

Aussagekraft von Enantiomerenverhältnissen orangensafttypischer Aromakomponenten

| α -Terpineol | Authentizitätsparameter | Enantiomerenverhältnis | Lagerung | Linalool |

1. Einleitung

Mit Hilfe der enantioselektiven Analyse chiraler Aromastoffe lassen sich bei der Qualitätskontrolle von Fruchtsäften Erkenntnisse im Hinblick auf die Authentizität gewinnen. Aufgrund der hohen Selektivität bei der Biosynthese chiraler Aromakomponenten resultieren häufig fruchtspezifische Enantiomerenverhältnisse^[1], sodass abweichende Verteilungen auf einen Verschnitt mit artfremden Früchten oder auf einen Zusatz künstlicher Aromastoffe hinweisen können. Konkrete Aussagen zu derartigen Verfälschungen anhand bestimmter Aromakomponenten lassen sich jedoch nur treffen, wenn natürliche Schwankungsbreiten, begründet z. B. durch Herkunft und/oder Sorte, bekannt sind und einbezogen werden. Weiterhin ist sicherzustellen, dass bestimmte Faktoren, wie unterschiedliche Herstellungsverfahren, Lagerung und Probenaufarbeitung als Einflussfaktoren ausgeschlossen werden können. Die vorliegenden Untersuchungen befassten sich mit der Frage nach möglichen Veränderungen der Enantiomerenverhältnisse orangensafttypischer Aromakomponenten während der Lagerung, die je nach Ausmaß zu Fehlinterpretationen im Hinblick auf die Authentizität führen können. Hierbei lag ein besonderes Augenmerk auf Linalool, da diese Aromakomponente als Authentizitätsparameter z. B. zur Unterscheidung von Bitter und Süßorangenölen herangezogen werden kann^[2]. Um eventuelle Veränderungen in den Enantiomerenverhältnissen ausschließlich auf die Lagerung und deren Bedingungen zurückführen zu können, wurde zunächst die Simultane Wasserdampfdestillation und Extraktion (SDE) als verwendete Probenaufarbeitungsmethode als möglicher Einflussfaktor untersucht.

2. MATERIAL + METHODEN

2.1 Probenmaterial und Standardsubstanzen

Für die Versuche wurde ein handelsüblicher Orangenektar einer Charge verwendet. Für die Wiederfindungsversuche wurde zusätzlich ein Modellsaft, jeweils frisch aus D-Glucose, D-Fructose, Saccharose und Citronensäure im Verhältnis 15 : 8,25 : 4,25 : 1 hergestellt. Die Zusammensetzung erfolgte in Anlehnung an §64 LFGB – L 00.00 – 106^[3]. Zur Identifikation und Quantifizierung mittels GC MS dienten die von Sigma Aldrich bezogen folgende Referenzsubstanzen: (R)/(S) Ethyl-2-methylbutyrat, (R)/(S) Linalool, (R)/(S) Ethyl-3-hydroxyhexanoat, (R)/(S) Terpinen-4-ol, (R)/(S) α -Terpineol, (R)- α -Pinen, Ethylbutyrat, δ -3-Caren, β -Myrcen, Ethylhexanoat, Limonen, Octanal, *trans* 2-Hexenal, Decanal, Valencen, Dodecanal, Nootkaton.

2.2 Untersuchung zu Veränderungen während der SDE

Um zu überprüfen, ob und inwieweit die Enantiomerenverhältnisse durch die Aufarbeitung mittels SDE beeinflusst werden, wurden

verschiedene Versuchsreihen durchgeführt. Diese beinhalteten zum einen den Vergleich mit einer in Bezug auf die thermische Belastung schonenderen Methode – der direkten Extraktion – und zum anderen die Variation der Extraktionszeit (0,5 bis 5,5 Stunden) bei der Durchführung der SDE.

Die SDE wurde gemäß der GfL-Arbeitsanweisung^[4] durchgeführt. Die direkte Extraktion erfolgte durch Ausschütteln mittels Schütteltrichter. Als Extraktionslösung wurde bei beiden Aufarbeitungsmethoden ein (1:1) Pentan Diethylether Gemisch verwendet. Der jeweils gewonnene Aromaextrakt wurde an einer Vigreuxkolonne eingeeengt und zur Quantifizierung mittels GC MS gemessen.

