

## Enantioselektive Analyse zur Natürlichkeitsbewertung von Aromastoffen

Positionspapier der Arbeitsgruppe Aromastoffe

Stand: 2001

Für chirale Aromastoffe hat sich die enantioselektive Analyse auf der Basis kapillargaschromatographischer Trennungen von Enantiomeren auf chiralen stationären Phasen als wichtige Methode zur Authentizitätskontrolle sowie zur Bewertung der „Natürlichkeit“ etabliert.

Die Beurteilung der mit diesem Verfahren ermittelten Daten setzt u.a. folgendes voraus:

- Charakteristisches biogenes Enantiomerenverhältnis
- Kenntnis der Enantiomerenverteilung genuiner chiraler Verbindungen
- Stabilität des Enantiomerenverhältnisses während Verarbeitung und Lagerung
- Bewertung aromarelevanter und anderer charakteristischer Inhaltsstoffe. Darüber hinaus sind bei der Bestimmung der Enantiomerenverhältnisse einige grundlegende analytische Parameter zu beachten, die nachfolgend beschrieben werden.

### Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die enantioselektive Analyse zur Natürlichkeitsbewertung von Aromastoffen ist ein Spezialfall der quantitativen Analyse und unterliegt damit den gleichen Grundbedingungen wie die klassische quantitative Analyse [1]. Für eine exakte Angabe von Enantiomerenverhältnissen sind demnach – wie bei allen Quantifizierungen – Nachweis- (NG) und Bestimmungsgrenze (BO) die wichtigsten Parameter.

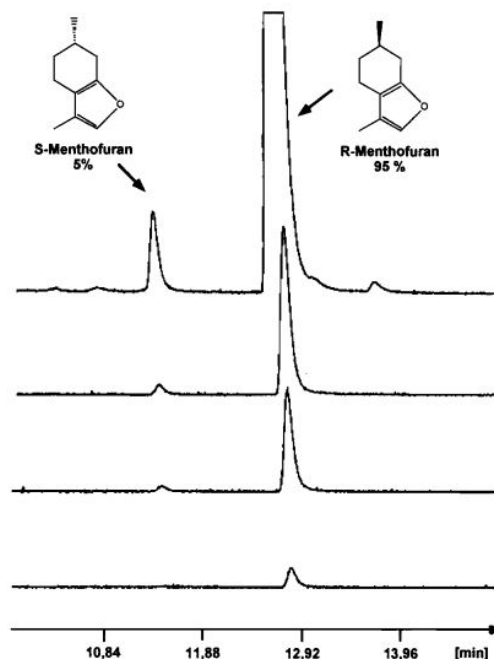


Abb. 1: Einfluss der Konzentration auf die exakte Bestimmung von Enantiomerenverhältnisse am Beispiel der chromatographischen Trennung von Menthofuran (R:S = 95 : 5)

Für die Ermittlung von NG und BG werden folgende Parameter vorausgesetzt.

- optimaler Zustand der Analysengeräte
- im Bereich von NG und BG linear verlaufende Kalibrierfunktion
- Normalverteilung der Messwerte.

Sind diese Voraussetzungen gegeben, können NG und BG auf der Basis von Zusatzversuchen bestimmt werden. Hierzu wählt man zunächst ein geeignetes Analysenverfahren. Das verwendete Verfahren sollte das komplette Spektrum der zu aromatisierenden Lebensmittel abdecken, d.h. von rein wässrigen Systemen (Fruchtsäfte), wässrig-alkoholischen Systemen (alkoholische Getränke), bis hin zu lipophileren Systemen (wie z.B. Speiseeis, Fruchquark, Margarine).

In der Regel werden die zu bestimmen-en Verbindungen einer geeigneten Matrix zugesetzt und anhand dieser Proben die Analysen nach dem gewählten Verfahren durchgeführt. Die Zusätze sollten dabei im Bereich der vermuteten NG beginnen und bis in den voraussichtlichen Arbeitsbereich reichen. Die vorgesehenen Gehaltsstufen (ca. 4-5) sollten gleichmäßig über den gesamten Bereich verteilt sein, und die Zusatzversuche sollten auf jeder Stufe mehrfach wiederholt werden. In Grenzfällen, d.h. wenn sich die Konzentration einer Komponente im Bereich von Nachweis- und Bestimmungsgrenze bewegt, müssen NG und BG durch Standardadditionsversuche validiert werden.

