



Die leuchtende Limonade

Quantitative Fluoreszenzanalyse von Chinin-Aroma in verschiedenen Zubereitungen

Marion Egelkraut-Holtus

Shimadzu Europa GmbH

Der Klassiker der Fluoreszenzspektroskopie, den fast Jedermann schon mal zu Gesicht bekommen hat, ist ein Getränk, das unter Schwarzlichtbedingungen leuchtet. Dieses Leuchten von Tonic Water oder Bitter-Lemon-Limonaden kann dem Chinin zugeordnet werden. Seine Leuchtkraft, die Fluoreszenz, ist so intensiv, dass es als Fluoreszenzstandard eingesetzt werden kann.

Was ist Chinin?

Rein chemisch gesehen, ist es nach folgender Bezeichnung ein Alkohol 1-(6-Methoxychinolin-4-yl)-1-(5-vinyl-1,4-ethanopiperidin-2-yl)methanol mit der Summenformel $C_{20}H_{24}N_2O_2$. Die dazugehörige Struktur zeigt ein Ringsystem, das einen aromatischen Part aufweist und unter anderem die Ursache für die Fluoreszenz ist. Vereinfacht gesagt, lassen sich die π -Elektronen der Doppelbindungen mit energiereicher Lichtquelle (kurze Wellenlängen – UV-Strahlung) anregen. Mit der aufgenommenen Energie verlassen die Elektronen ihren energetischen Grundzustand und fallen nach kurzer Zeit unter Ausstrahlung der aufgenommenen Energie (Fluoreszenz) in den Grundzustand zurück.

Dieser weiße kristalline Feststoff – kurz Chinin – wurde im 17. Jahrhundert als Medizin gegen Malaria entdeckt. Seit dieser Zeit wurde und wird für eine medizinische Dosis ca. 300 mg Chinin eingesetzt.

Historisch gesehen haben die Kolonialisten, die in Malariagebieten wirkten, das „Tonic“ Wasser oder „Bitter Lemon“ Getränk kreiert, um sich präventiv gegen Malaria zu schützen. Auch heutzutage werden diese Getränke angeboten. So wird durchschnittlich für Tonic Water 70 mg/l und für Bitter Lemon 30 mg/l an Chinin verwendet.



Abb. 1: Flaschen von Tonic Water unter Normallichtbedingung links im Bild und eine Flasche mit Fluoreszenzphänomen

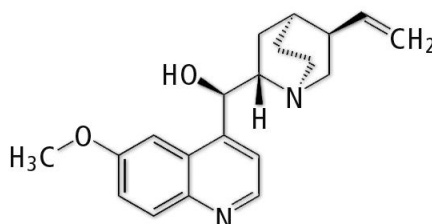


Abb. 2: Skizze der Chinin-Strukturformel

Chinin bringt den bitteren/herben Geschmack in das Getränk, ähnlich wie der Geschmack bei einer Pampelmuse. Aufgrund veränderten Konsumentenverhaltens ist das Selbsterstellen von Getränken eine Möglichkeit für die Verbraucher, mit Chinin in Kontakt zu kommen und damit zu arbeiten. Chinin-Geschmacksstoff, abgefüllt in kleinen Fläschchen, ist auf dem Markt erhältlich.

Fluoreszenzverhalten des Chinins

In dieser Applikation wird nun gezeigt, wie sich das Fluoreszenzverhalten des Chinins unter unterschiedlichsten Flüssigkeitsumgebungen zum einen verändert und zum anderen quantifizieren lässt.

Die Fluoreszenzspektroskopie ist selektiv. Man kann eine Substanz aus einem Gemisch heraus bestimmen. Trotzdem muss man die Umgebung der zu bestimm-

menden Umgebung – hier der Lösung – beachten. Die Fluoreszenz von Flüssigkeiten ist abhängig von der Temperatur, der Konzentration des Fluorophors, dem Lösemittel und dem pH-Wert der Lösung [1]. Zur Analyse gelangten „Bitter Lemon“ und „Tonic Water“ aus dem Supermarkt, deklariert als chininhaltige Getränke, und ein „Tonic Water“-Aroma zum Zubereiten von eigenen Limonaden.

