

# **Vanille**

## **Neues zur Authentizität**

### **Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

von  
Annette Scharrer  
aus Nördlingen

Frankfurt am Main 2002

vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der  
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. W. E. Müller

1. Gutachter: Prof. Dr. A. Mosandl

2. Gutachter: Prof. Dr. B. Ludwig

Datum der Disputation: 16. Mai 2002

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Januar 1998 bis Februar 2002 am Institut für Lebensmittelchemie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main.

Meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. Armin Mosandl, danke ich herzlich für die Bereitstellung des interessanten Themas und für die hervorragenden Arbeitsbedingungen, die er geschaffen hat.

Den Mitgliedern des Essenzenverbandes danke ich für die Bereitstellung von Vanilleschoten. Für die finanzielle Unterstützung der Arbeit gilt mein Dank dem Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI).

Herrn Dr. Dieter Juchelka von der Firma ThermoFinnigan MAT danke ich für seine stete Bereitschaft zu hilfreichen Diskussionen bei Problemen am Isotopenmassenspektrometer.

Bei allen Kolleginnen und Kollegen am Institut für Lebensmittelchemie möchte ich mich für das stets angenehme Arbeitsklima bedanken. Besonderer Dank gilt hierbei Herrn Dr. Martin Heil und Herrn Panagiotis Steliopoulos, die mir bei Computerproblemen immer mit Rat und Tat zur Seite standen. Frau Steffi Bilke möchte ich für die hilfreichen und interessanten Diskussionen am Isotopenmassenspektrometer und für die stets gute Zusammenarbeit im Säulenlabor danken.

Für die hervorragende technische Unterstützung danke ich ganz herzlich Herrn Frank Dettmar, Herrn Andreas Münch und Herrn Renald Gleß, die immer mit dem richtigen Werkzeug zur Stelle waren, und ohne die manches Problem nicht so schnell lösbar gewesen wäre.

Allen Studentinnen und Studenten der Lebensmittelchemie gilt mein Dank für die im Rahmen der Literatuarbeit geleistete Hilfe bei meiner Arbeit.

Außerdem möchte ich mich bei allen Freunden bedanken, die sich bei Erfolgen mit mir gefreut haben und die mich nach Misserfolgen wieder aufgebaut haben.

Meinen Eltern danke ich ganz herzlich dafür, dass sie mir mein Studium ermöglicht haben und mir immer die nötige Freiheit gelassen haben, meine eigenen Entscheidungen zu treffen.

Zuletzt möchte ich mich besonders herzlich bei Herrn Oliver Boden bedanken, der mich immer wieder neu motiviert und mit großer Geduld alle meine Launen erträgt.

# Inhalt

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1	Vanille – Geschichte, Botanik und Bedeutung .....	1
1.2	Inhaltsstoffe von Vanille .....	4
1.3	Stand der Analytik .....	5
1.4	Zielsetzung.....	6
<b>2</b>	<b>SCHOTENEXTRAKTION .....</b>	<b>8</b>
<b>3</b>	<b>QUANTITATIVE BESTIMMUNG DER HAUPTINHALTSSTOFFE.....</b>	<b>11</b>
<b>3.1</b>	<b>Analytik mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) ..</b>	<b>11</b>
3.1.1	Stand der Forschung und Zielsetzung.....	11
3.1.2	Methodik.....	12
<b>3.2</b>	<b>Analytik mittels Gaschromatographie (GC) .....</b>	<b>17</b>
3.2.1	Stand der Forschung und Zielsetzung.....	17
3.2.2	Methodik.....	17
<b>3.3</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>21</b>
3.3.1	Methodenvergleich .....	21
3.3.2	Vanillingehalt und Verhältniszahlen .....	21
3.3.2.1	Allgemeine Betrachtungen.....	21
3.3.2.2	Abhängigkeit vom Erntejahrgang.....	25
3.3.2.3	Abhängigkeit von der Herkunft .....	28
3.3.2.4	Vergleich mit bisherigen Richtwerten.....	29
<b>3.4</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>30</b>

---

<b>4</b>	<b>ISOTOPENANALYTIK .....</b>	<b>32</b>
<b>4.1</b>	<b>Grundlagen .....</b>	<b>32</b>
<b>4.2</b>	<b>Bestimmung von Isotopenwerten .....</b>	<b>36</b>
4.2.1	Isotopenverhältnismassenspektrometrie (IRMS).....	37
4.2.2	Stellungsspezifische Isotopenverteilung (SNIF-NMR).....	39
<b>4.3</b>	<b>Bestimmung der <math>\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}</math>-Werte von Vanillin und 4-Hydroxybenzaldehyd mittels GC-C-IRMS.....</b>	<b>39</b>
4.3.1	Stand der Forschung und Zielsetzung.....	39
4.3.2	Methodik.....	41
4.3.2.1	Kalibrierung .....	41
4.3.2.2	Optimierung des GC-C-IRMS-Systems .....	41
4.3.2.3	Einfluss der Schotenaufarbeitung .....	44
4.3.3	Ergebnisse und Diskussion .....	45
4.3.3.1	Authentizitätsbewertung anhand der $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Isotopenwerte ...	45
4.3.3.2	Einfluss der Extraktionsbedingungen auf die $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ - Isotopenwerte .....	49
<b>5</b>	<b>ANALYTIK VON MINORKOMPONENTEN .....</b>	<b>51</b>
<b>5.1</b>	<b>Enantioselektive Analyse von Minorkomponenten .....</b>	<b>52</b>
5.1.1	Enantioselektive Analyse mittels multidimensionaler Gaschromatographie (MDGC) .....	52
5.1.2	Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE) .....	53
5.1.3	Stand der Forschung und Zielsetzung.....	53
5.1.4	Enantioselektive Analyse von $\gamma$ -Nonalacton .....	54
5.1.4.1	Methodik.....	54
5.1.4.2	Ergebnisse und Diskussion .....	54
5.1.5	Enantioselektive Analyse von Monoterpenen.....	55
5.1.5.1	Methodik .....	56
5.1.5.2	Ergebnisse und Diskussion .....	57
<b>5.2</b>	<b>Bestimmung von Guajacol .....</b>	<b>59</b>
5.2.1	Allgemeines.....	59
5.2.2	Methodik.....	60
5.2.3	Ergebnisse und Diskussion .....	62

---

<b>5.3</b>	<b>Identifizierung geruchsaktiver Minorkomponenten .....</b>	<b>62</b>
5.3.1	Gaschromatographie-Olfaktometrie .....	62
5.3.2	Methodik.....	63
5.3.3	Ergebnisse und Diskussion .....	64
<b>6</b>	<b>EXPERIMENTELLER TEIL .....</b>	<b>69</b>
<b>6.1</b>	<b>Probenmaterial und verwendete Standardsubstanzen .....</b>	<b>69</b>
6.1.1	Probenmaterial.....	69
6.1.2	Standardsubstanzen .....	70
<b>6.2</b>	<b>Experimenteller Teil zu Kapitel 2 .....</b>	<b>71</b>
6.2.1	Extraktion mit unterschiedlichen Lösungsmitteln.....	71
6.2.1.1	Ethanol / Wasser-Extrakt nach AOAC .....	71
6.2.1.2	Extraktion mit anderen Lösungsmitteln.....	71
6.2.2	HPLC-Methode .....	72
6.2.3	Zeitabhängige Untersuchung der Diethylether-Extraktion .....	72
<b>6.3</b>	<b>Experimenteller Teil zu Kapitel 3 .....</b>	<b>73</b>
6.3.1	Schotenextraktion .....	73
6.3.2	HPLC-Methode .....	73
6.3.3	GC-Methode.....	75
6.3.4	Ergebnisse der quantitativen Untersuchungen.....	76
<b>6.4</b>	<b>Experimenteller Teil zu Kapitel 4 .....</b>	<b>82</b>
6.4.1	Schotenextraktion und Vorbereitung der Extrakte .....	82
6.4.2	GC-C-IRMS .....	83
6.4.3	Kalibrierung .....	84
6.4.4	Ergebnisse .....	84
<b>6.5</b>	<b>Experimenteller Teil zu Kapitel 5 .....</b>	<b>88</b>
6.5.1	MDGC-MS-System.....	88
6.5.2	Stir Bar Sorptive Extraction .....	89
6.5.2.1	Extraktionsbedingungen .....	89
6.5.2.2	Thermodesorption und Kaltaufgabe.....	90
6.5.3	Enantioselektive Analyse von $\gamma$ -Nonalacton .....	90
6.5.3.1	Extraktion mit Mikro-SDE.....	90
6.5.3.2	Extraktion mit SBSE .....	91
6.5.3.3	Analytik mit MDGC-MS.....	91
6.5.3.4	Ergebnisse.....	91

---

6.5.4	Enantioselektive Analytik von Monoterpenen .....	92
6.5.4.1	Headspace-SBSE-MDGC-MS .....	92
6.5.4.2	Ergebnisse .....	93
6.5.5	Untersuchung von Guajacol .....	95
6.5.5.1	MDGC-MS-Nachweis von Guajacol .....	95
6.5.5.2	Semiquantitative Bestimmung von Guajacol .....	95
6.5.5.2.1	GC-FID-System .....	95
6.5.5.2.2	Ergebnisse .....	96
6.5.6	Identifizierung geruchsaktiver Minorkomponenten .....	96
6.5.6.1	Dynamische Headspace-Extraktion .....	96
6.5.6.2	HPLC-Fraktionierung des Headspace-Extrakts .....	97
6.5.6.3	Gaschromatographie-Olfaktometrie (GCO) .....	97
6.5.6.4	Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) .....	98
6.5.6.5	Synthese von 4-Hydroxybenzylamin .....	99
6.5.6.6	MDGC-MS-Analytik .....	99
6.5.6.7	Gehaltsabschätzung der identifizierten Substanzen .....	100
<b>7</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY .....</b>	<b>101</b>
7.1	Zusammenfassung .....	101
7.2	Summary .....	103
<b>8</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>104</b>
8.1	Abkürzungsverzeichnis .....	104
8.2	Verzeichnis der untersuchten Verbindungen .....	106
8.3	Literaturverzeichnis .....	104
8.4	Eigene Publikationen .....	114
8.5	Lebenslauf .....	115

# 1 Einleitung

## 1.1 Vanille – Geschichte, Botanik und Bedeutung

Die Vanillepflanze, ein tropisches Orchideengewächs liefert das wohl wichtigste, beliebteste und neben Safran auch das teuerste Gewürz der Welt. Die Früchte dieser ursprünglich in Mexiko beheimateten Pflanze erfreuten sich schon im 15. Jahrhundert bei den Azteken großer Beliebtheit. Sie verwendeten das Gewürz „tlixochitl“, um Kakaotränke zu aromatisieren. Obwohl Vanille bereits 1510 in Europa bekannt war, und der Bedarf damit stieg, blieb Mexiko für die folgenden 350 Jahre das einzige Anbaugebiet für Vanille. Versuche, die Pflanze auch in anderen Ländern zu kultivieren scheiterten an der Tatsache, dass die natürlichen Bestäuber – in Mexiko beheimatete Melipona-Bienen und Kolibris – in anderen Ländern nicht vorkommen. Erst als es 1841 Charles Morren gelang, eine Methode zur künstlichen Bestäubung der Vanilleblüten zu entwickeln, ebnete dies den Weg für eine Vanilleproduktion auch außerhalb Mexikos [1]. Heute wird Vanille in einem Gürtel zwischen 25° nördlicher Breite und 25° südlicher Breite angebaut. Zu den wichtigsten Anbaugebieten zählen Madagaskar, Indonesien, die Komoren, Mexiko, Reunion und Tahiti.

Von den über 100 bekannten Arten von Vanille sind nur drei von wirtschaftlicher Relevanz: *Vanilla planifolia* Andrews, auch bekannt unter dem Namen *Vanilla fragrans* (Salisbury), *Vanilla tahitensis* J.W. Moore und *Vanilla pompona* Schiede. Die zuletzt genannte Art findet allerdings auf dem Lebensmittelmarkt kaum Verwendung; ihr Haupteinsatzgebiet liegt in der Pharmazie und in der Parfümindustrie. Die verbreitetste Sorte stellt *V. planifolia* dar, die auch in den meisten Vanilleanbaugebieten kultiviert wird. *V. tahitensis*, die vor allem auf Tahiti angebaut wird, findet besonders in der italienischen Eiskremherstellung Verwendung.

Die Vanillepflanze bevorzugt humushaltige Böden. Sie gedeiht bei Temperaturen von 25-30°C und bei einer Niederschlagsmenge von ca. 200 cm/Jahr am besten. Sie besitzt dickfleischige Blätter und rankt sich an Stützpflanzen bis zu 10 m hoch [2]. Die gelblichen Orchideenblüten öffnen sich nur an einem Tag für wenige Stunden. In dieser Zeit muss die Bestäubung erfolgen. Da bei den Zwitterblüten Narbe und Staubgefäß durch ein Häutchen voneinander getrennt sind, ist keine Selbstbestäubung möglich. Eine Bestäubung erfolgt nur durch die auf Mexiko beschränkten natürlichen



Bestäuber oder auf künstlichem Weg. Die künstliche Bestäubung wird in der Regel mit einem kleinen Bambusstab durchgeführt, mit dem das Trennhäutchen durchstochen wird, wie Abb. 1 zeigt.



Abb. 1: Blüte einer Vanilleblüte und künstliche Bestäubung mit einem Bambusstab

Nach erfolgter Bestäubung entwickeln sich in den darauffolgenden fünf bis sieben Monaten Kapsel Früchte, die häufig – fälschlicherweise – als Schoten bezeichnet werden. Im noch unreifen Zustand werden die noch geruchlosen, grünen Früchte geerntet und zur Ausbildung des charakteristischen Vanillearomas einer Fermentation unterzogen. Dieser Prozess erfordert viel Erfahrung und wird in den einzelnen Produktionsländer nach leicht unterschiedlichen Verfahren durchgeführt. Prinzipiell kann der Fermentationsprozeß in vier Abschnitte gegliedert werden [1,3]:

**Killing:** Während dieses Prozesses wird die Reifung und Entwicklung der Frucht unterbrochen. Dies wird durch heißes Wasser, durch Erhitzen in der Sonne oder in einem Ofen oder auch durch Gefrieren der Schoten erreicht. Durch das Killing werden die Zellstrukturen zerstört, so dass verschiedene Enzyme mit ihren Substraten in Kontakt treten können.

**Sweating:** Um die Gefahr von mikrobiellem Befall zu minimieren, muss der Wassergehalt der Schoten reduziert werden. Dies erfolgt meist durch Sonneneinstrahlung. Dieser Schritt der Fermentation ist der kritischste, da hierbei die vanilleeigenen Enzyme ihre größte Aktivität an den Tag legen. Aus den geruchlosen Glucosiden werden die Aromastoffe freigesetzt, wobei sich das charakteristische Vanillearoma ausbildet. Während des ein bis zwei Wochen dauernden Prozesses bildet sich durch die Oxidation von Polyphenolen auch die typische dunkle Farbe der Vanilleschoten aus.

**Drying:** Um den Wassergehalt noch weiter zu senken, werden die Schoten nach der Sweating-Phase noch stärker getrocknet. Dies dient erneut zum

Schutz vor mikrobiellem Befall. Bei einem Wassergehalt von 25-30% am Ende dieses Schrittes reduziert sich auch die Aktivität unerwünschter Enzyme, und biochemische Reaktionen werden stark verlangsamt.

**Conditioning:** Während der Lagerung der Schoten in geschlossenen Kisten, die mehrere Monate dauern kann, werden durch biochemische Reaktionen noch eine Reihe von flüchtigen Aromastoffen gebildet, die einen wichtigen Beitrag zum Gesamtaroma der Vanilleschoten liefern.

Das wohl bekannteste Fermentationsverfahren ist das Bourbon-Verfahren [3], das ursprünglich im französischen Departement Reunion entwickelt wurde. Hierbei werden die Schoten zum Zwecke des Killings für 7-15 Minuten in 80°C heißes Wasser getaucht und danach 10 Tage lang auf Decken ausgebreitet, der Sonne ausgesetzt und nachts in die Decken eingerollt. Anschließend werden die Schoten über einen Zeitraum von zwei bis drei Monaten langsam getrocknet, ohne sie zu erhitzen. Während dieser Behandlung bildet sich das sog. „Bourbon-Aroma“ aus, das sich größter Beliebtheit erfreut. Heute wird das Bourbon-Verfahren vor allem in Madagaskar angewendet.

Nach Einstufung der Schoten in verschiedene Qualitätsstufen [4] werden sie dem Handel zugeführt. Die Hauptabnehmer für Vanille sind die USA (ca. 50-60% der Weltproduktion) und Europa, vor allem Deutschland und Frankreich. In den letzten Jahren ist der Bedarf an Vanillearoma stetig gewachsen. Abb. 2 zeigt den Verlauf der Importe während der letzten 40 Jahre.

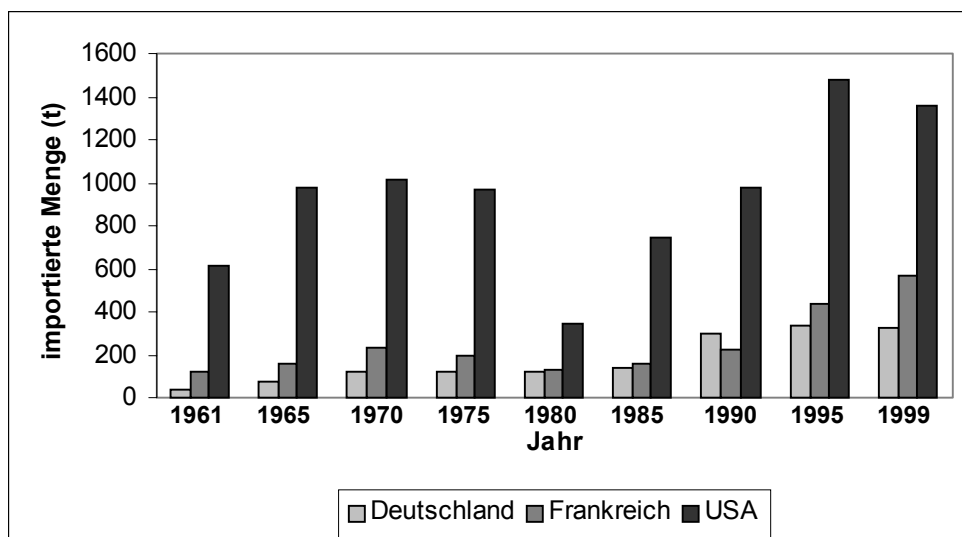


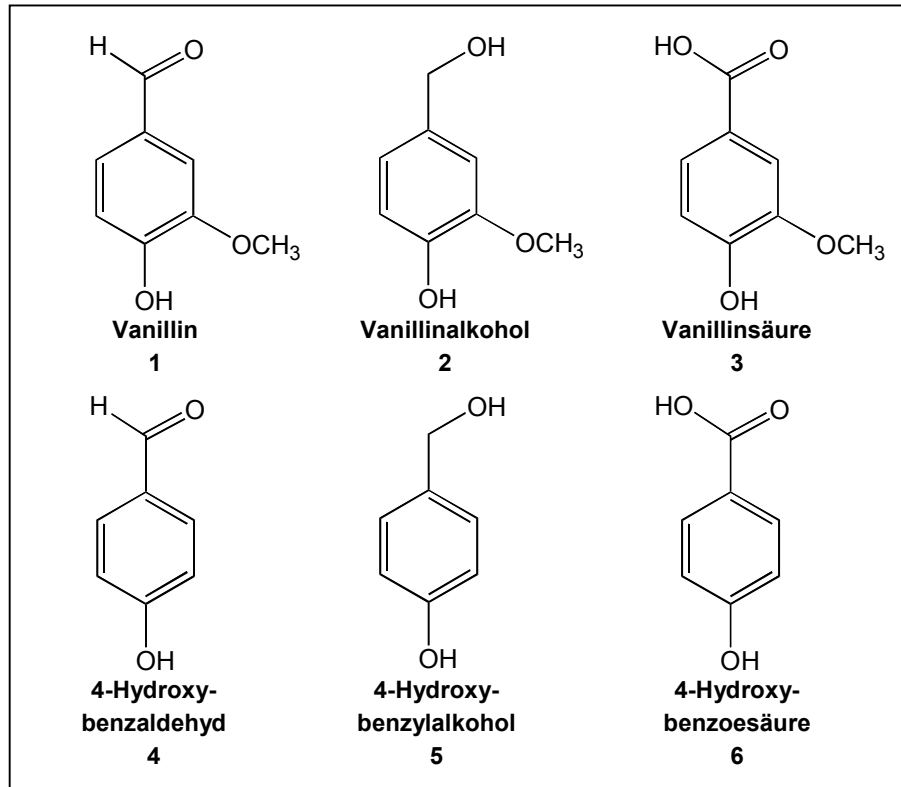
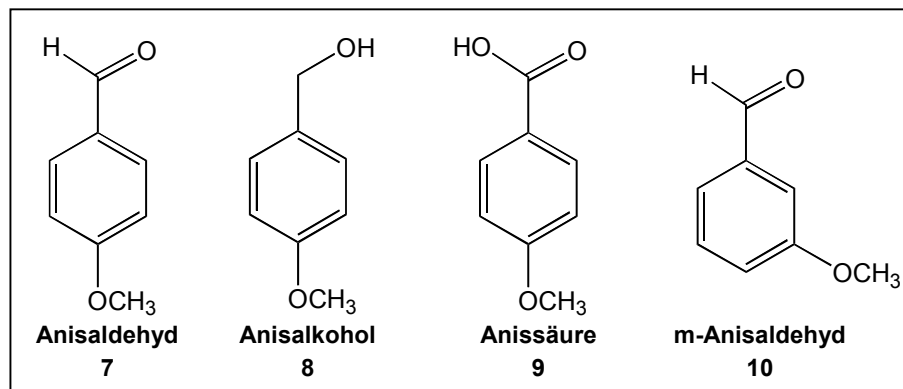
Abb. 2: Vanille-Importe für Deutschland, Frankreich und die USA (FAO) [5]

Bei Betrachtung der umgeschlagenen Mengen an Vanille und unter Einbeziehung des Preises von 10-20 US\$ pro kg Schoten wird deutlich, welche enorme wirtschaftliche Bedeutung Vanille hat.

Während nur ein geringer Teil der Ernte direkt als Schoten gehandelt wird, wird der größte Teil der Ernte noch im Ursprungsland zu Extrakten verarbeitet. Die gängigste Methode ist hierbei die Herstellung eines alkoholischen Extrakts. Dies erfolgt durch Mazeration oder Perkolation der Schoten mit einem Ethanol / Wasser-Gemisch. Die Konzentration eines solchen Extraktes wird durch den sogenannten „fold“ angegeben. Ein single fold Extrakt enthält den extrahierbaren Teil von 100 g Vanilleschoten in einem Liter Extrakt. Durch teilweises Entfernen des Lösungsmittels kann die Konzentration eines Extrakts entsprechend erhöht werden. Bei vollständiger Entfernung des Lösungsmittels erhält man ein sog. Oleoresin. Ein anderes Verfahren ist die Extraktion mit überkritischem CO<sub>2</sub>. Beide Extraktionsverfahren liefern aufgrund der unterschiedlichen Lösungsmiteleigenschaften Produkte unterschiedlicher Zusammensetzung [6].

## 1.2 Inhaltsstoffe von Vanille

Vanille enthält neben Proteinen, Zuckern, Cellulose, organischen Säuren, Fetten und Wachsen eine Vielzahl von Substanzen, die teilweise nur in sehr geringen Mengen vorkommen. Neben der für das Aroma wichtigsten Komponente Vanillin, tragen je nach Vanille-Sorte auch andere Verbindungen entscheidend zum Geruch und Geschmack von Vanille bei. Bei *V. planifolia* kommen neben der Hauptkomponente Vanillin, die hier bis zu mehr als 2% ausmachen kann, noch Vanillinalkohol, Vanillinsäure, 4-Hydroxybenzaldehyd, 4-Hydroxybenzylalkohol und 4-Hydroxybenzoesäure vor (Abb. 3). Während Vanillin bei *V. tahitensis* nur in geringerer Menge vorkommt (ca. 1%), ist der Anteil von 4-Hydroxybenzoesäure deutlich größer. Zusätzlich treten die Verbindungen Anisaldehyd, Anisalkohol, Anissäure und 3-Methoxybenzaldehyd (m-Anisaldehyd) auf (Abb. 4), die in den Schoten von *V. planifolia* nicht vorkommen. Neben diesen Hauptkomponenten sind aber auch eine Vielzahl von Komponenten in oftmals nur sehr geringen Mengen vorhanden. Adeji et al. nennen für *V. planifolia* über 80 und für *V. tahitensis* über 60 flüchtige Bestandteile [7]. Klimes und Lamparsky wiesen sogar 169 flüchtige Komponenten für Vanille nach [8].

Abb. 3: Hauptkomponenten von *V. planifolia*Abb. 4: Hauptkomponenten von *V. tahitensis*

### 1.3 Stand der Analytik

Neben dem wohl wichtigsten Qualitätskriterium für Vanille, dem Geruch und Geschmack, sind eine Reihe von analytischen Verfahren entwickelt worden, um die Qualität von Vanille zu beschreiben. Schon seit Jahrzehnten ist die Entwicklung neuer Analysenmethoden eine Herausforderung für viele Wissenschaftler. Zur Untersuchung der Hauptkomponenten finden hauptsächlich photometrische und chromatographische Methoden Anwendung

[9]. In den offiziellen Arbeitsmethoden gemäß der Association of Official Analytical Chemists (AOAC) aus dem Jahr 1990 werden zur Bestimmung des Vanillingehalts in Vanilleextrakten UV-photometrische Methoden und eine papierchromatographische Methode vorgeschlagen [10]. Bei UV-photometrischen Bestimmungen besteht allerdings immer das analytische Problem, auch andere Substanzen mitzuerfassen, wie z.B. den künstlichen Aromastoff Ethylvanillin. Chromatographische Methoden weisen hingegen eine größere Selektivität auf. So sind beispielsweise Methoden beschrieben, bei denen mittels Dünnschichtchromatographie mehrere Substanzen nebeneinander quantifiziert werden können [11,12]. Häufige Anwendung findet auch die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC). Sie ermöglicht eine gute Trennung verschiedener Vanille-Inhaltsstoffe und deren quantitative Bestimmung. Näher soll auf diese Methodik in Kapitel 3 eingegangen werden. Doch die genannten Methoden sind nicht immer ausreichend, um Verfälschungen von Vanilleextrakten erfassen zu können, da der Zusatz von synthetischen Substanzen (z.B. Vanillin, 4-Hydroxybenzaldehyd) chromatographisch nicht immer sicher erkannt werden kann. Daher finden seit einiger Zeit auch Methoden Anwendung, die die Isotopenwerte v.a. von Vanillin betrachten. Hierbei seien die Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (IRMS) und die **site specific natural isotope fractionation**, gemessen mit NMR (SNIF-NMR), genannt, auf die in Kapitel 4 näher eingegangen werden soll. Neben der Analytik der Hauptkomponenten kann aber auch die Untersuchung von Minorkomponenten in Vanille von Bedeutung sein. Auf diesen Bereich soll in Kapitel 5 näher eingegangen werden.

Da der hohe Preis und die steigende Nachfrage es zu einem lukrativen Ziel machen, Vanilleextrakte zu verfälschen, stellt die Vanille trotz vieler verschiedener analytischer Methoden immer noch eine Herausforderung an den Analytiker dar.

## 1.4 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, zum einen die analytischen Methoden zur Authentizitätsbewertung von Vanille weiterzuentwickeln und zum anderen die Kenntnisse über deren Minorkomponenten zu erweitern. Im einzelnen waren die Ziele folgende:

- Entwicklung einer neuen HPLC-Methode zur quantitativen Untersuchung der Hauptinhaltsstoffe von Vanille
- Entwicklung einer neuen GC-Methode zur quantitativen Untersuchung der Hauptinhaltsstoffe von Vanille

- 
- Bestimmung von Inhaltsstoff-Verhältniszahlen mit den neu entwickelten Methoden
  - Bestimmung der  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenverhältnisse von Vanillin und 4-Hydroxybenzaldehyd und daraus resultierend die Festlegung von Authentizitätsbereichen
  - Erweiterung der Kenntnisse über Minorkomponenten in Vanille

## 2 Schotenextraktion

Es ist notwendig, Vanilleschoten einer Extraktion zu unterziehen, um sie verschiedenen analytischen Methoden zuführen zu können. Wie oben erwähnt, werden die Schoten bei der Herstellung von Handelsextrakten üblicherweise alkoholisch-wässrig oder mit überkritischem CO<sub>2</sub> extrahiert. Die Zusammensetzung der erhaltenen Extrakte unterscheidet sich bei beiden Methoden deutlich [6,13,14]. Während bei der Extraktion mit überkritischem CO<sub>2</sub>, das ein weniger polares Lösungsmittel darstellt, polare Substanzen nur schlecht erfasst werden, ist der Gehalt an polaren Substanzen, wie z.B. Zuckern, in einem alkoholisch-wässrigen Extrakt deutlich höher.

Doch nicht nur bei der Herstellung von Handelsextrakten wird mit unterschiedlichen Lösungsmitteln gearbeitet. Die Extraktion zu analytischen Zwecken erfolgt ebenfalls auf unterschiedliche Weise. Welchen Einfluss die unterschiedlichen Extraktionsverfahren auf analytische Resultate haben können, zeigen Ehlers et al., die die gleichen Schoten mit verschiedenen Alkoholen extrahiert und die erhaltenen Extrakte mit HPLC analysiert haben [15]. Die quantitative Zusammensetzung der Hauptinhaltsstoffe Vanillin, 4-Hydroxybenzaldehyd, Vanillinsäure und 4-Hydroxybenzoesäure zeigte dabei eine Abhängigkeit von der Polarität des verwendeten Alkohols. Für die Extraktion zum Zwecke der Probenaufarbeitung werden neben Alkoholen aber auch andere Lösungsmittel verwendet, wie z.B. Kohlenwasserstoffe.

Aus diesem Grund erschien es sinnvoll, nicht nur eine Art von Extrakt für die geplanten analytischen Verfahren herzustellen, sondern den Aspekt der Extraktion mit in die Untersuchungen einzubeziehen. Als erstes Extraktionsverfahren wurde das sehr häufig verwendete Verfahren nach AOAC verwendet [16]. Dabei werden die zerkleinerten Schoten zunächst für 12 Stunden bei 40°C mit Wasser mazeriert. Nach Zugabe von Ethanol wird dann noch weitere drei Tage extrahiert. Um ein zweites, möglichst gut geeignetes Extraktionsverfahren zu finden, wurden verschiedene Lösungsmittel auf ihre Eignung geprüft. Ziel war es hierbei, ein Lösungsmittel zu finden, das in seiner Extraktionseffizienz möglichst nahe an die von einem bei der Extraktion nach AOAC verwendeten Ethanol / Wasser-Gemisch heranreicht. Als Maß für die Extraktionseffizienz wurde der Vanillingehalt herangezogen, der durch HPLC bestimmt wurde.

Tab. 1: Vanillingehalte einer homogenen Vanilleprobe bei Verwendung verschiedener Extraktionsmittel; es wurde jeweils 24 Stunden bei Raumtemperatur extrahiert

Extraktionsmittel	Vanillingehalt [g/100g]
Ethanol / Wasser (AOAC) <sup>1</sup>	2,3
Acetonitril	0,8
<i>tert</i> -Butylmethylether	1,2
Diethylether	1,5
Ethylacetat	1,0

Aus Tab. 1 ist ersichtlich, dass durch keines der getesteten Lösungsmittel nach 24 Stunden eine mit Ethanol / Wasser vergleichbare Extraktionseffizienz erreicht werden kann. Mit einigen Lösungsmitteln wurde daher die Extraktionsdauer auf sieben Tage ausgedehnt, und danach wieder der Vanillingehalt bestimmt.

Tab. 2: Vanillingehalte einer homogenen Vanilleprobe bei Verwendung verschiedener Extraktionsmittel; es wurde jeweils sieben Tage bei Raumtemperatur extrahiert

Extraktionsmittel	Vanillingehalt [g/100g]
Ethanol / Wasser (AOAC) <sup>1</sup>	2,3
Acetonitril	1,6
<i>tert</i> -Butylmethylether	1,6
Diethylether	2,1

Aus Tab. 2 geht hervor, dass die Extraktion mit Diethylether über sieben Tage der Effizienz von Ethanol / Wasser am nächsten kommt. Um zu testen, ob durch eine weitere Verlängerung der Extraktionszeit einer nochmalige Steigerung der Extraktionseffizienz erzielt werden kann, wurde der Vanillingehalt nach unterschiedlichen Extraktionszeiten bestimmt. Das Ergebnis hieraus ist in Abb. 5 dargestellt. Es zeigt sich, dass die Vanillingehalte auch

<sup>1</sup> Die Zusammensetzung des Ethanol / Wasser-Gemisches beträgt, abhängig vom Wassergehalt der extrahierten Schoten ca. 70 / 30 (v/v); im Folgenden wird nur von Ethanol / Wasser-Extrakt gesprochen (vgl. Arbeitsvorschrift Kapitel 6.2.1.1)



durch Steigerung der Extraktionsdauer nicht mehr signifikant erhöht werden können. Nach einer Woche Extraktion (168 Stunden) ist bereits die maximale Effizienz erreicht.

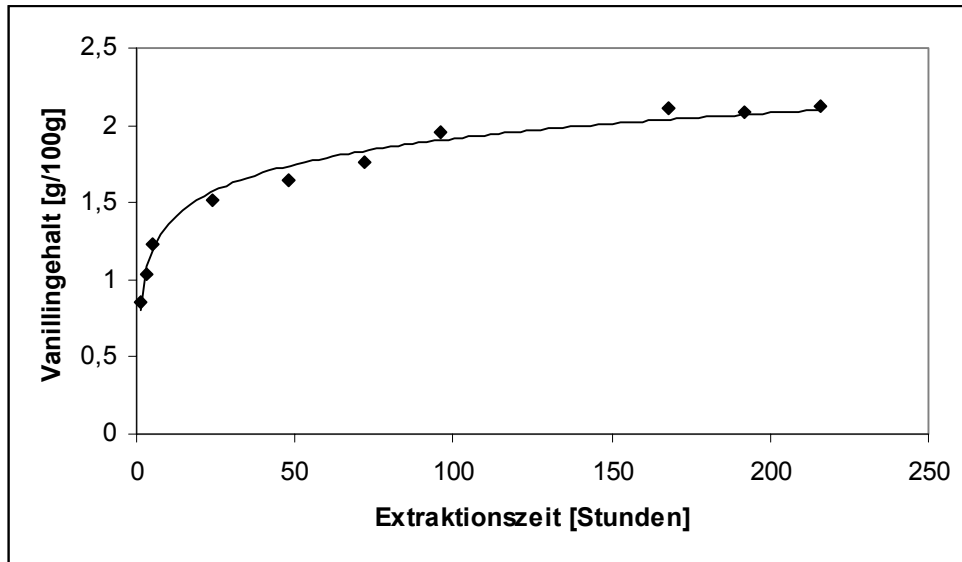


Abb. 5: Abhängigkeit des Vanillengehalts von der Extraktionsdauer bei Extraktion mit Diethylether bei Raumtemperatur

Aus diesem Grund wurde neben der Aufarbeitung nach AOAC die Extraktion mit Diethylether über eine Woche bei Raumtemperatur als zweites Verfahren zur Aufarbeitung gewählt. Die Unterschiedlichkeit der beiden Verfahren sollte es ermöglichen, Aussagen über den Einfluss des Extraktionsverfahrens bei den einzelnen im Folgenden angewendeten Analysenverfahren treffen zu können.

### **3 Quantitative Bestimmung der Hauptinhaltsstoffe**

Eine Betrachtung der Hauptinhaltsstoffe der Vanille ist zur Beurteilung eines Vanilleextraktes von großer Bedeutung. Für *V. planifolia* sind das vor allem die beiden Hauptkomponenten Vanillin und 4-Hydroxybenzaldehyd, daneben aber auch die entsprechenden Säuren und Alkohole (Abb. 3). Der Vanillingehalt wird häufig zur Qualitätsbewertung herangezogen [4]. Für die anderen Inhaltsstoffe ist allerdings die Angabe von Absolutwerten meist wenig aussagekräftig, da diese stark von Reifezustand, Fermentation und Feuchtigkeitsgrad der Schoten abhängig sind [17]. Aus diesem Grund liefert die Bildung von Verhältniszahlen zwischen einzelnen Inhaltsstoffen wesentlich aussagekräftigere Resultate. Am häufigsten wird für eine Bewertung von Vanille das Verhältnis der beiden Hauptinhaltsstoffe Vanillin und 4-Hydroxybenzaldehyd herangezogen [17-20]. Die Verhältniszahlen, die unter Einbeziehung der beiden Säuren erhalten werden, sind aber ebenfalls von Bedeutung. Die von Fayet et al. [19] ermittelten Verhältniszahlen aus Vanillin, 4-Hydroxybenzaldehyd, 4-Hydroxybenzoesäure und Vanillinsäure werden seither als Richtwerte für die Authentizitätsbewertung von Vanille herangezogen und stellen auch die Grundlage für die französische Rechtsprechung dar [21]. Für Deutschland und den übrigen Europäischen Markt besitzen diese Werte allerdings keine rechtliche Verbindlichkeit. Ehlers et al. zeigten auf, dass diese Werte vermutlich zu eng gefasst sind [15], was zu falscher Beanstandung authentischer Proben führen kann.

Eine Neubestimmung dieser Verhältniszahlen als Kriterien zur Echtheitsbewertung von Vanille erscheint daher sinnvoll.

#### **3.1 Analytik mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)**

##### **3.1.1 Stand der Forschung und Zielsetzung**

Die HPLC wird seit langem für die Vanille-Analytik angewendet. Sie dient dabei sowohl der Ermittlung der qualitativen als auch der quantitativen Zusammensetzung. Die bisherigen Arbeiten unterscheiden sich allerdings stark in den angewendeten Arbeitsbedingungen. Neben verschiedenen Aufarbeitungsmethoden für die Schoten (siehe Kapitel 2) unterscheiden sich auch die apparativen Bedingungen stark. Als Säulenmaterial werden meist RP-

18-[19,20,22,23] oder RP-8-Phasen [6,17,24,25] verwendet. Als Eluenten dienen meist Mischungen auf der Basis von Methanol und verdünnter Säure, wobei sowohl mit isokratischer, als auch mit Gradientenelution gearbeitet wird. Die Detektion erfolgt in der Regel mit einem UV-Detektor, wobei sich die verwendeten Detektionswellenlängen aber stark unterscheiden. Für quantitative Aussagen werden in einzelnen Fällen interne Standards benutzt, wie z.B. Ethylvanillin [22], Phenoxyessigsäure [20] oder auch ortho-Vanillin [26]. Weit häufiger erfolgt eine quantitative Bestimmung aber über eine externe Kalibrierung.

In vielen publizierten Arbeiten zur HPLC-Analytik von Vanille sind die einzelnen Substanzen nicht genügend aufgelöst [18], was die Verwendbarkeit der Angaben zur Quantifizierung stark einschränkt. Doch auch bei überzeugender Analytik weichen die Ergebnisse oft deutlich voneinander ab. Dies kann sicherlich auch auf die stark unterschiedlichen Arbeitsbedingungen zurückgeführt werden. Um quantitative Aussagen über die Vanille-Inhaltsstoffe als Authentizitätskriterium einsetzen zu können ist es daher unabdingbar, unter vergleichbaren, definierten Bedingungen zu arbeiten.

Basierend darauf sollte im Rahmen dieser Arbeit eine neue HPLC-Methode erarbeitet werden. Hierbei sollte mit internen Standards gearbeitet werden, um eine zuverlässige Quantifizierung zu erzielen. Zur Überprüfung des Einflusses der Schotenextraktion auf die Ergebnisse sollte die entwickelte Analytik auf zwei verschiedene Extrakte angewendet werden.

### 3.1.2 Methodik

Für eine zuverlässige Quantifizierung der relevanten Substanzen wurden zwei interne Standards gewählt. Ethylvanillin und Veratrumaldehyd weisen strukturbedingt ein gut vergleichbares chromatographisches Verhalten zu den Analyten auf. Für die HPLC-Analytik wurde ein *reversed phase*-System mit einem Fließmittel aus verdünnter Phosphorsäure, Methanol und Acetonitril in Gradientenelution gewählt. Die Trennung erfolgt dabei an einer RP-18-Phase (6.2.2). Als Detektor wurde ein Dioden-Array-Detektor gewählt, um bei den zum Teil relativ komplexen Extrakten die Möglichkeit zu haben, die einzelnen Substanzen zusätzlich zur Retentionszeit auch anhand des UV-Spektrums identifizieren zu können. Zur Ermittlung einer optimalen Wellenlänge zur Quantifizierung wurden die UV-Spektren aller interessierender Substanzen betrachtet.

