

Bestimmung von Aromastoffen in Apfel- und Orangensaft

- Methodenentwicklung und Anwendung mit der
Stir Bar Sorptive Extraction und GC-MS -

Der Fakultät für Naturwissenschaften

Department Chemie

der Universität Paderborn

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Chemie

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von Dipl.-Chemikerin

Mareike Busse

aus Kirchlengern

Paderborn 2011

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von August 2007 bis August 2010 in Kooperation mit der Faethe Labor GmbH an der Universität Paderborn im Fach Anorganische und Analytische Chemie (Department Chemie, Fakultät für Naturwissenschaften) unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. M. Grote angefertigt.

Veröffentlichungen im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit:

M. Busse, C. Sprenger, M. Grote; *Entwicklung einer SBSE-GC/MS-Methode zur Analyse von Aromastoffen in Apfelsäften*; GDCh Wissenschaftsforum Chemie, 31.08.-02.09.2009, Frankfurt, Posterpräsentation, Tagungsband S. 383

M. Busse, C. Sprenger, M. Grote; *Entwicklung und Anwendung einer SBSE-TC-GC/MS-Methode zur Analyse von Aromastoffen in Apfelsäften*; 39. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 20.-22.09.2010 in Stuttgart, Posterpräsentation, Tagungsband S. 153

1. Referent: Prof. Dr. M. Grote
(Department Chemie, Anorganische und Analytische Chemie)
2. Referent: Prof. Dr. H. Heseker
(Department Sport und Gesundheit, Institut für Ernährung, Konsum und Gesundheit)

Tag der Prüfung: 16.12.2011

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. M. Grote für die interessante Themenstellung, stete Diskussionsbereitschaft und die Betreuung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Heseker danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Herrn Dr. C. Sprenger, Geschäftsführer der Faethe Labor GmbH Paderborn, danke ich für die firmeninterne Betreuung im Rahmen eines Forschungsprojektes.

Herzlich möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Arbeitskreises, insbesondere bei Manuel Ewe, Dr. Reinhard Michel, Dr. Didem Hanim Meriç, Rodica Knaup, Annika Weber und Farzana Chowdhury für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die stete Hilfsbereitschaft, bedanken.

Meinen ganz besonderen Dank möchte ich darüber hinaus all denjenigen aussprechen, die in fachlicher wie auch privater Hinsicht diese Arbeit auf vielfältige Art und Weise unterstützt haben. Ich danke all meinen Freunden, die mir stets zur Seite standen und durch ihre Diskussionsbereitschaft eine große Hilfestellung waren.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei meinen Eltern, die mich während meiner Studienzeit geduldig und nach Kräften unterstützt haben.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
1. Einleitung und Zielsetzung	1
2. Früchte und Fruchtsäfte	4
2.1 Fruchtsaftkonsum und Verbraucherverhalten	4
2.2 Apfel und Apfelsaft	7
2.3 Orange und Orangensaft	9
2.4 Presstechnologie	11
2.4.1 Apfel	11
2.4.2 Orange	14
3. Aroma und Aromastoffe	16
3.1 Was ist Aroma?	16
3.2 Klassifizierung der Aromen	21
3.3 Apfeleromen	22
3.4 Summenparameter zur analytischen Beurteilung von Apfeleromen	29
3.5 Orangenaroma	32
4. Analytik von Aromastoffen	34
4.1 Aromaanalytik	34
4.2 Historische Entwicklung der Apfelanalytik	35
4.2.1 Polydimethylsiloxan als Sorbens	36
4.2.2 Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE)	37
4.2.2.1 Charakteristika der SBSE-Technik	37
4.2.2.2 Theoretische Grundlagen der Extraktion mit dem Twister (SBSE)	40
4.2.2.3 Ablauf der Probenvorbereitung mit der SBSE-Technik	41
4.2.3 Simultane Destillation-Extraktion (SDE)	43
4.2.4 Vergleich SBSE und SDE	44
5. Untersuchungsmethodik	46

Inhaltsverzeichnis

6. Ergebnisse und Diskussion	50
6.1 Methodenentwicklung Stir Bar Sorptive Extraction-Thermo Desorption-GC-MS	50
6.1.1 „Apfelmethode“	50
6.1.1.1 Ausgangssituation.....	50
6.1.1.2 Probenvorbereitung	50
6.1.1.3 TD-GC-MS	55
6.1.1.4 Interner Standard und Lagerung.....	59
6.1.1.5 Matrixinterferenzen und Modelllösungen	60
6.1.1.6 Zusammenfassung der „Apfelmethode“.....	63
6.1.2 „Orangenmethode“.....	65
6.1.2.1 Probenvorbereitung	65
6.1.2.2 Interner Standard und Lagerung der beladenen Twister	67
6.1.2.3 Zusammenfassung der „Orangenmethode“.....	69
6.2 Validierung	70
6.2.1 Ausreißer-Tests.....	71
6.2.2 Normalverteilung	72
6.2.3 Arbeitsbereich	72
6.2.4 Linearität	74
6.2.5 Varianzhomogenität	75
6.2.6 Erkennungs-, Bestimmung-/ Erfassungsgrenze und Erfassungsvermögen.....	76
6.2.7 Verfahrenskenndaten.....	78
6.2.8 Präzision	79
6.2.9 Richtigkeit.....	80
6.2.10 Selektivität und Spezifität	81
6.3 Ringversuch	83
6.3.1 Laborvergleichsuntersuchung anhand von Apfeldirektsäften	83
6.3.2 Untersuchung von handelsüblichen Apfelsäften	84
6.3.3 Fazit des Ringversuches.....	85
6.4 Erkennung von aromatisierten Direktsäften	86

6.5	Vorschlag zur Mindestaromatisierung.....	89
6.6	Chemometrische Datenanalyse zur Klassifizierung von Apfelsäften.....	93
6.6.1	Hauptkomponentenanalyse (PCA)	95
6.6.2	Soft Independent Modeling of Class Analogy (SIMCA)	99
6.6.3	Anwendungen des chemometrischen Modells	103
7.	Zusammenfassung und Ausblick	109
8.	Literatur	112
Anhang.....		
A.	Analyten.....	I
B.	Experimenteller Teil.....	IV
C.	Konzentration der Aromen im Realstandard.....	VIII
D.	Messmethode zur Aromenanalyse in Apfelsäften.....	IX
E.	Messmethode zur Bestimmung von Ethylbutyrat in Orangensaft.....	XII
F.	Messmethode zur Bestimmung von Markersubstanzen in Apfelsaft.....	XV
G.	Validierung.....	XVIII
H.	Arbeitsanweisung SDE.....	XLVII

Abkürzungsverzeichnis

AIJN	European Fruit Juice Association
ASK	Apfelsaftkonzentrat
a	Ordinatenabschnitt der Kalibriergeraden
b	Steigung der Kalibriergeraden
CC α	Entscheidungsgrenze
CC β	Nachweisgrenze
DE	Deutschland
DGE	Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V.
FEI	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V.
FID	Flammenionisationsdetektor
FR	Frankreich
FruchtsaftVO	Fruchtsaftverordnung
GB	Großbritannien
GC	Gaschromatograph
GDCh	Gesellschaft Deutscher Chemiker
GSW	Geruchsschwellenwert
h	Stunde
HCA	Hierarchical Cluster Analysis, Hierarchische Clusteranalyse
HS	Headspace
HSSE	Headspace Sorptive Extraction
IS	Interner Standard
IT	Italien
L	Liter
LLE	Flüssig/Flüssig- Extraktion
LVU	Laborvergleichsuntersuchung
mL	Milliliter
μ L	Mikroliter
min	Minuten
MS	Massenspektrometer
MSD	Massenselektiver Detektor
N	Anzahl der Messungen
OTT	Open Tubular Trap
P	Wahrscheinlichkeit
PCA	Principal Component Analysis, Hauptkomponentenanalyse
PET	Polyethylentherephthalat

PDMS	Polydimethylsiloxan
RSK	Richtwerte und Schwankungsbreiten bestimmter Kennzahlen
RV	Ringversuch
SBSE	Stir Bar Sorptive Extraction
SDE	Simultane Destillation Extraktion
SE-TD	Sorptive Extraction- Thermal Desorption
SIM	Selected Ion Monitoring
SIMCA	Soft Independent Modeling of Class Analogy
SPME	Solid Phase Microextraction
TIC	Total Ion Current
TDU	Twister Desorption Unit, Twister Desorptionseinheit
Upm	Umdrehungen pro Minute
VdF	Verband der deutschen Fruchtsaftindustrie e.V.

1. Einleitung und Zielsetzung

Apfel- und Orangensaft gehören in Deutschland zu den beliebtesten Fruchtsäften. Im Jahr 2008 wurden in Deutschland circa 500 neue Getränke im alkoholfreien Sektor mit der Geschmacksrichtungen Apfel auf den Markt gebracht. Die große Beliebtheit des Apfelsaftes resultiert aus dem erfrischenden, leicht säuerlichen Geschmack und den gesundheitsfördernden Eigenschaften, die ihm zugeschrieben werden¹. Um auf dem stetig wachsenden Markt der alkoholfreien Getränke neben weiteren Getränken mit gesundheitlichem Mehrwert bestehen zu können, müssen Produzenten der sensorischen Qualität, dem Geruch und dem Geschmack, besondere Aufmerksamkeit schenken. Diese Eigenschaften variieren, je nach Zusammensetzung aus den charakteristischen Inhaltsstoffen wie Zucker, Säuren und Aromastoffen.

Während einem Apfeldirektsaft laut Fruchtsaftverordnung² (FruchtsaftVO) kein Aroma zugesetzt werden darf, muss dem Apfelsaft aus Apfelsaftkonzentrat das während der Konzentrierung entzogene Aroma wieder zugeführt werden. Zur Beurteilung dieser Rearomatisierung gibt der Gesetzgeber zwei Kriterien vor - Sensorik und Analytik-, nach denen ein Fruchtsaft aus Konzentrat beurteilt werden soll: „Das auf diese Art gewonnene Erzeugnis muss im Vergleich zu einem durchschnittlichen [...] Saft zumindest gleichartige organoleptische und analytische Eigenschaften aufweisen.“²

Diese Gleichartigkeit wird durch die sensorische Prüfung von Farbe, Geruch und Geschmack sowie durch die analytische Kontrolle anhand der Richtwerte und Schwankungsbreiten bestimmter Kennzahlen (RSK)^{3,4} bzw. European Fruit Juice Association (AIJN/Association of the Industry of Juices and Nectars from Fruit and Vegetables of the European Union)⁵- Richtwerte sichergestellt. Seit geraumer Zeit wird diese Gleichartigkeit auch anhand der Analytik der Aromastoffe überprüft.

Ein industriell hergestelltes Produkt muss immer qualitativ einwandfrei sein, gleiches gilt dementsprechend für die eingesetzte Rohware und den Produktionsprozess, der hinsichtlich der Endqualität betrachtet werden muss. Dies ist auch in der FruchtsaftVO definiert: „Fruchtsaft ist das gärfähige, jedoch nicht gegorene, aus gesunden und reifen Früchten [...] gewonnene Erzeugnis, das die für den Saft dieser Frucht/Früchte charakteristische Farbe, das dafür charakteristische Aroma und den dafür charakteristischen Geschmack besitzt.“²

Kriterien für die Aromaqualität von aus Konzentrat hergestellten Säften bezüglich der analytischen Gleichartigkeit sind bisher nicht anerkannt. Bis vor wenigen Jahren wurde das Aroma zum größten Teil nur sensorisch bewertet. Durch die heutigen analytischen Techniken wächst jedoch erneut der Wunsch nach objektiven Beurteilungskriterien.

Die quantitative Bestimmung der für das Aroma verantwortlichen Substanzen in Fruchtsäften gewinnt an Bedeutung, da die Sensorik, trotz eines intensiv geschulten Panels, keine vollständige Objektivität gewährleisten kann. Wie wichtig dieser Aspekt ist, zeigt sich auch in der Überschrift „Das Aroma macht den Unterschied“, welche die Stiftung Warentest für ihren Apfelsaft-Test 2009 wählte⁶. Bereits in dem Bericht „Billig und schlecht“, veröffentlicht in der Zeitschrift test 5/2007, wurde die schlechte Bewertung vieler Apfelfruchtsaftgetränke überwiegend mit der Aromaqualität begründet⁷.

Es wurden bereits viele Untersuchungen über die Schlüsselaromastoffe des Apfels und des Apfelsaftes wie auch über die Veränderung des Aromas während der Produktion und der anschließenden Lagerung durchgeführt. Anerkannte Parameter, um die Rearomatisierung eines Apfelsaftes aus Konzentrat zu überprüfen, fehlen jedoch. In verschiedenen Gremien wurde die Reglementierung von Fruchtsaftaromen diskutiert. Die vorgeschlagenen Summenparameter werden bislang kontrovers diskutiert. Generell ist bei allen Beurteilungskriterien wichtig, dass die verwendeten Parameter die Schwankungsbreiten, die ein Naturprodukt wie Fruchtsaft aufweist, berücksichtigt werden.

