

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg

Hamburg University of Applied Sciences

Masterarbeit

zum Thema

Methodenoptimierung und -validierung zur NIR-spektroskopischen Analyse von Schokolade, kakaohaltiger Fettglasur und Backmassen

im Studiengang

Master of Food Science

vorgelegt von

CHRISTINA KRABBE

1997264

Hamburg,

19. November 2015

Die Arbeit wurde erstellt und bearbeitet im



Institut für Hygiene und Umwelt

Hamburger Landesinstitut für Lebensmittelsicherheit,
Gesundheitsschutz und Umweltuntersuchungen

Erstgutachter: Prof. Dr. Jan Fritsche (HAW Hamburg)

Zweitgutachter: Dr. Bijan Kawiani (HU Hamburg)

Inhalt

Tabellenverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	VI
Formelverzeichnis.....	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
Statistische und mathematische Kenngrößen	IX
Danksagung	X
1 Einleitung.....	1
2 Problemstellung.....	2
3 Zielsetzung	3
4 Theorie	4
4.1 Validierung	4
4.2 Schokolade.....	5
4.2.1 Allgemeine Grundlagen	5
4.2.2 Fettgehalt	6
4.2.3 Theobromin/Coffein	9
4.2.4 Saccharose und Laktose	10
4.3 Kakaohaltige Fettglasur	11
4.3.1 Allgemeine Grundlagen und Abgrenzung zur Kuvertüre	11
4.3.2 Fettgehalt	11
4.3.3 Theobromin/Coffein	12
4.4 Marzipan/Persipan.....	13
4.4.1 Allgemeine Grundlagen	13
4.4.2 Verwendung und Differenzierung.....	14
4.5 IR-Spektroskopie	15
4.5.1 Allgemeine Grundlagen	15
4.5.2 NIR	16
4.5.3 MIR.....	17
5 Material.....	18
5.1 Schokoladenproben.....	18
5.2 Geräte und Materialien	18
6 Methoden.....	20
6.1 Analytische Methoden	20
6.1.1 Probenvorbereitung	20
6.1.2 HPLC.....	20

6.1.3	Gesamtfett nach Weibull-Stoldt	22
6.2	NIR	24
6.2.1	Probenvorbereitung	24
6.2.2	Probenmessung	24
6.3	MIR	25
6.3.1	Probenvorbereitung	25
6.3.2	Probenmessung	25
6.4	Methodenvalidierung	26
6.5	Statistische Auswertungsmethode	28
6.5.1	Korrelationen und Signifikanz	28
6.5.2	Ausreißertest nach Grubbs	29
6.5.3	Voraussetzungen statistische Tests.....	30
6.5.4	Hypothesentest/Signifikanztest.....	31
7	Ergebnisse.....	33
7.1	Quantitative Untersuchungen	33
7.1.1	Voraussetzungen und Validierungsparameter	33
7.1.2	Gesamtfett.....	34
7.1.3	Theobromin/Coffein	37
7.1.4	Saccharose	39
7.1.5	Laktose.....	42
7.2	Qualitative Untersuchungen.....	44
7.2.1	NIR	44
7.2.2	MIR.....	51
8	Diskussion	55
8.1	Referenzanalytik vs. NIR	55
8.2	NIR vs. MIR	57
9	Fazit.....	58
	Zusammenfassung	60
	Abstract	61
	Literaturverzeichnis.....	62
	Gesetze, Verordnungen und Richtlinien sowie Amtliche Untersuchungsverfahren.....	66
	Eidesstattliche Erklärung	67
	Anhang	A - N

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht Mindestanforderungen laut KakaoVO	5
Tabelle 2: Vergleich MIR- und NIR-Spektroskopie (Skoog, et al., 1992 S. 274)	16
Tabelle 3: Geräte und Hilfsmittel	19
Tabelle 4: Kalibrierlösungen.....	21
Tabelle 5: Einstellungen HPLC-Anlage	22
Tabelle 6: Zeiten Weibull-Stoldt	23
Tabelle 7: Stärke Korrelationskoeffizient r	28
Tabelle 8: Irrtumswahrscheinlichkeit p und ihre Bedeutung für die Signifikanz.....	29
Tabelle 9: Übersicht Bedingungen t-Test	32
Tabelle 10: Ermittelte Korrelationskoeffizienten	33

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Verarbeitungsschritte der Kakaoherstellung (Eigene Darstellung nach Eisenbrand, et al., 2006 S. 582)	6
Abbildung 2: Fettsäurezusammensetzung von Kakaobutter (Krist, 2013 S. 316)	7
Abbildung 3: Triglyceridzusammensetzung von Kakaobutter (Krist, 2013 S. 317).....	8
Abbildung 4: Strukturformel Theobromin und Coffein (Eigene Darstellung nach Schwedt, 2005 S. 213)	9
Abbildung 5: Lineare Regressionsgerade Gesamtfett	34
Abbildung 6: SPSS Output t-Test Gesamtfett	35
Abbildung 7: Lineare Regressionsgerade Theobromin/Coffein	37
Abbildung 8: SPSS Output t-Test Theobromin/Coffein.....	38
Abbildung 9: Lineare Regressionsgerade Saccharose.....	39
Abbildung 10: Lineare Regressionsgerade Saccharose nach Eliminierung der Ausreißer	40
Abbildung 11: SPSS Output t-Test Saccharose 2	41
Abbildung 12: Lineare Regressionsgerade Laktose	42
Abbildung 13: SPSS Output t-Test Laktose	43
Abbildung 14: Schokoladen & Fettglasur gesamt.....	45
Abbildung 15: Schokoladen & Fettglasuren – dunkel	46
Abbildung 16: Schokoladen & Fettglasuren – Vollmilch	48
Abbildung 17: Marzipan & Persipan	50
Abbildung 18: MIR-Spektrum Schokolade & Fettglasur.....	52
Abbildung 19: MIR-Spektrum Marzipan & Persipan	54

Formelverzeichnis

Formel 1: Berechnung fettfreie Kakaotrockenmasse.....	10
Formel 2: Berechnung Gesamtkakaotrockenmasse.....	10
Formel 3: Berechnung Gesamtfett	23
Formel 4: Reststandardabweichung.....	26
Formel 5: Verfahrensstandardabweichung.....	27
Formel 6: Verfahrensvariationskoeffizient	27
Formel 7: Wiederfindungsrate.....	27
Formel 8: Berechnung Korrelationskoeffizient.....	28
Formel 9: Ausreißertest nach Grubbs	29
Formel 10: Lineare Interpolation	30
Formel 11: Test auf Normalverteilung nach David	30
Formel 12: t-Test für abhängige Stichproben	31

Abkürzungsverzeichnis

BMEL	Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft
FFKTM	fettfreie Kakaotrockenmasse
FS	Fettsäure
GKTM	Gesamtkakaotrockenmasse
HPLC-DAD	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (Diodenarray Detektor)
HPLC-FI	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (Fluorimetrischer Reaktionsdetektor)
IR	Infrarot
LFGB	Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch
LM	Lebensmittel
LMIV	Lebensmittelinformationsverordnung
MIR	Mittleres Infrarot
MIRS	Spektroskopie im mittleren Infrarotbereich
NIR	Nahinfrarot
NIRS	Nahinfrarotspektroskopie
VO	Verordnung
VO (EG)/(EU)	Verordnung der Europäischen Gemeinschaft/Europäischen Union

Statistische und mathematische Kenngrößen

α	Signifikanzniveau (alpha)
H_0	Nullhypothese
H_1	Alternativhypothese
m	Steigung
n	Stichprobenumfang
p-Wert	Signifikanzwert/Irrtumswahrscheinlichkeit
Q	Prüfgröße des Ausreißertestes nach Grubbs
r	Korrelationskoeffizient
R^2	Bestimmtheitsmaß
s	Standardabweichung
s_{gr}	Reststandardabweichung
s_x	Verfahrensstandardabweichung
t	Prüfwert des t-Testes
V_{ko}	Verfahrensvariationskoeffizient
WFR	Wiederfindungsrate
\bar{x}/\bar{y}	Mittelwerte der Stichproben x bzw. y

Danksagung

Besonders danke ich Herrn Prof. Dr. Jan Fritsche für die Ermöglichung der Durchführung der Masterarbeit im Institut für Hygiene und Umwelt Hamburg (HU), was nur durch seinen persönlichen Einsatz und seiner Unnachgiebigkeit aufgrund bürokratischer Hürden erreichbar war. Ebenfalls bedanke ich mich für die Übernahme der Erstkorrektur dieser Arbeit, die freie Arbeitsgestaltung, gewährte Freiräume und Unterstützung

Mein Dank gilt ebenso Herrn Dr. Bijan Kawiani für die Stellung der spannenden Thematik, die Betreuung als Zweitkorrektor und die Unterstützung sowie für die Anregungen und wertvollen Ratschläge.

Weiter möchte ich Frau Ina Fuhlendorf, Frau Stefanie Zwergk, Frau Carolin von Rhein-Müller und Frau Inken Sandmann für die Unterstützung im Labor und bei den Analysen danken.

Ebenfalls bedanke ich mich bei Herrn Ehrhard Köhn für die statistischen Hinweise und Ratschläge.

Für das Korrekturlesen bedanke ich mich bei meinem Vater Lutz Krabbe und meiner Schwester Carina Krabbe.

Weiter möchte ich mich bei meiner Familie für die Ermöglichung des Studiums und den Rückhalt danken. Zudem danke ich meinen Freunden für die allgemeine Unterstützung sowie für die Präsenz und Hilfe bei Fragen und Unklarheiten.

1 Einleitung

Der Begriff Qualität beschreibt eine Eigenschaft eines Produktes und wird stets subjektiv beurteilt. Eine genaue und allgemeingültige Definition des Begriffes ist unzweckmäßig, da Qualität produktspezifisch ist und im Auge des Betrachters liegt (von Regius, 2006 S. 1). Die DIN EN ISO 9000:2000 beschreibt Qualität wie folgt: „*Vermögen einer Gesamtheit inhärenter (lat. innewohnend) Merkmale eines Produktes, eines Systems oder eines Prozesses zur Erfüllung von Forderungen von Kunden und anderen interessierten Parteien.*“ (Kamiske, et al., 2007 S. 176) (Klein, 2001 S. 316).

Die Qualitätsparameter von Schokolade werden im Wesentlichen durch Aussehen, Textur, Geschmack und Aroma definiert. Diese sensorischen Charakteristika werden durch die Behandlung von Kakao nach der Ernte (Fermentation, Trocknung) und den Fertigungsprozessen (Röstung, Raffination, Conchieren und Temperieren) hervorgerufen. Überdies bestimmt die finale Rezeptur, also die einzelnen Zutaten, die Produktqualität (Afoalwa, 2010 S. Chapter 5.3).

Mit einem Pro-Kopf-Konsum von 12,22 kg im Jahre 2013 liegt Deutschland im europäischen Vergleich auf Platz eins des Schokoladenverzehrs (Statista, 2015). Laut dem BDSI ist die Schokoladenproduktion im Jahre 2014 um 0,4 % auf 1,12 Mio. t im Vergleich zum Vorjahr gestiegen (BDSI, 2015).

Im Bereich der Lebensmittelanalytik werden im Institut für Hygiene und Umwelt Schokoladen und Backmassen auf ihre Bestandteile hin untersucht. Die notwendigen Analysen stellen sich als umfangreich und zeitaufwendig dar. Die Zusammensetzung von Schokolade ist eng an gesetzliche Vorschriften der Kakaoverordnung (KakaoVO) gebunden, welche die entsprechende Kategorisierung in Bezug auf die Verkehrsbezeichnung und Verkehrsfähigkeit vorgibt. Die Angaben im Rahmen der Etikettierung/Kennzeichnung werden analytisch auf ihre Richtigkeit hin überprüft, um die Vorgaben der VO (EG) 1169/2011 (LMIV) und den Schutz vor Täuschung nach Art. 7 LMIV in Verbindung mit § 11 LFGB zu gewährleisten. Ein weiterer Aspekt im Hinblick auf die Täuschung in der LM-Produktion ist das Inverkehrbringen/der Einsatz nachgemachter LM ohne ausreichende Kennzeichnung, was nach § 11 Abs. 2 Nr. 2 verboten ist. Im Bereich der Süßwaren, Backwaren und Schokoladen ist hier die Differenzierung zwischen Marzipan und Persipan sowie von Schokolade/Kuvertüre und kakaohaltiger Fettglasur von Interesse. In den Leitsätzen für Ölsamen und daraus hergestellte Massen und Süßwaren sind die Charakteristika von Marzipan und Persipan geregelt. In der Industrie-Richtlinie für Zuckerwaren werden Angaben für kakaohaltige Fettglasur wiedergegeben.

2 Problemstellung

Im Hinblick auf moderne Analyseverfahren, welche ohne eine Probenvorbereitung auskommen und zeitlich schnellere Arbeitsabläufe garantieren, können bereits mehrere Lebensmittel (LM) mit der Nahinfrarotspektroskopie (NIRS) valide untersucht werden. Fraglich ist hierbei, inwieweit mittels der Nahinfrarotspektroskopie ebenfalls zuverlässige Daten für die Analytik von Schokoladen gewonnen werden können. Im Vordergrund stehen hierbei der Gesamtfettgehalt sowie die Gehalte von Theobromin und Coffein. Mittels des Gesamtalkaloidgehaltes (Theobromin + Coffein) kann die fettfreie Kakaotrockenmasse (FFKTM) errechnet werden. Addiert mit dem Gesamtfettgehalt ergibt sich der Anteil an Gesamtkakaotrockenmasse (GKTM), welcher als Qualitätsmerkmal im Rahmen der Kennzeichnung der KakaoVO (§ 3 Abs. 4 Nr. 1) auf der Verpackung anzugeben ist. Im Rahmen der Methodenvalidierung werden auch die Anteile an Saccharose und Laktose einbezogen. Die Validierung der Laktosebestimmung bezieht sich produktspezifisch nur auf Milkschokoladen.

Weiterhin ist eine schnelle, analytische Unterscheidung von Schokolade/Kuvertüre und kakaohaltiger Fettglasur mittels der NIRS von Interesse, da hier qualitative Eigenschaften eine Rolle spielen und ebenfalls die Aspekte der Kennzeichnung und Täuschung berührt werden. Darüber hinaus wird die Möglichkeit der qualitativen Abgrenzung von Backmassen wie Marzipan und Persipan mit Hilfe der NIR-Analyse untersucht, welche regulär über den Gehalt an α - und γ -Tocopherol durch HPLC-FI erfolgt. Die gesetzliche Regulierung von Marzipan und Persipan ist in den Leitsätzen für Ölsamen und daraus hergestellten Massen und Süßwaren festgesetzt und ebenfalls ist der Schutz vor Täuschung nach § 11 LFGB an dieser Stelle maßgeblich.

Die Masterarbeit befasst sich mit der Validierung der NIR-Spektroskopie zur schnelleren Analytik von Schokolade und der Erstellung einer Methode zur Unterscheidung von Backmassen, um eine zeitnahe Überprüfung der Kennzeichnungs- und Qualitätsparameter zu ermöglichen.

3 Zielsetzung

Ziel der wissenschaftlichen Arbeit ist es Aussagen über die Analysemethode der NIR-Spektroskopie in Bezug auf die genannten Analyseparameter der Matrices treffen zu können. Die mittels NIR-Spektroskopie ermittelten Daten werden statistisch mit den Ergebnissen der Referenzanalyseverfahren verglichen. Anhand dessen wird beurteilt inwieweit sich die NIR-Spektroskopie für die Analyse der Lebensmittel Schokoladen und Backmassen eignet und valide Ergebnisse hervorbringt, sodass schnell entsprechende Aussagen über die Richtigkeit von deklarierten Produktmerkmalen getroffen werden können.

Eine schnellere Analysemethode stellt eine enorme Arbeitserleichterung dar und kann die Arbeitsabläufe deutlich beschleunigen. Dies ist aufgrund der hohen Anzahl an Produktproben äußerst dienlich. Einige Lebensmittel, wie z. B. Fleischprodukte/Fleischbrät können bereits zuverlässig mittels NIR auf die Zusammensetzung hin untersucht werden. Um dies auch für Schokoladen und Backmassen zu gewährleisten, kann anhand der statistischen Auswertung zwischen den Ergebnissen der standardisierten Analysemethoden und denen der NIR-Messung eine Validierung der Messmethode bzw. ein qualitativer Abgleich der Backmassen erfolgen, um diese zukünftig als zuverlässige Screeningmethode einsetzen zu können.

Die Methodenoptimierung zur qualitativen Differenzierung für Schokolade und kakaohaltiger Fettglasur sowie zwischen Marzipan und Persipan erfolgt über den Spektrenvergleich der NIRS. Zusätzlich werden die Proben im MIR-Bereich (400 – 4.000 nm) gemessen und die Spektren entsprechend verglichen. Maßgeblich ist hierbei nur, ob es erkennbar ist, dass es sich nicht um Schokolade bzw. Marzipan handelt und somit ein nachgemachtes LM vorliegt. Ob es sich schlussendlich um kakaohaltige Fettglasur bzw. Persipan handelt ist weniger relevant.

Die durch die Untersuchungen gewonnenen Erkenntnisse sind für das Institut von hohem Interesse.

4 Theorie

4.1 Validierung

Der Begriff Validierung wird seit ca. der 70er Jahren genutzt und bezeichnet allgemein die Prüfung auf Brauchbarkeit einer Methode. Nach der DIN EN ISO/IEC 17025:2005 lautet die Definition für Validierung wie folgt: „(...) ist die *Bestätigung durch Untersuchung und Bereitstellung eines Nachweises, dass die besonderen Anforderungen für einen speziellen beabsichtigten Gebrauch erfüllt werden.*“ Validierung gilt als ein wichtiges Element in der Qualitätssicherung. Die Ausführung gestaltet sich im Einzelnen zweck- und produktspezifisch und bereits validierte Methoden sind regelmäßig zu kontrollieren, um die notwendige Ergebnissicherheit zu erreichen (Kromidas, 1999 S. 9). Nachfolgende Punkte zählen zu den grundlegenden Komponenten der Validierung:

- Untersuchung von Fakten
- Nachweis nachvollziehbarer Kriterien
- Validierung als zielgerichtete Prüfung
- Definition des Methodenhintergrundes
- Eindeutige Prüfdefinition festlegen
- Ermittelte Daten als Grundlage der Methodenbrauchbarkeit nutzen
- Dokumentation aller relevanter Informationen

Der Prozess der Validierung folgt keiner festgelegten Checkliste sondern wird analysespezifisch durchgeführt, d. h. Umfang und Durchführungsbedingungen hängen vom beabsichtigten Zweck ab, sollten aber zudem in einem angemessenen Verhältnis zu den Forderungen stehen. Grundsätzlich werden nach der DIN EN ISO/IEC 17025:2005 völlige Durchführungsfreiheiten überlassen, solange laut der Definition „die besonderen Forderungen für einen speziellen, beabsichtigten Gebrauch“ festgelegt sind und eine fachgerechte Durchführung garantiert werden kann (Kromidas, 1999 S. 10). Abschließend erfolgt eine geeignete statistische Auswertung der ermittelten Datensätze.

Im nachfolgenden Theorieabschnitt werden grundlegende, untersuchungsrelevante Eigenschaften der analysierten Lebensmittel Schokolade, kakaohaltige Fettglasur sowie Marzipan und Persipan, welche im Titel als Backmassen bezeichnet werden, wiedergegeben.

4.2 Schokolade

4.2.1 Allgemeine Grundlagen

Nach Anlage 1 Nr. 3 der KakaoVO ist unter Schokolade folgendes zu verstehen: „*Erzeugnis aus Kakaoerzeugnissen und Zuckerarten, das (...) mindestens 35 % Gesamtkakaotrockenmasse, davon mindestens 18 % Kakaobutter und mindestens 14 % fettfreie Kakaotrockenmasse, enthält.*“ Das heißt, in der KakaoVO sind die qualitätsgebenden Bestandteile durch die Angabe von Mindestgehalten definiert. Die festgelegten Mindestanforderungen beziehen sich lediglich auf den reinen Schokoladenanteil im Produkt, welcher durch die entsprechenden Zutaten der Anlage 1 KakaoVO charakterisiert ist (BDSI, 2014 S. 10 f.). Tabelle 1 zeigt beispielgebend einen Auszug der Mindestanteile einzelner Inhaltsstoffe einiger Kakaoerzeugnisse gemäß der KakaoVO (Anlage 1 KakaoVO).

Tabelle 1: Übersicht Mindestanforderungen laut KakaoVO

	Gesamt-kakao-trocken-masse	Kakao-butter	Fettfreie Kakaotrockenmasse	Milch-trockenmasse	Milch-fett	Gesamt-fett
Schokolade	35 %	davon mindestens				
		18 %	14 %			
Zart-/Halbbitter-Schokolade*	50 %	26 %	14 %			
Bitterschokolade*	60 %	26 %	14 %			
Schokoladen-Kuvertüre	35 %	31 %	2,5 %			
Milchschokolade	25 %		2,5 %	14 %	3,5 %	25 %
Weißer Schokolade		20 %		14 %	3,5 %	

* nicht definiert in der KakaoVO; Anforderungen ergeben sich aus der Verkehrsauffassung bzw. den Usance der deutschen Industrie (BDSI, 2014 S. 30)

Deutlich wird hier, dass der Anteil der GKTm mindestens ein Viertel ausmacht (bei Milchschokolade). Der Gehalt der FFKTM kann zwischen den einzelnen Schokoladen stark variieren, beträgt aber mindestens 2,5 %. Ausgenommen davon ist die weiße Schokolade, welche lediglich aus Kakaobutter, Milchbestandteilen und Zucker besteht und somit keinerlei Kakaoanteil enthält.

Abbildung 1 zeigt die einzelnen Verarbeitungsprozesse der Kakaoherstellung und verdeutlicht die Gewinnung der separaten Zwischen- und Endprodukte. Zur Herstellung von Schokoladenerzeugnissen werden Kakaomasse, Kakaopulver und Kakaobutter unter Zugabe von Zucker vermengt, gewalzt und conchiert. Die so entstandene Schokoladenmasse wird anschließend geformt, gekühlt und verpackt (Schünemann, et al., 2009 S. 379).

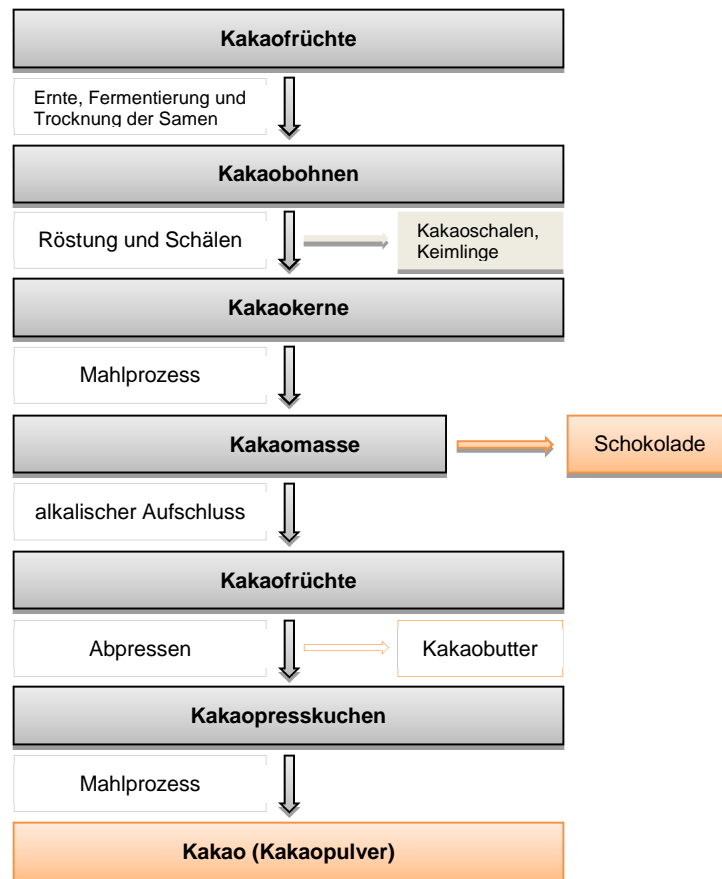


Abbildung 1: Verarbeitungsschritte der Kakaoherstellung (Eigene Darstellung nach Eisenbrand, et al., 2006 S. 582)

4.2.2 Fettgehalt

Wie bereits genannt, äußert sich der Fettgehalt von Schokolade als Kakaobutter. Diese wird durch Auspressen der Kakaofrüchte oder Teilen davon gewonnen (vgl. Abbildung 1) (Anlage 1 KakaoVO). Kakaobutter ist eine Schlüsselkomponente von Schokolade und prägt die sensorischen Charakteristika nennenswert. In Abbildung 2 sind die einzelnen Fettsäuren (FS) von Kakaobutter aufgelistet. Aufgrund der speziellen Zusammensetzung der Triglyceride werden die typischen Schmelzeigenschaften hervorgerufen, welche die Qualität maßgeblich beeinflussen (Garti, et al., 2012 S. vii). Entscheidend ist hier ein hoher Gehalt an symmetrischen, einfach ungesättigten Triglyceriden (Eisenbrand, et al., 2006 S. 583).

Fettsäurezusammensetzung

Fettsäuren	Gehalt in % nach Roth und Kormann (2000, S. 128)	Gehalt in % nach Firestone (1999, S. 28)	Gehalt in % nach augustus-oils.ltd.uk, 01.09.05
Myristinsäure	–	0,1	–
Palmitinsäure	24–32	25–27	27,3
Palmitoleinsäure	–	0,1–0,3	–
Margarinsäure	–	0,1	–
Stearinsäure	31–38	31–37	34,7
Ölsäure	30–38	31–35	32,5
Linolsäure	1,4–4,2	2,8–4,0	2,5
α -Linolensäure	–	0,1	–
Arachinsäure	–	0,2–1,0	–
Oleodistearin	10	–	–
Oleopalmitin	52	–	–
Oleodipalmitin	6	–	–
Stearodiolein	12	–	–
Palmitodiolein	9	–	–

Abbildung 2: Fettsäurezusammensetzung von Kakaobutter (Krist, 2013 S. 316)

Abbildung 3 zeigt die typische Triglyceridzusammensetzung von Kakaobutter, wodurch ein Schmelzpunkt von 30 – 35 °C vorliegt. Da Kakaobutter aufgrund der bezeichnenden Eigenschaften ein sehr teures Fett darstellt, bekommen Kakaobutteraustauschfette (Cocoa butter substitutes, CBS) zunehmende Bedeutung. Diese Austauschfette lassen sich in zwei Gruppen klassifizieren: Kakaobutteräquivalente (Cocoa butter equivalents, CBE) und Kakaobutterersatzfette (Cocoa butter replacers, CBR). Die Kakaobutteräquivalente (z. B. Palmöl, Shea, Mangokern) zeigen eine ähnliche FS-Zusammensetzung und Glyceridstruktur wie Kakaobutter auf und können somit den Kakaobutteranteil in Kakaoerzeugnissen zum Teil ersetzen, ohne erheblich negative Auswirkungen auf Sensorik und Verarbeitung hervorzurufen. Im Gegenzug dazu weisen Kakaobutterersatzfette deutliche Unterschiede in FS-Zusammensetzung und Glyceridstruktur auf. Diese Fette finden überwiegend in Süßwaren und kakaohaltigen Erzeugnissen durch eine vollständige Substitution von Kakaobutter Verwendung. Dazu zählen z. B. Kokos- und Palmkernfett (Krist, 2013 S. 318 f.).

