

## Vanillin – natürlich oder synthetisch?

### GCMS und IRMS nehmen den Fingerabdruck von Vanillin

Dr. Balázs Horváth, Dr. David Psomiadis, Dr. Bernd Bodiselitsch

Imprint Analytics GmbH

Vanillin ist einer der beliebtesten Aromastoffe der Welt. Traditionell wird es durch das Mazerieren von Vanilleschoten (*Vanilla planifolia* und andere Species) hergestellt. Allerdings deckt die weltweite natürliche Vanilleproduktion lediglich etwa 1% des Bedarfs der globalen Lebensmittelindustrie ab. Daher werden 99 % des verwendeten Vanillin-Aromas entweder synthetisch (petrochemischer Ursprung) oder biotechnologisch (zum Beispiel aus Ferulasäure, Eugenol, etc.) hergestellt.

Der Preisunterschied zwischen natürlichem und synthetischem Vanillin beträgt ungefähr das 100-fache. Daher ist es kein Wunder, dass natürliches Vanillin eines der meist gefälschten Lebensmittelzusatzstoffe der Welt ist. Wie können Verbraucher vor Falschdeklarationen geschützt werden?

Natürliches Vanillin und der synthetische Nachbau sind chemisch identisch. Jedoch hinterlassen die Ausgangssubstanzen und der Herstellungsprozess Spuren in der Isotopenverteilung des fertigen Produkts. Somit kann der „Isotopen-Fingerabdruck“ zur Unterscheidung herangezogen werden.

#### Kopplung von GC-MS und IR-MS enthüllen komponentenspezifische Isotopensignatur

Ein herkömmlicher Elementaranalysator, gekoppelt mit einem hochauflösenden Sektorfeld-Massenspektrometer (Isotope Ratio Mass Spectrometer, IR-MS) kann mit sehr hoher Genauigkeit die Isotopensignatur von Reinmaterialien bestimmen. Allerdings befindet sich die Zielsubstanz Vanillin in einem komplexen Vanilleextrakt in einem Konzentrationsbereich von 2 bis 300 µg ml<sup>-1</sup>. Daher müssen zuerst die Substanzen voneinander getrennt werden.

Anschließend können die Isotopenverhältnisse der Zielsubstanz und bei Bedarf auch der Begleitkomponenten (Component Specific Isotope Analysis, CSIA) einzeln bestimmt werden. Dazu wird ein GC-MS mit einem IR-MS gekoppelt.

Das Unternehmen Imprint Analytics aus dem österreichischen Neutal verwendet weltweit als erstes ein Shimadzu GC-MS (GCMS-QP2010 Ultra) für diese Kopplung.

Für die Bestimmung des <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C Verhältnisses in Vanillin (Hoffman und Salb, 1979 [1]) kam die CSIA-Technik zum ersten Mal kommerziell zur Anwendung. Allerdings kann mittels der <sup>13</sup>C Analyse alleine nicht zwischen dem synthetischen (petrochemisch) oder dem biosynthetischen (zum Beispiel Ferulasäure, Eugenol) Ursprung des Vanillins unterschieden werden. Darüber hinaus kann die <sup>13</sup>C-Signatur durch angereicherte Ausgangssubstanzen manipuliert werden und ein natürliches Produkt vortäuschen.

#### Bestimmung der Verhältnisse der Wasserstoffisotope

Aus diesem Grund müssen noch weitere Merkmale zur Differenzierung herangezogen werden. Dazu bietet sich als Lösung die zusätzliche Bestimmung der Verhältnisse der Wasserstoffisotope an (Greule et al., 2010 [2]). Bis zum heutigen Zeitpunkt sind aber nur wenige Daten darüber veröffentlicht. Imprint Analytics hat in den letzten Jahren eine umfangreiche Datenbank aufgebaut, mittels der sich die Herkunft und Authentizität verschiedener Vanillin-Proben feststellen lässt.

Welche Methode wendet Imprint Analytics nun an, um zu verifizieren, ob das Vanillin in Extrakten oder Fertigprodukten, einen natürlichen, naturidenten oder synthetischen Ursprung hat?

#### Materialien und Methoden

Das Vanillin wird aus der Essenz (beziehungsweise aus dem Fertigprodukt) extrahiert. Das Lösemittel ist 2-Methoxy-2-methylpropan (MTBE). Die Probe wird in ein 200 µl-Insert in eine 2 ml Flasche überführt und auf dem Trayholder des Autosamplers (Shimadzu, AOC-5000) gestellt.