Die Analytik von Apfelaromastoffen wird bislang häufig mittels Simultaner Destillation-Extraktion (SDE) und anschließender Headspace-Gaschromatographie-Massenspektrometrie (HS-GC-MS) durchgeführt⁸. Die Durchführung der SDE dauert 3 Stunden je Probe, der Anwender muss über einige Erfahrung verfügen und es werden 80 mL Lösemittel eingesetzt. Im zweiten Schritt muss der erhaltene Extrakt noch eingeengt werden.

Die Stir-Bar-Sorptive-Extraction (SBSE) ist eine einstufige Probenvorbereitungstechnik, die es erlaubt, 15 Proben innerhalb von drei Stunden aufzuarbeiten und nur 10 mL Lösemittel je Probe zur Reinigung des Stir Bars benötigt. Aus den methodischen Defiziten die die SDE-Methode aufweist, ergab sich die Zielsetzung dieser Arbeit.

Ziel dieser Arbeit:

- Entwicklung einer Stir Bar Sorptive Extraction-Thermodesorption-Gaschromatographie-Massenspektrometrie (SBSE-TD-GC-MS)-Methode zur Quantifizierung ausgewählter Apfeleromastoffe in Apfelsäften, Direktsäften und Säften aus Konzentrat, sowie Apfeleromen
- Anwendung der Methode in der Routineanalytik zur Qualitätskontrolle der produzierten Säfte
- Teilnahme an einer Laborvergleichsuntersuchung der GDCh zum Abgleich unterschiedlicher Methoden zur Quantifizierung von Aromen in Apfelsäften
- Beitrag von Analysedaten von Apfeldirekt- und Konzentratsäften für den Datenbestand der GDCh-Projektgruppe „Beurteilungskriterien für Apfelsaftaroma“
- Beitrag von Analysedaten für den Verband der deutschen Fruchtsaft-Industrie e.V. (VdF)
- Vorschlag eines Grenzwertes zur Mindestaromatisierung von Apfelsäften aus Konzentrat
- Identifizierung von Markersubstanzen zur Erkennung von rearomatisierten Konzentratsäften
- Entwicklung eines chemometrischen Modells mit der Software Pirouette Lite Classify® zur Klassifizierung von Apfelsäften und zur Identifizierung von mit Aroma versetzten Apfeldirektsäften
- Entwicklung einer Stir Bar Sorptive Extraction Thermodesorption-Gaschromatographie-Massenspektrometrie (SBSE-TD-GC-MS)-Methode zur Quantifizierung von Ethylbutyrat in Orangensaft zur Kontrolle der eingesetzten Entgaser
- Anwendung dieser Methode in der Routineanalytik zur Kontrolle bestimmter Produktionsschritte

Der Verbraucher muss beim Kauf von Fruchtsäften die Gewissheit haben können, dass er ein in der Qualität gesetzeskonformes Produkt erwirbt. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen einen Beitrag zur Diskussion der Beurteilungsmodelle der Rearomatisierung in Apfelsäften aus Konzentrat leisten, um daraus Grenzwerte abzuleiten, die

- dem Verbraucherschutz ein Instrument an die Hand geben, um die im Verkauf stehenden Produkte zu beurteilen,
- und die dem Produzenten ein objektives Mittel geben, um die Rechtskonformität seiner Produkte zu kontrollieren.

2. Früchte und Fruchtsäfte

2.1 Fruchtsaftkonsum und Verbraucherverhalten

Der „Durchschnittsdeutsche“ trinkt pro Jahr 291,4 L alkoholfreie Getränke⁹. Dieser Verbrauch setzt sich aus 117,0 L Erfrischungsgetränken (z. B. Limonaden, Fruchtsaftgetränke, Tee- und Kaffeegetränke), 137,4 L Wässern sowie 37,0 L Fruchtsäften und Fruchtnektaren zusammen (siehe Abb. 1). Mit einem pro-Kopf-Verbrauch von 37,0 L lagen die Deutschen im Jahr 2009 mit einem Mehrverbrauch von 9 Litern gegenüber den USA und 13,6 L gegenüber dem EU-Durchschnitt an der Spitzenposition im internationalen Vergleich (siehe Abb. 2).

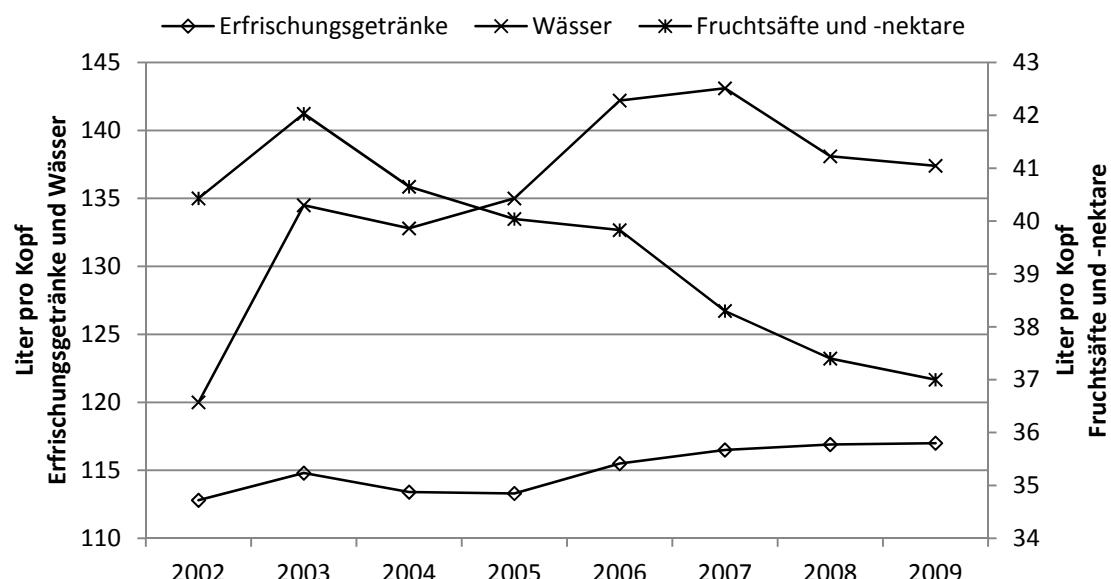


Abb. 1: Entwicklung des pro-Kopf-Verbauchs von alkoholfreien Getränken nach Getränkearten 2002-2009, Erfrischungsgetränke, Wässer und Fruchtsäfte und –nektares⁹

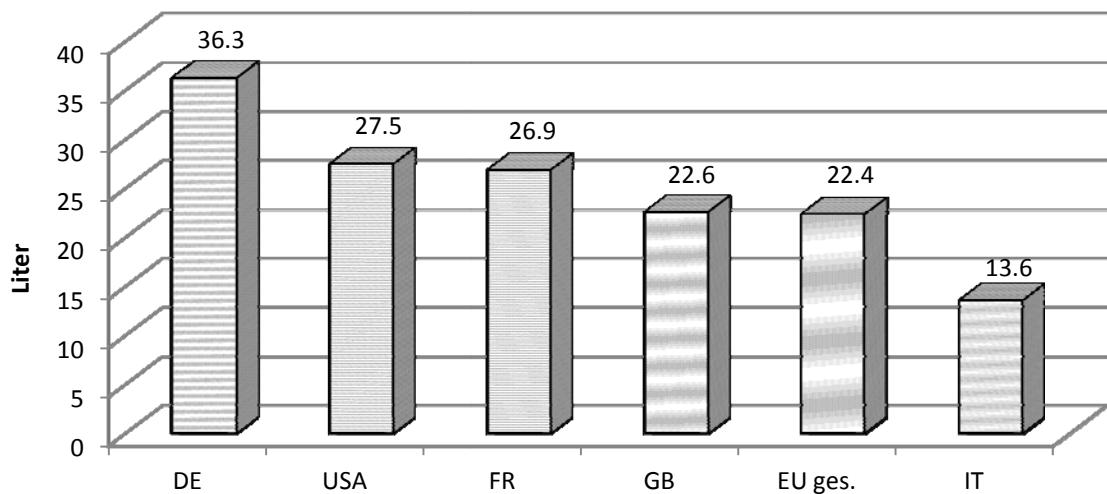


Abb. 2: Fruchtsaftkonsum im Ländervergleich im Jahr 2010 ohne Berücksichtigung der Fruchtschorlen¹²

Der Fruchtsaftkonsum unterliegt seit 2003 jedoch einem fallenden Trend, da eine Verschiebung zu Fruchtsaftgetränken und Wässern stattgefunden hat. Der geringere Konsum von Fruchtsäften hat mehrere Ursachen. Zum einen wurden Preisanpassungen durchgesetzt, die aufgrund immens gestiegener Rohstoffpreise notwendig waren¹⁰. Zum anderen haben sich Produktinnovationen nachhaltig etablieren können, welche dem Verbraucher einen gesundheitlichen Mehrwert bieten und somit eine Alternative zu den Fruchtsäften darstellen¹¹.

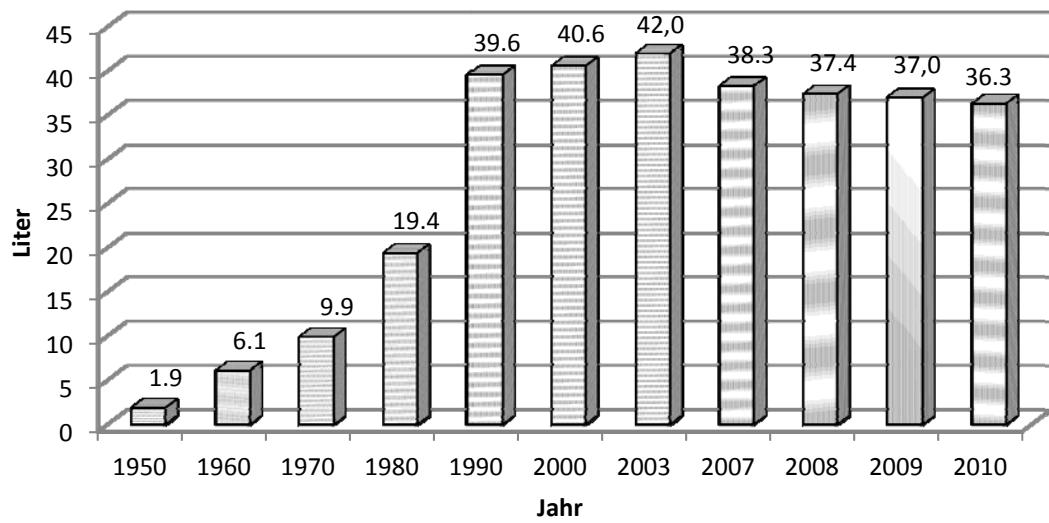


Abb. 3: Entwicklung des pro-Kopf-Verbrauchs an Fruchtsäften und Fruchtnektaren in Deutschland seit 1950 ohne Berücksichtigung der Fruchtschorlen¹²

Auch wenn sich der pro-Kopf-Verbrauch verändert hat (Abb. 3), ist in der Beliebtheit der Säfte nur ein geringer Wandel zu erkennen. Apfel- und Orangensaft gehören weiterhin zu den wichtigsten Fruchtsorten. Mit 17,5 L haben sie einen Anteil von 47,3% Gesamtverbrauch (Abb. 4)¹².

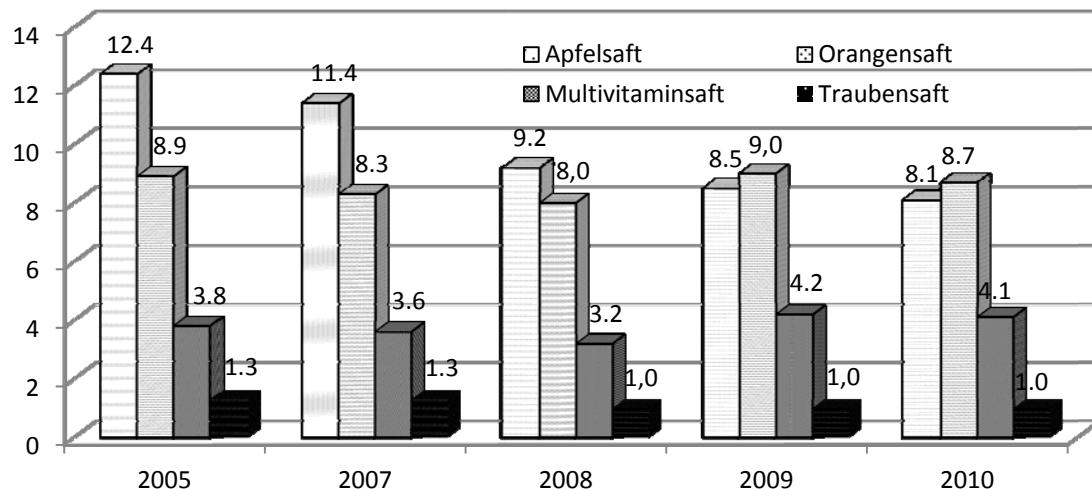


Abb. 4: Entwicklung des pro-Kopf-Verbrauchs an Apfel-, Orangen-, Trauben- und Multivitaminsäften¹²

Getränkegattungen

Bei fruchtsafthaltigen Getränken wird dem Verbraucher eine Vielzahl von Wahlmöglichkeiten geboten. Wie viel *Fruchtanteil* in Fruchtsäften, Fruchtnektaren, Fruchtsaftgetränken und Fruchtsaftschorlen verarbeitet wird und ob andere Zusatzstoffe, wie z. B. Zucker zugesetzt sind, ist in der Fruchtsaftverordnung² und in den Leitsätzen für Erfrischungsgetränke vom 27.11.2002¹³ festgelegt.