Triglyceridzusammensetzung

Triglyceride	Gehalt in % nach Karleskind (1996, S. 209)	Gehalt in % nach Firestone (1999, S. 138)
OOL	0,1–0,2	–
POL	0,3–2,5	–
PPL	1,5–2,5	1–2
OOO	0,2–2,0	–
SOL	0,3–1,0	–
POO	1,5–7,0	3–4
PSL	2,5–3,5	3
PPO+MSO	14–21	14–18 (ohne MSO)
PPP	0,1–0,2	–
PMgO	0,1–0,3	–
SOO	2,0–9,0	3–6
SSL	1,5–2,0	2
PSO	32–41	36–40
PPS	0,3–0,6	1
MgSO	0,1–0,3	–
AOO	0,2–0,5	–
SSO	20–30	23–26
PSS+APP	0,2–1,0	1 (ohne APP)
SAO	0,8–1,5	1–2
SSS+PSA	0,1–0,5	–
AOP	–	0–1

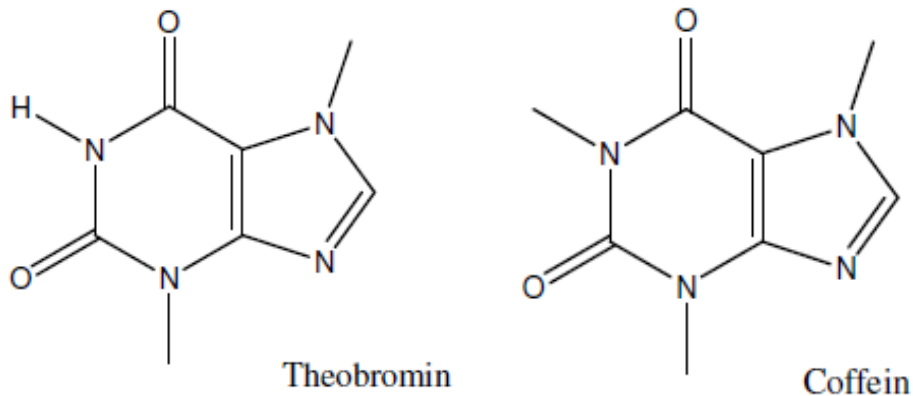
Abbildung 3: Triglyceridzusammensetzung von Kakaobutter (Krist, 2013 S. 317)

Nach § 2 Abs. 1 Nr. 1 der KakaoVO dürfen neben Kakaobutter auch sechs pflanzliche Fette bis insgesamt maximal 5 % des Enderzeugnisses unter Beibehaltung der Mindestgehalte an Kakaobutter oder Gesamtkakaotrockenmasse als Zutat in Schokoladen verwendet werden. Zu den zugelassenen tropischen Pflanzenfetten gehören: Illipe (auch Borneo-Talg oder Tengkwang), Palmöl, Sal, Shea, Kokum gurgi und Mangokern. Deren Einsatz ist nach Anlage 2 Nr. 1 der KakaoVO an bestimmte Bedingungen geknüpft. Der Einsatz anderer Fette ist gemäß § 3 Abs. 4 Nr. 4 der KakaoVO mit dem Hinweis "enthält neben Kakaobutter auch andere pflanzliche Fette" zu kennzeichnen. Diese Fette kategorisieren die Kakaobutteräquivalente (Fischer, et al., 2015 S. 119).

Bei den zu untersuchenden Schokoladenproben wird davon ausgegangen, dass diese ausschließlich Kakaobutter als Fettbestandteil enthalten und die ermittelten Fettgehalte somit reine Kakaobuttermengen darstellten. Dieser Parameter wird weiter als „Gesamtfett“ bezeichnet.

4.2.3 Theobromin/Coffein

Theobromin (3, 7-Dimethylxanthin) und Coffein (1, 3, 7-Trimethylxanthin) sind Alkaloide, welche zu der Gruppe der Methylxanthine gehören. Sie kommen in geringen Mengen in Kakao und somit in Schokoladenerzeugnissen vor, weisen eine leicht anregende Wirkung auf den menschlichen Körper auf und sind für den bitteren Geschmack von Kakao verantwortlich (Matissek, et al., 2014 S. 380) (Garti, et al., 2012 S. 4). Abbildung 4 zeigt die Skelettformeln und nennt weitere Eigenschaften beider Methylxanthine (Schwedt, 2005 S. 213).



- Hauptalkaloid des Kakaos
 - wird hauptsächlich aus Schalen der Kakaobohne gewonnen
 - wirkt gefäßerweiternd und anregend auf den Herzmuskel
 - schwächere Wirkung als die des Coffeins
- findet sich in Kaffeebohnen, im schwarzen Tee, in Mate-Tee, in Cola und Kakaobohnen
 - anregenden Wirkung auf Herztätigkeit, Stoffwechsel, Atmung, Blutdruck

Abbildung 4: Strukturformel Theobromin und Coffein (Eigene Darstellung nach Schwedt, 2005 S. 213)

Die Gehalte an Theobromin und Coffein in Schokoladen werden generell über die Peakflächen der HPLC-DAD ermittelt. Die Peaks zeigen sich nach stoffspezifischen Retentionszeiten im Chromatogramm und können manuell nachintegriert werden. Anhand der aus Standardlösungen gewonnenen Kalibriergeraden, kann die genaue Berechnung der Gehalte erfolgen (Matissek, et al., 2014 S. 382).

Der Gehalt beider Stoffe kann in Summe zur Abschätzung der fettfreien Kakaotrockenmasse (FFKTM) herangezogen werden. Der Gehalt der FFKTM kann nicht direkt berechnet werden, sondern wird mit Hilfe der Gehalte der Methylxanthine und eines Faktors für diese Indikatorsubstanzen abgeschätzt (Formel 1) (Matissek, et al., 2014 S. 385). Dieser Faktor eignet sich jedoch nur bedingt für die Berechnung. Bei Mischungen verschiedener Kakaosorten lässt sich der Gehalt mittels des allgemeinen Faktors recht gut angeben, jedoch bei höherwertigen Produkten, bei denen nur eine einzige Sorte Kakao verwendet wurde, empfiehlt sich ein spezieller Faktor für die jeweilige Kakaosorte. Der allgemeine Faktor weist einen Schwankungsbereich zwischen 2,5 und 3,4 auf (BDSI, 2014 S. 11).

Die GKTM stellt sich als Summe aus wasserfreier Kakaomasse, wasserfreiem Kakaopulver und Kakaobutter dar, also als Addition der FFKTM und Kakaobutter (Formel 2) (BDSI, 2014 S. 13).

Formel 1: Berechnung fettfreie Kakaotrockenmasse

$$FFKTM \left[\frac{g}{100 g} \right] = \frac{(G_T + G_C) \cdot 100}{F}$$

$G_T + G_C =$ Summe Gehalt Theobromin + Coffein in g

$F =$ Faktor 2,5 – 3,4

Formel 2: Berechnung Gesamtkakaotrockenmasse

$$GKTM \left[\frac{g}{100 g} \right] = FFKTM + KB$$

$FFKTM =$ berechneter Gehalt an fettfreier Kakaotrockenmasse

$KB =$ Gehalt an Kakaobutter (Gesamtfett)

4.2.4 Saccharose und Laktose

Je nach Schokoladenart variiert der Gehalt an Saccharose und kann bis zu 50 % betragen (Eisenbrand, et al., 2006 S. 1045). Der Zusatz von Saccharose verleiht der Schokolade ihren süßen Geschmack. Aufgrund der hydrolytischen Spaltung enthalten die fermentierten Kakaobohnen nur noch Spuren von Saccharose, wodurch die Kakaomasse einen extrem bitteren Geschmack aufweist (Schwedt, 2005 S. 212).

Laktose findet sich produktcharakteristisch nur in Milch- und Sahneschokoladen sowie in weißer Schokolade durch den Zusatz an Milchbestandteilen (Milch-, Sahne- oder Molkenpulver) wieder. Der Gehalt liegt je nach Rezeptur bis zu 10 % bei Sahne- und Milchsokoladen, bei Weißer bis zu 14 % (Eisenbrand, et al., 2006 S. 1045).

4.3 Kakaohaltige Fettglasur

4.3.1 Allgemeine Grundlagen und Abgrenzung zur Kuvertüre

Kakaohaltige Fettglasur zählt zu den Zuckerwaren und enthält mindestens 5 % Kakaopulver und davon mindestens 4 % FFKTM (BDSI, 2014 S. 10). Außerdem heißt es in der Richtlinie für Zuckerwaren in Abschnitt C Nr. 5.11: „Bei mit Schokoladenarten verwechselbaren Erzeugnissen wird das Wort Schokolade, Schoko, Choc u. ä. nicht verwendet“ (BDSI, 2012 S. 6). Kakaohaltige Fettglasur findet überwiegend bei der Herstellung von Dauerbackwaren, Feinbackwaren und Speiseeis Verwendung und kann ggf. mit Kakaoerzeugnissen verwechselt werden (Eisenbrand, et al., 2006 S. 1210). Demzufolge ist dies nach Abschnitt I Nr. 8 der Leitsätze für Feine Backwaren mit einem entsprechenden Hinweis zu kennzeichnen (z. B. "mit kakaohaltiger Fettglasur") bzw. die Bezeichnung des Lebensmittels adäquat zu wählen, um somit nach § 11 Abs. 2 Nr. 2a LFGB den Schutz vor Täuschung über nachgemachte LM sicherzustellen.

Entsprechend der Begriffsbestimmung für Schokoladenüberzugsmassen, auch bezeichnet als Kuvertüre, nach Anlage 1 Nr. 3b der KakaoVO müssen mindestens 35 % Gesamtkakaotrockenmasse, davon mindestens 31 % Kakaobutter und mindestens 2,5 % fettfreie Kakaotrockenmasse, in Schokoladenkuvertüre enthalten sein. Erzeugnisse, die diesen Kakaoerzeugnissen ähnlich sind, aber nicht den genannten Begriffsdefinitionen der KakaoVO entsprechen, dürfen nicht mit den geschützten Begriffen bezeichnet werden.

4.3.2 Fettgehalt

Übersteigt der Anteil an pflanzlichen, zugesetzten Fetten aus denen in Anlage 2 der KakaoVO aufgeführten Fetten die 5 %-Höchstmenge, so handelt es sich um ein Erzeugnis aus kakaohaltiger Fettglasur. Dies ist entsprechend zu kennzeichnen (BDSI, 2014 S. 6). Ebenfalls können hier auch andere Fette eingesetzt werden, wie z. B. gehärtetes Erdnuss- oder Kokosfett. Durch den Fettaustausch und dem damit verbundenen, veränderten Schmelzverhalten, wird eine weichere oder festere Konsistenz erzielt. Welches Fett eingesetzt wird richtet sich nach den charakteristischen Anforderungen an das Endprodukt (Eisenbrand, et al., 2006 S. 1210).

4.3.3 Theobromin/Coffein

Die Verwendung von Kakaopulver in kakaohaltiger Fettglasur trägt dazu bei, dass die Methylxantine Theobromin und Coffein ebenfalls in kakaohaltiger Fettglasur enthalten sind. Allerdings liegen wesentlich geringere Gehalte derer vor als in Schokolade, da lediglich mindestens 4 % FFKTM im Vergleich zu 14 % bei Schokolade enthalten sein müssen (BDSI, 2012 S. 6). Bei Kuvertüre und kakaohaltiger Fettglasur können die Gehalte ähnlich ausfallen bzw. die von Fettglasur höher sein, da bei Kuvertüre alleinig 2,5 % FFKTM vorgegeben sind (Anlage 1 Nr. 3 KakaoVO).

Analytisch erfolgt die Differenzierung zwischen Schokolade/Kuvertüre und kakaohaltiger Fettglasur anhand der Fettsäurezusammensetzung der zuvor umgeesterten Triglyceriden mittels der Gaschromatographie. Hierbei kann die qualitative und quantitative Zusammensetzung von tierischen und pflanzlichen Fetten/Ölen über Fettsäurespektren nachgewiesen werden (Matissek, et al., 2014 S. 233).

Der nachfolgende Abschnitt bezieht sich auf die in der Thematik genannten und untersuchten Backmassen, welche hier Marzipan und Persipan darstellen.

4.4 Marzipan/Persipan

4.4.1 Allgemeine Grundlagen

Marzipan und Persipan sind, nach Nr. II Abschnitt C Buchstabe b der Leitsätzen für Ölsamen und daraus hergestellten Massen und Süßwaren, Fertigerzeugnisse aus einer Mischung von aus Ölsamen hergestellten Rohmassen und höchstens der gleichen (Marzipan) bzw. 1,5fachen (Persipan) Gewichtsmenge Zucker. Die Rohmassen zeigen folgende Zusammensetzungen (Hoffmann, et al., 2002 S. 171 ff.):

- Marzipanrohmasse: Masse aus geschälten Mandeln, max. 35 % zugesetztem Zucker und mind. 28 % Mandelöl. Mit einem Feuchtigkeitsgehalt von höchstens 17 %. Entbitterte bittere Mandeln oder Bergmandeln werden nicht verwendet.
- Persipanrohmasse: Masse aus geschälten, ggf. entbitterten bitteren Mandel-, Aprikosen- oder Pfirsichkernen und max. 35 % zugesetztem Zucker. Mit einem Feuchtigkeitsgehalt von höchstens 20 %. Es erfolgt die Zugabe von 0,5 % Stärke als Indikator.

(Nr. II Abschnitt B Leitsätzen für Ölsamen und daraus hergestellten Massen und Süßwaren).

Diese Rohmassen dienen wiederum als Grundlage für die entsprechenden Fertigerzeugnisse Marzipan und Persipan, welche sich wie folgt zusammensetzen:

- Marzipan: Masse aus Marzipanrohmasse und max. der gleichen Gewichtsmenge Zucker. Es kann eine teilweise Ersetzung des Zuckers durch Glukosesirup und/oder Sorbit erfolgen.
- Persipan: Masse aus Persipanrohmasse und max. der 1,5fachen Menge Zucker, dieser kann auch hier teilweise durch Glukosesirup und/oder Sorbit ersetzt werden.

Die genauen Angaben über den Einsatz von Glukosesirup und Sorbit finden sich unter Nr. II Abschnitt C Buchstabe b) Leitsätzen für Ölsamen und daraus hergestellten Massen und Süßwaren.

4.4.2 Verwendung und Differenzierung

Die Rohmassen als auch die daraus hergestellten Fertigerzeugnisse werden überwiegend in Back- und Süßwaren verarbeitet. Persipan ist ein nachgemachtes Lebensmittel und kann mit Marzipan verwechselt werden, weshalb eine entsprechende Kennzeichnung nach § 11 Abs. 2 Nr. 2a LFGB zu erfolgen hat (Schünemann, et al., 2009 S. 380 f.). Bei Feinen Backwaren ist der Einsatz von Persipan zu kennzeichnen, wenn nach der Verkehrsauffassung eine Verwendung dessen nicht üblich ist (Abschnitt. I Nr. 9 Leitsätze für Feine Backwaren).

Analytisch erfolgt die Unterscheidung von Marzipan und Persipan über die Tocopherolgehalte mittels HPLC-FI. Mandeln weisen einen Gehalt von 96 – 100 % an α -Tocopherol auf und Aprikosenkerne indes 94 – 98 % an γ -Tocopherol (Frede, 2006 S. 685).

4.5 IR-Spektroskopie

4.5.1 Allgemeine Grundlagen

Allgemein dient die Infrarotspektroskopie der Identifizierung und der Strukturaufklärung chemischer Verbindungen. Im Vergleich zu den üblichen Analysemethoden minimiert sich der Zeitaufwand für die IR-Spektroskopie wesentlich, überdies ist eine geringere Menge Probenmaterial notwendig und weder Lösemittel noch andere Chemikalien sind erforderlich (Schulz, 1995 S. 163). Die IR-Spektroskopie wird genutzt, um die Zusammensetzung unterschiedlicher Lebensmittel zu analysieren und kann sowohl bei Flüssigkeiten, Pasten als auch Pulvern zur Untersuchung verwendet werden. Beispielsweise können die chemischen Bestandteile wie Protein, Wasser und Fett zeitgleich erfasst werden. Voraussetzung ist, wie grundsätzlich bei Analysen, lediglich die Homogenität der Probe.

IR-Strahlen weisen das Vermögen auf, Atome bzw. Atomgruppen von Molekülen in Schwingungen zu versetzen, aufgrund der elektromagnetischen Wellen. Dieser Vorgang ist darauf begründet, dass die Abstände der Atome Gleichgewichtslagen einnehmen und nicht fest fixiert vorliegen (Schulz, 1995 S. 164). Das im Spektrophotometer auf die Probe einfallende Licht wird absorbiert, reflektiert oder auch gestreut. Die in das Untersuchungsmaterial eingedrungene Strahlung tritt in Wechselwirkungen mit den Atomen bzw. Molekülen der Substanz, wird zum Teil absorbiert und versetzt diese somit in Schwingungen. Mittels eines Detektors wird das reflektierte Licht gemessen und in ein Messsignal umgewandelt, welches die Absorptionsintensität wiedergibt. Anhand der einzelnen Molekülschwingungen, welche durch das energiereiche IR-Licht in der Probe hervorgerufen werden, entstehen materialspezifische Absorptionsspektren, über welche Rückschlüsse auf die Bestandteilemengen gezogen werden. Das heißt, die Quantität des absorbierten Lichtes der unterschiedlichen Wellenlängen gleicht unmittelbar der Anzahl an chemischen Molekülen, wie O-H, C-H und N-H (Gottwald, et al., 1997 S. 158).

Insbesondere wird die IR-Spektroskopie für die Strukturaufklärung und zur qualitativen Analyse organischer Substanzen genutzt. Grundlegende Thematiken wie unter anderem die Prüfung zweier Materien auf Wesensgleichheit (Vergleich Probe und Referenzsubstanz) spielen eine nennenswerte Rolle (Gottwald, et al., 1997 S. 152). Die mittels der IR-Spektroskopie gewonnenen Spektren werden oftmals unterschiedlich dargestellt. Für gewöhnlich erfolgt die Darstellung der Absorption über der Wellenzahl. Die mittlere und die Nahinfrarotspektroskopie unterscheiden sich in erster Linie in der eingesetzten Wellenlänge der auf die Probe einwirkenden Strahlung. Tabelle 2 verdeutlicht die Unterschiede in Zahlenwerten.

Tabelle 2: Vergleich MIR- und NIR-Spektroskopie (Skoog, et al., 1992 S. 274)

	Wellenzahl $\tilde{\nu}$ in cm^{-1} ($= \frac{1}{\lambda}$)	Wellenlänge λ in μm	Frequenz f in Hz
NIR	12.500 – 4.000	0,8 – 2,5	$3,8 \cdot 10^{14}$ – $1,2 \cdot 10^{14}$
MIR	4.000 – 400	2,5 – 25	$1,2 \cdot 10^{14}$ – $6,0 \cdot 10^{12}$

4.5.2 NIR

Teye, et al. (2014) definiert die NIRS wie folgt: *“Near infrared spectroscopy (...) is an advanced analytical tool. It is fast, simple, non destructive and does not involve chemical use and elaborate sample preparation.”* Dies verdeutlicht präzise die Vorteile der NIRS im Vergleich zu den einzelnen Analysen der nasschemischen Referenzanalytik.

In vielen Bereichen wird die NIR-Spektroskopie bereits zuverlässig verwendet und ist eine hilfreiche Screeningmethode im Bereich der Qualitätssicherung in der Lebensmittelindustrie (da Costa Filho, 2009 S. 1). Aus den gemessenen Daten können direkt mehrere qualitative und quantitative Parameter abgeleitet werden, wie z. B. Wasser-, Fett-, Proteingehalt, Feuchte, Trockenmasse, Coffein- und Alkoholgehalt (Matissek, et al., 2014 S. 84). Der Einsatz von Schnellmethoden wie der NIR-Spektroskopie soll die nasschemische Referenzanalytik nicht ersetzen, sondern stellt eine weniger aufwendige Alternative dar, welche gleichermaßen aussagekräftige Ergebnisse liefern soll.

Aktuelle Arbeiten zeigen, dass bereits Kakao/Schokolade und deren Analytik durch NIRS erforscht werden. Von da Costa Filho (2008) ist der Nachweis von Saccharose in Schokolade untersucht worden, Davies et al. (1991) analysierte die Qualität von Schokolade mittels NIRS, die Arbeit von Moros et al. (2006) bezieht sich auf die ernährungsphysiologischen Parameter in Schokolade und Krähmer et al. (2014) analysierten die biochemischen Qualitätsparameter in Kakao mit Hilfe der Nahinfrarotspektroskopie.

4.5.3 MIR

Ebenfalls wird die Strahlung im mittleren Infrarotbereich für die Analytik von Lebensmitteln eingesetzt. Nach Wilson (1990) zeigen sich deutliche Vorteile gegenüber der NIRS, wie unter anderem die bessere Auflösung der Bandendarstellung, welche somit eindeutiger spezifischen chemischen Gruppen zugeordnet werden können. Ein limitierender Aspekt sind oftmals die physikalischen und chemischen Eigenschaften von Lebensmitteln bzw. deren Zusammensetzung. Viele LM sind undurchsichtig und/oder enthalten viel Wasser, wodurch die Strahlung sehr stark absorbiert wird (Wilson, 1990 S. 127).

Die MIR-Spektroskopie wird gleichermaßen zu quantitativen als auch qualitativen Identifizierung organischer Verbindungen eingesetzt. Die MIR-Spektren können hier sehr gut verglichen werden, da sie viele Absorptionsminima und -maxima aufweisen. Das Spektrum des mittleren Infraroten Lichtes von organischen Verbindungen liefert einen eindeutigen „Fingerabdruck“ („Fingerprint“), mit welchem Stoffe direkt charakterisiert und verglichen werden können (Skoog, et al., 1992 S. 274). Dieser Fingerprintbereich liegt unterhalb von 1.500 bis ca. 1.000 cm^{-1} (Günzler, et al., 2003 S. o. S.).

Auch im Bereich der MIRS zeigen sich aktuelle Arbeiten in Verbindung mit der Untersuchung von Lebensmitteln. Maurer et al. (2012) z. B. untersucht die Möglichkeit der schnellen Beurteilung von Qualitätsparameter von Kakaobutter mittels MIR-Strahlung, Koca et al. (2010) versucht mittels der MIRS die Erkennbarkeit der Verfälschung von Butter durch Margarine und Che Man et al. (2005) analysierten die Nachweisbarkeit der Untermischung von Schmalz zu Schokoladen und Schokoladenerzeugnissen.

5 Material

5.1 Schokoladenproben

Die Schokoladen, welche im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, stammen aus dem LM-Einzelhandel und waren/sind gewöhnliche Untersuchungsproben im HU. Diese sind von 2014 bis März 2015 zusammengekommen und umfassen 104 Proben. Bei der Untersuchung auf Laktose werden lediglich 39 Milch-/Sahneschokoladen einbezogen. Bis dato sind die Proben bei Raumtemperatur gelagert worden.

Für die qualitative Differenzierung mittels Infrarotspektroskopie werden sechs Proben kakaohaltige Fettglasur, wovon fünf für die Messungen im LM-Einzelhandel gekauft werden, und die genannten Schokoladen sowie vier Proben Marzipan und eine Probe Persipan verwendet, welche ebenfalls vom HU zur Verfügung gestellt werden.

5.2 Geräte und Materialien

Die anzuwendenden Methoden der nasschemischen Analysen finden sich in der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsmethoden nach § 64 LFGB. Angegeben sind diese unter dem spezifischen Kennbuchstaben (L) und unter der erzeugniskennzeichnenden Warengruppe. Innerhalb dieser Gruppe erfolgt die weitere Kennzeichnung durch eine nach dem jeweiligen Veröffentlichungsdatum geordnete fortlaufende Nummer. In den Arbeitsanleitungen sind genaue Angaben zu Zweck und Anwendungsbereich der Methoden, Begriffsbestimmungen, Kurzbeschreibungen zu Chemikalien, Geräten und Hilfsmitteln, zur Probenentnahme, Durchführung, Auswertung und der Zuverlässigkeit der Methode aufgeführt. Eine zusätzliche Auflistung der dafür benötigten Chemikalien und Materialien erfolgt hier nicht, sie werden in der Beschreibung der analytischen Methoden unter Punkt 6.1 genannt. Es werden die Untersuchungen gemäß der Amtlichen Methodensammlung auf Theobromin und Coffein als Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Fettanalysen erfolgen als Einfachbestimmung.

Verwendete Anlagen, Geräte und Hilfsmittel sind nachfolgend in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Geräte und Hilfsmittel

Gerät	Herstellerangaben
HPLC-Anlage Dionex UltiMate 3000	Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co. KG Saarbrückener Straße 248 38116 Braunschweig
NIRFlex N-500 Solids	BÜCHI Labortechnik AG 9230 Flawil 1 Schweiz
MIR Agilent 660 FT-IR Spectrometer GoldenGate ATR Einheit (Software Agilent Resolutions Pro Software)	Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co. KG Herrenberger Strasse 130 71034 Böblingen
Trockenschrank Heraeus T 5042 E	Heraeus electronic Heraeus Deutschland GmbH & Co. KG Heraeusstraße 12 - 14 63450 Hanau
Petrischalen aus Glas mit Deckel Ø 10 cm	DURAN Group GmbH Otto-Schott-Straße 21 97877 Wertheim/Main
Teigschaber 20 cm	-
Foss-Extraktor Soxtec 2050, Twisselmann-Prinzip	FOSS Analytical 69, Slangergade 3400 Hilleroed Dänemark

6 Methoden

Bereitstehende, handelsübliche Schokoladenproben sind bereits mittels NIRS analysiert worden (80) und 24 neue Proben werden im Rahmen dieser Arbeit noch gemessen. Die so ermittelten Daten werden bezüglich der Parameter Gesamtfett, Theobromin-/Coffeingehalt, Saccharose und Laktose verwendet. Es erfolgt eine manuelle Bestimmung aller Proben mittels Referenzmethodik. Der Gesamtfettgehalt der Schokoladen wird nach Weibull-Stoldt ermittelt und die Gehalte an Theobromin und Coffein werden über HPLC-DAD erfasst. Die anzuwendenden Methoden entsprechen denen nach § 64 LFGB.

6.1 Analytische Methoden

6.1.1 Probenvorbereitung

Für die nasschemischen Analysen werden die Schokoladen wie folgt vorbereitet: Die Schokoladenproben werden zur besseren Verarbeitung für mindestens 10 min in ein Tiefkühlfach gestellt und anschließend mit einer handelsüblichen Küchenreibe, welche ebenfalls im Tiefkühlfach gelagert wird, fein gerieben. Die zerkleinerte Schokolade wird im Probenbehälter im Kühlschrank gelagert. Dadurch wird eine feste Konsistenz der feinen Partikel gewährleistet und ein Verkleben dieser aufgrund einer warmen Umgebungstemperatur verhindert.

6.1.2 HPLC

Eluent

Als Eluent A dient 0,02 mol/L (1,5416 g/L) Ammoniumacetat p.a. Der pH-Wert wird mit 50 %iger Essigsäure auf 4,75 eingestellt und anschließend im Verhältnis 95:5 mit Methanol angesetzt. Für die HPLC-Grade wird 100 % Methanol als Eluent B eingesetzt. Die Eluenten werden jeweils 10 min mit Helium entgast.