Es müssen zwei separate Analysen durchgeführt werden, da die Kohlenstoff- und die Wasserstoffisotopensignatur separat zu erfassen sind.

Die Proben werden mit einer 10-µl-Spritze in den Optic-4 Multimode Inlet (GL Sciences, Tokyo, Japan) kalt (35°C) injiziert. Das Lösungsmittel wird einige Sekunden lang bei hohem Split abgeblasen. Anschließend wird der Injektor im Splitless-Modus auf 285°C erhitzt und die Probe so vollständig auf die Trennsäule überführt. Die Trennung erfolgt auf einer ZB-5MSi Säule (60 m x 0,25 mm 1,4 µm, Phenomenex, Torrance, USA). Die Analyse wird mit folgenden Parametern durchgeführt:

Temperaturprogramm: 35°C (1 min)

Aufheizrate: 20°C min<sup>-1</sup> bis 300°C

Druckprogramm: He Carrier: 300 kPa

Flow Control: Linear Velocity, APC1 (Druck nach dem Detector Switching Device, DSD): 100 kPa

Splitless-Zeit: 0,7 min.

Am Ende der Trennsäule befindet sich das Detector Switch Device von Shimadzu. Dieses ermöglicht die vollständige Abtrennung des Lösungsmittels sowie weiterer störender Begleitsubstanzen. Das Vanillin und andere Analyten mit ähnlicher Retentionszeit werden in einer inertisierten Kapillare weitergeleitet und über ein T-Stück in zwei Richtungen gesplittet. Ein Teil des Eluats wird zur Identifikation der Einzelsubstanzen zum Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra geführt, der andere Teil des Eluats wird im Oxidationsofen (Hekatech, Wegberg, Deutschland) zu H<sub>2</sub>O und CO<sub>2</sub> oxidiert.

Entstandenes Wasser wird mit Hilfe einer Nafion<sup>TM</sup> Membran entfernt (Hekatech, Wegberg, Deutschland) und CO<sub>2</sub> in das IR-MS (Nu Instruments, Wrexham, UK) geleitet. Hier wird das Isotopenverhältnis des Kohlenstoffs (<sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C) bestimmt (Abbildung 1).

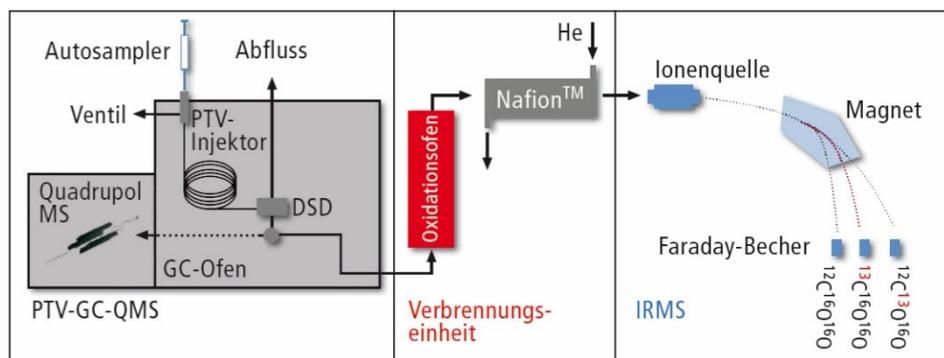


Abb.1: Messung des Isotopenverhältnisses von Kohlenstoff aus Vanillin. Schematische Darstellung. Die Probe wird kalt injiziert und das Lösungsmittel im PTV abgeblasen (Vent). Nach der Trennsäule befindet sich der Detector Switching Device (DSD) von Shimadzu; dort werden die Begleitstoffe abgetrennt. Nach dem DSD wird der Gasstrom gesplittet: Der kleinere Teil kommt in das Quadrupol-Massenspektrometer, wo die Substanzen identifiziert werden; der größere Teil wird im Oxidationsofen verbrannt. Nach Entfernung des Wassers gelangt das CO<sub>2</sub> in das IR-MS, wo das Isotopenverhältnis gemessen wird.

Die Wasserstoffisotopenbestimmung läuft ähnlich ab, jedoch wird dazu mehr Material benötigt. Injektionsvolumen und Abblasezeit im Optic-4 Multimode Inlet müssen daher erhöht werden. Außerdem wird nach Aufteilung des Eluats am T-Stück das Vanillin anstatt in einen Oxidationsofen in einen Pyrolyseofen geführt. Hier wird das Vanillin zu H<sub>2</sub> (beziehungsweise CO) reduziert. Der Wasserstoff wird in das IRMS geleitet und das <sup>2</sup>H/<sup>1</sup>H Isotopenverhältnis bestimmt.