Hochsafthaltige Getränke:

- Fruchtsaft

Laut Fruchtsaftverordnung muss ein mit Fruchtsaft deklariertes Getränk 100% Fruchtsaft enthalten. Dies kann entweder ein Direktsaft oder ein Saft aus Konzentrat sein. Konzentrat kann über mehrere Monate auf kleinem Raum gelagert und kostengünstiger transportiert werden. Durch Zugabe von Wasser und Aromen entsprechend dem vorherigen Entzug wird der Saft wieder hergestellt. Dies findet besonders bei Früchten Anwendung, die nur in entfernten Gebieten angebaut werden können, um so Transportkosten zu minimieren, z. B. bei Orangen, welche zum großen Teil in Brasilien angebaut werden.

- Fruchtnektar

Fruchtnektare enthalten zwischen 25% und 50% Fruchtanteil. Diese werden häufig aus besonders säurerichen Früchten, wie Sauerkirschen oder schwarzen Johannisbeeren, oder aus besonders fruchtfleischhaltigen Sorten, wie Bananen oder Mangos, hergestellt. Der entsprechende Fruchtgehalt ist auf der Packung deklariert. Bei Fruchtnektaren kann Zucker oder Honig bis zu einer Menge von 20% des Gesamtgewichts des fertigen Erzeugnisses zugesetzt sein.

Erfrischungsgetränke:

- Fruchtsaftgetränk

Fruchtsaftgetränke enthalten Fruchtsaft, Fruchtsaftkonzentrat, Fruchtmark, Fruchtmarkkonzentrat oder Mischungen daraus, Wasser und Aromaextrakte und/oder natürliche Aromastoffe. Der Fruchtgehalt liegt zwischen 6% und 30%.

- Fruchtschorle

Fruchtschorlen enthalten Fruchtsaft, Fruchtsaftkonzentrat, Fruchtmark, Fruchtmarkkonzentrat oder Mischungen daraus, Wasser und Kohlensäure. Diese können mit Zucker gesüßt und mit natürlichen Aromen versetzt sein. Der Fruchtgehalt liegt bei mindestens 25 - 50%, je nach Unterscheidung, ob die jeweilige Frucht zum unmittelbaren Genuss geeignet ist.

2.2 Apfel und Apfelsaft

Die Gattung Apfel (lat. *Malus*) gehört zur Familie der Rosengewächse. *Malus domestica* bezeichnet den Gartenapfel als Sammelart für die Urform der europäischen Kultursorten¹⁴. Schon vor ca. 60 Millionen Jahren (Beginn der Tertiärzeit) entwickelten sich primitive Vorformen des Apfels. Aus den tropischen Bergregionen Südostasiens breiteten sie sich fast über die gesamte Nordhalbkugel aus. Die ältesten fossilen Funde in Deutschland stammen aus Ehringsdorf bei Weimar und ihr Alter wird auf 100 000 Jahre geschätzt¹⁵. Das Wissen, dass aus Früchten Säfte hergestellt werden können, reicht bis in die menschliche Frühzeit zurück.

Der Apfel ist mit momentan 5 500 Sorten das am häufigsten verzehrte Obst¹⁶. Mit einem Anteil von 19,0% liegt es noch weit vor Bananen (10,7%) und Orangen (3,2%)¹⁷.

Die durchschnittliche *Zusammensetzung* eines Apfels und von Apfelsaft ist in Tab. 1 zusammengefasst. Verschiedene Faktoren haben einen Einfluss auf die Zusammensetzung und auf das Aroma. Nicht nur zwischen den verschiedenen Sorten finden sich große Unterschiede in der Zusammensetzung, auch Anbaubedingungen, Klima, Witterungsverlauf, Reifestadium und Lagerungsbedingungen verändern diese.

Tab. 1: Durchschnittliche Zusammensetzung von Äpfeln, Grenzwerte und Mittelwerte¹⁸ und Zusammensetzung von Apfelsaft, Grenzwerte und Mittelwerte^{5,19,20}

		Apfel		Apfelsaft
Wasser	%	80-90		88,8-90
Roheiweiß	g/100 g essbarer Anteil	0,3	g/100 mL	0,3
Kalium		90-150		900-1500
Calcium		3-12		30-120
Magnesium		4-7,5		40-75
Phosphor		7-17		40-75
Eisen		0,1-0,25		5
Vitamin B ₁		15-60	mg/L	0,06-0,4
Vitamin B ₂		20-50		0,1-0,5
Niacin		100-500		1-5
Vitamin B ₆		100		0,96
Pantothensäure		100		0,2-1
Vitamin C		3-25		74
Glucose		1,4-2,35		15-35
Fructose		4,8-6,4		45-85
Saccharose		0,54-2,78		5-30
Sorbit		0,51		2,5-7
Ballaststoffe		1,8-2,5		2,0
Äpfelsäure	mg/100 g essbarer Anteil	270-790		min. 3,0
Citronensäure		29,3		0,05-0,2

Der Schwerpunkt der Obstverarbeitung in Deutschland ist eindeutig beim Kernobst und zwar bei den Äpfeln zu sehen. Um einen Liter Apfelsaft zu gewinnen, braucht man etwa 1,5 kg Äpfel. Durchschnittlich werden jährlich 800 000 Tonnen Äpfel zu Saft verarbeitet²⁰.

Die Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE) ordnet Fruchtsäfte in der Lebensmittelpyramide in die Gruppe der pflanzlichen Lebensmittel ein und unterstützt die Empfehlung, dass Fruchtsäfte im Rahmen der „5 am Tag“-Kampagne eine von fünf Obstportionen ersetzen können²¹. Sie stellen durch ihre *gesundheitsfördernde Wirkung* eine wichtige Ergänzung zur täglichen Nährstoffzufuhr dar. Besonders hervorzuheben sind hier das Vitamin C und die Polyphenole. Die anderen in Fruchtsäften vorkommenden Vitamine spielen aufgrund ihrer geringen Konzentration eine untergeordnete Rolle²¹.

Vitamin C: Die Wirkung von Vitamin C erkannte schon der Schiffsarzt Dr. James Lind. Daraufhin sorgte der Kapitän James Cook dafür, dass seine Mannschaft täglich Orangen und Zitronen zum Verzehr bekam. Die tödlich verlaufende Krankheit Skorbut konnte mit der regelmäßigen Zufuhr von Vitamin C eingedämmt werden. Heutzutage kann es durch Vitamin C-Mangel zu einer starken Anfälligkeit gegen Infektionen, Blutungsbereitschaft und Mattigkeit kommen. Als Antioxidans ist es in der Lage aktivierten Sauerstoff abzufangen und radikalische Kettenreaktionen abzubrechen und so zellschädigende Folgen zu verhindern²¹.

Polyphenole: Je intensiver die Farbgebung der Fruchtsäfte, umso mehr Polyphenole enthalten sie. Bei Äpfeln wird die Konzentration von mehreren Faktoren beeinflusst, wie z. B. der Sorte, dem Reifegrad, der Sonneneinstrahlung, der Düngung und der Press-technologie²¹. Apfelsäfte, besonders naturtrübe, sind eine reiche Quelle an natürlichen Antioxidantien, und Studien weisen auf einen vorbeugenden Effekt gegen degenerative Krankheiten beim Menschen hin^{22,23}.

2.3 Orange und Orangensaft

Die Orange, welche auch Apfelsine genannt wird, gehört zur Familie der Rautengewächse (*Rutaceae*). Sie stammt aus den südchinesischen Provinzen Yunnan und Sichuan und wurde vor mehr als 4000 Jahren in Südchina in Kultur genommen. Ihren Weg nach Europa hat sie erst im frühen 16. Jahrhundert gefunden.

Orangen werden heutzutage in den Ländern des „Zitrus-Gürtels“ (zwischen dem 40. Grad nördlicher und dem 35. Grad südlicher Breite) angebaut. Von den geschätzten 400 Sorten sind 30 wirtschaftlich von Bedeutung, sowohl als Frischobst als auch verarbeitet zu Säften, Marmeladen und anderen Konserven²⁴.

Die Zitrusfrüchte, wobei Orangen mit 63% den größten Anteil darstellen, zählen neben Weintrauben und Bananen zu den weltweit am meisten angebauten Obstarten²⁵.

Orangen zeichnen sich durch ihren hohen Gehalt an den *Vitaminen C, A und B* aus. In Tab. 2 ist die durchschnittliche Zusammensetzung von Orangen und Orangensaft zusammengefasst. Doch nicht nur Vitamin C, auch Polyphenole (s. Kap. 2.2) machen den Orangensaft zu einem gesundheitsfördernden Getränk. Vitamin C erhöht zudem die Verfügbarkeit von Eisen in der Nahrung. Eine Empfehlung des Forschungsinstituts für Kinderernährung in Dortmund ist, die ersten Milch- und Gemüsebreie mit Fruchtsäften anzureichern, da Eisen besonders für Kleinkinder wichtig ist²¹.

Tab. 2: Durchschnittliche Zusammensetzung von Orangen, Grenzwerte und Mittelwerte und Zusammensetzung von Orangensaft, Grenzwerte und Mittelwerte^{5,18,26}

		Orange		Orangensaft
Wasser	%	85,7-86,1		88,2-90,0
Roheiweiß	g/100 g essbarer Anteil	1,0-1,1	g/100 mL	0,9
Kalium	mg/100 g essbarer Anteil	150-206	g/L	1,3-2,5
Calcium		33-58	60-150	
Magnesium		11,18	70-160	
Phosphor		23	115-210	
Eisen		0,1-0,4	40	
Vitamin B ₁	μg/100 g essbarer Anteil	79-110	mg/L	0,6
Vitamin B ₂		40-42		0,1
Niacin		300-400		2-3,0
Vitamin B ₆		100-104		0,55-1,45
Pantothensäure		270-340		0,2
Vitamin C	mg/100 g essbarer Anteil	49,0-54,0	g/L	30,9
Glucose	g/100 g essbarer Anteil	2,2-2,44	g/L	20-50
Fructose		2,4-2,58		20-50
Saccharose		3,23-3,9		10-50
Ballaststoffe		1,4-1,9		0,95
Äpfelsäure		0,04-0,19		0,8-3,0
Citronensäure		0,6-1,88		6,3-17

2.4 Presstechnologie

2.4.1 Apfel

Äpfel stellen in Mitteleuropa die bedeutendste Fruchtart dar und werden dort am häufigsten für die Fruchtsaftbereitung verwendet. Sie eignen sich wegen des ausgeglichenen Säure/Zucker-Verhältnisses für die Saftherstellung besonders gut, da sie im Gegensatz zu särureren Säften, z. B. Sauerkirschsaft oder schwarzem Johannisbeersaft, ohne Zusatz von Zucker oder weiterer Verdünnung, konsumiert werden können^{16,52}. Die einzelnen Schritte der *Apfelsaftherstellung* sind schematisch in Abb. 5 gezeigt¹⁶.

Bevor die Äpfel in der Mühle zerkleinert werden erfolgt nach der Annahme zunächst die Reinigung mittels Schwemmbäder. Eine weitere Vorbehandlung wie Entsteinen oder Schälen ist beim Apfel nicht nötig. Zur *Zerkleinerung* von Kernobst werden häufig Rätszmühlen eingesetzt. Hier wird das Obst mit den Rotorblättern gegen die Wand des Mahlraums gedrückt und durch die eingelegten Messer zerkleinert. Je nach gewünschter Partikelgröße der Maische können unterschiedliche Messer eingesetzt werden.

Nach dem *Entsaften*, unterscheiden sich die Herstellungswege von naturtrübem Apfel direktsaft und Apfelsaft aus Konzentrat.

Der naturtrübe *Direktsaft* wird üblicherweise mittels Bucherpressen oder Dekantern hergestellt, separiert, kurzzeitig erhitzt und in sterilen Tanks eingelagert. Nur in Ausnahmefällen wird heute zur Herstellung von naturtrüben Direktsäften die Maische vorab enzymiert. Nach vorgegebener Lagerzeit wird der trübe Saft nach einer nochmaligen Kurzzeiterhitzung abgefüllt, für den Verkauf etikettiert und verpackt. Ein Apfeldirektsaft muss gemäß der EU-Fruchtsaft-Richtlinie eine relative Dichte (Quotient ρ_{Probe} und ρ_{Wasser}) von mindestens 1,040 aufweisen.

Die *Bucherpresse* ist eine hydraulische Horizontal-Korb presse, welche diskontinuierlich presst. Sie ermöglicht eine hohe Pressausbeute mit hygienisch sauberem Betrieb ohne Saftverluste und kann auch unter Schutzgas betrieben werden. Der *Dekanter* presst kontinuierlich. Er trennt durch eine horizontale Schneckenzentrifuge den Saft von den Feststoffen. Mit Dekantern und Pressen können vergleichbare Ausbeuten erreicht werden.