Stammlösung und Kalibrierlösungen

Zunächst wird die Coffein-Stammlösung angesetzt. Dafür werden 100 mg Coffein auf 0,1 mg genau in einen 100-mL-Messkolben eingewogen, 85 mL Ethanol (96 %ig) zugegeben und im siedendem Wasserbad gelöst. Nach dem Abkühlen wird bei 20 °C mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt.

Für die Theobromin/Coffein-Stammlösung werden 65 mg Theobromin auf 0,1 mg genau in einen 100-mL-Messkolben eingewogen, 80 mL Ethanol zugefügt und im siedenden Wasserbad gelöst. Nach Temperieren der Lösung auf 20 °C werden 10 mL der Coffein-Stammlösung in den Messkolben pipettiert und bis zur Marke mit Reinstwasser aufgefüllt.

Für die Kalibrierlösungen werden folgende, in Tabelle 4 aufgelisteten Verdünnungen der Theobromin/Coffein-Stammlösung angesetzt. Nach Zugabe der Stammlösung werden die Messkolben bis zur Marke mit Reinstwasser aufgefüllt. Die Verdünnungslösungen werden ebenfalls in Vials abgefüllt, versiegelt und tiefgekühlt.

Tabelle 4: Kalibrierlösungen

Verdünnung	Volumen Stamm-lösung [mL]	Volumen Mess-kolben [mL]	Gehalt Theo-bromin [mg/L]	Gehalt Cof-fein [mg/L]
V1	24	50	312,0	48,0
V2	18	50	234,0	36,0
V3	12	50	156,0	24,0
V4	6	50	78,0	12,0
V5	0,5	250	1,3	0,2

Probenmesslösungen

Zur Herstellung der Probenmesslösungen (Doppelbestimmung) werden pro Probe jeweils 1,0 g auf 0,1 mg genau in einen 100-mL-Messkolben eingewogen und mit 70 mL siedendem Reinstwasser suspendiert. Es folgt die Weiterbehandlung in einem siedenden Wasserbad für 20 min unter gelegentlichem Umschwenken. Die Probenlösungen müssen sauer sein (Kontrolle mit pH-Papier). Nach Abkühlen auf Raumtemperatur werden jeweils 1 mL der Carrez-Lösungen I und II zu pipettiert und nach jeder Zugabe umgeschwenkt. Der Messkolben wird bei 20 °C mit Reinstwasser bis zur Marke aufgefüllt und der Inhalt durch einen Faltenfilter filtriert. Ca. 1,5 mL der Messlösung werden über einen Membranfilter (0,45 µm) in Vials aus Glas überführt und mit einer Verschlusskappe mit Septum versiegelt. Die befüllten Vials werden bis zur HPLC-Messung im Tiefkühler bei –18 °C gelagert.

Die HPLC-Messungen erfolgen am unter Punkt 5.2 genannten Autosampler. Es wird mit der Equilibrierung der Anlage begonnen indem das Purgeventil geöffnet und ca. 5 min gespült wird, sodass sich keine Luftblasen mehr im System befinden (Ventil verschließen). Zudem wird die Spritze drei Mal gespült und das gesamte System für 30 – 45 min mit den Eluenten A und B im Verhältnis 50:50 gespült. Mit folgenden Einstellungen (Tabelle 5) werden anschließend die Proben gemessen:

Tabelle 5: Einstellungen HPLC-Anlage

Parameter	Einstellungen
Stationäre Phase	Kieselgelsäule
Detektor	UV/VIS
Wellenlänge	274 nm
Druck	~ 238 bar
Injektionsvolumen	0,5 µL
Fluss	0,5 mL/min
Laufzeit	34 min
Verhältnis Eluenten A:B	95:5

Die Kalibrierung der Standards erfolgt über das Computerprogramm basierend auf den eingegebenen Konzentrationen. Der Gehalt beider Methylxanthine der gemessenen Proben kann somit direkt über das Computerprogramm berechnet werden. Hierfür werden die einzelnen Einwaagen der Proben im Programm hinterlegt.

6.1.3 Gesamtfett nach Weibull-Stoldt

Aufschluss

Für die Fettanalyse werden 4 – 5 g vorbereitetes Probenmaterial in ein hohes 400-mL-Becherglas eingewogen, mit 45 mL kochendem, destilliertem Wasser mittels eines Glasstabes homogen suspendiert und mit 55 mL Salzsäure (8 mol/L) aufgefüllt. Das Becherglas wird mit einem Magnetrührstäbchen versehen und mit einem Uhrglas bedeckt. Der Glasstab wird im Becherglas belassen. Nun wird die Suspension auf einem Magnetrührer unter ständigem Rühren bis zum leichten Sieden erhitzt.

Der so angesetzte Aufschluss erfolgt für 60 min. Anschließend wird die Aufschlussflüssigkeit durch einen mit destilliertem Wasser befeuchteten Faltenfilter filtriert und mehrmals das Becherglas sowie Uhrglas und Glasstab mit heißem destillierten Wasser nachgespült, bis das Filtrat säurefrei ist (pH-Kontrolle). Die Faltenfilter werden möglichst kompakt zusammen gefaltet und in das zum Aufschluss verwendete Becherglas gestellt. Es folgt die Trocknung zunächst für 30 min bei Raumtemperatur und anschließend für 3 h bei 103 °C ± 2 °C im Trockenschrank.

Die Extraktionskolben (Aluminiumbecher zugehörig zum Foss Soxtec) werden mit einigen entfetteten Siedeperlen für 1 h im Trockenschrank bei 103 °C ± 2 °C vorgetrocknet. Nach Abkühlen im Exsikkator werden diese auf 1 mg genau ausgewogen.

Der getrocknete Faltenfilter wird nochmals zusammengefaltet und in die Extraktionshülse gegeben, das Aufschlussbecherglas und der Glasstab mit entfetteter Watte und Petrolether gründlich ausgewischt und auf den Filter in die Hülse gegeben. Es folgt die Extraktion im Foss-Extraktor (Soxtec 2050, Twisselmann-Prinzip) mit folgenden, in Tabelle 6 angegebenen, Eigenschaften.

Tabelle 6: Zeiten Weibull-Stoldt

Parameter	Kriterium
Temperatur	115 °C
Extraktionsmittel	80 mL Petroleumbenzin
Flüssigextraktion	45 min
Dampfextraktion	105 min
Destillation, Abblasen	18 min
Abschluss	1 min

Nach abgeschlossener Extraktion werden die Kolben abermals bei $103\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ für 1 h im Trockenschrank getrocknet. Nach Abkühlen im Exsikkator werden diese genau gewogen. Es folgt die Berechnung des Fettgehaltes in Prozent nach Formel 3.

Formel 3: Berechnung Gesamtfett

$$\text{Fettgehalt } w \text{ [\%]} = \frac{(m_2 - m_1) \cdot 100}{m_0}$$

m_0 = Einwaage Probe

m_1 = Kolben mit Siedeperlen vor Extraktion

m_2 = Kolben mit Siedeperlen nach Extraktion

6.2 NIR

6.2.1 Probenvorbereitung

Für die Probenmessung mit dem NIRFlex N-500, werden die Schokoladenproben mit einem Messer oder durch Brechen grob zerkleinert und ggf. sorgfältig von Füllungen oder Zusätzen getrennt. Die reine Schokolade, auf welche sich die Angabe der GKTM auf der Verpackung bezieht, wird in einem Plastikprobenbehälter überführt, beschriftet und verschlossen. Es folgt die Lagerung über mindestens 8 h im Trockenschrank bei 45 °C. Für die Messungen von kakaohaltigen Fettglasuren wird analog verfahren.

6.2.2 Probenmessung

Zur Messung wird die im Trockenschrank geschmolzene Schokolade durch Rühren mit einem kleinen Teigschaber homogenisiert, gleichmäßig in eine Petrischale aus Glas überführt (ca. 50 g) und mit einem entsprechenden Deckel bedeckt. Die Petrischale wird für mindestens 5 min in den Trockenschrank (45 °C) gestellt, um die Temperatur der Proben sicherzustellen. Aus dem Trockenschrank wird die Petrischale auf die Messvorrichtung des NIR-Gerätes gestellt, die Probedaten im Computer-Programm eingetragen und die Messung über den Computer gestartet. Es erfolgt eine Zweitmessung nach Drehung der Petrischale auf dem Probenhalter um ca. 90° im Uhrzeigersinn. Die quantitativen Messergebnisse werden direkt vom Programm angezeigt und es erfolgt ein automatischer Ausdruck über die Analyseparameter.

Für die qualitativen Messungen wird ebenso verfahren. Hier werden die erhaltenen Spektren zur Auswertung genutzt. Die Marzipan- und Persipanproben werden durch kontrolliertes Kneten homogenisiert und die weiche Masse auf den Boden der Petrischale gleichmäßig verteilt, sodass die gesamte Fläche lückenlos und ebenmäßig bedeckt ist.

Nach jeder erfolgten Messung wird das Spektrum der Probe direkt in dem Computerprogramm angezeigt. Auch hier wird anschließend eine zweite Messung durchgeführt, nachdem die Petrischale um gut 90° gedreht wird, sodass pro Untersuchungsprobe zwei Spektren erhalten werden. Die Darstellung der einzelnen Spektren lässt sich über das Computerprogramm nicht farblich variieren, weshalb eine manuelle Markierung auf den Ausdrucken erfolgt.

Die Spektren werden lediglich qualitativ verglichen über die optische Betrachtung, evtl. Rückschlüsse auf das Vorliegen bestimmter funktioneller Gruppen in den Proben erfolgt hier nicht.

6.3 MIR

6.3.1 Probenvorbereitung

Ein Vorteil der MIR-Messung ist, dass absolut keine Probenvorbereitung zu erfolgen hat. Die Proben können sofort gemessen werden. Aufgrund der Probenaufbewahrung im Tiefkühler bei -18 °C , ist das Temperieren auf 20 °C notwendig. Dies erfolgt über Nacht bei Raumtemperatur.

6.3.2 Probenmessung

Für die Messung wird eine sehr kleine Menge Probenmaterial (ca. $V = 3 \times 3 \times 3\text{ mm}^3$) auf die Messvorrichtung gegeben und mit der Anpressvorrichtung fixiert und angedrückt. Über das Computerprogramm wird die Messung gestartet. Nach jeder Messung wird das aktuelle Spektrum angezeigt. Durch das Markieren mehrerer Proben kann eine gemeinsame Darstellung erfolgen und gespeichert werden.

Ebenfalls werden an dieser Stelle keine Vermutungen, auf vorliegende Inhaltsstoffe der Proben anhand der Spektren, aufgestellt.

6.4 Methodenvalidierung

Im Rahmen der Methodenvalidierung ist die Qualität der mittels NIRS gewonnenen Ergebnisse zu bestimmen und zu beurteilen. Die Ergebnisse der nasschemischen Analysen gelten an dieser Stelle vergleichend als Referenzwerte (Sollwerte). Für diese Prüfung eignet sich die Einbeziehung relevanter Validierungskenngrößen, mit welchen die Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit der Methode geprüft wird. Zu diesen Validierungsparametern zählen die Präzision und die Richtigkeit einer Methode. Die Präzision stellt das Maß für die Streuung der Einzelergebnisse dar und wird über die Standardabweichung und die relative Standardabweichung (Variationskoeffizient) bestimmt (Kromidas, 1999 S. 52). Die Richtigkeit gilt als Maß für die Übereinstimmung der Messwerte gegenüber einem Sollwert (Referenzwert). Hierzu wird die Betrachtung der Wiederfindungsrate eingesetzt (Funk, et al., 1992 S. 138). Die Berechnung der Kenngrößen erfolgt über nachfolgend aufgelistete Formeln:

Reststandardabweichung s_{gr}

Die Reststandardabweichung entspricht der Standardabweichung, berechnet aus den Zahlenwerten der Reste und stellt demnach ein Maß für die Streuung der Messwerte um die Regressionsgerade dar (Kromidas, 1999 S. 153).

Formel 4: Reststandardabweichung

$$s_{gr} = \sqrt{\frac{Q_y - m \cdot Q_{xy}}{n - 2}}$$

$$Q_y = \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2$$

$$Q_{xy} = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})$$

m = Steigung der Geraden

n = Stichprobenumfang

Oder mittels der Excelfunktion STFEHLERYX

Verfahrensstandardabweichung s_x

Die Verfahrensstandardabweichung ist ein Maß für die Leistungsfähigkeit einer Methode und wird mit Hilfe der Reststandardabweichung und der Steigung (Empfindlichkeit) berechnet (Kromidas, 1999 S. 164)

Formel 5: Verfahrensstandardabweichung

$$s_x = \frac{s_{gr}}{m}$$

s_{gr} = Reststandardabweichung

m = Steigung der Geraden

Verfahrensvariationskoeffizient V_{ko}

Der Verfahrensvariationskoeffizient wird auch als relative Standardabweichung bezeichnet und stellt ein relatives Maß für zufällig auftretende Abweichungen der Messwerte zum Mittelwert dar. Die Angabe erfolgt üblicherweise in Prozent (Cleff, 2015 S. 58).

Formel 6: Verfahrensvariationskoeffizient

$$V_{ko} = \frac{s_x}{\bar{x}} \cdot 100 \%$$

s_x = Verfahrensstandardabweichung

\bar{x} = Mittelwert

Wiederfindungsrate WFR

Die Wiederfindungsrate gibt das Verhältnis des gemessenen Wertes zum richtigen Wert (Referenz) an und gilt als Beurteilungsaspekt für die Richtigkeit einer Methode (Matissek, et al., 2014 S. 22).

Formel 7: Wiederfindungsrate

$$WFR = \frac{y_{ist}}{x_{soll}} \cdot 100 \%$$

y_{ist} = gemessener Ist – Wert

x_{soll} = Referenzwert

6.5 Statistische Auswertungsmethode

Die Auswertungen erfolgen mit Windows Microsoft Excel 2010 und IBM SPSS Statistic Version 22.

6.5.1 Korrelationen und Signifikanz

Mittels der Zusammenhangsanalyse wird geprüft, ob zwischen zwei Variablen ein linearer Zusammenhang (Korrelation) besteht und ob die Unterschiede zwischen den Ergebnissen zufällig auftreten (Signifikanz).

Zur Ermittlung der Korrelation wird der Korrelationskoeffizient r herangezogen, welcher als dimensionsloses Maß für den Grad eines linearen Zusammenhanges zwischen zwei Variablen gilt. Dieser kann Werte zwischen $+1$ und -1 annehmen, wobei Werte nahe $+1$ für eine hohe positive Korrelation und Werte nahe -1 für eine hohe negative Korrelation sprechen. Ein Korrelationskoeffizient von 0 weist keinerlei linearen Zusammenhang zweier Variablen nach. Die in Tabelle 7 angegebenen Wertebereiche für den Korrelationskoeffizienten dienen der Orientierung und Interpretation (Quatember, 2008 S. 71). Angaben zur Berechnung finden sich im nachfolgenden Abschnitt (7).

Tabelle 7: Stärke Korrelationskoeffizient r

bis 0,2	bis 0,5	bis 0,7	bis 0,9	über 0,9
sehr geringe Korrelation	geringe Korrelation	mittlere Korrelation	hohe Korrelation	sehr hohe Korrelation

Zur Ermittlung des Korrelationskoeffizienten werden die NIR-Ergebnisse visuell mittels des Programms Microsoft Excel über den Ergebnissen der nasschemischen Analysen aufgetragen, eine lineare Trendlinie eingefügt und die Funktionsgleichung sowie das Bestimmtheitsmaß angezeigt. Der Korrelationskoeffizient r errechnet sich aus der Wurzel des Bestimmtheitsmaßes R^2 (Formel 8).

Formel 8: Berechnung Korrelationskoeffizient

$$r = \sqrt{R^2}$$

$R^2 = \text{Bestimmtheitsmaß}$

Die Berechnung der Irrtumswahrscheinlichkeit p erfolgt parallel zum t-Test im Programm SPSS. Durch diese Zahl wird ausgedrückt, wie groß die Wahrscheinlichkeit einer fälschlich angenommen zufälligen Verteilung der erfassten Mittelwerte ist. Je geringer die Irrtumswahrscheinlichkeit ausfällt, umso höher ist die konkrete Qualität der Informationen. Es gelten folgende Zusammenhänge, wie sie in Tabelle 8 aufgelistet sind (Oestreich, et al., 2014 S. 262) (Precht, et al., 2005 S. 216).

Tabelle 8: Irrtumswahrscheinlichkeit p und ihre Bedeutung für die Signifikanz

$p > 0,5$	$p \leq 0,5$	$p \leq 0,01$	$p \leq 0,001$
nicht signifikant	signifikant	sehr signifikant	höchst signifikant

6.5.2 Ausreißertest nach Grubbs

Aufgrund der natürlichen Streuung von Messwerten können bei Messreihen Werte auftreten, welche auffällig von den anderen Daten, genauer gesagt vom Mittelwert, abweichen. Diese Werte werden als Ausreißer bezeichnet und können auf verschiedene statistische Parameter erheblichen Einfluss haben, d. h. die Parameter sind empfindlich gegenüber Ausreißern. Zudem gilt der Einbezug von Ausreißern als nicht repräsentativ und Ergebnisdaten werden verfälscht (Kromidas, 1999 S. 67). Diesbezüglich wird anhand der Regressionsgeraden visuell eine Untersuchung auf derartig abweichende Werte durchgeführt. Die vermuteten Ausreißerdaten werden mittels des Grubbs-Testes darauf hin geprüft, ob diese tatsächlich als Ausreißer einzustufen sind und somit nicht in die weiteren Auswertungen einbezogen werden (Funk, et al., 1992 S. 19). Die Formel zur Prüfung auf Ausreißer nach Grubbs lautet wie folgt (Formel 9):

Formel 9: Ausreißertest nach Grubbs

$$Q = \frac{|x^* - \bar{x}|}{s}$$

x^* = Ausreißer verdächtiger Wert

\bar{x} = Mittelwert aller Daten

s = Standardabweichung aller Daten

Der mittels angegebener Formel berechnete Wert Q wird mit dem kritischen Wert der Tabelle nach Grubbs bei entsprechendem Stichprobenumfang verglichen. Es gilt: $Q \geq Q_{Tabelle}$, so liegt ein Ausreißer auf dem entsprechenden Signifikanzniveau vor.

Für nicht in den verwendeten Statistiktabelle aufgeführte Stichprobenumfänge bzw. Freiheitsgrade wird mittels linearer Interpolation (Formel 10) gearbeitet (Oestreich, et al., 2014 S. 216) (Pesch, 2009 S. 167). Gilt entsprechend für nachfolgenden Test.

Formel 10: Lineare Interpolation

$$y = y_1 + \frac{y_2 - y_1}{x_2 - x_1} \cdot (x - x_1)$$

$x_1/x_2 =$ angegebene Stichprobenumfänge n bzw. Freiheitsgrade f

$y_1/y_2 =$ entsprechende Tabellenwerte

6.5.3 Voraussetzungen statistische Tests

Zur Festlegung der geeigneten Analyseverfahren sind zwei Aspekte von Bedeutung: Das Vorhandensein von intervallskalierten Variablen und das Vorliegen einer Normalverteilung (Janczyk, et al., 2013 S. 52). Aufgrund der Messwertangaben als metrisch prozentuale Gehalte, wird die erste Bedingung erfüllt. Zur Prüfung der zweiten Bedingung werden die Werte der jeweils ausgewählten Variablen mittels des Schnelltests auf das Vorliegen einer Normalverteilung nach David überprüft (Kromidas, 1999 S. 77). Dies errechnet sich nach folgender Formel 11:

Formel 11: Test auf Normalverteilung nach David

$$\text{Prüfgröße} = \frac{R}{s}$$

$R =$ Spannweite (Range) = größter Wert – kleinster Wert

$s =$ Standardabweichung

Dieser Wert wird mit den Werten für die obere und untere Grenze aus der David-Tabelle (vgl. Anhang Anlage 6) verglichen. Liegt der errechnete Wert zwischen den Grenzwerten, liegt auf dem entsprechenden Signifikanzniveau eine Normalverteilung vor (Kromidas, 1999 S. 54 f.). Für Stichprobenumfängen von $n \geq 30$ sind die Information über die Art der Verteilung weniger relevant, da aufgrund des zentralen Grenzwertsatzes von normalverteilten Stichproben ausgegangen werden kann (Oestreich, et al., 2014 S. 272). Die Prüfung auf das Vorliegen normalverteilter Daten ist demnach nicht zwangsläufig erforderlich, da viele Testverfahren zusätzlich relativ robust gegen eine Verletzung der Annahme einer Normalverteilung sind und sich die resultierende Verteilung bei steigender Anzahl von Werten an eine Normalverteilung anpasst (Kronthaler, 2014 S. 162).

6.5.4 Hypothesentest/Signifikanztest

Mittels des zweiseitigen t-Tests (Student-Test) für gepaarte (abhängige) Stichproben wird überprüft, ob die Mittelwerte beider Analysemethoden jeweils der gleichen Grundgesamtheit entstammen und somit die Analysemethoden die gleichen Ergebnisse liefern (Kromidas, 1999 S. 88). Die nasschemischen Analysen dienen als Referenzmethode und stellen demnach die Sollgehalte dar. Dieser Test entspricht somit dem Differenzen-t-Test und es werden die Ergebnisse der NIR-Messungen (Stichprobe y) von denen der Nasschemie (Stichprobe x) subtrahiert (Kromidas, 1999 S. 94 f.). Voraussetzung hierfür ist, dass die Stichprobendifferenzen normalverteilt sind. Normalverteilung der einzelnen Stichproben heißt nicht, dass die Paardifferenzen ebenfalls normalverteilt sind (Bruhn, 1986 S. 159). Demzufolge wird der Schnelltest auf Normalverteilung für die Differenzen zwischen den Stichproben durchgeführt (Anlage 4).

Als Nullhypothese (H_0) wird je Untersuchungsparameter angenommen, dass die Mittelwertdifferenz der Stichproben gleich null ist und der kalkulierte Unterschied zwischen den Mittelwerten zufällig auftritt ($H_0: \bar{x} - \bar{y} = 0$). Die Alternativhypothese oder Gegenhypothese (H_1) besagt, dass die Mittelwertdifferenzen ungleich null sind ($H_1: \bar{x} - \bar{y} \neq 0$). Folglich ergibt sich daraus eine zweiseitige (ungerichtete) Fragestellung: Die Differenzen der Mittelwerte können größer oder kleiner Null sein.

Aufgrund der Relevanz der in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse und zukünftig erfolgenden Analysen im Institut für Hygiene und Umwelt, wird das Signifikanzniveau α auf 0,1 % festgelegt und es ergibt sich eine statistische Sicherheit $(1 - \alpha)$ von 99,9 %.

Der nach Formel 12 errechnete t-Wert wird mit dem Wert aus der t-Tabelle für $f = n - 1, \alpha = 0,1 \%$ verglichen (vgl. Anhang Anlage 7). Es gilt: $|t_{berechnet}| \leq t_{Tabelle}$, so gibt es mit der entsprechenden Wahrscheinlichkeit (99,9 %) keinen signifikanten Unterschied zwischen den Mittelwerten beider Methoden. Die Methoden können entsprechend als gleichwertig betrachtet werden (Kromidas, 1999 S. 95).

Formel 12: t-Test für abhängige Stichproben

$$t = \frac{|\bar{x} - \bar{y}|}{s_{\Delta}} \cdot \sqrt{n}$$

\bar{x} = Mittelwert der Referenzanalytik

\bar{y} = Mittelwert der NIR – Messungen

s_{Δ} = Standardabweichung der Differenzen

n = Stichprobenumfang

Eine übersichtliche Zusammenfassung aller Bedingungen für den hier relevanten t-Test sind in Tabelle 9 aufgelistet.

Tabelle 9: Übersicht Bedingungen t-Test

Nullhypothese	$H_0: \bar{x} - \bar{y} = 0$
Alternativhypothese	$H_1: \bar{x} - \bar{y} \neq 0$
Signifikanzniveau	$\alpha = 0,1 \% \text{ bzw. } 0,001$
Testgröße	$t = \frac{ \bar{x} - \bar{y} }{s_{\Delta}} \cdot \sqrt{n}$
Kritischer Wert	$t_{1-\frac{\alpha}{2}}$
H_0 annehmen, wenn	$ t_{\text{berechnet}} \leq t_{\text{kritisch}}$

Aufgrund des Vorliegens einer zweiseitigen Alternativhypothese gilt für den kritischen t-Wert der t-Tabelle eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $1 - \frac{\alpha}{2} \rightarrow 0,05 \% (99,95 \%)$, sofern eine zweiseitige Abgrenzung nicht angegeben ist. Die im Anhang unter Anlange 7 beige-fügte Tabelle kritischer t-Werte berücksichtigt die zweiseitige Fragestellung der Gegenhypothese (o. V., 2015 S. 480).

Alternativ oder zusätzlich zum Vergleich der errechneten Prüfgröße t mit dem kritischen Tabellenwert kann auch anhand der Irrtumswahrscheinlichkeit p eine Entscheidung bezüglich der Hypothesen getroffen werden. Fällt die von SPSS ausgegebene Irrtumswahrscheinlichkeit (Sig. 2-seitig) kleiner als das vorher festgelegte Signifikanzniveau α aus, wird die Nullhypothese abgelehnt. Demnach gilt: H_0 verwerfen, wenn $p < \alpha$. Mittels des Wertes p wird die tatsächliche Wahrscheinlichkeit für das Auftreten der berechneten Testgröße t unter Gültigkeit der Nullhypothese angegeben (Oestreich, et al., 2014 S. 268) (Kronthaler, 2014 S. 162).

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Betrachtung des Konfidenzintervalls der Differenzen, welches eine Spanne wiedergibt, in welcher mit der festgelegten Sicherheit der wahre Mittelwert der Differenzen liegt. Umfasst dieser Bereich den Wert null, kann die Nullhypothese nicht abgelehnt werden, da eine Mittelwertdifferenz von null in der Population nicht ausgeschlossen werden kann (Rasch, et al., 2014 S. 61).

7 Ergebnisse

7.1 Quantitative Untersuchungen

7.1.1 Voraussetzungen und Validierungsparameter

Beim Verdacht auf Ausreißer wurde dies mittels des genannten Ausreißertests nach Grubbs überprüft und bestätigte Ausreißer aus den entsprechenden Stichproben entfernt.

Die Prüfung auf Normalverteilung der Differenzwerte mittels des Schnelltestes nach David ergibt für alle Parameter normalverteilte Datensätze. Eine detaillierte Ergebnisauflistung erfolgt im Anhang (Anlage 4).

Folgende, in Tabelle 10, aufgelistete Korrelationskoeffizienten ergeben sich für die jeweiligen untersuchten Parameter.

Tabelle 10: Ermittelte Korrelationskoeffizienten

Parameter	Korrelationskoeffizient r
Gesamtfett	0,9716
Theobromin/Coffein	0,9495
Saccharose	0,9730
Laktose	0,0686

Verglichen mit der Einordnung nach Tabelle 7, ergeben sich für die Parameter Gesamtfett, Theobromin/Coffein und Saccharose sehr hohe Korrelationen zwischen den nasschemischen Analysen und den NIR-Messungen. D. h. es liegt jeweils ein sehr hoher linearer Zusammenhang zwischen den ermittelten Daten der Parameter vor. Die ermittelten Korrelationen sind jeweils auf dem 0,001 Niveau zweiseitig höchst signifikant (vgl. SPSS Output).

