

Grundlagenpapier

der Arbeitsgruppen "Aromastoffe" und "Stabilisotopenanalytik" in der Lebensmittelchemischen Gesellschaft zum Thema

Herkunft und Authentizität von Vanillearomen

Einleitung

Vanillearomen zählen zu den weltweit am häufigsten eingesetzten Aromen. Sie werden für die Aromatisierung zahlreicher Lebensmittel wie etwa Eiscreme, Milchprodukte, Süßspeisen, Konfekt, Backwaren und Spirituosen verwendet. Auch in Parfums und Körperpflegeprodukten werden sie eingesetzt.

Natürliches Vanillearoma wird traditionell aus den Kapsel Früchten der Gewürzvanille (*Vanilla planifolia*) gewonnen, die landläufig als "Vanilleschoten" bezeichnet werden. Obwohl streng genommen botanisch falsch, wird im Folgenden diese übliche Bezeichnung verwendet. Die entscheidende aromaaktive Substanz des Vanillearomas ist Vanillin (4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd). Es wird überwiegend erst nach der Ernte im Verlauf eines mehrwöchigen Trocknungs- und Fermentationsprozesses der Schoten durch Hydrolyse des in den Früchten vorkommenden Vanillinglucosids gebildet.

Vanillin besitzt ein charakteristisches, angenehm süßliches Aroma. Sein Wahrnehmungsschwellenwert in Lebensmitteln liegt je nach Matrix bei 30 bis 200 µg/kg [1].

Neben natürlichem Vanillearoma wird biotechnologisch und synthetisch hergestelltes Vanillin zur Aromatisierung von Lebensmitteln eingesetzt. Da einerseits die Nachfrage nach natürlichem Vanillearoma bzw. nach aus der Vanilleschote isoliertem Vanillin sehr hoch ist und andererseits biotechnologisch gewonnenes und synthetisches Vanillin deutlich preisgünstiger sind, ist das Problem von Verfälschungen und irreführenden Angaben hier besonders groß.

Verbraucherorganisationen veröffentlichen regelmäßig Ergebnisse von Untersuchungen zur Echtheit des als "natürlich" deklarierten Vanillearomas in Lebensmitteln. Dabei wird meist über eine hohe Beanstandungsquote hinsichtlich der Echtheit des Vanillearomas bzw. des Vanillins berichtet. Diese Bewertungen beruhen auf analytischen Befunden, die Beurteilungskriterien und die Kenndaten zur Zuverlässigkeit der Analyseverfahren werden jedoch nur den betroffenen Herstellern umfassend offengelegt.

Im vorliegenden Positionspapier der Arbeitsgruppen „Aromastoffe“ und „Stabilisotopenanalytik“ der Lebensmittelchemischen Gesellschaft werden die gebräuchlichen Methoden und Kriterien zur Beurteilung der Authentizität von Vanille vorgestellt und einer kritischen Betrachtung unterworfen.

Urproduktion der Gewürzvanille

Hauptanbaugebiete des in Mittelamerika und Mexiko beheimateten tropischen Lianengewächses aus der Familie der *Orchidaceae* sind Madagaskar, die Komoren, Uganda, Mexiko, Indien, Indonesien, Tahiti, Papua-Neuguinea, Guadeloupe, La Réunion und Martinique.

Von den etwa 100 bekannten Vanilla-Arten werden nur drei kultiviert [2,3,4]:

- Die größte wirtschaftliche Bedeutung besitzt ***Vanilla planifolia*** Andrews (Syn. *Vanilla fragrans* (Salisbury) Ames). Je nach Herkunft wird sie auch unter Bezeichnungen wie Bourbon-, Madagaskar- oder Mexiko-Vanille gehandelt. Der natürliche Vanillingehalt bei getrockneten und fermentierten Vanilleschoten beträgt – je nach Erntejahr und -zeitpunkt sowie bedingt durch außergewöhnliche Witterungseinflüsse – 1,6 bis 2,4 %. Als charakteristische Begleitstoffe treten vor allem *p*-Hydroxybenzaldehyd, *p*-Hydroxybenzoesäure, Vanillinsäure, Vanillinalkohol und *p*-Hydroxybenzylalkohol auf [2].

Der Hinweis "Bourbon" ist als geographische Herkunftsbezeichnung zu betrachten. Das Ausgangsmaterial muss bei einem entsprechenden Hinweis von den „Vanille-Inseln“ (Madagaskar, Komoren, Réunion, Seychellen, Mauritius) stammen [4,5].

Die Ausdrücke Bourbon-Vanille, echte Vanille oder entsprechende Hinweise in der Kennzeichnung eines aromatisierten Lebensmittels sind nur bei Verwendung von *Vanilla planifolia* Andrews zulässig [6,5]

- ***Vanilla tahitiensis*** J. W. Moore (,Tahiti-Vanille') zeichnet sich durch eine in Richtung Anis gehende Note aus, zu der insbesondere Substanzen wie *p*- und *m*-Anisaldehyd, Anisalkohol und Anissäure beitragen. Mit etwa 1% liegt der Anteil des Vanillins niedriger als bei *Vanilla planifolia* Andrews, der Anteil der *p*-Hydroxybenzoesäure dagegen höher [2,3].
- ***Vanilla pompona*** Schiede (auch ,Guadeloupe'- oder ,Antillen-Vanille') findet nur für pharmazeutische Produkte und Parfüms Verwendung.

Gewinnungs- und Herstellungsverfahren von Vanillearomen und Vanillin

- **Vanilleextrakte** werden üblicherweise durch Extraktion von Vanilleschoten mit Ethanol gewonnen. Sogenannte Vanilleauszüge sind durch Extraktion mit Ethanol und Wasser gewonnene Produkte, bei denen das Extraktionsmittel im Produkt verbleibt.