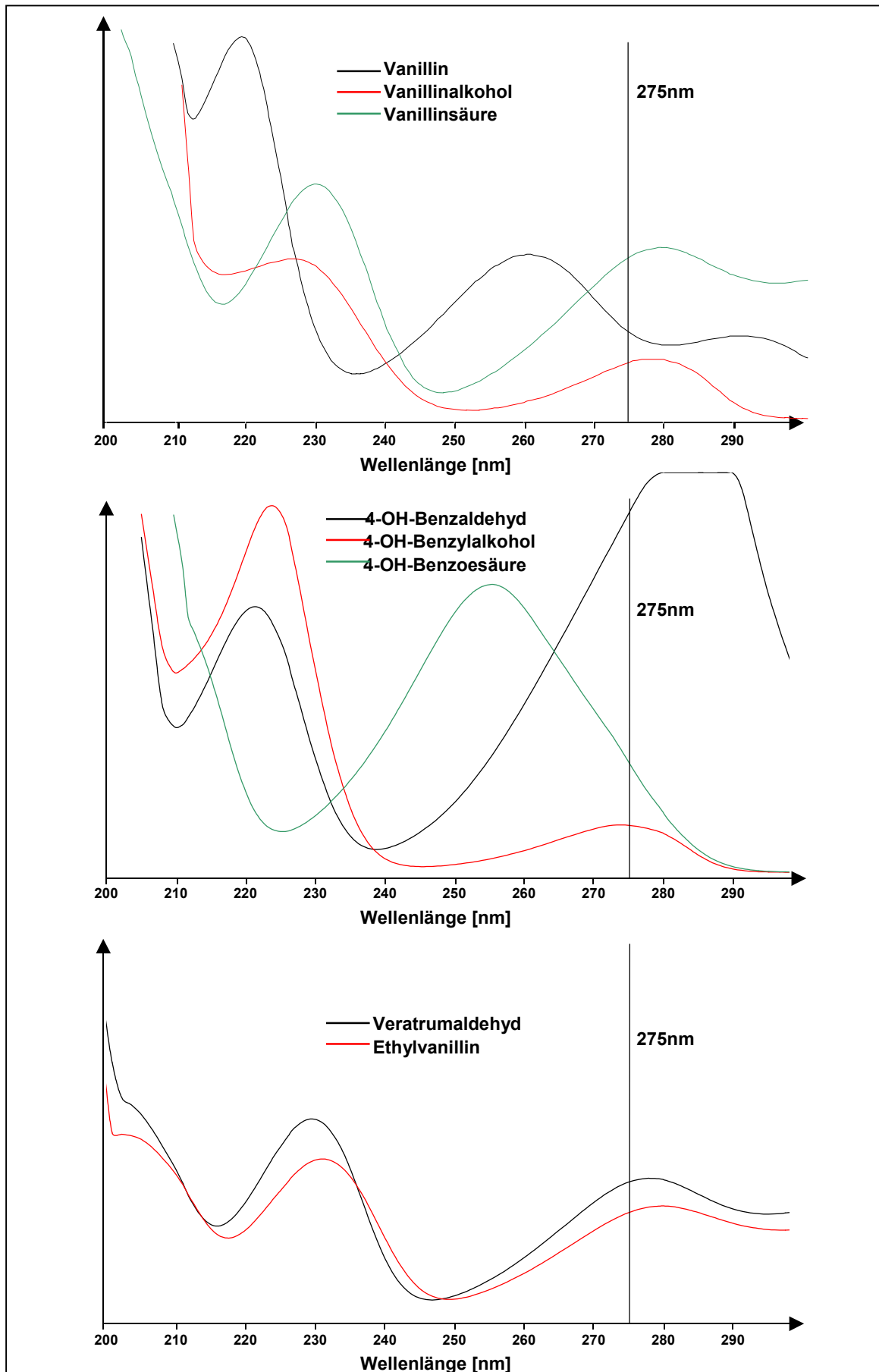


Abb. 6: UV-Spektren der Analyten und der internen Standards

In einem niedrigen Wellenlängenbereich von ca. 200-230 nm ist die Empfindlichkeit für alle Substanzen sehr groß. Es stellte sich jedoch heraus, dass in diesem Bereich Verunreinigungen in den Extrakten mitdetektiert werden, was zu Ungenauigkeiten bei der Quantifizierung führen kann. Aus diesem Grund wurde als Wellenlänge zur Quantifizierung 275 nm gewählt. Wie Abb. 6 zeigt, ist hier die Empfindlichkeit für die meisten Substanzen verhältnismäßig gut, wobei Verunreinigungen nur minimal mitdetektiert werden. Nur für Vanillinalkohol und 4-Hydroxybenzylalkohol reicht die Empfindlichkeit für eine zuverlässige Quantifizierung nicht mehr aus. Da diese Verbindungen aber in der Regel auch nicht zu Authentizitätsaussagen herangezogen werden, wurde dies in Kauf genommen und auf eine Quantifizierung der Alkohole verzichtet. Unter den gewählten Bedingungen ergibt sich folgendes Standardchromatogramm:

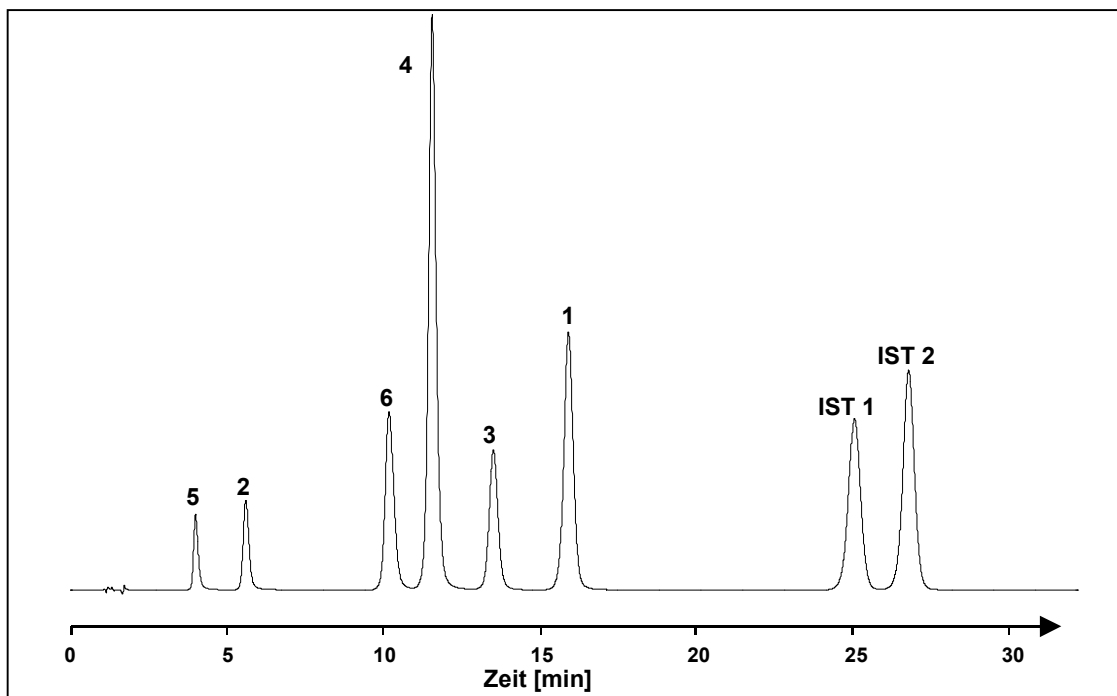


Abb. 7: HPLC-Standardchromatogramm

1: Vanillin; 2: Vanillinalkohol; 3: Vanillinsäure; 4: 4-Hydroxybenzaldehyd;  
5: 4-Hydroxybenzylalkohol; 6: 4-Hydroxybenzoesäure;  
IST 1: Ethylvanillin; IST 2: Veratrumaldehyd

Mit der entwickelten Methode wurden nun sowohl die hergestellten Ethanol / Wasser- als auch die Diethylether-Extrakte vermessen. Dabei wurden Inhaltsstoffe unterschiedlicher Konzentration mit unterschiedlichen internen Standards quantifiziert, die vor der Aufarbeitung in angepasster Menge zugegeben wurden. So wird Vanillin im Bezug auf Ethylvanillin quantifiziert, die übrigen Inhaltsstoffe im Bezug auf Veratrumaldehyd als internen Standard. Für

jeden Extrakt ist somit eine Analytik bei zwei unterschiedlichen Konzentrationen notwendig. Die folgenden Abbildungen zeigen beispielhaft Chromatogramme von Ethanol / Wasser- (Abb. 8) und von Diethylether-Extrakten (Abb. 9) von Schoten der Gattung *V. planifolia* bei den unterschiedlichen Konzentrationen:

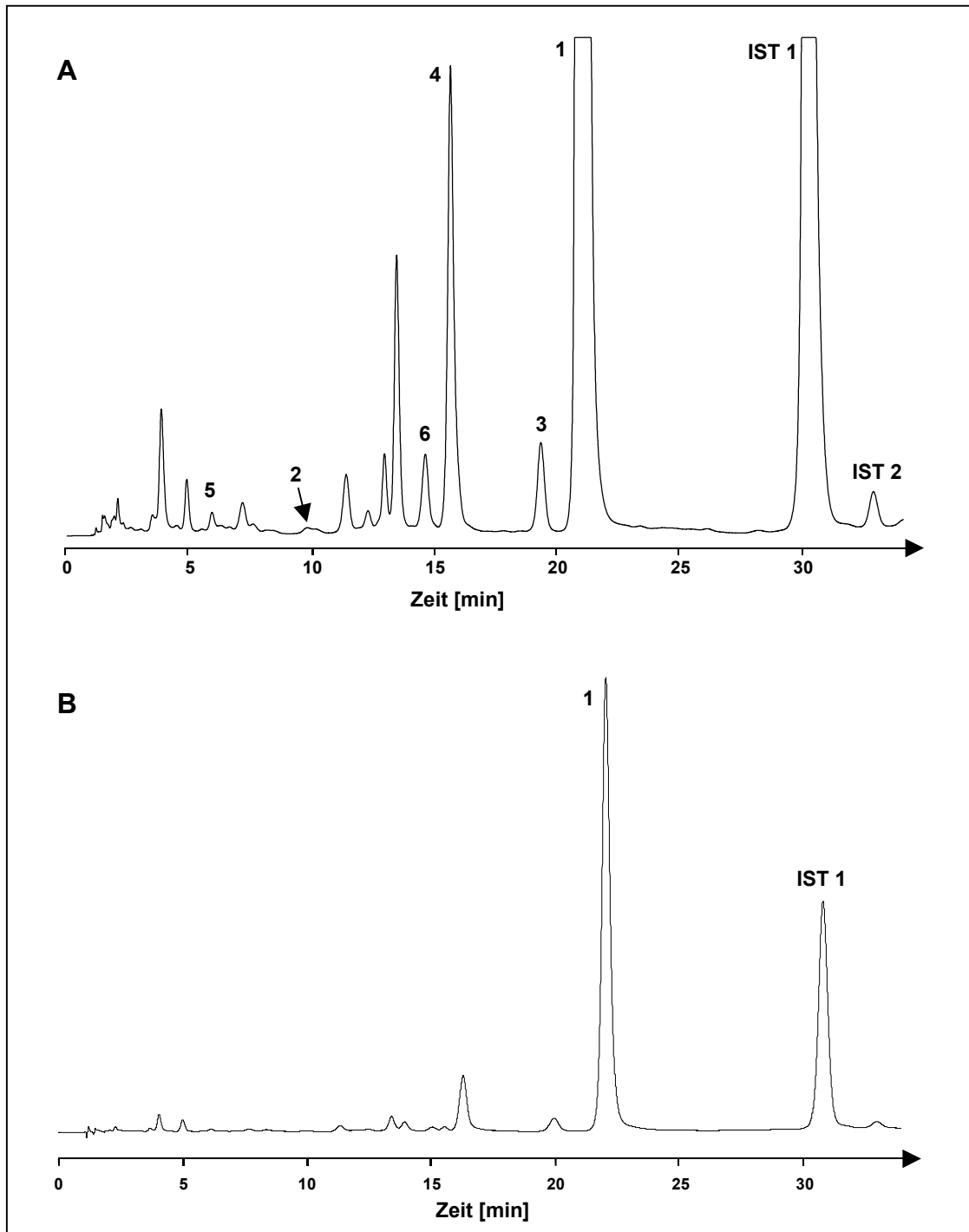


Abb. 8: Ethanol / Wasser-Extrakt nach AOAC; A: hohe Konzentration, B: niedrige Konzentration  
1: Vanillin; 2: Vanillinalkohol; 3: Vanillinsäure; 4: 4-Hydroxybenzaldehyd;  
5: 4-Hydroxy-benzylalkohol; 6: 4-Hydroxybenzoesäure;  
IST 1: Ethylvanillin; IST 2: Veratrumaldehyd

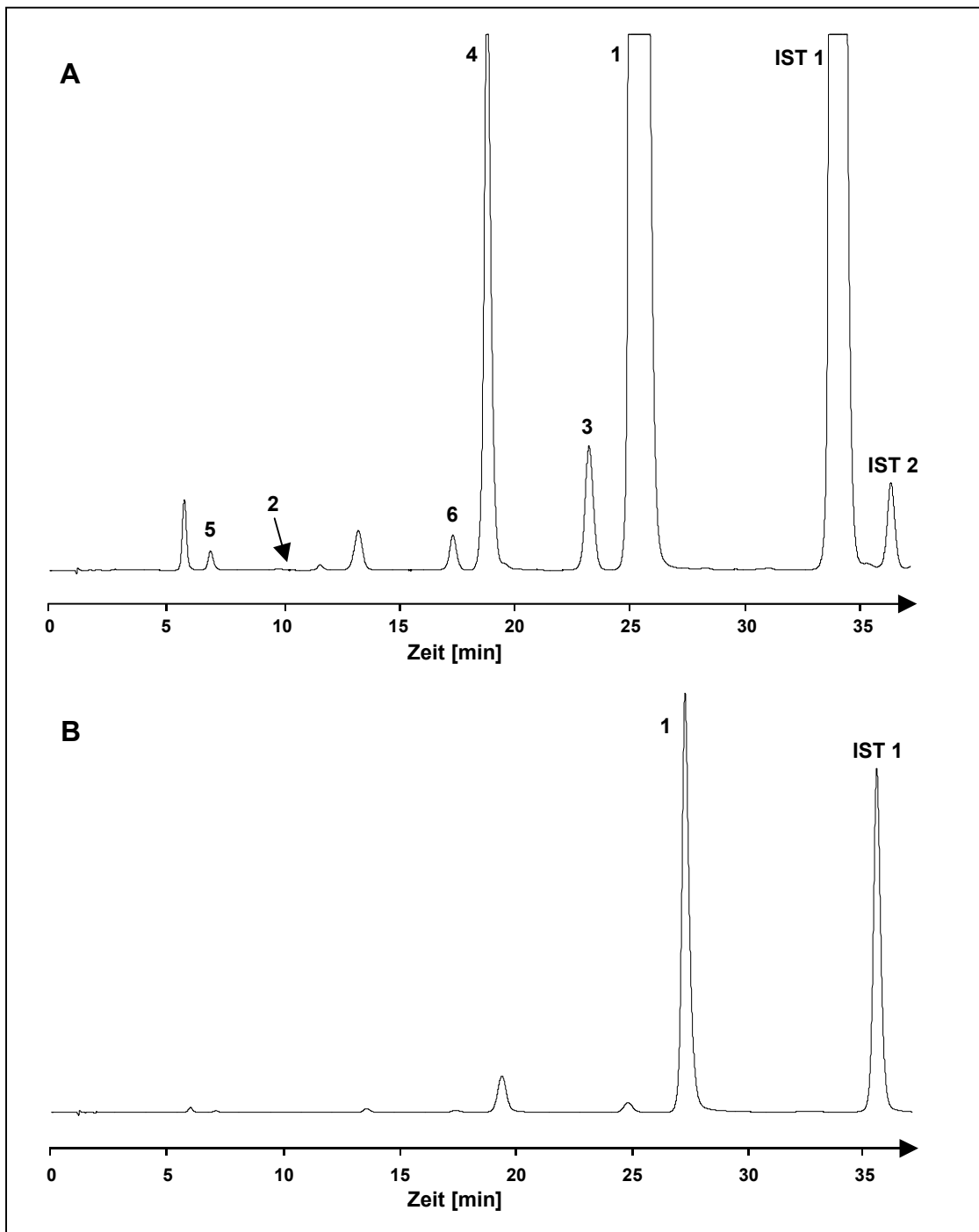


Abb. 9: Diethylether-Extrakt; A: hohe Konzentration, B: niedrige Konzentration  
1: Vanillin; 2: Vanillinalkohol; 3: Vanillinsäure; 4: 4-Hydroxybenzaldehyd;  
5: 4-Hydroxy-benzylalkohol; 6: 4-Hydroxybenzoesäure;  
IST 1: Ethylvanillin; IST 2: Veratrumaldehyd

Mittels dieser HPLC-Analytik sind in beiden Extrakten die relevanten Substanzen Vanillin, 4-Hydroxybenzaldehyd, Vanillinsäure und 4-Hydroxybenzoesäure sauber von anderen Komponenten abtrennbar.

## 3.2 Analytik mittels Gaschromatographie (GC)

### 3.2.1 Stand der Forschung und Zielsetzung

Während die HPLC in der Vanille-Analytik sehr häufig Anwendung findet, sind nur wenige gaschromatographische Methoden zur Bestimmung der Hauptkomponenten in Vanille beschrieben. Dabei wird in der Regel mit gepackten Säulen gearbeitet und es werden meist nicht alle relevanten Komponenten betrachtet [27-29]. Mariani et al. bezeichnen die Gaschromatographie sogar als eine ungeeignete Methode, um die Hauptkomponenten der Vanille zu untersuchen [30]. Kapillar-GC-Methoden werden meist nur zur Untersuchung von flüchtigen Minorkomponenten angewendet, eine Methode zur Analytik der Hauptkomponenten mit Kapillar-GC ist bislang nicht beschrieben. Da durch die Kapillar-GC jedoch eine sehr hohe Trennleistung erzielt werden kann, erschien es sinnvoll, im Rahmen dieser Arbeit eine entsprechende Methodik zu entwickeln. Mit dieser Methode sollten die Hauptkomponenten quantifiziert werden und daraus Verhältniszahlen gebildet werden. Analog zur HPLC-Analytik sollte die Analytik auch hier auf zwei verschiedene Extrakte angewendet werden.

### 3.2.2 Methodik

Zunächst stellt sich bei der Entwicklung einer gaschromatographischen Methode die Frage nach einer geeigneten Säule. Unpolare Kapillarsäulen sind für die Trennung der Aldehyde Vanillin und 4-Hydroxybenzaldehyd durchaus geeignet und finden hierfür auch immer wieder Anwendung. Für die Chromatographie der Säuren Vanillinsäure und 4-Hydroxybenzoesäure sind sie jedoch nicht sinnvoll: die Peakform ist nicht akzeptabel, und die Elution der Säuren ist bei unpolaren Säulen nach relativ kurzer Zeit nicht mehr ausreichend bzw. gar nicht mehr gegeben. Aus diesem Grund wurden verschiedene andere Kapillarsäulen auf ihre Eignung getestet. Die Verwendung einer sehr polaren FFAP-Säule (mit Nitroterephthalsäure modifiziertes Polyethylenglykol) erwies sich dabei als sehr günstig. Mit einer solchen Säule ist es möglich, die Säuren mit verhältnismäßig hoher Reproduzierbarkeit über einen langen Zeitraum zu bestimmen. Außerdem weist eine solche Säule noch einen weiteren Vorteil auf: im Gegensatz zu den meisten anderen Säulen ist sie gegen die Injektion von wässrig-alkoholischen Lösungen unempfindlich. Somit können die hergestellten Ethanol / Wasser-Extrakte direkt ohne einen weiteren Extraktionsschritt analysiert werden. Bei Extraktion mit einem organischen Lösungsmittel ergäbe sich das Risiko einer nicht quantitativen Erfassung, da die interessierenden Komponenten sich in ihrer Polarität und damit in ihrem Extraktionsverhalten stark unterscheiden. Es ist also bei Verwendung einer FFAP-Kapillarsäule



möglich, sowohl die Ethanol / Wasser- als auch die Diethylether-Extrakte direkt zu vermessen.

Unter den angewandten Bedingungen (6.3.3) erhält man ein Standardchromatogramm, wie in Abb. 10 dargestellt:

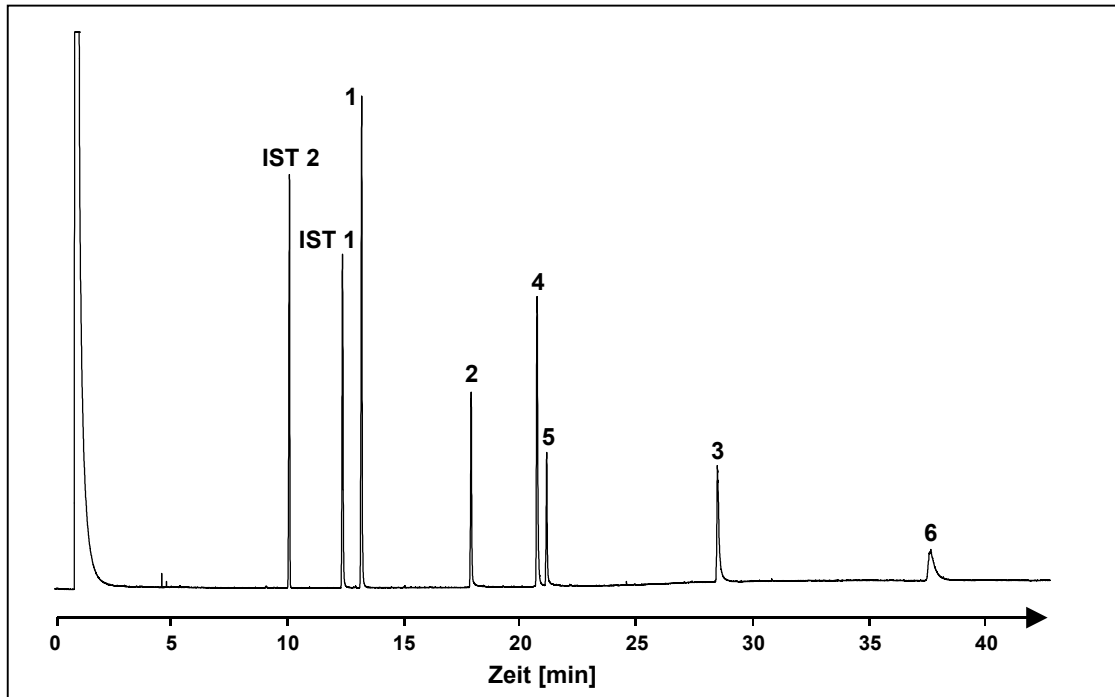


Abb. 10: GC-Standardchromatogramm

1: Vanillin; 2: Vanillinalkohol; 3: Vanillinsäure; 4: 4-Hydroxybenzaldehyd;  
5: 4-Hydroxybenzylalkohol; 6: 4-Hydroxybenzoesäure;  
IST 1: Ethylvanillin; IST 2: Veratrumaldehyd

Trotz der im Vergleich zu anderen Kapillarsäulen verbesserten Elution der Säuren ist zu betonen, dass dennoch eine Quantifizierung der Säuren, vor allem für die in geringer Menge vorliegende 4-Hydroxybenzoesäure (6) nur sehr bedingt möglich ist (hohe Schwankungsbreite für die ermittelten Werte).

Analog zur HPLC-Analytik wird auch hier mit den beiden internen Standards Ethylvanillin und Veratrumaldehyd gearbeitet, die wiederum den Konzentrationen der Analyten angepasst werden. Dementsprechend ist auch bei der GC-Analytik eine Messung bei zwei unterschiedlichen Konzentrationen erforderlich. In den folgenden Abbildungen sind Beispiele von Chromatogrammen der Ethanol / Wasser- und der Diethylether-Extrakte von *V. planifolia* bei unterschiedlichen Konzentrationen dargestellt:

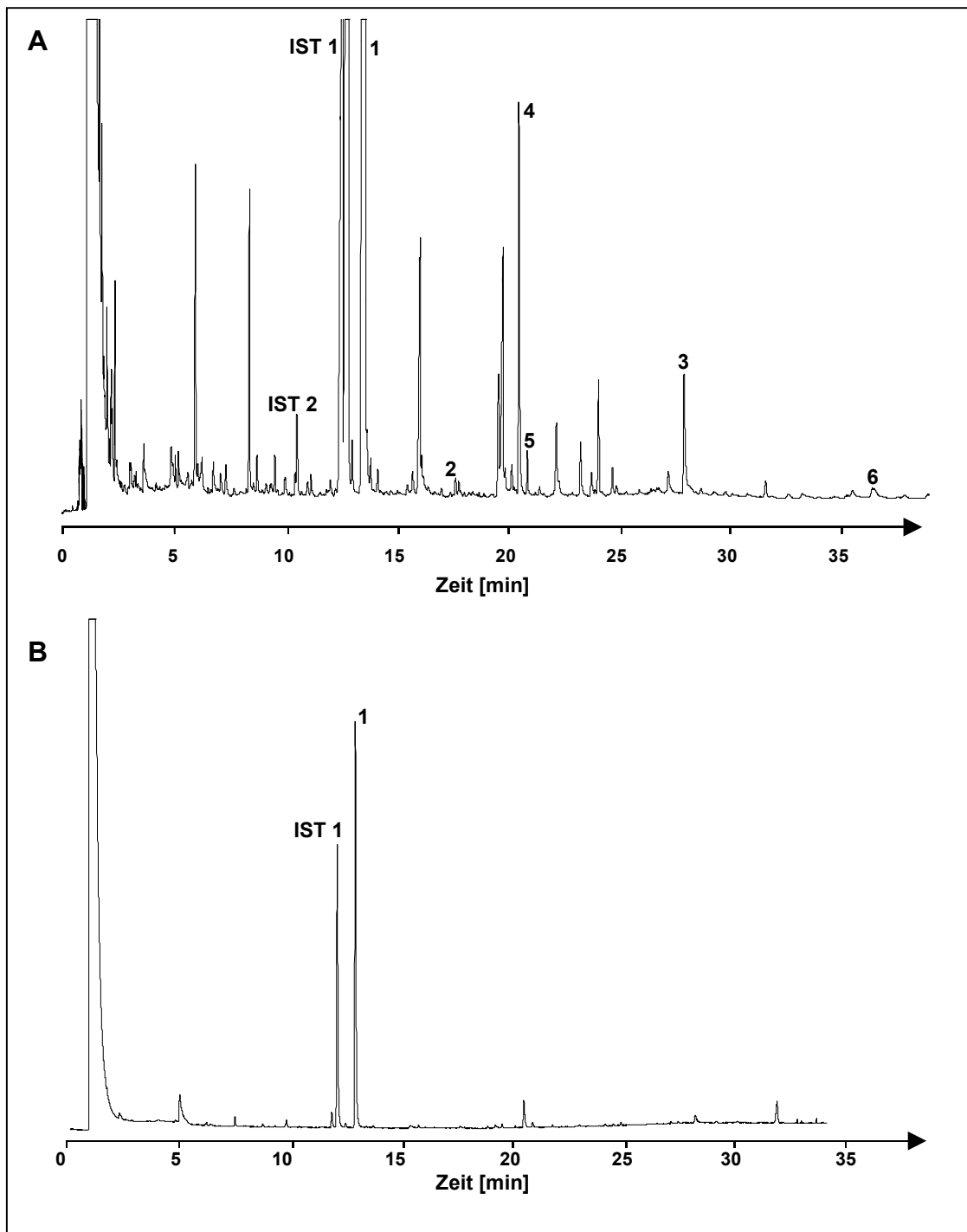


Abb. 11: Ethanol / Wasser-Extrakt nach AOAC; A: hohe Konzentration, B: niedrige Konzentration  
1: Vanillin; 2: Vanillinalkohol; 3: Vanillinsäure; 4: 4-Hydroxybenzaldehyd;  
5: 4-Hydroxybenzylalkohol; 6: 4-Hydroxybenzoesäure;  
IST 1: Ethylvanillin; IST 2: Veratrumaldehyd

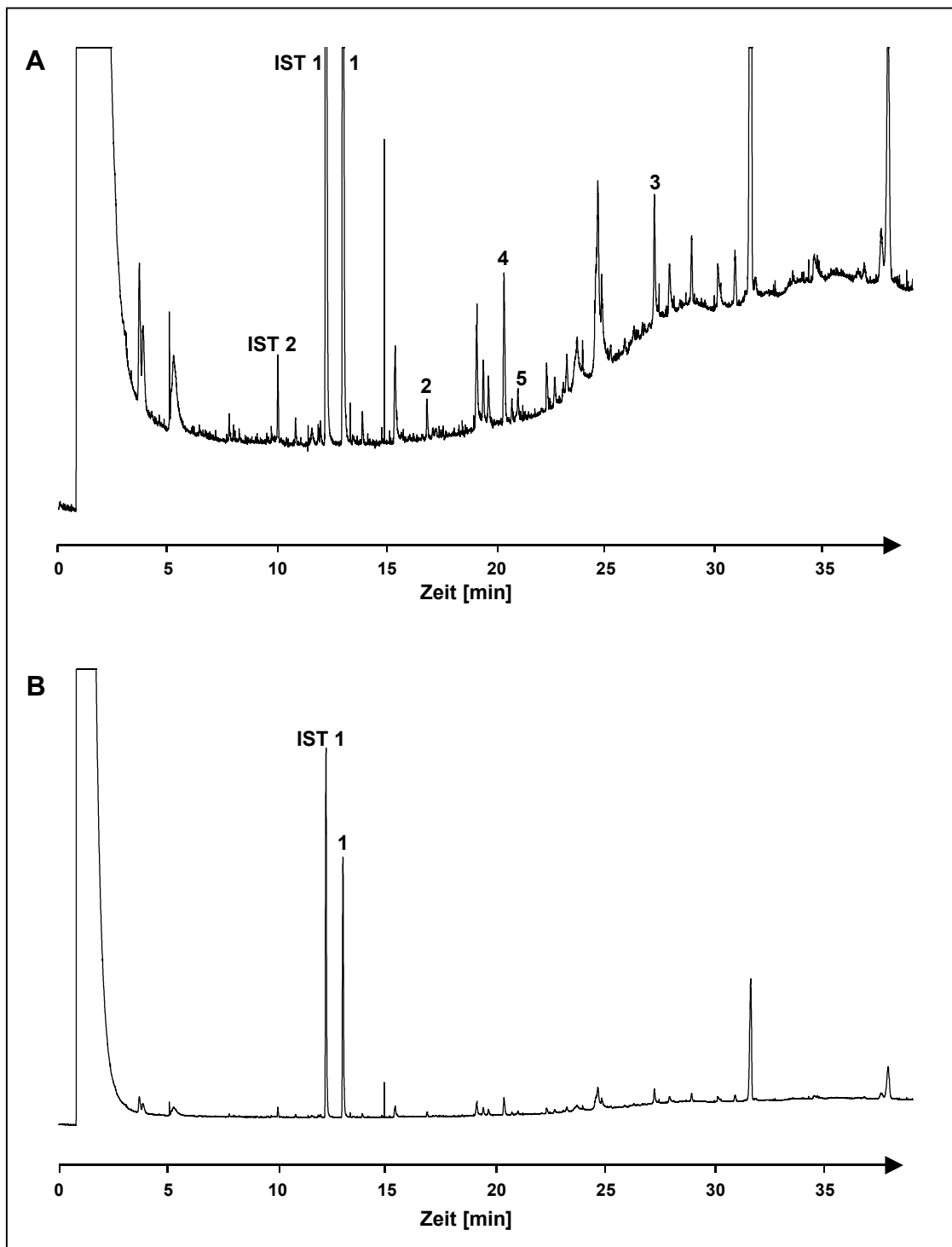


Abb. 12: Diethylether-Extrakt; A: hohe Konzentration, B: niedrige Konzentration  
1: Vanillin; 2: Vanillinalkohol; 3: Vanillinsäure; 4: 4-Hydroxybenzaldehyd;  
5: 4-Hydroxybenzylalkohol; 6: 4-Hydroxybenzoesäure;  
IST 1: Ethylvanillin; IST 2: Veratrumaldehyd

### 3.3 Ergebnisse und Diskussion

#### 3.3.1 Methodenvergleich

Ein Vergleich der HPLC- und der GC-Methode (Abb. 11 und Abb. 12) zeigt, dass die Gaschromatographie für die Bestimmung der Säuren nur bedingt geeignet ist. Mit beiden Methoden ist es möglich, die relevanten Komponenten von anderen Inhaltsstoffen sauber abzutrennen. Vergleicht man Ethanol / Wasser und Diethylether-Extrakte, so ist bei der HPLC-Analytik festzustellen, dass die Diethylether-Extrakte wesentlich weniger Störkomponenten enthalten als die Ethanol / Wasser-Extrakte und somit besser aufgelöste Chromatogramme liefern (Abb. 8 und Abb. 9). Für die Gaschromatographie erweisen sich hingegen die Diethylether-Extrakte als weniger geeignet. Wie aus Abb. 12 hervorgeht, ist bei einer Retentionszeit von über 20 Minuten ein erhebliches Ansteigen der Basislinie zu beobachten, die bei Ethanol / Wasser-Extrakten nicht auftritt. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass bei einer Extraktion mit dem lipophileren Diethylether eine erhebliche Menge an Lipiden mitextrahiert wird. Dadurch ist eine Quantifizierung von Vanillinsäure (**3**) nur bedingt, von 4-Hydroxybenzoesäure (**6**) nicht mehr möglich.

#### 3.3.2 Vanillingehalt und Verhältniszahlen

##### 3.3.2.1 Allgemeine Betrachtungen

Wie bereits weiter oben erwähnt, besitzen die Absolutwerte der Vanille-Inhaltsstoffe nur eine verhältnismäßig geringe Aussagekraft. Aus diesem Grund werden häufig Verhältniszahlen aus den Gehalten einzelner charakteristischer Inhaltsstoffe gebildet, deren Aussagekraft deutlich größer ist. Relevant sind hierbei die Verhältnisse der Inhaltsstoffe Vanillin, 4-Hydroxybenzaldehyd, Vanillinsäure und 4-Hydroxybenzoesäure. Die enthaltenen Alkohole werden nicht herangezogen. Als einziger Absolutwert wird der von Vanillin betrachtet. Die Spannbreiten der Ergebnisse, die für die untersuchten Proben von *V. planifolia* erhalten wurden, sind – aufgeschlüsselt nach den unterschiedlichen angewendeten Methoden – in Tab. 3 dargestellt:

Tab. 3: Vanille-Inhaltsstoff-Verhältniszahlen und Vanillingehalte für unterschiedliche Extraktionsmethoden, bestimmt mit HPLC und GC; n.b.: nicht bestimmbar

	Ethanol/Wasser HPLC	Ethanol/Wasser GC	Diethylether HPLC	Diethylether GC
<b>Vanillin / 4-OH-Benzaldehyd</b>	10 – 28	15 – 25	10 – 25	9 – 22
<b>Vanillin / 4-OH-Benzoessäure</b>	14 – 117	18 – 143	26 – 152	n.b.
<b>Vanillin / Vanillinsäure</b>	7 – 27	9 – 29	5 – 28	4 – 27
<b>4-OH-Benzoessäure/ 4-OH-Benzaldehyd</b>	0,20 – 0,87	0,14 – 1,40	0,16 – 0,81	n.b.
<b>Vanillinsäure / 4-OH-Benzoessäure</b>	0,61 – 2,85	0,63 – 2,61	0,70 – 4,20	0,69 – 3,65
<b>Vanillingehalt [g/100g]</b>	1,40 – 3,55	1,47 – 3,48	1,44 – 2,91	1,08 – 2,34

Bei Betrachtung der angegebenen Spannbreiten ist festzustellen, dass einige Verhältniszahlen deutlich größeren Schwankungen unterworfen sind als andere. So weisen die Verhältnisse Vanillin / 4-Hydroxybenzoessäure und 4-Hydroxybenzoessäure / 4-Hydroxybenzaldehyd sehr hohe Schwankungen auf. Dies ist auf die Einbeziehung von 4-Hydroxybenzoessäure zurückzuführen, deren Bestimmung aufgrund der relativ geringen Menge mit einem größeren Fehler behaftet ist, als die der anderen Substanzen. Die genannten Verhältniszahlen erweisen sich daher als wenig aussagekräftig im Bezug auf Authentizitätsbewertungen. Betrachtet man hingegen die Verhältniszahlen Vanillin / 4-Hydroxybenzaldehyd und Vanillin / Vanillinsäure, so ist festzustellen, dass diese deutlich geringeren Schwankungen unterworfen sind. Sie erscheinen daher geeignet, um bei Fragestellungen bezüglich einer Verfälschung herangezogen zu werden.

Als einziger Absolutwert wird der Gehalt an Vanillin betrachtet. Er ist, wie die Verhältniszahlen, ebenfalls deutlichen Schwankungen unterworfen. Abb. 13 zeigt eine graphische Darstellung der Vanillingehalte aller gemessenen Proben, getrennt dargestellt für die verschiedenen Extraktions- und Analysenverfahren.

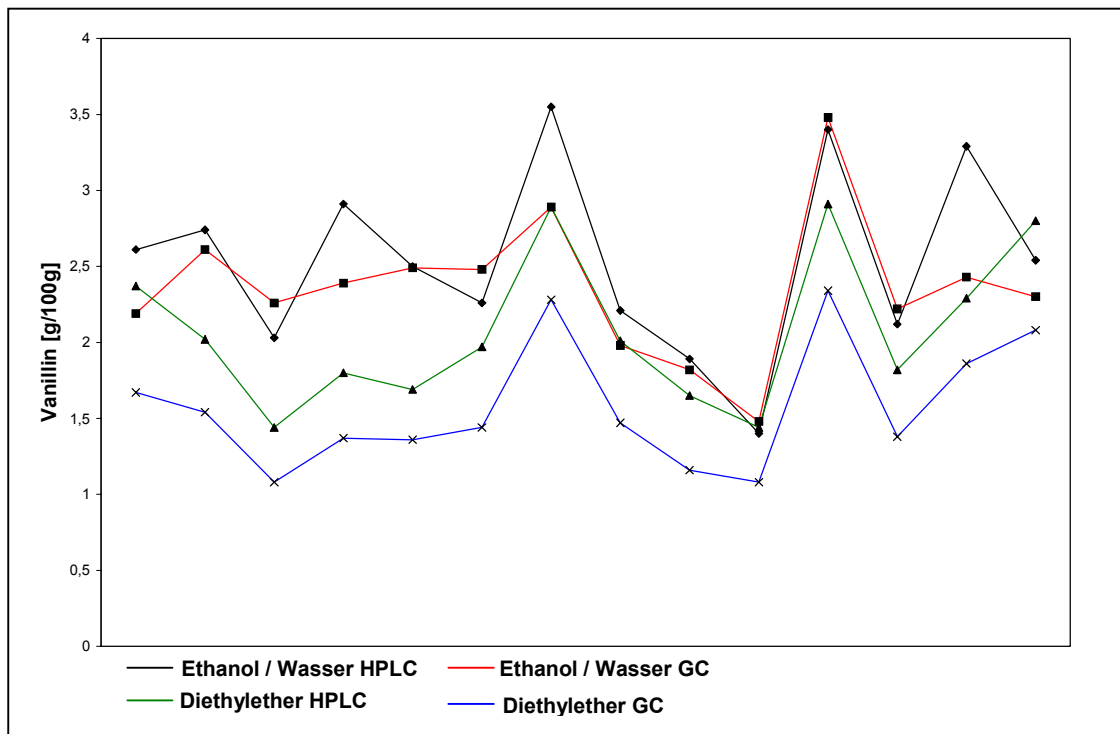


Abb. 13: ermittelte absolute Vanillingehalte für alle gemessenen Proben, aufgeschlüsselt nach Extraktions- und Analysenverfahren

Aus der graphischen Auftragung ist ersichtlich, dass die Werte der Diethylether-Extrakte – sowohl mit HPLC als auch mit GC gemessen – durchweg unter den Werten der Ethanol / Wasser-Extrakte liegen. Dies ist auf die bereits beschriebene geringere Extraktionseffizienz von Diethylether im Vergleich zu Ethanol / Wasser zurückzuführen.