Für Laktose ergibt sich ein Korrelationseffizient von 0,0686. Hier liegt kein signifikanter linearer Zusammenhang zwischen den ermittelten Werten vor. Dies ist auch deutlich in der grafischen Darstellung der Messergebnisse (Abbildung 12) zu erkennen.

Im Folgenden wird näher auf die einzelnen relevanten Ergebnisse der untersuchten Parameter eingegangen. Nicht jeder Wert der SPSS-Daten wird einbezogen.

7.1.2 Gesamtfett

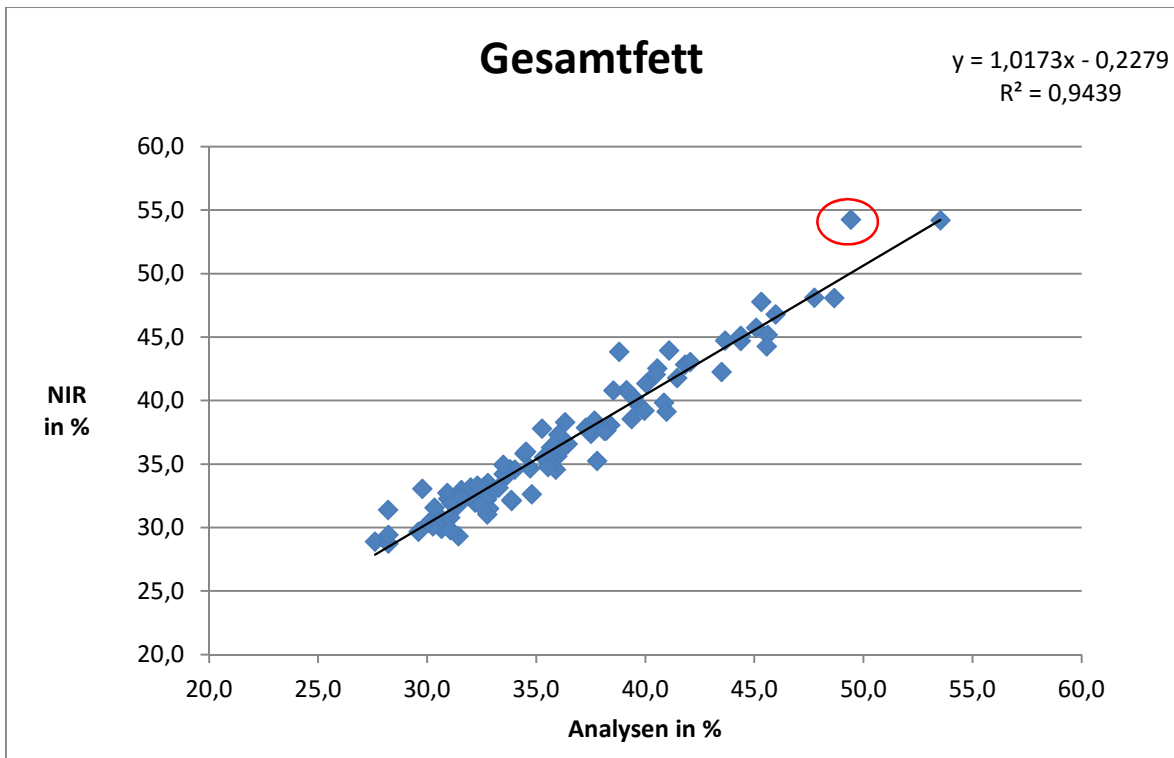


Abbildung 5: Lineare Regressionsgerade Gesamtfett

Die Werte für die Fettgehalte der einzelnen Schokoladen liegen im Bereich zwischen ca. 26 und knapp 55 %, welche den gängigen Fettgehalten entsprechen. Die meisten der untersuchten Schokoladenproben weisen einen Fettanteil zwischen rund 29 und 40 % auf.

In der Grafik der Regressionsanalyse von Gesamtfett (Abbildung 5) ist deutlich ein stetiger Verlauf der Datenpunkte zu erkennen. Die einzelnen Messwerte streuen nur gering oberhalb und unterhalb um die Ausgleichsgerade. Hier kann ein monoton steigender linearer Zusammenhang zwischen beiden Messwerten angenommen werden, was durch die Berechnung des Korrelationskoeffizienten (Formel 8) bestätigt wird. Der Korrelationskoeffizient von gerundet 0,972 weist die sehr hohe Stärke des linearen Zusammenhanges nach. Ebenso wird das errechnete Zusammenhangsmaß von dem SPSS Output (Abbildung 6) angegeben. Die Korrelation zwischen den Messdaten wird durch die Formel $y = 1,0173x - 0,2279$ beschrieben und mit ihr ca. 94 % der Varianz von y erklärt (R^2 /Erklärungsgehalt). Die Steigung beträgt beinahe 1 und stellt somit näherungsweise die Winkelhalbierende des Diagrammes dar. Der y-Achsenabschnitt von 0,2279 liegt nah bei null, so dass sich nahezu die Beziehung $y = x$ vermuten lässt.

Der in Abbildung 5 markierte Datenpunkt fällt bei der Betrachtung der Punktwolke direkt auf und könnte einen Ausreißerwert darstellen. Zur Überprüfung der Vermutung wird an dieser Stelle der Test auf Ausreißer nach Grubbs (Formel 9) angewandt. Es errechnet sich für diesen Datenpunkt eine Prüfgröße von 3,411, welche den kritischen Wert der Grubbs-Tabelle für $n = 104$ von 3,911 unterschreitet. Demzufolge handelt es sich hierbei nicht um einen Ausreißer und der Stichprobenumfang von $n = 104$ kann beibehalten werden und wird im Folgenden zur statistischen Auswertung genutzt.

Statistik für Stichproben mit paarigen Werten

	Mittelwert	H	Standard- abweichung	Standardfehler Mittelwert
Gesamtfett Analysen	36,1315	104	5,23381	,51322
NIR	36,5301	104	5,48123	,53748

Korrelationen für Stichproben mit paarigen Werten

	H	Korrelation	Sig.
Gesamtfett Analysen & NIR	104	,972	,000

Test für Stichproben mit paarigen Werten

	Paarige Differenzen					t	df	Sig. (2-sei- tig)
	Mittel- wert	Standard- abweichung	Standard- fehler Mittelwert	99,9% Konfidenz- intervall der Differenz				
				Unterer	Oberer			
Gesamtfett Analysen - NIR	-,39856	1,30195	,12767	-,83103	,03391	-3,122	103	,002

Abbildung 6: SPSS Output t-Test Gesamtfett

In den hier wiedergegebenen SPSS-Daten in Abbildung 6 zeigt sich ein Mittelwert der Differenzen zwischen den Analyse-Ergebnissen und den NIR-Ergebnissen der Fettgehalte von $-0,39856$, d. h., dass die NIR-Ergebnisse im Mittel um den Wert $0,39856$ höher ausfallen als bei den nasschemischen Untersuchungen. Die Standardabweichung der Differenzen von gerundet $1,3$ gibt an, dass die einzelnen Daten um diesen Faktor durchschnittlich um den Differenzenmittelwert schwanken.

Der kalkulierte t-Wert des Differenzen-t-Testes ergibt einen Betrag von $3,122$. Wird dieser mit dem kritischen Wert der t-Tabelle bei entsprechenden Freiheitsgraden und Signifikanzniveau verglichen, ergibt sich $|-3,122| < 3,3885$. Demzufolge, dass der berechnete t-Wert den der Tabelle unterschreitet, kann die Nullhypothese nicht abgelehnt werden und der auftauchende Unterschied zwischen den Mittelwerten erfolgt zufällig.

Die gleiche Erkenntnis liefert auch der Vergleich des p-Wertes mit dem festgelegten Signifikanzniveau α . Da $p > \alpha$ ($0,002 > 0,001$), kann die Nullhypothese ebenfalls nicht verworfen werden. Mit einer Wahrscheinlichkeit von 99,9 % liegt der wahre Wert im Konfidenzintervall zwischen $-0,83103$ und $0,03391$. Die Tatsache, dass das Intervall den Wert von null einschließt, deutet darauf hin, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen den analysierten Mittelwerten gibt. Das Ergebnis des t-Testes ist auf dem 0,01-Niveau zweiseitig sehr signifikant. Die Wahrscheinlichkeiten einen t-Wert $\geq |-3,122|$ zu erhalten beträgt 0,2 %.

7.1.3 Theobromin/Coffein

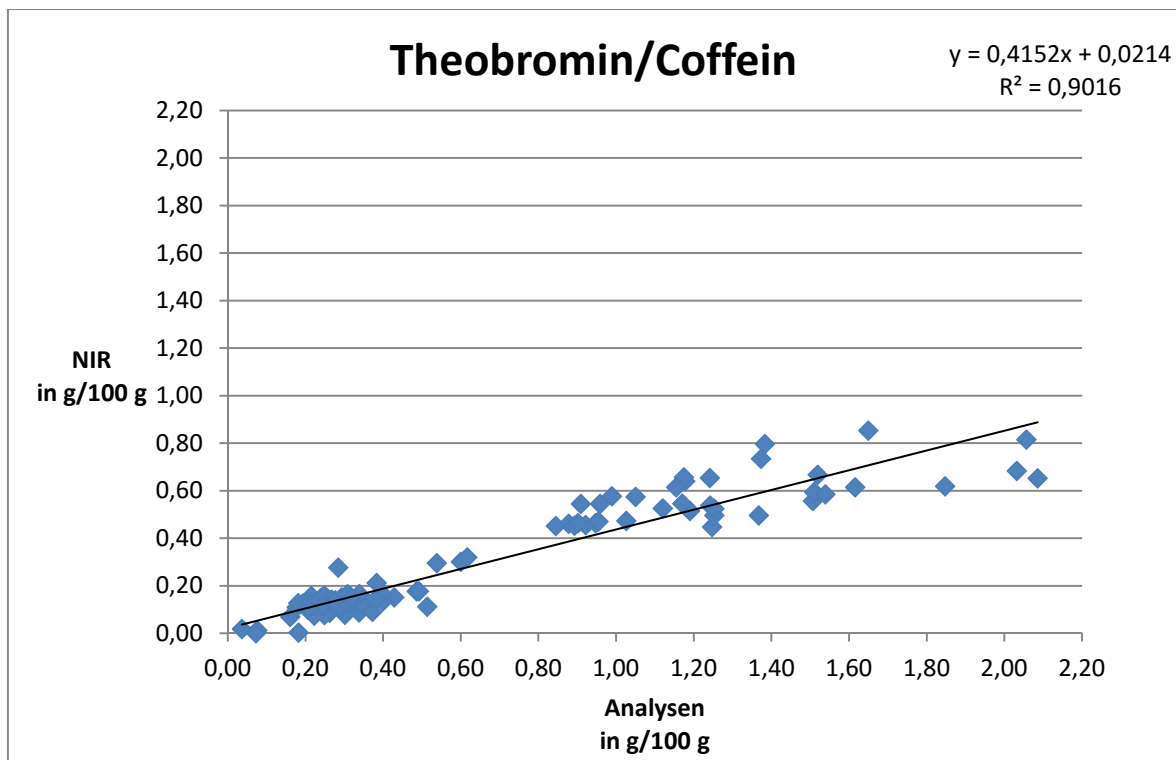


Abbildung 7: Lineare Regressionsgerade Theobromin/Coffein

Die Regressionsgerade für den Parameter Theobromin/Coffein zeigt sich in Abbildung 7. Hier ist deutlich zu erkennen, dass die Messergebnisse der Analysen im Bereich von 0 bis ca. 2,1 g/100 g liegen, jedoch von den NIR-Messungen nur Gehalte zwischen ca. 0 und 0,9 angegeben werden. Mittels der NIRS werden somit keine Gehalte höher 1 g/100 g ausgegeben. Aufgrund dessen verläuft die Regressionsgerade eher flach mit einer Steigung von 0,4152 und einem Achsenabschnitt von 0,0214. Ein monoton steigender Verlauf lässt sich durch die grafische Darstellung bis ca. 1,2 g/100 g auf der x-Achse erkennen. Bei höheren x-Werten deutet sich eher ein waagerechter Verlauf an und die Wertepunkte streuen stärker, sodass ein linearer Zusammenhang hier nicht deutlich wird. Trotz dessen ist der absolute Korrelationskoeffizient mit gerundet 0,95 ziemlich hoch, wodurch ein sehr starker Zusammenhang wiedergegeben wird. Insgesamt wird die Ausgleichsgerade durch die Formel $y = 0,4152x + 0,0214$, mit einem Informationsgehalt von 90 %, beschrieben.

Eindeutige Ausreißer können aufgrund der Streuung aus der Punktwolke optisch nicht erkannt und vermutet werden, sodass der Datensatz von $n = 104$ nicht verändert wird und alle Messergebnisse in die statistische Auswertung einbezogen werden.

Statistik für Stichproben mit paarigen Werten

	Mittelwert	H	Standard- abweichung	Standardfehler Mittelwert
Theo/Coff Analysen	,6345	104	,51854	,05085
NIR	,2849	104	,22671	,02223

Korrelationen für Stichproben mit paarigen Werten

	H	Korrelation	Sig.
Theo/Coff Analysen & NIR	104	,949	,000

Test für Stichproben mit paarigen Werten

	Paarige Differenzen					t	df	Sig. (2-sei- tig)
	Mittel- wert	Standard- abweichung	Standard- fehler Mittelwert	99,9% Konfidenz- intervall der Differenz				
				Unterer	Oberer			
Theo/Coff Analysen - NIR	,34963	,31152	,03055	,24615	,45311	11,446	103	,000

Abbildung 8: SPSS Output t-Test Theobromin/Coffein

Anhand der in Abbildung 8 wiedergegebenen SPSS-Ergebnisse lässt sich eine Mittelwertdifferenz von 0,34963 und eine Standardabweichung von 0,31152 ermitteln. Die Messdaten der Analysen von Theobromin/Coffein sind im Mittel um 0,34963 höher als die vom NIR gemessenen Gehalte. Die Werte der Differenzen zwischen den Stichproben streuen durchschnittlich um den Faktor 0,31 um den Mittelwert der Differenzen.

Es wird ein t-Wert von 11,446 errechnet, welcher den kritischen Tabellenwert von 3,3885 deutlich übersteigt. Das bedeutet, dass hier die Nullhypothese nicht beibehalten werden kann, sondern die Alternativhypothese angenommen wird. Es besteht somit ein Unterschied zwischen den Mittelwerten der nasschemischen Analysen zu den NIR-Ergebnissen. Zu gleichem Resultat führt auch der Vergleich des p-Wertes mit der festgelegten Irrtumswahrscheinlichkeit α . Es zeigt sich $0,000 < 0,001$ ($p < \alpha$), demzufolge bestätigt sich hier die Ablehnung der Nullhypothese. Das Konfidenzintervall gibt den Bereich zwischen 0,24615 und 0,45311, in dem mit 99,9-prozentiger Sicherheit der wahre Mittelwert der Differenzen liegt, an. Da dieses Intervall nicht den Wert null einschließt, kann mit der angegebenen Sicherheit die Differenz der Mittelwerte nicht den Wert null annehmen. Es liegt hier also ein höchst signifikanter Unterschied zwischen den Messergebnissen der Analysen und NIR-Daten für den Parameter Theobromin/Coffein in Schokoladen vor.

7.1.4 Saccharose

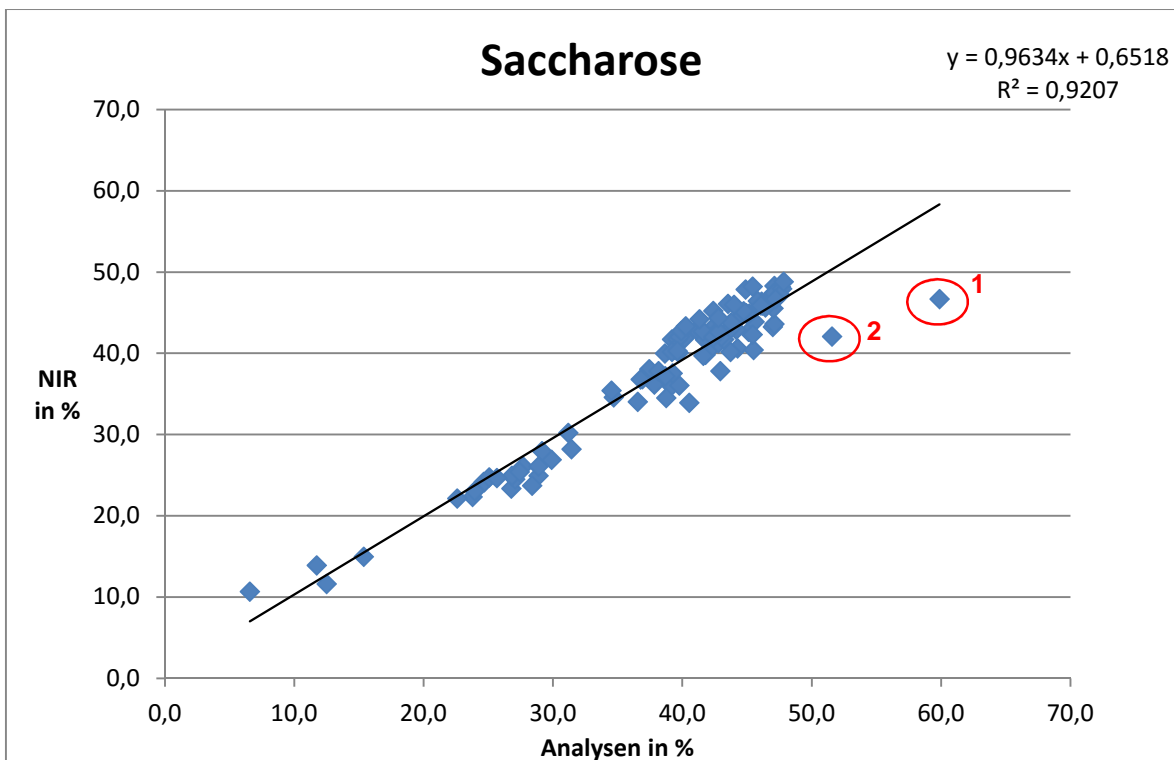


Abbildung 9: Lineare Regressionsgerade Saccharose

Die einzelnen Werte schwanken leicht um die Gerade, wobei die Saccharosegehalte der Schokoladen zwischen ca. 6 und 60 % liegen. Die meisten Datenpunkte finden sich im Bereich von 22 bis 48 %.

Die Regressionsgerade von Saccharose wird mit der Formel $y = 0,9634x + 0,6518$ beschrieben, wodurch 92 % der Varianzen von y erklärt werden. Die Ausgleichsgerade nähert sich der Winkelhalbierenden $y = x$, aufgrund der Werte für die Steigung nahe 1 und für den Achsenabschnitt um null, an. Der Korrelationskoeffizient von 0,9595 zeigt einen starken linearen Zusammenhang zwischen den Ergebnissen der nasschemischen Analysen und den NIR-Daten. Der monoton steigende Verlauf der Geraden lässt sich ab einer Konzentration von 50 % der Referenzanalyse, aufgrund weiterer fehlender Ergebnisse in diesem Bereich, nicht bestätigen. Die NIRS erfasst keine Werte über 50 %. Somit können die markierten Datenpunkte größer 50 % auch als Ausreißer angesehen werden. Aufgrund dessen wird hier der Ausreißertest nach Grubbs angewandt. Der Test wird mit der Stichprobendifferenz durchgeführt, da sich der nachfolgende t-Test auf diese Stichprobe bezieht. Es errechnet sich für den mit der Zahl 1 markierten Wert eine Prüfgröße von 4,865, welche den kritischen Tabellenwert von 3,911 überragt. Folglich wird der Wert mit einer Sicherheit von 99,5 % als Ausreißer eingestuft und aus der Stichprobe eliminiert.

Dadurch ergeben sich ein neuer Mittelwert sowie eine neue Standardabweichung, womit nun der mit der Zahl 2 markierte Datenpunkt überprüft wird. Die Prüfgröße ergibt einen Betrag von 3,936, der ebenfalls größer ist als der kritische Wert der Grubbs-Tabelle für nun $n = 103$ von 3,908. Resultierend daraus wird dieser Punkt ebenfalls aus dem Datensatz entfernt. Weiter folgt eine erneute visuelle Darstellung der Messergebnisse mit einem reduzierten Stichprobenumfang auf $n = 102$.

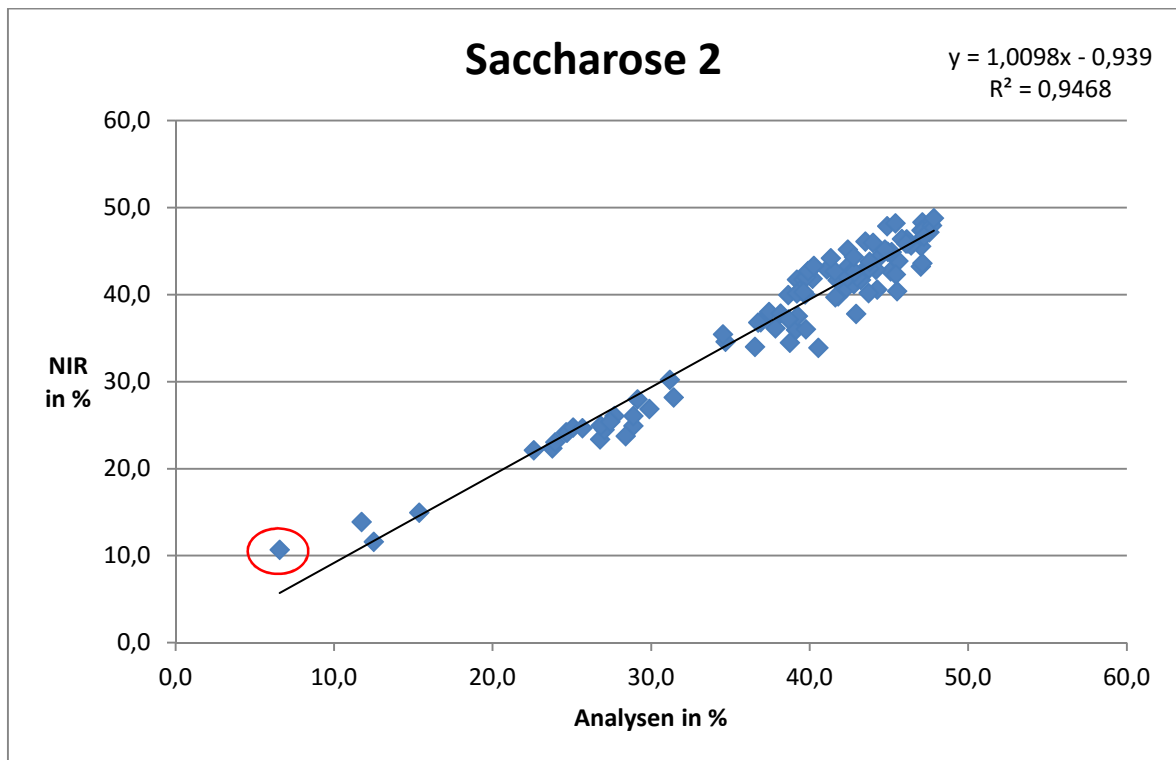


Abbildung 10: Lineare Regressionsgerade Saccharose nach Eliminierung der Ausreißer

In Abbildung 10 ist die lineare Regressionsgerade der Saccharosedaten, nach der Entfernung der zwei ermittelten Ausreißer aus den Stichproben, dargestellt. Die Gerade wird durch die Formel $y = 1,0098x - 0,939$ definiert, mit einem Informationsgehalt von knapp 95 %. Nun ergibt sich ein leicht höherer Korrelationskoeffizient von 0,9730, wodurch die Stärke des Zusammenhanges etwas höher ausfällt. Die zuvor bereits genannte Beschreibung gilt hier weiterhin.

Markiert ist in dieser Grafik wieder ein Datenpunkt, welcher aufgrund der neuen Darstellung besonders auffällt. Erneut wird dieser mit Hilfe von Formel 9 und aktuellem Mittelwert sowie Standardabweichung geprüft. Es errechnet sich eine Prüfgröße von 1,695. Dieser Wert unterschreitet die kritische Zahl der Grubbs-Tabelle von 3,906 für $n = 102$. Daher wird dieser Datenpunkt nicht als Ausreißer eingestuft und bleibt im Datensatz enthalten.

Statistik für Stichproben mit paarigen Werten

		Mittelwert	H	Standard- abweichung	Standardfehler Mittelwert
Saccharose	Analysen	38,4404	102	8,73611	,86500
	NIR	37,8788	102	9,06632	,89770

Korrelationen für Stichproben mit paarigen Werten

		H	Korrelation	Sig.
Saccharose	Analysen & NIR	102	,973	,000

Test für Stichproben mit paarigen Werten

	Paarige Differenzen					t	df	Sig. (2- seitig)	
	Mittel- wert	Standard- abweichung	Standard- fehler Mittelwert	99,9% Konfidenz- intervall der Differenz					
				Unterer	Oberer				
Saccharose	Analysen - NIR	,56159	2,09284	,20722	-,14079	1,26396	2,710	101	,008

Abbildung 11: SPSS Output t-Test Saccharose 2

Der Mittelwert der Differenzen zwischen den Ergebnissen der Referenzanalytik und der NIRS beträgt 0,56159. Folglich fallen die Daten der nasschemischen Analysen durchschnittlich um 0,56159 höher aus. Die mittlere Streuung um den Mittelwert der Differenz liegt bei ungefähr 2,09.

Der Betrag des errechneten t-Wertes liegt bei 2,710 und fällt unterhalb des kritischen t-Wertes von 3,3895. Der Unterschied zwischen den Mittelwerten beider Stichproben taucht somit zufällig auf und die Nullhypothese wird beibehalten. Selbiges geht aus dem Vergleich von p-Wert und α hervor ($0,008 > 0,001$). Mit der Sicherheit von 99,9 % liegt der wahre Wert des Differenzenmittelwertes im Konfidenzintervall zwischen -0,14079 und 1,26396. Dieses Intervall umfasst den Wert null, wodurch das Beibehalten der Nullhypothese erneut bestätigt wird. Die Ergebnisse des Differenzen-t-Testes sind für den Parameter Saccharose auf dem 0,01-Niveau zweiseitig sehr signifikant. Die Wahrscheinlichkeit, einen t-Wert $\geq 2,710$ unter Gültigkeit der Nullhypothese zu erhalten, beträgt 0,8 %.

Ähnliche Ergebnisse errechnen sich auch ohne die Eliminierung der Ausreißer. Allerdings sind die Daten der Differenzen in diesem Fall nicht normalverteilt. Ebenfalls kann die Nullhypothese beibehalten werden und der Unterschied zwischen den Mittelwerten tritt zufällig auf. Die SPSS-Ergebnisse dazu finden sich im Anhang unter Anlage 5.