Bei der Herstellung von *Saft aus Konzentrat* wird die Apfelmaische üblicherweise mit pektolytischen Enzymen versetzt. Nach einer Haltezeit von 30 - 60 min bei 50 – 55 °C wird mittels Bucher presse oder Dekanter der Saft gepresst. Der Trester wird nach dem

Zusatz von Trinkwasser und Enzymen nochmals abgepresst. Beide Presssäfte werden vereinigt und mit stärkeabbauenden Enzymen versetzt. Nach dieser Behandlung wird kurzzeiterhitzt, geschönt und filtriert. Der so gewonnene Saft wird aufkonzentriert, wobei das Apfelsaftkonzentrat und die Aromaphase gewonnen werden.

Die *Konzentratherstellung* (ASK, Apfelsaftkonzentrat) durch Verdampfen im Vakuum ist das am häufigsten angewendete und wirtschaftlichste Verfahren. Weitere technologische Möglichkeiten sind Sublimation (Gefriertrocknen), Kristallisation (Gefrierkonzentrieren) und Diffusion (Umkehr-Osmose).

Das *Aroma* (Apfelwasserphase 150- bis 2500-fach konzentriert) wird neben dem ASK als Konzentrat aus dem Saft gewonnen. Die Aromagegewinnung erfolgt bei den meisten Verfahren zweistufig durch Abtrennung der Aromastoffe und anschließender Anreicherung. Die Anreicherung aus der wässrigen Phase kann durch Extraktion oder Destillation geschehen. 0,5 - 2,0% der Frischsaftmenge fallen in einer Aromarückgewinnungsanlage als Aromawasserphase an, welches danach auf die gewünschte Konzentration destilliert werden kann.

Nach der Konzentrierung werden Konzentrat und Aroma separat gelagert. Die Lagerung nach der Konzentrierung ist kostengünstiger und länger möglich als die Lagerung des Direktsaftes. Bei Vollkonzentraten (60 - 74% Trockensubstanz) verringert sich das Volumen um das sechs- bis siebenfache im Vergleich zum Direktsaft. Zur Abfüllung wird nun aus Konzentrat, Aroma und Wasser der Apfelsaft rekonstituiert. Es müssen gleiche Anteile an Konzentrat, Aroma und Wasser zur Rekonstituierung genutzt werden, welche im Saft vor der Konzentratherstellung ursprünglich vorhanden waren. Nur unter diesen Bedingungen darf der Saft als 100%-Saft deklariert werden. Ein Apfelsaft aus Konzentrat muss laut EU-Fruchtsaft-Richtlinie eine relative Dichte von 1,045 aufweisen.

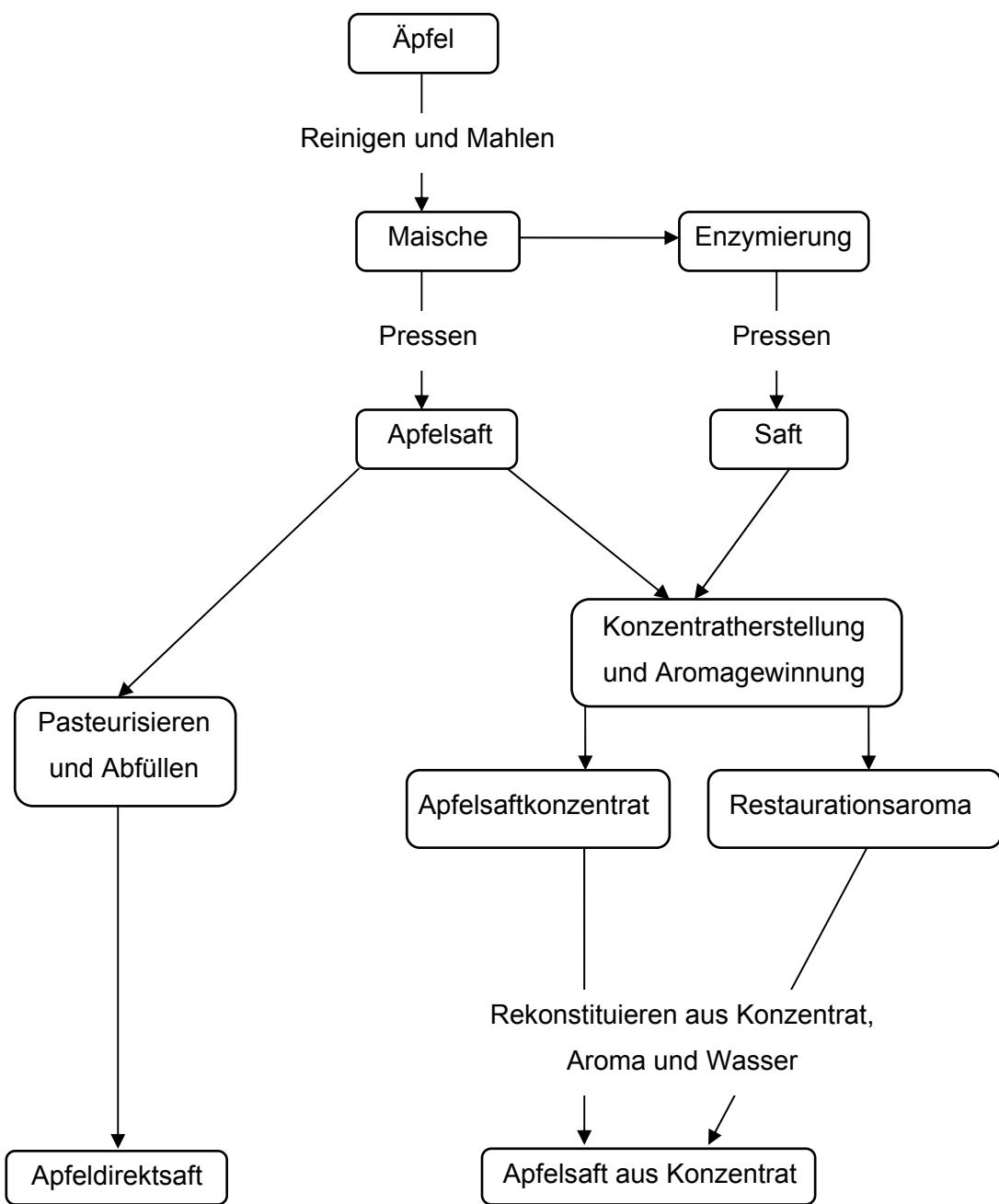


Abb. 5: Schema der Verarbeitung von Äpfeln zu Apfelsaft, Direkt und aus Konzentrat (in Anlehnung an Schobinger¹⁶⁾)

2.4.2 Orange

Da das Hauptanbaugebiet für Orangen im Zitrus-Gürtel liegt, werden die Früchte häufig dort zu Konzentrat und Aroma verarbeitet, welches so kostengünstiger gelagert und transportiert werden kann und auch länger haltbar ist. Die einzelnen Prozessschritte der Saftherstellung sind in Abb. 6 schematisch dargestellt.

Bei der Herstellung von Orangensaftkonzentrat und -aroma fällt, im Gegensatz zur Herstellung von Apfelsaftkonzentrat und -aroma, nicht nur eine *Aromawasserphase*, sondern auch eine *Ölphase (Essenzöl)* an. Zusätzlich wird während des Pressvorganges *Schalenöl* abgetrennt. Dies erfordert andere Press- und Abtrennungstechniken, welche im Folgenden näher beschrieben werden¹⁶.

Nach der Reinigung und Kontrolle der Orangen erfolgt vor der *Saftextraktionsanlage* eine Größensorтировung, da jeder Extraktor eine bestimmte Fruchtgröße optimal presst. Dort wird Saft und Schalenöl gewonnen. Während des Pressvorgangs der Orange wird die Frucht mit Wasser besprüht, um so das Schalenöl aus dem Entsafter zu spülen. Bei falscher Einstellung der Presse kann Schalenöl in den Saft gelangen, was einen zumeist unerwünschten Geschmack zur Folge hat, oder die Ausbeute verringert.

Nach der Saftextraktion wird in der *Passiermaschine* der Saft von den restlichen Fruchtbestandteilen abgetrennt. Dazu wird der Saft mit einer Schraube gegen ein Trennsieb gepresst. Der Saft fließt ab und die sogenannte Pulpe bleibt zurück. Das Zentrifugieren des Saftes ist eine weitere Möglichkeit der Pulpen-Abtrennung. Der Saft wird nach dem Pasteurisieren als Direktsaft abgefüllt. Beim Orangendirektsaft schreibt die EU-Fruchtsaft-Richtlinie einen Mindestwert der relativen Dichte von 1,040 vor.

Bei der Konzentrierung des Saftes zu *Orangensaftkonzentrat* (OSK) wird das Aroma, bestehend aus einer Wasser (WP)- und Öl-Phase (ÖP), gewonnen. Im Verdampfer wird das Orangensaftkonzentrat auf 65% Trockenmasse konzentriert. Am Abfüllort wird das Konzentrat rückverdünnt und die entsprechenden Anteile an Aroma-Wasserphase und Ölphase werden wieder zugesetzt, um einen Orangensaft aus Konzentrat herzustellen. Für einen Orangensaft mit Zellen aus Konzentrat wird zusätzlich noch Pulpe zugefügt. Nach dem Homogenisieren kann der Saft abgefüllt, pasteurisiert und etikettiert werden. Nur unter diesen Bedingungen darf der Saft als 100%-Saft deklariert werden. Ein Orangensaft aus Konzentrat muss laut der EU-Fruchtsaft-Verordnung eine relative Dichte von mindestens 1,045 aufweisen. Aus 10 000 kg Orangen werden durchschnittlich 5 600 kg Saft, 4 400 kg Schale/Pulpe, 22 kg Schalenöl, 1-3 kg Ölphase und 10 kg Wasserphase gewonnen²⁷.

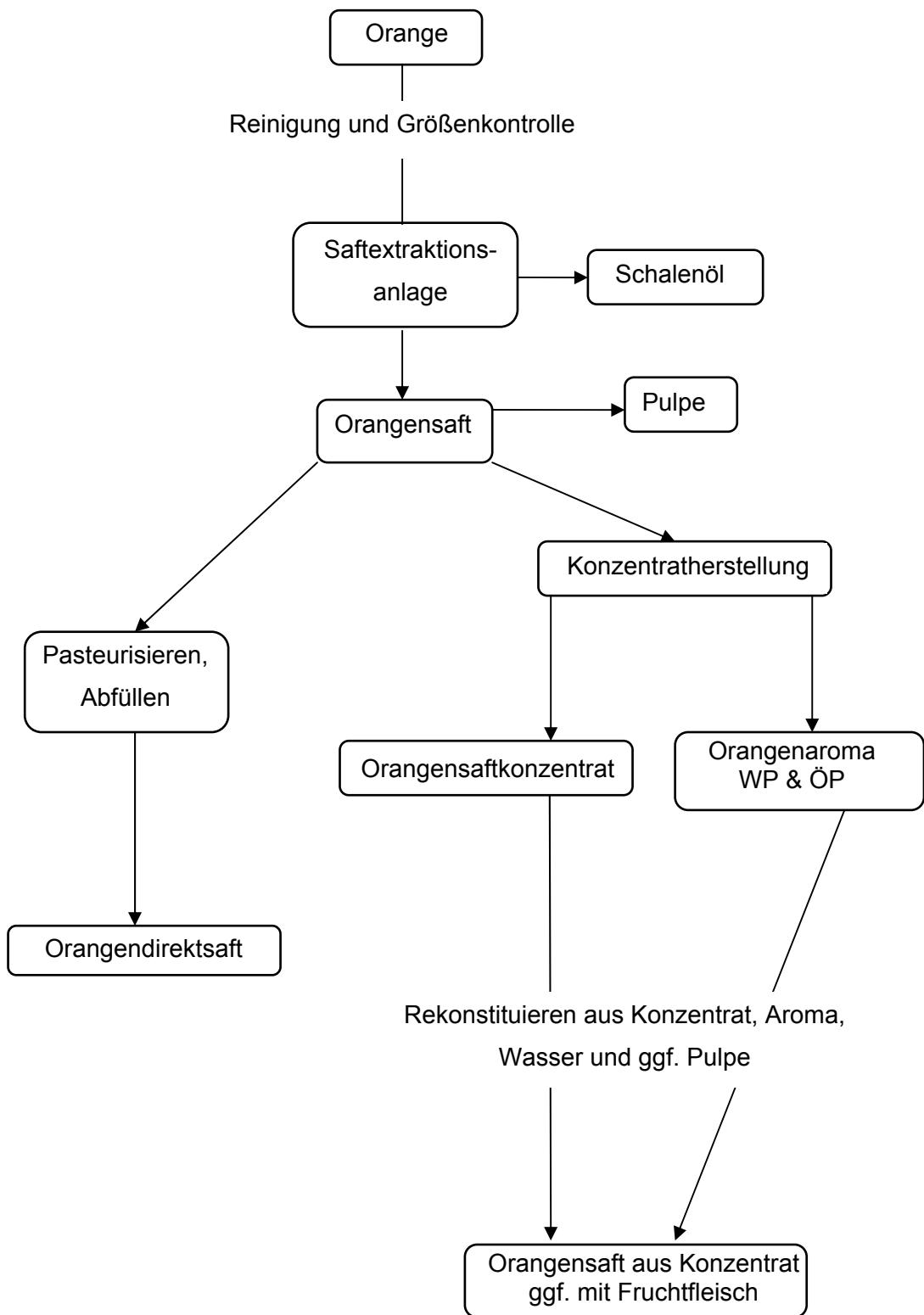


Abb. 6: Schema der Verarbeitung von Orangen zu Orangensaft, Direkt und aus Konzentrat (in Anlehnung an Schobinger¹⁶), WP: Wasserphase, ÖP: Ölphase

3. Aroma und Aromastoffe

3.1 Was ist Aroma?

Allen Lebewesen stehen verschiedene Sinne zur Wahrnehmung ihrer Umwelt zur Verfügung. Menschen sehen, hören, fühlen, riechen und schmecken. In Verbindung mit Lebensmitteln spielen der Geruchssinn, die *olfaktorische Wahrnehmung*, und der Geschmackssinn, die *gustatorische Wahrnehmung*, die wichtigsten Rollen. Nur beide Sinne zusammen, als Oro-naso-fazial-Sinn bezeichnet, lassen uns Speisen vollständig wahrnehmen. Sie dienen auch als Warnsystem, z. B. beim Geruch von Feuer oder beim bitteren Geschmack von verdorbenen Lebensmitteln und giftigen Früchten. Der Gesamteindruck aus Geschmack und Geruch wird als *Aroma* (engl. flavour) bezeichnet^{28,34}.