Eine zunehmende Bedeutung erfährt auch die Extraktion mittels überkritischem CO₂. Die so gewonnenen Erzeugnisse unterscheiden sich in ihrer Zusammensetzung deutlich von den alkoholischen Vanilleextrakten. Dies betrifft sowohl die absoluten Gehalte an Vanillin, Vanillinsäure, *p*-Hydroxybenzaldehyd und *p*-Hydroxybenzoesäure als auch deren Konzentrationsverhältnisse. [7, 8].

CO₂-Extrakte der Vanille werden in der Regel zu höheren Preisen gehandelt als die alkoholisch/wässrigen. Sie weisen mehr ,Süße' als die Ethanolextrakte, aber kaum Farbe auf und werden deshalb bevorzugt in der alkoholischen Parfümerie eingesetzt. Darüber hinaus wird das Verfahren genutzt, um Vanillin-angereicherte Extrakte sowie Isolate des natürlichen Aromastoffs für die Lebensmittelherstellung zu gewinnen.

- **Biosynthetisch gewonnenes Vanillin:** Das derzeit wirtschaftlich bedeutsamste biotechnologische Verfahren zur Gewinnung von natürlichem Vanillin basiert auf der Verwendung von aus Reis stammender Ferulasäure als Substrat. Aus Eugenol, das aus Nelkenöl isoliert wurde, kann ebenfalls per Biotransformation natürliches Vanillin erhalten werden [9]. Weiterhin ist eine fermentative Umsetzung von Curcumin möglich. Dieses EU-patentiertere Verfahren wurde bisher jedoch noch nicht auf industrielle Maßstäbe übertragen.
- **Chemosynthetisch gewonnenes Vanillin:** Der überwiegende Anteil chemosynthetischen Vanillins wird ausgehend von Guajakol durch Addition von Glyoxylsäure und anschließende Oxidation und Decarboxylierung gewonnen [10, 11]. Nur noch ein kleiner Anteil wird durch Oxidation von Ligninsulfonsäure erhalten, die im Zuge der Sulfitlaugerei bei der Papier- und Cellulosegewinnung anfällt. Ein anderes Verfahren, das auch nur noch untergeordnete Bedeutung besitzt, geht von Eugenol aus Nelkenöl aus, das durch Isomerisierung und oxidative Spaltung in Vanillin umgewandelt werden kann.

Analysenmethoden zur Authentizitätsprüfung von Vanillearomen und Vanillin

a) HPLC und GC

Natürliches Vanillearoma enthält neben Vanillin weitere charakteristische Begleitstoffe wie z.B. *p*-Hydroxybenzaldehyd, Vanillinsäure und *p*-Hydroxybenzoesäure. Die Konzentrationen dieser Komponenten stehen in natürlichem Vanillearoma in charakteristischen Verhältnissen zueinander und können unter bestimmten Umständen zur Authentizitätsprüfung herangezogen werden. Für die quantitative Bestimmung dieser Stoffe kommen HPLC- und GC-Methoden zum Einsatz [12, 13].

Zur Probenvorbereitung für die HPLC wird üblicherweise mit Methanol oder Ethanol verdünnt bzw. extrahiert [13]. Bei Vanilleschoten können allerdings störende Matrixeffekte auftreten. Durch alternative Extraktion mit Diethylether lässt sich in solchen Fällen gegebenenfalls eine bessere Abtrennung der interessierenden Stoffe erreichen [12]. Aus komplexen Lebensmitteln können Dichtungsmittel mit Ethanol gefällt werden, oft ist hier auch eine Klärung nach Carrez [15,16] und/oder eine Entfettung mit einem unpolaren Lösungsmittel erforderlich. Die Chromatographie erfolgt an RP-Phasen bei UV-Detektion [13].

Die Probenvorbereitung für die GC kann in vergleichbarer Weise durchgeführt werden [12, 13, 14]. Bei komplexeren Lebensmittelmatrices kann eine zusätzliche Extraktion mit einem unpolaren Lösungsmittel (z. B. Pentan/Diethylether) und/oder eine Isolierung an Festphasen erforderlich sein [13]. Die chromatographische Trennung erfolgt vorzugsweise auf mittelpolaren oder stark polaren Fused Silica Kapillarsäulen [12,13].

Die besondere Stärke der GC liegt in der Möglichkeit, im Aroma der Vanilleschote enthaltene Minor Komponenten wie beispielsweise Guajacol oder verschiedene Lactone und Monoterpene miterfassen zu können. Die Enantiomerenanalytik an chiralen Säulen hat gezeigt, dass insbesondere Limonen und β -Pinen in Vanilleextrakten einen signifikanten Überschuss an einer der beiden optisch aktiven Formen aufweisen [12].

Beurteilung der Authentizität von Vanillin über Kennzahlen der HPLC- oder GC-Analyse

Tabelle 1 zeigt in einer Übersicht die Schwankungsbreiten der Konzentrationsverhältnisse von Vanillin zu seinen Begleitstoffen, wie sie in verschiedenen wissenschaftlichen Studien ermittelt worden sind. Die angegebenen Schwankungsbereiche spiegeln - wie bei Naturprodukten üblich - Abhängigkeiten von den Anbau- und Bearbeitungsbedingungen (Klima, Bodenverhältnisse, Erntezeitpunkt, Fermentationsverfahren) wider [12].

Tabelle 1: Schwankungsbreiten der Konzentrationsverhältnisse von Vanillin zu seinen Begleitstoffen, ermittelt in verschiedenen wissenschaftlichen Untersuchungen.