2.3 Untersuchungen zu Veränderungen während der Lagerung

Für die Lagerversuche wurde eine Mischprobe eines handelsüblichen Orangenektars einer Charge hergestellt und mit Benzoesäure / Sorbinsäure (1:1) konserviert (500 mg/L). Anschließend wurde der Orangenektar in 200 g Portionen abgefüllt und in geschlossenen Glasgefäßen gelagert, die zu jedem Probennahme Zeitpunkt einzeln entnommen und direkt für die Aufarbeitung mittels SDE eingesetzt wurden. Die Lagerzeit betrug insgesamt 6 Wochen. Um den Einfluss der Lagertemperatur diskutieren zu können, wurde der Orangenektar sowohl bei 18 °C als auch bei 40 °C gelagert.

2.4 Identifizierung und Quantifizierung mittels GC MS

Für die enantioselektive Trennung fand eine chirale Trennsäule mit einer modifizierten Cyclodextrinphase (BGB 174) Anwendung. Die Quantifizierung der Aromastoffe wurde mit Hilfe externer Kalibrierungen über charakteristische Massenfragmente (SIM Modus) durchgeführt. Dabei wurden die Wiederfindungsraten der jeweiligen Methoden einbezogen. Die Zuordnung der Aromastoffe erfolgte anhand der jeweiligen Retentionszeit, der Peakform und des charakteristischen Ionen-Verhältnisses der drei pro Substanz festgelegten spezifischen m/z Verhältnissen.

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

3.1 Beeinflussung der Enantiomerenverhältnisse durch die Aufarbeitungsmethode (SDE)?

Für die Extraktion der Aromastoffe mittels SDE ist in der Routineanalytik eine zweistündige Siededauer vorgesehen^[3-5]. In dieser thermischen Beanspruchung begründet sich der in der Literatur meist genannte Nachteil dieser Methode – eine mögliche Bildung von Artefakten^[5]. Im Gegensatz zur SDE erfolgt die Extraktion der Aromastoffe bei der Vergleichsmethode durch den direkten Kontakt der Probe mit dem Extraktionsmittel, so dass keine Erhitzung

Tab 1: Enantiomerenverhältnis [%] in Abhängigkeit der Extraktionszeit t (Auszug)

Aromakomponente	t = 0,5 h	t = 1 h	t = 1,5 h	t = 2 h	t = 3 h	t = 5,5 h
(R)-Ethyl-3-hydroxyhexanoat	100	100	100	100	100	100
(S)-Ethyl-3-hydroxyhexanoat	0	0	0	0	0	0
(R)-Ethyl-2-methylbutyrat	0	0	0	0	0	0
(S)-Ethyl-2-methylbutyrat	100	100	100	100	100	100
(R)-Linalool	13	14	14	18	13	14
(S)-Linalool	87	86	86	82	87	86
(R)-Terpinen-4-ol	23	24	23	24	24	23
(S)-Terpinen-4-ol	77	76	77	76	76	77
(R)-alpha-Terpineol	94	94	94	93	94	94
(S)-alpha-Terpineol	6	6	6	7	6	6

der Probenlösung notwendig ist. Die GC-MS Analyseergebnisse beider Aufarbeitungsmethoden des Orangenektars ergaben vergleichbare Enantiomerenverhältnisse (Ergebnisse nicht gezeigt).

Der Methodenvergleich beinhaltete desweiteren die Bestimmung der Wiederfindungsraten in verschiedenen Matrices. Dafür wurden sowohl der Modellsaft als auch der Orangenektar mit Standardsubstanzen dotiert und mit beiden Methoden aufgearbeitet. Es zeigte sich, dass die SDE matrixunabhängige Wiederfindungsraten liefert. Für Linalool ergaben sich z. B. durch die Aufarbeitung mittels SDE sowohl im Orangenektar als auch im Modellsaft Wiederfindungsraten von ca. 80 %. Die Wiederfindungsraten der direkten Extraktion variierten hingegen je nach Matrix stark und lagen im Orangenektar bei nur 50 %. Die Wiederfindung im Modellsaft war wiederum mit der SDE vergleichbar.

Zur weiteren Absicherung, dass die untersuchten Analyten während der SDE nicht beeinflusst werden, wurden bei der Aufarbeitung des Orangenektars die Extraktionszeiten von 0,5 bis 5,5 Stunden variiert. Weder die Enantiomerenverhältnisse (Tabelle 1) noch die Konzentrationen der untersuchten Analyten (siehe 2.1) unterlagen dabei signifikanten Veränderungen.