Der Geruchsschwellenwert (GSW) definiert die Konzentration in mg/L, ab der ein Geruch wahrnehmbar ist. Dieser wird zum einen durch den Siedepunkt bestimmt, je höher die Konzentration der Aromastoffe in der Gasphase ist, umso stärker ist der Geruchseindruck, und zum anderen durch den molekularen Aufbau des Aromastoffes. Das Vorhandensein von sowohl polaren als auch unpolaren Gruppen in einem Molekül ist Grundvoraussetzung für die geruchliche Wahrnehmung. Das Optimum der Polarität eines Moleküls ist z. B. bei einigen Estern zu finden, die daher einen besonders niedrigen GSW aufweisen²⁸. Das maximale Molekulargewicht von flüchtigen Aromastoffen liegt bei circa 400²⁹. Für den Geruchssinn zuständig sind die *olfaktorischen Nervenfasern*, welche hinter der Nasenbrücke liegen (siehe Abb. 7).

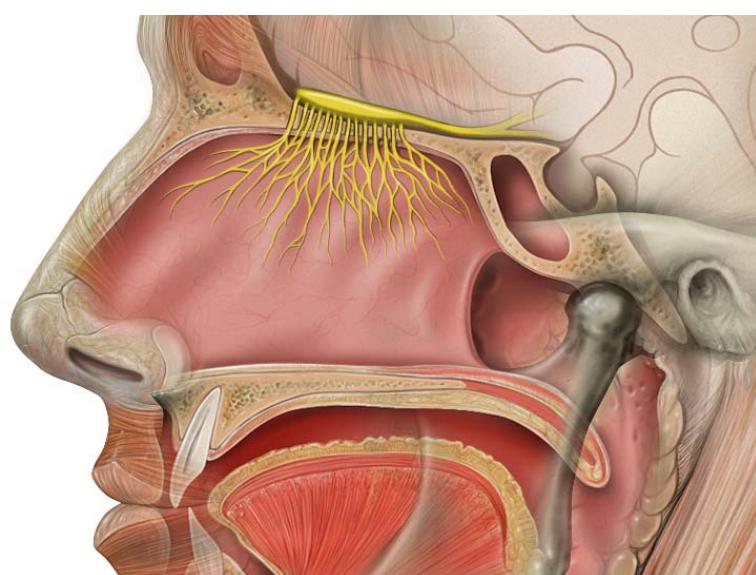


Abb. 7: Lage der olfaktorischen Nervenfasern (Nn. Olfactorii, gelb)³⁰

Die Aromastoffe dringen in die Riechschleimhaut auf der Epitheloberfläche ein und beeinflussen die Riechzellen mit ihrem Zilienbesatz (siehe Abb. 8)³¹.

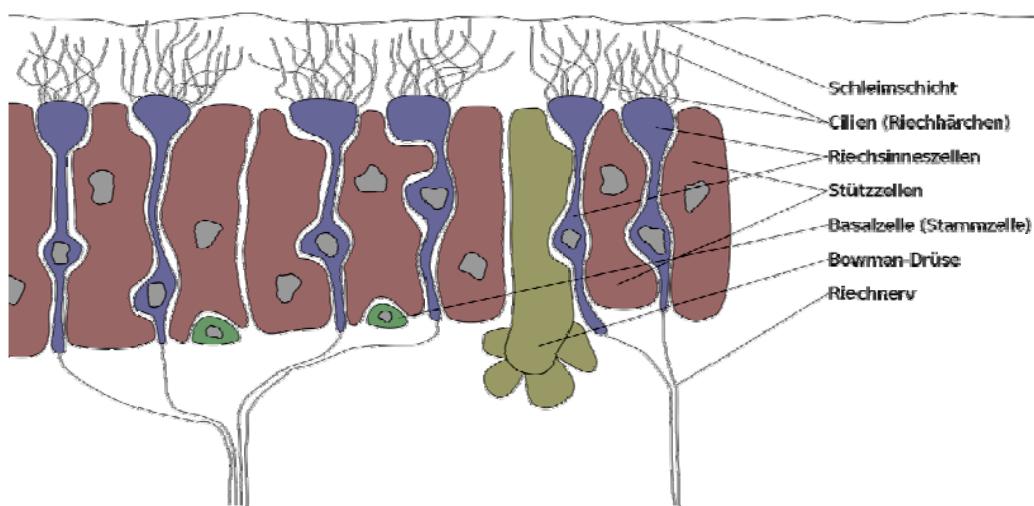


Abb. 8: Schematische Darstellung eines Schnitts durch die Riechschleimhaut³²

Die einzelnen Fasern des Geruchsnerfs reagieren auf eine Reihe verschiedener Gerüche. Bislang konnten keine *primären Geruchsqualitäten*, entsprechend den Geschmacksqualitäten, identifiziert werden³¹. Gerüche werden nicht nur pronasal (durch direktes Riechen), sondern auch retronasal (durch den Rachenraum bei dem Verzehr eines Lebensmittels) wahrgenommen.

Die elektrischen Signale werden im Gehirn verarbeitet, wie z. B. im limbischen System, in dem Gefühle entstehen. Anhand der Rezeptoren in der Nasenhöhle kann der Mensch viele tausend Gerüche erkennen^{33,34}. Die *Verknüpfung von Gerüchen und Gefühlen* wird bewusst zur Konsumentenbeeinflussung eingesetzt. Morrison hat den Einfluss von Vanillearoma auf junge Modeeinkäufer in einer Verkaufsumgebung getestet und konnte eine erhöhte Zufriedenheit, eine längere Verweildauer in dem Geschäft und einen höheren Umsatz feststellen³⁵. Dieses Aromamarketing hat sich zu einem effektiven „Business Tool“ entwickelt, da man sich dem Geruch nicht entziehen kann. Er nimmt den größten Einfluss auf unsere Stimmung und unsere Emotionen.

Für die *gustatorische Wahrnehmung* sind etwa 10 000 Geschmacksknospen, die meisten davon befinden sich im Epithel der Zunge, zuständig. Doch auch in der Schleimhaut der Wangen, des Schlundes und des Rachens, des Kehlkopfes und der Speiseröhre befinden sich Geschmacksknospen.

Eine Geschmacksknospe besteht aus einem Bündel an Zellen, das im Epithel eingebettet liegt und über den Geschmacksborus (siehe Abb. 9) Anschluss an die Oberfläche bekommt³¹. Die Mikrovilli, mit denen die Geschmacksknospe über die Geschmackspore heraustritt, agieren als Chemosensoren und melden eine bestimmte Geschmacksqualität.

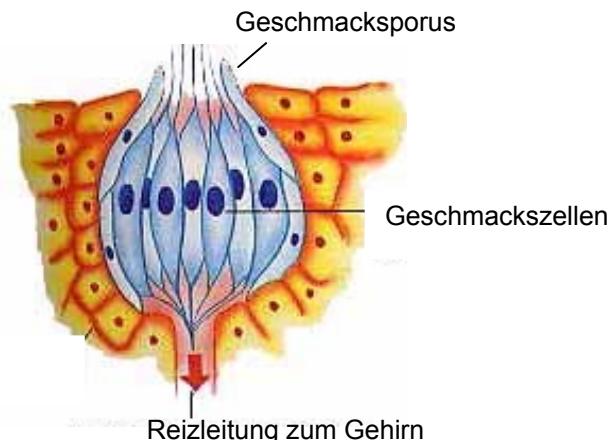


Abb. 9: Querschnitt einer Geschmacksknospe³⁶

Über die Geschmacksknospen können *fünf unterschiedliche Geschmäcke* wahrgenommen werden: süß, sauer, bitter, salzig und umami. Als möglichen sechsten Sinn hat Keast die Wahrnehmung von Fett vorgeschlagen³⁷.

Die Ausbildung von Geruchs- und Geschmackspräferenzen beginnt nicht erst nach der Geburt, sondern kann schon pränatal geprägt werden. Der Geschmack der Nahrung, welche die Mutter während der Schwangerschaft zu sich nimmt, wird an das Baby weitergeleitet. Während der Entwicklung des Fötus kann die Vorliebe für bestimmte Gerüche und Geschmäcke bereits ausgebildet werden³⁸.

Der Geschmack kann laut Eskine et al.³⁹ auch unsere *moralische Einschätzung* beeinflussen. Testgruppen haben nach dem Verzehr eines bitteren, eines süßen und eines geschmacksneutralen Getränkes Fragestellungen nach dem persönlichen moralischen Empfinden eingestuft. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass ein signifikanter Einfluss des Geschmacks auf das moralische Urteil vorhanden ist. Das Urteil beim Konsum des bitteren Getränkes ist negativer ausgefallen als beim Konsum eines neutralen Getränkes und beim neutralen Getränk wiederum negativer als beim süßen Getränk.

Aromastoffe sind *flüchtige Verbindungen*, die in einer bestimmten Konstellation und Konzentration für ein Lebensmittel charakteristisch sind. Besonders Lebensmittel, die durch thermische Prozesse (z. B. Kaffee) oder Fermentation (z. B. Bier) hergestellt werden, weisen weit mehr als 800 flüchtige Verbindungen auf. Diese Vielfalt ist auch bei vielen

Obst- und Gemüsesorten gegeben²⁸. Von den Verbindungen sind jedoch nur diejenigen von Bedeutung, die in einer Konzentration über dem GSW vorhanden sind⁴⁰.

Manche Aromastoffe prägen das Aroma so stark, dass diese als „*character impact compounds*“ bezeichneten Verbindungen, auch als Einzelsubstanzen für ein Lebensmittel charakteristisch sind²⁸. Zwei bekannte Beispiele dafür sind der bittermandelartige Benzaldehyd in Mandeln und Kirschen und das pilzartige (*R*)-1-Octen-3-ol in Champignons⁴⁰.

Chiralität, eine Form der Isomerie, bezeichnet stereoisomere Moleküle, die wie Bild und Spiegelbild zueinander stehen. Solche Enantiomere können als Nachweis der *Genauigkeit* dienen⁴¹. Neben vielen Ähnlichkeiten, die ein Enantiomerenpaar untereinander aufweist, wie identische Bindungen, gleicher Energiegehalt, Schmelzpunkte, Siedepunkte und Dichte, ist der Unterschied anhand der optischen Aktivität erkennbar. Ein weiterer Unterschied, den manche chirale Aromastoffe aufweisen, ist der *charakteristische Geruch*^{42,43}.

Genuiner Nachweis: Die Enantiomerenverteilung bestimmter Analyten lässt Rückschlüsse auf die Echtheit der vorliegenden Probe zu. Bei der im Apfel vorkommenden Substanz 2-Methylbutanol hat Schuhmacher ausschließlich die S-Form gefunden und konnte so bestätigen, dass der Nachweis eines Aromas hinsichtlich der Authentizität und der Echtheit über bestimmte Enantiomere geführt werden kann⁴¹. Die Echtheitskontrolle mittels chiraler stationärer Phasen wird in der Aromen- und Duftstoffindustrie zur Qualitäts sicherung eingesetzt^{44,45}.

Charakteristischer Geruch: Ein sehr bekanntes Beispiel ist das Limonen (Abb. 10), welches uns in Getränken, Putzmitteln und Kosmetika täglich begegnet. In der (*R*)-Form riecht es nach Orange, in der (*S*)-Form jedoch nach Zitrone^{42,43}.