Als aussagekräftigste Verhältniszahlen sollen die Verhältniszahlen Vanillin / 4-Hydroxybenzaldehyd und Vanillin / Vanillinsäure näher betrachtet werden. Die folgenden Abbildungen zeigen die Verhältniszahlen Vanillin / 4-Hydroxybenzaldehyd (Abb. 14) und Vanillin / Vanillinsäure (Abb. 15):

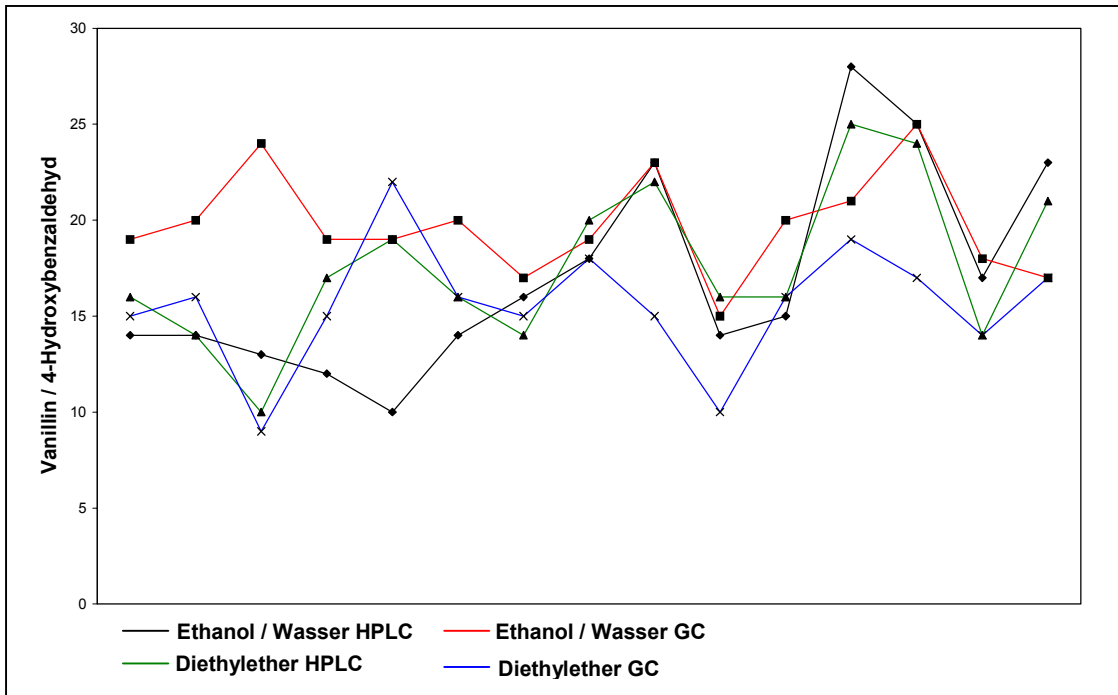


Abb. 14: Verhältnis Vanillin / 4-Hydroxybenzaldehyd für alle gemessenen Proben, aufgeschlüsselt nach Extraktions- und Analysenverfahren

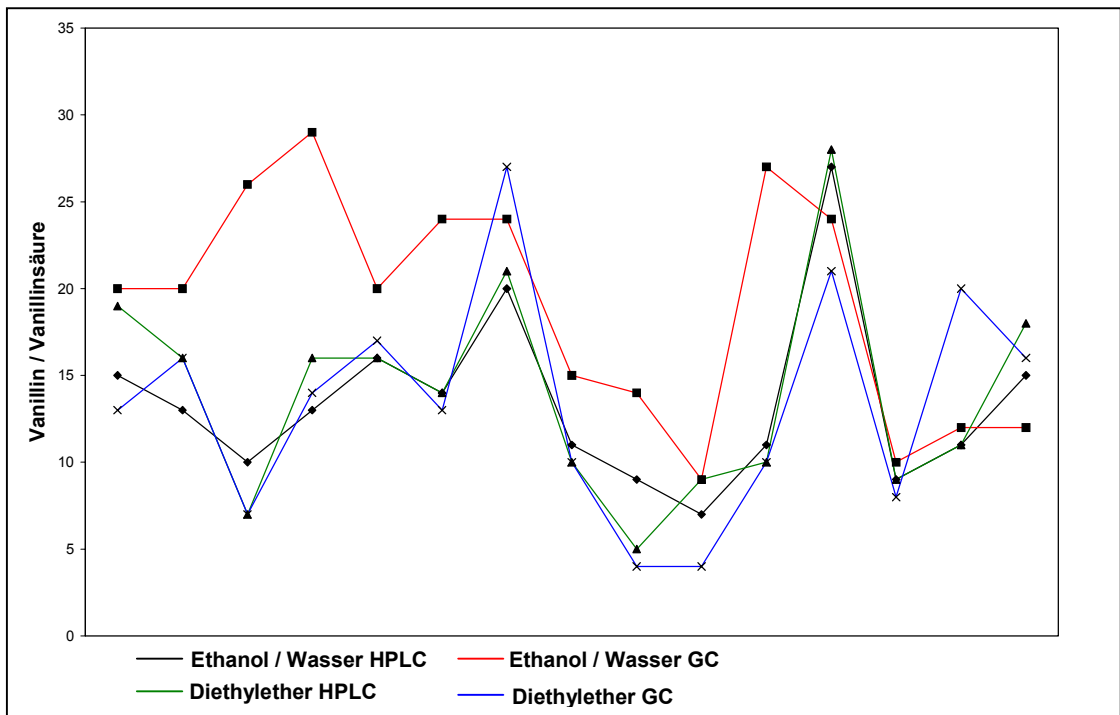


Abb. 15: Verhältnis Vanillin / Vanillinsäure für alle gemessenen Proben, aufgeschlüsselt nach Extraktion- und Analysenverfahren

Die für die absoluten Vanillingehalte beschriebenen Differenzen zwischen Ethanol / Wasser- und Diethylether-Extraktion findet sich bei den dargestellten Verhältniszahlen nicht wieder. Dies lässt den Schluß zu, dass sich die verminderte Extraktionseffizienz von Diethylether auf alle Substanzen vergleichbar stark auswirkt. Die Analyseverfahren – HPLC oder GC – scheint keinen Einfluß auf die Inhaltsstoff-Verhältniszahlen zu haben. Beide Methoden sind also geeignet, um die Hauptkomponenten der Vanille zu analysieren.

### 3.3.2.2 Abhängigkeit vom Erntejahrgang

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Vanille-Proben stammen aus den Erntejahrgängen 1998, 1999 und 2000. Da die klimatischen Bedingungen in diesen Jahren unterschiedlich waren, erschien die Überprüfung einer Abhängigkeit der Inhaltsstoff-Verhältniszahlen bzw. des Vanillingehalts vom Erntejahr sinnvoll. Tab. 4 und Tab. 5 zeigen, getrennt für die beiden Extraktionsverfahren, die ermittelten Schwankungsbreiten der Werte aufgeschlüsselt nach den Erntejahrgängen.

Tab. 4: Spannbreiten der Vanille-Inhaltsstoffe und Vanillingehalte der Ethanol / Wasser-Extrakte in Abhängigkeit vom Erntejahrgang; HPLC- und GC-Ergebnisse getrennt aufgeführt

	Ernte 1998		Ernte 1999		Ernte 2000	
	HPLC	GC	HPLC	GC	HPLC	GC
<b>Vanillin / 4-OH-Benzaldehyd</b>	10 – 14	19 – 24	14 – 23	15 – 23	17 – 28	17 – 25
<b>Vanillin / 4-OH-Benzoesäure</b>	14 – 70	34 – 106	24 – 50	29 – 143	29 – 117	18 – 88
<b>Vanillin / Vanillinsäure</b>	10 – 16	20 – 29	7 – 20	9 – 27	9 – 27	10 – 24
<b>4-OH-Benzoesäure / 4-OH Benzaldehyd</b>	0,20 – 0,70	0,18 – 0,59	0,30 – 0,62	0,14 – 0,86	0,24 – 0,87	0,26 – 1,40
<b>Vanillinsäure / 4-OH-Benzaldehyd</b>	0,61 – 1,10	0,63 – 1,00	0,82 – 2,57	0,70 – 1,81	1,03 – 2,85	0,89 – 2,61
<b>Vanillingehalt [g/100g]</b>	2,03 – 2,91	2,19 – 2,61	1,40 – 3,55	1,47 – 2,89	2,12 – 3,40	2,22 – 3,48



Tab. 5: Spannbreiten der Vanille-Inhaltsstoffe und Vanillingehalte der Diethylether-Extrakte in Abhängigkeit vom Erntejahrgang; HPLC- und GC-Ergebnisse getrennt aufgeführt; n.b.: nicht bestimmbar

	Ernte 1998		Ernte 1999		Ernte 2000	
	HPLC	GC	HPLC	GC	HPLC	GC
<b>Vanillin / 4-OH-Benzaldehyd</b>	10 – 19	9 – 22	14 – 22	10 – 18	14 – 25	14 – 19
<b>Vanillin / 4-OH-Benzoessäure</b>	26 – 90	n.b.	28 – 61	n.b.	30 – 125	n.b.
<b>Vanillin / Vanillinsäure</b>	7 – 19	7 – 17	5 – 21	4 – 27	9 – 28	8 – 21
<b>4-OH-Benzoessäure / 4-OH Benzaldehyd</b>	0,16 – 0,37	n.b.	0,26 – 0,78	n.b.	0,17 – 0,81	n.b.
<b>Vanillinsäure / 4-OH-Benzaldehyd</b>	0,85 – 1,31	1,00 – 1,37	0,70 – 4,20	0,69 – 3,65	0,92 – 2,62	0,78 – 2,25
<b>Vanillingehalt [g/100g]</b>	1,44 – 2,37	1,08 – 1,67	1,44 – 2,89	1,08 – 2,28	1,82 – 2,91	1,38 – 2,34

Bei Betrachtung der Werte sind weder für die Verhältniszahlen noch für die Vanillingehalte charakteristische Unterschiede festzustellen. Bei einer beispielhaften graphischen Auftragung der Vanillingehalte (Abb. 16A) und der Verhältniszahlen Vanillin / 4-Hydroxybenzaldehyd (Abb. 16B) und Vanillin / Vanillinsäure (Abb. 16C) der Ethanol / Wasser-Extrakte, die mit HPLC ermittelt wurden, wird dies noch einmal verdeutlicht.

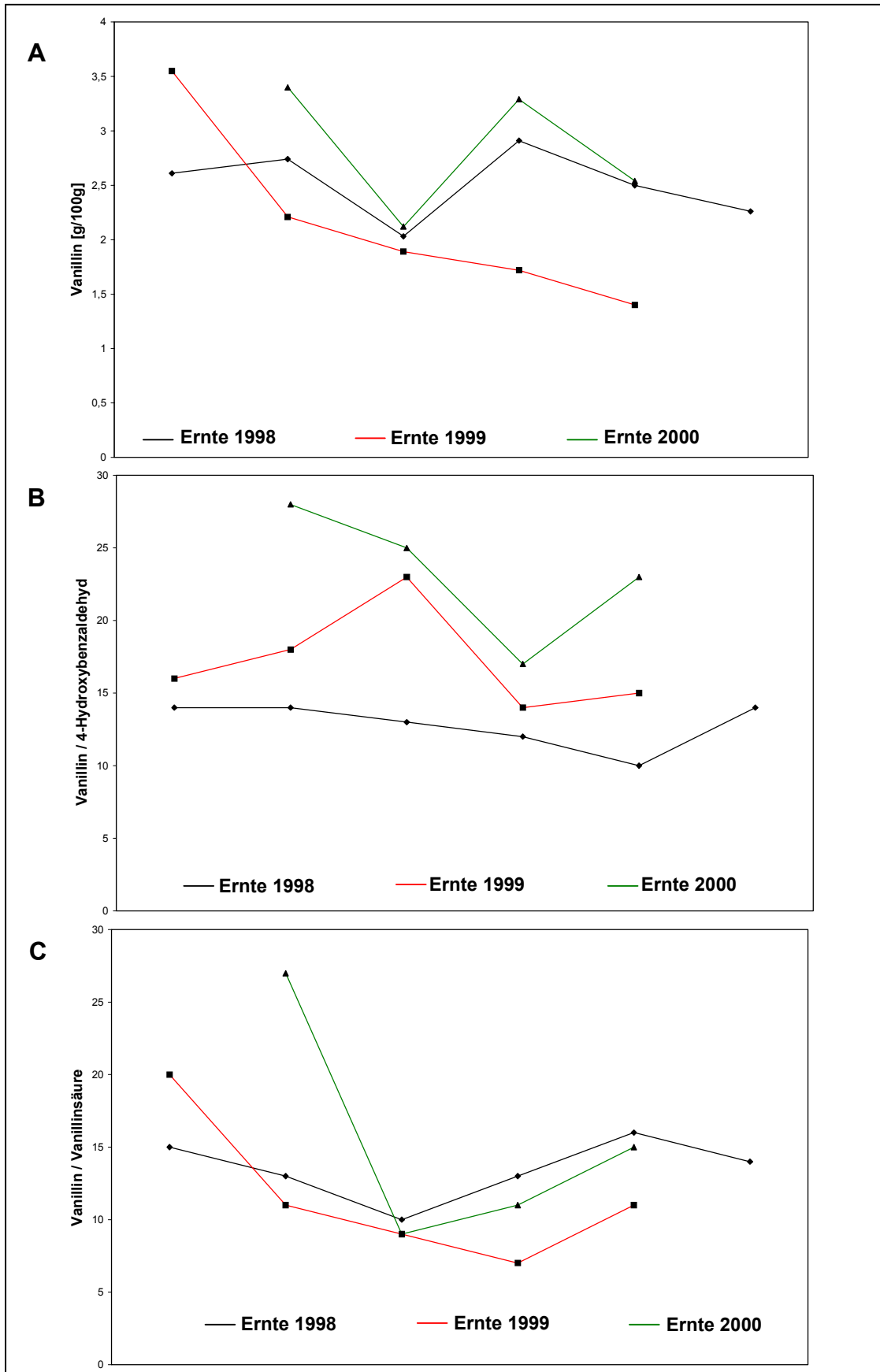
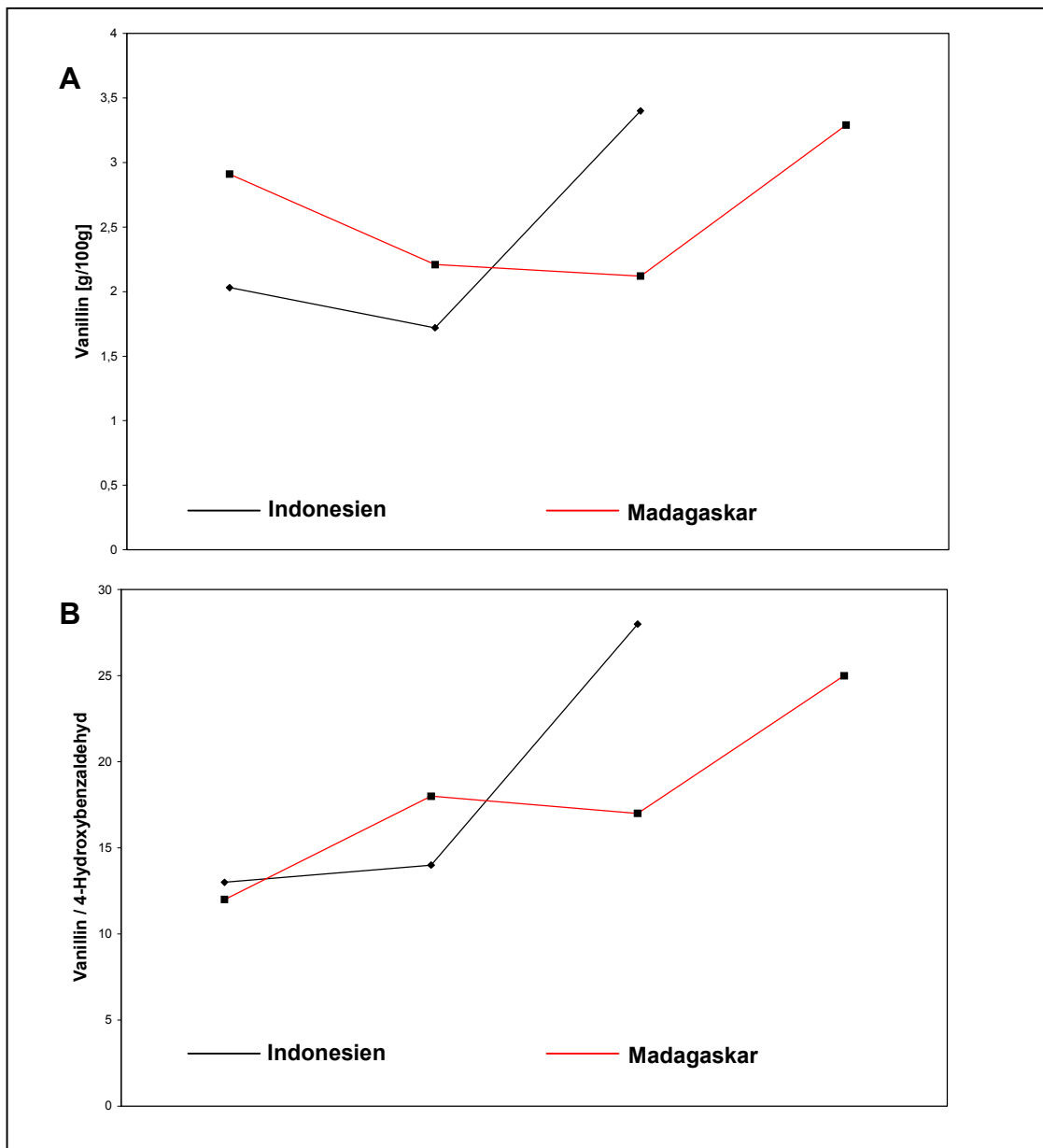


Abb. 16: Inhaltsstoff-Verhältniszahlen und Vanillingehalt der Ethanol / Wasser-Extrakte, mit HPLC ermittelt, in Abhängigkeit vom Erntejahrgang

Aus diesen Ergebnissen kann gefolgert werden, dass sowohl die Vanillingehalte als auch die Verhältniszahlen keine Abhängigkeit vom Erntejahrgang aufweisen. Das läßt gleichzeitig auch den Schluß zu, dass keine signifikante Abhängigkeit der Werte von den klimatischen Bedingungen zu beobachten ist. Die ermittelten Werte können somit Anwendung für Schoten aller Erntejahrgänge finden.

### 3.3.2.3 Abhängigkeit von der Herkunft

Zur Überprüfung einer Abhängigkeit der ermittelten Werte von der Schotenherkunft, sind in Abb. 17 die mit HPLC ermittelten Vanillingehalte (A), das Vanillin / 4-Hydroxybenzaldehyd- (B) und das Vanillin / Vanillinsäure-Verhältnis (C) der Ethanol / Wasser-Extrakte von Proben aus Madagaskar und Indonesien exemplarisch dargestellt:



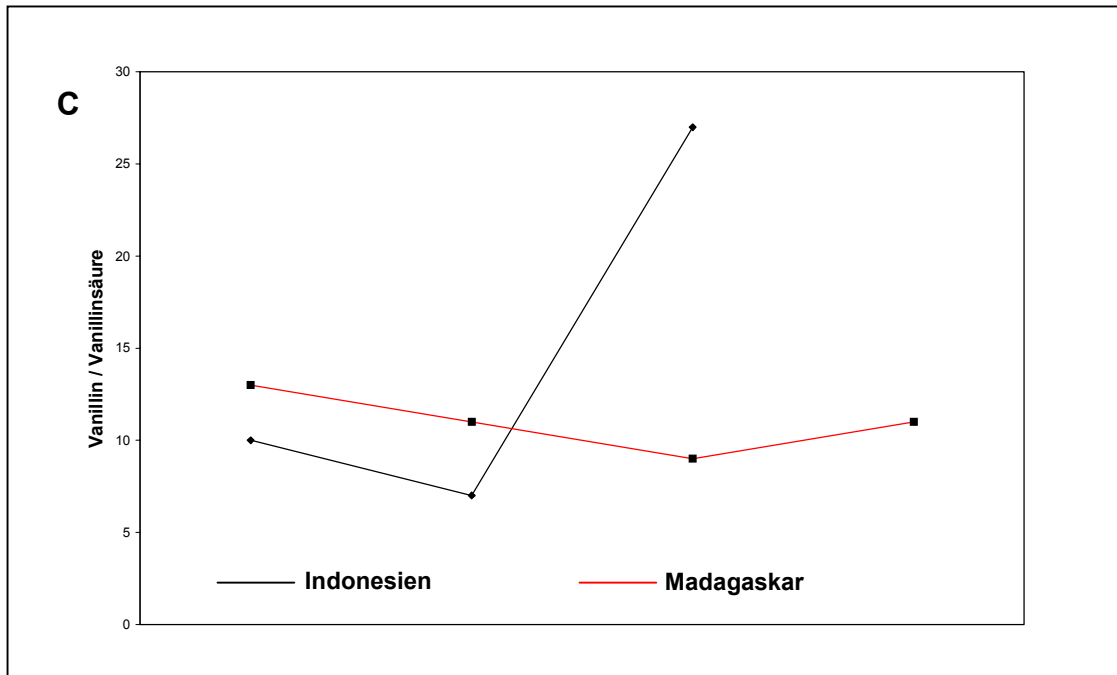


Abb. 17: Inhaltsstoff-Verhältniszahlen und Vanillingehalt der Ethanol / Wasser-Extrakte, mit HPLC ermittelt, in Abhängigkeit von der Herkunft

Aus der Darstellung wird deutlich, dass die Werte für ein Herkunftsland den gleichen Schwankungen unterworfen sind wie die Gesamtheit der Werte. Rückschlüsse auf die Herkunft von Schoten sind also anhand der Inhaltsstoff-Verhältniszahlen nicht möglich.

#### 3.3.2.4 Vergleich mit bisherigen Richtwerten

Bisher wurden Echtheitsbewertungen von Vanille oftmals anhand der Richtwerte, die auf den von Fayet et al. veröffentlichten Werten basieren [19], durchgeführt. Diese Werte wurden bereits von Ehlers et al. als zu eng gefasst eingestuft [15]. Die strenge Anwendung dieser Richtwerte kann daher fälschlicherweise zu einer Beanstandung authentischer Proben führen. Im Rahmen dieser Arbeit sollten daher eine Neubestimmung dieser Werte erfolgen. Tab. 6 zeigt einen Vergleich der neu bestimmten Werte – getrennt aufgeführt für die unterschiedlichen angewendeten Extraktionsverfahren – mit den bisherigen Richtwerten.

Tab. 6: Vergleich der neu ermittelten Verhältniszahlen und Vanillingehalte aus Ethanol / Wasser-Extrakten und Diethylether-Extrakten mit den bisher verwendeten Richtwerten

	Ethanol / Wasser- Extrakte	Diethylether- Extrakte	Bisherige Richtwerte [19]
Vanillin / 4-OH-Benzaldehyd	10 – 28	9 – 25	10 – 20
Vanillin / 4-OH-Benzoessäure	18 – 143	26 – 152	53 – 110
Vanillin / Vanillinsäure	7 – 29	4 – 28	15 – 29
4-OH-Benzoessäure / 4-OH-Benzaldehyd	0,14 – 1,40	0,16 – 0,81	0,15 – 0,35
Vanillinsäure / 4-OH-Benzaldehyd	0,61 – 2,85	0,69 – 4,20	0,53 – 1,00
Vanillingehalt [g/100g]	1,40 – 3,55	1,08 – 2,91	≥ 2

Es zeigt sich, dass die neu ermittelten Werte deutlich größere Spannbreiten aufweisen als die bisherigen Richtwerte, was die Ergebnisse von Ehlers et al. [15] bestätigt. Auch der bisher vorausgesetzte Mindestgehalt an Vanillin von 2 g/100g konnte bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen nicht bestätigt werden. Auch bei einer Extraktion mit Ethanol / Wasser, das optimale Extraktionseffizienz besitzt, konnten nicht für alle Schoten Vanillingehalte von mindestens 2 g/100g ermittelt werden.

### 3.4 Zusammenfassung

Insgesamt ist zu den Untersuchungen zur Analytik der Hauptkomponenten zu bemerken, dass durch die Einführung einer GC-Methode zusätzlich zur bisher gängigen HPLC-Analytik ein großer Fortschritt erzielt werden konnte. Die Vanille-Analytik kann dadurch einem größeren Anwenderkreis zugänglich gemacht werden.

Anhand der erzielten Ergebnisse ist es durch eine Analytik der Hauptkomponenten mit den vorgestellten Methoden möglich, erste orientierende Aussagen über eine mögliche Verfälschung von Vanille zu treffen. Ein alleiniger Zusatz von Vanillin sollte z.B. über das Verhältnis Vanillin / 4-Hydroxybenzaldehyd leicht erkennbar sein.

Da aber eine „Einstellung der richtigen Verhältniszahlen“ durch Zusatz mehrerer synthetischer Verbindungen möglich ist, erscheint eine Authentizitätsbewertung ausschließlich auf der Grundlage der Inhaltsstoff-Verhältniszahlen als nicht ausreichend. Eine weiterführende Analytik, im speziellen eine Isotopenanalytik für einzelne Inhaltsstoffe, ist für eine zuverlässigere Authentizitätsbewertung unabdingbar.

## 4 Isotopenanalytik

### 4.1 Grundlagen

Bei den meisten Elementen kommen in der Natur mehrere Isotope vor, d.h. Atome mit gleicher Anzahl von Protonen im Kern, aber unterschiedlicher Anzahl von Neutronen. Man unterscheidet dabei stabile und radioaktive Isotope. Moleküle, in die unterschiedliche Isotope eingebaut sind, bezeichnet man als Isotopomere.

Da das chemische Verhalten primär durch die Zahl an Elektronen bestimmt wird, verhalten sich Isotope im Allgemeinen chemisch gleich. In Folge ihrer unterschiedlichen Massen weichen Isotope desselben Elements hinsichtlich ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften dennoch geringfügig voneinander ab. Dies trifft vor allem auf Elemente niedriger Masse zu, da bei diesen die Massendifferenz zwischen Isotopen verhältnismäßig groß sein kann. Die unterschiedlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften resultieren aus quantenmechanischen Effekten und führen zu verschiedenen Bindungsenergien von Isotopomeren. So besitzen Moleküle, die schwerere Isotope enthalten stabilere chemische Bindungen als die leichteren Isotopomere [31].

Isotopomere reagieren daher in chemischen Reaktionen unterschiedlich schnell. Durch den sogenannten kinetischen Isotopeneffekt kommt es zu unterschiedlichen Isotopenverhältnissen von Edukt und Produkt einer Reaktion. Dies tritt auch bei enzymkatalysierten Reaktionen in Organismen auf. In der Regel kommt es dabei zu einer Anreicherung der schweren Isotopomere in den Reaktionsprodukten im Verhältnis zur Ausgangsverbindung. Da die Variation des Isotopenverhältnisses sehr gering ist, wird sie normalerweise als Promill(‰)-Abweichung von einem international akzeptierten Standard angegeben [31]. Die sog.  $\delta$ -Werte berechnen sich – hier angegeben für das  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis – nach folgender Gleichung:

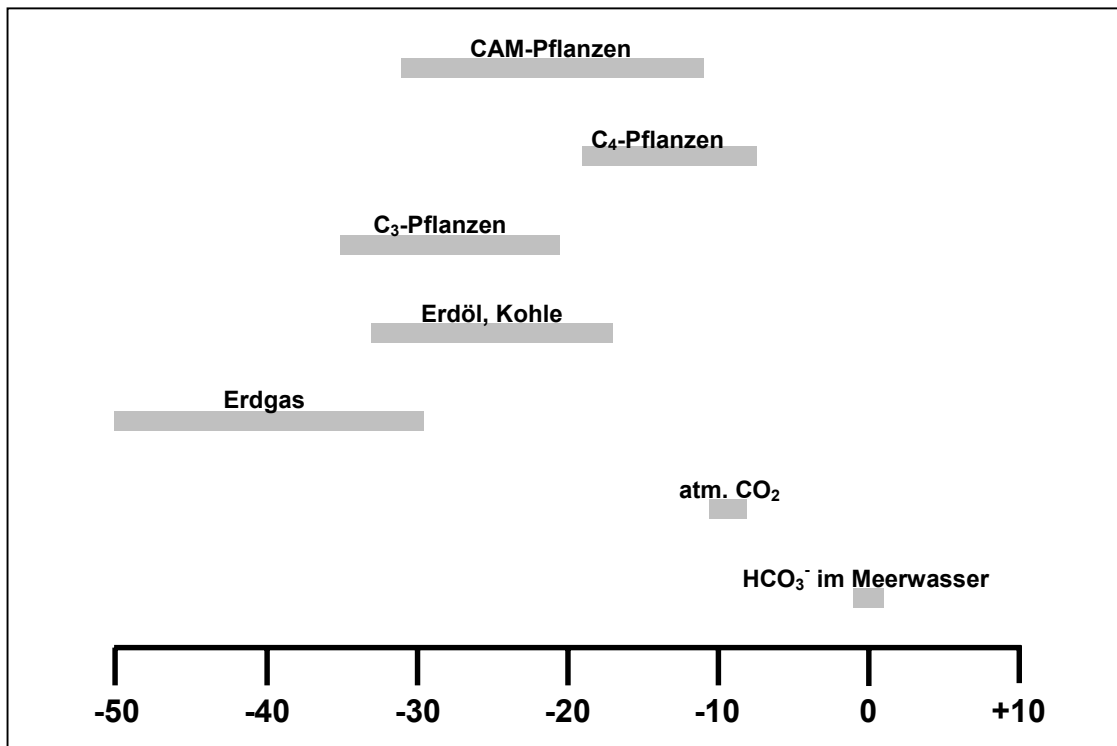
$$\delta^{13}\text{C} = \frac{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{Probe}} - (^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{V-PDB}}}{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{V-PDB}}} \times 1000 \text{ [‰]}$$

In Tab. 7 sind die gebräuchlichen Standards für einige Elemente genannt.

Tab. 7: Isotopenverteilung wichtiger Elemente und entsprechende Standards sowie deren Isotopenverhältnis [31]

Element	Isotope	nat. Häufigkeit [%]	Standard	Verhältnis im Standard
Wasserstoff	$^1\text{H}$	99,985	V-SMOW (Vienna-Standard Mean Ocean Water)	$^2\text{H}/^1\text{H}$
	$^2\text{H}$	0,015		$1,5575 \times 10^{-4}$
Kohlenstoff	$^{12}\text{C}$	98,98	V-PDB (Vienna-Pee Dee Belemnite)	$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$
	$^{13}\text{C}$	1,11		$1,1237 \times 10^{-2}$
Stickstoff	$^{14}\text{N}$	99,63	$\text{N}_2$ atm.	$^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$
	$^{15}\text{N}$	0,37		$3,677 \times 10^{-3}$
Sauerstoff	$^{16}\text{O}$	99,756	V-SMOW (Vienna-Standard Mean Ocean Water)	$^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$
	$^{17}\text{O}$	0,037		$2,0052 \times 10^{-3}$
	$^{18}\text{O}$	0,204	V-PDB (Vienna-Pee Dee Belemnite)	$2,0672 \times 10^{-3}$

Aufgrund des oben beschriebenen Isotopeneffekts ergeben sich für unterschiedliche Kohlenstoffquellen unterschiedliche Isotopenverhältnisse, wie Abb. 18 zeigt.

Abb. 18:  $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte der wichtigsten Kohlenstoffreservoirs der Erde [32]



Für Pflanzen wurde bereits vor über 30 Jahren eine Gruppierung anhand des  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisses festgestellt [33]. Aufgrund der unterschiedlichen Weise, während der Photosynthese atmosphärisches  $\text{CO}_2$  zu assimilieren, ergeben sich drei Gruppen von Pflanzen:  $\text{C}_3$ -Pflanzen,  $\text{C}_4$ -Pflanzen und CAM-Pflanzen. Die unterschiedlichen Arten der  $\text{CO}_2$ -Fixierung sollen im folgenden kurz dargestellt werden [34]:

### $\text{C}_3$ -Pflanzen:

Mittels der Ribulosebisdiphosphat-carboxylase/Oxygenase wird  $\text{CO}_2$  in eine Pentose, das Ribulose-1,5-diphosphat eingebaut. Der dadurch gebildete instabile  $\text{C}_6$ -Körper zerfällt sofort in zwei  $\text{C}_3$ -Körper. Das entstandene 3-Phosphoglycerat wird unter ATP-Verbrauch mit einem Redoxäquivalent  $\text{NADH}+\text{H}^+$  zu 3-Phosphoglycerinaldehyd reduziert (Abb. 19). Aus zwei Molekülen 3-Phosphoglycerinaldehyd wird eine Hexose gebildet. Die Regeneration von Ribulose-1,5-diphosphat erfolgt in einem über mehrere Zwischenstufen ablaufenden Cyclus, dem Calvin-Cyclus.

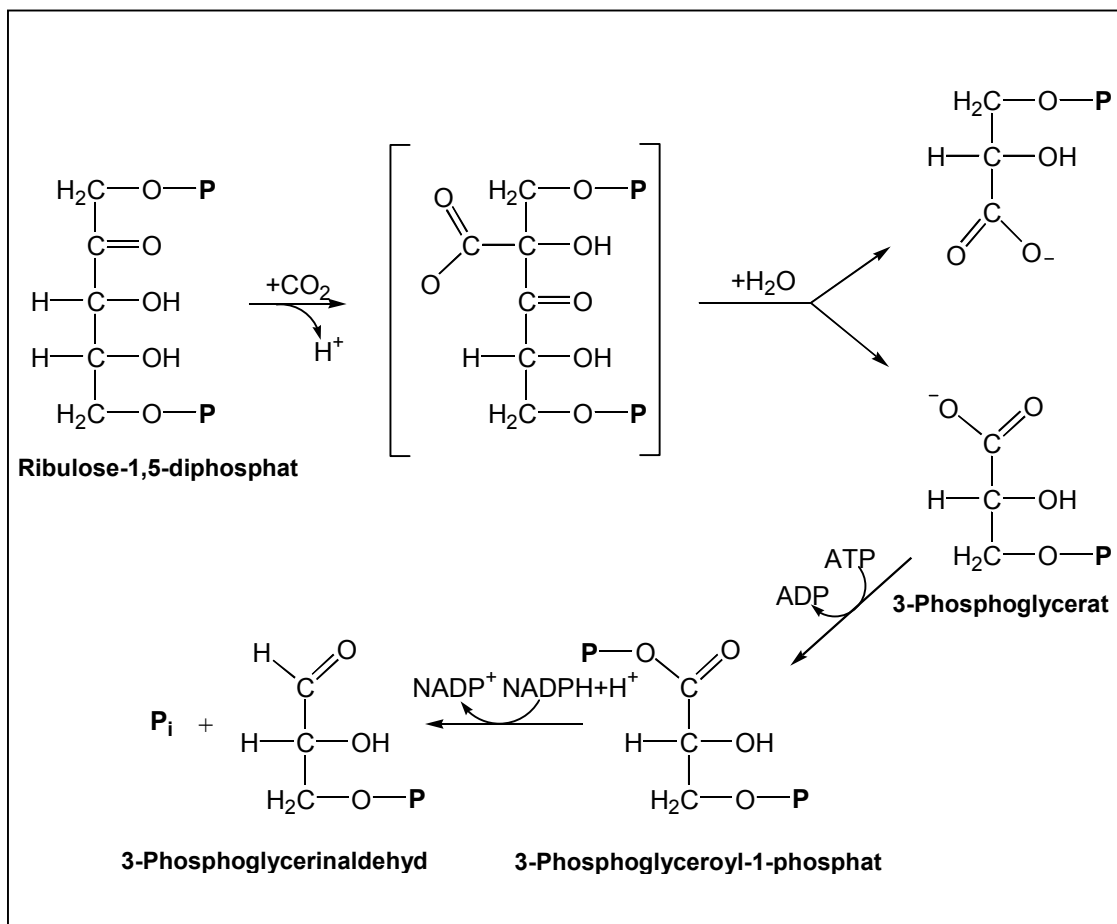


Abb. 19:  $\text{CO}_2$ -Fixierung von  $\text{C}_3$ -Pflanzen; die primäre Bindung erfolgt an Ribulose-1,5-diphosphat

Die Bezeichnung C<sub>3</sub>-Pflanzen rührt von dem zuerst gebildeten C<sub>3</sub>-Körper 3-Phosphoglycerat her. C<sub>3</sub>-Pflanzen bilden das größte Kontingent der Pflanzen. Bei diesem Photosyntheseweg kommt es zu einer relativ starken Anreicherung an <sup>13</sup>C, so dass die Pflanzen auch als „leichte Pflanzen“ bezeichnet werden.

#### C<sub>4</sub>-Pflanzen:

Bei den C<sub>4</sub>-Pflanzen erfolgt die primäre CO<sub>2</sub>-Fixierung über den sogenannten C<sub>4</sub>-Dicarbonsäureweg. Hierbei findet eine Arbeitsteilung zwischen den Mesophyllzellen und den die Leitbündel kranzförmig umgebenden Bündelscheidenzellen statt. Während in den Mesophyllzellen der primäre CO<sub>2</sub>-Einbau in Phosphoenol-Pyruvat (PEP) unter Katalyse der PEP-Carboxylase erfolgt, kommt es in den Bündelscheidenzellen zu einem CO<sub>2</sub>-Einbau nach dem Calvin-Cyclus, analog den C<sub>3</sub>-Pflanzen (Abb. 20).

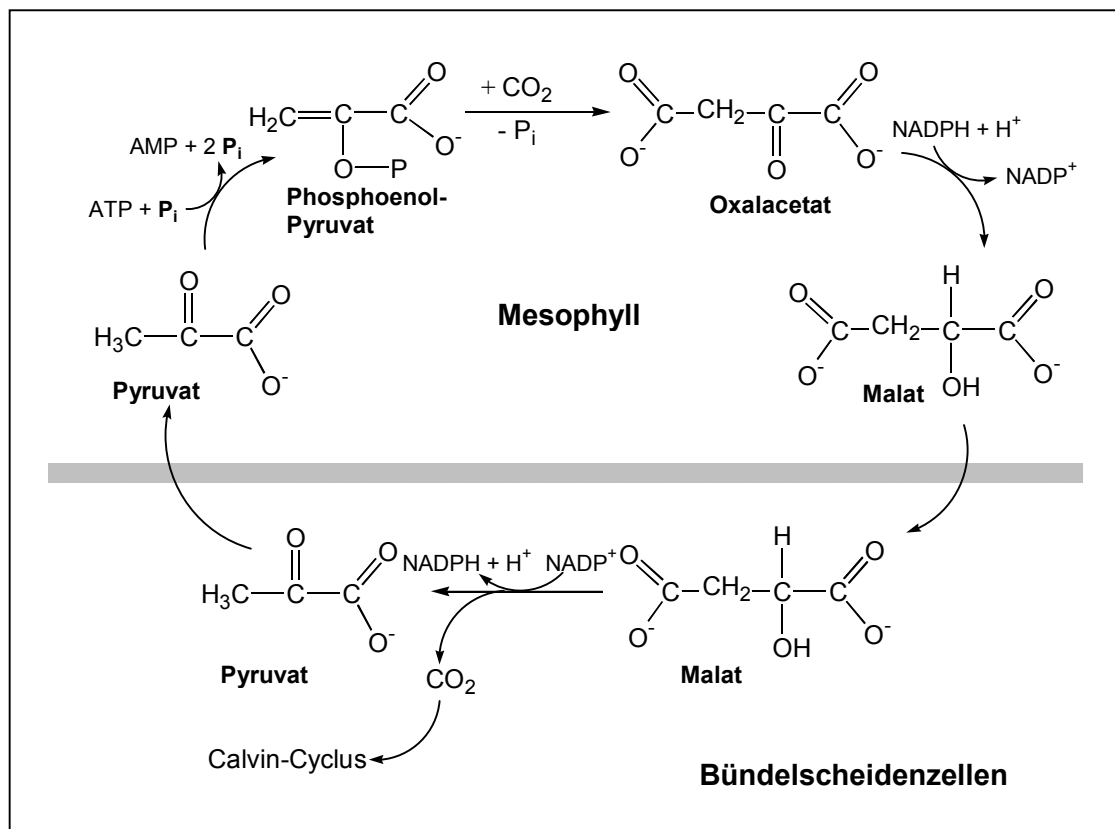


Abb. 20: CO<sub>2</sub>-Fixierung von C<sub>4</sub>-Pflanzen; die primäre Bindung erfolgt an Phosphoenol-Pyruvat

Trotz des zusätzlichen Energieaufwandes für die Pflanzen, der durch den vorübergehenden Einbau von CO<sub>2</sub> in eine C<sub>4</sub>-Dicarbonsäure entsteht, bietet dieser Photosyntheseweg wichtige Vorteile: Da die PEP-Carboxylase eine extrem hohe Affinität zu CO<sub>2</sub> aufweist, ist auf diesem Weg ein CO<sub>2</sub>-Einbau auch noch bei Konzentrationen möglich, die etwa eine Zehnerpotenz niedriger liegen

als bei den  $C_3$ -Pflanzen. Die so erreichte Anreicherung von  $CO_2$  in den Bündelscheidenzellen ermöglicht es den Pflanzen, ihre Spaltöffnungen beim Vorliegen eines starken Wasserpotentialgefälles weniger weit zu öffnen als die  $C_3$ -Pflanzen. Die Abreicherung an  $^{13}C$  ist bei diesem Photosyntheseweg weniger stark, so dass die entsprechenden Pflanzen auch „schwere Pflanzen“ genannt werden.