Anhand der durchgeführten Analysen ließ sich nachweisen, dass die Konzentrationen und die Enantiomerenverhältnisse der chiralen Aromastoffe während der Aufarbeitung mittels SDE nicht beeinflusst werden. Bei der Diskussion um die Eignung bestimmter chiraler Aromastoffe für die Authentizitätsbewertung kann daher die SDE als Einflussfaktor ausgeschlossen werden.

Bei den beiden in Tabelle 1 aufgeführten Verbindungen Terpinen-4-ol und α -Terpineol handelt es sich um bekannte Off Flavour Verbindungen in Orangensäften, für die in der Literatur eine Konzentrationszunahme in Abhängigkeit von Temperatur und Zeit beschrieben ist^[6,7]. Daher war auch eine kontinuierliche Konzentrationszunahme der beiden Verbindungen während der SDE in Abhängigkeit der Extraktionsdauer zu erwarten. Bei den hier durchgeführten Untersuchungen blieben sowohl die Konzentra-

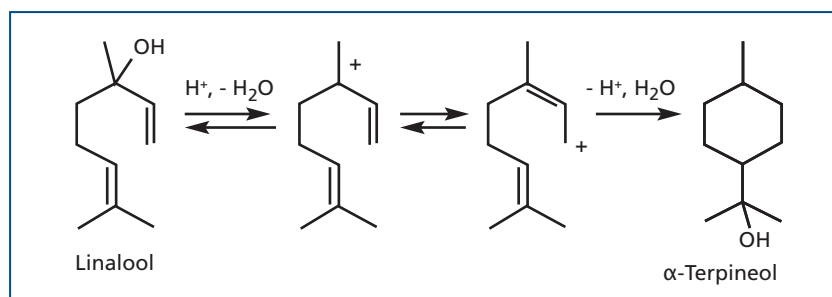


Abb 1: Bildung von α -Terpineol aus Linalool über die Zwischenstufe des Linalylkations^[7].

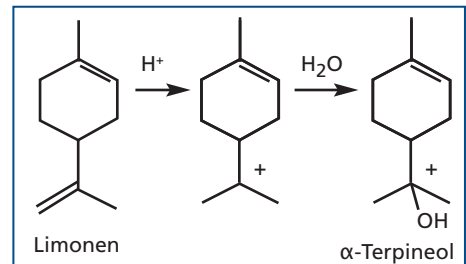


Abb 2: Bildung von α -Terpineol aus Limonen über eine säurekatalysierte Wasseraddition^[7].

tionen der beiden Verbindungen α -Terpineol und Terpinen 4 ol als auch deren in der Literatur beschriebenen Vorläuferverbindungen Linalool (Abb. 1) und Limonen (Abb. 2) konstant. Eine Erklärung, dass bei den genannten Aromakomponenten während der bis zu 5,5-stündigen thermischen Behandlung durch die SDE kein Konzentrationsanstieg zu beobachten war, liegt vermutlich in der kontinuierlichen Überführung der flüchtigen Verbindungen in das Extraktionsmittel. Sobald sich die Aromastoffe im Extraktionsmittel befinden, unterliegen sie nicht mehr dem nativen sauren pH Wert der Probe. Außerdem wird das Extraktionsmittel im Wasserbad nur bei einer Temperatur von 50 °C am Sieden gehalten, so dass die Aromastoffe in der Lösemittelphase kaum thermisch belastet werden.

3.2 Beeinflussung der Enantiomerenverhältnisse durch Lagerung?

Bis auf zwei Ausnahmen (Linalool und α -Terpineol) wurden die Enantiomerenverhältnisse der untersuchten Analyten während der Lagerung bei den unter Abschnitt 2 aufgeführten Bedingungen nicht beeinflusst. Für eine Vielzahl der untersuchten Aromakomponenten können daher sowohl Probenaufarbeitung (SDE) als auch Lagerung als Einflussfaktoren auf die Enantiomerenverhältnisse ausgeschlossen werden. Für eine endgültige Beurteilung der Authentizität sind jedoch zusätzlich Kenntnisse zu natürlichen Schwankungsbreiten und Sekundärfaktoren notwendig. So kann das Enantiomerenverhältnis von Terpinen-4-ol je nach Herkunft stark variieren^[8]. Bei dieser Aromakomponente ist weiterhin zu bedenken, dass es sich um einen sekundären Aromastoff handelt, der unter bestimmten Bedingungen analog zu α -Terpineol (Abb. 1 und 2) aus den Vorläuferverbindungen Limonen und Linalool gebildet wird^[9]. Dass hierbei je nach Vorläuferverbindung durchaus auch das Enantiomerenverhältnis aufgrund einer solchen Umwandlungsreaktion beeinflusst werden kann, zeigte sich bei den vorliegenden Lagerversuchen am Beispiel von α -Terpineol.