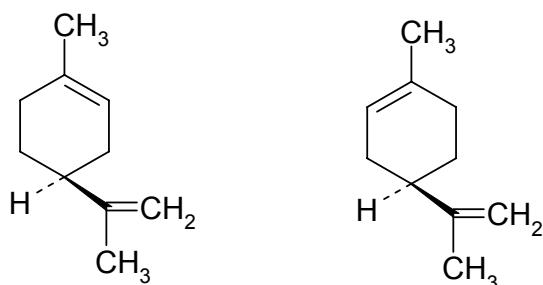


Abb. 10: Das Enantiomerenpaar (*S*)-Limonen (links, Geruch nach Zitrone) und (*R*)-Limonen (rechts, Geruch nach Orange)^{42,43}

Dieser Unterschied ist auch beim Carvon (Abb. 11) sehr ausgeprägt. (*S*)-Carvon hat eine Kümmel-Note, während (*R*)-Carvon nach Krauseminze riecht^{42,43}.

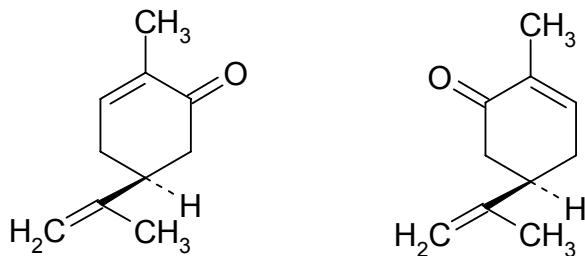


Abb. 11: Das Enantiomerenpaar (*R*)-Carvon (links, Geruch nach Krauseminze) und (*S*)-Carvon (rechts, Geruch nach Kümmel)^{42,43}

Die systematische Erschließung der Aromastoffe begann schon in der ersten Hälfte des 19. Jahrhunderts. Nach der Isolierung und Strukturaufklärung war die Laborsynthese und spätere industrielle Herstellung möglich. Tab. 3 zeigt einige Stationen dieser Entwicklung im 19. Jahrhundert⁴⁶.

Tab. 3: Zeitliche Entwicklung der Isolierung und Synthese von Aromastoffen im 19. Jahrhundert⁴⁶

1834	Isolierung von Zimtaldehyd aus Zimtöl (Dumas und Peligot)
1837	Isolierung von Benzaldehyd aus Bittermandel (Liebig und Wöhler)
1851	Herstellung verschiedener Fruchtester (Hoffmann)
1856	Synthese von Zimtaldehyd (Chiozza)
1863	Synthese von Benzaldehyd (Cahours)
1872	Aufklärung der Bruttoformel des Vanillin (Carles)
1872	Erste Synthese von Vanillin (Haarmann)
1874	Erste industrielle Herstellung von Vanillin (Haarmann & Reimer)
1886	Isolierung von Citral (Bertram, Dodge)
1887	Synthese von Menthol (Beckmann und Pleisner)
1893	Industrielle Herstellung von Zimtaldehyd (Schimmel)
1895	Industrielle Herstellung von Citral (Haarmann & Reimer, Schimmel)

3.2 Klassifizierung der Aromen

Aromen werden anhand der Art der Gewinnung, nach dem Vorkommen in der Natur und nach enthaltenen Gruppen und Stoffgruppen eingeteilt. Im Sinne der Aromaverordnung sind Aromen wie folgt definierte Erzeugnisse und deren Mischungen, die dazu bestimmt sind, Lebensmitteln einen besonderen Geruch oder Geschmack zu verleihen⁴⁷:

- „Natürliche Aromastoffe:

chemisch definierte Stoffe mit Aromaeigenschaften, gewonnen durch geeignete physikalische Verfahren (einschließlich Destillation und Extraktion mit Lösungsmitteln), durch enzymatische oder mikrobiologische Verfahren aus Ausgangsstoffen pflanzlicher oder tierischer Herkunft, die als solche verwendet oder mittels herkömmlicher Lebensmittelzubereitungsverfahren (einschließlich Trocknen, Rösten und Fermentieren) für den menschlichen Verzehr aufbereitet werden.“⁴⁷

- „Naturidentische Aromastoffe:

chemisch definierte Stoffe mit Aromaeigenschaften, die durch chemische Synthese oder durch Isolierung mit chemischen Verfahren gewonnen werden und mit einem Stoff chemisch gleich sind, der in einem Ausgangsstoff pflanzlicher oder tierischer Herkunft [...] natürlich vorkommt.“⁴⁷

- „Künstliche Aromastoffe:

chemisch definierte Stoffe mit Aromaeigenschaften, die durch chemische Synthese gewonnen werden, aber nicht mit einem Stoff chemisch gleich sind, der in einem Ausgangsstoff pflanzlicher oder tierischer Herkunft [...] natürlich vorkommt.“⁴⁷

- „Aromaextrakte:

nicht unter die Begriffsbestimmung der Nummer 1 fallende konzentrierte und nicht konzentrierte Erzeugnisse mit Aromaeigenschaften, gewonnen durch geeignete physikalische Verfahren (einschließlich Destillation und Extraktion mit Lösungsmitteln), durch enzymatische oder mikrobiologische Verfahren aus Ausgangsstoffen pflanzlicher oder tierischer Herkunft, die als solche verwendet oder mittels herkömmlicher Lebensmittelzubereitungsverfahren (einschließlich Trocknen, Rösten und Fermentieren) für den menschlichen Verzehr aufbereitet werden.“⁴⁷

- „Reaktionsaromen:

Erzeugnisse, hergestellt unter Beachtung der nach redlichem Herstellerbrauch üblichen Verfahren durch Erhitzen einer Mischung von Ausgangserzeugnissen, von denen mindestens eines Stickstoff (Aminogruppe) enthält und ein anderes ein reduzierender Zucker ist, während einer Zeit von höchstens 15 Minuten auf nicht mehr als 180 Grad C.“⁴⁷

- „Raucharomen:

Zubereitungen aus Rauch, der bei den herkömmlichen Verfahren zum Räuchern von Lebensmitteln verwendet wird.“⁴⁷

3.3 Apfeleromen

Das charakteristische Apfeleroma bildet sich in bestimmten Entwicklungsstadien, ebenso wie z. B. Zucker, Säuren und die Farbe der Schale. Die Bestimmung der einzelnen *Entwicklungsstadien* ist zudem wichtig, um mit anbautechnischen Maßnahmen die Entwicklung des Apfelbaumes optimal zu unterstützen.

Der Baumschnitt zum Beispiel kann über einen längeren Zeitraum durchgeführt werden, während bei der Bekämpfung des Apfelschorfes der optimale Zeitpunkt sehr wichtig ist. Abb. 12 zeigt wichtige Entwicklungsstadien des Apfels. Die erste Ziffer bezeichnet das Makro-, die zweite das Mikrostadium. Die Entwicklungsphasen (Makrostadien) werden wie folgt unterteilt⁴⁸:

- | | |
|---|---------------------------------------|
| 0 | Austrieb |
| 1 | Blattentwicklung |
| 3 | Triebentwicklung |
| 4 | Ausläufer und Jungpflanzenentwicklung |
| 5 | Blütenknospenentwicklung |
| 6 | Blüte |
| 7 | Fruchtbildung |
| 8 | Fruchtreife |
| 9 | Abschluss der Vegetation |

Die *Fruchtreife* ist für die Entwicklung des apfelytischen Aromas und Geschmacks wichtig. Beim Makrostadium 8 unterscheidet man zwischen den folgenden Mikrostadien⁴⁸:

- 81 Beginn der Fruchtreife: sortenspezifische Aufhellung der Grundfarbe
- 85 Fortgeschrittene Fruchtreife: zunehmend sortentypische Intensität der Deckfarbe
- 87 Pflückreife: Früchte sind ausreichend entwickelt und haben noch eine gute Lagerfähigkeit
- 89 Genussreife: Früchte haben sortentypischen Geschmack und optimale Festigkeit

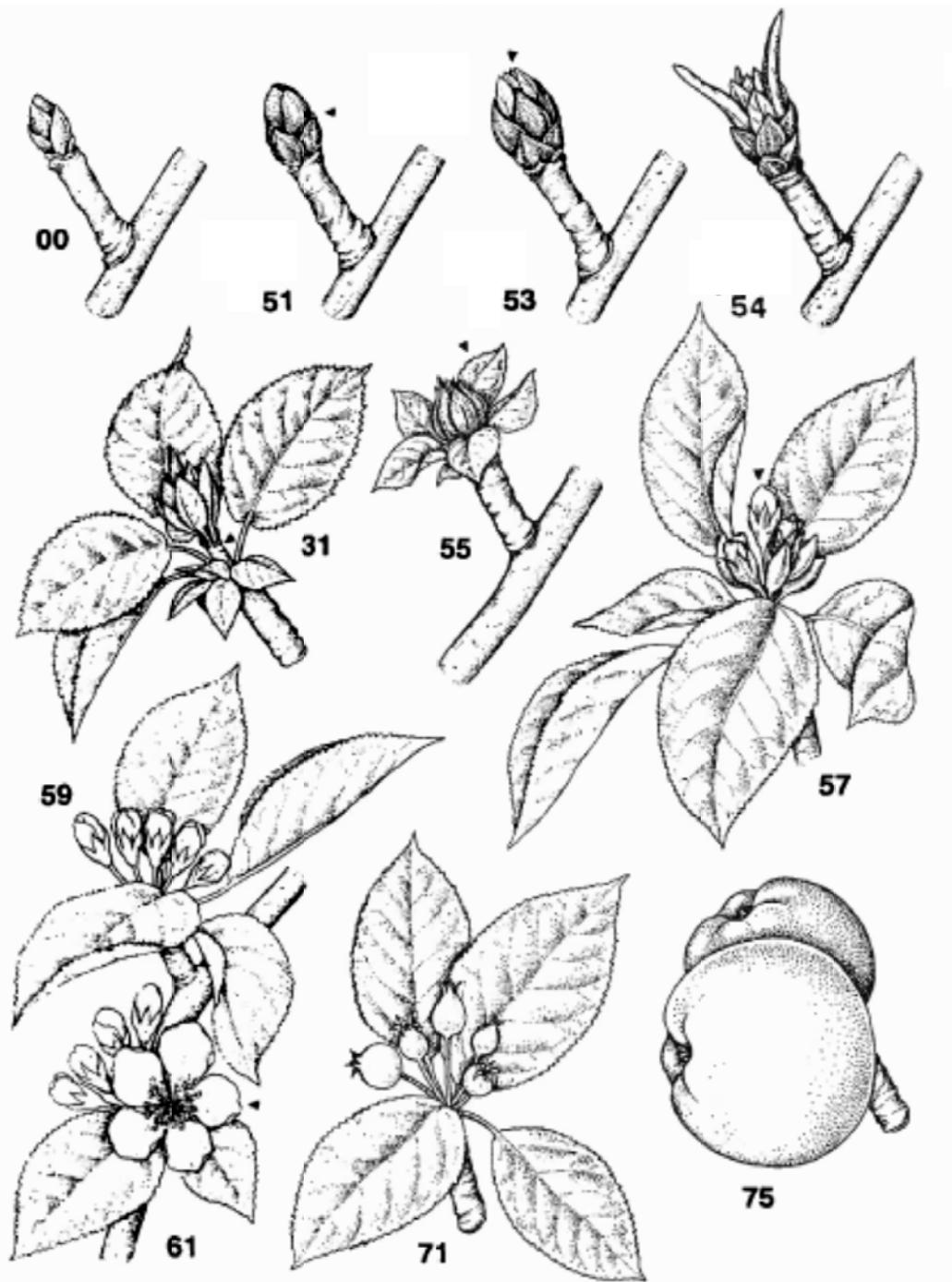


Abb. 12: Wichtige phänologische Entwicklungsstadien des Apfels⁴⁸

Das Aroma, wie der Verbraucher es von einem Apfel erwartet, entwickelt sich mit dem Klimakterium, welches kurz nach der Ernte und zu Beginn der Lagerung einsetzt. Zur Bestimmung des Erntezeitpunkts und der Reife gibt es mehrere Kriterien⁴⁹.

Einige Kriterien sind:

- Die Härte des Apfels muss ausreichend abgenommen haben
- der Stärkeabbau sollte weitgehend abgeschlossen sein
- ein Trockenmassegehalt von mindestens 10,5% sollte erreicht sein
- der Säuregehalt sollte ausgeglichen sein

Im Laufe des Reifeprozesses des Apfels wird der hohe Säuregehalt abgebaut, während der Zuckergehalt zunimmt. Das Aroma bildet sich aus und der Apfel bekommt seine sortentypische Farbe^{50,51}.