Um eine hohe Messgenauigkeit zu gewährleisten, werden die gemessenen Werte in zwei Schritten normalisiert: jede Messung anhand eines eigenen reinen Referenzgases und jede Messreihe anhand eines Referenzmaterials (im Fall von Wasserstoff zwei Referenzmaterialien) mit bekannter Isotopenzusammensetzung. Der Normalisierungsprozess wird durch Standardproben überprüft. Zur Steigerung der Messgenauigkeit werden außerdem mehrere Wiederholungen für beide Elementen durchgeführt.

Die erhobenen Werte werden dann mit der Referenzdatenbank verglichen (Abbildung 2). Dadurch kann festgestellt werden, ob das Vanillin natürlichen, naturidenten oder synthetischen Ursprungs ist.

Die Zusammensetzung der Isotope kann nicht nur zur Authentizitätsprüfung herangezogen werden, sondern bietet auch Informationen über die geografische Herkunft des natürlichen Vanillins. So lässt sich zum Beispiel feststellen, ob die deklarierte Bourbon-Vanille tatsächlich aus Madagaskar stammt.

### Ausblick

Mit der oben beschriebenen Technik und Methodik können nach heutigem Wissensstand alle derzeitigen Vanillinquellen identifiziert werden. Jedoch gibt es immer neue Wege, Vanillin künstlich herzustellen. Daher ist es nicht ausgeschlossen, dass zukünftig diese Methode vor neue Herausforderungen gestellt wird.

Um auch dann adäquate Aussagen zur Authentizität von Vanillin treffen zu können, wird es notwendig sein, die Sauerstoffisotope zu berücksichtigen. Dadurch wäre eine dritte Messung erforderlich, wobei der Sauerstoff von Vanillin in einem Platinofen zum Kohlenmonoxid (CO) umgewandelt wird.

Neben Vanillin gibt es eine Vielzahl an Aromastoffen, bei denen es oft zu Verfälschungen kommt, zum Beispiel Bittermandel (Benzaldehyd) oder Zimt (Zimtaldehyd), um nur einige zu nennen. Imprint Analytics plant auf diesem Gebiet weitere Entwicklungen vorzunehmen, um auch diese Fälschungen entlarven zu können.

### Literatur

[1] Hoffman, P.G., Salb, M. (1979) Isolation and stable isotope ratio analysis of vanillin. *J. Agric. Food Chem.*, 1979, 27 (2), pp 352-355

[2] Greule, M., Tumino, L.D., Kronewald, T., Hener, U., Schleucher, J., Mosandl, A., & Kepler, F. (2010) Improved rapid authentication of vanillin using  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^2\text{H}$  values. *European Food Research and Technology*, 231: 933-41

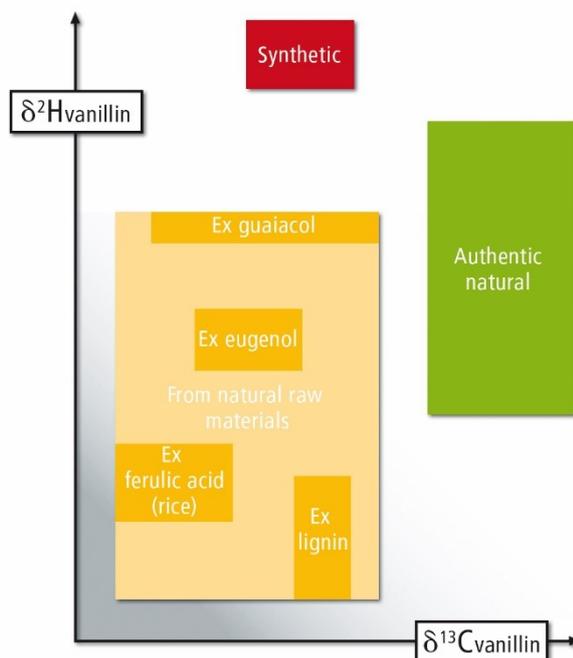


Abb.2: Darstellung der Isotopensignaturen für Vanille-Aromen. Die einzelnen Wertebereiche zeigen die möglichen Isotopensignaturen aus natürlicher, biotechnologisch oder synthetisch hergestellter Vanille. (Daten produziert von Imprint Analytics).