Das verwendete „Tonic Water“-Aroma soll laut Angabe 6% Chinin, Wasser, Alkohol, Aromaextrakt und natürliche Aromen enthalten. Aufgrund der hohen Konzentration an Chinin wurde das Aroma 1: 50.000 verdünnt.

Einfluss des pH-Werts auf die analytischen Wellenlängen

Als Referenzmaterial wurde chemisch reines Chinin in destilliertem Wasser gelöst. Diese Lösung hatte einen pH-Wert von 5. Im Vergleich dazu liegen die durch Kohlensäure angesäuerten Limonaden bei einem pH-Wert von 2-3. In diesem Experiment wurde das „TonicWater“-Aroma einmal mit destilliertem Wasser (pH-Wert 5) und einmal mit Schwefelsäure angesäuert (pH-Wert 2-3) hergestellt. Die Messungen erfolgten am Fluoreszenz-Spektrophotometer RF-6000 von Shimadzu mit einer fluoreszenzfreien Standardküvette.

Beide Lösungen wurden mit der Fluoreszenzmessung charakterisiert. Zur vergleichenden Darstellung wurden beide Lösungen in einer EEM-Matrix (Excitation Emission Matrix) gemessen, in der man die fluoreszenzaktiven Regionen erkennt. Bei gleicher Skalierung sieht man, dass die angesäuerte Matrix zum Langwelligen hin verschoben liegt. Mit dem pH-Wert 5 liegt das analytische Wellenlängenpaar (Anregung/Emission) bei 275/375 nm (Region 1) und bei 325/375 nm (Region 2) und verschiebt sich mit pH-Wert 2-3 zu 325/450 nm

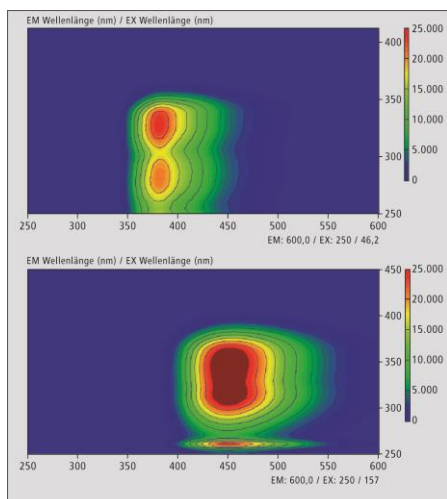


Abb. 3: EEM-Matrizes von Chinin in destilliertem Wasser (oben) pH-Wert 5, und angesäuert (unten) pH-Wert 2-3, wobei EEM gleich Excitation-Emission-Matrix bedeutet.

(Region 1) und 350/450 (Region 2) nm. Der Einfluss des pH-Werts auf die Anregung und Emission der Fluorophore ist bekannt [1].

Chinin-Gehalt überprüft

Zur Überprüfung des Chinin-Gehalts wurde eine Kalibrationsreihe aus 22 Standards (Tabelle 1, angesäuert, pH 2-3) erstellt, die einen weiten Konzentrationsbereich (0,05 bis 25,74 mg/l) bei gleichen Messparametern abdecken (Anregung bei 345 nm und Emission bei 449 nm). In Abbildung 4 ist die Kalibrationskurve des Experiments wiedergegeben.

Die Fluoreszenzintensität der Standards bei 449 nm und deren Chinin-Konzentration lassen sich durch eine polynomische Kalibrationskurve zweiten Grades verbinden. Die Ausgleichsrechnung ergibt eine Korrelation von 0,9997, wobei 1 der Idealzustand wäre. Diese Kalibration wurde gewählt, um den dynamischen Bereich des Gerätes zu demonstrieren.

Zur Analyse gelangten herkömmliche Limonaden in PET-Flaschen von verschiedenen Anbietern sowie ein Aromastoff. Exemplarisch werden Messungen mit Tonic Water und dem „Tonic Water“-Aroma gezeigt.