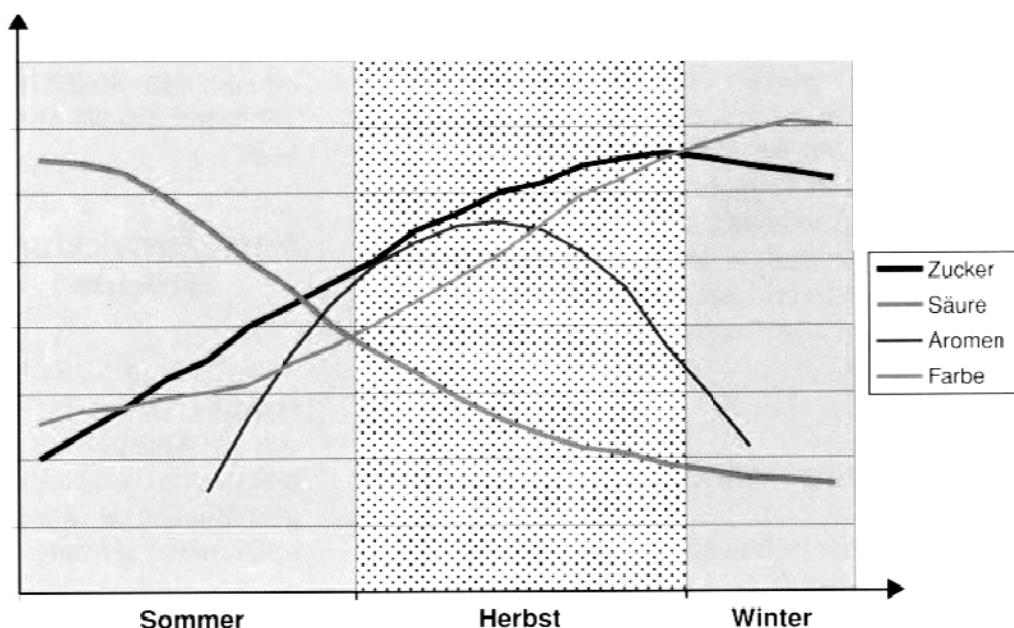


Abb. 13: Entwicklung der Zucker-, Säure- und Aromengehalte und der Farbe während der Reife eines Apfels⁵²

Zum Zeitpunkt der Ernte weisen die Blätter und Früchte noch ein sehr ähnliches Bild von flüchtigen Inhaltsstoffen auf. In Abb. 14 A und B ist zu erkennen, dass die Aromastoffe hauptsächlich während der Lagerung gebildet werden und nach ca. 70 Tagen Lagerung wieder sinken⁶⁸. Song et al. haben ebenfalls eine starke Korrelation zwischen der Reife des Apfels und der Konzentration an Aromastoffen festgestellt⁵³. Guadagni hat nachgewiesen, dass sich das Aroma in besonders großen Mengen in der Schale bzw. im äußereren Fruchtfleisch befindet. Den größten Aromabeitrag liefern die Ester Ethylbutyrat, Butylacetat, Ethyl-2-methylbutyrat und 2-Methylbutylacetat⁵⁴.

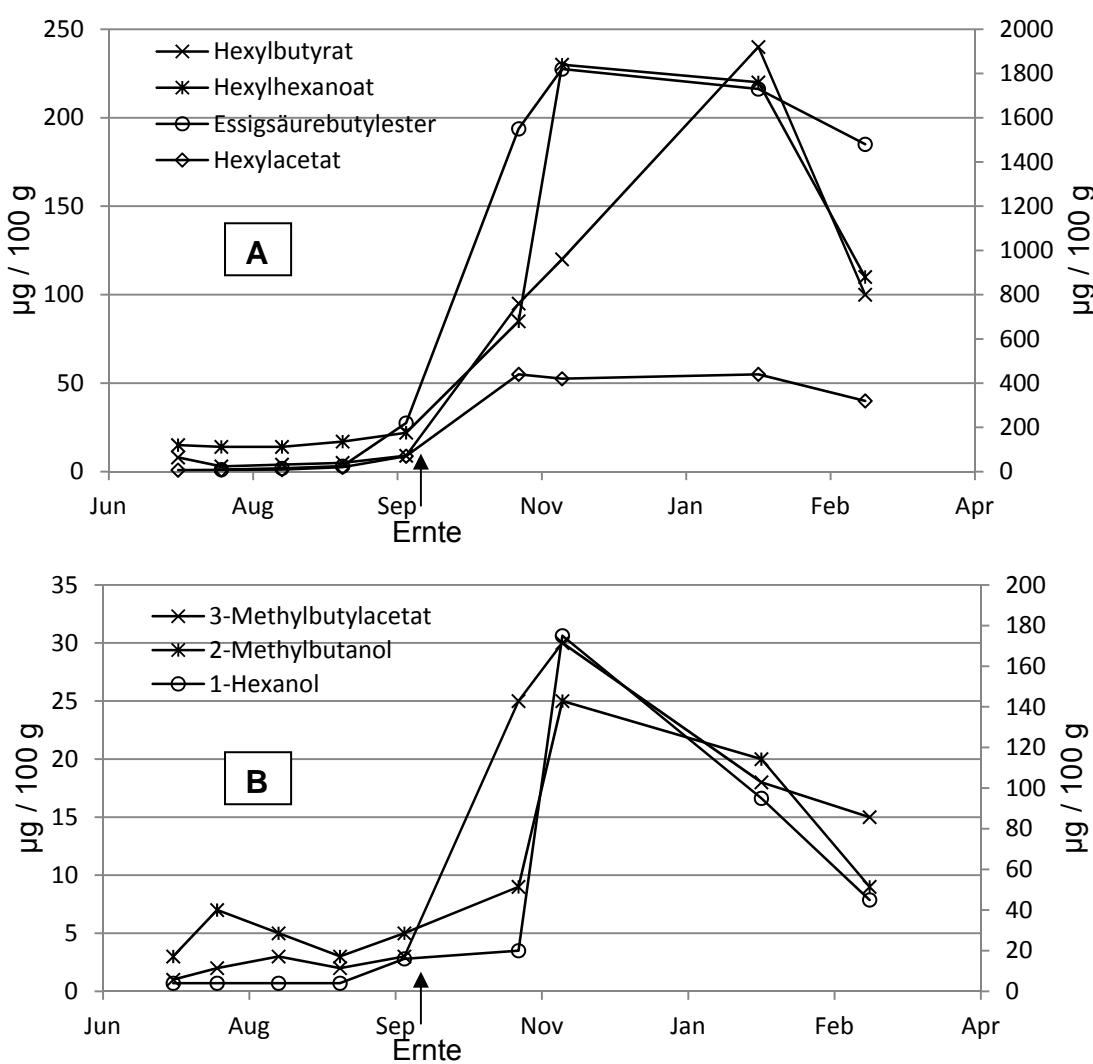


Abb. 14: Veränderung der Aromastoffprofile während des Wachstum und der Lagerung bei Äpfeln der Sorte Cox Orange im Jahr 1965⁵⁴, rechte Skala: Essigsäurebutylester, Hexylacetat, 1-Hexanol, linke Skala: Hexylbutyrat, Hexylhexanoat, 3-Methylbutylacetat, 2-Methylbutanol.

Einen besonderen Einfluss auf das Aroma des Apfelsaftes haben die Aromastoffe *trans*-2-Hexenal, *trans*-2-Hexenol und Hexanal (frischer Gras- bzw. Blättergeruch). Diese Stoffe entstehen erst nach Zerstörung der Fruchzellen durch den enzymatischen Abbau der ungesättigten Fruchtsäuren und werden als sekundäre Aromastoffe bezeichnet, bereits in der intakten Frucht vorhandene Aromastoffe als primäre Aromastoffe.

Tressl und Drawert haben sich intensiv mit dem Abbau zu sekundären Aromastoffen im Apfel beschäftigt^{56,55}. Die C₆-Alkohole und C₆-Aldehyde haben sie in Presssäften nachgewiesen, in den intakten Früchten jedoch nicht. Der Begriff Apfeleroma wird synonym für das Aroma des intakten Apfels und für das Aroma von Apfelsäften verwendet.

Die folgenden Substanzen bilden sich in unterschiedlichen Konzentrationen erst bei der Homogenisierung unter Luftzutritt: Hexanal, *cis*-3-Hexen-1-al, *trans*-3-Hexen-1-al, *trans*-2-Hexenal, Hexanol, *cis*-3-Hexen-1-ol und *trans*-2-Hexen-1-ol. Als Hauptkomponenten wurden *trans*-2-Hexenal und Hexanal bestimmt. Hexanal, *cis*-3-Hexen-1-al, *trans*-3-Hexen-1-al, *trans*-2-Hexenal wurden als Produkte der Vorläufer Linolensäure und Linolsäure nachgewiesen. Durch Reduktion bilden sich aus *trans*-2-Hexenal und Hexanal die entsprechenden Alkohole *trans*-2-Hexenol und Hexanol (siehe Tab. 4).

Tab. 4: Vorläufer und daraus bei Zerstörung des Zellverbandes des Apfels entstehende Produkte^{55,56}

Vorläufer	Produkte
Linolensäure	<i>cis</i> -3-Hexen-1-al, <i>trans</i> -3-Hexen-1-al, <i>trans</i> -2-Hexenal
Linolsäure	Hexanal
<i>trans</i> -2-Hexenal	<i>trans</i> -2-Hexenol
Hexanal	Hexanol

Des Weiteren laufen bei der Zerstörung des Zellverbandes enzymatische hydrolytische Prozesse ab. Die Fruchtester werden durch Esterasen in Alkohole und Säuren gespalten.

Der stark unterschiedliche Geschmack der frischen Frucht und des Fruchtsaftes resultiert daher aus den neu gebildeten Substanzen wie *trans*-2-Hexenal und Hexanal und dem Abbau von Estern zu Alkoholen und Säuren durch zelleigene Enzyme^{55,56}.

Wie schon in Kap. 2.2 erwähnt weisen die verschiedenen Sorten ein unterschiedliches Aromenspektrum auf. Auch Faktoren wie Anbaubedingungen, Klima, Witterungsverlauf, Reifestadium und Lagerungsbedingungen beeinflussen dieses⁵⁷.

Die ersten Untersuchungen zum Apfelaroma wurden bereits 1920 durchgeführt⁵⁸. Acetaldehyd sowie die Ester der Ameisen-, Essig- und Capronsäure wurden als Hauptbestandteile des Apfeleromas identifiziert. In den folgenden Jahren konnten immer mehr Aromen identifiziert werden. Eine Übersicht über den damaligen Stand der Forschung zum Thema „Aromaprofil des Apfels“ wurde von Dimick und Hoskins 1983⁵⁹ und Paillard 1990⁶⁰ erstellt. Mehr als 300 flüchtige Komponenten wurden bereits im Apfel identifiziert⁶¹, doch nicht alle tragen zum charakteristischen Aroma bei.

Durch Kombination von instrumentell-analytischen und sensorischen Methoden konnten aus dieser Vielzahl von Aromen sogenannte Schlüsselverbindungen identifiziert werden⁶². Der Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI) hat Säfte aus Äpfeln der Sorte Golden Delicious sensorisch als am apfelsafttypischsten bewertet und folgende Aromastoffe als besonders aromaaktiv identifiziert⁶³:

Tab. 5: Vom FEI⁶³ als besonders aromaaktiv identifizierte Aromastoffe von Äpfeln der Sorte Golden Delicious

Aromastoff	Geruchseindruck ^{46,57,62,65}
β-Damascenon	bratapfelartig
Hexanal	nach frisch geschnittenem Gras
Dimethylsulfid	spargelartig
<i>trans</i> -2-Hexenal	nach grünem Apfel, marzipanartig
Ethyl-2-methylbutyrat	fruchtig
Diacetyl	süß-butterartig
Methional	nach gekochten Kartoffeln
Methyl-2-methylbutyrat	fruchtig
Ethylbutyrat	grün, nach Apfel

Steinhaus⁶⁴ hat weitere Substanzen als Schlüsselaromastoffe für die Sorte Golden Delicious beschrieben:

Tab. 6: Zusätzlich von Steinhaus⁶⁴ als Schlüsselaromen der Sorte Golden Delicious identifizierte Substanzen

Aromastoff	Geruchseindruck ^{46,57,62,65}
1-Octen-3-on	pilzartig
Acetaldehyd	frisch, fruchtig
(Z)-3-Hexenal	nach frisch geschnittenem Gras

Eiß fügte dem Aromaprofil noch die in Tab. 7 beschriebenen Substanzen als für das Aromaprofil des Apfels charakteristisch hinzu:

Tab. 7: Von Eiß⁶⁵ zusätzlich als charakteristische Aromakomponenten im Apfel identifizierte Substanzen

Aromastoff	Geruchseindruck ^{46,57,62,65}
Hexanol	süßlich
<i>trans</i> -2-Hexenol	fruchtig
<i>cis</i> -3-Hexenol	pilzartig
Butylacetat	fruchtig
Hexylacetat	fruchtig, schwach fettig
2-Methylbutylacetat	käseartig
1-Butanol	stechend
1,3-Octandiol	-
5-(Z)-Octen-1,3-diol	-

Während 2-Methylbutanol (fruchtig) und 2-Methylbutylacetat (käseartig) genuine Aromastoffe des Apfels sind, werden 3- Methylbutanol (malzig) und 3-Methylbutylacetat (käseartig) als Gärungsindikatoren genutzt^{66,67}.