Aus den erhaltenen Analyseergebnissen wird zunächst die Regressionsgerade des Verfahrens berechnet. Danach werden die Grenzen des Prognoseintervalls bestimmt und daraus die Nachweis- und Bestimmungsgrenze rechnerisch bzw. graphisch ermittelt. Detaillierte Angaben zu diesen Verfahren finden sich in [2-4].

Für die Interpretation der Analyseergebnisse gilt:

- Die Anwesenheit des Analyten kann per Definition „nicht mehr mit ausreichender Sicherheit festgestellt werden, wenn der Messwert unterhalb der Nachweisgrenze liegt“, d.h. der Analyt ist nicht nachweisbar.
- Wenn der Messwert größer als die Nachweisgrenze aber kleiner als die Bestimmungsgrenze ist, so ist zwar „die Anwesenheit des Analyten nachgewiesen, doch ist über dessen Gehalt in der Probe keine quantitative Aussage möglich“, d.h. der Analyt ist nachweisbar, jedoch nicht quantifizierbar.
- Erst wenn der Messwert größer als die Bestimmungsgrenze ist, kann eine quantitative Aussage über den Gehalt in der Probe getroffen werden.

Die Ermittlung von Nachweis- und Bestimmungsgrenze sollten nach allgemein anerkannten Verfahren durchgeführt werden.

### **Interne Standardisierung**

Als interne Standards (IST) sollten Substanzen verwendet werden, die eine möglichst enge strukturelle Beziehung zum Analyten aufweisen, z.B. Homologe oder  $^2\text{H}$  ( $^{13}\text{C}$ ) markierte Isotopomere.

Isotopenverdünnungsanalyse in Verbindung mit massenselektiver Detektion (SIM-Modus) kann insbesondere zur Bestimmung von Spurenkomponenten aus komplexer Matrix erfolgreich eingesetzt werden. Man muss allerdings beachten, dass auch markierte IST-Substanzen durch chemische und/oder physikalische Verfahren - wie Extraktion, Destillation, Chromatographie und

Derivatisierung - diskriminiert werden können. Höher markierte Isotopomere können sich u.U. signifikant von ihren Analyten unterscheiden. Eine Validierung ist in jedem Falle unabdingbar.

### Quantifizierung van Enantiomerenverhältnissen

Die Stereodifferenzierung chiraler Verbindungen und die daraus resultierende Angabe von Enantiomerenreinheiten in Form von ee (enantiomeric excess)-Werten oder auch die Angabe von prozentualen Verteilungen der Enantiomere ist nur eine besondere Form einer quantitativen Aussage.

#### Definition:

$ee = X\% \text{ Enantiomer 1} - Y\% \text{ Enantiomer 2}$

Bsp.:

Die Analyse ergab ein Enantiomerenverhältnis von 96% (R) : 4% (S). Daraus resultiert für (R) ein ee-Wert von 96% - 4% = 92%

Bei der stereoselektiven Analyse hoch angereicherter Enantiomere, wie sie in der Regel für chirale Naturstoffe erwartet werden, ist der Gehalt des Minor-Enantiomeren der limitierende Faktor für die exakte Bestimmung des Enantiomerenverhältnisses.

Für die Angabe von Verhältniszahlen, z.B. ee-Werte oder die prozentuale Verteilung der Enantiomere, bedeutet dies: Nur wenn der Messwert für den Gehalt eines jeden Enantiomers größer ist als die Bestimmungsgrenze, ist eine Angabe von exakten Enantiomerenverhältnissen möglich. Dies soll nachfolgend exemplarisch verdeutlicht werden (Abb. 1, Tab. 1-2).

Für ein Analysenverfahren wurde die Nachweisgrenze für zwei zu untersuchende Enantiomere (R) und (S) mit jeweils 100 µg/kg und die Bestimmungsgrenze mit jeweils 150 µg/kg ermittelt. Die Gehalte der Enantiomere (R) und (S) aus unterschiedlichen Proben finden sich in Tab 1.