7.1.5 Laktose

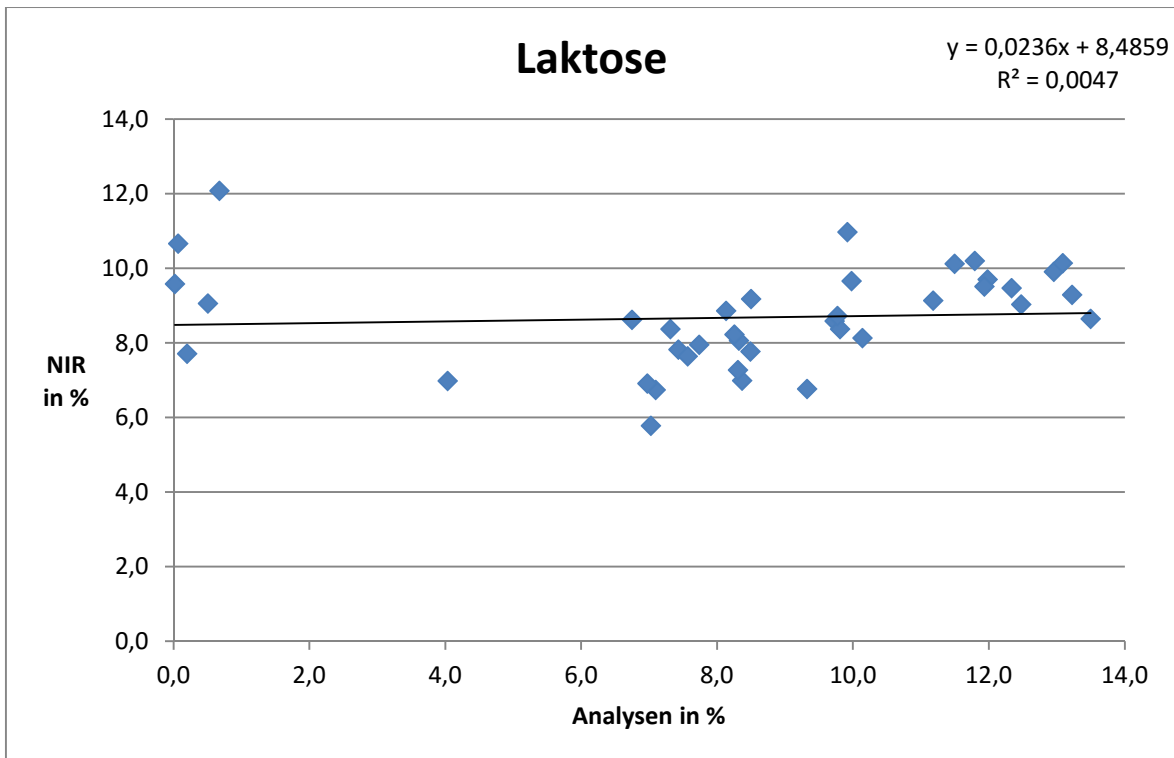


Abbildung 12: Lineare Regressionsgerade Laktose

Mittels der in Abbildung 12 dargestellten linearen Regressionsgeraden für die nasschemischen Analysen und NIR-Messdaten für den Parameter Laktose, lässt sich deutlich erkennen, dass hier kein linearer Zusammenhang vorherrscht. Die Werte streuen vergleichsweise stark und die NIR-Messung gibt beinahe nur konstante Werte zwischen 6 und 12 % aus. Dabei ergeben sich für die Referenzergebnisse ein Wertebereich zwischen 0 und 14 %, sodass sich ein waagerechter Verlauf andeutet. Rechnerisch wird ein Korrelationskoeffizient von 0,0686 bestimmt, mit welchem der nicht vorhandene Zusammenhang bestätigt wird. Die annähernd waagerechte Gerade wird über die Formel $y = 0,0236x + 8,4859$ beschrieben und erklärt lediglich 0,47 % der Varianz von y . Optisch lässt sich aus der Datenwolke auch kein anderer mathematischer Zusammenhang ableiten.

Aufgrund der Tatsache, dass für den Parameter Laktose kein linearer Zusammenhang zwischen den Untersuchungsergebnissen besteht, kann an dieser Stelle theoretisch die Auswertung beendet werden. Der Vollständigkeit halber wird der t-Test ebenfalls für diesen Datensatz durchgeführt, wodurch die Irrelevanz verdeutlicht wird.

Statistik für Stichproben mit paarigen Werten

	Mittelwert	H	Standard- abweichung	Standardfehler Mittelwert
Laktose Analysen	8,3694	39	3,81205	,61042
NIR	8,6833	39	1,31673	,21085

Korrelationen für Stichproben mit paarigen Werten

	H	Korrelation	Sig.
Laktose Analysen & NIR	39	,068	,679

Test für Stichproben mit paarigen Werten

	Paarige Differenzen					t	df	Sig. (2-sei- tig)
	Mittel- wert	Standard- abweichung	Standard- fehler Mittelwert	99,9% Konfidenz- intervall der Differenz				
				Unterer	Oberer			
Laktose Analysen - NIR	-,31390	3,94712	,63205	-2,56757	1,93977	-,497	38	,622

Abbildung 13: SPSS Output t-Test Laktose

Auffällig zeigt sich in der SPSS-Ergebnisdarstellung (Abbildung 13) der bereits genannte Korrelationskoeffizient von 0,068, welcher mit einem p-Wert von 0,679 absolut nicht signifikant ist.

Weiter wird deutlich, dass sich eine Mittelwertdifferenz von $-0,3139$ und eine durchschnittliche Streuung der Daten um diesen Wert von gerundet $3,95$. Über den Vergleich des errechneten t-Wertes mit dem kritischen Wert der t-Tabelle würde die Nullhypothese nicht abgelehnt werden, da $|-0,497| < 3,57$. Selbiges wäre auch die Schlussfolgerung beim Abgleich des p-Wertes mit der Irrtumswahrscheinlichkeit α . Hier zeigt sich $0,662 > 0,001$, allerdings gilt der p-Wert mit $0,622$ als nicht mehr signifikant. Das bedeutet, dass die Wahrscheinlichkeit einen t-Wert $\geq 0,497$ bei Gültigkeit der Nullhypothese zu erhalten mit $62,2\%$ sehr hoch ist.

Bei Betrachtung des Konfidenzintervalls mit einem Bereich zwischen ca. $-2,56$ und $1,94$, fällt auf, dass wiederum der Wert null eingeschossen wird, wodurch erneut die Beibehaltung der Nullhypothese resultierend erfolgen würde. Das Konfidenzintervall gibt eine vergleichsweise breite Spanne an, was einen Hinweis auf die Ungültigkeit der Ergebnisse darstellen kann.

Anhand dieser widersprüchlichen Daten wird schnell deutlich, dass die Stärke der Korrelation zwischen den Ergebnissen beider Analysemethoden eine entscheidende Voraussetzung für eine statistische Auswertung ist, um aussagekräftige Schlüsse ziehen zu können.

7.2 Qualitative Untersuchungen

Unter den nächsten Abschnitten werden die mittels IR-Spektroskopie erhaltenen Spektren visuell verglichen und anhand dessen die Möglichkeit der Differenzierung zwischen Schokolade und kakaohaltiger Fettglasur sowie Marzipan und Persipan beurteilt.

7.2.1 NIR

7.2.1.1 Schokolade und kakaohaltige Fettglasur

Abbildung 14 auf der nachfolgenden Seite zeigt das Gesamtspektrum aller verwendeten Schokoladen und Fettglasuren in Doppelmessungen. Hierzu zählen zwei dunkle Schokoladen und drei dunkle Fettglasuren sowie zwei Vollmilchschokoladen und zwei Fettglasuren der Sorte Vollmilch. Für die Zuordnungsmöglichkeit der Spektren zu den einzelnen Proben sind die Kurven im links angegebenen Wellenlängenbereich (10.000 – 8.500 nm) farblich markiert.

Es zeigen sich überwiegend ähnliche Kurvenverläufe über den gesamten Bereich der Wellenlänge zwischen 10.000 und 4.000 nm. Die erkennbaren Abweichungen äußern sich überwiegend in Verschiebungen der Kurven nach oben bzw. unten. Darüber hinaus erweisen sich die Kurvenverläufe als solches annähernd gleichartig.

Allerdings zeigen sich in der Masse der ganzen Spektren in zwei Regionen geringfügige Unterschiede. Im Wellenzahlbereich zwischen ca. 6.750 und 6.500 cm^{-1} weichen die beiden Messungen der Probe „Glasur dunkel“ (gelb markiert) sichtbar von den anderen gemessenen Proben ab. Ein weiterer Unterschied im Spektrenverlauf bildet sich in der Spanne von 5.250 und 5.000 cm^{-1} ab. Diese Abweichung ist abermals auf die kakaohaltige Fettglasur (Glasur dunkel) zurückzuführen. Diese Probe war im HU vorrätig und ist im Tiefkühler bei -18 °C gelagert worden. Weitere Informationen z. B. zu den Inhaltsstoffen oder die genaue Bezeichnung des Produktes sind nicht bekannt.

Vermuten lässt sich hierdurch, dass die Probe „Glasur dunkel“ in der allgemeinen Produktzusammensetzung Unterschiede zu den anderen Produkten aufweist oder sich die unbekannte Lagerdauer bei Tiefkühltemperatur sowie Anzahl an Auftauprozessen auf die Beschaffenheit der Fettglasur ausgewirkt hat.

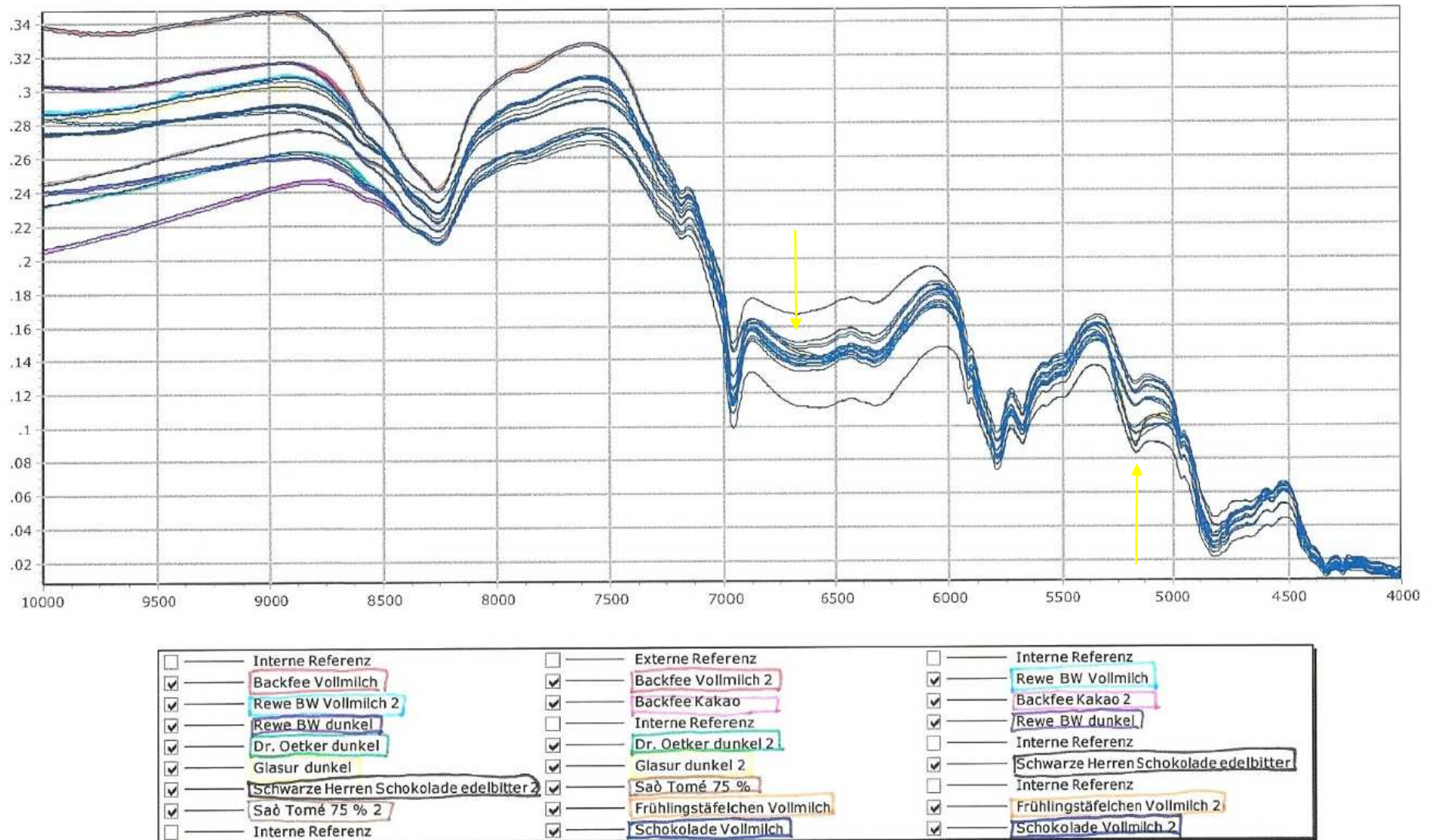


Abbildung 14: Schokoladen & Fettglasur gesamt

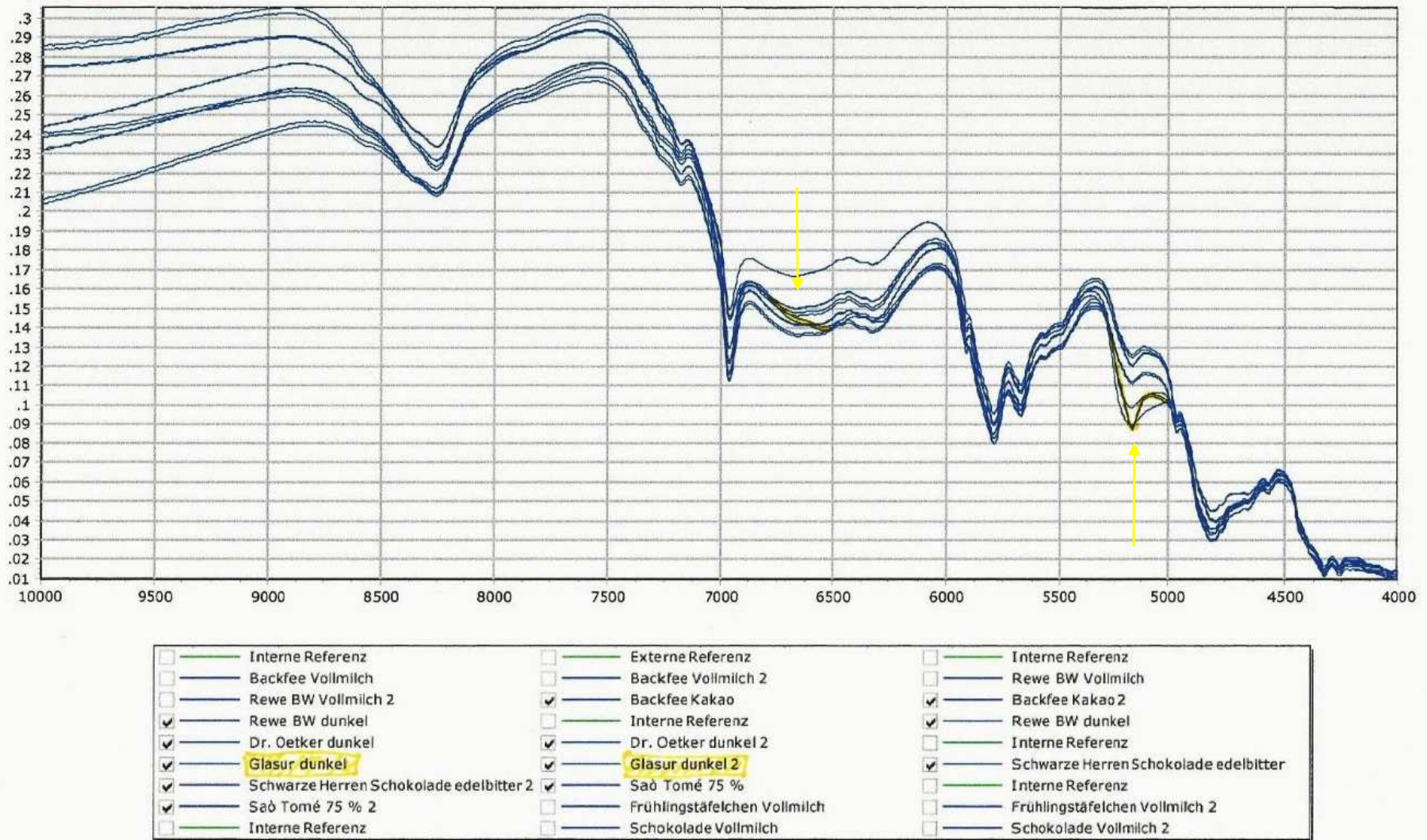


Abbildung 15: Schokoladen & Fettglasuren – dunkel

In Abbildung 15 sind nur die NIR-Spektren der dunklen Schokoladen und Fettglasuren dargestellt. Auch hier zeigen sich noch eindeutiger die Abweichungen der Probe „Glasur dunkel“, die auch im Gesamtspektrum erkennbar waren. In der Kategorie „dunkle Sorten“ lässt sich demnach nicht zwischen dem LM Schokolade und dem nachgemachten LM kakaohaltige Fettglasur klar differenzieren. Lediglich eine Probe der Fettglasuren weicht von den gemessenen an zwei Stellen im Spektrum ab.

Die Abbildung 16 auf der nächsten Seite stellt die ermittelten Spektren der Schokoladen und kakaohaltigen Fettglasuren der Kategorie „Vollmilch“ dar. Hier ist ein durchaus harmonischer, analoger Verlauf der Kurven zu erkennen. Über geringfügige Unterschiede in der Absorptionsintensität variieren die Kurven entlang der Ordinate. Basierend darauf kann für diese Kategorie der Schokoladen und Fettglasuren keine fundierte Differenzierung erfolgen, die Spektren ähneln sich zu stark.

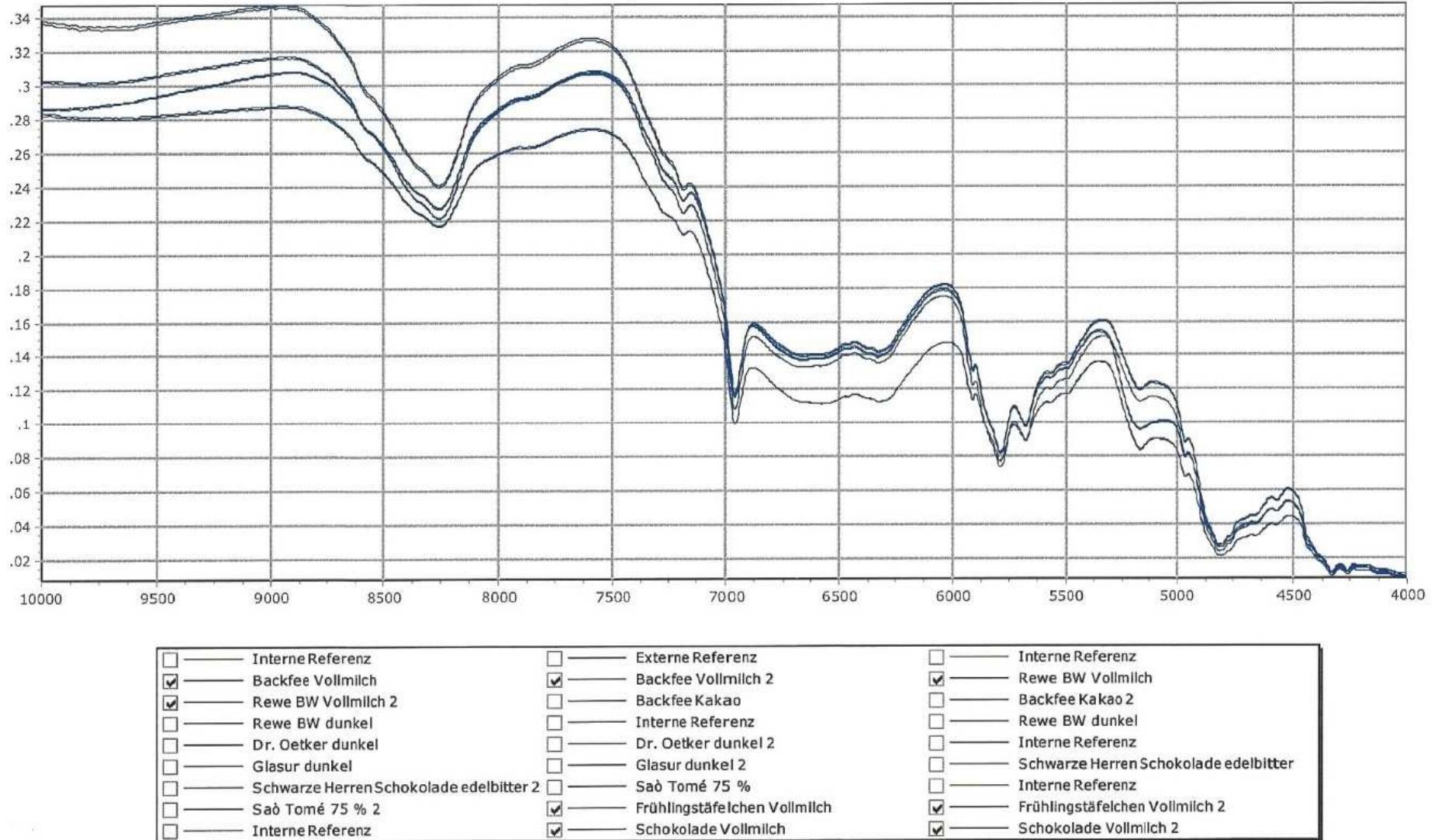


Abbildung 16: Schokoladen & Fettglasuren – Vollmilch

7.2.1.2 Marzipan und Persipan

Abbildung 17 zeigt die NIR-Spektren der Marzipanproben und der Persipanprobe entsprechend als Doppelmessung. Jeweils zwei Untersuchungsproben ähneln sich sehr stark. Die gelb markierte Kurve der Probe „B – Marzipan“ und die rote der Probe „C – Marzipankartoffeln“ weisen nur geringfügige Unterschiede auf, wie unter anderem die Variierung in der Absorptionsstärke.

Die dunkelblaue (D – Marzipan) und die hellblaue (E – Persipan) Kurve ähneln sich ebenfalls sehr, unterscheiden sich aber wiederum eindeutig von den zuvor beschriebenen Spektren. Die blauen Kurvenverläufe erweisen sich als wesentlich flacher (geringere Absorptionsintensität) gegenüber der gelben und roten Kurvendarstellung.

Aufgrund der erhaltenen Informationen aus dem Spektrum von Marzipan und Persipan lässt sich vermuten, dass die als Marzipan deklarierte Probe „D – Marzipan“ (hellblau) tatsächlich Persipan ist, hinsichtlich des starken Unterschiedes zu den anderen beiden Marzipanproben (rot und gelbe Kurven). Die Abweichungen können aufgrund der verschiedenen Mengen an zugesetztem Zucker zu Marzipan und Persipan oder des höheren Feuchtigkeitsgehaltes der Persipanrohmasse gegenüber der Marzipanrohmasse entstehen. Die Angaben beziehen sich wiederum lediglich auf die zulässigen Höchstgehalte nach den Leitsätzen für Ölsamen und daraus hergestellte Massen und Süßwaren.

Genauere Angaben können hier nicht erfolgen, da von keiner der gemessenen Proben Zutatenverzeichnis, präzise Bezeichnung der LM oder sonstige Informationen bekannt sind. Anhand der Zusammensetzung wären ggf. Rückschlüsse auf die Bandenintensitäten der Absorptionen möglich.

Im Anhang finden sich unter Anlage 6 die NIR-Spektren der Einzelmessungen von Marzipan und Persipan.