### **CAM-Pflanzen:**

Bei den CAM (Crassulacean Acid Metabolism)-Pflanzen findet sich eine Variante des  $C_4$ -Dicarbonsäurewegs. Bei geöffneten Spaltöffnungen speichern sie nachts  $CO_2$  in Form von Malat. Tagsüber wird das  $CO_2$  wieder freigesetzt und in Ribulose-1,5-diphosphat eingebaut. Die CAM-Pflanzen sind also auch in der Lage, tagsüber Photosynthese zu betreiben, wenn ihre Spaltöffnungen klimatisch bedingt geschlossenen sind. Im Unterschied zu den  $C_4$ -Pflanzen ist bei den CAM-Pflanzen die primäre  $CO_2$ -Fixierung und die Bildung von Hexosen nicht räumlich, sondern zeitlich getrennt. Die  $\delta^{13}C$ -Werte von CAM-Pflanzen liegen zwischen denen von  $C_3$ - und  $C_4$ -Pflanzen (Abb. 18).

Tab. 8 zeigt einen Überblick über wichtige  $C_3$ -,  $C_4$ - und CAM-Pflanzen unter Angabe der auf dem jeweiligen Photosyntheseweg erhaltenen  $\delta^{13}C$ -Werte:

**Tab. 8: wichtige Vertreter der verschiedenen Pflanzengruppen unter Angabe der resultierenden  $^{13}C/^{12}C$ -Isotopenwerte [32,35]**

<b>Pflanzengruppe</b>	<b><math>\delta^{13}C</math>-Wert [%]</b>	<b>wichtige Vertreter</b>
$C_3$ -Pflanzen	-35 bis -24	Weizen, Reis, Hafer, Kartoffel, Zuckerrübe, Weintraube
$C_4$ -Pflanzen	-16 bis -10	Mais, Hirse, Zuckerrohr
CAM-Pflanzen	-30 bis -12	Ananas, Vanille, Kakteen, Agave

## **4.2 Bestimmung von Isotopenwerten**

Da sich die Isotopenverhältnisse von Substanzen je nach Herkunft unterscheiden (Abb. 18 für Kohlenstoff), kann die Bestimmung von Isotopenwerten zur Herkunftsbestimmung von Lebensmittelinhaltsstoffen herangezogen werden. Dies ermöglicht beispielsweise auch eine Authentizitätsbewertung von Aromastoffen. Prinzipiell bestehen zwei Möglichkeiten, Isotopenwerte zu ermitteln: die Isotopenmassenspektrometrie (IRMS; **i**sotope **r**atio **m**ass **s**pectrometry) und die Bestimmung des stellungsspezifischen Isotopenmusters mittels SNIF-NMR (**s**ite-specific **n**atural

isotope fractionation measured by nuclear magnetic resonance) [36]. Beide Methoden sollen im Folgenden kurz vorgestellt werden.

#### 4.2.1 Isotopenverhältnismassenspektrometrie (IRMS)

Die Isotopenverhältnismassenspektrometrie (IRMS) ermöglicht es, die Isotopenverteilung eines Moleküls zu ermitteln. Im Bezug auf Authentizitätsfragen ist hierbei die Ermittlung der Verhältnisse  $^2\text{H}/^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  und  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  von Bedeutung. Prinzipiell gibt es zwei Möglichkeiten, die Isotopenverhältnisse zu ermitteln: mittels direkter Verbrennung oder Pyrolyse von Reinsubstanzen und der Auftrennung der Produkte im Massenspektrometer oder mittels der Kopplung von Gaschromatographie (GC) und Massenspektrometrie. Im Folgenden wird nur auf die Kopplung GC-IRMS zur Bestimmung von  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnissen eingegangen.

Die GC-IRMS bietet den enormen Vorteil, dass im Vorfeld der Analytik keine aufwendige Isolierung und Aufreinigung der zu analysierenden Substanzen erforderlich ist. Bei der Kopplung dient die hochauflösende Kapillargaschromatographie zur Isolierung einzelner Substanzen, die dann über ein Interface in das Massenspektrometer gelangen.

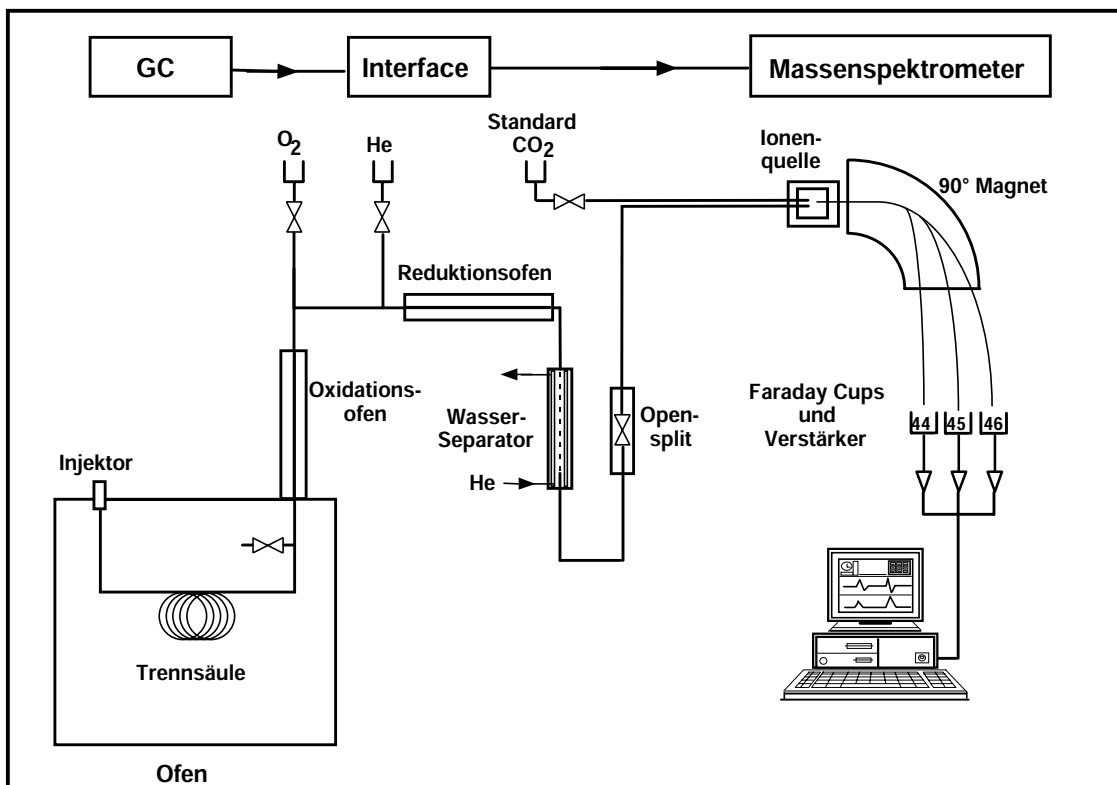


Abb. 21: schematischer Aufbau der GC-C-IRMS zur Bestimmung von  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnissen

Abb. 21 zeigt schematisch den apparativen Aufbau für die Bestimmung von  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnissen. Nach der Auftrennung eines Substanzgemisches mittels GC erfolgt die Verbrennung der Einzelsubstanzen in einem Oxidationsofen an einem CuO/NiO-Kontakt zu  $\text{CO}_2$  und Wasser. Als Katalysator dient dabei ein Platindraht. Das entstandene Wasser wird im Wassereparator mittels einer semipermeablen Membran entfernt. Über den sogenannten open split gelangt dann das gebildete  $\text{CO}_2$  in das Massenspektrometer (MS). Durch den open split, über den Helium zugeleitet wird, wird gewährleistet, dass ein konstanter Fluss ins MS erfolgt. Im MS werden dann die Massen 44 ( $^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2$ ), 45 ( $^{13}\text{C}^{16}\text{O}_2$  und  $^{12}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O}$ ) und 46 ( $^{12}\text{C}^{18}\text{O}^{16}\text{O}$ ) getrennt und in sog. Faraday-Cups getrennt detektiert. Die Mitbestimmung der Masse 46 ist notwendig, um den auf  $^{12}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O}$  zurückzuführenden Beitrag zur Masse 45 zu eliminieren. Dies ist möglich, da das  $^{18}\text{O}/^{17}\text{O}$ -Verhältnis in der Natur nahezu konstant ist. Mittels eines Standard- $\text{CO}_2$ -Gases mit bekanntem  $\delta^{13}\text{C}$ -Wert, das gesondert ins MS eingelassen werden kann, kann dann der  $\delta^{13}\text{C}$ -Wert einer Substanz ermittelt werden.

Da sich Isotopomere bei einer chromatographischen Auftrennung nicht identisch verhalten, kommt es im Verlauf eines Peaks zu einer Veränderung des Isotopenverhältnisses. So eluiert der  $^{13}\text{CO}_2$ -Peak kurz vor dem  $^{12}\text{CO}_2$ -Peak, was bei der Aufzeichnung des 45/44-Verhältnisses in einer charakteristischen „S-Shape“ resultiert, und im Verlauf des Peaks zu unterschiedlichen  $\delta^{13}\text{C}$ -Werten führt, wie Abb. 22 zeigt.

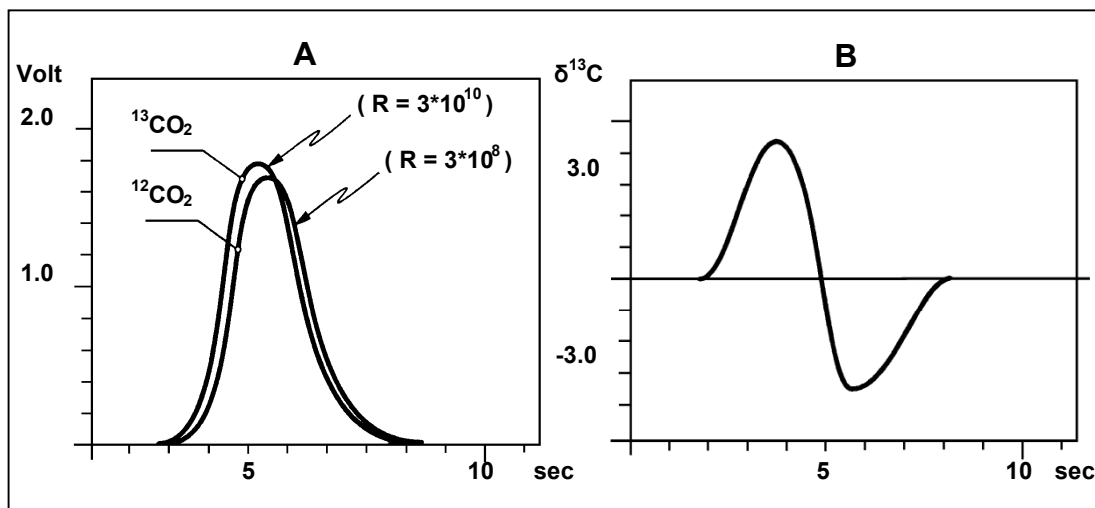


Abb. 22: Fraktionierung der Isotopomere in der GC (Masse 44 und Masse 45 mit verschiedenen Verstärkungen getrennt aufgezeichnet) und daraus resultierende „S-Shape“;  
R: Widerstand [ $\Omega$ ]

Es ist daher wichtig, immer den kompletten Peak zu erfassen, um richtige Werte zu ermitteln.

Mittels GC-IRMS kann also der Gesamt-Isotopenwert einer Verbindung aus einem komplexen Gemisch von Substanzen bestimmt werden.

#### 4.2.2 Stellungsspezifische Isotopenverteilung (SNIF-NMR)

SNIF-NMR (site-specific natural isotope fractionation measured by nuclear magnetic resonance) ist eine Methode zur Bestimmung der stellungsspezifischen Isotopenverteilung in einem Molekül. Man bedient sich dabei der quantitativen  $^2\text{H}$ -Kernresonanzspektroskopie. Grundlage dieses analytischen Verfahrens ist die Tatsache, dass die Verteilung von Deuterium an den verschiedenen Positionen in organischen Molekülen nicht statistisch erfolgt, sondern ein spezifisches Verteilungsmuster aufweist. Da das Isotopenverteilungsmuster stark von der Herkunft einer Substanz abhängig ist (synthetisch, natürlich, biotechnologisch), ist die SNIF-NMR eine geeignete Methode, um Authentizitätsfragen zu beantworten [36].

Auch für Vanille findet die SNIF-NMR häufig Anwendung [37,38], wobei die Isotopenmuster von Vanillin und 4-Hydroxybenzaldehyd betrachtet werden können.

Nachteile der SNIF-NMR im Vergleich zur GC-IRMS sind zum einen die Tatsache, dass die zu untersuchende Substanz vor der Analyse isoliert und aufgereinigt werden muss, und dass eine verhältnismäßig große Substanzmenge erforderlich ist. Zum anderen sind mit der SNIF-NMR auch deutlich höhere Kosten verbunden als mit der GC-IRMS.

### 4.3 Bestimmung der $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte von Vanillin und 4-Hydroxybenzaldehyd mittels GC-C-IRMS

#### 4.3.1 Stand der Forschung und Zielsetzung

Bereits seit fast 30 Jahren findet die Isotopenanalytik zur Authentizitätsprüfung von Vanille Anwendung [39]. Seither wurden zahlreiche  $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte für Vanillin unterschiedlicher Herkunft publiziert [40]. Die meisten Werte, die in der Literatur zu finden sind, sind allerdings durch Direktverbrennung des isolierten, aufgereinigten Vanillins ermittelt worden. Dies gilt z.B. auch für die von Fayet et al. ermittelten Werte [19], die die Grundlage für die häufig zur Bewertung von Vanille herangezogenen Richtwerte darstellen. Bei einer Isolierung und Aufreinigung kann es aber immer zu einer Isotopendiskriminierung kommen, wenn die Aufarbeitung nicht genügend überprüft wird. Wird beispielsweise eine Vorreinigung mit präparativer Gaschromatographie durchgeführt, kommt es im

Verlauf des Peaks zu einer Veränderung des Isotopenwertes [41] (vgl. 4.2.1). Auch Fellous et al. zeigen in ihrer Arbeit auf, dass es durch eine unzulängliche Isolierung des Vanillins zu Isotopendiskriminierung kommen kann [42]. Sie verwenden daher als erste die Methode der gekoppelten Gaschromatographie-Isotopenmassenspektrometrie, die es ermöglicht, die Isotopenverhältnisse ohne vorherige Isolierung der interessierenden Substanz zu ermitteln.

Die alleinige Bestimmung von  $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werten für Vanillin – ob über Direktverbrennung oder über Kopplung mit Gaschromatographie – ist aber inzwischen oftmals nicht mehr ausreichend. Da es möglich ist, synthetischem Vanillin  $^{13}\text{C}$ -angereichertes Vanillin zuzusetzen, können „natürliche“  $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte eingestellt werden (Abb. 23).

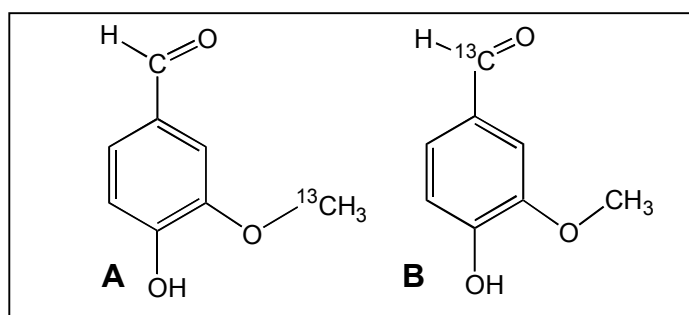


Abb. 23: Möglichkeiten zur  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung in synthetischem Vanillin

Durch Bestimmung des Gesamtisotopenwertes ist es nicht mehr möglich, solche Syntheseprodukte von Vanillin *ex Vanilla* zu unterscheiden. Durch Abspaltung der Methylgruppe und Bestimmung des Isotopenwertes des entstehenden 3,4-Dihydroxy-Benzaldehyds bzw. der Methylgruppe kann eine mögliche Anreicherung in der Methoxy-Gruppe von Vanillin (Abb. 23A) detektiert werden [43-46]. Eine Anreicherung in der Carbonyl-Funktion (Abb. 23B) kann durch Bestimmung des Isotopenwertes des nach Oxidation zur Vanillisäure und anschließender Decarboxylierung freigesetzten  $\text{CO}_2$  detektiert werden [47]. Beide Methoden sind allerdings verhältnismäßig aufwendig und somit für eine Routineanalytik nur bedingt einsetzbar.

Prinzipiell existieren zwei Möglichkeiten einer weitergehenden Isotopenanalytik für Vanille: Die Bestimmung mehrerer Elemente (multielement-Analytik), z.B.  $\delta^{13}\text{C}$ - und  $\delta^2\text{H}$ -Werte (mittels IRMS oder SNIF-NMR) oder die Bestimmung der  $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte von mehr als einer Komponente (multikomponent-Analytik). Bei Anwendung von GC-C-IRMS kann damit ein deutlicher Fortschritt im Hinblick auf eine Authentizitätsbewertung von Vanille erzielt werden [48-50].

Im Rahmen der durchgeführten Arbeit sollten mittels GC-C-IRMS die  $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte der beiden wichtigsten Vanille-Inhaltsstoffe Vanillin und 4-Hydroxybenzaldehyd bestimmt werden. So sollten zuverlässigere Kriterien für eine Authentizitätsbewertung von Vanille ermittelt werden. Außerdem sollte analog den quantitativen Bestimmungen der Inhaltsstoffe überprüft werden, welchen Einfluss die Schotenextraktionsbedingungen auf die Isotopenwerte haben.

### 4.3.2 Methodik

#### 4.3.2.1 Kalibrierung

Ein wichtiger Punkt in der Isotopenmassenspektrometrie ist eine präzise Kalibrierung des Systems. Zunächst muss der exakte Isotopenwert des  $\text{CO}_2$ -Referenzgases, über den die Isotopenwerte der untersuchten Substanzen bestimmt werden, festgestellt werden. Hierzu werden Substanzen, deren Isotopenwerte zuvor über externe Bestimmung durch Direktverbrennung ermittelt wurden, über das GC-C-IRMS-System vermessen. Im vorliegenden Fall wurden hierfür die Substanzen Menthol, 5-Nonanon,  $\gamma$ -Octalacton und  $\gamma$ -Decalacton herangezogen. Zusätzlich wurden 4-Hydroxybenzaldehyd, Vanillin und Ethylvanillin mit bekannten  $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werten zur Überprüfung der geplanten Anwendung vermessen. Auf diese Weise kann dann der Isotopenwert des Referenzgases ermittelt werden.

Eine solche Vorgehensweise ist sehr wichtig, um mögliche Einflüsse des GC-C-IRMS-Systems auf die ermittelten Isotopenwerte feststellen zu können.

#### 4.3.2.2 Optimierung des GC-C-IRMS-Systems

Bei der Anwendung der direkten Kopplung von Gaschromatographie und Isotopenmassenspektrometrie (GC-C-IRMS) ergeben sich oftmals Schwierigkeiten, die bei der Direktverbrennung von Substanzen nicht auftreten. Bereits Kaunzinger et al. beschrieben Probleme bei der Verbrennung der phenolischen Vanille-Inhaltsstoffen zur Isotopenanalytik [48]. Durch eine unvollständige Verbrennung kann es zu Peakverbreiterung und falschen Isotopenwerten kommen. Um diesem Problem entgegenzutreten, optimierten Kaunzinger et al. das GC-C-IRMS-System insofern, als dass sie den Verbinder, der die GC-Kapillare mit dem Oxidationsofen verbindet, durchbohrten. Dadurch wird erreicht, dass die GC-Kapillare in den Oxidationsofen hineinragt, was für die von der GC-Kapillare eluierenden Substanzen eine deutlich geringere Wegstrecke bis zur Verbrennung bedeutet.



Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen, stellte sich allerdings heraus, dass auch mit einem durchbohrten Verbinder für die interessierenden Substanzen keine optimalen Resultate erzielt werden konnten. Während die zur Standardisierung des Systems herangezogenen Verbindungen 5-Nonanon, Menthol,  $\gamma$ -Octalacton und  $\gamma$ -Decalacton scharfe, schmale Peaks ergaben, wiesen die Substanzen Vanillin, 4-Hydroxybenzaldehyd und Ethylvanillin unter den gegebenen Bedingungen extreme Peakverbreiterung auf (Abb. 24).

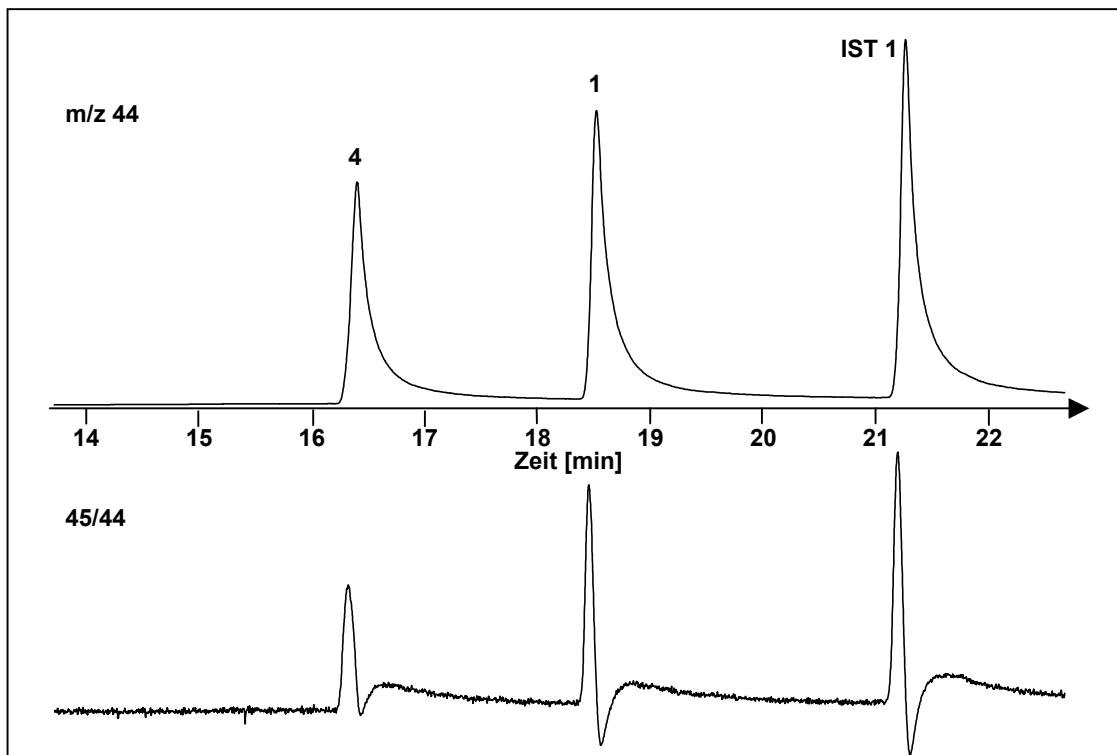


Abb. 24: untersuchte Substanzen bei normaler Gerätekonfiguration; Massenspur m/z 44 und Verhältnis der Massen 45 und 44  
1: Vanillin; 4: 4-Hydroxybenzaldehyd; IST 1: Ethylvanillin

Dies deutet auf eine unvollständige Verbrennung hin. Da eine mögliche Ursache hierfür eine unzureichende Verbrennungstemperatur sein kann, wurde das Temperaturprofil des Heizers, in dem sich der Verbrennungsofen befindet ermittelt:

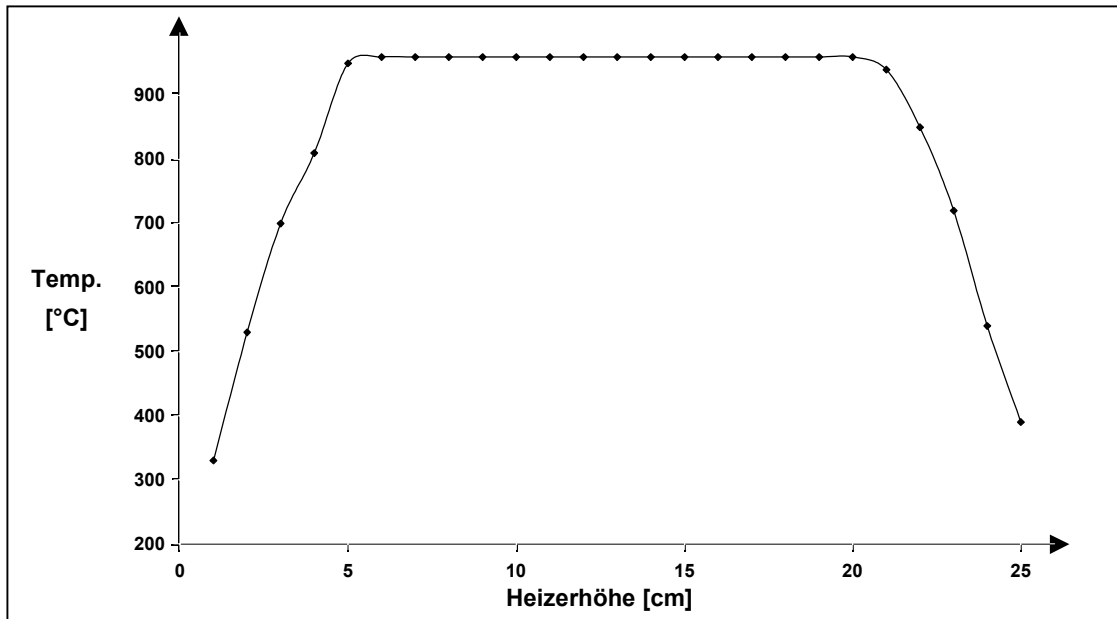


Abb. 25: Temperaturverlauf innerhalb des Heizers für den Verbrennungsofen (von unten nach oben); eingestellte Heizertemperatur: 960°C; (für die Messung wurde anstelle des Verbrennungsofens ein Temperaturfühler in den Heizer eingeführt)

Bei einem nach Herstellerangabe erfolgten Einbau des Verbrennungsofens, ragt die GC-Kapillare ca. 3 mm in den Heizer hinein. Dort herrscht, gemäß dem ermittelten Temperaturprofil, eine Temperatur von unter 300°C. Diese ist vermutlich nicht ausreichend, um eine komplette Verbrennung von phenolischen Substanzen zu erreichen. Fixiert man den Verbrennungsofen so, dass das Ende der Kapillare 1 cm weiter im Heizer liegt, also ca. 13 mm, herrscht dort eine deutlich höhere Temperatur, die eine vollständige Verbrennung der interessierenden Substanzen ermöglicht. Abb. 26 zeigt die Verbindungen 4-Hydroxybenzaldehyd, Vanillin und Ethylvanillin bei einem entsprechenden Einbau des Verbrennungsofens:

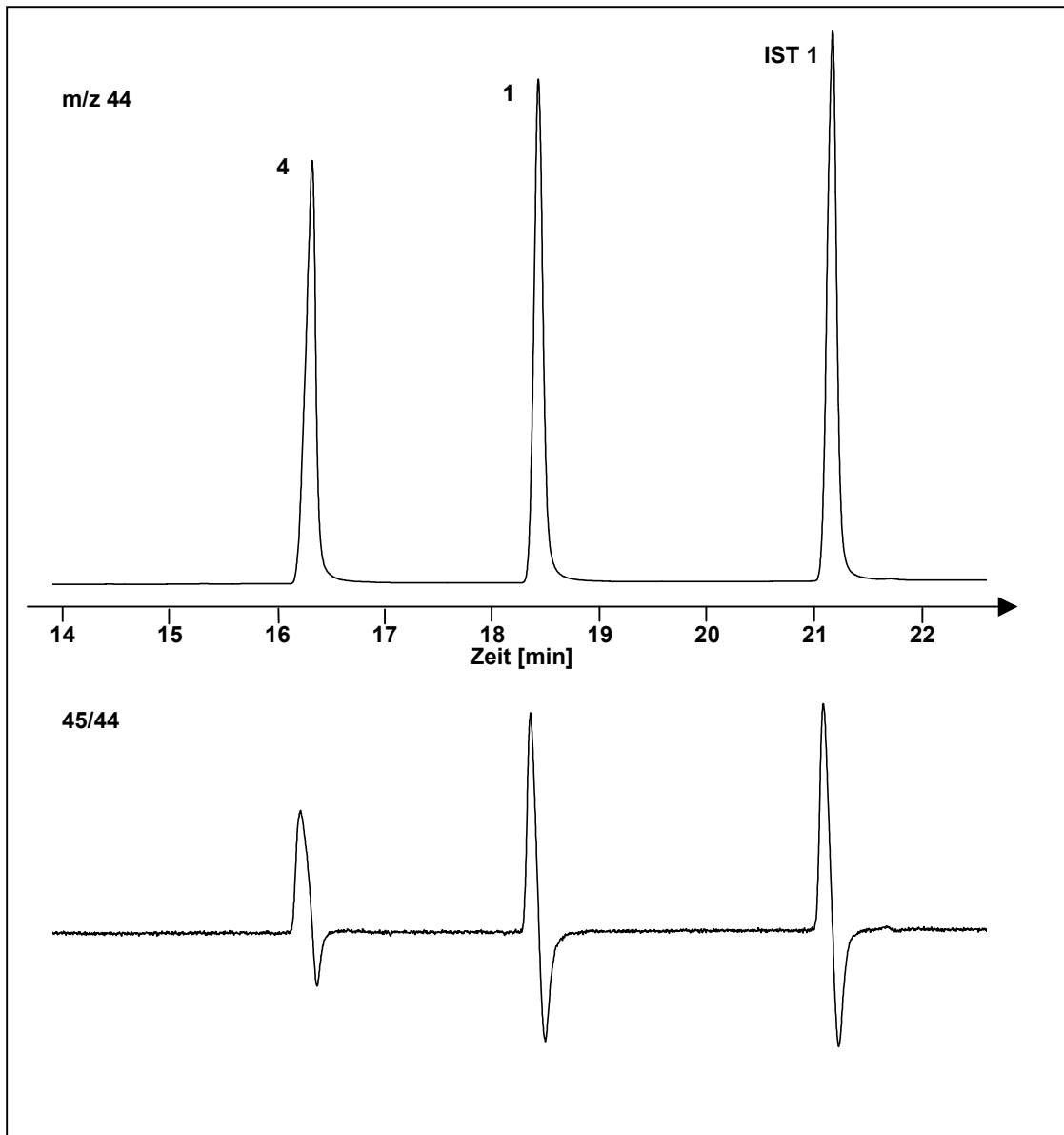


Abb. 26: untersuchte Substanzen bei modifizierter Gerätekonfiguration; Massenspur m/z 44 und Verhältnis der Massen 45 und 44  
1: Vanillin; 4: 4-Hydroxybenzaldehyd; IST 1: Ethylvanillin

Durch diese Modifikation war es möglich, die interessierenden Substanzen reproduzierbar und richtig zu vermessen.

#### 4.3.2.3 Einfluss der Schotenaufarbeitung

Analog zu den quantitativen Bestimmungen der Vanille-Inhaltsstoffe sollte auch im Bezug auf die Isotopenanalytik der Einfluss der Extraktionsbedingungen überprüft werden. Zu diesem Zweck wurden auch hier zwei verschiedene Extraktionsmethoden angewendet (Ethanol / Wasser-Extrakte und Diethylether-Extrakte). Da die Extraktionseffizienz von Diethylether geringer ist als die von

Ethanol / Wasser (vgl. Kap. 2), wurde außerdem überprüft, ob der Extraktionsgrad einen Einfluss auf die  $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte hat.

### 4.3.3 Ergebnisse und Diskussion

#### 4.3.3.1 Authentizitätsbewertung anhand der $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Isotopenwerte

Durch die in Kap. 4.3.2.2 beschriebene Gerätemodifikation war es möglich, die  $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte der beiden wichtigsten Inhaltsstoffe der Vanille – Vanillin und 4-Hydroxybenzaldehyd – zu bestimmen. Die Untersuchung erfolgte hierbei für Schoten der Gattungen *V. planifolia* und *V. tahitensis*. Abb. 27 zeigt beispielhaft die Massenspur  $m/z$  44 und das Verhältnis 45/44 für einen Ethanol / Wasser-Extrakt von Schoten der Gattung *V. planifolia*.

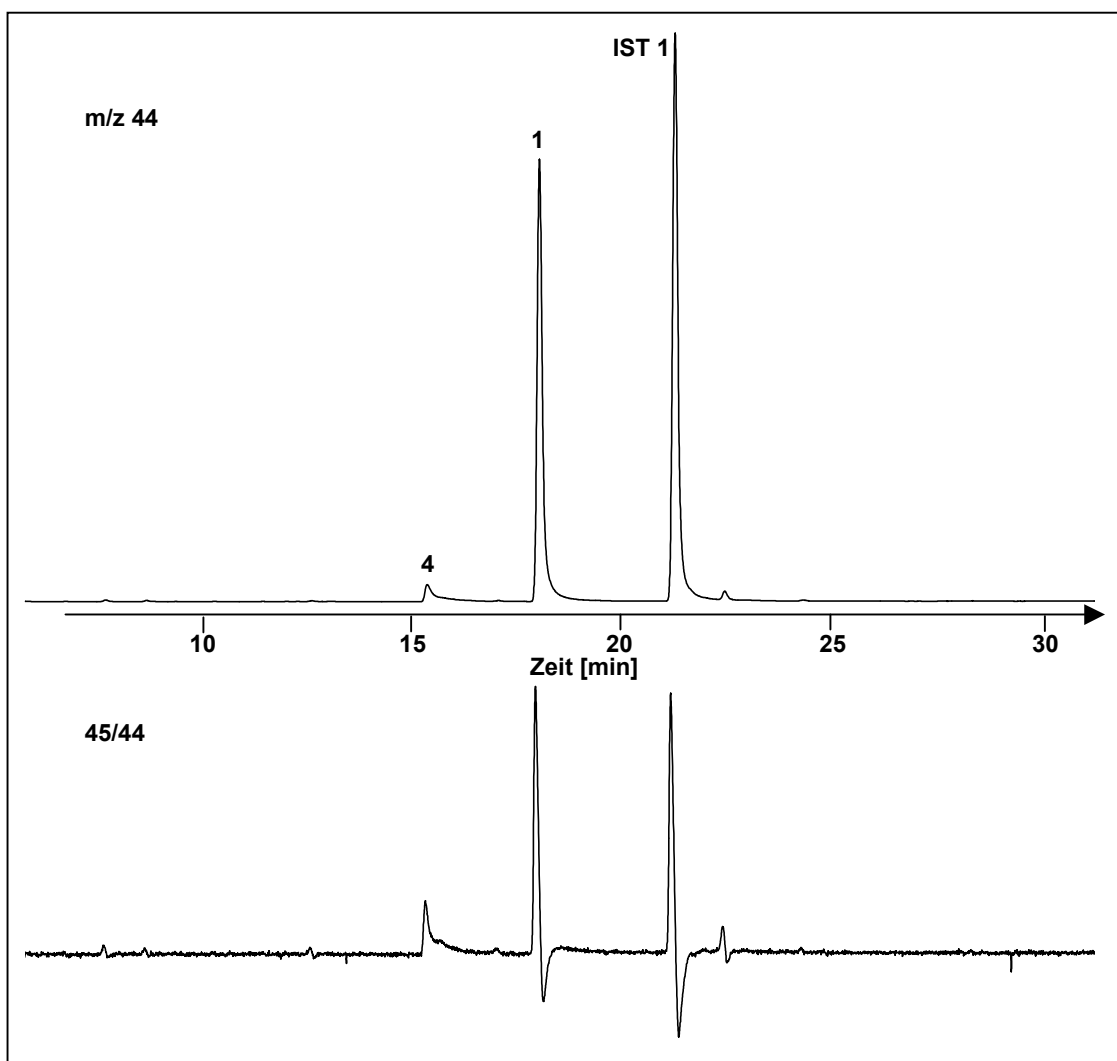


Abb. 27: Ethanol / Wasser-Extrakt von Schoten der Gattung *V. planifolia*; Massenspur  $m/z$  44 und Verhältnis der Massen 45 und 44  
1: Vanillin; 2: 4-Hydroxybenzaldehyd; IST 1: Ethylvanillin

Aus Abb. 27 ist ersichtlich, dass die Isotopenwerte der beiden Substanzen Vanillin und 4-Hydroxybenzaldehyd nicht gleichzeitig bestimmt werden können. Zur Bestimmung von 4-Hydroxybenzaldehyd ist es notwendig, den Extrakt konzentrierter einzuspritzen, wobei Vanillin und Ethylvanillin dann ausgeblendet werden. Da in allen Extrakten das Ethylvanillin als interner Standard zugesetzt wurde (vgl. Kap. 3), dient der Isotopenwert des synthetischen Ethylvanillin als Kontrolle bei den Messungen des  $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werts von Vanillin.

Die ermittelten  $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte der untersuchten authentischen Proben von *V. planifolia* und *V. tahitensis* sind in Tab. 9 dargestellt:

Tab. 9: Bereiche der  $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte von Vanillin und 4-Hydroxybenzaldehyd für die untersuchten Proben von *V. planifolia* und *V. tahitensis*; (n: Anzahl der Proben)

	$\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ Vanillin	$\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ 4-Hydroxybenzaldehyd
<b><i>V. planifolia</i></b>	-21,5 bis -19,2 n=15	-20,1 bis -16,9 n=9
<b><i>V. tahitensis</i></b>	-19,7 bis -15,9 n=4	-19,8 bis -16,5 n=4

Zur Ermittlung der Verwertbarkeit der ermittelten Werte für eine Unterscheidung von Vanillin und 4-Hydroxybenzaldehyd ex *Vanilla* von Proben anderen Ursprungs (Synthese, Biotechnologie), wurden entsprechende Reinsubstanzen unterschiedlichen Ursprungs vermessen. Die Ergebnisse sind in Abb. 28 und Abb. 29 dargestellt:

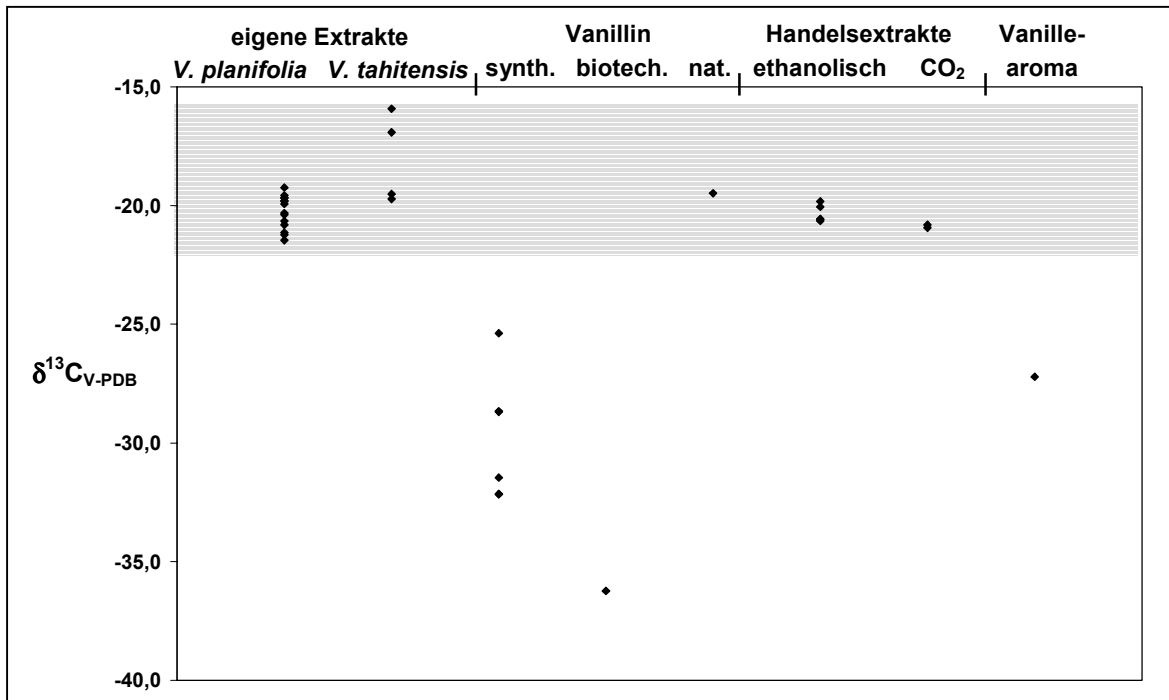


Abb. 28:  $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte von Vanillin unterschiedlichen Ursprungs; grau unterlegt: Bereich für authentische Proben

Abb. 28 zeigt deutlich, dass eine klare Unterscheidung von Vanillin *ex Vanilla* und Vanillin anderen Ursprungs möglich ist. Während die Werte für Vanillin aus authentischen Proben zwischen  $-21,5\%$  und  $-15,9\%$  liegen, sind die Werte von synthetischem Vanillin zwischen  $-32,2\%$  und  $-25,4\%$  angesiedelt. Der  $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Wert von biotechnologisch hergestelltem Vanillin, das lebensmittelrechtlich als natürliches Vanillin gilt [51], ist mit  $-36,2\%$  deutlich negativer als alle anderen vermessenen Vanillin-Proben. Das Vanillin aus Handelsextrakten (ethanolisch und  $\text{CO}_2$ ) weist  $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte auf, die eine klare Einordnung als *ex Vanilla* erlauben. Für ein handelsübliches Vanillearoma konnte anhand des  $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werts festgestellt werden, dass es sich um einen Zusatz synthetischen Vanillins handelt.