Konzentrationsverhältnis	Schwankungsbreite	
	Literatur [17]	Literatur [15,16]
Vanillin / <i>p</i> -Hydroxybenzaldehyd	10 - 20	9 - 28
Vanillin / <i>p</i> -Hydroxybenzoesäure	40 - 110	14 - 152
Vanillin / Vanillinsäure	12 - 29	4 - 29
<i>p</i> -Hydroxybenzoesäure / <i>p</i> -Hydroxybenzaldehyd	0,15 - 0,35	0,14 - 1,4
Vanillinsäure / <i>p</i> -Hydroxybenzaldehyd	0,53 - 1,50	0,61 - 3,48

Als anerkannte Referenz für die in Bourbon-Vanille zu erwartenden Konzentrationsverhältnisse gelten die in der französischen „note d'information 2003-61“ veröffentlichten Verhältniswerte

(Kennzahlen) [17]. Die dort aufgeführten Werte wurden auf der Grundlage von ethanolischen Extrakten der Bourbon-Vanille ermittelt. Eine Reihe von wissenschaftlichen Untersuchungen der letzten Jahre zeigen jedoch Werte, die von den in [17] dargestellten nicht unerheblich abweichen.

Beispielsweise haben Untersuchungen an *Vanilla planifolia* aus den Erntejahren 2006 und 2007 nicht unbeträchtliche Abweichungen von den oben dargestellten Wertebereichen aufgezeigt [18]. Nur rund die Hälfte der aus Madagaskar stammenden Schoten der Kategorie "red beans", welche den überwiegenden Anteil der dortigen Gesamterzeugung ausmachen, entsprachen vollständig den in [17] gemachten Vorgaben. Für Ware dieser Provenienz wurde eine Tendenz zu höheren Gehalten an Vanillinsäure und niedrigeren Konzentrationen an *p*-Hydroxybenzaldehyd und *p*-Hydroxybenzoesäure festgestellt. Als Ursache werden zum einen modifizierte Fermentationsverfahren angeführt, zum anderen haben veränderte klimatische Bedingungen sowie die anhaltende gesellschaftliche Krisensituation in Madagaskar sich in den letzten Jahren teilweise erheblich auf den Anbau ausgewirkt. Auch dies könnte die stoffliche Zusammensetzung der Vanilleschoten beeinflusst haben.

Daraus ist abzuleiten, dass die in [17] genannten Verhältniszahlen nicht die gesamte Schwingungsbreite der Konzentrationsverhältnisse von natürlicher Bourbon-Vanille widerspiegeln.

Zu beachten ist darüber hinaus, dass sich die Konzentrationsverhältnisse im Laufe der Verarbeitung des Rohstoffs oder des aromatisierten Lebensmittels verschieben können. Dies ist insbesondere in folgenden Fällen in Betracht zu ziehen:

- Verwendung von anderen Extraktionsmitteln als Ethanol/Wasser, z.B. Kohlendioxid, Diethylether [15] oder 1,1,1,2-Tetrafluoroethan [19]
- Produktionsbedingungen, die eine thermisch induzierte Oxidation des Vanillins zu Vanillinsäure begünstigen [20]
- Milchhaltige Lebensmittel. In frischer und pasteurisierter Milch ist oftmals eine mikrobiell bzw. enzymatisch induzierte Oxidation von Vanillin zu Vanillinsäure sowie von *p*-Hydroxybenzaldehyd zu *p*-Hydroxybenzoesäure zu beobachten [21, 22]. Es wurde deshalb eine modifizierte Verhältniszahl

$$VZ_{(A+S)} = \frac{c [\text{Vanillin}] + c [\text{Vanillinsäure}]}{c [\text{pHBA}] + c [\text{pHBS}]}$$

(pHBA: *p*-Hydroxybenzaldehyd, pHBS: *p*-Hydroxybenzoesäure)

eingeführt [23], die diesem Effekt dadurch Rechnung trägt, dass die Reaktionsprodukte in die Berechnung mit einbezogen werden. Auf Basis der in Tabelle 1 angeführten Verhältniszahlen aus [17] errechnet sich für die modifizierte Verhältniszahl $VZ_{(A+S)}$ ein charakteristischer Wertebereich von 8,3 bis 18,3. Bei starker Oxidation des Vanillins sollte allerdings hinterfragt werden, inwieweit das abweichende Aromaprofil in stofflicher und sensorischer Hinsicht noch einem verkehrstüblichen Vanillearoma und der Aufmachung des Erzeugnisses entspricht.

- Lebensmittel, die unter Verwendung von Rahm oder Buttereinfett aus EU-Subventionsbeständen hergestellt wurden. Diese Rohstoffe können gemäß der Verordnung EG Nr. 2571/97 mit Vanillin aus der Vanilleschote bzw. synthetischer Herkunft markiert sein, die Mindestmenge beträgt 250 mg/kg. Bei entsprechender Rezeptur beispielsweise eines Vanille-Speiseeises kann sich dieser Umstand merklich auf die im Endprodukt ermittelten Verhältniszahlen auswirken.

Die Kennzahlen sind folglich nur bedingt für die Authentizitätsprüfung von Vanillearomen geeignet. Es wird deutlich, dass deren Interpretation ohne Kenntnis der Produktionsbedingungen und Einflussfaktoren in bestimmten Fällen zu einer falschen Beurteilung führen kann.