Um die Selektivität der Fluoreszenz und den dynamischen Bereich des Gerätes zu demonstrieren, wurde hier mit unterschiedlichsten Verdünnungen gearbeitet. Die gemessene Intensität und daraus berechnete Konzentration von ca. 55 g/l korreliert bei dem Aroma mit der Angabe auf der Flasche (6% Chinin ent-

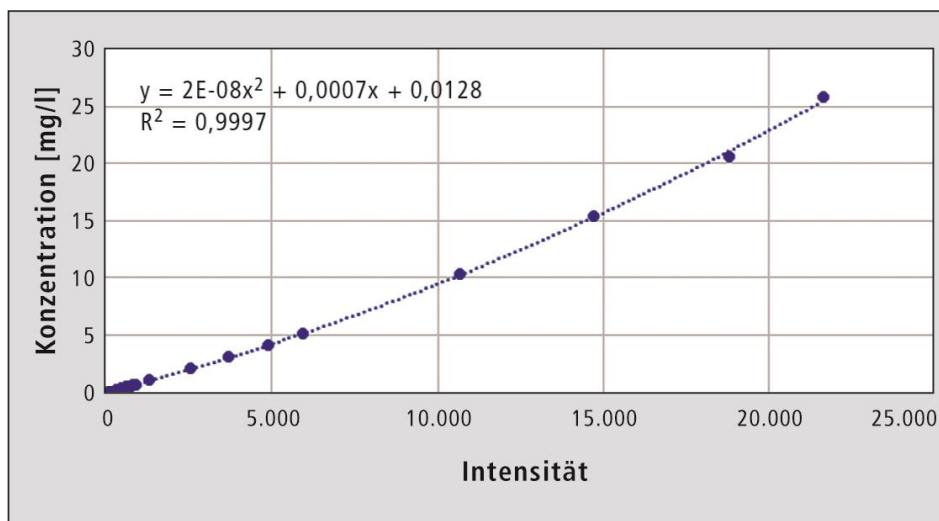


Abb. 4: Kalibrationskurve gebildet aus 22 Standards von Chinin in Konzentrationen von 0,05 bis 25,74 ppm

spricht einer Menge von 60 g/kg) und für die Limonade mit ca. 77 mg/l, das Markenprodukt, mit den in der Literatur gefundenen Angaben (ca. 70 mg/l Chinin). Im Vergleich dazu war das Chinin in der Discounter-Ware geringer dosiert. Die beiden Limonaden erfüllen nach der Aromaverordnung die erlaubten Chininkonzentrationen, denn beide liegen unter dem Grenzwert von 85 mg/l.

Fazit

Das Chinin in Limonaden und Aromastoffkonzentrat lässt sich gut bestimmen. Eine Kalibration von niedrig- bis hochkonzentriert kann mit Chinin erstellt werden. Die Kalibration konnte ohne Wechsel der Messparameter in Bezug auf Detektorempfindlichkeit und Gittereinstellung durchgeführt werden. Eine Optimierung der Kalibration kann man durch kleinere Konzentrationsbereiche und angepasste Geräteparameter erreichen.

Literatur

[1] *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, J. R. Lakowicz, 3rd Edition, 2010, Springer

[2] *Aromaverordnung*

Tab 1: 22 Standards hergestellt aus angesäuerten Chininlösungen, die Konzentrationen und Fluoreszenzen des analytischen Wellenlängenpaars

Intensität bei EM 449 nm	Chinin [mg/l]
88,548	0,05
137,096	0,1
214,153	0,15
266,866	0,21
336,795	0,26
402,928	0,31
469,410	0,36
531,006	0,41
592,821	0,46
659,707	0,51
711,222	0,56
778,106	0,61
887,907	0,67
1.258,75	1,03
2.514,80	2,06
3.698,36	3,09
4.858,05	4,12
5.935,70	5,15
10.652,5	10,3
14.746,9	15,45
18.824,2	20,59
21.649,0	25,74

Tab 2: Auflistung der Proben, deren Verdünnung, Fluoreszenzintensität und berechnetem Gehalt an Chinin

Probe	EM 449 nm	Konz. [mg/l]	Verdünnungsfaktor	Chinin (mg/l)	Herstellerangabe
Konzentrat - Flavour Tonic Water	1.485	1,10	50.000	54.835,94	6% (~60 g/l) Chinin in Lösung
Markenware - Tonic Water	1.056	0,77	100	77,43	~70 mg in Getränken
Discounter - Tonic Water	2.680	2,03	25	50,82	