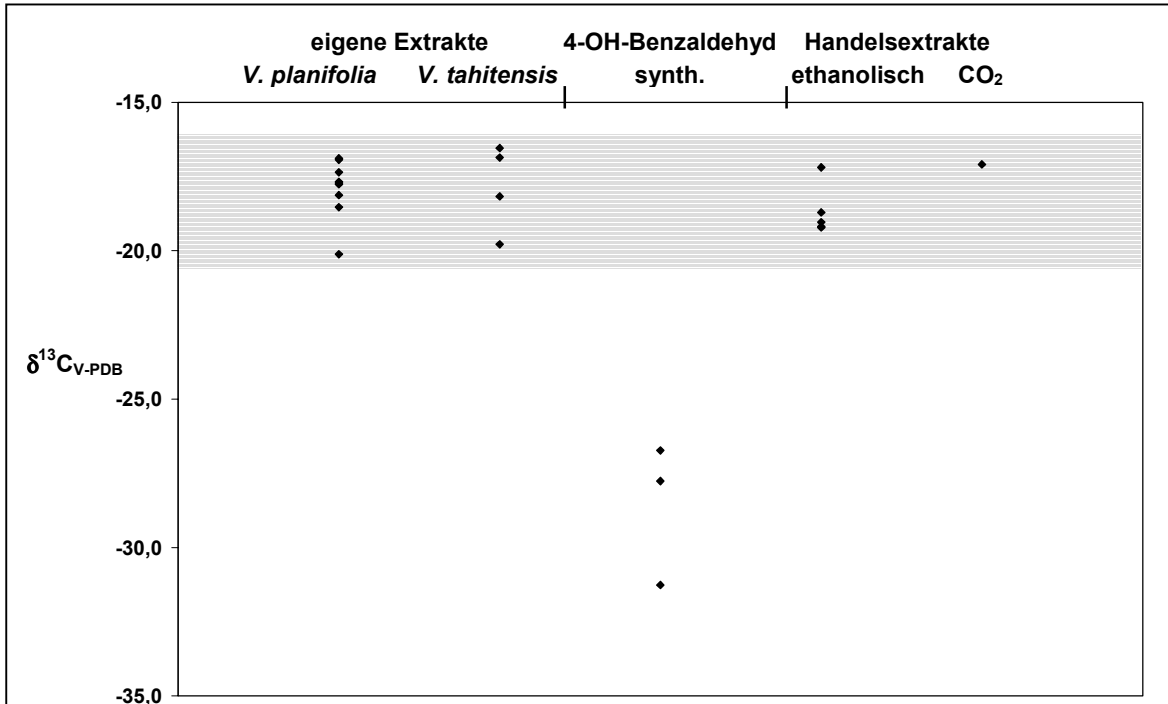


Abb. 29:  $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte von 4-Hydroxybenzaldehyd unterschiedlichen Ursprungs; grau unterlegt: Bereich für authentische Proben

Auch für 4-Hydroxybenzaldehyd ist, wie aus Abb. 29 ersichtlich, eine klare Unterscheidung von synthetischem und natürlichem Ursprung möglich. Während die Werte für natürliches 4-Hydroxybenzaldehyd zwischen -20,1‰ und -16,9‰ liegen, sind Proben synthetischen Ursprungs in einem Bereich zwischen -31,3‰ und -26,7‰ anzusiedeln. Vanille-Extrakte aus dem Handel konnten auch anhand des Isotopenwerts von 4-Hydroxybenzaldehyd als natürlich eingeordnet werden.

Betrachtet man die Korrelation der  $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte von Vanillin und 4-Hydroxybenzaldehyd, erhält man einen Bereich, wie in Abb. 30 dargestellt:

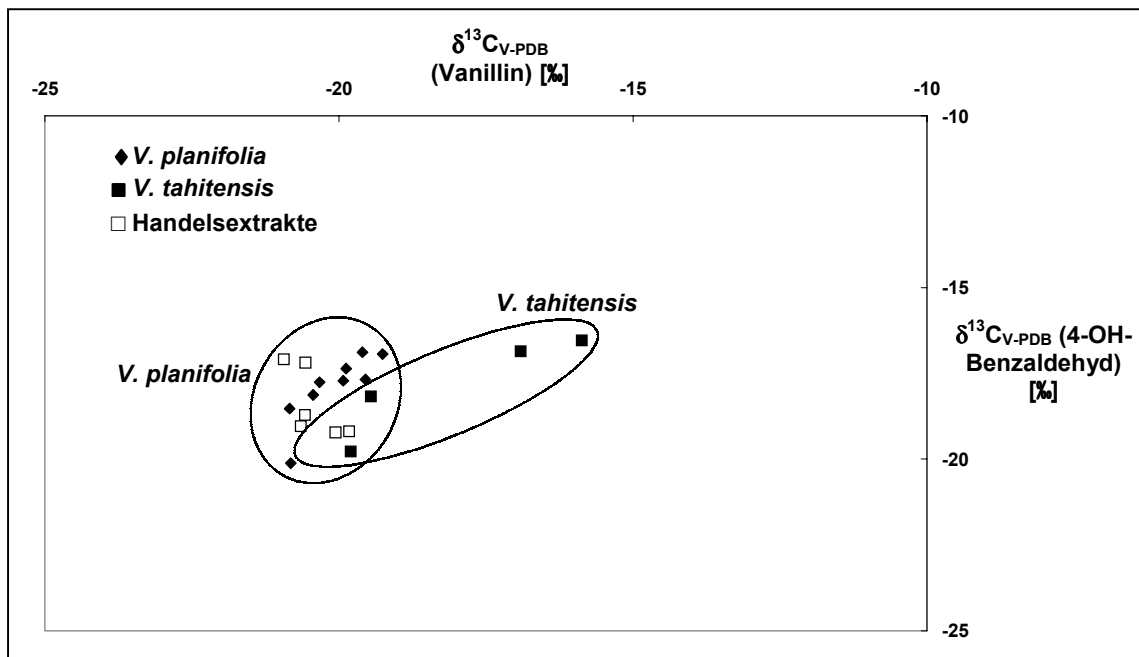


Abb. 30: Korrelation der  $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte von Vanillin und 4-Hydroxybenzaldehyd für authentische Proben (*V. planifolia* und *V. tahitensis*) und Handelsextrakte

Es können auf diese Weise eindeutige Authentizitätsbereiche für authentische Vanille festgelegt werden. Eine Unterscheidung der beiden Spezies *V. planifolia* und *V. tahitensis* ist hierbei allerdings nicht möglich, da sich beide Bereiche partiell überlappen. Eine Unterscheidung dieser Art ist allerdings auch nicht erforderlich, da für eine Authentizitätsbewertung von Vanille zwischen den beiden Gattungen nicht unterschieden werden muss.

Insgesamt kann gesagt werden, dass durch die Bestimmung der  $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte von zwei Komponenten in der Vanille eine deutlich verbesserte Authentizitätsbewertung möglich ist, als anhand des alleinigen Vanillin-Isotopenwerts, der leichter manipuliert werden kann (vgl. Kap. 4.3.1).

#### 4.3.3.2 Einfluss der Extraktionsbedingungen auf die $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Isotopenwerte

Die Überprüfung der Extraktionsbedingungen ist eine wichtige Voraussetzung für die richtige Bestimmung von Isotopenwerten. Um den Einfluss der Extraktionsbedingungen auf die Isotopenwerte zu untersuchen, wurde zum einen überprüft, welchen Einfluss die verwendeten Extraktionslösungsmittel (Ethanol / Wasser bzw. Diethylether) haben, zum anderen, inwieweit die Extraktionseffizienz die Isotopenwerte beeinflusst.

Abb. 31 zeigt die Differenzen der  $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte von Vanillin zwischen Ethanol / Wasser- und Diethylether-Extrakten:



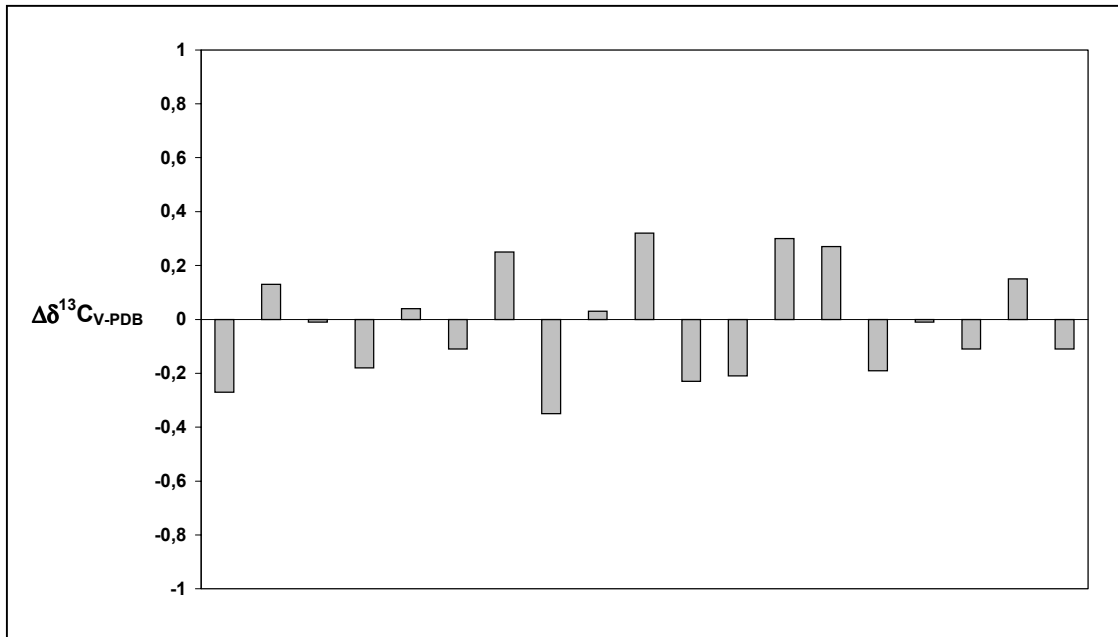


Abb. 31: Differenz der  $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte von Vanillin aus Diethylether- und Ethanol / Wasser-Extrakten

Die Abweichungen liegen für alle Proben im Bereich der messbedingten Standardabweichung. Man erhält dementsprechend für beide Extraktionslösungsmittel die gleichen Isotopenwerte.

Zur Prüfung der Notwendigkeit einer quantitativen Extraktion für die Ermittlung korrekter  $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte für Vanillin, wurde eine Extraktion von Vanilleschoten mit Diethylether durchgeführt. Nach verschiedenen Extraktionszeiten wurden Proben entnommen und der Vanillingehalt und der  $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Wert bestimmt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tab. 10 dargestellt:

Tab. 10: Abhängigkeit des  $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werts von Vanillin von der Extraktionseffizienz

Extraktionszeit [h]	$\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ (Vanillin) [%]	Vanillingehalt [g/100g]
1	-20,2 ( $\pm 0,2$ )	0,5
3	-19,9 ( $\pm 0,2$ )	0,6
5	-20,1 ( $\pm 0,2$ )	0,8
168	-19,9 ( $\pm 0,2$ )	2,0

Aus den Resultaten ist klar ersichtlich, dass die Menge an extrahiertem Vanillin ohne Einfluss auf den Isotopenwert ist.

## 5 Analytik von Minorkomponenten

Neben den in den vorangegangenen Kapiteln behandelten Hauptinhaltsstoffen, tragen zum charakteristischen Vanillearoma auch eine große Zahl von Minorkomponenten bei. Zur Untersuchung dieser flüchtigen Komponenten wird häufig eine Headspace-Analytik [8,52,53], oder eine Analytik nach direkter Thermodesorption der Vanilleschoten durchgeführt [7,54]. Zur Identifizierung der Substanzen werden dabei oftmals nur Retentionsindices bestimmt oder Vergleiche mit Bibliotheks-Massenspektren herangezogen. Dies resultiert zwar meist in einer Auflistung von sehr vielen Substanzen, so führen Adeji et al. beispielsweise für *V. tahitensis* 67 und für Bourbon-Vanille 83 Substanzen auf [7], doch durch eine solche Identifizierung kann es auch zu fehlerhaften Zuordnungen von Substanzen kommen, da eine klare Identifizierung anhand der entsprechenden Standardsubstanzen nicht erfolgt. Da manche Substanzen aber als Kriterium für eine Verfälschung herangezogen werden, kann es so leicht zu fehlerhaften Bewertungen von Vanilleschoten bzw. -extrakten kommen. Als Beispiel hierfür sei Piperonal genannt: Während einige Autoren Piperonal als wichtige Schlüsselkomponente für Vanille beschreiben [8,53], werten andere es als synthetisches Additiv und damit als Kriterium für eine mögliche Verfälschung [18,55].

Es erschien daher sinnvoll, im Rahmen dieser Arbeit auch Untersuchungen zu einigen ausgewählten Minorkomponenten der Vanille durchzuführen. Hierbei sollte zum einen eine enantioselektive Untersuchung von chiralen Inhaltsstoffen durchgeführt werden, zum anderen sollten einige besonders geruchsaktive Substanzen einer genaueren Betrachtung unterzogen werden.

## 5.1 Enantioselektive Analyse von Minorkomponenten

### 5.1.1 Enantioselektive Analyse mittels multidimensionaler Gaschromatographie (MDGC)

Die Trennung von Enantiomeren ist seit geraumer Zeit ein bedeutendes analytisches Verfahren in der Analytik von Duft- und Aromastoffen [56]. Durch die Einführung modifizierter Cyclodextrinderivate zur Herstellung chiraler Trennphasen für die Kapillar-Gaschromatographie konnten auf dem Gebiet der Trennung von Enantiomeren erhebliche Fortschritte erzielt werden [57]. Insbesondere die *tert*-butyldimethylsilyl-substituierten Cyclodextrine erweisen sich als sehr effiziente Trennphasen in der Kapillar-Gaschromatographie [58]. Eine besonders geeignete Methode der Enantiomertrennung aus komplexen Matrices stellt die multidimensionale Gaschromatographie (MDGC) dar:

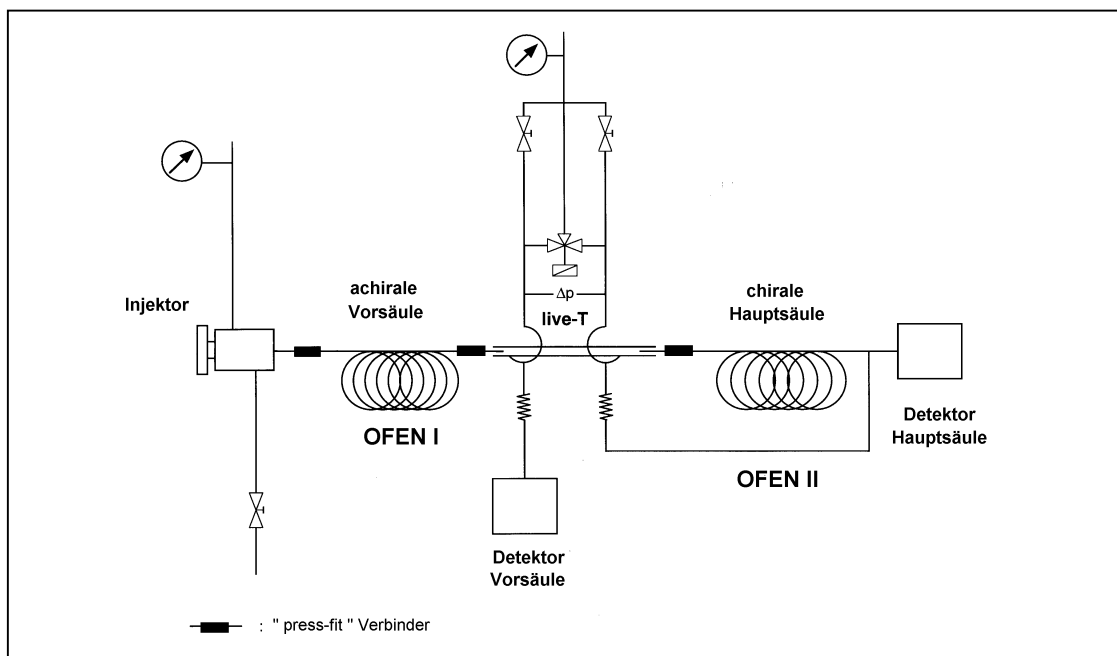


Abb. 32: schematische Darstellung eines multidimensionalen Gaschromatographen

Bei der MDGC werden zwei Trennsäulen in getrennten Öfen miteinander gekoppelt. Als Säulenschaltung dient dabei ein sog. „Live-T“-Stück. Die achirale Vorsäule dient zur Vortrennung und Aufreinigung der untersuchten Probe. Die interessierenden Substanzen werden durch einen sogenannten „Cut“ auf die zweite, in diesem Fall chirale Trennsäule transferiert. Dort findet die Trennung der Enantiomere statt. Durch die Verwendung eines massenselektiven Hauptsäulendetektors kann die Empfindlichkeit und Selektivität der Methode noch weiter gesteigert werden. In diesem Fall können Substanzen nicht nur

anhand ihrer Retentionszeiten auf Vor- und Hauptsäule identifiziert werden, sondern zusätzlich noch anhand ihres Massenspektrums.

### 5.1.2 Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE)

Die Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE) ist eine vor kurzem eingeführte, sehr einfache, lösungsmittelfreie Extraktionsmethode. Die Extraktion erfolgt direkt aus wässriger Lösung mit einem Rührkern, der mit einer als Sorbens dienenden Polydimethylsiloxan-Phase (PDMS) beschichtet ist [59]. Nach erfolgter Extraktion werden die extrahierten Substanzen in einem Thermo-desorptionsaufsatz vom Rührkern, dem sogenannte Twister<sup>®</sup>, desorbiert und nach Kryofokussierung direkt auf ein GC-System aufgegeben. Die SBSE stellt also eine sehr einfache Extraktionsmöglichkeit dar, die mit einer minimalen Probenbelastung verbunden ist. Vergleicht man die SBSE mit der Solid Phase Microextraction (SPME), bietet sie die gleiche Einfachheit, wobei aber die Extraktionseffizienz bei der SBSE durch die wesentlich größere Menge an Sorbens (SPME: maximal 0,5 µl, SBSE: 55 – 219 µl Sorbens) deutlich erhöht ist. Dadurch kann eine bis zu 500fache Steigerung der Empfindlichkeit im Vergleich zur SPME erzielt werden [59].

Die SBSE kann aber nicht nur auf wässrige Matrices angewendet werden. Auch eine Headspace-SBSE ist mit hervorragender Empfindlichkeit möglich [60,61].

Die SBSE stellt daher eine optimal geeignete Methode dar, um Minorkomponenten aus komplexen Matrices zu analysieren.

### 5.1.3 Stand der Forschung und Zielsetzung

Als bisher einzige Verbindungen in der Vanille, zu der enantioselektive Betrachtungen angestellt wurden, sind die Vitispirane, geruchsaktive Spiroether, bekannt. Von den vier Stereoisomeren kommen nach Schulte-Elte et al. nur zwei Diastereomere in der Vanille vor, die sich in ihrem Geruchseindruck stark voneinander unterscheiden [62]. Erste Untersuchungen zur absoluten Konfiguration der Vitispirane zeigten, dass die 2S-Isomere in der Vanille dominieren [63].

Zu anderen Komponenten der Vanille ist keine enantioselektive Untersuchung bekannt. Aus diesem Grund wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Vanilleinhaltsstoffe enantioselektiv analysiert. Zum einen wurde das  $\gamma$ -Nonalacton betrachtet, zum anderen verschiedene Monoterpene.

### 5.1.4 Enantioselektive Analyse von $\gamma$ -Nonalacton

Während geradzahlige Lactone in vielen Pflanzen wichtige Aromakomponenten darstellen, sind ungeradzahlige Lactone verhältnismäßig selten beschrieben.  $\gamma$ -Nonalacton wurde aber auch schon in verschiedenen Pflanzen nachgewiesen [64-67]. Die dort bestimmten Verhältnisse von R-Enantiomer zu S-Enantiomer liegen in einem Bereich von 60:40 [64,65] bis 40:60 [66,67].

#### 5.1.4.1 Methodik

Zur Untersuchung von  $\gamma$ -Nonalacton in Vanille werden zwei unterschiedliche Verfahren zur Extraktion herangezogen: Zum einen wird eine Extraktion mittels Mikro-SDE (Simultane Destillation Extraktion) durchgeführt, zum anderen eine Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE). Die Analytik erfolgt mittels MDGC-MS, was eine sichere Identifizierung erlaubt. Die Zuordnung der Enantiomere erfolgt anhand von enantiomerenreinen Standardverbindungen.

#### 5.1.4.2 Ergebnisse und Diskussion

$\gamma$ -Nonalacton konnte im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal in Vanille nachgewiesen werden. Beide angewendeten Extraktionsverfahren ermöglichten eine enantioselektive Analytik von  $\gamma$ -Nonalacton. Die Aufarbeitung mittels Mikro-SDE hat zwar den Vorteil, durch Zusatz eines internen Standards (hier: Valeriansäurepentylester), dass auch Aussagen über den ungefähren Gehalt an  $\gamma$ -Nonalacton möglich sind, andererseits hat diese Methode aber den Nachteil, dass eine große Probenmenge erforderlich (ca. 30 – 40 g Schoten pro Aufarbeitung) ist, und dass bei einer Extraktionszeit von zwei Stunden ein hoher Zeitaufwand notwendig ist. Die Extraktion mit SBSE ist dagegen eine denkbar simple Aufarbeitungsmethode und ermöglicht eine Analytik bereits bei Verwendung nur einer Vanilleschote. Quantitative Betrachtungen sind allerdings in diesem Fall nicht möglich. Für die SBSE wurden verschiedene Extraktionsmatrices getestet, um höchste Empfindlichkeit zu erzielen. Beim Vergleich der Extraktion aus einer wässrigen Aufschlammung einer zerkleinerten Vanilleschote, aus einem Ethanol / Wasser-Extrakt und aus einem Diethylether-Extrakt, erwies sich die Extraktion aus einer wässrigen Aufschlammung als effektivste Variante. Diese Extraktion wurde daher neben der Aufarbeitung mit Mikro-SDE als zweite Möglichkeit der Aufarbeitung ausgewählt. Abb. 33 zeigt beispielhaft ein Hauptsäulenchromatogramm einer Vanilleprobe nach Extraktion mit Mikro-SDE.

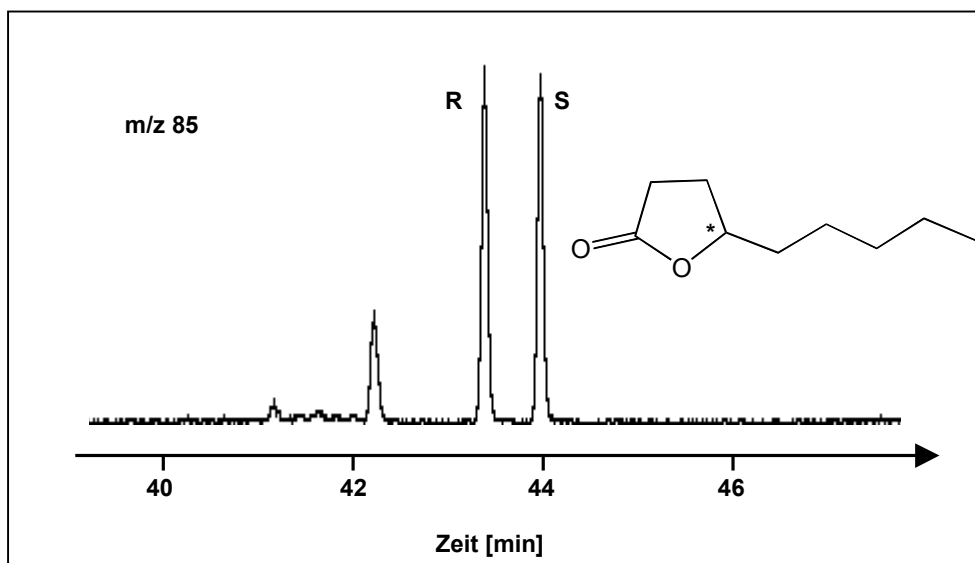


Abb. 33: Hauptsäulenchromatogramm von  $\gamma$ -Nonalacton aus Vanille auf der Massenspur  $m/z$  85 nach Extraktion mit mSDE

Die bei der Untersuchung von Schoten der Gattungen *V. planifolia* und *V. tahitensis* ermittelten Enantiomerenverhältnisse sind in Tab. 11 dargestellt:

Tab. 11: Enantiomerenverhältnisse von  $\gamma$ -Nonalacton in Vanille

(R)- $\gamma$ -Nonalacton	(S)- $\gamma$ -Nonalacton
45 – 63 %	37 – 55 %

$\gamma$ -Nonalacton liegt also in der Vanille – wie auch in der Literatur für andere Pflanzen beschrieben – nur mit geringen Enantiomerenüberschüssen vor. Die ermittelten Enantiomerenverteilungen sind dabei bei beiden Extraktionsverfahren vergleichbar. Der Gehalt an  $\gamma$ -Nonalacton, der aus Mikro-SDE-Extrakten bestimmt wurde, liegt im Bereich von ca. 100 ppb.

### 5.1.5 Enantioselektive Analyse von Monoterpenen

Monoterpene leisten in vielen Pflanzen einen wichtigen Beitrag zum Aroma. Auch in Vanille wurden bereits Monoterpene nachgewiesen [8]. Eine enantioselektive Analyse dieser Verbindungen ist allerdings nicht bekannt. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Komponenten nur in sehr geringen Mengen vorhanden sind, was eine weiterführende Analytik erschwert. Durch die neue Methode der hochempfindlichen SBSE war es im Rahmen

dieser Arbeit möglich, eine solche Analyse durchzuführen. Es wurden sechs verschiedene Monoterpene bezüglich ihres Enantiomerenverhältnisses in Vanille untersucht. Abb. 34 zeigt die in der Vanille untersuchten Verbindungen:

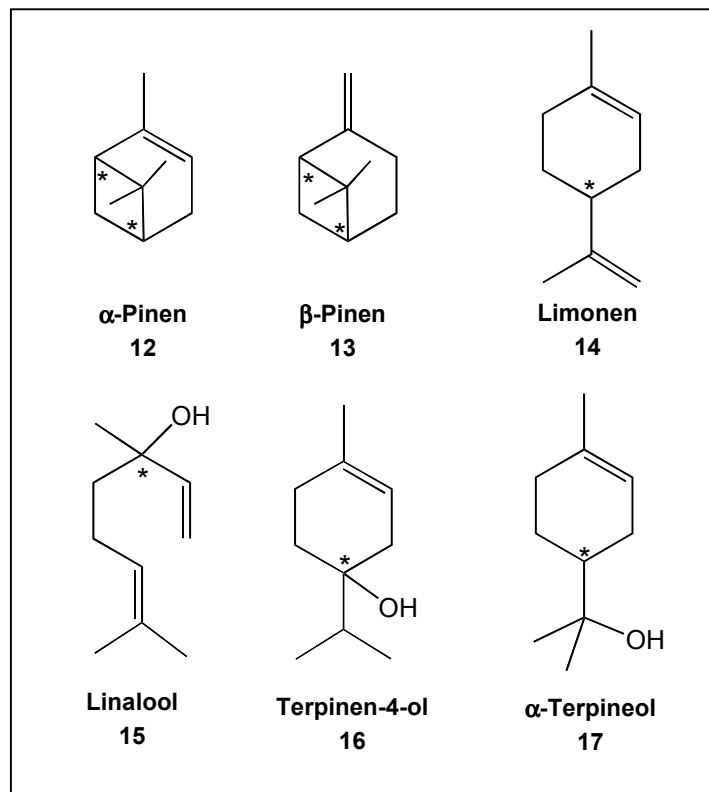


Abb. 34: Enantioselektiv analysierte Monoterpene in Vanille

#### 5.1.5.1 Methodik

Da Monoterpene sich für eine Headspace-Analytik gut eignen, und die SBSE, wie in Kapitel 5.1.2 bereits erwähnt, auch hier eine hervorragende Empfindlichkeit aufweist, stellt die Headspace-SBSE ein optimales Verfahren für die gestellte Aufgabe dar. Die enantioselektive Analytik erfolgt an einem MDGC-System mit massenselektiver Detektion. Die Identifizierung erfolgt anhand der Retentionszeit und des Massenspektrums. Die Zuordnung der Retentionsreihenfolge erfolgt durch Retentionszeitenvergleich mit enantiomerenreinen Standardverbindungen.

Diese Methodik stellt eine geeignete Kombination dar, um eine enantioselektive Analytik für Minorkomponenten zu etablieren.

### 5.1.5.2 Ergebnisse und Diskussion

Alle sechs untersuchten Monoterpene ließen sich in einem chromatographischen Lauf gleichzeitig bestimmen. Abb. 35 zeigt das Hauptsäulenchromatogramm einer Standardmischung:

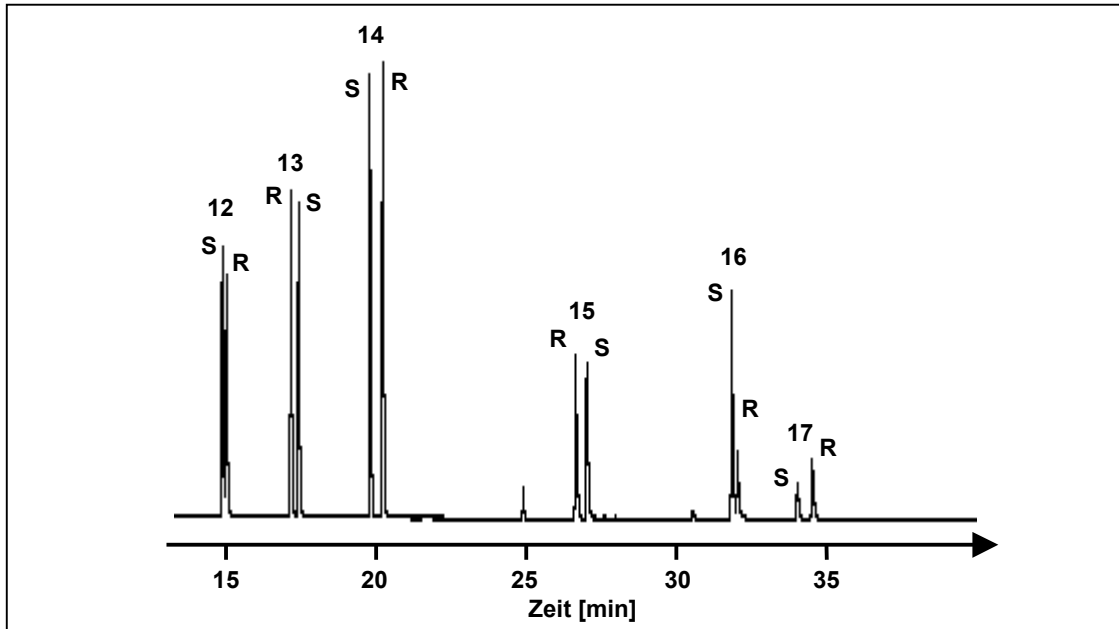


Abb. 35: enantio-MDGC chiraler Monoterpene:  
Hauptsäulenchromatogramm einer Standardmischung

In Abb. 36 ist ein entsprechendes Hauptsäulenchromatogramm einer Vanilleprobe dargestellt:

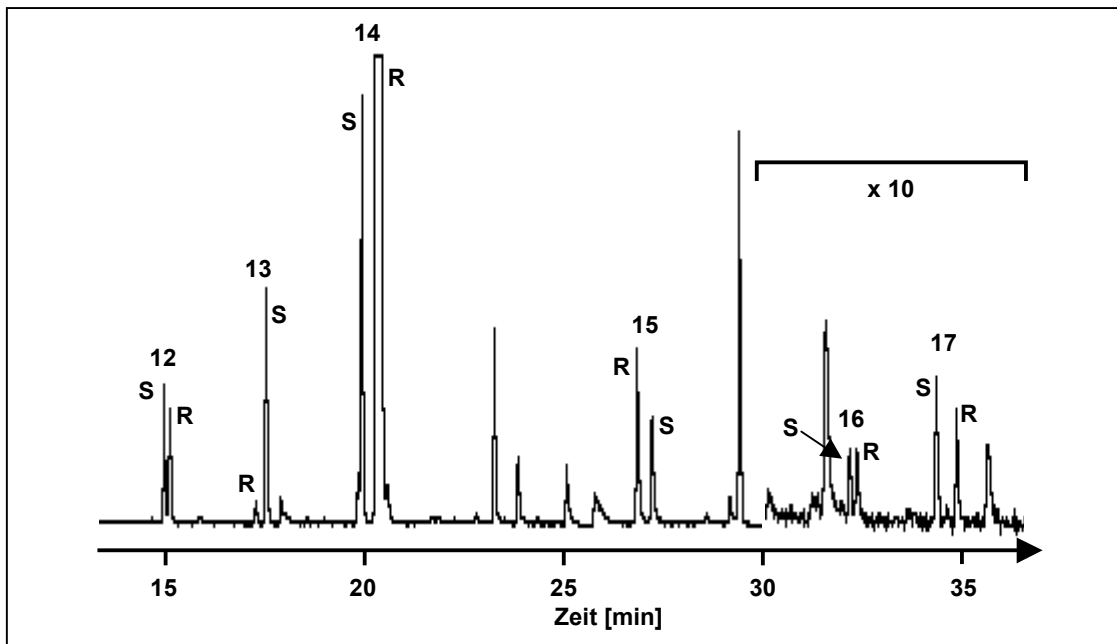


Abb. 36: enantio-MDGC chiraler Monoterpene aus Vanille: Hauptsäulenchromatogramm



Es wurden Schoten der Gattungen *V. planifolia* und *V. tahitensis* unterschiedlicher Herkunft und Erntejahrgänge untersucht. Während  $\alpha$ -Pinen,  $\beta$ -Pinen und Limonen in allen untersuchten Schoten vorkamen, konnten Linalool, Terpinen-4-ol und  $\alpha$ -Terpineol nicht in allen Schoten nachgewiesen werden. Die Spannbreiten der ermittelten Enantiomerenverhältnisse sind in Tab. 12 dargestellt:

Tab. 12: Spannbreiten der Enantiomerenverhältnisse der untersuchten Monoterpene in Vanille

Verbindung	Enantiomerenverhältnis	
$\alpha$ -Pinen	<b>R:</b> 31 – 83%	<b>S:</b> 17 – 69%
$\beta$ -Pinen	<b>R:</b> 7 – 14%	<b>S:</b> 86 – 93%
Limonen	<b>R:</b> > 95%	<b>S:</b> < 5%
Linalool	<b>R:</b> 59 – 80%	<b>S:</b> 20 – 41%
Terpinen-4-ol	<b>R:</b> 34 – 52%	<b>S:</b> 48 – 66%
$\alpha$ -Terpineol	<b>R:</b> 41 – 53%	<b>S:</b> 47 – 59%

Die Enantiomerenverhältnisse von  $\beta$ -Pinen und Limonen weisen bei relativ großer Enantiomerenreinheit sehr konstante Verhältnisse auf. Während bei Limonen das R-Enantiomer mit durchweg über 95% deutlich überwiegt, liegt der Überschuss bei  $\beta$ -Pinen mit immerhin mehr als 85% auf der Seite des S-Enantiomeren. Die Enantiomerenverhältnisse von  $\alpha$ -Pinen und Linalool sind dagegen starken Schwankungen unterworfen. Terpinen-4-ol konnte nur in zwei der 15 untersuchten Vanilleschoten nachgewiesen werden. In diesen Proben war – wie auch bei  $\alpha$ -Pinen und Linalool – keine hohe Enantiomerenreinheit festzustellen. Für die Enantiomere von  $\alpha$ -Terpineol wird eine nahezu 1:1-Verteilung gefunden.

Zur Überprüfung eines möglichen Einflusses der Schotenherkunft auf die Enantiomerenverhältnisse, zeigt Tab. 13 beispielhaft einen Vergleich der Enantiomerenverhältnisse für  $\alpha$ -Pinen aus Schoten der Jahrgänge 1998, 1999 und 2000 aus Madagaskar:

Tab. 13: Enantiomerenverhältnisse von  $\alpha$ -Pinen für Schoten aus Madagaskar verschiedener Erntejahrgänge

Ernte 1998		Ernte 1999		Ernte 2000	
<b>R:</b> 31%	<b>S:</b> 69%	<b>R:</b> 69%	<b>S:</b> 31%	<b>R:</b> 75%	<b>S:</b> 25%

Daraus wird ersichtlich, dass die Schwankungen im Enantiomerenverhältnis nicht durch unterschiedliche Schotenherkunft erklärt werden können. Auch die Schoten aus einem Herkunftsland sind großen Schwankungen unterworfen.

Zusammenfassend ist zu diesen Untersuchungen zu sagen, dass durch die Verwendung von Headspace-SBSE eine enorme Empfindlichkeit erzielt werden kann. Dadurch ist es auch für Minorkomponenten möglich, weitergehende Untersuchungen, in diesem Fall eine enantioselektive Analyse, durchzuführen.

## 5.2 Bestimmung von Guajacol

### 5.2.1 Allgemeines

Guajacol wurde bereits mehrfach als Minorkomponente in Vanille beschrieben [8,52,54]. Die sehr geruchsaktive Substanz besitzt einen rauchigen, brenzligen Ton und in Wasser einen Geruchsschwellenwert von nur 3 µg/kg [35]. Durch nichtoxidative Decarboxylierung kann Guajacol aus Vanillinsäure gebildet werden [68.69]:

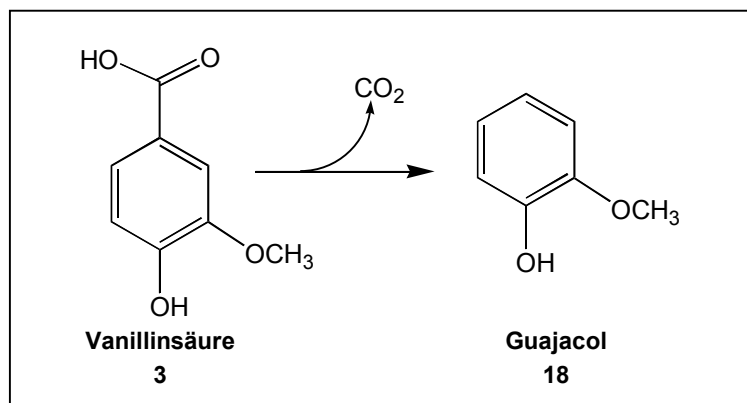


Abb. 37: Decarboxylierung von Vanillinsäure zu Guajacol

Im Hinblick auf eine mögliche Verwendung von Guajacol als Qualitätsparameter für Vanille, sollte zunächst auf das Vorhandensein von Guajacol getestet werden. Danach sollte versucht werden, quantitative Aussagen über den Gehalt an Guajacol in unterschiedlichen Schoten zu treffen, um hierbei mögliche Abhängigkeiten von Gattung und Herkunft der Schoten festzustellen.