Das Verfahren wird nicht zuletzt auch durch die analytischen Bestimmungsgrenzen für die gering konzentrierten Komponenten limitiert. Bei relativ niedriger Dosierung eines Vanillearomas in einem Lebensmittel mag zwar für Vanillin ein Gehalt anzugeben sein, die zu erwartenden

Konzentrationen der charakteristischen Begleitstoffe können aber bereits unter den Nachweis- oder Bestimmungsgrenzen liegen. Verringerte Wiederfindungsraten, wie sie etwa bei stark dickungsmittelhaltigen Lebensmitteln auftreten können, sind bei der Validierung von Analyseverfahren daher auch zu berücksichtigen.

b) Stabilisotopenanalytik

Natürliches Vanillin, das aus der Vanilleschote gewonnen wird, kann von synthetisch oder biotechnologisch hergestelltem Vanillin anhand der Stabilisotopenverhältnisse unterschieden werden. Die wissenschaftlichen Grundlagen, die auf der Fraktionierung der stabilen Isotope basieren, sind in der Fachliteratur ausführlich beschrieben [24]. Pflanzen bzw. deren Inhaltsstoffe weisen entsprechend ihres Photosyntheseweges spezifische Stabilisotopenverhältnisse der Elemente Kohlenstoff ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) und Wasserstoff ($^2\text{H}/^1\text{H}$) auf. So sind bei Pflanzen drei Photosynthesewege für die CO_2 -Fixierung bekannt. So genannte C_3 -Pflanzen (z. B. Weizen, Reis, Zuckerrübe) nutzen die Ribulosebisphosphat-Carboxylase Reaktion, während C_4 -Pflanzen (z. B. Rohrzucker, Mais) die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase Reaktion nutzen. CAM-Pflanzen wie Sukkulenten und Orchideen (z. B. *Vanilla planifolia*) haben den Crassulacean Acid Metabolismus.

Stabilisotopen-Verhältnismassenspektrometrie (IRMS)

Gaschromatographie-IRMS (GC-IRMS) und Elementaranalysator (EA-IRMS)

Durch direkte Kopplung eines Elementaranalysators (EA) oder eines Gaschromatographen (GC) mit einem Isotopenverhältnis-Massenspektrometer (IRMS) ist es möglich, die stabilen Isotope von Kohlenstoff, Sauerstoff und Wasserstoff sehr präzise zu bestimmen.

Der Einsatz der GC-IRMS ermöglicht die komponentenspezifische Analyse der Isotopenverhältnisse des Vanillins und bei genügender Konzentration auch der Begleitstoffe in einem Lösungsmittel-extrakt. Die Bestimmung der Kohlenstoffisotopenverhältnisse erfolgt mit GC-Combustion-IRMS (GC-C-IRMS) und die der Sauerstoff- und Wasserstoffisotopenverhältnisse mit GC-Pyrolyse-IRMS (GC-P-IRMS).

In präparativ isoliertem Vanillin können die $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ und $^2\text{H}/^1\text{H}$ -Isotopenverhältnisse mit einem High Temperature Conversion Elemental Analyzer (TC/EA) und die $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenverhältnisse mit Combustion Elemental Analyzer (C/EA) bestimmt werden [25].

Bei allen Verfahren werden z. B. für Kohlenstoff die Konzentrationen der Isotope ^{13}C und ^{12}C ins Verhältnis gesetzt und auf den international festgelegten Standard, Vienna Pee Dee Belemnite (VPDB) bezogen. Entsprechend der Formel

$$\delta^{13}\text{C} [\text{‰}] = \left(\frac{[^{13}\text{C}]_{\text{sample}} / [^{12}\text{C}]_{\text{sample}}}{[^{13}\text{C}]_{\text{standard}} / [^{12}\text{C}]_{\text{standard}}} - 1 \right) \cdot 1000$$

wird der delta-Wert ($\delta^{13}\text{C}$ -Wert) des Kohlenstoff-Isotopenverhältnisses ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) in Promille (‰) VPDB angegeben.

Das Isotopenverhältnis des Wasserstoffs ($^2\text{H}/^1\text{H}$) und des Sauerstoffs ($^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$) wird entsprechend als $\delta^2\text{H}$ - bzw. $\delta^{18}\text{O}$ -Wert berechnet und in ‰ VSMOW (Vienna Standard Mean Ocean Water) angegeben.

Die bislang im Rahmen von zahlreichen Proficiency Tests verschiedener Labors durch EA-IRMS- und GC-IRMS ermittelten $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von isoliertem Vanillin zeigten eine sehr gute Vergleichbarkeit, so dass diese Methoden als validiert zu bewerten sind.

Tabelle 2 gibt eine Übersicht der in der Fachliteratur publizierten Stabilisotopenverhältnisse des Kohlenstoffs und Wasserstoffs im Vanillin verschiedener geographischer und botanischer Herkünfte bzw. von Vanillin, hergestellt aus verschiedenen Rohstoffen.

Tabelle 2: Stabilisotopenverhältnisse von Kohlenstoff und Wasserstoff des Vanillins verschiedener Herkünfte und Herstellungsverfahren, ermittelt in verschiedenen wissenschaftlichen Untersuchungen

Herkunft/ Rohstoff des Vanillins	$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ [‰]	$\delta^2\text{H}_{\text{VSMOW}}$ [‰]	Literatur
ex Schote (Bourbon)	-21,5 bis -19,2		[26]
ex Schote (Tahiti)	-19,7 bis -15,9		[26]
ex Schote	> -21		[27]
ex Schote	-21,5 bis 16,8	-115 bis -52	[24]
ex Schote	-22,0 bis -19,0		[21]
ex Guajakol	-36,2 bis -24,9	-23 bis -17	[24]
ex Eugenol	-31,7 bis -29,9		[24]
ex Lignin	-28,7 bis -26,5	-204 bis -170	[24]
ex Ferulasäure aus Reiskleie	-37 bis -36		[17]

Bereits der $\delta^{13}\text{C}$ -Wert ermöglicht es, Vanillin verschiedener botanischer Herkünfte sowie verschiedener Herstellungsverfahren zu unterscheiden:

- Natürliches Vanillin aus *Vanilla planifolia* oder *Vanilla tahitiensis* bzw. aus wässrig-ethanolischen Extrakten dieser Varietäten weist $\delta^{13}\text{C}$ -Werte auf, die positiver als -21,5 ‰ VPDB sind.
- Für Vanillin, das biotechnologisch - z.B. aus Ferulasäure - hergestellt wird und lebensmittelrechtlich als natürliches Vanillin bezeichnet werden darf, sind $\delta^{13}\text{C}$ -Werte im Bereich von -36 bis -37 ‰ VPDB charakteristisch.
- Vanillin, das chemisch aus Lignin, Eugenol oder Guajakol synthetisiert wird und nach der noch gültigen AromenV als „naturidentisch“ einzustufen ist, besitzt $\delta^{13}\text{C}$ -Werte, die negativer als -25 ‰ VPDB sind.

Grundsätzlich muss eine allgemeine instrumentelle Messunsicherheit bzw. die im Rahmen von Ringversuchen oder Laborvergleichsuntersuchungen ermittelte Vergleichbarkeit dieser Analytik berücksichtigt werden; nach den bisherigen Erkenntnissen liegt sie für Vanillin bei +/- 1 ‰ VPDB. Dabei ist für eine valide Analytik vorauszusetzen, dass die eingesetzten Messtechniken sowie die Laborverfahren zur Isolierung und Anreicherung des Vanillins insbesondere aus fett- und milchhaltigen Matrices zu keinen Artefakten durch Isotopenfraktionierungen führen. In diesem Sinne könnte auch der von Kempe [21] ermittelte negativste $\delta^{13}\text{C}$ -Wert von -22 ‰ auf einer höheren Messunsicherheit bei der Analyse von verarbeiteten Lebensmitteln beruhen (siehe Tabelle 2).

Für milchhaltige Lebensmittel wurde festgestellt, dass sich im Zuge einer enzymatischen Oxidation von Vanillin zu Vanillinsäure das Kohlenstoffisotopenverhältnis des verbleibenden Vanillins zu positiveren $\delta^{13}\text{C}$ -Werten verschieben kann [21]. Hier besteht jedoch nicht die Gefahr eines falsch-positiven Befundes im Hinblick auf einen Anteil von Vanillin, welcher nicht aus der Schote kommt. In jedem Falle müssen aber derartige Effekte durch weitere Studien genauer überprüft werden.

Die Beurteilung der Authentizität von Vanillearomen kann zusätzlich durch eine Bestimmung des $\delta^2\text{H}$ -Wertes von Vanillin abgesichert werden. Der Bereich der $\delta^2\text{H}$ -Werte von Vanillin ex Schote ist mit -115 bis -52 ‰ VSMOW deutlich abgegrenzt von dem des synthetischen Vanillins ex Guajakol mit -23 bis -17 ‰ und dem ex Lignin mit -204 bis -170 ‰.

Spezielle Messverfahren der IRMS

Es ist nicht auszuschließen, dass der $\delta^{13}\text{C}$ -Wert von natürlichem, aus der Schote gewonnenem Vanillin durch Manipulationen imitiert wird. So könnte ein Vanillearoma beispielsweise mit synthetisch oder biotechnologisch hergestelltem Vanillin verschnitten werden, bei dem die ^{13}C -Konzentration zuvor künstlich angereichert wurde. Derartige Verfälschungen können in Einzelfällen mit Hilfe der ^{13}C -IRMS nach gezieltem Abbau von Teilen des Vanillinmoleküls, durch ^{13}C -IRMS von Begleitstoffen oder mittels ^{18}O -IRMS des Vanillins oder von dessen Abbauprodukten nachgewiesen werden.

^{13}C -IRMS nach Abbaureaktionen

Das Vanillinmolekül wird über spezifische chemische Reaktionen abgebaut. Die Kohlenstoffisotopenverhältnisse der resultierenden Fragmente ermöglichen dann Aussagen über den Synthese- bzw. Biosyntheseweg des Vanillins. So können unter anderem die Carbonylgruppe (nach Oxidation zur Carboxylgruppe) oder die Methylgruppe des Vanillinmoleküls abgespalten und die ^{13}C -Werte des Fragments CO_2 bzw. der Methylgruppe bestimmt werden. Dieses Verfahren kann beispielsweise zum Nachweis von Vanillin dienen, das aus Lignin synthetisiert und mit ^{13}C angereichert wurde [28]. Das Abbauprodukt Guajakol kann ebenfalls zur Authentizitätsprüfung mittels ^{13}C -IRMS herangezogen werden [29].

^{13}C -IRMS von Begleitstoffen

Als weitere Kriterien für die Beurteilung der Authentizität von Vanillearomen können die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der Begleitstoffe im Vanillearoma wie p-Hydroxybenzaldehyd, Vanillinsäure und p-Hydroxybenzylalkohol herangezogen werden.

Voraussetzung für die Messung ist, dass ausreichend hohe Konzentrationen dieser Stoffe in der Probenmatrix vorhanden sind und eine ausreichende Empfindlichkeit und Genauigkeit des Messsystems gegeben sind [26, 30]. Das Verfahren ist in Anbetracht der meist geringen Konzentrationen der NebenkompONENTEN im Vanillearoma vor allem für Extrakte und in aller Regel nicht für Lebensmittel geeignet.

^{18}O -IRMS

Die Bestimmung des Sauerstoff-Isotopenverhältnisses im Vanillinmolekül oder von Abbauprodukten wie Guajakol kann unter anderem für einen Nachweis von biotechnologisch aus Ferulasäure gewonnenem Vanillin eingesetzt werden [24, 29, 31].