**Tab. 1: Berechnungsbeispiel: Konzentrationen (µg/kg) und Enantiomerenverhältnisse**

	Konzentration (R) (µg/kg)	Konzentration (S) (µg/kg)	(R) %	(S) %
1.	5700	300	95	5
2.	3040	160	95	5
3.	2280	120	95	5
4.	1520	80	95	5

**Tab. 2: Berechnungsbeispiel: Angabe von Enantiomerenverhältnissen unter Berücksichtigung von Nachweis- und Bestimmungsgrenze**

	Konzentration (R) (µg/kg)	Konzentration S (µg/kg)	(R) %	(S) %
1.	5700	300	95	5
2.	3040	160	95	5
3.	2280	n.b.*	-	-
4.	1520	n.n.**	-	-

\* n.b. = nicht bestimmbar < BG (150 µg/kg),

\*\* n.n. = nicht nachweisbar < NG (100 µg/kg)

### Diskussion der Ergebnisse:

Messungen 1 und 2:

Die Meßwerte für (R) und (S) sind größer als die Bestimmungsgrenze. Für beide Messungen können exakte Enantiomerenverhältnisse angegeben werden, da auch der Gehalt des limitierenden Enantiomers die Bestimmungsgrenze überschreitet.

Messung 3:

Der Messwert für (R) ist größer als die Bestimmungsgrenze, der Messwert für (S) größer als die Nachweisgrenze aber kleiner als die Bestimmungsgrenze. Die Quantifizierung für (R) ist exakt. Da der Gehalt an (S) aber die Bestimmungsgrenze von 150 µg/kg unterschreitet, gilt (S) zwar sicher als nachgewiesen, aber es ist keine quantitative Aussage über den Gehalt möglich. Somit sollte auch auf die Angabe eines Enantiomerenverhältnisses verzichtet werden (vgl. auch Tabelle 2).

Messung 4:

Der Messwert für (R) ist größer als die Bestimmungsgrenze, der Messwert für (S) kleiner als die Nachweisgrenze. Die Quantifizierung für (R) ist exakt. Der Gehalt an (S) unterschreitet die Nachweisgrenze von 100 µg/kg. Deshalb kann die Anwesenheit von (S) nicht mehr mit ausreichender Sicherheit festgestellt werden. In diesem Fall muss auf die Angabe eines Enantiomerenverhältnisses verzichtet werden. Die Ergebnisse sollten daher entsprechend Tabelle 2 angegeben werden.

Wenn nicht auf die Angabe einer prozentualen Verteilung für die Messungen 3 und 4 verzichtet werden soll, können unter Hinzuziehung der Bestimmungsgrenze folgende Berechnungen durchgeführt werden, mit denen näherungsweise eine Angabe über eine Enantiomerenverteilung möglich wird:

Setzt man als maximalen Gesamtgehalt an (R + S) die Summe aus dem exakt ermittelten Wert für (R) und den Wert der Bestimmungsgrenze für (S) an

**Gehalt (R) + Gehalt BG (S) = 100 %,**

**so ergibt sich für**

**Messung 3: → 2280 + 150 = 2430, daraus folgt für% (R) → 94%**

**und für**

**Messung 4: → 1520 + 150 = 1670, daraus folgt für% (R) → 91 %.**

Für beide Berechnungen muss der Wert der BG eingesetzt werden, da Konzentrationen im Intervall zwischen BG und NG nicht bestimmbar sind. Zur Vermeidung von Fehlinterpretationen ist es unabdingbar, Nachweis- und Bestimmungsgrenze des Verfahrens anzugeben und bei der Beurteilung der Analysenwerte in Betracht zu ziehen.

### Literatur

1. Mosandl A, Hener U, Fuchs S (1999) in: Analytiker Taschenbuch Bd. 21 Springer Verlag Berlin, Heidelberg, 37.
2. Frehse H, Thier H P (1991) GIT Fachz Lab 35, 285.
3. Hädrich, J., Vogelgesang, J. (1999) Deutsche Lebensmittel-Rundschau 95, 428
4. Hädrich, J., Vogelgesang, J. (1999) Deutsche Lebensmittel-Rundschau 95, 495

Erschienen in: Lebensmittelchemie **55**, 1-28 (2001)