### 5.2.2 Methodik

Zur Prüfung auf Guajacol in Vanille wurde erneut die Headspace-SBSE herangezogen. Die Analytik erfolgt mittels MDGC-MS, wobei eine Identifizierung durch Vergleich der Retentionszeit und des Massenspektrums mit einem Standard erfolgte. Abb. 38 zeigt ein entsprechendes Hauptsäulenchromatogramm mit Massenspektrum:

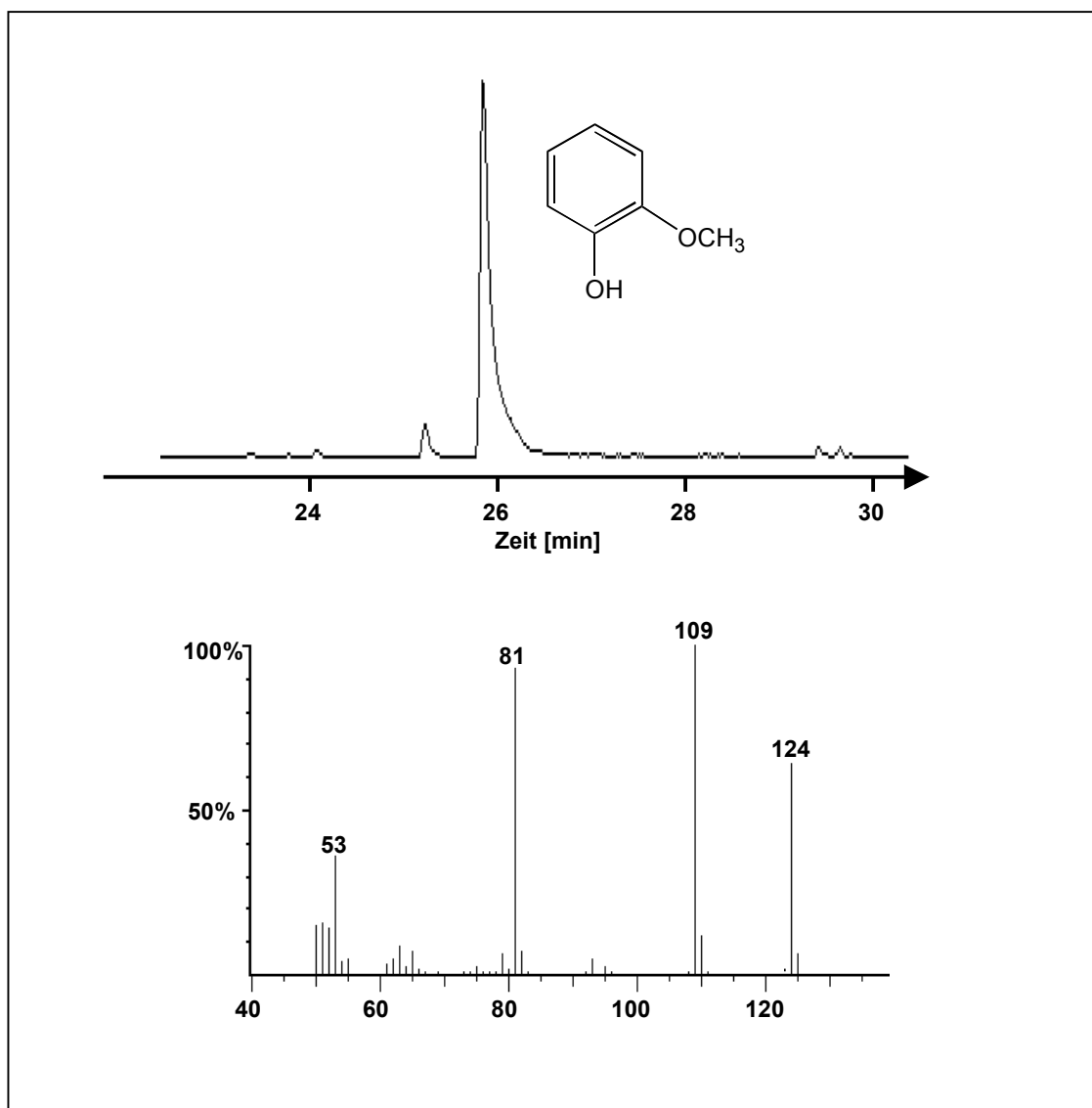


Abb. 38: Hauptsäulenchromatogramm und Massenspektrum von Guajacol

Guajacol ist im Headspace von Vanilleschoten klar nachweisbar. Um quantitative Aussagen treffen zu können, kann allerdings die Methode der

Headspace-SBSE nicht herangezogen werden. Daher wurden für quantitative Untersuchungen die Diethylether-Extrakte mit eindimensionaler Gaschromatographie mit FID-Detektion analysiert. Zur Gehaltsbestimmung konnte dabei das den Extrakten als interner Standard zugesetzte Veratrumaldehyd (**IST 2**) herangezogen werden. In Abb. 39 ist ein entsprechendes Chromatogramm beispielhaft dargestellt:

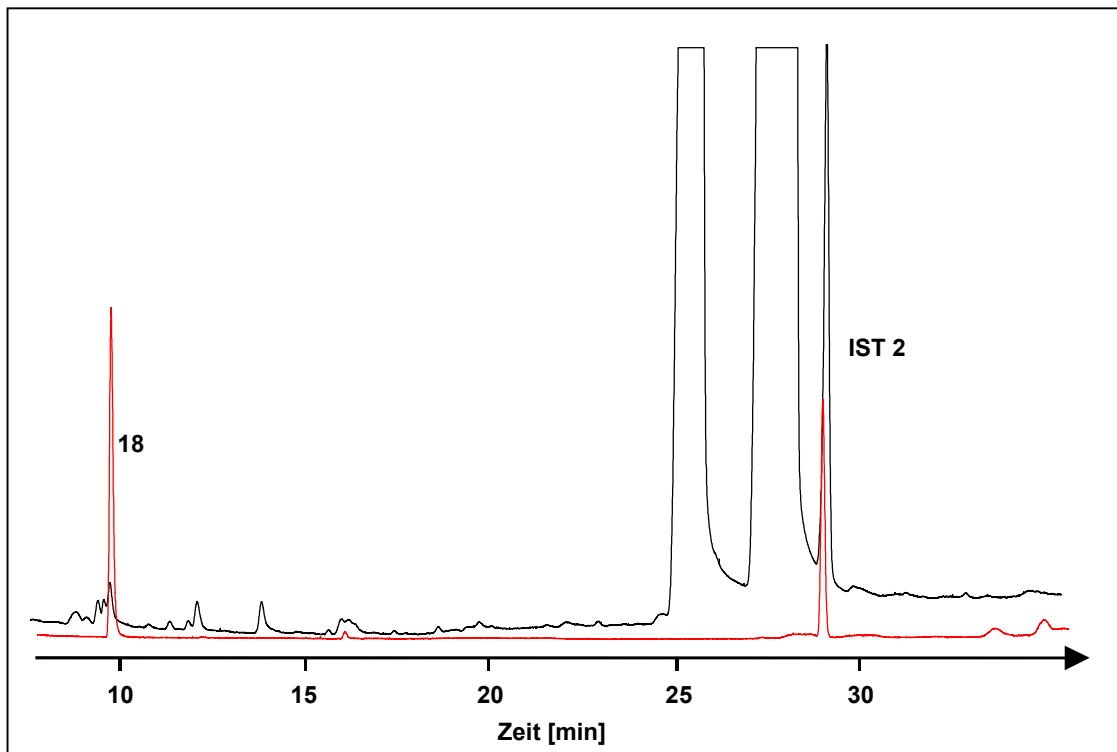


Abb. 39: Chromatogramm eines Diethylether-Extrakts (schwarz) und eines entsprechenden Standards (rot); 18: Guajacol; IST 2: Veratrumaldehyd

Wie aus Abb. 39 deutlich wird, ist die Konzentration von Guajacol in den Diethylether-Extrakten extrem niedrig. Eine zuverlässige Quantifizierung ist daher trotz Verwendung eines internen Standards nicht möglich. Um dennoch zumindest eine Abschätzung der vorhandenen Menge treffen zu können, wurden den Extrakten unterschiedliche Mengen an Guajacol zugesetzt, und nach linearer Regression durch Extrapolation der eigentlich vorhandene Guajacol-Gehalt im Diethylether-Extrakt bestimmt. Hierfür wurden Schoten der Gattungen *V. planifolia* und *V. tahitensis* untersucht.

### 5.2.3 Ergebnisse und Diskussion

Tab. 14 zeigt die ermittelten Gehalte an Guajacol für *V. planifolia* und *V. tahitensis*:

Tab. 14: ermittelte Guajacol-Gehalte für *V. planifolia* und *V. tahitensis*

Schoten	Guajacol-Gehalt [ppm] (semiquantitative Werte)
<i>V. planifolia</i>	20 – 90
<i>V. tahitensis</i>	6

Die Gehalte an Guajacol liegen in Schoten der Gattung *V. planifolia* in einem weit gestreuten Bereich, aber durchweg höher als in denen von *V. tahitensis*. Dies ist insofern überraschend, als dass die Schoten von *V. tahitensis* einen deutlich rauchigeren, phenolischeren Ton aufweisen, der an Guajacol erinnert.

Für die untersuchten Schoten konnte kein Zusammenhang zwischen Guajacol-Gehalt und Schotenherkunft festgestellt werden (vgl. hierzu Einzelwerte in Kapitel 6.5.5.2.2). Als Markerverbindung für die Qualität bzw. die Herkunft der Schoten scheint Guajacol daher nicht geeignet zu sein.

## 5.3 Identifizierung geruchsaktiver Minorkomponenten

### 5.3.1 Gaschromatographie-Olfaktometrie

Vanille enthält – wie eine Vielzahl anderer Produkte auch – eine große Zahl an flüchtigen Komponenten. Da aber nur ein Teil davon Relevanz für das Aroma hat, ist es von Interesse, zwischen stark geruchsaktiven Substanzen und geruchsarmen bzw. geruchlosen Substanzen zu unterscheiden. In der Praxis wird hierfür die Gaschromatographie-Olfaktometrie (GCO) verwendet [70,71]. Dabei werden durch Verriechen („Sniffing“) des GC-Eluats parallel zur FID-Detektion die geruchsaktiven Substanzen in einem Chromatogramm lokalisiert. Einen entsprechenden apparativen Aufbau zeigt Abb. 40 schematisch.

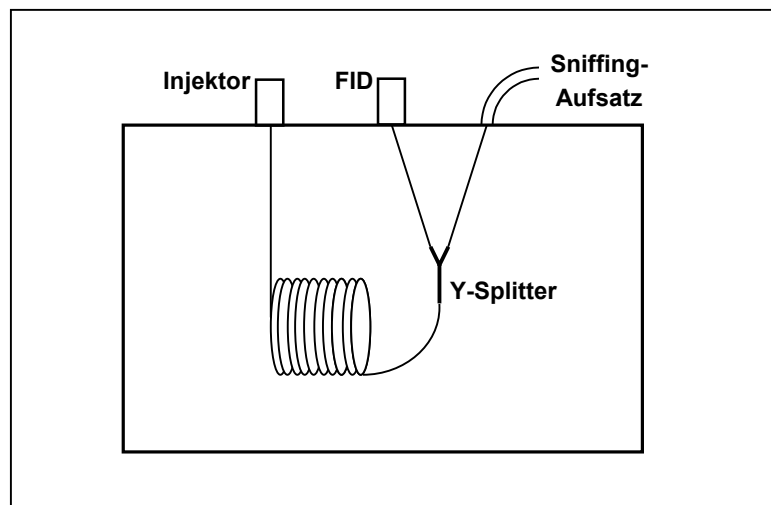


Abb. 40: schematischer Aufbau einer GC-Sniff-Apparatur

Sind die relevanten Peaks erkannt, können diese durch eine weiterführende Analytik – beispielsweise durch massenselektive Detektion – identifiziert werden.

### 5.3.2 Methodik

Zur Identifizierung geruchsaktiver Substanzen in Vanille wurde zunächst eine dynamische Headspace-Extraktion von Schoten der Gattung *V. tahitensis* durchgeführt. Da ein solcher Extrakt verhältnismäßig komplex ist, wurde eine Vorfraktionierung mittels HPLC durchgeführt. Hierbei wurden willkürlich Fraktionen von jeweils fünf Minuten gesammelt. Danach wurden die einzelnen Fraktionen verrochen. Die geruchsaktivste Fraktion wurde zur weiteren Analyse herangezogen. Ein entsprechendes HPLC-Chromatogramm ist in Abb. 41 dargestellt.

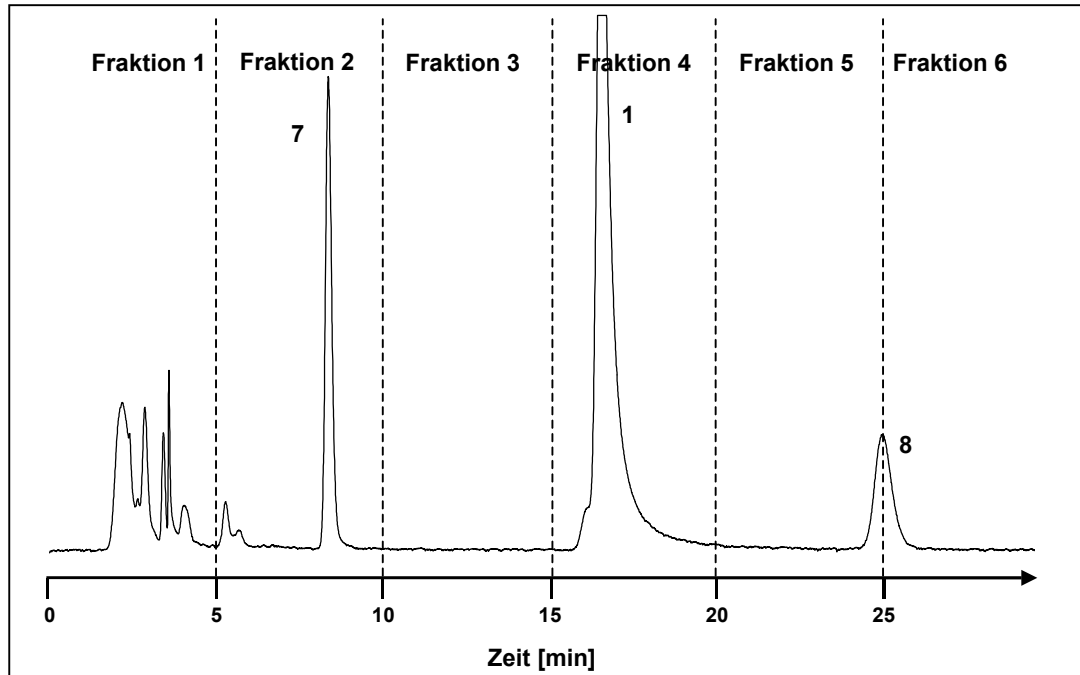


Abb. 41: HPLC-Fraktionierung des dynamischen Headspace-Extrakts von *V. tahitensis*  
1: Vanillin; 7: Anisaldehyd; 8: Anisalkohol

Durch GCO wurden dann innerhalb der ausgewählten Fraktion stark geruchsaktive Peaks ermittelt. Um eine Identifizierung der Substanzen vornehmen zu können, wurde die Fraktion an einem vergleichbaren GC-System mit massenselektiver Detektion analysiert. Anhand der erhaltenen Massenspektren wurde dann eine Identifizierung der Substanzen durch Vergleich mit Standardsubstanzen durchgeführt.

### 5.3.3 Ergebnisse und Diskussion

Der Geruchseindruck der einzelnen HPLC-Fractionen des Headspace-Extrakts unterscheidet sich deutlich. Während die Fraktionen 1, 3, und 5 nur einen schwachen Geruch aufweisen, zeigen die übrigen Fraktionen deutlich stärkere Geruchsaktivität: In Fraktion 4 wird der Geruch klar durch das vorhandene Vanillin (**1**) dominiert, Fraktion 6 hingegen weist den für Anisalkohol (**8**) typischen rauchigen, unangenehmen Geruch auf. Fraktion 2 vermittelt einen sehr starken, rauchigen, leicht brenzligen Geruchseindruck, der nicht allein auf das in dieser Fraktion als Hauptkomponente vorkommende Anisaldehyd zurückzuführen ist. Aus diesem Grund wurde für die weiteren Untersuchungen Fraktion 2 ausgewählt.

Bei der GCO-Analyse dieser Fraktion konnte an verschiedenen Stellen des Chromatogramms starke Geruchsaktivität festgestellt werden. Abb. 42 zeigt ein entsprechendes Chromatogramm:

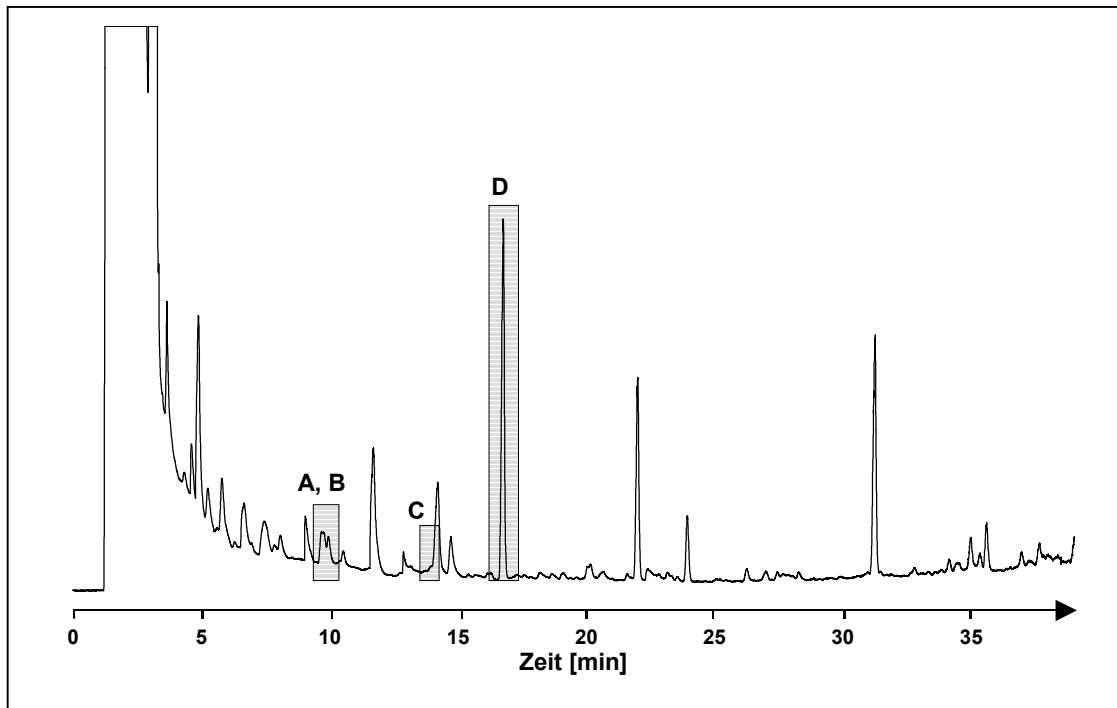


Abb. 42: Chromatogramm von Fraktion 2 (vgl. Abb. 41) zur Ermittlung geruchsaktiver Substanzen mit GCO; grau unterlegt: starke Geruchsaktivität

Durch Analyse der Fraktion an einem analogen chromatographischen System mit Massendetektion konnten für die entsprechenden Peaks Massenspektren ermittelt werden. Dabei konnte die Substanz **B** als das bereits untersuchte Guajacol identifiziert werden, bei Substanz **D** handelt es sich um Anisaldehyd.

Die Substanzen **A** und **C** waren bei den vorhergehenden Untersuchungen zur Vanille noch nicht in Erscheinung getreten. Anhand der Massenspektren wurde für diese Verbindungen eine mögliche Struktur hergeleitet und mit entsprechenden Standards überprüft, ob es sich um die entsprechende Substanz handelt. Abb. 43 zeigt das Massenspektrum der Verbindung **A**:



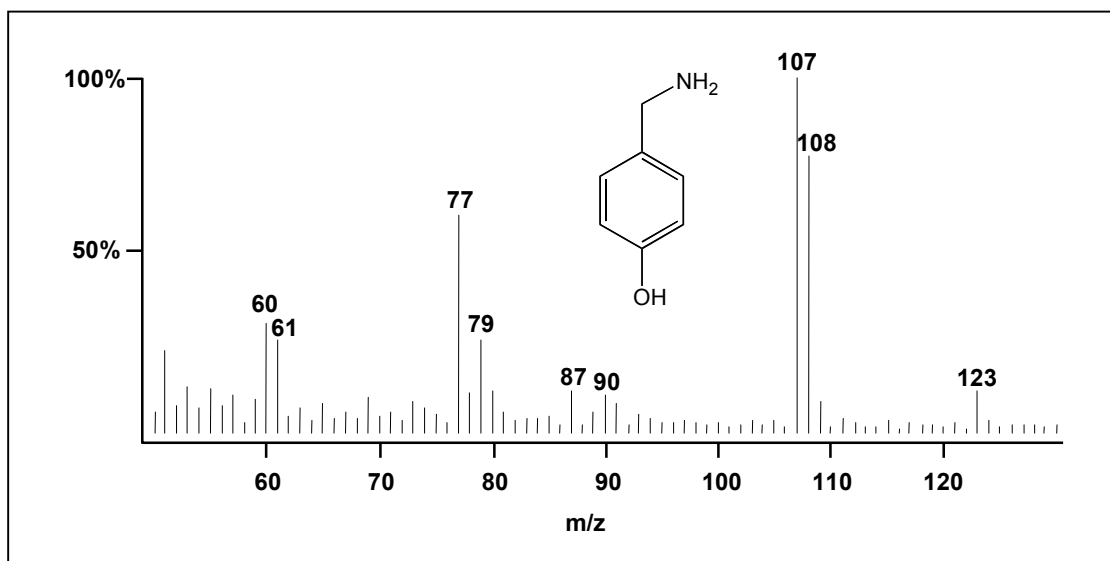


Abb. 43: Massenspektrum der geruchsaktiven Verbindung A (4-Hydroxybenzylamin)

Anhand des Massenspektrums wurde als mögliche Struktur das 4-Hydroxybenzylamin hergeleitet. Da die Substanz nicht käuflich erhältlich ist, wurde ein entsprechender Standard synthetisch durch katalytische Hydrierung von 4-Cyanophenol hergestellt (Abb. 44):

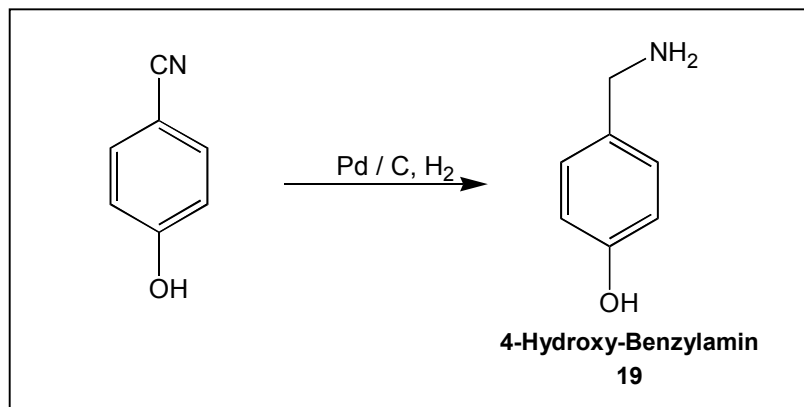


Abb. 44: Synthese von 4-Hydroxybenzylamin aus 4-Cyanophenol

Durch Vergleich von Retentionszeit und Massenspektrum konnte die geruchsaktive Substanz **A** eindeutig als 4-Hydroxybenzylamin identifiziert werden.

Der Geruch von 4-Hydroxybenzylamin ist sehr intensiv, streng, leicht modrig an nasses Laub erinnernd. In der Literatur konnten keine Angaben über 4-Hydroxybenzylamin als aromarelevante Komponente in Vanille oder anderen Pflanzen gefunden werden. Es kann also davon ausgegangen werden, dass

diese Verbindung im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal als geruchsaktive Komponente einer Pflanze nachgewiesen wurde.

Das Massenspektrum von Verbindung **C** (Abb. 45) ließ als mögliche Struktur das 2-Methoxy-4-methylphenol (Kreosol) vermuten:

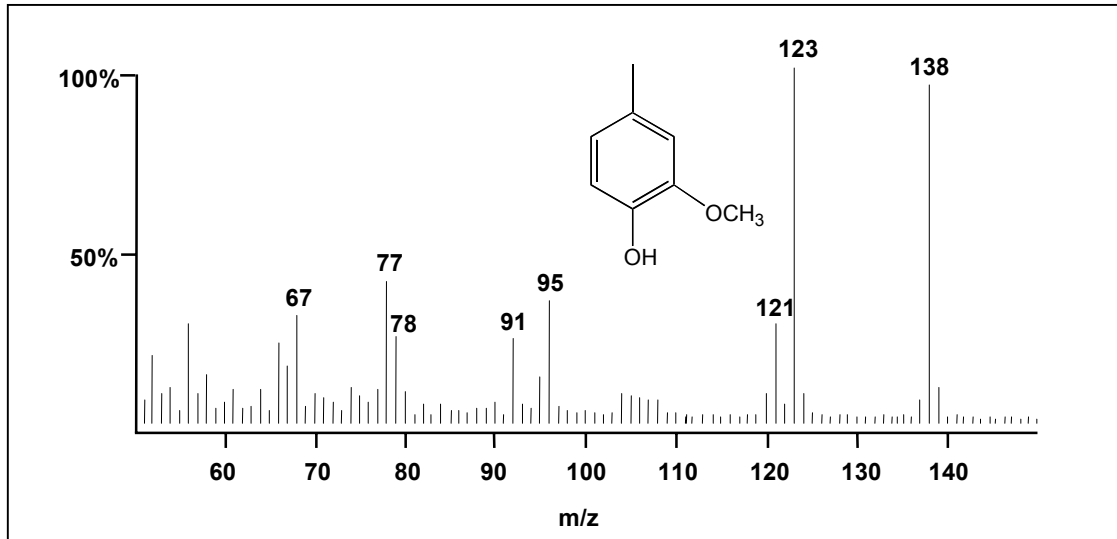


Abb. 45: Massenspektrum der geruchsaktiven Verbindung **C** (Kreosol)

Auch diese Substanz konnte anhand der Retentionszeit und des Massenspektrums eindeutig identifiziert werden.

Kreosol, das einen phenolischen, rauchigen, leicht an Vanille erinnernden Geruch aufweist, wurde bereits für *V. planifolia* als Minorkomponente beschrieben [8,52]. Zum Vorhandensein in *V. tahitensis* lagen allerdings keine Daten vor.

Durch Aufstockexperimente konnte aus den Diethylether-Extrakten eine ungefähre Abschätzung des Gehaltes an 4-Hydroxybenzylamin und Kreosol durchgeführt werden. Beide Substanzen kommen im unteren ppb-Bereich vor. Dies zeigt, dass das Aroma der Vanille zwar durch die Hauptkomponente Vanillin, das im Prozentbereich vorkommt, bestimmt wird, dass aber auch extreme Minorkomponenten einen wichtigen Beitrag zum Gesamtaroma liefern können.

Abschließend wurde für 4-Hydroxybenzylamin und Kreosol die Nachweisbarkeit mit Headspace-SBSE in Schoten von *V. planifolia* und *V. tahitensis* überprüft. Die Analytik dafür erfolgte mit MDGC-MS. Wie Abb. 46 zeigt, konnten beide Komponenten im Headspace beider Gattungen nachgewiesen werden:

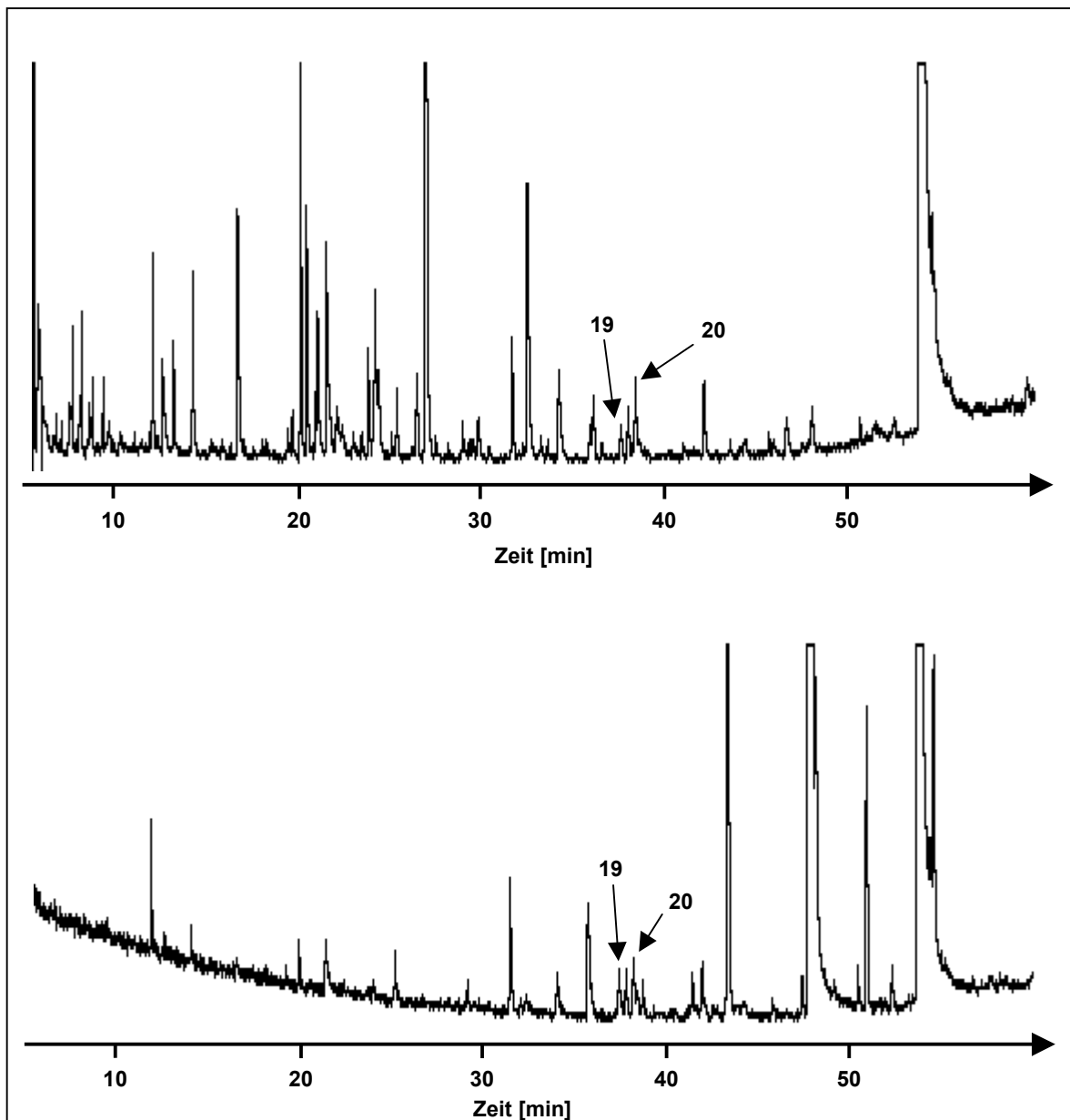


Abb. 46: Hauptsäulenchromatogramme von *V. planifolia* und *V. tahitensis* nach Headspace-SBSE; 19: 4-Hydroxybenzylamin; 20: Kreosol

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass durch die Identifizierung der beiden Verbindungen 4-Hydroxybenzylamin und Kreosol beispielhaft gezeigt werden konnte, wie eine Identifizierung geruchsaktiver Komponenten in Vanille erfolgen kann. Ob solche Verbindungen in der Qualitätsbewertung von Vanille von Bedeutung sein können, wird sich in Zukunft zeigen. Eine solche Analytik scheint aber ein wichtiger Schritt zu einer erweiterten Kenntnis über Vanille-Inhaltsstoffe zu sein.

## 6 Experimenteller Teil

### 6.1 Probenmaterial und verwendete Standardsubstanzen

#### 6.1.1 Probenmaterial

Authentische Vanilleproben wurden von verschiedenen Mitgliedern des Essenzenverbandes zur Verfügung gestellt.

Tab. 15: verwendete authentische Vanilleproben

Gattung	Herkunft	Erntejahr
<i>V. planifolia</i>	Komoren	1998
<i>V. planifolia</i>	Tonga	1998
<i>V. planifolia</i>	Indonesien	1998
<i>V. planifolia</i>	Madagaskar	1998
<i>V. planifolia</i>	Mexiko	1998
<i>V. planifolia</i>	unbekannt	1998
<i>V. planifolia</i>	Komoren	1999
<i>V. planifolia</i>	Madagaskar	1999
<i>V. planifolia</i>	Mexiko	1999
<i>V. planifolia</i>	Indonesien	1999
<i>V. planifolia</i>	unbekannt	1999
<i>V. planifolia</i>	Indonesien	2000
<i>V. planifolia</i>	Madagaskar (I)	2000
<i>V. planifolia</i>	Madagaskar (II)	2000
<i>V. planifolia</i>	Uganda	2000
<i>V. tahitensis</i>	Tahiti	1998
<i>V. tahitensis</i>	Tahiti	1999
<i>V. tahitensis</i>	Tahiti (I)	2000
<i>V. tahitensis</i>	Tahiti (II)	2000

Außerdem standen verschiedene Vanille-Extrakte zur Untersuchung zur Verfügung:

Tab. 16: untersuchte Handelsextrakte

Bezeichnung	Hersteller
ethanolischer Kaltextrakt Ernte 1998	Döhler, Darmstadt
ethanolischer Heißextrakt Ernte 1998	Döhler, Darmstadt
ethanolischer Kaltextrakt Ernte 1999	Döhler, Darmstadt
ethanolischer Heißextrakt Ernte 1999	Döhler, Darmstadt
Resinoid	Haarmann&Reimer, Holzminden
CO <sub>2</sub> -Extrakt	Flavex Naturextrakte, Rehlingen
getrockneter CO <sub>2</sub> -Extrakt	Flavex Naturextrakte, Rehlingen

### 6.1.2 Standardsubstanzen

Es wurden folgende Standardsubstanzen verwendet:

Tab. 17: verwendete Standardsubstanzen

Substanz	Hersteller
Vanillin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Vanillinalkohol	Fluka, Buchs
Vanillinsäure	Fluka, Buchs
4-Hydroxybenzaldehyd	Sigma-Aldrich, Steinheim
4-Hydroxybenzylalkohol	Fluka, Buchs
4-Hydroxybenzoesäure	Fluka, Buchs
Anisaldehyd	Fluka, Buchs
Anisalkohol	Fluka, Buchs
Anissäure	Fluka, Buchs
m-Anisaldehyd	Fluka, Buchs
$\gamma$ -Nonalacton	Roth, Karlsruhe
$\alpha$ -Pinen	Fluka, Buchs
$\beta$ -Pinen	Fluka, Buchs
Limonen	Fluka, Buchs
Linalool	Fluka, Buchs

Substanz	Hersteller
Terpinen-4-ol	Sigma-Aldrich, Steinheim
$\alpha$ -Terpineol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Guajacol	Fluka, Buchs
Kreosol	Fluka, Buchs
Ethylvanillin	Fluka, Buchs
Veratrumaldehyd	Fluka, Buchs
Valeriansäurepentylester	Fluka, Buchs

## 6.2 Experimenteller Teil zu Kapitel 2

### 6.2.1 Extraktion mit unterschiedlichen Lösungsmitteln

#### 6.2.1.1 Ethanol / Wasser-Extrakt nach AOAC

Die Extraktion erfolgt nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift gemäß AOAC [10]. Ca. 25 g zerkleinerte Vanille-Schoten werden zunächst für 12 Stunden bei 40°C mit 50 ml Wasser mazeriert. Danach werden 50 ml Ethanol (96 vol%) zugegeben und die Schoten weitere 3 Tage bei 40°C extrahiert. Nach Filtration und Nachwaschen des Rückstands mit Ethanol wird mit Ethanol auf ein Gesamtvolumen von 250 ml aufgefüllt. Um den Vanillingehalt bestimmen zu können, werden vor Beginn der Extraktion ca. 500 mg Ethylvanillin als interner Standard zugegeben.

#### 6.2.1.2 Extraktion mit anderen Lösungsmitteln

Ca. 25g zerkleinerte Vanille-Schoten werden mit 100 ml des entsprechenden Lösungsmittels (Acetonitril, *tert*-Butylmethylether, Diethylether, Ethylacetat), versetzt und für 24 Stunden bzw. 7 Tage bei Raumtemperatur extrahiert. Zur Bestimmung des Vanillingehalts werden vor Extraktionsbeginn ca. 500 mg Ethylvanillin als interner Standard zugesetzt.

### 6.2.2 HPLC-Methode

<b>Pumpe:</b>	Merck Hitachi 655A-12 mit Controller L-5000 LC
<b>Injektor:</b>	Injektionsschlaufe mit 10 µl-Volumen
<b>Trennsäule:</b>	LiChrospher 60 RP-select B; 125 x 4 mm; 5 µm Partikelgröße
<b>Fließmittel:</b>	A: Acetonitril; B: Methanol; C: 10 ml 85%ige Phosphorsäure in 1000 ml Wasser 0 Minuten: A / B / C            2 / 3 / 95 (v / v / v) 60 Minuten:    A / B / C            10 / 30 / 60 (v / v / v)
<b>Fluss:</b>	1 ml / min
<b>Detektor:</b>	Merck Hitachi Diode Array Detector L-4500A Spektrum: 190-300 nm feste Wellenlänge: 275 nm
<b>Auswertesystem:</b>	Chromatography Data Station; DAD System Manager Model D-6500

#### Aufarbeitung für die HPLC-Analytik:

##### *Ethanol / Wasser-Extrakt:*

Für die HPLC-Messungen werden ca. 8 ml des Extrakts im Stickstoffstrom möglichst weit eingeeengt, um für die HPLC störendes Ethanol zu entfernen. Nach erneutem Aufnehmen in ca. 2 ml Wasser wird membranfiltriert, und mit Wasser auf eine geeignete Konzentration verdünnt.

##### *Diethylether-Extrakt (bzw. Extrakte mit anderen Lösungsmitteln):*

Für die HPLC-Messungen werden ca. 8 ml des Extrakts im Stickstoffstrom möglichst weit eingeeengt. Nach erneutem Aufnehmen in ca. 2 ml Wasser wird membranfiltriert, und mit Wasser auf eine geeignete Konzentration verdünnt.

### 6.2.3 Zeitabhängige Untersuchung der Diethylether-Extraktion

Bei der Extraktion mit Diethylether analog 6.2.1.2 werden nach verschiedenen Zeiten (1, 3, 5, 24, 48, 72, 96, 168, 192 und 216 Stunden) Proben entnommen und der Vanillingehalt daraus bestimmt. Die mit HPLC ermittelten Gehalte sind in Tab. 18 dargestellt:

Tab. 18: Vanillingehalt in Abhängigkeit der Extraktionszeit für das Lösungsmittel Diethylether

Extraktionszeit [h]	Vanillingehalt [g/100g]
1	0,84
3	1,06
5	1,23
24	1,48
48	1,59
72	1,73
96	1,94
168	2,09
192	1,97
216	2,01

### 6.3 Experimenteller Teil zu Kapitel 3

#### 6.3.1 Schotenextraktion

Die Extraktion der Schoten mit Ethanol / Wasser und Diethylether erfolgt analog 6.2.1.1 bzw. 6.2.1.2. Zusätzlich zum internen Standard Ethylvanillin werden allerdings vor Extraktionsbeginn noch 10 mg (1 ml einer 1%igen Lösung) Veratrumaldehyd zugegeben.