^2H - und ^{13}C -Kernresonanzspektroskopie (^2H -NMR, SNIF-NMR)

Sofern genügend Probenmaterial verfügbar ist, können mittels positioneller ^2H -NMR-Messung die $^2\text{H}/^1\text{H}$ (D/H)-Verhältnisse an den verschiedenen Positionen des Vanillinmoleküls bestimmt werden. Die auch als SNIF-NMR[®] bezeichnete Methode basiert darauf, dass die Verteilung der ^2H -Isotope an den verschiedenen Positionen eines Moleküls nicht statistisch erfolgt, sondern von Diskrimierungseffekten während der (Bio)synthese des Rohstoffes abhängt. Über die vier zur Beurteilung relevanten (D/H)-Isotopenverhältnisse des Vanillinmoleküls können sogar Mischungen von natürlichem und synthetischem Vanillin nachgewiesen werden [32, 33, 34]. Die Methode wurde in einem AOAC Ringversuch getestet und wird insbesondere zur Authentizitätskontrolle in der Aromenindustrie eingesetzt. Da bislang relativ hohe Substanzmengen mit größtmöglicher Reinheit benötigt werden, ist diese Methode in der Praxis der amtlichen Überwachung und Qualitätskontrolle von Lebensmitteln nicht oder nur sehr bedingt einsetzbar.

Erste Ergebnisse zur Bestimmung der positionellen ^{13}C -Verteilung im Vanillinmolekül mittels NMR versprechen Vorteile gegenüber der ^2H -NMR, da die ^{13}C -NMR deutlich empfindlicher ist. So ist hier eine besonders aussagekräftige Möglichkeit zur Abgrenzung von chemosynthetischem gegenüber biosynthetischem Vanillin gegeben [35, 36, 37, 38]. Auch diese Methode wird in absehbarer Zeit wohl nur in wenigen speziellen Laboratorien eingesetzt werden können.

Schlussfolgerungen

Die Überprüfung der Echtheit (Authentizität) von Vanillearomen bzw. des Aromastoffes Vanillin ist eine große Herausforderung für die Lebensmittelanalytik.

Stimmen die durch GC- oder HPLC-Messung ermittelten Verhältniswerte des Vanillins zu seinen Begleitstoffen mit den in der Fachliteratur beschriebenen Verhältniswerten überein, so ist dies ein erstes wichtiges Indiz dafür, dass das Vanillearoma aus der Vanilleschote stammt. Ein Konzentrationsverhältnis Vanillin / *p*-Hydroxybenzaldehyd größer als 20 weist darauf hin, dass chemosynthetisches oder biotechnologisch hergestelltes oder durch Extraktion mit überkritischem CO₂ aus der Vanilleschote gewonnenes Vanillin verwendet oder mitverwendet wurde. Beträgt dieses Konzentrationsverhältnis 20 oder weniger, so ist hierdurch ein zweifelsfreier Nachweis der Echtheit jedoch noch nicht gegeben, da beispielsweise eine Verfälschung durch den Zusatz von Vanillebegleitstoffen nicht auszuschließen ist.

Die Authentizitätsprüfung sollte also generell durch Bestimmungen von Stabilisotopenverhältnissen, insbesondere des $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes des Vanillins ergänzt werden.

Ein $\delta^{13}\text{C}$ -Wert des Vanillins, der - unter Berücksichtigung der Messunsicherheit - negativer als -21,5 ‰ VPDB ist, weist darauf hin, dass die Substanz nicht ausschließlich aus Vanilleschoten stammt. Bei Beurteilungen auf der Grundlage des $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes müssen jedoch Isotopenfraktionierungen, z.B. hervorgerufen durch die Probenvorbereitung oder die Messung mittels IRMS ausgeschlossen sein.

Sofern alle chromatographischen Analysenbefunde, der $\delta^{13}\text{C}$ -Wert des Vanillins oder auch andere ermittelten Stabilisotopenwerte keine sichere Beurteilung der Authentizität ermöglichen, jedoch konkrete Verdachtsmomente bestehen, müssen vor einer abschließenden Beurteilung im Rahmen der Rückverfolgung weitere Ermittlungen zur Art, Herkunft und Zusammensetzung des Vanillearomas, zur Rezeptur und den Herstellungsbedingungen des Lebensmittels, das ein solches Aroma enthält, sowie zu den von Lieferanten und Herstellern durchgeführten Qualitätssicherungsmaßnahmen erfolgen. Zur Beweislast des Herstellers wird auf das Positionspapier "Authentizität von Aromastoffen" der LChG-AG Aromastoffe aus dem Jahre 2004 [39] verwiesen.

Ausblick

Zur Optimierung der analytischen Bewertung von Vanillearomen sind weitere Entwicklungen im Bereich der Multielement-/Multikomponenten- Stabilisotopenanalytik erforderlich. Dies gilt für die Messverfahren der IRMS und NMR selbst, für die Methoden der Isolierung und Anreicherung des Vanillins und seiner Begleitstoffe aus verschiedenen Lebensmittelmatrizes und auch für die Auswertemethoden, etwa mit Hilfe von Differenzdiagrammen, wie am Beispiel der Authentizitätsprüfung von Lavendelöl gezeigt wurde[40].

Darüber hinaus wird der Aufbau von Datenbanken für notwendig erachtet, die Stabilisotopenwerte von Vanillin und Vanillebegleitstoffen verschiedener Herkunft und Gewinnungsverfahren enthalten und die für alle an der Qualitätsprüfung und -sicherung Beteiligten gleichermaßen zugänglich sind.