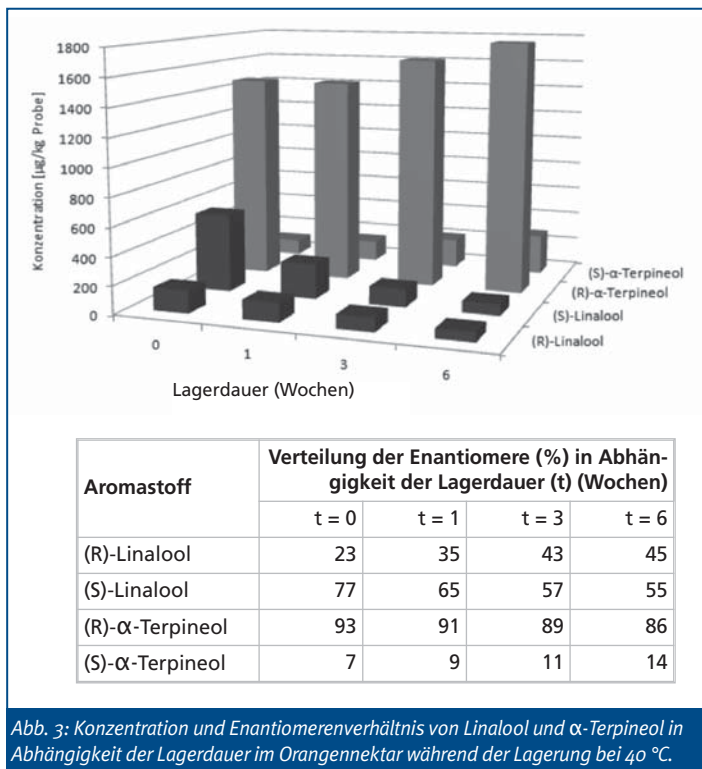


Abb. 3: Konzentration und Enantiomerenverhältnis von Linalool und α-Terpineol in Abhängigkeit der Lagerdauer im Orangennektar während der Lagerung bei 40 °C.

Für die Bildung der Off Flavour Komponente α-Terpineol ist in der Literatur während der Lagerung von Orangensäften eine Temperatur-Abhängigkeit beschrieben^[7]. Wie aus **Abbildung 3** zu entnehmen ist, ergab sich auch bei den vorliegenden Untersuchungen aufgrund der erhöhten Lagertemperatur (40 °C) ein Konzentrationsanstieg des α-Terpineols in Abhängigkeit von der Lagerdauer. Mit der Konzentrationszunahme einhergehend, erfolgte eine Verschiebung des Enantiomerenverhältnisses von R:S = 93:7 zu R:S = 86:14. Dies lässt sich durch die Bildung eines racemischen Gemisches von α-Terpineol aus Linalool erklären. Im Gegensatz dazu blieben bei der 18 °C Lagerung die Konzentrationen und die Enantiomerenverhältnisse der beiden Aromastoffe konstant.

Da Linalool in höherem Maße abgebaut, als α-Terpineol gebildet wurde, können noch weitere Abbauprodukte vermutet werden. Die Konzentration des möglichen Abbauproduktes Terpinen-4-ol sowie dessen Enantiomerenverhältnis blieben in Abhängigkeit der Lagerdauer konstant. Als ein weiteres, in dieser Arbeit nicht untersuchtes mögliches Abbauprodukt von Linalool wird z. B. Weinlacton diskutiert^[10].

Wie in **Abbildung 1** gezeigt wird, erfolgt die Umwandlung des Linalools zu α-Terpineol über die Zwischenstufe des Linalylkations, wodurch die stereochemische Information verlorengeht. Beide Enantiomere des α-Terpineols werden gleichermaßen gebildet und verursachen eine Verschiebung im Enantiomerenverhältnis. In den Lagerversuchen von Averbek et al. konnte gezeigt werden, dass aus der Umwandlung des (R) Limonens, welches in Orangensaft nahezu enantiomerenrein vorkommt, hingegen nur das (R) α-Terpineol resultiert. Sowohl vor als auch nach der vierwöchigen Lagerung eines Orangensaftes bei 37 °C wurde, trotz des deutlichen Konzentrationsanstiegs von α-Terpineol, zu 99 % nur das (R) Enantiomer detektiert^[11].