#### 6.3.2 HPLC-Methode

Geräteparameter: siehe Kap. 6.2.2

Die Retentionszeiten der analysierten Substanzen sind in Tab. 19 dargestellt:

Tab. 19: Retentionszeiten der mit HPLC untersuchten Substanzen

Substanz	Retentionszeit [min]
4-Hydroxybenzylalkohol	5,6
Vanillinalkohol	9,4
4-Hydroxybenzoesäure	14,5
4-Hydroxybenzaldehyd	15,9
Vanillinsäure	19,1



Substanz	Retentionszeit [min]
Vanillin	22,1
Ethylvanillin	30,1
Veratrumaldehyd	33,2

Aufgrund des verwendeten Gradientenprogramms waren teilweise erhebliche Verschiebungen der Retentionszeit (2-3 Minuten) festzustellen. Daher wurde die Zuordnung aller Substanzen durch ihr UV-Spektrum abgesichert.

Zur Quantifizierung werden mit Standardsubstanzen Responsefaktoren bestimmt. Die Berechnung erfolgt nach folgender Formel:

$$R_f = \frac{m_{\text{Substanz}} \times \text{Peakfläche}_{\text{IST}}}{m_{\text{IST}} \times \text{Peakfläche}_{\text{Substanz}}}$$

Dabei werden zwei verschiedene interne Standards verwendet. Die Quantifizierung von Vanillin erfolgt im Bezug auf Ethylvanillin als internen Standard, die der übrigen Inhaltsstoffe im Bezug auf Veratrumaldehyd.

Tab. 20: zur Quantifizierung mit HPLC bestimmte Responsefaktoren

Substanz	Responsefaktor (Ethylvanillin)	Responsefaktor (Veratrumaldehyd)
Vanillin	0,91	1,03
Vanillinalkohol	3,94	4,45
Vanillinsäure	1,82	2,06
4-OH-Benzaldehyd	0,53	0,59
4-OH-Benzylalkohol	5,52	6,24
4-OH-Benzoessäure	1,39	1,57

Die Berechnung der Gehalte erfolgt nach folgender Gleichung:

$$\text{Gehalt}_{\text{Substanz}} = \frac{R_f \times m_{\text{IST}} \times \text{Peakfläche}_{\text{Substanz}}}{\text{Peakfläche}_{\text{IST}} \times \text{Einwaage}_{\text{Vanilleschoten}}}$$

### 6.3.3 GC-Methode

<b>Gerät:</b>	Carlo Erba Instruments; HRGC 5300 HT Mega Series
<b>Trennsäule:</b>	30 m x 0,25 mm i.D. fused silica; ZB-FFAP (Phenomenex, Aschaffenburg), 0,25 µm Filmdicke
<b>Trägergas:</b>	Wasserstoff; 2 ml/min
<b>Injektor:</b>	Split-Injektor; 280°C Splifluss: 25 ml/min
<b>Detektor:</b>	FID; 280°C
<b>Temp.-Programm:</b>	150°C / 0 min // 4°C/min // 260°C / 30 min
<b>Auswertesystem:</b>	ChromCard Version 1.19

#### Aufarbeitung für die GC-Analytik:

##### *Ethanol / Wasser- und Diethylether-Extrakt :*

Ein aliquoter Teil des Extrakts wird im Stickstoffstrom auf etwa das halbe Volumen aufkonzentriert. Nach Membranfiltration können die niedrig konzentrierten Inhaltsstoffe bestimmt werden. Zur Bestimmung von Vanillin wird entsprechend mit Wasser (für Ethanol / Wasser-Extrakte) bzw. mit Diethylether (für Diethylether-Extrakte) verdünnt.

Die Retentionszeiten der analysierten Substanzen sind in Tab. 21 zusammengestellt:

Tab. 21: Retentionszeiten der mit GC untersuchten Substanzen

Substanz	Retentionszeit [min]
Veratrumaldehyd	10,1
Ethylvanillin	12,4
Vanillin	13,2
Vanillinalkohol	17,9
4-Hydroxybenzaldehyd	20,7
4-Hydroxybenzylalkohol	21,1
Vanillinsäure	28,5
4-Hydroxybenzoesäure	37,6

Auch hier werden analog zur HPLC-Bestimmung Responsefaktoren für die quantitative Bestimmung der Inhaltsstoffe ermittelt:

Tab. 22: zur Quantifizierung mit GC bestimmte Responsefaktoren

Substanz	Responsefaktor (Ethylvanillin)	Responsefaktor (Veratrumaldehyd)
Vanillin	1,09	1,07
Vanillinalkohol	1,69	1,65
Vanillinsäure	1,66	1,62
4-OH-Benzaldehyd	1,01	0,99
4-OH-Benzylalkohol	2,27	2,22
4-OH-Benzoessäure	1,92	1,88

Die Berechnungen erfolgten analog zur HPLC-Bestimmung.

### 6.3.4 Ergebnisse der quantitativen Untersuchungen

Die Resultate der quantitativen Bestimmung der Inhaltsstoffe der Ethanol / Wasser- und der Diethylether-Extrakte von Schoten der Gattung *V. planifolia* sind nach der jeweiligen Methode aufgeschlüsselt in den folgenden Tabellen dargestellt:

Tab. 23: Inhaltsstoff-Verhältniszahlen und Vanillingehalte von Ethanol / Wasser-Extrakten von Schoten des Erntejahrs 1998, bestimmt mit HPLC

Herkunft	Komoren	Tonga	Indonesien	Madagaskar	Mexiko	unbek.
Erntejahr	1998	1998	1998	1998	1998	1998
Vanillin / 4-OH-Benzaldehyd	14	14	13	12	10	14
Vanillin / 4-OH-Benzoessäure	22	70	33	32	14	29
Vanillin / Vanillinsäure	15	13	10	13	16	14
4-OH-Benzoessäure/ 4-OH-Benzaldehyd	0,65	0,20	0,38	0,37	0,70	0,47
Vanillinsäure / 4-OH-Benzaldehyd	0,94	1,10	1,25	0,92	0,61	0,95
Vanillin [g/100g]	2,61	2,74	2,03	2,91	2,50	2,26

Tab. 24: Inhaltsstoff-Verhältniszahlen und Vanillingehalte von Ethanol / Wasser-Extrakten von Schoten des Erntejahrs 1998, bestimmt mit GC

Herkunft	Komoren	Tonga	Indonesien	Madagaskar	Mexiko	unbek.
Erntejahr	1998	1998	1998	1998	1998	1998
Vanillin / 4-OH-Benzaldehyd	19	20	24	19	19	20
Vanillin / 4-OH-Benzoessäure	62	106	92	106	45	34
Vanillin / Vanillinsäure	20	20	26	29	20	24
4-OH-Benzoessäure/ 4-OH-Benzaldehyd	0,30	0,19	0,26	0,18	0,43	0,59
Vanillinsäure / 4-OH-Benzaldehyd	0,93	1,00	0,93	0,63	0,97	0,83
Vanillin [g/100g]	2,19	2,61	2,26	2,39	2,49	2,48

Tab. 25: Inhaltsstoff-Verhältniszahlen und Vanillingehalte von Ethanol / Wasser-Extrakten von Schoten des Erntejahrs 1999, bestimmt mit HPLC

Herkunft	Komoren	Madagaskar	Mexiko	Indonesien	unbek.
Erntejahr	1999	1999	1999	1999	1999
Vanillin / 4-OH-Benzaldehyd	16	18	23	14	15
Vanillin / 4-OH-Benzoessäure	44	43	37	24	50
Vanillin / Vanillinsäure	20	11	9	7	11
4-OH-Benzoessäure/ 4-OH-Benzaldehyd	0,38	0,44	0,62	0,61	0,30
Vanillinsäure / 4-OH-Benzaldehyd	0,82	1,80	2,57	2,09	1,33
Vanillin [g/100g]	3,55	2,21	1,89	1,72	1,40

Tab. 26: Inhaltsstoff-Verhältniszahlen und Vanillingehalte von Ethanol / Wasser-Extrakten von Schoten des Erntejahrs 1999, bestimmt mit GC

Herkunft	Komoren	Madagaskar	Mexiko	Indonesien	unbek.
Erntejahr	1999	1999	1999	1999	1999
Vanillin / 4-OH-Benzaldehyd	17	19	23	15	20
Vanillin / 4-OH-Benzoensäure	91	30	56	29	143
Vanillin / Vanillinsäure	24	15	14	9	27
4-OH-Benzoensäure/ 4-OH-Benzaldehyd	0,21	0,86	0,49	0,54	0,14
Vanillinsäure / 4-OH-Benzaldehyd	0,70	1,34	1,65	1,81	0,74
Vanillin [g/100g]	2,89	1,98	1,82	1,47	1,48

Tab. 27: Inhaltsstoff-Verhältniszahlen und Vanillingehalte von Ethanol / Wasser-Extrakten von Schoten des Erntejahrs 2000, bestimmt mit HPLC

Herkunft	Indonesien	Madagaskar (I)	Madagaskar (II)	Uganda
Erntejahr	2000	2000	2000	2000
Vanillin / 4-OH-Benzaldehyd	28	25	17	23
Vanillin / 4-OH-Benzoensäure	117	29	40	56
Vanillin / Vanillinsäure	27	9	11	15
4-OH-Benzoensäure/ 4-OH-Benzaldehyd	0,24	0,87	0,43	0,41
Vanillinsäure / 4-OH-Benzaldehyd	1,03	2,85	1,58	1,50
Vanillin [g/100g]	3,40	2,12	3,29	2,54

Tab. 28: Inhaltsstoff-Verhältniszahlen und Vanillingehalte von Ethanol / Wasser-Extrakten von Schoten des Erntejahrs 2000, bestimmt mit GC

Herkunft	Indonesien	Madagaskar (I)	Madagaskar (II)	Uganda
Erntejahr	2000	2000	2000	2000
Vanillin / 4-OH-Benzaldehyd	21	25	18	17
Vanillin / 4-OH-Benzoessäure	88	18	49	36
Vanillin / Vanillinsäure	24	10	12	12
4-OH-Benzoessäure/ 4-OH-Benzaldehyd	0,26	1,40	0,47	0,51
Vanillinsäure / 4-OH-Benzaldehyd	0,89	2,61	1,64	1,42
Vanillin [g/100g]	3,48	2,22	2,43	2,30

Tab. 29: Inhaltsstoff-Verhältniszahlen und Vanillingehalte von Diethylether-Extrakten von Schoten des Erntejahrs 1998, bestimmt mit HPLC

Herkunft	Komoren	Tonga	Indonesien	Madagaskar	Mexiko	unbek.
Erntejahr	1998	1998	1998	1998	1998	1998
Vanillin / 4-OH-Benzaldehyd	16	14	10	17	19	16
Vanillin / 4-OH-Benzoessäure	90	86	26	81	67	60
Vanillin / Vanillinsäure	19	16	7	16	16	14
4-OH-Benzoessäure/ 4-OH-Benzaldehyd	0,18	0,16	0,37	0,21	0,28	0,27
Vanillinsäure / 4-OH-Benzaldehyd	0,85	0,86	1,31	1,07	1,22	1,19
Vanillin [g/100g]	2,37	2,02	1,44	1,80	1,69	1,97

Tab. 30: Inhaltsstoff-Verhältniszahlen und Vanillingehalte von Diethylether-Extrakten von Schoten des Erntejahrs 1998, bestimmt mit GC; n.b.: nicht bestimmbar

Herkunft	Komoren	Tonga	Indonesien	Madagaskar	Mexiko	unbek.
Erntejahr	1998	1998	1998	1998	1998	1998
Vanillin / 4-OH-Benzaldehyd	15	16	9	15	22	16
Vanillin / 4-OH-Benzoessäure	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Vanillin / Vanillinsäure	13	16	7	14	17	13
4-OH-Benzoessäure/ 4-OH-Benzaldehyd	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Vanillinsäure / 4-OH-Benzaldehyd	1,19	1,00	1,37	1,07	1,29	1,23
Vanillin [g/100g]	1,67	1,54	1,08	1,37	1,36	1,44

Tab. 31: Inhaltsstoff-Verhältniszahlen und Vanillingehalte von Diethylether-Extrakten von Schoten des Erntejahrs 1999, bestimmt mit HPLC

Herkunft	Komoren	Madagaskar	Mexiko	Indonesien	unbek.
Erntejahr	1999	1999	1999	1999	1999
Vanillin / 4-OH-Benzaldehyd	14	20	22	16	16
Vanillin / 4-OH-Benzoessäure	57	61	28	33	47
Vanillin / Vanillinsäure	21	10	5	9	10
4-OH-Benzoessäure/ 4-OH-Benzaldehyd	0,26	0,32	0,78	0,48	0,35
Vanillinsäure / 4-OH-Benzaldehyd	0,70	2,05	4,20	1,80	1,63
Vanillin [g/100g]	2,89	2,01	1,65	0,59	1,44

Tab. 32: Inhaltsstoff-Verhältniszahlen und Vanillingehalte von Diethylether-Extrakten von Schoten des Erntejahrs 1999, bestimmt mit GC; n.b.: nicht bestimmbar

Herkunft	Komoren	Madagaskar	Mexiko	Indonesien	unbek.
Erntejahr	1999	1999	1999	1999	1999
Vanillin / 4-OH-Benzaldehyd	15	18	15	10	16
Vanillin / 4-OH-Benzoessäure	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Vanillin / Vanillinsäure	27	10	4	4	10
4-OH-Benzoessäure/ 4-OH-Benzaldehyd	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Vanillinsäure / 4-OH-Benzaldehyd	0,69	1,88	3,65	2,70	1,70
Vanillin [g/100g]	2,28	1,47	1,16	0,41	1,08

Tab. 33: Inhaltsstoff-Verhältniszahlen und Vanillingehalte von Diethylether-Extrakten von Schoten des Erntejahrs 2000, bestimmt mit HPLC

Herkunft	Indonesien	Madagaskar (I)	Madagaskar (II)	Uganda
Erntejahr	2000	2000	2000	2000
Vanillin / 4-OH-Benzaldehyd	25	24	14	21
Vanillin / 4-OH-Benzoessäure	152	30	50	69
Vanillin / Vanillinsäure	28	9	11	18
4-OH-Benzoessäure/ 4-OH-Benzaldehyd	0,17	0,81	0,28	0,31
Vanillinsäure / 4-OH-Benzaldehyd	0,92	2,62	1,20	1,16
Vanillin [g/100g]	2,91	1,82	2,29	2,80



Tab. 34: Inhaltsstoff-Verhältniszahlen und Vanillingehalte von Diethylether-Extrakten von Schoten des Erntejahrs 2000, bestimmt mit GC; n.b.: nicht bestimmbar

Herkunft	Indonesien	Madagaskar (I)	Madagaskar (II)	Uganda
Erntejahr	2000	2000	2000	2000
Vanillin / 4-OH-Benzaldehyd	19	17	14	17
Vanillin / 4-OH-Benzoessäure	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Vanillin / Vanillinsäure	21	8	20	16
4-OH-Benzoessäure/ 4-OH-Benzaldehyd	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Vanillinsäure / 4-OH-Benzaldehyd	0,89	2,25	0,78	1,07
Vanillin [g/100g]	2,34	1,38	1,86	2,08

## 6.4 Experimenteller Teil zu Kapitel 4

### 6.4.1 Schotenextraktion und Vorbereitung der Extrakte

Für die Untersuchungen mittels GC-C-IRMS werden die gleichen Extrakte wie für die quantitative Bestimmung der Inhaltsstoffe verwendet (vgl. daher zur Schotenaufarbeitung Kap. 6.3.1).

Da für die GC-C-IRMS keine FFAP-Kapillarsäule verwendet wird, müssen die Ethanol / Wasser-Extrakte vor der gaschromatographischen Untersuchung mit Pentan / Diethylether extrahiert werden. Hierfür werden ca. 10 ml des jeweiligen Extrakts mit 3 x 10 ml Pentan / Diethylether (1/1) erschöpfend extrahiert.

Für die Messung der Isotopenwerte von 4-Hydroxybenzaldehyd wurden die Komponenten Vanillin und Ethylvanillin durch den Backflush-Modus ausgeblendet.

### 6.4.2 GC-C-IRMS

<b>Gerät:</b>	Siemens SiChromat 2-8 via Combustion Interface II gekoppelt an Finnigan MAT Delta S
<b>Trennsäule:</b>	30 m x 0,32 mm i.D. fused silica; ZB-5 (Phenomenex, Aschaffenburg), 0,50 µm Filmdicke
<b>Trägergas:</b>	Helium; 1,8 ml/min
<b>Injektor:</b>	Split-Injektor; 250°C Splifluss: 25 ml/min (für Vanillin-Messungen) 2 min splitless (für 4-Hydroxybenzaldehyd-Messungen)
<b>Interface:</b>	Reaktortemperatur: 960°C Reduktionsofen: 600°C Helium: 1,8 bar CO <sub>2</sub> -Referenzgas: 1,2 bar
<b>Temp.-Programm:</b>	100°C / 5min // 5°C/min // 250°C / 10min (für Vanillin-Messungen) 60°C / 0min // 3°C/min // 155°C / 0min // 5°C/min // 250°C / 10min (für 4-Hydroxybenzaldehyd-Messungen)
<b>Auswertesystem:</b>	Isodat Version 7.4

Der Reaktoreinbau erfolgte nicht nach Herstellerangaben. Der gesamte Verbrennungsofen inklusive Verbinder wird einen Zentimeter weiter in den Heizer geschoben und mit einem Draht fixiert.

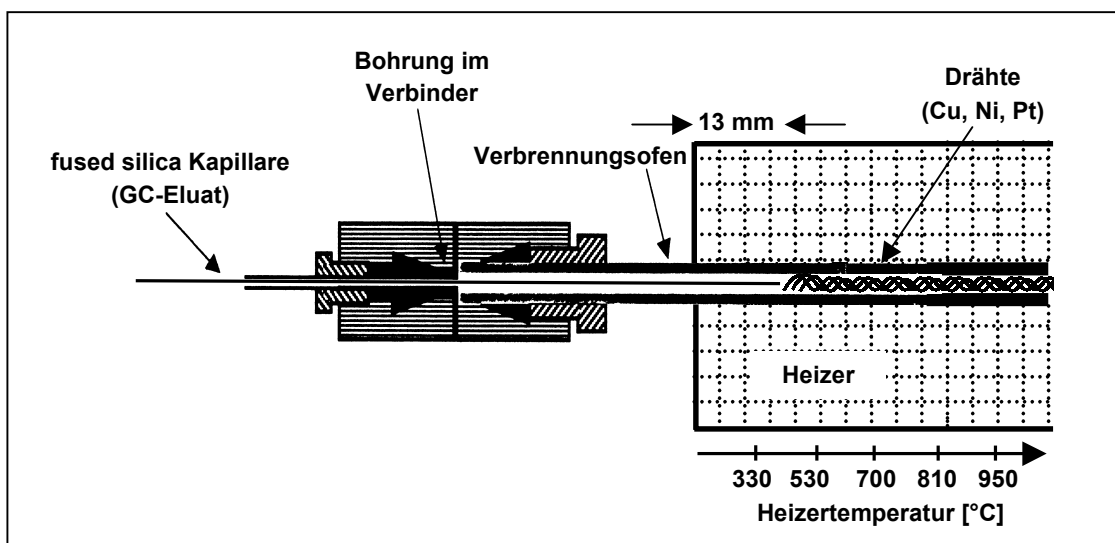


Abb. 47: modifizierter Einbau des Verbrennungsofens

### 6.4.3 Kalibrierung

Die Kalibrierung des GC-C-IRMS-Systems erfolgte über Standardsubstanzen mit bekanntem  $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Wert.

Tab. 35: zur Kalibrierung des GC-C-IRMS-Systems herangezogenen Standardsubstanzen

Substanz	Hersteller	$\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Wert [‰]
5-Nonanon	Fluka, Buchs	-26,11
Menthol	EGA-Chemie, Steinheim	-26,14
$\gamma$ -Octalacton	Sigma-Aldrich, Steinheim	-27,29
$\gamma$ -Decalacton	Sigma-Aldrich, Steinheim	-28,54
4-OH-Benzaldehyd	Fluka, Buchs	-27,88
Vanillin	Fluka, Buchs	-29,51
Ethylvanillin	Fluka, Buchs	-27,71

Über den Mittelwert der über das GC-C-IRMS ermittelten  $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte aller sieben Standardsubstanzen wird ein Referenzgaswert von -24,78‰ ermittelt.

### 6.4.4 Ergebnisse

Für die Bestimmung der  $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte von Vanillin wird der Mittelwert aus fünf Messungen ermittelt, für die Bestimmung der  $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte von 4-Hydroxybenzaldehyd der Mittelwert aus drei Messungen. Es wurde Vanillin aus selbst hergestellten Ethanol / Wasser- und Diethylether-Extrakten authentischer Vanilleschoten (Tab. 36), aus verschiedenen Handelsextrakten und einem Handelsaroma (Tab. 37) und als Reinsubstanzen verschiedener Herkunft (Tab. 38) vermessen. 4-Hydroxybenzaldehyd wurde aus selbst hergestellten Ethanol / Wasser-Extrakten authentischer Vanilleschoten (Tab. 39), aus Handelsextrakten (Tab. 40) und als Reinsubstanzen synthetischen Ursprungs (Tab. 41) vermessen. Die Ergebnisse sind in den folgenden Tabellen dargestellt:

Tab. 36:  $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte von Vanillin aus selbst hergestellten Ethanol / Wasser- und Diethylether-Extrakten authentischer Vanilleschoten; s: Standardabweichung

Gattung	Herkunft	Ethanol / Wasser-Extrakt		Diethylether-Extrakt	
		$\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ [‰]	s	$\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ [‰]	s
<i>V. planifolia</i>	Komoren 1998	-19,88	0,24	-19,75	0,11
<i>V. planifolia</i>	Tonga 1998	-19,55	0,04	-19,82	0,08
<i>V. planifolia</i>	Indonesien 1998	-19,93	0,11	-19,94	0,20
<i>V. planifolia</i>	Madagaskar 1998	-19,60	0,05	-19,56	0,03
<i>V. planifolia</i>	Mexiko 1998	-21,05	0,06	-21,23	0,10
<i>V. planifolia</i>	unbekannt 1998	-20,33	0,05	-20,44	0,06
<i>V. planifolia</i>	Komoren 1999	-19,69	0,14	-19,92	0,15
<i>V. planifolia</i>	Madagaskar 1999	-20,82	0,07	-20,50	0,29
<i>V. planifolia</i>	Mexiko 1999	-19,51	0,16	-19,86	0,09
<i>V. planifolia</i>	Indonesien 1999	-19,26	0,11	-19,23	0,23
<i>V. planifolia</i>	unbekannt 1999	-20,44	0,09	-20,19	0,10
<i>V. planifolia</i>	Indonesien 2000	-21,14	0,08	-21,33	0,10
<i>V. planifolia</i>	Madagaskar (I) 2000	-20,84	0,08	-20,54	0,15
<i>V. planifolia</i>	Madagaskar (II) 2000	-20,71	0,08	-20,92	0,05
<i>V. planifolia</i>	Uganda 2000	-21,60	0,13	-21,33	0,15
<i>V. tahitensis</i>	Tahiti 1998	-16,91	0,09	-16,92	0,05
<i>V. tahitensis</i>	Tahiti 1999	-15,87	0,05	-15,98	0,12
<i>V. tahitensis</i>	Tahiti (I) 2000	-19,80	0,09	-19,65	0,26
<i>V. tahitensis</i>	Tahiti (II) 2000	-19,46	0,11	-19,57	0,02

Tab. 37:  $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte von Vanillin aus verschiedenen Handelsextrakten und einem Handelsaroma; s: Standardabweichung

Bezeichnung	$\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ [‰]	s
ethanolischer Kaltextrakt 1998	-19,83	0,23
ethanolischer Heißextrakt 1998	-20,58	0,10
ethanolischer Kaltextrakt 1999	-20,65	0,09
ethanolischer Heißextrakt 1999	-20,06	0,17
Resinoid	-20,57	0,13
CO <sub>2</sub> -Extrakt	-20,94	0,11
getrockneter CO <sub>2</sub> -Extrakt	-20,81	0,13
Vanille-Aroma	-27,21	0,09

Tab. 38:  $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte von Vanillin-Reinsubstanzen verschiedener Herkunft; s: Standardabweichung

Herkunft	Hersteller	$\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ [‰]	s
synthetisch	Haarmann&Reimer, Holzminden	-31,46	0,45
synthetisch	Haarmann&Reimer, Holzminden	-32,16	0,18
synthetisch	Merck, Darmstadt	-25,38	0,14
synthetisch	Merck, Darmstadt	-28,66	0,17
synthetisch	Riedel de Haën, Seelze	-32,15	0,14
synthetisch	Sigma-Aldrich, Steinheim	-28,69	0,21
<i>ex Vanilla</i>	Haarmann&Reimer, Holzminden	-19,48	0,25
biotechnologisch	Givaudan, Dübendorf	-36,23	0,10

Tab. 39:  $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte von 4-Hydroxybenzaldehyd aus selbst hergestellten Ethanol / Wasser-Extrakten authentischer Vanilleschoten; s: Standardabweichung

Gattung	Herkunft	$\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ [‰]	s
<i>V. planifolia</i>	Komoren 1998	-17,36	0,09
<i>V. planifolia</i>	Tonga 1998	-17,68	0,14
<i>V. planifolia</i>	Indonesien 1998	-17,72	0,14
<i>V. planifolia</i>	Madagaskar 1998	-16,89	0,24
<i>V. planifolia</i>	unbekannt 1998	-17,76	0,06
<i>V. planifolia</i>	Madagaskar 1999	-20,12	0,19
<i>V. planifolia</i>	Indonesien 1999	-16,94	0,19
<i>V. planifolia</i>	unbekannt 1999	-18,13	0,06
<i>V. planifolia</i>	Madagaskar (I) 2000	-18,53	0,08
<i>V. tahitensis</i>	Tahiti 1998	-16,86	0,23
<i>V. tahitensis</i>	Tahiti 1999	-16,54	0,08
<i>V. tahitensis</i>	Tahiti (I) 2000	-19,78	0,11
<i>V. tahitensis</i>	Tahiti (II) 2000	-18,17	0,04

Tab. 40:  $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte von 4-Hydroxybenzaldehyd aus verschiedenen Handelsextrakten; s: Standardabweichung

Bezeichnung	$\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ [‰]	s
ethanolischer Kaltextrakt 1998	-19,19	0,23
ethanolischer Heißextrakt 1998	-18,71	0,13
ethanolischer Kaltextrakt 1999	-19,04	0,21
ethanolischer Heißextrakt 1999	-19,22	0,42
Resinoid	-17,19	0,20
CO <sub>2</sub> -Extrakt	-17,09	0,19

Tab. 41:  $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte von synthetischen Reinsubstanzen von 4-Hydroxybenzaldehyd;  
s: Standardabweichung

Herkunft	Hersteller	$\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ [‰]	s
synthetisch	Fluka, Buchs	-31,26	0,20
synthetisch	Merck, Darmstadt	-26,73	0,16
synthetisch	Roth, Karlsruhe	-27,69	0,07

Zur Überprüfung der Abhängigkeit des Isotopenwerts von der Extraktionseffizienz werden zerkleinerte Vanilleschoten mit Diethylether extrahiert (vgl. 6.2.1.2) und nach verschiedenen Zeiten Proben entnommen. Der Vanillingehalt wird mittels HPLC (6.2.2) ermittelt, der Isotopenwert unter den oben genannten Bedingungen.

## 6.5 Experimenteller Teil zu Kapitel 5

### 6.5.1 MDGC-MS-System

<b>Gerät:</b>	Siemens SiChromat 2-8 mit Live-T-Schaltung
<b>Vorsäule:</b>	30 m x 0,25 mm i.D.; SE 52; 0,25 $\mu\text{m}$ Filmdicke
<b>Hauptsäule:</b>	30 m x 0,25 mm i.D.; 30 % Heptakis(2,3-di-O-methyl-6-O-TBDMS)- $\beta$ -Cyclodextrin in SE 52, 0,25 $\mu\text{m}$ Filmdicke
<b>Trägergas:</b>	Helium
<b>Injektor:</b>	Split-Injektor; 250°C Splifluss: 25 ml/min
<b>Detektor (Vorsäule):</b>	FID; 250°C Auswertesystem: ChromCard Version 1,19
<b>Detektor (Hauptsäule):</b>	Finnigan MAT Ion Trap Detector Transferline 250°C; Open split Interface 250°C; Ion Trap Manifold 230°C; Ionisierungsenergie 70eV Auswertesystem: ITD-Software Version 4,10
<b>Temperaturprogramm (Vorsäule):</b>	60°C / 0min // 3°C/min // 250°C / 10min
<b>Temperaturprogramm (Hauptsäule):</b>	60°C / 0min // 2°C/min // 200°C / 10min

## 6.5.2 Stir Bar Sorptive Extraction

Es werden Stir Bars (Twister<sup>®</sup>) der Firma Gerstel (Mülheim), bestehend aus einem magnetischen Kern, eingeschmolzen in eine Glashülle, mit einer Länge von 1,2 cm und einem Außendurchmesser von 1,2 mm verwendet. Die umgebende Sorbens-Phase besteht aus 55 µl Polydimethylsiloxan (PDMS).

### 6.5.2.1 Extraktionsbedingungen

Die Extraktion mit Stir Bar erfolgt entweder aus einer Lösung oder aus dem Headspace.

Bei einer Extraktion aus Lösung sind die Bedingungen wie folgt:

**Extraktionsmaterial:** eine zerkleinerte Vanilleschote (ca. 3-4 g), aufgeschlämmt in 5 ml Wasser

**Extraktionsdauer:** 15 Minuten

Bei einer Headspace-Extraktion sind die Bedingungen wie folgt:

Der Twister<sup>®</sup> wird an einem magnetischen Draht befestigt im Headspace lokalisiert (Abb. 48):

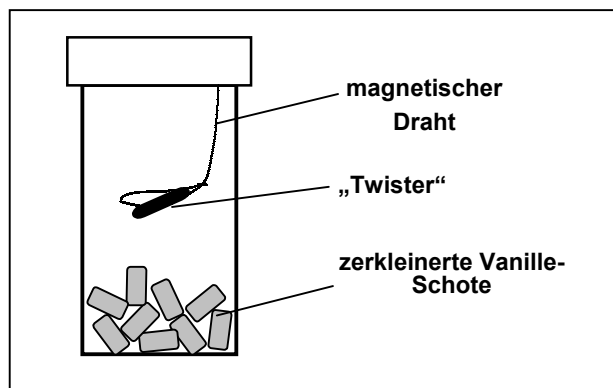


Abb. 48: schematische Darstellung der Headspace-SBSE von Vanilleschoten

**Extraktionsmaterial:** eine zerkleinerte Vanilleschote (ca. 3-4 g)

**Extraktionsdauer:** 60 Minuten



### 6.5.2.2 Thermodesorption und Kaltaufgabe

Die Aufgabe auf das MDGC-MS-System erfolgt über ein Thermodesorptionssystem, das über eine Transferkapillare mit einem Kaltaufgabesystem verbunden ist.

- **Thermodesorption:**

<b>Gerät:</b>	Gerstel TDS 2
<b>Temperaturprogramm:</b>	10°C / 0min // 60°C/min // 250°C / 2min
<b>Desorptionsfluß:</b>	30 ml/min
<b>Aufgabemodus:</b>	splitless

- **Transferkapillare:** 250°C

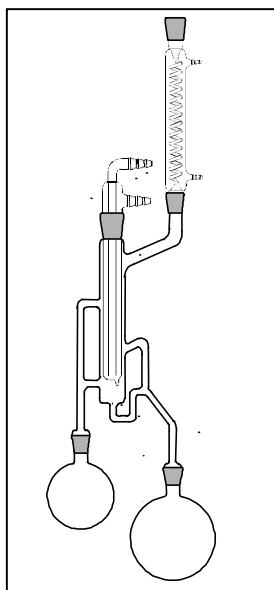
- **Kaltaufgabesystem:**

<b>Gerät:</b>	Gerstel CIS-3 PTV Injector
<b>Temperaturprogramm:</b>	-150°C / 0min // 12°C/s // 250°C / 2min
<b>Aufgabemodus:</b>	splitless

### 6.5.3 Enantioselektive Analyse von $\gamma$ -Nonalacton

Zur Analyse von  $\gamma$ -Nonalacton werden Vanilleschoten zum einen mit Mikro-SDE, zum anderen mit SBSE extrahiert. Die Bestimmung erfolgt mittels MDGC-MS.

#### 6.5.3.1 Extraktion mit Mikro-SDE



Die Mikro-SDE (Abb. 49) hat im Vergleich mit der herkömmlichen SDE-Apparatur den Vorteil, dass durch deutlich verringerte Dimensionen (ca. Faktor 4) die Gasräume wesentlich geringer sind, was eine erhöhte Wiederfindung von Substanzen bewirkt. Außerdem ist bei einer Extraktion mit Mikro-SDE deutlich weniger Probenmaterial erforderlich und der Verbrauch an Lösungsmitteln wird erheblich reduziert.

Abb. 49: schematischer Aufbau einer Mikro-SDE

Zur Extraktion werden ca. 40 g zerkleinerte Vanilleschoten eingewogen, mit 5  $\mu$ l einer 1%igen Lösung von Valeriansäurepentylester als interner Standard versetzt und mit 50 ml Wasser aufgeschlämmt. Als Extraktionslösungsmittel werden 10 ml Pentan / Dichlormethan (2/1) verwendet. Nach einer Extraktionsdauer von zwei Stunden wird das Lösungsmittel über Natriumsulfat getrocknet und an einer Vigreuxkolonne bei einer Kopftemperatur von 40°C vorsichtig auf ca. 1 ml eingeeingt.

#### 6.5.3.2 Extraktion mit SBSE

Die Stir Bar Sorptive Extraction erfolgt aus einer wässrigen Aufschlämmung einer Vanilleschote (vgl. 6.5.2.1).

#### 6.5.3.3 Analytik mit MDGC-MS

Geräteparameter: siehe 6.5.1

Tab. 42: Cut-Zeiten der untersuchten Substanzen

Substanz	Cut-Zeit [min]
Valeriansäurepentylester	10,2-10,8
$\gamma$ -Nonalacton	28,4-28,9

Tab. 43: Retentionszeit der untersuchten Substanzen auf der Hauptsäule

Substanz	Retentionszeit [min]
Valeriansäurepentylester	30,5
(R)- $\gamma$ -Nonalacton	43,3
(S)- $\gamma$ -Nonalacton	44,0

#### 6.5.3.4 Ergebnisse

Aus den mit Mikro-SDE hergestellten Extrakten wurden durch Quantifizierung über den internen Standare Valeriansäurepentylester ungefähre Gehalte an  $\gamma$ -Nonalacton bestimmt.

Responsefaktor:  $R_f = 0,78$

Außerdem wurden die Enantiomerenverhältnisse ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tab. 44 dargestellt. Nach SBSE wurden nur die Enantiomerenverhältnisse bestimmt (Tab. 45).

Tab. 44: Ergebnisse der enantioselektiven Analytik von  $\gamma$ -Nonalacton nach Mikro-SDE

Gattung	Herkunft	Enantiomerenverhältnis [%]		Gehalt [ppb] (semiquantitativ)
		R	S	
<i>V. planifolia</i>	Madagaskar 1998	51	49	70
<i>V. planifolia</i>	Mexiko 1998	47	52	130
<i>V. planifolia</i>	Komoren 1998	51	49	80
<i>V. tahitensis</i>	Tahiti 1998	46	64	130

Tab. 45: Ergebnisse der enantioselektiven Analytik von  $\gamma$ -Nonalacton nach SBSE

Gattung	Herkunft	Enantiomerenverhältnis [%]	
		R	S
<i>V. planifolia</i>	Komoren 1998	50	50
<i>V. planifolia</i>	Tonga 1998	49	51
<i>V. planifolia</i>	Indonesien 1998	53	47
<i>V. planifolia</i>	Madagaskar 1998	50	50
<i>V. planifolia</i>	Mexiko 1998	51	49
<i>V. planifolia</i>	Komoren 1999	50	50
<i>V. planifolia</i>	Mexiko 1999	50	50
<i>V. planifolia</i>	Indonesien 1999	52	48
<i>V. planifolia</i>	unbekannt 1999	63	37

## 6.5.4 Enantioselektive Analytik von Monoterpenen

### 6.5.4.1 Headspace-SBSE-MDGC-MS

Um die Monoterpene einer enantioselektiven Analytik zuzuführen, werden die Schoten einer Headspace-SBSE (6.5.2) unterworfen. Die Analytik erfolgt mittels MDGC-MS (6.5.1).

Tab. 46: Cut-Zeiten der untersuchten Monoterpene

Substanz	Cut-Zeit [min]
$\alpha$ -Pinen	8,9-9,0
$\beta$ -Pinen	10,3-10,6
Limonen	12,4-12,7
Linalool	15,5-16,0
Terpinen-4-ol	19,2-19,6
$\alpha$ -Terpineol	19,8-20,3

Tab. 47: Retentionszeit der untersuchten Monoterpene auf der Hauptsäule

Substanz	Retentionszeit [min]	
	R-Enantiomer	S-Enantiomer
$\alpha$ -Pinen	15,1	14,9
$\beta$ -Pinen	17,2	17,5
Limonen	20,4	19,9
Linalool	26,7	27,1
Terpinen-4-ol	32,1	31,9
$\alpha$ -Terpineol	34,6	34,1

#### 6.5.4.2 Ergebnisse

Es wurden Schoten der Gattungen *V. planifolia* und *V. tahitensis* im Hinblick auf die Enantiomerenverteilungen von Monoterpenen untersucht. Die Ergebnisse sind in Tab. 48 dargestellt:

Tab. 48: Enantiomerenverhältnisse der untersuchten Monoterpene in %; n.n.: nicht nachweisbar

Gattung	Herkunft	$\alpha$ -Pinen		$\beta$ -Pinen		Limonen		Linalool		Terpinen-4-ol		$\alpha$ -Terpineol	
		R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S
<i>V. planifolia</i>	Komoren 1998	38	62	11	89	97	3	77	23	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
<i>V. planifolia</i>	Tonga 1998	41	59	14	86	96	4	71	29	n.n.	n.n.	42	58
<i>V. planifolia</i>	Indonesien 1998	83	17	9	91	96	4	75	25	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
<i>V. planifolia</i>	Madagaskar 1998	31	69	10	90	97	3	80	20	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
<i>V. planifolia</i>	Mexiko 1998	48	52	9	91	97	3	68	32	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
<i>V. planifolia</i>	Komoren 1999	45	55	7	93	97	3	64	36	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
<i>V. planifolia</i>	Madagaskar 1999	69	31	9	91	98	2	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
<i>V. planifolia</i>	Mexiko 1999	48	52	7	93	97	3	64	36	34	66	n.n.	n.n.
<i>V. planifolia</i>	Indonesien 1999	45	55	8	92	97	3	59	41	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
<i>V. planifolia</i>	Madagaskar (I) 2000	75	25	9	91	97	3	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	50	50
<i>V. tahitensis</i>	Tahiti 1999	47	53	10	90	97	3	62	38	52	48	44	56
<i>V. tahitensis</i>	Tahiti (I) 2000	76	24	n.n.	n.n.	95	5	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	41	59

## 6.5.5 Untersuchung von Guajacol

### 6.5.5.1 MDGC-MS-Nachweis von Guajacol

Um zu überprüfen, ob Guajacol in Vanilleschoten nachweisbar ist, werden die Schoten nach Headspace-SBSE (6.5.2) mit MDGC-MS (6.5.1) untersucht.

Tab. 49: Cut-Zeiten für Guajacol

Substanz	Cut-Zeit [min]
Guajacol	15,2-16,2

Tab. 50: Retentionszeit von Guajacol auf der Hauptsäule

Substanz	Retentionszeit [min]
Guajacol	25,3

### 6.5.5.2 Semiquantitative Bestimmung von Guajacol

Für die semiquantitative Bestimmung von Guajacol werden Diethylether-Extrakte an einem GC-FID-System analysiert. Als interner Standard diente Veratrumaldehyd.