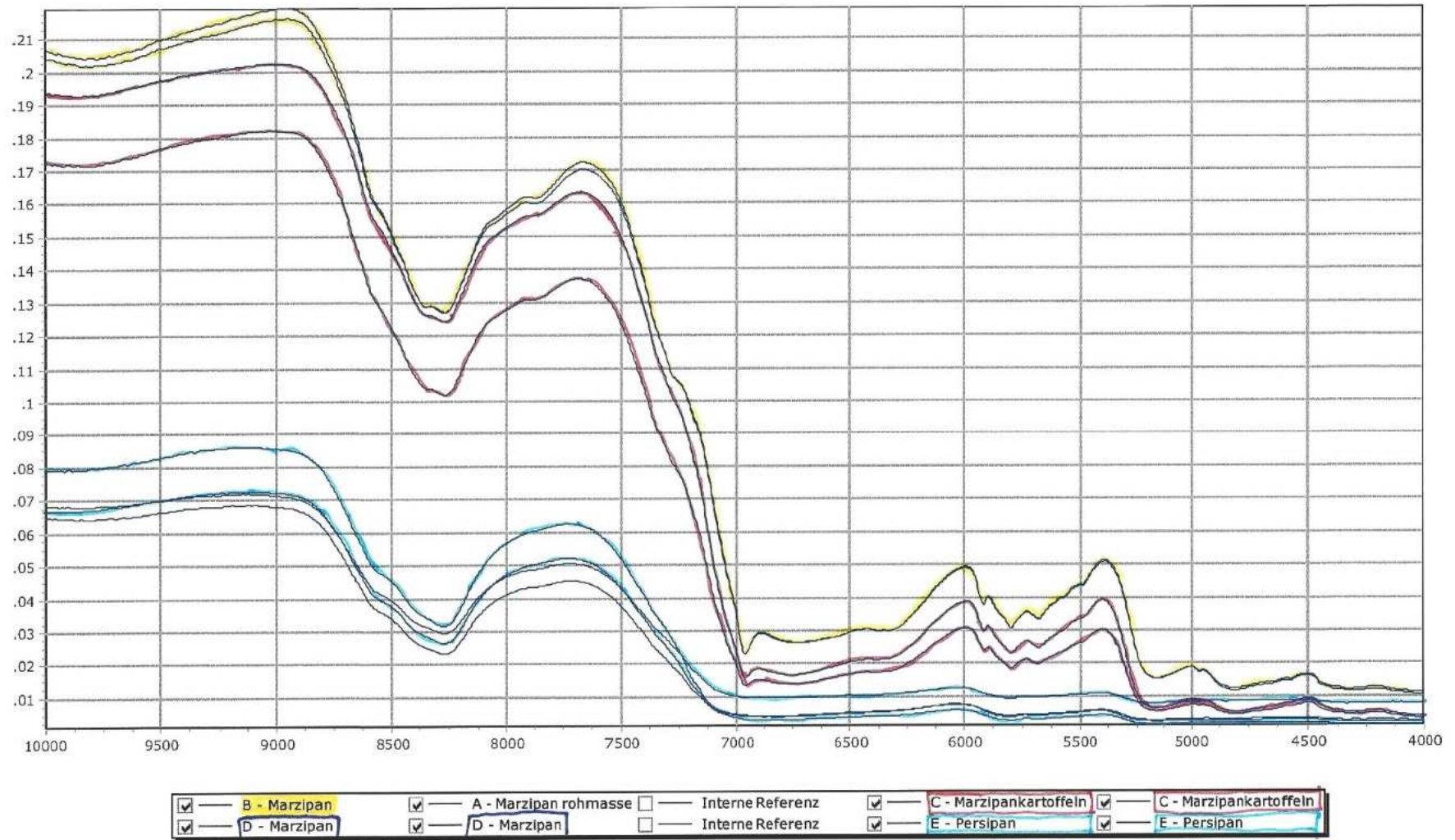


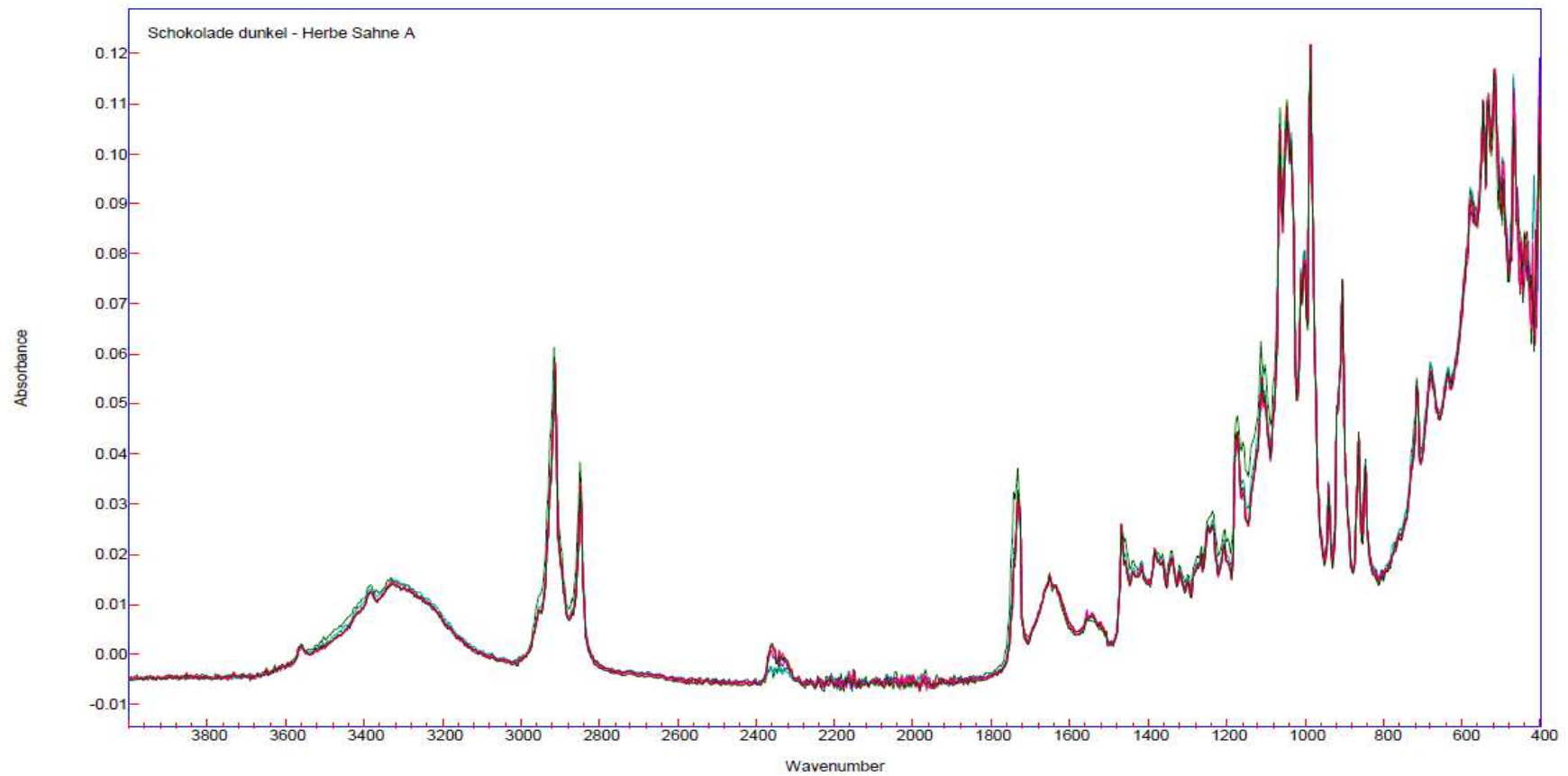
Abbildung 17: Marzipan & Persipan

7.2.2 MIR

Die Darstellung beider Differenzierungsprodukte erfolgt in einem Gesamtspektrum, in welchem alle Spektren übereinander liegen und in einem Diagramm, in welchem die Spektren zur besseren Erkennbarkeit, getrennt aufgeführt werden. Die Gesamtspektren sind als Abbildung 18 und Abbildung 19 auf den nachfolgenden Seiten angefügt. Die Darstellung der Einzelspektren erfolgt im Anhang unter Anlage 7.

Die MIR-Spektren von den Schokoladen und der kakaohaltiger Fettglasur zeigen sich auf nachfolgender Seite in Abbildung 18. Hier sind fünf unterschiedliche Schokoladensorten und eine Probe kakaohaltige Fettglasur am MIR-Gerät gemessen worden. Die Fettglasur entspricht der Probe „Glasur dunkel“ aus den NIR-Messungen. Die Spektren zeigen keine eindeutigen Abweichungen, welche mit dem bloßen Auge erkennbar sind. Auch die Probe „Glasur dunkel“ weicht hier im Verlauf nicht von den Spektren der verschiedenen Schokoladensorten ab.

Mittels der MIR-Spektroskopie kann demnach aus diesen Informationen keine Differenzierung zwischen Schokolade und kakaohaltiger Fettglasur erfolgen. Weitere Tests mit anderen Fettglasuren aus den NIR-Messungen wären weiter denkbar. Allerdings lässt sich eine Abweichung der Glasuren von den Schokoladen anzweifeln, da sich im NIR-Bereich überwiegend sehr ähnliche Spektren gezeigt haben.



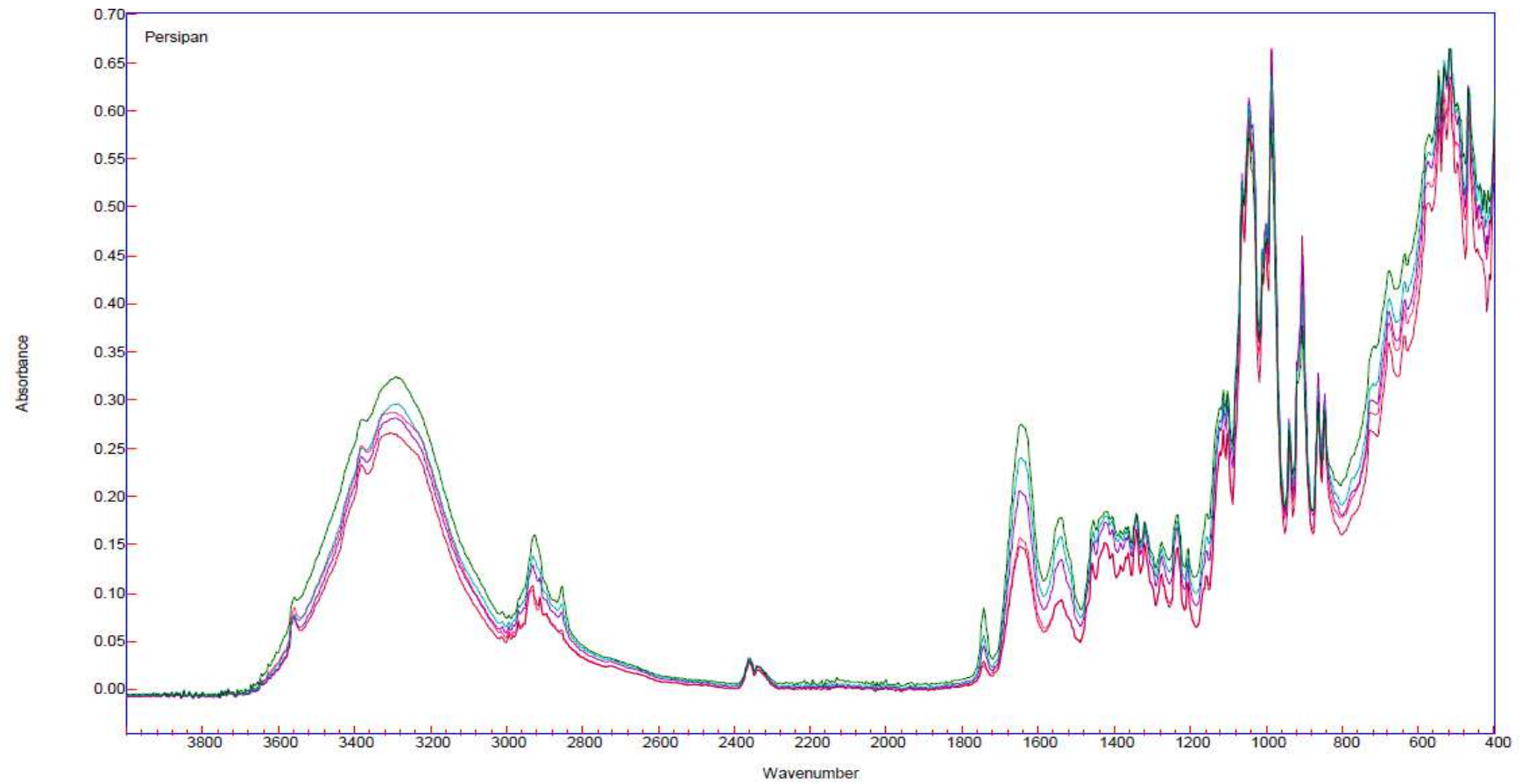
Name	Line Color
kakaohaltige Fettglasur F	Black
Schokolade weiß E	Magenta
Schokolade Vollmilch hochfein D	Red
Schokolade dunkel - schwarze Herren Schokolade edelbitter C	Blue
Schokolade dunkel - São Tomé B	Green
Schokolade dunkel - Herbe Sahne A	Black

Abbildung 18: MIR-Spektrum Schokolade & Fettglasur

Selbiges gilt für die Differenzierung von den vier Marzipanproben und zur Persipanprobe. Es zeigt insgesamt eine deutliche Ähnlichkeit zwischen den farblich unterschiedlichen Spektren in Abbildung 19. Es sind leichte Unterschiede in Bezug auf die Absorptionsintensität erkennbar, aber die Kurvenverläufe als solches äußern sich gleichartig.

Die Persipanprobe lässt sich anhand des MIR-Spektrums nicht von den Marzipanproben unterscheiden. Selbst im Fingerprint-Bereich ($1.500 - 1.000 \text{ cm}^{-1}$) lassen sich keine Auffälligkeiten oder Abweichungen ausmachen.

Darauf begründend lässt sich mittels der MIRS Persipan qualitativ nicht von Marzipan unterscheiden.



Name	Color
Persipan	Red
Marzipan D	Dark Red
Marzipan-Kartoffeln C	Purple
Marzipan B	Green
Marzipan-Rohmasse A	Black

Abbildung 19: MIR-Spektrum Marzipan & Persipan

8 Diskussion

8.1 Referenzanalytik vs. NIR

Aufgrund der vergleichenden Auswertung der Ergebnisse nasschemischer Analysen und denen der NIRS für die Gehalte der Schokoladen in Bezug auf die Parameter Gesamtfett, Theobromin/Coffein, Saccharose und Laktose ergeben sich unterschiedliche Resultate im Hinblick auf die Validierung der NIR-Messung. Für zwei Parameter erzielt die NIRS valide Ergebnisse, welche denen der Referenzanalytik gegenüber als gleichwertig anzusehen sind. Die Betrachtung der Datensätze der weiteren zwei Parameter ergeben keine übereinstimmenden Ergebnisse zwischen den Methoden. Demnach eignet sich hier die NIRS nicht für die Analytik von Schokoladen.

Für den Parameter Gesamtfett hat sich ein sehr starker Zusammenhang zwischen den erzielten Gehalten beider Methoden ergeben. Darauf basierend kann mittels der statistischen Auswertungsmethodik nachgewiesen werden, dass mit der NIRS signifikant gleichwertige Ergebnisse für den Fettgehalt von Schokolade wie mit der nasschemischen Analytik gemessen werden. Demzufolge ist der Einsatz der NIRS zur Messung des Fettgehaltes von Schokoladen im Rahmen eines Screenings als Schnellmethode möglich.

Die Untersuchung des Parameters Theobromin/Coffein hat einerseits einen starken Zusammenhang zwischen den Messdaten beider Methoden ergeben. Andererseits zeigt sich im statistischen Vergleich, dass sich die Ergebnisse der Nasschemie und NIRS signifikant unterscheiden und die gemessenen Gehalte der NIRS nicht denen der Referenzanalytik entsprechen. Die NIRS liefert für die Gehalte an Theobromin und Coffein unrichtige Ergebnisse. Demzufolge kann hier die Verwendung als Screeningmethode nicht eingesetzt werden. Zur Analyse der Gehalte an Theobromin und Coffein in Schokoladen ist weiter die Referenzmethodik mittels HPLC-DAD nach der Amtlichen Sammlung nach § 64 anzuwenden.

Im Hinblick auf die Untersuchung der Schokoladenproben auf Saccharose zeigt sich ebenfalls ein sehr starker Zusammenhang zwischen der Referenzmethode und der Messung mittels NIRS. Auch die Anwendung der Statistik zeigt, dass sich die Datensätze nur zufällig geringfügig unterscheiden und die NIRS grundsätzlich äquivalente Ergebnisse bezogen auf das Standardverfahren liefert. Entsprechend kann ebenfalls zur Analyse des Saccharosegehaltes in Schokoladen die NIRS als Schnellmethode angewandt werden.

Die Daten für den Untersuchungsparameter Laktose in den entsprechenden Schokoladensorten zeigen zwischen den zwei Methoden keinerlei Zusammenhang und dadurch ergeben sich nicht relevante Statistikergebnisse. Zur Analyse des Laktosegehaltes in Milch-, Sahne- und weißer Schokolade ist weiterhin die standardisierte Methodik zu wählen.

Um die Angaben des Kakaogehaltes auf den Schokoladenverpackung zu überprüfen, können lediglich die Fettgehalte mittels NIRS ermittelt werden. Die zur Berechnung der GKTM überdies notwendigen Gehalte an Theobromin und Coffein können nicht über die Probenmessung mit Hilfe der NIRS bestimmt werden. Hierzu ist die Referenzmethode mittels HPLC beizubehalten. Über die Schnellmethode für die Fettbestimmung in Schokolade kann zumindest diesen Parameter betreffend Zeit und Chemikalien eingespart werden.

Die Ergebnisse zu den berechneten Validierungsparametern sind den Anhang (Anlage 3) beigefügt. Die Daten für die untersuchten Schokoladenbestandteile an Fett und Saccharose zeigen, parallel zu den bereits genannten Ergebnissen, realistische Werte. Diese wiederum können zur Kalibrierung des NIR-Gerätes herangezogen werden.

Die erzielte Validität der Gehalte an Fett und Saccharose in Schokoladen der NIRS ist regelmäßig zu überprüfen und für die zukünftige Verwendung der Screeningmethode zu bestätigen.

8.2 NIR vs. MIR

Der Hintergrund der Differenzierung zwischen verschiedenen LM, vor allem in Bezug auf das Inverkehrbringen von nachgemachten LM, stellt eine entscheidende Komponente zur Sicherstellung des Schutzes vor Täuschung nach § 11 LFGB in Verbindung mit Art. 7 LMIV dar. Eine Unterscheidung dieser LM mittels einer Schnellmethode ist, besonders im Hinblick auf die Kurzlebigkeit dieser Produkte und die zeit- sowie materialintensiven standardisierten Untersuchungen, von Interesse.

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Differenzierungsmöglichkeit zwischen Schokolade und kakaohaltiger Fettglasur sowie zwischen Marzipan und Persipan mittels der NIR- und MIR-Spektroskopie, bringt verschiedene Ergebnisse hervor.

Die Unterscheidung zwischen den LM Schokolade und kakaohaltige Fettglasur ist weder im mittlern noch im nahen Infrarot eindeutig möglich. Zwar zeigt sich eine Fettglasur im NIR leicht auffällig, was aber zu keiner verallgemeinernden Aussage führt. Die andern Fettglasuren ähneln im NIR-Spektrum denen der Schokoladen sehr. Im MIR-Bereich können keinerlei Abweichungen nachgewiesen werden. Folglich eignet sich basierend auf diesen Ergebnissen keine der Methoden als Screeningmethode zur Differenzierung zwischen Schokolade und kakaohaltiger Fettglasur.

Im Hinblick auf die Unterscheidung des nachgemachten LM Persipan von Marzipan, können Differenzen zwischen den Spektren des NIR ausgemacht werden. Hierbei zeigt sich ein völlig verschiedener Kurvenverlauf der Persipanprobe. Da lediglich eine Probe Persipan vorliegt, lässt sich der Verdacht nicht völlig bestätigen. Eine der als Marzipan deklarierten Probe erweist sich als äußerst ähnlich zum Persipan, wodurch die Vermutung naheliegt, dass es sich dabei tatsächlich um Persipan handelt.

Die Betrachtung beider Schnellmethoden führt zu spärlichen Informationen zur Differenzierungsmöglichkeit der verschiedenen LM. Im Allgemeinen sind mittels der NIRS eher Abweichungen zwischen den Produkten erkennbar, da durch die elektromagnetischen Wellen die Atome/Moleküle aufgrund des höheren Energieeintrages in Kombinations- und Oberschwingungen versetzt werden (Skoog, et al., 1992 S. 215). Weitere qualitative Untersuchungen mit einer größeren Anzahl an Proben könnten zu eindeutigeren Ergebnissen führen und evtl. eine Nutzbarkeit zur Differenzierung von LM bestätigen.

9 Fazit

Basierend auf den gewonnenen Erkenntnissen ist die NIRS vielseitig nutzbar, lässt sich aber bei den hier betrachteten Anwendungsbereich allerdings nur bedingt einsetzen. LM stellen sehr komplexe Materien dar, wobei eine einfache und schnelle Analytik die Grenzen finden kann. Vor allem im Rahmen der gesetzlichen Vorgaben für LM-Inhaltsstoffe, -Kennzeichnung und den Schutz vor Täuschen gegenüber dem Verbraucher ist eine fundierte Analyse von entscheidender Bedeutung.

Aufgrund der vergleichenden Analytik zwischen NIRS und standardisierter Nasschemie, kann eindeutig bestätigt werden, dass die NIRS als Schnellmethode zur Untersuchung von Fett- und Saccharosegehalt in Schokoladen geeignet ist. Über den statistischen Vergleich der Ergebnisse beider Methoden kann sehr signifikant nachgewiesen werden, dass die NIRS gleichwertige Ergebnisse liefert wie die Referenzmethodik. Die Ergebnisse der mittels NIRS erfassten Gehalte an Fett und Saccharose in den Schokoladen sind demnach valide. Die betrachteten Parameter nehmen die Hauptbestandteile von Schokoladen ein, wodurch die nachgewiesene Validität der Screeningmethode darauf beruht, dass entsprechen große Mengengehalte nachgewiesen werden. Die ermittelten Daten für diese untersuchten Parameter können für eine erneute Kalibrierung des NIR-Gerätes von Bedeutung sein, um die Richtigkeit und Präzision der Methodik weiter zu verbessern.

Für Untersuchungen der Parameter Theobromin/Coffein und Laktose ergeben sich die Schlussfolgerungen, dass die NIRS signifikant abweichende Ergebnisse liefert. Die Gehalte an Theobromin/Coffein, welche mittels NIRS gemessen werden, übersteigen für keine Probe den Gehalt von 1 g/100 g, obwohl dies nach der Referenzmethodik bei einem Viertel aller Ergebnisse der Fall ist. Evtl. ist an dieser Stelle die Untersuchung/Validierung der NIRS für Schokoladen mit einem geringen Gehalt an Theobromin/Coffein denkbar (Milkschokoladen). Problematisch zeigt sich der Nachweis der Methylxanthine dahingegen, dass diese lediglich in Spuren im Produkt enthalten sind und somit die genaue Bestimmung erschwert wird.

Die Daten für die ermittelten Laktosegehalte der Milkschokoladen über die NIRS stehen in keinem Zusammenhang zu denen der Referenzmethode. Hierbei ergeben sich völlig abweichende Ergebnisse, wodurch die Schnellmethode absolut nicht für die Laktosebestimmung in Schokoladen Einsatz finden kann. Zu berücksichtigen ist allerdings, dass zu dieser Validierung nur 39 Proben einbezogen werden. Die grundsätzlichen Gehalte an Laktose in Schokoladen sind auch eher gering und betragen meist unter 10 %, sodass auch hier Nachweise mittels einer Schnellmethode Schwierigkeiten aufbringen können.

Die Vergleiche im Rahmen der Methodenoptimierung zur Differenzierung zwischen Schokoladen/kakaohaltiger Fettglasur und Marzipan/Persipan mittels der NIRS bzw. MIRS erzeugten Spektren ergibt eine beschränkte Informationsqualität. Zwar lassen sich Unterschiede zwischen Schokolade und kakaohaltiger Fettglasur ausmachen, jedoch weicht nur eine Probe in Gesamtbild der NIR-Spektren von den Anderen ab.

Für Marzipan und Persipan kann dahingegen keine fundierte Aussage getroffen werden, dass nur eine Probe Persipan vorliegt und insgesamt zu wenige Informationen über die einzelnen LM angegeben sind. An dieser Stelle kann eine Vermutung formuliert werden, dass eine Differenzierung von Persipan zu Marzipan mittels der NIRS grundsätzlich möglich sein kann. Die MIRS eignet sich nach den gewonnenen Erkenntnissen nicht für die genannten Differenzierungen.

Zusammenfassung

In der Masterarbeit zum Thema "Methodenoptimierung und -validierung zur NIR-spektroskopischen Analyse von Schokolade, kakaohaltiger Fettglasur und Backmassen" geht es im Allgemeinen um die Einsetzbarkeit der Nahinfrarotspektroskopie (NIRS) als Screeningmethode zur analytischen Bestimmung der Zusammensetzung von Schokolade. Die Parameter Fett- und Theobromin-/Coffeingehalt und die Anteile an Saccharose und Laktose werden näher betrachtet.

Zum Nachweis der Eignung der NIRS werden 104 Schokoladenproben auf die genannten Parameter über die Referenzanalytik nach der Amtlichen Sammlung nach § 64 LFGB analysiert und jeweils mittels eines Nahinfrarot-Photospektrometers gemessen. Die jeweils ermittelten Ergebnisse werden auf ihren Zusammenhang zueinander geprüft und mittels statistischer Tests ausgewertet. Anhand der Statistikdaten kann eine Angabe zur Einsetzbarkeit der NIRS als Schnellmethode erfolgen. Dieser Bereich umfasst die Methodvalidierung der NIRS gegenüber der standardisierten nasschemischen Analytik und stellt den Hauptteil dieser Arbeit dar. Die NIRS bietet die Vorteile, dass keine aufwendige Probenvorbereitung zu erfolgen hat und keine Chemikalien einzusetzen sind. Zudem ist eine Probenmessung nach einmaliger Einweisung direkt durchführbar und dauert nur wenige Sekunden.

Ein weiterer Aspekt der Arbeit ist die Verwendung der NIRS zur Differenzierung zwischen verschiedenen Lebensmitteln (LM). Hintergrund stellt hierbei der Schutz vor Täuschung nach Art. 7 LMIV in Verbindung mit § 11 LFGB und damit das in Verkehr bringen nachgemachter LM dar, was nach § 11 Abs. 2 Nr. 2 LFGB verboten ist. Untersucht wird hierbei die Möglichkeit der Differenzierung zwischen Schokolade und kakaohaltiger Fettglasur sowie zwischen Marzipan und Persipan. Jeweils letztere genannte LM stellen nachgemachte LM zu den ersteren dar. Über die Messung der Proben werden Absorptionsspektren erhalten, welche visuell auf Unterschiede und Ähnlichkeiten hin überprüft werden. Zusätzlich zu den Probenmessungen durch die NIRS werden die genannten LM im Rahmen der Produktdifferenzierung auch mit einem Photospektrometer des mittleren Infrarotbereiches gemessen. Hintergrund ist selbiger bereits erwähnter und bietet den weiteren Vorteil, dass absolut keine Vorbereitung der zu untersuchenden Proben notwendig ist.

Für die Parameter Fett- und Saccharosegehalt in Schokolade kann aufgrund der gewonnenen Erkenntnisse die NIRS als Screeningmethode eingesetzt werden. Für die Gehalte an Theobromin/Coffein und Laktose ist dies nicht anwendbar. Der Einsatz der NIRS zur qualitativen LM-Differenzierung ist im Fall von Schokolade/Fettglasur nicht möglich. Für Marzipan/Persipan kann der Einsatz evtl. erfolgen, jedoch liegen hier nicht ausreichend Informationen vor, um eine eindeutige Aussage treffen zu können.

Abstract

This master thesis about the topic "method optimization and validation for NIR spectroscopic analysis of chocolate, containing cocoa glaze and baking compositions" deals generally with the applicability of the near-infrared spectroscopy (NIRS) as a screening method for the analytical determination of the composition of chocolate. The parameters fat and theobromine/caffeine content and the proportions of sucrose and lactose are considered in more detail.

To demonstrate the suitability of the NIRS 104 chocolate samples are analyzed on the above mentioned parameters by the reference method of the Official Compilation according to § 64 LFGB and each sample is measured by a near-infrared spectrophotometer. The results determined in each case are tested for their relationship to each other and evaluated means of statistical tests. Based on the statistical data a decision can be given about the specifying of usability of NIRS as a rapid method. This part covers the method validation of NIRS opposite to the standardized wet chemical analysis and represents the major part of this work. The NIRS has the advantage that there is no complex sample preparation needed and no chemicals should be used. In addition, a sample measurement is directly carried out after a single instruction and takes only a few seconds.

Another aspect of the work is the use of the NIRS for the differentiation between different foods. Background represents the protection of fraud under Art. 7 LMIV in conjunction with § 11 LFGB and therefore the placing of imitated food on the market, which is prohibited according to § 11 para. 2 no. 2 LFGB. The possibility of differentiation between chocolate and containing cocoa glaze and between marzipan and persipan will be examined. In each case, the latter mentioned food represents an imitated food of the first mentioned. The absorption spectra which are obtained by the measuring are visually checked for similarities and differences. In addition to the sample measurements by the NIRS the samples are measured as part of product differentiation with a spectrophotometer of the mid-infrared range. It is based on the already mentioned background and offers the additional advantage that absolutely no preparation of the sample is necessary for examination.

Based on the findings, the NIRS can be used as a screening method for the parameters of fat and sucrose in chocolate. For the contents of theobromine/caffeine and lactose, this method is not applicable. The use of the NIRS for qualitative differentiation is not possible in the case of chocolate/cocoa containing fat glaze. The use for marzipan/persipan can be carried out if necessary, but there are not enough information available for an unequivocal statement.

Literaturverzeichnis

Afoalwa, E. O. 2010. *Chocolate Science and Technology*. Chichester, West Sussex : John Wiley & Sons, 2010.

Amtliche Sammlung, von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB. Untersuchungen von Lebensmitteln. *Bestimmung von Theobromin und Coffein, Methode L 18.00.16.*

BDSI, Bundesverband der Deutschen Süßwarenindustrie. 2015. BDSI. *Bundesverband der Deutschen Süßwarenindustrie e.V.* [Online] Januar 27, 2015. [Cited: Juni 09, 2015.] <http://www.bdsi.de/pressemeldungen/details/suesswarenindustrie-in-deutschland-2014-stabil-wachstum-ausschliesslich-ueber-den-export/>.

BDSI, Bundesverband der Deutschen Süßwarenindustrie e. V. 2012. Richtlinie für Zuckerwaren. [ed.] Bund für Lebensmittelrecht und Lebensmittelkunde e. V. BLL. Berlin : s.n., Mai 2012.