Eine neben der Umwandlung von Linalool ablaufende Bildung des α-Terpineols aus Limonen konnte unter den Bedingungen der eigenen Versuche nicht nachgewiesen werden. Limonen stellt in Orangensäften bzw. -nektaren quantitativ die Hauptkomponente der flüchtigen Verbindungen dar. Wenn in den vorliegenden Untersuchungen, wie in der Literatur beschrieben, eine Umwandlung von Limonen zu α-Terpineol stattgefunden hätte, müsste aufgrund der im Vergleich zu Linalool weitaus höheren Konzentration des Limonens eine deutliche Konzentrationszunahme des (R)-α-Terpineols bestimmt worden sein. Dem entgegen wurde jedoch eine Enantiomerenverschiebung zum (S)-α-Terpineol, welche durch die Umsetzung des Linalool erklärbar ist, beobachtet. Anhand der vorliegenden Untersuchungen wird deutlich, dass eine Verschiebung im Enantiomerenverhältnis des α-Terpineols einen Hinweis auf erhöhte Lagertemperaturen geben kann, auch dann, wenn der α-Terpineol Gehalt selbst keine Auffälligkeiten aufweist.

Die Ursache für ein verändertes Enantiomerenverhältnis kann neben nicht optimalen Lagerbedingungen jedoch auch in einer Verfälschung liegen. Ein in Richtung (S) Enantiomer verschobenes Verhältnis des α-Terpineols in Orangensaft könnte z. B. auf eine Verfälschung mit Mandarinenensaft hindeuten. So ermittelten Mondello et al. in einer Mischung aus 80 % Mandarinenöl und 20 % Süßorangenöl ein R:S Verhältnis von R:S = 31:69^[2]. Im Vergleich dazu weist ein reines Süßorangenöl einen hohen Überschuss des (R) Enantiomers auf und bereits geringe Anteile eines zugesetzten Mandarinenöls können zu einer Verschiebung im Enantiomerenverhältnis von α-Terpineol führen.

Eine Abweichung vom typischen Enantiomerenverhältnis des α-Terpineols in Orangensaft kann sowohl auf eine Verfälschung als auch auf ungünstige Lagerbedingungen hindeuten. Für eine genauere Eingrenzung der Ursache kann das Enantiomerenverhältnis von Linalool einen Anhaltspunkt geben. Wie aus **Abbildung 3** ablesbar, stellte sich unter einer erhöhten Lagertemperatur (40 °C) bereits nach einer Lagerdauer von 3 Wochen ein nahezu racemisches Verhältnis von (R)- und (S)-Linalool ein. Da dieses racemische Verhältnis bis zum Ablauf der gesamten Lagerdauer (6 Wochen) vorlag, kann neben dem Abbau von Linalool zu α-Terpineol, sicher von einer stattfindenden Racemisierung des Linalools und nicht nur von einem schnelleren Abbau des (S) Enantiomers ausgegangen werden.

Wie eingangs unter Abschnitt 1 erwähnt, wird das Enantiomerenverhältnis von Linalool z. B. zur Authentizitätsbewertung von Bitterorangenölen herangezogen. Aufgrund der möglichen Racemisierung während der Lagerung, ist Linalool als alleiniges Unterscheidungsmerkmal von Süß und Bitterorangenöl als kritisch anzusehen. Der initiierende Schritt für die Racemisierung ist eine Protonenanlagerung an die Hydroxylgruppe des Linalools, welche unter sauren Bedingungen begünstigt wird. Entsprechende Umlagerungsreaktionen können daher sowohl in Orangensaft, als auch in Orangenölen ablaufen.

4. ZUSAMMENFASSUNG

In Hinblick auf eine aussagekräftige Analytik von flüchtigen Aromakomponenten wurde untersucht, inwieweit die Probenaufarbeitung (SDE) und Lagerung als mögliche Einflussfaktoren bei

der Interpretation der Messergebnisse einbezogen werden müssen. Weder die Konzentrationen noch die Enantiomerenverhältnisse der untersuchten Aromastoffe wurden von der SDE beeinflusst. Sie eignet sich daher sehr gut für die Authentizitätsbewertung. Bei Säften, die konstant bei niedrigen Temperaturen (18 °C) gelagert wurden, zeigen sich ebenfalls keine Beeinflussung der Enantiomerenverhältnisse.