Responsefaktor:  $R_f = 0,87$

#### 6.5.5.2.1 GC-FID-System

<b>Gerät:</b>	Carlo Erba Instruments; HRGC 5300 HT Mega Series
<b>Trennsäule:</b>	50 m x 0,32 mm i.D. Glassäule; PS090, 0,25 µm Filmdicke
<b>Trägergas:</b>	Wasserstoff; 2 ml/min
<b>Injektor:</b>	Split-Injektor; 280°C Splifluss: 20 ml/min
<b>Detektor:</b>	FID; 280°C
<b>Temp.-Programm:</b>	80°C / 0 min // 3°C/min // 250°C / 30 min
<b>Auswertesystem:</b>	ChromCard Version 1.19

Tab. 51: Retentionszeiten der untersuchten Substanzen

Substanz	Retentionszeit [min]
Guajacol	9,8
Veratrumaldehyd	29,2

### 6.5.5.2.2 Ergebnisse

Es wurden Schoten der Gattungen *V. planifolia* und *V. tahitensis* untersucht. Die Ergebnisse sind in Tab. 52 dargestellt:

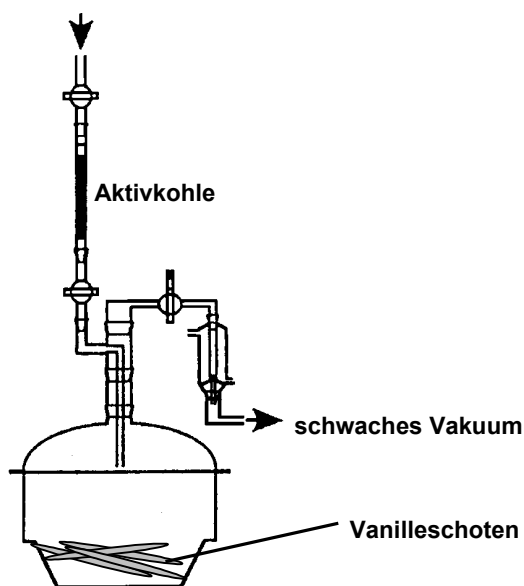
Tab. 52: Ergebnisse der semiquantitativen Bestimmung von Guajacol

Gattung	Herkunft	Gehalt [ppm] (semiquantitativ)
<i>V. planifolia</i>	Komoren 1998	20
<i>V. planifolia</i>	Tonga 1998	25
<i>V. planifolia</i>	Indonesien 1998	90
<i>V. planifolia</i>	Madagaskar 1998	20
<i>V. planifolia</i>	Mexiko 1998	40
<i>V. planifolia</i>	Madagaskar 1999	80
<i>V. tahitensis</i>	Tahiti 1999	6
<i>V. tahitensis</i>	Tahiti (I) 2000	6

## 6.5.6 Identifizierung geruchsaktiver Minorkomponenten

### 6.5.6.1 Dynamische Headspace-Extraktion

Es wird eine Apparatur wie in Abb. 50 dargestellt verwendet. Ca. 50 g Vanilleschoten (*V. tahitensis*, Tahiti (II) 2000) werden für 60 Stunden einer



dynamischen Headspace-Extraktion unterworfen. Der Fluss des Purses beträgt 60 ml/min. Als Adsorbens dient Tenax-TA<sup>®</sup> der Firma Alltech. Die Elution vom Tenax erfolgt mit 20 ml Diethylether. Der Extrakt wird an einer Vigreuxkolonne bei einer Kopftemperatur von 40°C vorsichtig auf ein Volumen von ca. 500 µl eingengt.

Abb. 50: Apparatur zur dynamischen Headspace-Extraktion

### 6.5.6.2 HPLC-Fraktionierung des Headspace-Extrakts

Der dynamische Headspace-Extrakt wird mit HPLC in Fraktionen aufgetrennt. Es werden sechs Fraktionen von jeweils fünf Minuten gesammelt. Die Fraktionen aus 15 HPLC-Läufen werden gesammelt, und jede Fraktion im Stickstoffstrom auf ca. 20 µl eingeeengt.

#### HPLC-System:

<b>Pumpe:</b>	Jasco PU-980
<b>Injektor:</b>	Injektionsschleife mit 10 µl-Volumen
<b>Trennsäule:</b>	LiChrospher Kieselgel Si-60; 250 x 4 mm; 5 µm Partikelgröße
<b>Fliessmittel:</b>	Pentan / Diethylether (1/4)
<b>Fluss:</b>	1 ml/min
<b>Detektor:</b>	Merck Hitachi Diode Array Detector L-4500A Spektrum: 190-300 nm feste Wellenlänge: 275 nm
<b>Auswertesystem:</b>	Chromatography Data Station; DAD System Manager Model D-6500

### 6.5.6.3 Gaschromatographie-Olfaktometrie (GCO)

Zur GCO-Analytik wird das Eluat der Gaschromatographie gesplittet, wobei eine Hälfte einer FID-Detektion zugeführt wird und die andere Hälfte zu einem Sniffing-Aufsatz gelangt, an dem das Eluat verrochen werden kann.

#### GC-System:

<b>Gerät:</b>	Fisons Instruments; HRGC Mega 2 Series
<b>Trennsäule:</b>	30 m x 0,25 mm i.D. fused silica; SE52, 0,25 µm Filmdicke
<b>Trägergas:</b>	Wasserstoff; 2 ml/min
<b>Injektor:</b>	Split-Injektor; 250°C Splifluss: 20 ml/min
<b>Detektor:</b>	a) FID; 250°C b) Sniffing-Aufsatz
<b>Temp.-Programm:</b>	60°C / 0 min // 3°C/min // 250°C / 30 min
<b>Auswertesystem:</b>	ChromCard Version 1.19



**6.5.6.4 Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS)**

Unter möglichst vergleichbaren Bedingungen zum GCO-System wird eine GC-MS-Analyse durchgeführt.

**GC-MS-System:**

<b>Gaschromatograph:</b>	Fisons Instruments; GC 8000 Series
<b>Trennsäule:</b>	30 m x 0,25 mm i.D. fused silica; SE52, 0,25 µm Filmdicke
<b>Trägergas:</b>	Helium; 1 ml/min
<b>Injektor:</b>	Split-Injektor; 230°C Splifluss: 20 ml/min
<b>Temp.-Programm:</b>	60°C / 0 min // 3°C/min // 250°C / 30 min
<b>Massenspektrometer:</b>	Fisons Instruments MD800
<b>Interface-Temperatur:</b>	250°C
<b>Ionenquellen-Temp.:</b>	200°C
<b>Ionisierungsenergie:</b>	70eV
<b>Auswertesystem:</b>	MassLab Version 1.2

**MS-Daten der identifizierten Substanzen:**

4-Hydroxybenzylaldehyd: 123 ( $M^+$ , 19), 108 (83), 107 (100), 79 (24), 77 (82)

Guajacol: 125 ( $M^+ + 1$ , 6), 124 ( $M^+$ , 90), 109 (100), 81 (61)

Kreosol: 139 ( $M^+ + 1$ , 9), 138 ( $M^+$ , 93), 123 (100), 95 (30), 77 (22), 67 (27)

Anisaldehyd: 136 ( $M^+$ , 70), 135 (100), 107 (19), 92 (18), 77 (42)

Tab. 53: Retentionszeiten der identifizierten Substanzen

Substanz	Retentionszeit [min]
4-Hydroxybenzylamin	11,4
Guajacol	11,5
Kreosol	15,9
Anisaldehyd	18,7

#### 6.5.6.5 Synthese von 4-Hydroxybenzylamin

500 mg 4-Cyanophenol (Acros Organics, Geel) werden in 1 ml Methanol gelöst und mit 50 mg (10 Gew.%) Palladium / Aktivkohle (Merck-Schuchardt, Hohenbrunn) versetzt. Es wird ein mit Wasserstoff gefüllter Luftballon aufgesetzt und 48 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgt mittels GC-MS (Retentionszeit 4-Cyanophenol: 27,5 min; 4-Hydroxybenzylamin: 11,4 min).

Nach vollständiger Hydrierung wird der Ansatz über Celite abfiltriert und das Methanol am Rotationsverdampfer abgezogen. Man erhält als Reinprodukt 300 mg eines braunen Öls.

Das Reinprodukt wird mit GC-MS und  $^1\text{H-NMR}$  untersucht.

MS: 123 ( $\text{M}^+$ , 19), 108 (83), 107 (100), 79 (24), 77 (82)

NMR (300 MHz;  $\text{d}_6\text{-DMSO}$ ): 9,2 (b), 2H ( $\text{NH}_2$ ); 7,6 (d), 1H (OH); 6,9 (d), 2H (Aryl-H); 6,6 (d), 2H (Aryl-H); 2,1 (s), 2H ( $\text{CH}_2$ )

Das NMR-Spektrum wurde auf einem Bruker ARX 300 Spektrometer aufgenommen. Die chemische Verschiebung ist in ppm angegeben. Die Signalzuordnung erfolgt mit b: breit, d: Duplett, s: Singulett

#### 6.5.6.6 MDGC-MS-Analytik

Zum Nachweis der Verbindungen Kreosol und 4-Hydroxybenzylamin im Headspace von *V. planifolia* und *V. tahitensis* wird nach Headspace-SBSE (6.5.2) eine MDGC-MS-Analytik (6.5.1) durchgeführt.

Tab. 54: Cut-Zeiten der untersuchten Substanzen

Substanz	Cut-Zeit [min]
4-Hydroxybenzylamin	18,6-19,0
Kreosol	24,6-25,1
Schoten-Headspace	0-60

Tab. 55: Retentionszeit der untersuchten Substanzen auf der Hauptsäule

Substanz	Retentionszeit [min]
4-Hydroxybenzylamin	36,5
Kreosol	37,5

**6.5.6.7 Gehaltsabschätzung der identifizierten Substanzen**

Geräteparameter: siehe 6.5.6.3

Den entsprechenden Diethylether-Extrakten wurden unterschiedliche Mengen an 4-Hydroxybenzylamin und Kreosol zugesetzt. Der Extrakt wurde vor und nach Aufstockung mit GC-FID untersucht. Aus den enthaltenen Peakflächen wurde der ungefähre Gehalt der Substanzen im Extrakt extrapoliert.

**Tab. 56: Ergebnisse der semiquantitativen Bestimmung von Kreosol und 4-Hydroxybenzylamin**

<b>Schoten</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Kreosol-Gehalt [ppb] (semiquantitativ)</b>	<b>4-Hydroxybenzylamin- Gehalt [ppb] (semiquantitativ)</b>
<i>V. planifolia</i>	Mexico 1999	12	6
<i>V. tahitensis</i>	Tahiti 1998	85	120

## 7 Zusammenfassung / Summary

### 7.1 Zusammenfassung

Vanille – ein tropisches Orchideengewächs – liefert eines der bedeutendsten Aromen weltweit. Die stetig wachsende Nachfrage und das hohe Preisniveau sind allerdings häufig die Ursache für Verfälschung von Vanilleextrakten und -aromen. Ziel der Arbeit war es daher, die Methoden zur Echtheitsbewertung von Vanille weiter zu entwickeln. Daneben sollten Untersuchungen im Hinblick auf aromaaktive Minorkomponenten durchgeführt werden.

Als Basisdaten für die Authentizität von Vanille dienen häufig Verhältniszahlen, die aus den Gehalten der Hauptinhaltsstoffe Vanillin, 4-Hydroxybenzaldehyd, Vanillinsäure und 4-Hydroxybenzoesäure gebildet werden. Um diese Verhältniszahlen zuverlässig bestimmen zu können, wurden eine hochdruckflüssigkeits-chromatographische (HPLC) und – zum ersten Mal – eine gas-chromatographische (GC) Methode entwickelt. Unter Verwendung von internen Standards konnte mit beiden Methoden eine zuverlässige Quantifizierung erzielt werden. Die ermittelten Werte erwiesen sich als unabhängig von der Analysenmethode, von Erntejahrgang und Herkunft der Schoten. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die bisher zur Bewertung herangezogenen Richtwerte im Vergleich mit den im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Werte durchweg zu enge Spannbreiten aufweisen. Die neu bestimmten Daten zur quantitativen Zusammensetzung von Vanilleschoten stellen daher wertvolle Basiskriterien für eine Echtheitsbewertung von Vanille dar.

Für eine weitergehende, noch zuverlässigere Authentizitätsbewertung wurden die  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse von Vanillin und der zweiten Hauptkomponente 4-Hydroxybenzaldehyd ermittelt. Als grundlegende Voraussetzung für die Bestimmung korrekter Isotopenwerte wurde zum einen die Gerätekonfiguration optimiert, um eine vollständige Verbrennung zu gewährleisten, zum anderen wurde der Einfluss der Schotenaufarbeitung untersucht. Durch Korrelation der  $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$ -Werte der beiden Komponenten konnten klare Authentizitätsbereiche festgelegt werden.

Insbesondere durch die integrale Betrachtungsweise beider Kriterien – Verhältniszahlen und Isotopenwerte – konnte die Authentizitätsbewertung von Vanille erheblich verbessert werden.

Neben den Hauptkomponenten kommen in der Vanille aber auch eine große Zahl von aromaaktiven Minorkomponenten vor. Im Rahmen dieser Arbeit sollten daher auch Untersuchungen zu einigen dieser Minorkomponenten durchgeführt werden. Dabei ermöglichte es der Einsatz der neuen, hochempfindlichen Methode der Stir Bar Sorptive Extraction, eine enantioselektive Analyse von  $\gamma$ -Nonalacton und verschiedenen Monoterpenen durchzuführen.  $\gamma$ -Nonalacton konnte dabei in allen untersuchten Proben mit einem nahezu racemischen Enantiomerenverhältnis nachgewiesen werden. Die Enantiomerenreinheit und die Schwankungen der Enantiomerenverhältnisse für die untersuchten Monoterpene waren stark variierend. Es konnte dabei aber weder eine Herkunfts- noch eine Jahrgangsabhängigkeit festgestellt werden. Die sehr geruchsaktive Substanz Guajacol wurde in Schoten der Gattungen *V. planifolia* und *V. tahitensis* semiquantitativ untersucht. Es konnte aber auch hier keine Abhängigkeit von der Herkunft der Schoten festgestellt werden. Um weitere geruchsaktive Minorkomponenten zu identifizieren, wurde ein Headspace-Extrakt von Vanilleschoten mittels Gaschromatographie-Olfaktometrie untersucht. Es konnten dabei die beiden Substanzen Kreosol und 4-Hydroxybenzylamin identifiziert werden. Letztgenanntes war bisher als natürlicher Aromastoff nicht bekannt. Obwohl beide Komponenten nur im ppb-Bereich vorkommen, leisten sie dennoch einen Beitrag zum Gesamtaroma von Vanille.

Insgesamt konnten im Rahmen dieser Arbeit neue Wege im Hinblick auf die Analytik und Authentizitätsbewertung von Vanille aufgezeigt werden.

## 7.2 Summary

Vanilla – a tropical orchid – is the source of one of the world's most important flavours. However, the continuously increasing demand of this highly priced flavour material has led to adulterations of Vanilla extracts and flavours. Therefore, it was the aim of this work to develop improved methods for authenticity assessment. Furthermore, investigations on odour active minor components has been carried out.

The ratios of the major components vanillin, 4-hydroxybenzaldehyde, vanillic acid and 4-hydroxybenzoic acid are frequently used as authenticity criteria for vanilla. To achieve a reliable determination of these ratios, a HPLC – and for the first time – a GC method was developed. By using internal standards, HPLC- as well as GC-analysis were found to be suitable methods for a reliable quantification of relevant vanilla flavour components. The results were independent of the analytical method, of the year of harvest, and of the origin of the pods. Furthermore, it could be shown that the target values used up to now, defined too small authenticity ranges. Using the new quantitative data, a reliable initial statement on authenticity of vanilla becomes possible.

Stable isotope discrimination during biosynthesis is a well known phenomenon and an efficient indicator of naturalness. This investigation reports on the  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ratios of vanillin and 4-hydroxybenzaldehyde from vanilla beans. Sample combustion and extraction parameters were optimised. Both are basic prerequisites for the determination of accurate isotope values. By correlation of the  $\delta^{13}\text{C}_{\text{V-PDB}}$  values, clear authenticity ranges were deduced. In particular, the combination of both the component ratios and the isotope values is a considerable progress in the authenticity assessment of vanilla.

Additionally, some odour active minor components of vanilla were evaluated. Using the new and highly efficient method of stir bar sorptive extraction, the enantioselective analysis of  $\gamma$ -nonanolide and several monoterpenoids was realised. The enantiomeric ratio of  $\gamma$ -nonanolide was nearly racemic in all samples investigated. The monoterpenoids showed a broad range of enantiomeric ratios, independent of origin or year of harvest. Guaiacol – a potent odour active component – was investigated in *V. planifolia* and *V. tahitensis*. The amount of guaiacol was determined semiquantitatively and did not show any dependency on the origin of pods. Gas chromatography-olfactometry was used to identify further odour active components in the headspace of vanilla. Using this method, the components creosole and 4-hydroxybenzylamine were identified. The latter one has not been reported as a flavour compound in plants up to now. Both components, although only present in the ppb range, contribute to the complex flavour of vanilla.

## 8 Anhang

### 8.1 Abkürzungsverzeichnis

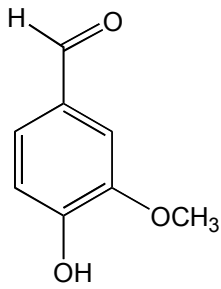
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
Abb	Abbildung
ADP	Adenosin-diphosphat
AMP	Adenosin-monophosphat
ATP	Adenosin-triphosphat
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
b	breit (NMR)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CAM	Crassulacean Acid Metabolism
cm	Zentimeter
Cut	Transfer von der Vor- auf die Hauptsäule (MDGC)
d	Duplett (NMR)
eV	Elektronenvolt
FID	Flammenionisationsdetektor
g	Gramm
GC	Gaschromatographie
GC-C-IRMS	Gaschromatographie-Combustion-Isotopenmassenspektrometrie
GC-IRMS	Gaschromatographie-Isotopenmassenspektrometrie
h	Stunde
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
i.D.	innerer Durchmesser
IRMS	Isotope Ratio Mass Spectrometry

---

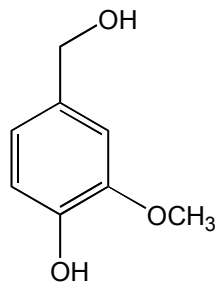
IST	interner Standard
ITD	Ion Trap Detector
m	Masse
MDGC	multidimensionale Gaschromatographie
mg	Milligramm
MHz	Megahertz
min	Minute
mm	Millimeter
MS	Massenspektrometrie
m/z	Masse / Ladungsverhältnis
NADP <sup>+</sup> /NADPH+H <sup>+</sup>	Nicotinadenin-dinucleotid-phosphat
nm	Nanometer
NMR	Kernresonanzspektroskopie
n.b.	nicht bestimmbar
n.n.	nicht nachweisbar
ppb	µg/kg
ppm	mg/kg
R <sub>f</sub>	Responsefaktor
RP	reversed phase für die HPLC
s	Singulett (NMR)
SBSE	Stir Bar Sorptive Extraction
SPME	Solid Phase Microextraction
SNIF-NMR	site specific natural isotopic fractionation, measured by NMR
Tab	Tabelle
UV	ultraviolettes Licht
vgl.	vergleiche
V-PDB	Vienna-Pee Dee Belemnite
V-SMOW	Vienna-Standard Mean Ocean Water



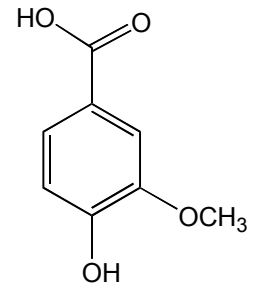
## 8.2 Verzeichnis der untersuchten Verbindungen



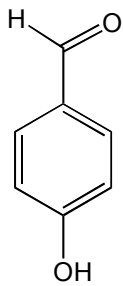
**Vanillin**  
1



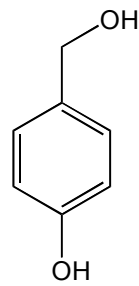
**Vanillinalkohol**  
2



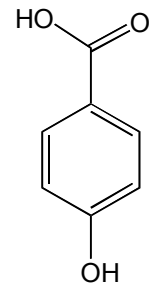
**Vanillinsäure**  
3



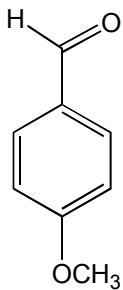
**4-Hydroxybenzaldehyd**  
4



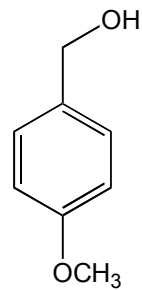
**4-Hydroxybenzylalkohol**  
5



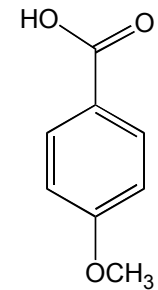
**4-Hydroxybenzoesäure**  
6



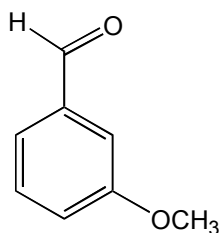
**Anisaldehyd**  
7



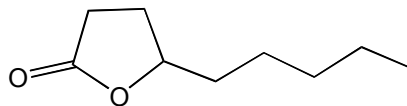
**Anisalkohol**  
8



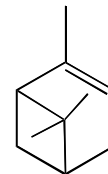
**Anissäure**  
9



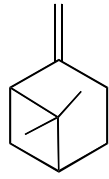
**m-Anisaldehyd**  
10



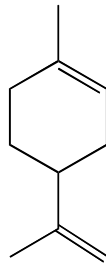
**$\gamma$ -Nonalacton**  
11



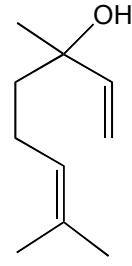
**$\alpha$ -Pinen**  
12



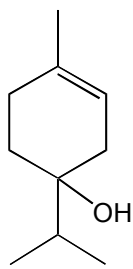
**$\beta$ -Pinen**  
13



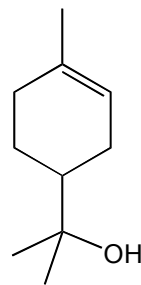
**Limonen**  
14



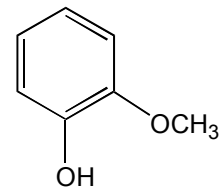
**Linalool**  
15



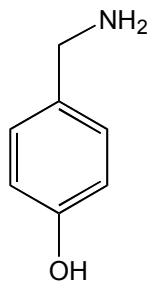
**Terpinen-4-ol**  
16



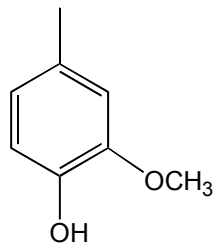
**$\alpha$ -Terpineol**  
17



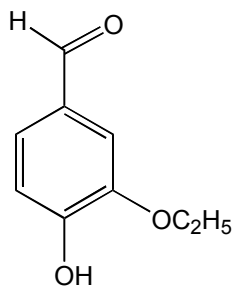
**Guajacol**  
18



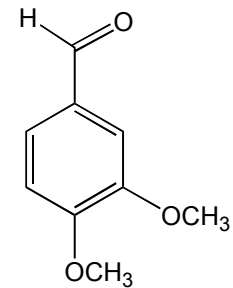
**4-Hydroxybenzylamin**  
19



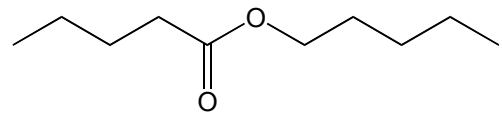
**Kreosol**  
20



**Ethylvanillin**  
IST 1



**Veratrumaldehyd**  
IST 2



**Valeriansäurepentylester**  
IST 3

### 8.3 Literaturverzeichnis

- [1] Ramachandra Rao S., Ravishankar G.A., (2000), *Vanilla flavour: production by conventional and biotechnological routes*; J. Sci. Food Agric., **80**, 289-304
- [2] Franke W., (1992), *Nutzpflanzenkunde*, 5. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York
- [3] Ranadive A.S., (1994), *Vanilla – Cultivation, Curing, Chemistry, Technology and Commercial Products.*, in: Charalambous G., (1994), *Spices, Herbs and Edible Fungi*, Elsevier, Amsterdam, London, New York
- [4] ISO 5565-1, (1999), *Vanilla [Vanilla fragrans (Salisbury) Ames] – Part 1: Specification*
- [5] Food and Agriculture Organization of the United Nations [online], erhältlich über <http://www.fao.org>
- [6] Ehlers D., Bartholomae S., (1993), *Hochdruckflüssigkeitschromatographische Untersuchung von Vanille-CO<sub>2</sub>-Hochdruckextrakten*, Z. Lebensm. Unters. Forsch., **197**, 550-557
- [7] Adeji J., Hartmann T.G., Ho C.-T., (1993), *Flavor Characterization of Different Varieties of Vanilla Beans*, Perfum. Flavor., **18**, 25-33
- [8] Klimes I., Lamparsky D., (1976), *Vanilla Volatiles – A Comprehensive Analysis*, Int. Flavours Food Addit., **7**, 272-291
- [9] ISO 5565-2, (1999), *Vanilla [Vanilla fragrans (Salisbury) Ames] – Part 1: Test methods*
- [10] AOAC, (2000), *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 17<sup>th</sup> Ed.: Association of Official Analytical Chemists: Washington DC, Methods 964.10, 966.12, 966.13, 955.31
- [11] Laub E., Kron D., (1986), *DC-Bestimmung von Vanillin und 4-Hydroxybenzaldehyd*, GIT Suppl., **2**, 37-40
- [12] Oberdieck R., (1998), *Ein Beitrag zur Kenntnis und Analytik von Vanille*, Dtsch. Lebensm. Rdschau, **94**, 53-59
- [13] Nguyen K., Barton P., Spencer J.S., (1991), *Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Vanilla*, J. Supercrit. Fluids, **4**, 40-46
- [14] Schroll W., Klein H., (1997), *New  $\beta$ -diketones in vanilla extracts (Vanilla planifolia)*, Proceedings of the 5<sup>th</sup> Wartburg Aroma Symposium, 535-541
- [15] Ehlers D., Schäfer P., Doliva H., Kirchhoff J., (1999), *Vanillingehalte und Inhaltsstoff-Verhältniszahlen von Vanilleschoten – Einfluß der*

- Extraktionsbedingungen auf die ermittelten Werte – Diskussion von Richtwerten*, Dtsch. Lebensm. Rdschau, **95**, 123-129
- [16] AOAC, (2000), *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 17<sup>th</sup> Ed.: Association of Official Analytical Chemists: Washington DC, Method 19.038, 310
- [17] Ranadive A.S., (1992), *Vanillin and Related Flavor Compounds in Vanilla Extracts Made from Beans of Various Global Origins*, J. Agric. Food Chem., **40**, 1922-1924
- [18] Jürgens U., (1981), *Zur hochdruckflüssigchromatographischen Analyse von Aromen: Untersuchung von Lebensmitteln mit Vanillegeschmack*, Dtsch. Lebensm. Rdschau, **77**, 93-96
- [19] Fayet B., Tisse C., Guerere M., Estienne J., (1987), *Nouveaux critères analytiques dans l'étude des gousses de vanille*, Analusis, **15**, 217-226
- [20] Archer A.W., (1989), *Analysis of vanilla essences by high-performance liquid chromatography*, J. Chromatogr., **462**, 461-466
- [21] REPUBLIQUE FRANCAISE, MINISTERE DE L'ECONOMIE; DES FINANCES ET DU BUDGET – DIRECTION GENERALE DE LA CONCURRENCE; DE LA CONSOMMATION ET DE LA REPRESSION DE FRAUDES – Service de la Consommation de la Qualité et de la Sécurité-Sous-Direction H – Bureau H2 (Hygiene): Etiquetage informatif. Fruit tropicaux. Huiles essentielle, arômes naturels et synthétique, Note de Service 5387, Object: Commercialisation et l'emploi de la vanille et des arômes de flaveur vanille. – Paris, le 17 octobre 1988
- [22] Fraisse D., Maquin F., Stahl D., Suon K., Tabet J.C., (1984), *Analyse d'extraits de vanille par chromatographie en phase liquide, couplage chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse et spectrométrie de masse-spectrométrie de masse*, Analusis, **12**, 63-71
- [23] Lamprecht G., Pichlmayer F., Schmid E.R., (1994), *Determination of the Authenticity of Vanilla Extracts by Stable Isotope Ratio Analysis and Component Analysis by HPLC*, J. Agric. Food Chem., **42**, 1722-1727
- [24] Guarino P.A., Brown S.M., (1985), *Liquid Chromatographic Determination of Vanillin and Related Flavor Compounds in Vanilla Extract: Cooperative Study*, J. Assoc. Off. Anal. Chem., **68**, 1198-1201
- [25] Kahan S., (1989), *Liquid chromatographic Method for Determination of Vanillin and Related Flavor Compounds in Vanilla Extract: Collaborative Study*, J. Assoc. Off. Anal. Chem., **72**, 614-618

- [26] Anklam E., Müller A., (1993), *Extraktion von Vanillin und Ethylvanillin aus Vanille-Zuckern verschiedener europäischer Provenienz mit Hilfe von überkritischem Kohlendioxid*, Dtsch. Lebensm. Rdschau, **89**, 344-346
- [27] Gubler B.A., (1969), *Anwendung der Gaschromatographie bei der Kontrolle von Aromen*, Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg., **60**, 418-435
- [28] Nakazawa Y., Tatsumi S., Izumitani M., Inagaki C., (1981), *Studies on the Vanilla Flavours for Food Processing (I) Analysis of Vanilla Flavouring Concentrates by Gaschromatography*, Jap. J. Dairy and Food Science, **30**, A-39-A-45
- [29] Nakazawa Y., Tatsumi S., Izumitani M., Inagaki C., Nakanishi T., (1981), *Studies on the Vanilla Flavours for Food Processing (II) Distribution and Contribution of Vanilla Flavours to the Flavourings*, Jap. J. Dairy and Food Science, **30**, A-47-A-53
- [30] Mariani M., Scotti A., Colombo E., (1982), *Vanilla: from the origin to its analysis*, Quintessenza (Milan), **18**, 3-25
- [31] Dawson T.E., Brooks P.D., (2001), *Fundamentals of Stable Isotope Chemistry and Measurement*, in: Unkovich M., Pate J., McNeill A., Gibbs D.J., *Stable Isotope Techniques in the Study of Biological Processes and Functioning of Ecosystems*, Kluwer Academic Publishers; Dordrecht, Boston, London
- [32] Krueger H.W., Reesman R.H., (1982), *Carbon isotope analyses in food technology*, Mass Spectrom. Rev., **1**, 205-236
- [33] Smith B.N., Epstein S., (1971), *Two Categories of  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  Ratios for Higher Plants*, Plant Physiol., **47**, 380-384
- [34] Nultsch W., (1991), *Allgemeine Botanik*, 9. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York
- [35] Belitz H.-D., Grosch W., (1992), *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*, 4. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg
- [36] Martin G., Remaud, G., Martin G.J., (1993), *Isotopic Methods for Control of Natural Flavours Authenticity*, Flav. Fragr. J., **8**, 97-107
- [37] Maubert C., Guêrin C., Mabon F., Martin G.J., (1988), *Détermination de l'origine de la vanilline par analyse multidimensionnelle du fractionnement isotopique naturel spécifique de l'hydrogène*, Analusis, **16**, 434-439
- [38] Remaud G.S., Martin Y.-L., Martin G.G., Martin G.J., (1997), *Detection of Sophisticated Adulterations of Natural Vanilla Flavors and Extracts:*

- Application of the SNIF-NMR Method to Vanillin and p-Hydroxybenzaldehyde*, J. Agric. Food Chem., **45**, 859-866
- [39] Bricout J., Fontes J.-C., Merlivat L., (1974), *Detection of Synthetic Vanillin in Vanilla Extracts by Isotopic Analysis*, J. Ass. Off. Anal. Chem., **57**, 713-715
- [40] Schmidt H.L., Roßmann A., Werner R.A., (1998), *Stable Ratio Analysis in Quality Control of Flavorings*, in: Ziegler E., Ziegler H. (ed.), *Flavourings*; Wiley-VCH, Weinheim
- [41] Hoffman P.G., Salb M., (1979), *Isolation and Stable Ratio Analysis of Vanillin*, J. Agric. Food Chem., **27**, 352-355
- [42] Fellous R., George G., Schippa C., (1992), *Vanilline: anomalies dans le protocole d'identification par <sup>13</sup>C*, Parf., Cosm., Aromes, **106**, 95-97
- [43] Bricout J., Koziat J., Derbesy M., Beccat B., (1981), *Nouvelles Possibilités de l'Analyse des Isotopes Stables du Carbone dans le Contrôle de la Qualité des Vanilles*, Ann. Fals. Exp. Chim., **74**, 691-696
- [44] Derbesy M., Troney C., Bayle J.-C., (1982), *contribution à l'étude des gousses de vanille – Critères analytiques de différents lots de gousses Madagascar, Récolte 1980*, Parf., Cosm., Aromes, **43**, 73-77
- [45] Arnaud N., Bayle J.-C., Derbesy M., (1983), *étude des gousses de vanille Madagascar – critères analytiques de la récolte 1981*, Parf., Cosm., Aromes, **53**, 99-101
- [46] Krueger D.A., Krueger H.W., (1983), *Carbon Isotopes in Vanillin and the Detection of Falsified „Natural“ Vanillin*, J. Agric. Food Chem., **31**, 1265-1268
- [47] Krueger D.A., Krueger H.W., (1985), *Detection of Fraudulent Vanillin Labeled with <sup>13</sup>C in the Carbonyl Carbon*, J. Agric. Food Chem., **33**, 323-325
- [48] Kaunzinger A., Juchelka D., Mosandl A., (1997), *Progress in the Authenticity Assessment of Vanilla. 1. Initiation of Authenticity Profiles*; J. Agric. Food Chem., **45**, 1752-1757
- [49] Culp R.A., Legato J.M., Otero E., (1998), *Carbon Isotope Composition of Selected Flavoring Compounds for the Determination of Natural Origin by Gas Chromatography / Isotope Ratio Mass Spectrometry*, ACS Symp. Ser., **705** (Flavor Analysis), 260-287

- [50] Fayet B., Saltron F., Tisse C., Guerere M., (1999), *Contribution à la caractérisation isotopique des gousses de vanille*, Ann. Fals. Exp. Chim., **92**, 11-16
- [51] Aromenverordnung vom 22. Dezember 1981, zuletzt geändert durch Art. 19 VO zur Neuordnung lebensmittelrechtlicher Vorschriften über Zusatzstoffe v. 29.1.1998, BGBl. III/FNA 2125-40-27
- [52] Brunke E.-J., Hammerschmidt F.-J., Rittler F., Schmaus G., (1997), *Scents of Nature: Analytical and Sensory Information as a Tool for Creativity*, Riv. Ital. EPPOS, 338-354
- [53] Sostaric T., Boyce M.C., Spickett E.E., (2000), *Analysis of the Volatile Components in Vanilla Extracts and Flavorings by Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography*, J. Agric. Food Chem., **48**, 5802-5807
- [54] Hartmann T.G., Karmas K., Chen J., Shevade A., Deagro M., Hwang H.-I., (1992), *Determination of Vanillin, Other Phenolic Compounds, and Flavors in Vanilla Beans*, ACS Symp. Ser., **506**, 60-76
- [55] Ehlers D., (1999), *HPLC-Untersuchung von Handelsprodukten mit Vanille oder Vanillearoma*, Dtsch. Lebensm. Rdschau, **95**, 464-468
- [56] Mosandl A., (1995), *Enantioselective Capillary Gas Chromatography and Stable Isotope Ratio Mass Spectrometry in the Authenticity Control of Flavors and Essential Oils*, Food Rev. Int., **11**, 597-664
- [57] Schreier P., Bernreuther A., Huffer M., (1995), *Analysis of Chiral Organic Molecules: Methodology and Applications*, Walter de Gruyter, Berlin, New York
- [58] Maas B., Dietrich A., Karl V., Kaunzinger A., Lehmann D., Köpke T., Mosandl A., (1993), *tert-Butyldimethylsilyl-substituted Cyclodextrin Derivatives as Versatile Chiral Stationary Phases in Capillary GC*, J. Microcol. Sep., **5**, 421-427
- [59] Baltussen E., Sandra P., David F., Cramers C., (1999), *Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE), a Novel Extraction Technique for Aqueous Samples: Theory and Principles*, J. Microcol. Sep., **11**, 737-747
- [60] Bicchi C., Cordero C., Iori C., Rubiolo P. Sandra P., (2000), *Headspace Sorptive Extraction (HSSE) in the Headspace Analysis of Aromatic and Medicinal Plants*, J. High Resol. Chromatogr., **23**, 539-546

- [61] Kreck M., Scharrer A., Bilke S., Mosandl A., (2002), *Enantioselective analysis of monoterpene compounds in essential oils by stir bar sorptive extraction (SBSE)-enantio-MDGC-MS*, Flav. Fragr. J., **17**, 32-40
- [62] Schulte-Elte K.H., Gautschi F., Renold W., Hauser A., Fankhauser P., Limacher J., Ohloff G., (1978), *Vitispiranes, Important Constituents of Vanilla Aroma*, Helv. Chim. Acta, **61**, 1125-1133
- [63] Herion P., Full G., Winterhalter P., Schreier P., (1993), *Enantio-differentiation of Isomeric Vitispiranes*, Phytochem. Anal., **4**, 235-239
- [64] Nitz S., Kollmannsberger H., Drawert F., (1989), *Über den Nachweis von nicht natürlichen Aromen in Fruchtschaumweinen. 2. Enantiomere  $\gamma$ -Lactone in Passionsfrüchten und Passionsfruchtprodukten*, Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm., **12**, 105-110
- [65] Kollmannsberger H., Nitz S., Drawert F., (1991), *Über den Nachweis von nicht natürlichen Aromen in Fruchtschaumweinen. 3. Enantiomere  $\gamma$ -Lactone in Ananasfrüchten und Ananasprodukten*, Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm., **13**, 58-63
- [66] Wörner M., Pflaum M., Schreier P., (1991), *Additional Volatile Constituents of Artemisia vulgaris L. Herb*, Flav. Fragr. J., **6**, 257-260
- [67] Wörner M., Schreier P., (1991), *Flüchtige Inhaltsstoffe aus Tonkabohnen (Dipteryx odorata Willd.)*, Z. Lebensm. Unters. Forsch., **193**, 21,25
- [68] Crawford R.L., Olson P.P., (1978), *Microbial Catabolism of Vanillate: Decarboxylation to Guaiacol*, Appl. Environ. Microbiol., **36**, 539-543
- [69] Huang Z., Dostal L., Rosazza J.P.N., (1993), *Mechanisms of Ferulic Acid Conversions to Vanillic Acid and Guaiacol by Rhodotorula rubra*, J. Biol. Chem., **268**, 23954-23958
- [70] Grosch W., (1993), *Detection of potent odorants in foods by aroma extract dilution analysis*, Trends in Food Sci. Technol., **4**, 68-73
- [71] van Ruth S.M., (2001), *Methods for gas chromatography-olfactometry: a review*; Biomolecular Engineering, **17**, 121-128



## 8.4 Eigene Publikationen

Podebrad F., Heil M., Scharrer A., Feldmer S., Schulte-Mäter O., Mosandl A., Sewell A.C., Böhles H.J., (1999), *Analysis of methylcitric acid by enantioselective multidimensional gas chromatography-mass spectrometry*, J. High Resol. Chromatogr., **22**, 604-608

Kreck M., Scharrer A., Bilke S., Mosandl A., (2001), *Stir bar sorptive extraction (SBSE)-enantio-MDGC-MS – a rapid method for the enantioselective analysis of chiral flavour compounds in strawberries*, Eur. Food Res. Technol., **213**, 389-394

Scharrer A., Mosandl A., (2001), *Reinvestigation of vanillin contents and component ratios of vanilla extracts using high-performance liquid chromatography and gas chromatography*, Dtsch. Lebensm. Rdschau, **97**, 449-456

Kreck M., Scharrer A., Bilke S., Mosandl A., (2002), *Enantioselective analysis of monoterpene compounds in essential oils by stir bar sorptive extraction (SBSE)-enantio-MDGC-MS*, Flav. Fragr. J., **17**, 32-40

Scharrer A., Mosandl A., (2002), *Progress in the Authenticity Assessment of Vanilla. 2.  $\delta^{13}C_{V-PDB}$  Correlations and Methodical Optimisations*, Dtsch. Lebensm. Rdschau, **98**, 117-121

## 8.5 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name Annette Scharrer  
geboren 15.12.1973 in Nördlingen  
Anschrift Rennbahnstrasse 12  
60528 Frankfurt am Main  
Familienstand ledig

### Schulbildung

1980-1984 Grundschule in Nördlingen  
1984-1993 Gymnasium in Nördlingen  
Juli 1993 Allgemeine Hochschulreife in Nördlingen

### Hochschulausbildung

Oktober 1993 – Oktober 1997 Studium der Lebensmittelchemie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main  
September 1995 Diplom-Chemiker-Vorprüfung  
Oktober 1995 Botanik-Vorprüfung im Rahmen der Vorprüfung für Lebensmittelchemiker  
Oktober 1997 Hauptprüfung für Lebensmittelchemiker, Teil A  
seit Januar 1998 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Lebensmittelchemie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main