BDSI, Bundesverband der Deutschen Süßwarenindustrie e.V. 2014. Kommentar - Recht der Süßwarenwirtschaft. [Loseblattwerk]. Hamburg : Behr's Verlag, 12 2014.

BMEL, Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft. 2011. LFGB. *Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch*. 2011.

BMELV, Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz, [ed.]. 2008. *KakaoVO*. September 30, 2008. Verordnung über Kakao- und Schokoladenerzeugnisse (Kakaoverordnung).

BMELV, Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz, [ed.]. 2014. *LFGB*. Dezember 5, 2014. Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch.

Bruhn, J. 1986. *Statistische Verfahren: Datenanalyse mit BASIC-Programmen*. Braunschweig, Wiesbaden : Friedr. Vieweg & Sohn, 1986.

Che Man, Y. B., et al. 2005. Analysis of potential lard adulteration in chocolate and chocolate products using Fourier transform infrared spectroscopy. *Food Chemistry*. 2005, 90, pp. 815 - 819.

Cleff, T. 2015. *Deskriptive Statistik und Explorative Datenanalyse*. 3. Wiesbaden : Springer Fachmedien, 2015.

da Costa Filho, P. A. 2009. Rapid determination of sucrose in chocolate mass using near infrared spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*. 2009, 631, pp. 206 - 211.

DIN Deutsches Institut für Normung e.V. 2005. DIN EN ISO 9000:2005.

Qualitätsmanagementsysteme – Grundlagen und Begriffe. s.l. : Beuth Verlag, Dezember 2005.

—. **2005.** DIN EN ISO/IEC 17025:2005. *Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Prüf- und Kalibrierlaboratorien.* s.l. : Beuth Verlag, August 2005.

DLMBK, Deutsche Lebensmittelbuch-Kommission. 2010. Leitsätze für Feine Backwaren. [ed.] Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft BMEL. Februar 4, 2010.

DLMBK, Deutsche Lebensmittelbuch-Kommission. 2010. *Leitsätze für Ölsamen und daraus hergestellte Massen und Süßwaren.* [ed.] Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft BMEL. Januar 8, 2010.

Eisenbrand, G., Schreier, P. and Meyer, A. H. 2006. *RÖMPP Lexikon Lebensmittelchemie.* 2. Stuttgart : Georg Thieme Verlag, 2006.

Europäische Parlament und, der Rat der europäischen Union. 2002. VO (EG) 178/2002. *Basis-Verordnung.* 2002.

Europäisches Parlament und, der Rat der europäischen Union. 2011. VO (EU) 1169/2011. *Lebensmittelinformationsverordnung (LebensmittelinfoVO).* 2011.

Fischer, M. and Glomb, M. A. 2015. *Moderne Lebensmittelchemie.* 1. Hamburg : Behr's Verlag, 2015.

Frede, W., [ed.]. 2006. *Taschenbuch für Lebensmittelchemiker - Lebensmittel - Bedarfsgegenstände - Kosmetika - Futtermittel.* 2. Berlin, Heidelberg : Springer-Verlag, 2006.

Funk, W., Dammann, V. and Donnevert, G. 1992. *Qualitätssicherung in der Analytischen Chemie.* Weinheim : VCH, 1992.

Garti, N. and Widlak, N. R., [ed.]. 2012. *Cocoa Butter and Related Compounds.* Urbana : AOCS Press, 2012.

Gottwald, W. and Wachter, G. 1997. *IR-Spektroskopie für Anwender.* Weinheim : Wiley-VCH Verlag, 1997.

Günzler, H. and Gremlich, H.-U. 2003. *IR-Spektroskopie: Eine Einführung.* 4. Weinheim : WILEY-VCH, 2003.

- Hoffmann, H., Mauch, W. and Untze, W. 2002.** *Zucker und Zuckerwaren*. 2. Hamburg : Behr's Verlag, 2002.
- Janczyk, M. and Pfister, R. 2013.** *Inferenzstatistik verstehen*. Berlin, Heidelberg : Springer Verlag, 2013.
- Kamiske, G. F. and Bauer, J.-P. 2007.** *Qualitätsmanagement von A bis Z: Erläuterungen moderner Begriffe des Qualitätsmanagements*. 6. München : Carl Hanser Verlag, 2007.
- Klein, M. 2001.** *Einführung in die DIN-Normen*. 13. Stuttgart, Berlin : B. G. Teubner GmbH, Beuth Verlag GmbH, 2001.
- Koca, N., et al. 2010.** Application of temperature-controlled attenuated total reflectance-mid-infrared (ATR-MIR) spectroscopy for rapid estimation of butter adulteration. *Food Chemistry*. 2010, 121, pp. 778 - 782.
- Krist, S. 2013.** *Lexikon der pflanzlichen Fette und Öle*. 2. Wien : Springer-Verlag, 2013.
- Kromidas, S. 1999.** *Validierung in der Analytik*. Weinheim : John Wiley & Sons, 1999.
- Kronthaler, F. 2014.** *Statistik angewandt*. Berlin, Heidelberg : Springer Verlag, 2014.
- Matissek, R., Steiner, G. and Fischer, M. 2014.** *Lebensmittelanalytik*. Berlin, Heidelberg : Springer-Verlag, 2014.
- Maurer, N. E. and Rodriguez-Saona, L. 2012.** Rapid Assessment of Quality Parameters in Cocoa Butter using ATR-MIR Spectroscopy and Multivariate Analysis. [ed.] Springer AOCS. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. December 25, 2012, 90, pp. 475 - 481.
- o. V. 2015.** Hanser. *Carl Hanser Verlag*. [Online] 2015. [Cited: September 19, 2015.] http://files.hanser.de/hanser/docs/20040419_244191129-96_3-446-21594-8Anhang4.pdf.
- Oestreich, M. and Romberg, O. 2014.** *Keine Panik vor Statistik*. 5. Wiesbaden : Springer Fachmedien, 2014.
- Pesch, B. 2009.** *Messen, Kalibrieren, Prüfen: Messungen planen, durchführen, bewerten, optimieren und dokumentieren*. Norderstedt : Books On Demand, 2009.
- Precht, M., Kraft, R. and Bachmaier, M. 2005.** *Angewandte Statistik 1*. 7. Berlin : Oldenbourg Verlag, 2005.
- Quatember, A. 2008.** *Statistik ohne Angst vor Formeln*. 2. München : Pearson Studium, 2008.

- Rasch, B., et al. 2014.** *Quantitative Methoden 1.* 4. Berlin, Heidelberg : Springer Verlag, 2014.
- Schulz, H. 1995.** Infrarotspektroskopie. [ed.] L. Matter. *Lebensmittel- und Umweltanalytik mit der Spektroskopie.* Weinheim : VCH Verlagsgesellschaft, 1995.
- Schünemann, C. and Treu, G. 2009.** *Technologie der Backwarenherstellung: fachkundliches Lehrbuch für Bäcker und Bäckerinnen.* 10. Alfeld/Leine : Gildebuchverlag GmbH & Co. KG, 2009.
- Schwedt, G. 2005.** *Taschenatlas der Lebensmittelchemie. 2.* Weinheim : WILEY-VCH Verlag, 2005.
- Skoog, D. A. and Leary, J. J. 1992.** *Principles of Instrumental Analysis.* 4. s.l. : Saunders College Publishing, 1992.
- Statista. 2015.** Statista. *Das Statistik-Portal.* [Online] 2015. [Cited: Juni 13, 2015.] <http://de.statista.com/statistik/daten/studie/20040/umfrage/jaehrlicher-schokoladenkonsum-pro-kopf-in-ausgewaehlten-laendern/>.
- Teye, E., et al. 2014.** Estimating cocoa bean parameters by FT-NIRS and chemometrics analysis. *Food Chemistry.* Dezember 18, 2014, 176, pp. 403 - 410.
- von Regius, B. 2006.** *Qualität in der Produktentwicklung: Vom Kundenwunsch bis zum fehlerfreien Produkt.* München : Carl Hansen Verlag, 2006.
- Wilson, R. H. 1990.** Fourier transform mid-infrared spectroscopy for food analysis. *Trends in analytical chemistry.* 1990, Vol. 9, 4, pp. 127 - 131.
- Wirbeleit, F. 2014.** *Prozessoptimierung: Einführung in die Statistische Datenanalyse und Versuchsplanung.* München : Oldenbourg Wissenschaftsverlag, 2014.

Gesetze, Verordnungen und Richtlinien sowie Amtliche Untersuchungsverfahren

LMIV - VERORDNUNG (EU) Nr. 1169/2011 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 25. Oktober 2011 betreffend die Information der Verbraucher über Lebensmittel und zur Änderung der Verordnungen (EG) Nr. 1924/2006 und (EG) Nr. 1925/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates und zur Aufhebung der Richtlinie 87/250/EWG der Kommission, der Richtlinie 90/496/EWG des Rates, der Richtlinie 1999/10/EG der Kommission, der Richtlinie 2000/13/EG des Europäischen Parlaments und des Rates, der Richtlinien 2002/67/EG und 2008/5/EG der Kommission und der Verordnung (EG) Nr. 608/2004 der Kommission

KakaoVO - Verordnung über Kakao- und Schokoladenerzeugnisse (Kakaoverordnung), Ausfertigungsdatum: 15.12.2003, Stand: Zuletzt geändert durch Art. 2 V v. 30.9.2008 I 1911

LFGB - Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch (Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch - LFGB), Ausfertigungsdatum: 01.09.2005, Stand: Neugefasst durch Bek. v. 3.6.2013 I 1426; Zuletzt geändert durch Art. 2 G v. 5.12.2014 I 1975

Leitsätze für Ölsamen und daraus hergestellte Massen und Süßwaren, Vom 27. Januar 1965 (Beilage zum BAnz. Nr. 101 vom 02.06.1965, GMBI Nr. 17 S. 165 vom 23.06.1965), zuletzt geändert am 08.01.2010 (BAnz. Nr. 16 vom 29.01.2010, GMBI Nr. 5/6 S. 120 ff. vom 04.02.2010)

Leitsätze für Feine Backwaren vom 17./18. September 1991 (Beilage Nr. 86 b zum BAnz. Vom 8. Mai 1992, GMBI. Nr. 17 S. 325 vom 8. Mai 1992), zuletzt geändert am 08.01.2010 (BAnz. Nr. 16 vom 29.01.2010, GMBI Nr. 5/6 S. 120 ff. vom 04.02.2010)

Richtlinie für Zuckerwaren vom Bundesverband der Deutschen Süßwarenindustrie (BDSI), fünften Fassung, Berlin, im Mai 2012, Bund für Lebensmittelrecht und Lebensmittelkunde e. V.

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB. (1980) Untersuchungen von Lebensmitteln. Methode L 18.00.16, Bestimmung von Theobromin und Cofein.

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB. (1980) Untersuchungen von Lebensmitteln. Methode L 44.00 4, Bestimmung des Gesamtfettgehaltes in Schokolade.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die von mir eingerichtete Masterarbeit mit dem Titel

„Methodenoptimierung und -validierung zur
NIR-spektroskopischen Analyse von Schokolade,
kakaohaltiger Fettglasur und Backmassen“

selbständig verfasst und ausschließlich die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe. Wörtlich oder dem Sinn nach aus anderen Werken entnommene Stellen sind unter Angabe der Quellen kenntlich gemacht.

Hamburg, 19. November 2015

Christina Krabbe

Anhang

Anlage 1: Messergebnisse aller Parameter Referenzanalytik	B
Anlage 2: Messergebnisse aller Parameter NIR	D
Anlage 3: Validierungsparameter.....	F
Anlage 4: Statistik – Prüfung auf Normalverteilung.....	G
Anlage 5: Statistik – Saccharose inkl. Ausreißern.....	H
Anlage 6: NIR-Spektren.....	I
Anlage 7: MIR-Spektren Schokoladen/kakaohaltige Fettglasur.....	J
Anlage 8: MIR-Spektren Marzipan/Persipan	K
Anlage 9: Statistiktabelle: Ausreißertest nach Grubbs	L
Anlage 10: Statistiktabelle: Normalverteilung nach David	M
Anlage 11: Statistiktabelle t-Tabelle.....	N

Anlage 1: Messergebnisse aller Parameter Referenzanalytik

Lfd-Nr.	Probe	Analysen					
		Gesamtfett [%]	Theobromin [g/100 g]	Coffein [g/100 g]	Theo/Coff [g/100 g]	Lactose [%]	Saccharose [%]
1	14-L-00646-1-1	45,9732	0,831313	0,077889	0,909201		28,877
2	14-L-00647-1-1	39,1416	1,407001	0,112352	1,519353		24,645
3	14-L-00883-1-1	38,8075	1,083722	0,094368	1,178090		24,706
4	14-L-00887-1-1	45,6027	1,374500	0,132500	1,507000		27,688
5	14-L-00983-1-1	37,5124	0,818482	0,059380	0,877862	0,198	37,433
6	14-L-01248-1-1	49,4221	1,291958	0,091664	1,383621		6,569
7	14-L-01799-1-1	41,8175	0,964731	0,085589	1,050320		29,897
8	14-L-01807-1-1	53,5373	1,075959	0,098839	1,174797		15,370
9	14-L-01821-1-1	45,3201	1,129089	0,113227	1,242316		26,773
10	14-L-02104-1-1	35,6118	0,835574	0,056890	0,892463		41,801
11	14-L-02105-1-1	35,9484	0,557341	0,042501	0,599842	4,035	43,015
12	14-L-02108-1-1	37,7878	0,224556	0,025180	0,249735	7,097	46,197
13	14-L-02109-1-1	30,0899	0,970000	0,056500	1,026500		45,105
14	14-L-02111-1-1	31,1134	0,252890	0,025421	0,278311	13,224	39,203
15	14-L-02112-1-1	40,5514	1,943500	0,142000	2,085500		23,774
16	14-L-02113-1-1	30,6566	0,891000	0,056500	0,947500		46,998
17	14-L-02114-1-1	35,9734	1,039500	0,081000	1,120500		36,556
18	14-L-02115-1-1	40,0521	1,923000	0,109000	2,032000		23,949
19	14-L-02117-1-1	44,3743	1,378279	0,132173	1,510451		27,066
20	14-L-02118-1-1	35,9009	0,216000	0,024500	0,240500		47,115
21	14-L-02120-1-1	40,8481	0,497000	0,041500	0,538500		34,695
22	14-L-02121-1-1	38,5416	1,148933	0,092598	1,241531		25,074
23	14-L-02124-1-1	45,5648	1,109209	0,081572	1,190780		29,149
24	14-L-02126-1-1	38,2146	0,329763	0,026699	0,356462	8,368	40,177
25	14-L-02212-1-1	43,6633	1,415000	0,124000	1,539000		26,819
26	14-L-02316-1-1	41,0917	1,678500	0,168500	1,847000		27,427
27	14-L-02424-1-1	47,7458	1,923500	0,133500	2,057000		12,509
28	14-L-02425-1-1	40,4694	1,488010	0,128072	1,616082		25,661
29	14-L-02536-1-1	48,6629	1,530500	0,119000	1,649500		11,743
30	14-L-02554-1-1	37,2799	0,569931	0,046367	0,616298		40,543
31	14-L-02555-1-1	33,5048	0,860681	0,060971	0,921652	0,507	42,301
32	14-L-02558-1-1	33,7952	0,057503	0,017931	0,075434		44,482
33	14-L-02559-1-1	33,8741	0,244000	0,023500	0,267500		47,116
34	14-L-02560-1-1	30,2572	1,169500	0,077500	1,247000		44,179
35	14-L-02562-1-1	34,0109	0,450029	0,035983	0,486012	7,43	39,609
36	14-L-02678-1-1	39,7198	1,031325	0,138951	1,170276		31,177
37	14-L-02686-1-1	41,4535	0,896467	0,093084	0,989550	0,069	31,422
38	14-L-02691-1-1	44,3762	0,872912	0,086175	0,959087		28,881
39	14-L-02692-1-1	42,0641	1,275500	0,097500	1,373000		22,604
40	14-L-02780-1-1	39,4700	0,443718	0,048515	0,492233		36,909
41	14-L-02880-1-1	31,3971	0,289930	0,024952	0,314882	8,501	47,032
42	14-L-02881-1-1	32,4399	0,300486	0,026937	0,327423		42,348
43	14-L-03080-1-1	28,2106	0,396570	0,032197	0,428767		44,890
44	14-L-03081-1-1	35,9055	0,275465	0,026623	0,302088		38,656
45	14-L-03083-1-1	31,9710	0,267391	0,026038	0,293429	9,728	43,328
46	14-L-03085-1-1	30,6103	0,194737	0,021332	0,216069		45,422
47	14-L-03211-1-1	35,6765	0,307859	0,029762	0,337621	10,138	39,724
48	14-L-03504-1-1	31,8503	0,250667	0,026718	0,277385		41,101
49	14-L-03505-1-1	36,4446	0,794309	0,050625	0,844934	0,676	37,842
50	14-L-03622-1-1	32,7803	0,370091	0,029570	0,399661	7,568	51,577
51	14-L-03639-1-1	31,1975	0,365713	0,030813	0,396525		45,592
52	14-L-03640-1-1	32,5778	0,301961	0,028997	0,330958	9,812	41,603
53	14-L-03793-1-1	30,9702	0,307040	0,025997	0,333037	9,978	39,972

Lfd-Nr.	Probe	Analysen					
		Gesamtfett [%]	Theobromin [g/100 g]	Coffein [g/100 g]	Theo/Coff [g/100 g]	Lactose [%]	Saccharose [%]
54	14-L-03972-1-1	31,5671	0,283429	0,022413	0,305841		46,121
55	14-L-09942-1-1	33,2700	0,322925	0,025930	0,348854		41,750
56	14-L-09945-1-1	33,8600	0,020650	0,016000	0,036650		59,873
57	14-L-10048-1-1	32,4600	0,193500	0,021550	0,215050		45,176
58	14-L-10050-1-1	30,9200	0,486500	0,026700	0,513200		39,781
59	14-L-10066-1-1	33,6595	0,145065	0,015787	0,160852	13,499	38,159
60	14-L-10067-1-1	27,5995	0,344497	0,028132	0,372629		45,819
61	14-L-10216-1-1	40,9700	0,141000	0,036500	0,177500		41,626
62	14-L-10287-1-1	37,3500	0,167000	0,026700	0,193700		44,267
63	14-L-10288-1-1	37,4400	0,141000	0,040000	0,181000		42,789
64	14-L-10299-1-1	39,9564	0,889859	0,064717	0,954575		34,531
65	14-L-10412-1-1	31,9910	0,219919	0,022561	0,242480	11,179	43,227
66	14-L-10413-1-1	37,7670	0,057738	0,014654	0,072392	9,324	42,996
67	14-L-10417-1-1	31,1300	0,228000	0,020800	0,248800	8,319	47,038
68	14-L-10658-1-1	34,7259	0,310096	0,028728	0,338823		42,691
69	14-L-10879-1-1	45,0766	1,068976	0,086178	1,155154		28,394
70	14-L-11001-1-1	34,4651	0,845793	0,056322	0,902115		43,726
71	14-L-11008-1-1	36,3256	1,171198	0,082178	1,253376	0,021	39,139
72	14-L-11015-1-1	37,6695	1,170246	0,082855	1,253101		38,748
73	14-L-11175-1-1	28,2262	0,266073	0,027411	0,293484	11,981	47,597
74	14-L-11294-1-1	35,3540	0,165676	0,016870	0,182545	8,131	43,757
75	14-L-11302-1-1	34,5315	1,281420	0,086584	1,368004		39,756
76	14-L-11406-1-1	39,3742	0,197244	0,021352	0,218596	7,024	41,590
77	14-L-11507-1-1	29,7769	0,348685	0,031947	0,380631	12,477	42,377
78	14-L-11509-1-1	38,3895	0,272642	0,035644	0,308285	8,255	39,258
79	14-L-11510-1-1	35,2624	0,239663	0,037448	0,277111	7,312	36,760
80	15-L-01453-1-1	31,5597	0,239248	0,024903	0,264151		39,909
81	15-L-01760-1-1	30,3380	0,281222	0,022766	0,303987		47,121
82	15-L-01837-1-1	31,4407	0,186216	0,018888	0,205104	11,498	47,712
83	15-L-01934-1-1	31,0483	0,288136	0,023968	0,312104		41,331
84	15-L-01939-1-1	32,3044	0,194000	0,015500	0,209500		42,831
85	15-L-01951-1-1	33,6563	0,239689	0,022498	0,262187	12,335	39,378
86	15-L-01952-1-1	33,4852	0,233500	0,022500	0,256000	7,735	44,927
87	15-L-01955-1-1	35,5180	0,228123	0,021326	0,249448	6,972	46,411
88	15-L-01956-1-1	32,8060	0,227652	0,021353	0,249005		42,400
89	15-L-01959-1-1	32,7406	0,253258	0,014855	0,268113		40,260
90	15-L-01961-1-1	36,0098	0,203128	0,023663	0,226790	8,493	45,513
91	15-L-02055-1-1	35,7938	0,191400	0,024925	0,216324		39,202
92	15-L-02058-1-1	34,7961	0,281506	0,026018	0,307524	9,919	45,426
93	15-L-02077-1-1	28,2280	0,221000	0,020000	0,241000	11,795	46,073
94	15-L-02182-1-1	29,6044	0,266047	0,024942	0,290989	12,956	43,519
95	15-L-02183-1-1	32,8257	0,262237	0,021890	0,284127		43,783
96	15-L-02280-1-1	43,5036	0,296595	0,042160	0,338754		38,673
97	15-L-02375-1-1	35,5464	0,219983	0,002784	0,222767	9,773	44,742
98	15-L-02420-1-1	32,2061	0,277682	0,025031	0,302713		47,553
99	15-L-02478-1-1	38,1276	0,347481	0,035504	0,382984	6,75	42,923
100	15-L-02612-1-1	36,1633	0,181612	0,025513	0,207125		39,614
101	15-L-02613-1-1	32,7615	0,266361	0,027728	0,294089	8,307	47,835
102	15-L-02615-1-1	32,7448	0,292449	0,024840	0,317288		47,201
103	15-L-02616-1-1	31,0658	0,264170	0,025161	0,289331	13,09	44,006
104	15-L-02781-1-1	32,4405	0,249758	0,023964	0,273721	11,934	42,782
Mittelwert \bar{x}		36,1314	0,584556	0,049986	0,634542	8,369	38,773
Standardabweichung s		5,2091	0,4806	0,0373	0,5160	3,763	8,949

Anlage 2: Messergebnisse aller Parameter NIR

Lfd-Nr.	Probe	NIR			
		Gesamtfett [%]	Theo/Coff [g/100g]	Lactose [%]	Saccharose [%]
1	14-L-00646-1-1	46,80	0,543705		24,91
2	14-L-00647-1-1	40,81	0,667035		24,19
3	14-L-00883-1-1	43,84	0,639551		24,14
4	14-L-00887-1-1	45,18	0,556417		26,05
5	14-L-00983-1-1	37,38	0,460813	7,710	38,03
6	14-L-01248-1-1	54,24	0,795998		10,66
7	14-L-01799-1-1	42,84	0,573445		26,88
8	14-L-01807-1-1	54,20	0,656145		14,94
9	14-L-01821-1-1	47,78	0,537320		23,36
10	14-L-02104-1-1	35,43	0,452625		39,83
11	14-L-02105-1-1	35,85	0,300110	6,980	41,97
12	14-L-02108-1-1	35,24	0,111920	6,740	45,90
13	14-L-02109-1-1	30,38	0,473092		42,67
14	14-L-02111-1-1	31,93	0,118593	9,290	41,72
15	14-L-02112-1-1	42,53	0,652089		22,34
16	14-L-02113-1-1	29,90	0,462793		43,23
17	14-L-02114-1-1	35,63	0,524922		34,01
18	14-L-02115-1-1	41,34	0,682455		23,02
19	14-L-02117-1-1	44,69	0,594181		24,48
20	14-L-02118-1-1	34,57	0,150102		43,61
21	14-L-02120-1-1	39,83	0,295293		34,58
22	14-L-02121-1-1	40,80	0,653101		24,74
23	14-L-02124-1-1	44,26	0,514463		27,96
24	14-L-02126-1-1	37,64	0,126740	6,990	41,85
25	14-L-02212-1-1	44,72	0,585065		24,94
26	14-L-02316-1-1	43,95	0,618337		25,39
27	14-L-02424-1-1	48,10	0,814687		11,59
28	14-L-02425-1-1	42,04	0,613595		24,65
29	14-L-02536-1-1	48,08	0,852088		13,89
30	14-L-02554-1-1	37,87	0,319009		33,90
31	14-L-02555-1-1	34,22	0,455083	9,060	40,77
32	14-L-02558-1-1	34,60	0,012148		44,50
33	14-L-02559-1-1	32,08	0,141427		48,30
34	14-L-02560-1-1	30,09	0,447595		42,88
35	14-L-02562-1-1	34,55	0,177112	7,820	41,73
36	14-L-02678-1-1	39,59	0,546137		30,21
37	14-L-02686-1-1	41,77	0,576674	10,660	28,18
38	14-L-02691-1-1	45,10	0,543877		26,07
39	14-L-02692-1-1	43,03	0,733720		22,11
40	14-L-02780-1-1	40,22	0,175923		36,83
41	14-L-02880-1-1	31,74	0,156476	9,180	45,54
42	14-L-02881-1-1	32,16	0,145825		43,14
43	14-L-03080-1-1	31,38	0,151247		47,86
44	14-L-03081-1-1	36,46	0,078002		39,96
45	14-L-03083-1-1	32,79	0,150610	8,590	42,66
46	14-L-03085-1-1	30,76	0,100902		48,21
47	14-L-03211-1-1	36,31	0,088109	8,130	40,05
48	14-L-03504-1-1	32,65	0,138779		42,91
49	14-L-03505-1-1	36,57	0,451564	12,080	36,15
50	14-L-03622-1-1	33,50	0,134258	7,640	42,07
51	14-L-03639-1-1	31,80	0,167442		43,87
52	14-L-03640-1-1	33,18	0,122481	8,370	42,56
53	14-L-03793-1-1	32,26	0,131391	9,660	42,71