Als wichtige Voraussetzungen hierfür werden daher vor allem

- Weitere Laborvergleichsuntersuchungen und Ringversuche zur ¹³C- und ²H-IRMS Analytik (auch im Hinblick auf die Festlegung der Messunsicherheiten)
- Die Standardisierung der Probenaufarbeitung für verschiedene Lebensmittel
- Die Überprüfung der Eignung der derzeit angewandten Methoden zur Bestimmung der ¹³C-Werte und der ²H-Werte von Begleitsubstanzen und Oxidationsprodukten des Vanillins
- Die Messung der natürlichen Variation sowie der Abhängigkeiten der ¹³C- und der ²H-Werte in den Begleitsubstanzen des Vanillins als Basis für den Aufbau von Datenbanken mit Stabilisotopenwerten

gesehen.

Abstract

In the present statement the common criteria for the evaluation of the authenticity of vanilla flavours are presented and submitted to a critical review. An overview of the established methods for chromatography, isotope ratio mass spectrometry (IRMS) and nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) as well as their fields of application in the analysis of vanilla flavours is given.

HPLC and GC methods are generally used for determining concentration ratios between characteristic marker compounds of natural vanilla, such as vanillin, vanillic acid, *p*-hydroxybenzaldehyde and *p*-hydroxybenzoic acid. Adequate ranges of values were published, for example, in the "note d'information n 2003-61" of the French government. The ratios depend on the species and the geographic origin of the vanilla plant, on the applied extraction procedure for the beans as well as on the manufacturing conditions for vanilla flavoured food. Therefore, these chromatographic reference values are suitable only to a limited extent for the authenticity assessment of vanilla flavours. In general, analyses should be complemented with the determination of stable isotope ratios, in particular of the $\delta^{13}\text{C}$ value of vanillin.

A $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ value of vanillin more depleted than $-21,5\%$ (plus measurement uncertainty) indicates that the vanillin does not derive exclusively from vanilla beans. Additional data can be obtained by ^{18}O -GC-IRMS of vanillin, ^{13}C -GC-IRMS of concomitant substances, i.e. *p*-hydroxybenzaldehyde, and ^{18}O -/ ^{13}C -GC-IRMS after directed degradation of vanillin. Furthermore, ^2H -NMR (SNIF[®]-NMR spectroscopy of vanillin may deliver valuable information. However, in cases of doubt, an appropriate evaluation of the authenticity of a vanilla flavour is only possible after disclosure of the sources of raw material as well as of the recipes and manufacturing conditions for extracts and flavoured food.

For further improvement of the authenticity assessment of vanilla flavours, sample preparation procedures should be standardised for different foodstuffs, the measuring sensitivity of components other than vanillin should be increased and interlaboratory comparisons, in particular for ^{13}C - and ^2H -IRMS, should be performed. In addition, the construction of a data base is recommended to monitor stable isotope ratios for the key compounds in different types of vanilla and vanilla extracts.

Zusammenfassung

Im vorliegenden Positionspapier werden die gebräuchlichen Kriterien zur Beurteilung der Authentizität von Vanillearomen vorgestellt und einer kritischen Betrachtung unterzogen. Es wird ein Überblick über die gängigen Verfahren der Chromatographie, Stabilisotopen-Massenspektrometrie und Kernresonanzspektroskopie sowie über deren Einsatzgebiete für die Analytik von Vanillearomen gegeben.

Chromatographischen Methoden werden üblicherweise zur Ermittlung von Konzentrationsverhältnissen zwischen charakteristischen Aromakomponenten der echten Vanille wie Vanillin, Vanillinsäure, *p*-Hydroxybenzaldehyd und *p*-Hydroxybenzoesäure herangezogen. Entsprechende Werte wurden beispielsweise in einer "Note d'information" Nr. 2003-61 der französischen Regierung veröffentlicht. Die Konzentrationsverhältnisse hängen von der Art und geographischen Herkunft der Vanillepflanze, dem für die Schoten gewählten Extraktionsverfahren sowie den Herstellungsbedingungen von Lebensmitteln mit Vanillearomen ab. Diese chromatographischen Kennzahlen sind deshalb nur bedingt für die Authentizitätsprüfung von Vanillearomen geeignet, die Untersuchungen sollten generell durch Bestimmungen von Stabilisotopenverhältnissen, insbesondere des $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes des Vanillins, ergänzt werden.

Ein $\delta^{13}\text{C}$ -Wert negativer als $-21,5\%$ VPDB (zuzüglich Messunsicherheit) weist darauf hin, dass das Vanillin nicht ausschließlich aus Vanilleschoten stammt. Die ^{18}O -GC-IRMS von Vanillin, die ^{13}C -GC-IRMS von Begleitstoffen wie *p*-Hydroxybenzaldehyd und die ^{18}O - und ^{13}C -GC-IRMS

nach gezieltem Abbau von Teilen des Vanillinmoleküls sowie die NMR-Spektroskopie von Vanillin können hier gegebenenfalls zusätzliche wertvolle Hinweise zur Authentizität liefern. In Zweifelsfällen ist eine sachgerechte Beurteilung eines Vanillearomas jedoch nur nach Offenlegung der Rohstoffquellen sowie der Herstellungsbedingungen und Rezepturen für Extrakte und aromatisierte Lebensmittel möglich.

Zur weiteren Verbesserung der Analytik von Vanillearomen sollten die Probenaufbereitungsverfahren für verschiedene Lebensmittel standardisiert, die Messempfindlichkeiten für Vanillebegleitkomponenten gesteigert und weitere Laborvergleichsuntersuchungen insbesondere zur ^{13}C - und ^2H -GC-IRMS Analytik durchgeführt werden. Darüber hinaus wird der Aufbau einer Datenbank befürwortet, in der Stabilisotopenwerte der Schlüsselkomponenten verschiedener Vanillotypen und -extrakte zusammengetragen und ausgewertet werden.