Die Authentizitätsbewertungen anhand nur einer Aromakomponente ist nur bedingt aussagekräftig. Sowohl Lagerungsbedingungen als auch gezielte Verfälschungen können zu abweichenden Verhältnissen der Enantiomere führen. Am Beispiel der beiden Aromakomponenten Linalool und α -Terpineol konnte gezeigt werden, dass unter bestimmten Bedingungen Umlagerungsreaktionen miteinander verknüpft sind und als Ursache von veränderten Enantiomerenverhältnissen anzusehen sind. Mit diesem Wissen lassen sich deutlich bessere Rückschlüsse bezüglich der Authentizität von Säften und deren Produkten ziehen.

5. LITERATUR

- [1] Günzler, H.: Analytiker Taschenbuch 21, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 2000
- [2] Dugo, G.; Di Giacomo, A.: Citrus – the genus citrus, CRC Press, 2002
- [3] Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB - L 00.00 -106, Untersuchung von Lebensmitteln – Bestimmung der Konzentrationen und Enantiomerenverhältnisse chiraler Aromastoffe in Lebensmitteln, 2006
- [4] GfL-Arbeitsanweisung für Prüfmethode: Bestimmung von Aromaindex und Estersumme, 2009
- [5] Chaintreau, A.: simultaneous distillation-extraction: from birth to maturity – review, FlavourFragr. J., 2001, 16, 136 – 148
- [6] Marcotte, M.; Steward, B.; Fustier, P.: abused thermal treatment impact on degradation products of chilled pasteurized orange juice, J. Agric. Food Chem, 1998, 46, 1991 – 1996
- [7] Haleva-Toledo, E.; Naim, E.M.; Zehavi, U.; Rouseff, R. L.; formation of α -terpineol in citrus juices, model and buffer solutions, Journal of Food Science, 1999, 64, 5, 838 –841
- [8] Del Castillo, MLR; Caja, MM; Blanch, GP; Herraiz, M: enantiomeric distribution of chiral compounds in orange juice according to their geographical origins, Journal of Food Protection, 2003, 66, 8, 1448 – 1454
- [9] Pérez-López, A. J.; Saura, D.; Lorente, J.; Carbonell-Barrachina, Ángel A.: limonene, linalool, α -terpineol, and terpinen-4-ol as quality control parameters in mandarin juice processing, Eur Food Res Technol, 2006, 222, 281 – 285
- [10] Perez-Cacho, P. R.; Rouseff, R.: processing and storage effects on orange juice aroma: a review, J. Agric. Food Chem., 2008, 56, 9785 – 9796
- [11] Averbeck, M.; Schieberle, P.: characterisation of the key aroma compounds in a freshly reconstituted orange juice from concentrate, Eur Food Res Technol, 2009, 229, 611 – 622

Die vorliegenden Ergebnisse wurden im Rahmen der wissenschaftlichen Abschlussarbeit bei der GfL Gesellschaft für Lebensmittel-Forschung mbH in Kooperation mit dem Institut für Lebensmitteltechnologie und Lebensmittelchemie der Technischen Universität Berlin angefertigt.

Anke Jährmann, Dipl. Lebensmittelchemikerin,
L. W. Kroh
 Institut für Lebensmitteltechnologie und Lebensmittelchemie, Technische Universität Berlin
 13355 Berlin

Mikko Hofsommer,
Dr. Thorsten Fiedler,
 Staatlich geprüfter Lebensmittelchemiker
 GfL Gesellschaft für Lebensmittel-Forschung mbH
 10787 Berlin



serv&care Umfassender Schutz für Ihr Investment

Auf welchen Märkten Sie auch aktiv sind: serv&care maximiert mit kompetenten Service-Lösungen die Verfügbarkeit Ihrer Anlagen. Schnell, zuverlässig und mit dem Know-how des Originalherstellers.



GEA Westfalia Separator Group GmbH

Werner-Habig-Straße 1, 59302 Oelde, Deutschland
 Tel.: +49 2522 77-0, Fax: +49 2522 77-2488
 ws.info@gea.com, www.gea.com

engineering for a better world