Lfd-Nr.	Probe	NIR			
		Gesamtfett [%]	Theo/Coff [g/100g]	Lactose [%]	Saccharose [%]
54	14-L-03972-1-1	32,96	0,157900		46,36
55	14-L-09942-1-1	33,12	0,121192		41,67
56	14-L-09945-1-1	32,18	0,017690		46,69
57	14-L-10048-1-1	32,71	0,156307		44,89
58	14-L-10050-1-1	32,72	0,111622		42,01
59	14-L-10066-1-1	34,24	0,068704	8,650	37,82
60	14-L-10067-1-1	28,90	0,090069		46,42
61	14-L-10216-1-1	39,12	0,109006		39,72
62	14-L-10287-1-1	37,83	0,125538		40,60
63	14-L-10288-1-1	37,65	0,126180		41,23
64	14-L-10299-1-1	39,19	0,470688		35,42
65	14-L-10412-1-1	33,15	0,122923	9,140	41,71
66	14-L-10413-1-1	38,06	0,000616	6,770	42,02
67	14-L-10417-1-1	31,94	0,158881	8,060	47,39
68	14-L-10658-1-1	34,66	0,163600		42,69
69	14-L-10879-1-1	45,73	0,613834		23,72
70	14-L-11001-1-1	35,83	0,463173		40,18
71	14-L-11008-1-1	38,29	0,496027	9,580	35,96
72	14-L-11015-1-1	38,41	0,523388		34,49
73	14-L-11175-1-1	28,73	0,115060	9,700	48,19
74	14-L-11294-1-1	35,53	0,002164	8,860	43,03
75	14-L-11302-1-1	35,97	0,496014		36,03
76	14-L-11406-1-1	38,55	0,120333	5,780	42,68
77	14-L-11507-1-1	33,05	0,143246	9,030	41,97
78	14-L-11509-1-1	38,06	0,163706	8,230	37,54
79	14-L-11510-1-1	37,78	0,130066	8,370	36,79
80	15-L-01453-1-1	32,36	0,091787		42,72
81	15-L-01760-1-1	31,56	0,141183		47,37
82	15-L-01837-1-1	29,32	0,101602	10,120	47,94
83	15-L-01934-1-1	30,78	0,129610		44,19
84	15-L-01939-1-1	33,31	0,125779		42,63
85	15-L-01951-1-1	34,11	0,085584	9,470	40,44
86	15-L-01952-1-1	34,94	0,124904	7,955	44,93
87	15-L-01955-1-1	35,40	0,115271	6,915	45,66
88	15-L-01956-1-1	31,44	0,077160		45,20
89	15-L-01959-1-1	32,23	0,138751		43,31
90	15-L-01961-1-1	37,31	0,122949	7,775	40,41
91	15-L-02055-1-1	36,40	0,090054		40,16
92	15-L-02058-1-1	32,61	0,127111	10,970	42,30
93	15-L-02077-1-1	29,41	0,111011	10,200	45,89
94	15-L-02182-1-1	29,67	0,111663	9,910	46,10
95	15-L-02183-1-1	31,52	0,275958		43,79
96	15-L-02280-1-1	42,25	0,164617		37,17
97	15-L-02375-1-1	34,76	0,074541	8,725	45,18
98	15-L-02420-1-1	31,96	0,153825		47,18
99	15-L-02478-1-1	37,62	0,211978	8,620	37,80
100	15-L-02612-1-1	36,17	0,100600		40,29
101	15-L-02613-1-1	31,03	0,120912	7,270	48,81
102	15-L-02615-1-1	32,39	0,148907		46,69
103	15-L-02616-1-1	29,80	0,110021	10,140	45,97
104	15-L-02781-1-1	31,76	0,132128	9,510	44,35
Mittelwert \bar{y}		36,53	0,284888	9,432	30,00
Standardabweichung s		5,45	0,2256	1,812	8,985

	Validierungsdaten NIR			
	Gesamtfett	Theo/Coff	Saccharose	Laktose
Mittelwert \bar{y}	36,5301	0,2849	37,8148	9,3580
Standardabweichung s	5,4548	0,2256	9,0432	1,7884
Reststandardabweichung s_{gr}	1,3052	0,0715	2,1015	1,7510
Verfahrensstandardabweichung s_x	1,2830	0,1721	2,0811	74,1967
Verfahrensvariationskoeffizient V_{ko}	3,51 %	60,41 %	5,50 %	792,86 %
Wiederfindungsrate WFR	101,11 %	45,22 %	98,48 %	1838,21 %

Schnelltest auf Normalverteilung der Differenzen nach David

Untere und obere Grenze nach linearer Interpolation für $\alpha = 0,1\%$:

Berechnete Prüfgrößen nach Formel 11:

$$\mathbf{n = 104} \quad \mathbf{g_u = 1,99} \quad \mathbf{g_o = 5,9224}$$

Gesamtfett: $1,99 < 5,8501 < 5,9224 \rightarrow$ normalverteilt

Theobromin/Coffein: $1,99 < 4,5979 < 5,9224 \rightarrow$ normalverteilt

Saccharose: $1,99 < 6,7693 > 5,9224 \rightarrow$ nicht normalverteilt

$$\mathbf{n = 102} \quad \mathbf{g_u = 1,99} \quad \mathbf{g_o = 5,9112}$$

Saccharose 2

(ohne Ausreißer): $1,99 < 5,1542 < 5,9112 \rightarrow$ normalverteilt

$$\mathbf{n = 39} \quad \mathbf{g_u = 1,978} \quad \mathbf{g_o = 5,136}$$

Laktose: $1,978 < 4,172 < 5,136 \rightarrow$ normalverteilt

SPSS Output Saccharose inkl. Ausreißerwerten:

Statistik für Stichproben mit paarigen Werten

		Mittelwert	H	Standard- abweichung	Standardfehler Mittelwert
Saccharose	Analysen	38,7728	104	8,99229	,88177
	NIR	38,0038	104	9,02832	,88530

Korrelationen für Stichproben mit paarigen Werten

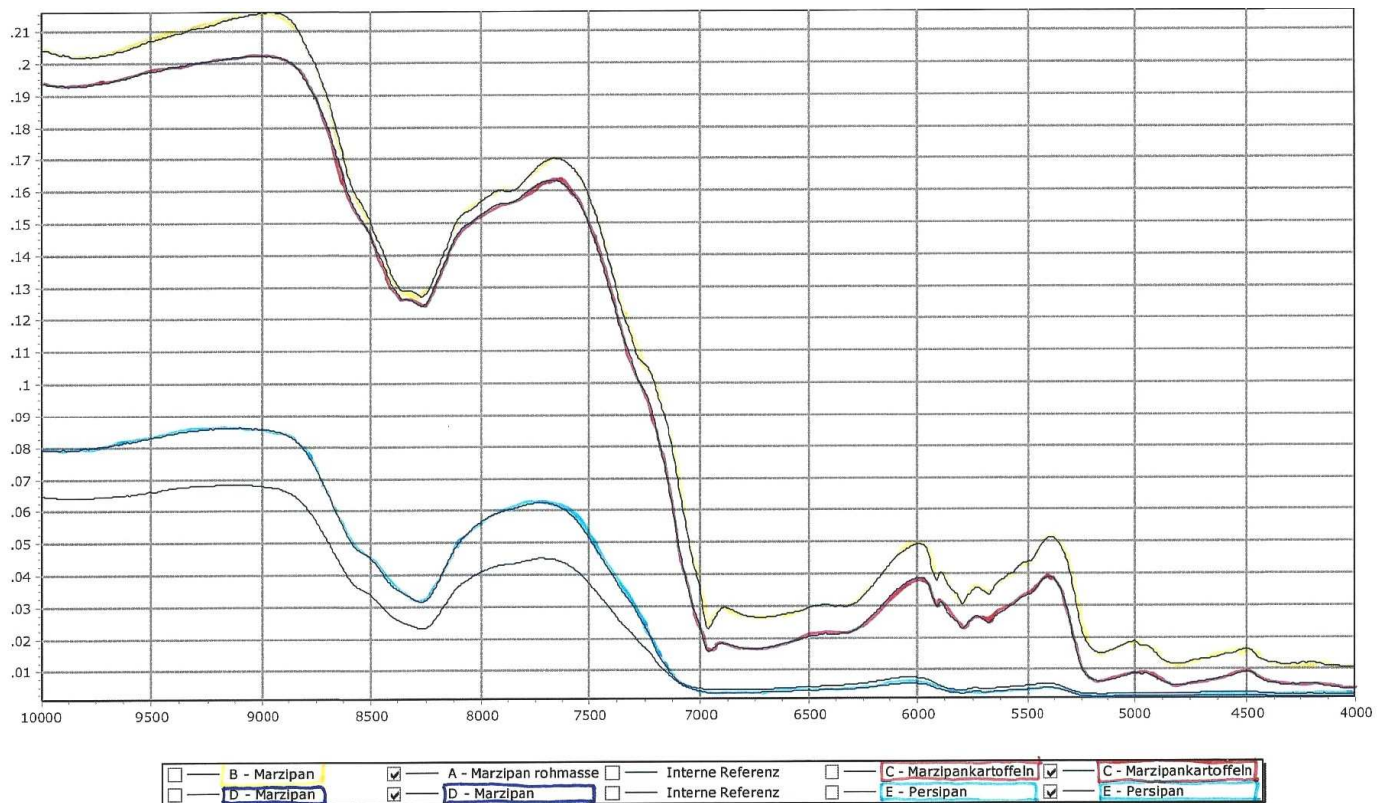
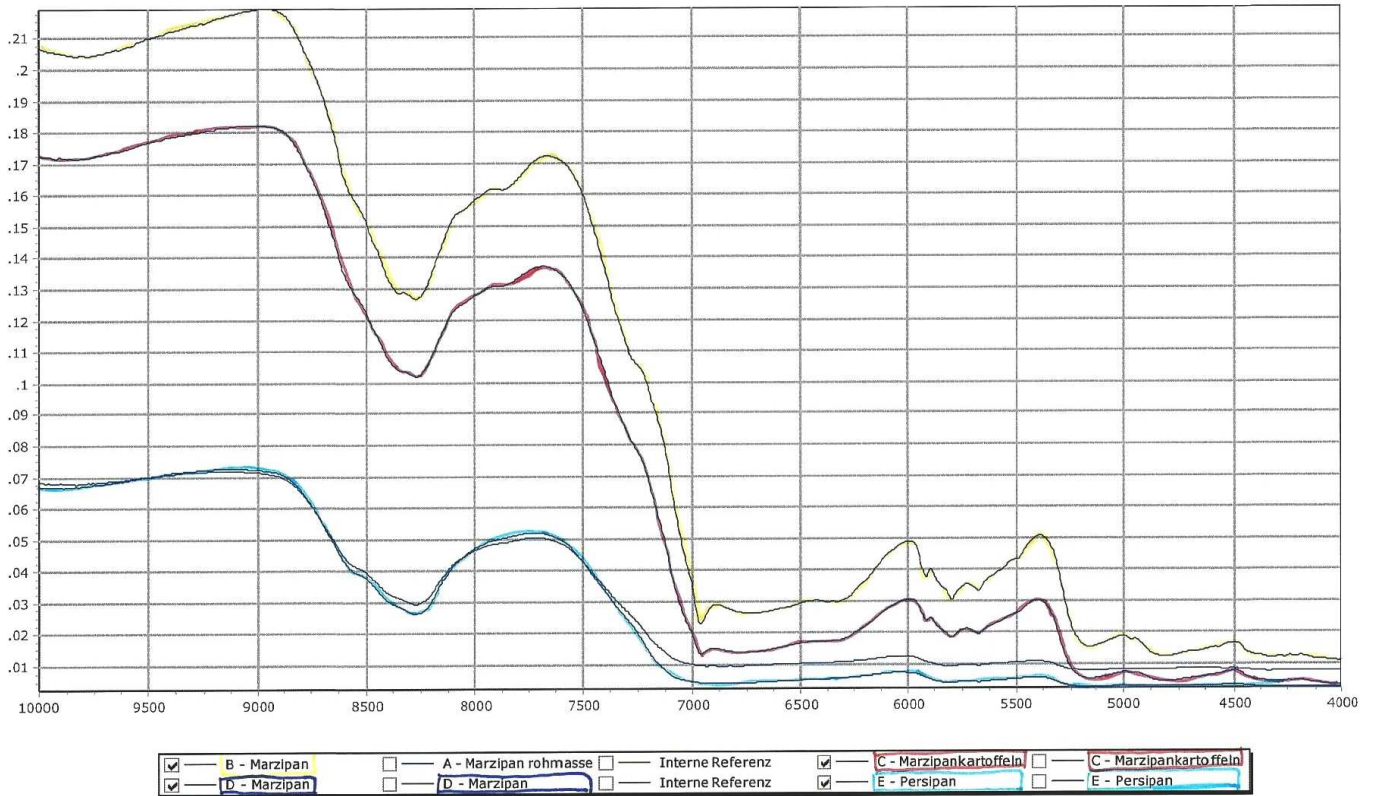
		H	Korrelation	Sig.
Saccharose	Analysen & NIR	104	,960	,000

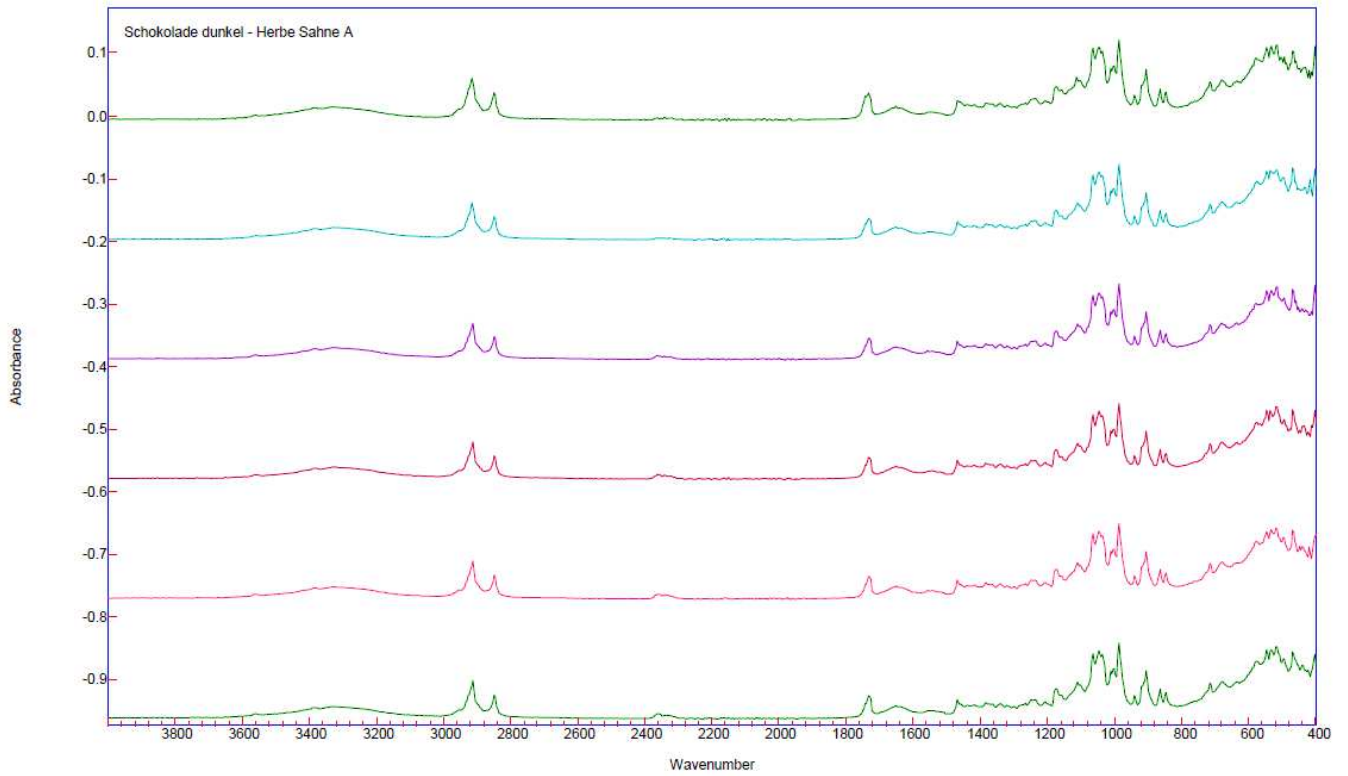
Test für Stichproben mit paarigen Werten

	Paarige Differenzen					t	df	Sig. (2-sei- tig)	
	Mittel- wert	Standard- abweichung	Standard- fehler Mittelwert	99,9% Konfidenz- intervall der Differenz					
				Unterer	Oberer				
Saccharose	Analysen - NIR	,76896	2,56418	,25144	-,08279	1,62071	3,058	103	,003

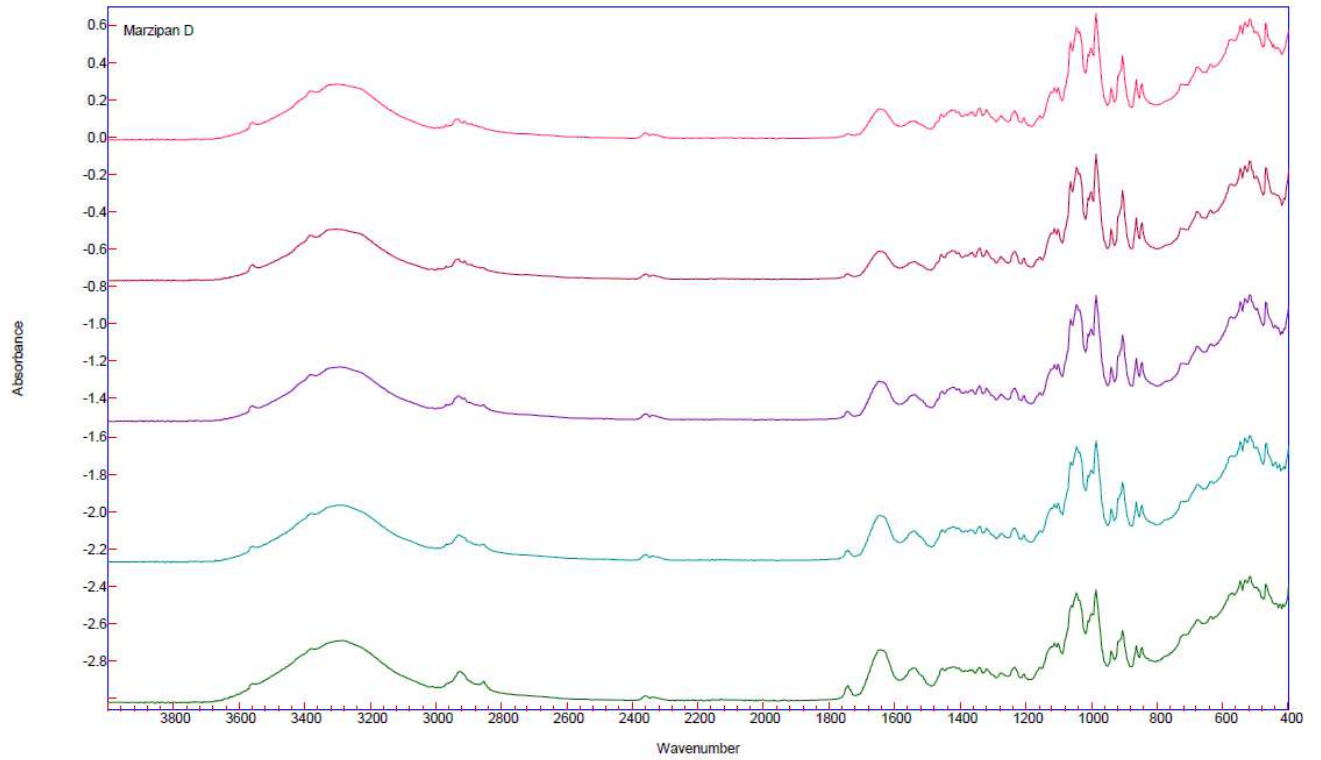
Für die Differenz der Stichproben der Saccharosegehalte ohne die Prüfung auf Ausreißer übersteigt der errechnete Prüfwert die obere Grenze für das Vorliegen normalverteilter Daten. Aufgrund des Stichprobenumfanges $n > 30$ und der Robustheit des Differenzen-t-Testes gegenüber einer Verletzung dieser Voraussetzung, kann der Hypothesentest trotz dessen für die Daten des Parameters Saccharose angewandt werden (Kronthaler, 2014 S. 162).

Einzelmessungen Marzipan und Persipan





Name	Color
kakaohaltige Fettglasur F	—
Schokolade weiß E	—
Schokolade Vollmilch hochfein D	—
Schokolade dunkel - schwarze Herren Schokolade edelbitter C	—
Schokolade dunkel - São Tomé B	—
Schokolade dunkel - Herbe Sahne A	—



Name	Color
Persipan	Red
Marzipan D	Purple
Marzipan-Kartoffeln C	Pink
Marzipan B	Teal
Marzipan-Rohmasse A	Green

N	$g_{krit;0,5\%}$	N	$g_{krit;0,5\%}$	N	$g_{krit;0,5\%}$
3	1,155	15	2,895	90	3,862
4	1,498	16	2,945	100	3,900
5	1,773	17	2,991	150	4,038
6	1,993	18	3,032	200	4,127
7	2,171	19	3,071	250	4,192
8	2,316	20	3,106	300	4,243
9	2,438	30	3,359	350	4,284
10	2,542	40	3,512	400	4,319
11	2,631	50	3,619	450	4,350
12	2,709	60	3,700	500	4,376
13	2,778	70	3,764	700	4,459
14	2,840	80	3,817	1000	4,542

Quelle: (Wirbeleit, 2014 S. 28)

Kritische Werte nach linearer Interpolation für:

$$n = 104 \rightarrow 3,91104$$

$$n = 103 \rightarrow 3,90828$$

$$n = 102 \rightarrow 3,90552$$

– David

N	Untere Schranken			Obere Schranken		
	5 %	1 %	0,1 %	5 %	1 %	0,1 %
5	2,15	2,02	1,83	2,83	2,80	2,80
6	2,28	2,15	1,83	3,16	3,16	3,10
7	2,40	2,26	1,87	3,46	3,46	3,34
8	2,50	2,35	1,87	3,74	3,74	3,54
9	2,59	2,44	1,90	4,00	4,00	3,72
10	2,67	2,51	1,90	4,24	4,24	3,88
11	2,74	2,58	1,92	4,47	4,01	3,80
12	2,80	2,64	1,92	4,69	4,13	3,91
13	2,86	2,70	1,93	4,90	4,24	4,00
14	2,92	2,75	1,93	5,10	4,34	4,09
15	2,97	2,80	1,94	5,29	4,44	4,17
16	3,01	2,84	1,94	5,48	4,52	4,24
17	3,06	2,88	1,94	5,66	4,60	4,31
18	3,10	2,92	1,94	5,83	4,67	4,37
19	3,14	2,96	1,95	6,00	4,74	4,43
20	3,18	2,99	1,95	6,16	4,80	4,49
25	3,34	3,15	1,96	6,93	5,06	4,71
30	3,47	3,27	1,97	7,62	5,26	4,89
35	3,58	3,38	1,97	8,25	5,42	5,04
40	3,67	3,47	1,98	8,83	5,56	5,16
45	3,75	3,55	1,98	9,38	5,67	5,26
50	3,83	3,62	1,98	9,90	5,77	5,35
55	3,90	3,69	1,98	10,39	5,86	5,43
60	3,96	3,75	1,98	10,86	5,94	5,51
65	4,01	3,80	1,98	11,31	6,01	5,57
70	4,06	3,85	1,99	11,75	6,07	5,63
75	4,11	3,90	1,99	12,17	6,13	5,68
80	4,16	3,94	1,99	12,57	6,18	5,73
85	4,20	3,99	1,99	12,96	6,23	5,78
90	4,24	4,02	1,99	13,34	6,27	5,82
95	4,27	4,06	1,99	13,71	6,32	5,86
100	4,31	4,10	1,99	14,07	6,36	5,90
150	4,59	4,38	1,99	17,26	6,64	6,18
200	4,78	4,59	2,00	19,95	6,84	6,39
500	5,37	5,13	2,00	31,59	7,42	6,94

Quelle: (Kromidas, 1999 S. 254)

Kritische Werte ($\alpha = 0,1 \%$) nach linearer Interpolation für:

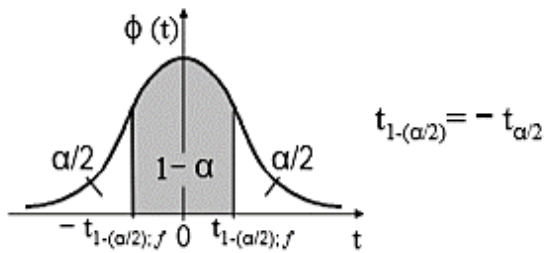
$$n = 104 \rightarrow 1,990 \quad 5,9224$$

$$n = 103 \rightarrow 1,990 \quad 5,9168$$

$$n = 102 \rightarrow 1,990 \quad 5,9112$$

$$n = 39 \rightarrow 1,978 \quad 5,1360$$

Quantile $t_{1-(\alpha/2);f}$ der t-Verteilung zur statistischen Sicherheit $1-\alpha$ im Abhängigkeit vom Freiheitsgrad f (zweiseitige Abgrenzung)



f	Statistische Sicherheit $1-\alpha$							f
	0,80	0,90	0,95	0,98	0,99	0,998	0,999	
1	3,078	6,314	12,71	31,82	63,66	318,3	636,6	1
2	1,886	2,920	4,303	6,965	9,925	22,33	31,60	2
3	1,638	2,353	3,182	4,541	5,841	10,21	12,92	3
4	1,533	2,132	2,776	3,747	4,604	7,173	8,610	4
5	1,476	2,015	2,571	3,365	4,032	5,893	6,869	5
6	1,440	1,943	2,447	3,143	3,707	5,208	5,959	6
7	1,415	1,895	2,365	2,998	3,499	4,785	5,408	7
8	1,397	1,860	2,306	2,896	3,355	4,501	5,041	8
9	1,383	1,833	2,262	2,821	3,250	4,297	4,781	9
10	1,372	1,812	2,228	2,764	3,169	4,144	4,587	10
11	1,363	1,796	2,201	2,718	3,106	4,025	4,437	11
12	1,356	1,782	2,179	2,681	3,055	3,930	4,318	12
13	1,350	1,771	2,160	2,650	3,012	3,852	4,221	13
14	1,345	1,761	2,145	2,624	2,977	3,787	4,140	14
15	1,341	1,753	2,131	2,602	2,947	3,733	4,073	15
16	1,337	1,746	2,120	2,583	2,921	3,686	4,015	16
17	1,333	1,740	2,110	2,567	2,898	3,646	3,965	17
18	1,330	1,734	2,101	2,552	2,878	3,610	3,921	18
19	1,328	1,729	2,093	2,539	2,861	3,579	3,883	19
20	1,325	1,725	2,086	2,528	2,845	3,552	3,850	20
21	1,323	1,721	2,080	2,518	2,831	3,527	3,819	21
22	1,321	1,717	2,074	2,508	2,819	3,505	3,792	22
23	1,319	1,714	2,069	2,500	2,807	3,485	3,768	23
24	1,318	1,711	2,064	2,492	2,797	3,467	3,745	24
25	1,316	1,708	2,060	2,485	2,787	3,450	3,725	25
26	1,315	1,706	2,056	2,479	2,779	3,435	3,707	26
27	1,314	1,703	2,052	2,473	2,771	3,421	3,690	27
28	1,313	1,701	2,048	2,467	2,763	3,408	3,674	28
29	1,311	1,699	2,045	2,462	2,756	3,396	3,659	29
30	1,310	1,697	2,042	2,457	2,750	3,385	3,646	30
40	1,303	1,684	2,021	2,423	2,704	3,307	3,551	40
50	1,299	1,676	2,009	2,403	2,678	3,261	3,496	50
60	1,296	1,671	2,000	2,390	2,660	3,232	3,460	60
80	1,292	1,664	1,990	2,374	2,639	3,195	3,416	80
100	1,290	1,660	1,984	2,364	2,626	3,174	3,390	100
200	1,286	1,652	1,972	2,345	2,601	3,131	3,340	200
500	1,283	1,648	1,965	2,334	2,586	3,107	3,310	500
∞	1,282	1,645	1,960	2,326	2,576	3,090	3,291	∞

Quelle: (o. V., 2015 S. 480)

Kritische Werte ($1 - \alpha = 0,999$) nach linearer Interpolation für:

$$f = 103 \rightarrow 3,3885$$

$$f = 101 \rightarrow 3,3895$$

$$f = 38 \rightarrow 3,5700$$