Literatur

- 1 Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, Garching; In-house Database (unveröffentlicht)
- 2 Adeji J, Hartmann T G, Ho C T (1993) *Perf. Flav.*, 18: 25-33
- 3 Ehlers D, Pfister M, Bartholomae S (1994) *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 199: 38-42
- 4 DIN EN ISO 3493:2007
- 5 DVAI Positionspapier Vanille, Stand 01.04.2009:
http://www.aromenhaus.de/fakten/dvai_positionspapier_vanille/
- 6 Leitsätze des Deutschen Lebensmittelbuches nach §§ 15 u. 16 LFGB;
URL:<http://www.bmelv.de/SharedDocs/Standardartikel/Ernaehrung/SichereLebensmittel/Kennzeichnung/Lebensmittelbuch/DeutschesLebensmittelbuch.html>
- 7 Ehlers D, Bartholomae S (1993) *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 197: 550-557
- 8 Quirin K W, Gerard D (1998) *The European Food and Drink Review*, n^oautumn, 53-55
- 9 Desmurs J R, Giannotta D, Gelo-Pujic M, Role C, Lancelin P (2004) *Perf. Flav.* 29: 32-42
- 10 Berger R (Ed.) (2007) *Flavours and Fragrances*, 1. Aufl., Springer, Berlin, Heidelberg
- 11 Ziegler E, Ziegler H (Eds.) (2007) *Flavourings – Production, Composition, Applications, Regulations*, 2. Aufl., Wiley-VCH, Weinheim
- 12 Scharrer A (2002) *Vanille: Neues zur Authentizität*, Dissertation, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, URN: urn:nbn:de:hebis:30-0000000818
URL: <http://publikationen.ub.uni-frankfurt.de/volltexte/2003/161/pdf/00000263.pdf>
- 13 Sinha A, Sharma U, Sharma N (2008) *Int J Food Sci Nutr.* 59 (4): 299-326
- 14 Pérez-Silva A, Odoux E, Brat P, Ribeyre F, Rodriguez-Jimenes G C, Robles-Olvera V, Garcia-Alvarado M A, Günata Z (2006) *Food chemistry* 99 (4): 728-735
- 15 Mosandl A (2001) *GC/IRMS-Multielementanalyse zur Authentizitätsbewertung von Vanilleschoten*; FEI-Bericht AiF-FV 12062 N vom 11.06.2001
- 16 Scharrer A., Mosandl A (2001) *Dt. Lebensmittel-Rundschau* 97:449-456
- 17 DGCCRF, Note d'information n 2003-61: http://julientap.free.fr/travail_fichiers/vanille.pdf
- 18 Gassenmeier K, Riesen B, Magyar B (2008) *Flavour Fragr. J.* 23: 194-201
- 19 Corr S (2005) In *Natural Flavors and Fragrances*; Frey C et al, ACS Symposium Series, American Chemical Society: Washington DC
- 20 Mourtzinos I, Konteles S, Kalogeropoulos N, Karathanos V T (2009) *Food Chemistry* 114: 791-797
- 21 Kempe K, Kohnen M (1999) *Adv. Food Sci.* 21 (1/2): 48-53
- 22 Anklam E, Gaglione S, Müller A (1997) *Food Chemistry* 60 (1): 43-51
- 23 Nienstedt S, Ehlers D (2005) *Dt. Lebensmittel-Rundschau* 101 (5): 182-187

-
- 24 Schmidt H L, Werner R A, Roßmann A, Mosandl A, Schreier P (2007) in: Ziegler E, Ziegler H (Eds.) *Flavourings*, 2. Aufl., Wiley-VCH, Weinheim: 602-663
- 25 Lamprecht G, Blochberger K (2009) *Food Chemistry* 114: 1130-1134
- 26 Scharrer A, Mosandl A (2002) *Dt. Lebensmittel-Rundschau* 98: 117-121
- 27 IOFI Information letter (1989) No 775
- 28 Krueger D A, Krueger H W (1985) *J. Agric. Food Chem* 33: 323-325
- 29 Bensaïd F F, Wietzerbin K, Martin G J (2002) *J Agric Food Chem* 50: 6271-6275
- 30 Kaunzinger A, Juchelka D, Mosandl A (1997) *J Agric Food Chem* 45: 1752-1757
- 31 Hener U, Brand W A, Hilker A W, Juchelka D, Mosandl A, Podebrad F (1998) *Z Lebensm Unters Forsch A* 206: 230-232
- 32 Remaud G S, Martin Y-L, Martin G G, Martin G J (1997) *J Agric Food Chem* 45: 859- 866
- 33 Jamin E, Martin F, Martin G G (2007): *Journal of AOAC International* 90: 187-195
- 34 John T V, Jamin E (2004) *J Agric Food Chem* 52: 7644-7650
- 35 Tenailleau E, Lancelin P, Robins R J, Akoka S (2004) *Anal. Chem* 76: 3818-3825
- 36 Caytan E, Botosa E P, Silvestre V, Robins R J, Akoka S, Remaud G S (2007) *Anal. Chem.* 79: 8266-8269
- 37 Botosa E P, Blumenstein C, MacKenzie D A, Silvestre V, Remaud G S, Kweicien R A, Robins R J (2009) *Analytical Biochemistry* 393: 182-188
- 38 Botosa E P, Silvestre V, Robins R J, Rojas J M M, Guillou C, Remaud G S (2009) *Journal of Chromatography A* 1216:7043-7048
- 39 *Lebensmittelchemie* (2004) 58: 54
- 40 Jung J, Sewenig S, Hener U, Mosandl A (2005) *Eur Food Res Technol* 220: 232-237