Apfeleromen lassen sich 2 Grundtypen einteilen, wobei sich die Aromastoffzusammensetzung verschiedener Sorten aus Alkoholen, Estern und Aldehyden nur quantitativ unterscheidet^{46,68}:

- Estertyp

Bei diesem Typ sind die Hauptkomponenten Ethylacetat, Butylacetat, Amylacetat, Hexylacetat, Butylbutyrate, Hexylbutyrate, Butylhexanoate, Hexyl-2-methylbutyrate, Hexylhexanoate, Oktylbutyrate und Oktansäurebutylester. In diese Kategorie kann man beispielsweise die Sorten Cox Orange, Jonathan und Golden Delicious einordnen. Äpfel dieses Typs enthalten meist größere Mengen an Aromastoffen und werden daher organoleptisch als aromatischer empfunden. Verstärkt wird dies durch die höhere Geschmacksintensität der Ester gegenüber den Alkoholen und den angenehmeren Gesamteindruck.

- Alkoholtyp

Die Hauptkomponenten beim Alkoholtyp sind Butanol, Iso-Pentanol, 2-Pentanol und Hexanol. Zu diesem Typ gehören unter anderem die Sorten Glockenapfel, Ontario, Bärlepsch, Goldparmäne und Champagner Renette.

3.4 Summenparameter zur analytischen Beurteilung von Apfeleromen

Laut FruchtsaftVO muss Fruchtsaft aus Konzentrat „im Vergleich zu einem durchschnittlichen [...] Saft zumindest gleichartige organoleptische und analytische Eigenschaften aufweisen.“² Bis vor einigen Jahren wurde die ausreichende Aromatisierung eines Fruchtsaftes zum größten Teil nur sensorisch bewertet, doch durch die heutigen analytischen Möglichkeiten wächst der Wunsch nach objektiven Beurteilungskriterien wodurch die quantitative Bestimmung der Aromen in Fruchtsäften an Bedeutung gewinnt.

Doch um die Aromatisierung eines Apfelsaftes im Sinne der Fruchtsaft-Verordnung bewerten zu können, müssen zunächst Modelle zur Berechnung entsprechender Summenparameter und im weiteren Schritt Grenzwerte definiert werden. Diese Grenzwerte müssen die große Bandbreite an Apfelsorten, Anbaubedingungen, Klima- und Lagerbedingungen berücksichtigen.

Bereits 1958 haben Brunner und Senn die Aromazahl eingeführt^{69,70}. Sie wurde entwickelt, um eine einfache Methode zur Ermittlung der Aromakonzentration zur Hand zu haben. Sie entspricht der Gesamtoxidationszahl, vermindert um den Alkoholgehalt des Konzentrates.

Im Verlauf der Diskussion über Parameter zur Beurteilung der Rearomatisierung wurden seit 2007 drei Modelle zu ihrer Berechnung für Apfelsaft aus Apfelsaftkonzentrat erarbeitet: die Estersumme⁷¹, die Summe der C₆-Aldehyde und -Alkohole⁷¹ und der Aromaindex⁷². Der Maßstab für eine ausreichende Rearomatisierung ist gemäß FruchtsaftVO der Apfeldirektsaft. Die dort gefundenen Aromakomponenten bzw. die sich daraus ergebenden Summenparameter beschreiben den ausreichend aromatisierten Apfelsaft aus Apfelsaftkonzentrat. Die Konzentrationen von ausgewählten Aromakomponenten wurden in verschiedenen Handelssäften ermittelt. Tab. 8 zeigt die Zuordnung der Substanzen zu den einzelnen Modellen.

- Estersumme⁷¹

Zur Berechnung der Estersumme werden die Konzentrationen der Ester (Tab. 8) in µg/L addiert. Butylacetat wird in dieser Summe nicht mit eingerechnet, da die mengenmäßige Dominanz allein den Summenparameter bestimmen würde. Die Estersumme steigt, wie Abb. 14 zeigt, mit dem Reife-/Lagerungsgrad. Äpfel, die dem Alkoholtyp zugeordnet werden, enthalten weniger Ester als die des Estertyps.

- Summe der C₆-Aldehyde und -Alkohole⁷¹

Hier werden die Konzentrationen (in µg/L) der Aldehyde und Alkohole mit einem C₆-Grundkörper summiert. Je höher die Summe, umso frischer erscheint der Apfel. Diese Aromen kommen im intakten Apfel nur in Spuren vor und werden erst bei der Zerkleinerung, wie z. B. bei der Saftpressung oder der Mazeration beim Verzehr des Apfels, gebildet.

- Aromaindex⁷²

Zur Bestimmung des Aromaindex (dimensionslos) findet eine gewichtete Bewertung statt. Dazu wird die Konzentration von 10 apfelytischen Estern und C₆-Körpern mit einem Normierungsfaktor multipliziert und dann aufsummiert. Mit dieser Methode soll der Einfluss natürlicher Schwankungen, die z. B. aufgrund klimatischer und technologischer Unterschiede und verschiedener Sorten vorliegen, minimiert werden.

Tab. 8: Zuordnung der unterschiedlichen Aromen zur Estersumme, Summe der C₆-Aldehyde und -Alkohole und dem Aromaindex mit zugehörigem Normierungsfaktor^{71,72}

	Ester- summe	Summe der C ₆ - Aldehyde und Alkohole	Aromaindex	
				Normierungs- faktor
(S)-2-Methylbutylacetat	X		X	0,250
(S)-Ethyl-2-methylbutyrat	X		X	2,00
(S)-Methyl-2-methylbutyrat	X			
1-Hexanol		X	X	0,017
2-Methylbutanol			X	0,033
Butylacetat			X	0,100
Ethylbutyrat	X		X	0,500
Ethylhexanoat	X			
Ethylisobutyrat	X			
Hexanal		X	X	0,100
Hexyl-2-methylbutyrat	X			
Hexylacetat	X		X	0,333
Methylhexanoat	X			
trans-2-Hexenal		X	X	0,025
trans-2-Hexenol		X	X	0,050

Zum Einsatz der Summenparameter als Beurteilungskriterium zur Aromaqualität von Apfelsäften herrschen unterschiedliche Meinungen:

- Heil und Ara (2007)⁷¹ betonen, dass eine Rechtssicherheit bei den Bewertungskriterien wünschenswert wäre, insbesondere für die Unterscheidung zwischen ausreichend und nicht ausreichend aromatisierten Fruchtsäften. Da die Bewertung anhand von einzelnen Parametern, die aufgrund von Unterschieden im Aromaprofil wenig praktikabel erscheinen, befürworten sie die Bewertung über Summenparameter. Sie haben 59 handelsübliche Direktsäfte und 139 Säfte aus Konzentrat, im Sinne der FruchtsaftVO als typisch, üblich oder durchschnittlich eingeordnet, mittels Simultaner Destillation-Extraktion-Gaschromatographie-Massenspektrometrie (SDE-GC-MS) analysiert und quantifiziert. Bei der Estersumme haben sie bei 150 µg/L einen statistisch markanten Messwert festgestellt und hielten diese Summenbildung für ein anwendbares Kriterium. Bei der Summe der C₆-Aldehyde und -Alkohole wurde kein Grenzwert diskutiert, da nicht genug Daten vorlagen.
- Wolter, Gessler und Winterhalter (2008)⁷² haben Säfte aus Laborpressungen und auch einige, auf technischen Anlagen erzeugte, sortenreine Säfte mittels SDE-GC-MS und Sensorik untersucht. Sie konnten keine Korrelation zwischen der Estersumme und der Summe der C₆-Aldehyde und -Alkohole feststellen. Sie hielten die Beurteilung des Apfelsaftaromas anhand der Estersumme und der Summe der C₆-Aldehyde und -Alkohole für nicht geeignet, um unzureichend aromatisierte Säfte mit ausreichender Sicherheit abzugrenzen. Zur Beschreibung der Aromatisierung stellten sie den Aromaindex vor, welcher durch die erweiterte Beurteilungsgrundlage Schwankungen in den Konzentrationen der Aromastoffe ausgleichen soll. Die Sensorik bleibt nach der Meinung von Wolter, Gessler und Winterhalter immer noch das am besten geeignete Instrument zur Kontrolle des Aromas und analytisch ermittelte Aromaprofile sollten lediglich zur Absicherung des sensorischen Ergebnisses dienen.
- Quadt, Jülich und Tretzel (2008)⁷³ haben mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion-GC-MS 29 Apfelwasserphasen untersucht und sensorisch beurteilt. Eine Korrelation zwischen analytischen Messdaten und Sensorik von Apfelsaftaromen konnte nicht festgestellt werden. Daher haben sie vorgeschlagen, die Rearomatisierung auch weiterhin organoleptisch zu beurteilen und die Authentizität und die Saftmatrix analytisch zu untersuchen. Die mögliche Bewertung der Rearomatisierung von

Apfelsäften anhand von analytischen Summenparametern sollte in weiteren Arbeiten untersucht werden.

- Nikfardjam und Maier (2010)^{74,117} haben mittels Headspace-Trap-Technologie und sensorisch nach dem DLG-Score 68 Direktsäfte und 17 Säfte aus Konzentrat untersucht und bewertet. Die Summe der Ester hat laut ihren Untersuchen keinen Einfluss auf die Sensorik der Apfelsäfte. Sensorisch schlechter beurteilte Säfte wiesen tendenziell eine höhere Estersumme auf. Die Summe der C₆-Aldehyde und -Alkohole erwies sich im negativen Sinne signifikant. Bei einem hohen Gehalt an C₆-Verbindungen wurden die Säfte vom Panel schlecht bewertet.
- Einen neuen Ansatz verfolgt ein Projekt des Forschungskreises der Ernährungsindustrie e. V. (FEI)^{75,76} mit dem Thema „Aromawert-Index als Kriterium zur Bewertung des Einflusses der Rearomatisierung und nicht-flüchtiger Geschmacksstoffe auf die Qualität von Apfelsäften aus Konzentrat“. Das Ziel dieses Projektes ist es, über die molekulare Sensorik zu klären, welche Aromastoffe einen Beitrag zum apfeltypischen Aroma haben. Auf Grundlage dieser Werte sollen Korrelationen ermittelt werden, die es ermöglichen, analytische Parameter für die Qualitätsbewertung von Apfelsaft aus Konzentrat zu definieren.

Der Wert 150 für den Aromaindex wurde von den Fachgremien des Verbandes der Fruchtsaftindustrie als Mindestmaß einer ausreichenden Rearomatisierung festgelegt. Ein Saft mit einem Aromaindex größer 150 ist damit verkehrsfähig¹⁸⁵.

3.5 Orangenaroma

Beim Orangenaroma müssen mehrere Fraktionen unterschieden werden. Hier wird, wie in Kapitel 2.4.2 beschrieben, nicht nur die Wasserphase extrahiert, sondern zusätzlich eine Ölphase und das Schalenöl⁷⁷. Das Schalenöl besteht zu 94,5% aus Limonen, 1% Valencen, 0,8% Linalool und 0,7% Oktanal, Dekanal und Ethylbutyrat⁷⁸. Der Anteil an Aroma-Ölphase beträgt in Orangensaft 0,005%⁷⁹. Im Vergleich zum Schalenöl enthält die Ölphase einen 7 bis 18-fach höheren Gehalt an Estern und einen geringeren Gehalt an Aldehyden⁸⁰.

Die ersten Nachweise von Orangenaromabestandteilen wurden 1925 von Hall und Wilson dokumentiert. Sie konnten 8 Stoffe identifizieren und haben dafür ein Probenvolumen von 2025 Litern eingesetzt. Ebenso wie bei der Aromaforschung beim Apfel hat auch hier die Entwicklung der Gaschromatographie und die spätere Einführung der massenselektiven

Detektoren einen großen Beitrag zur Identifizierung und Quantifizierung der Aromastoffe geleistet^{81,82}.

Bis heute konnten bereits mehr als 200 Aromastoffe in frischem Orangensaft identifiziert werden⁸³. Ester, Kohlenwasserstoffe, Alkohole und Aldehyde zählen zu den Verbindungs-klassen mit dem größten Anteil vom Gesamtaroma.

Wichtige Aromakomponenten des in Deutschland hauptsächlich konsumierten Orangen-saftes aus Konzentrat sind in Tab. 9 aufgeführt⁸⁴.

Tab. 9: Wichtige Aromastoffe in einem frisch rekonstituierten Orangensaft aus Konzen-trat^{84,85,85}

Aromastoff	Geruchseindruck
Ethylbutyrat	fruchtig
Linalool	blumig
Myrcen	geranien-ähnlich
(S)-Ethyl-2-methylbutyrat	fruchtig
Acetaldehyd	scharf, stechend
Dekanal	süß, blumig, orangenähnlich
(R)- α -Pinen	etherisch, nach Pinienbaum
(R)-Limonen	terpentinartig
β -Damascenon	bratapfelartig
Oktanal	grün, citrusartig
Dimethylsulfid	schwefelartig
(R)-Carvon	minzig
Hexanal	grün, grasartig

Der größte Unterschied zwischen einem frischen und einem Orangensaft aus Konzentrat liegt beim Gehalt der Aromastoffe Linalool, Oktanal, Dekanal, (R)-Limonen, (R)- α -Pinen und Myrcen. Sie wurden beim rekonstituierten Saft in größeren Mengen gefunden. Signifi-kant reduziert waren die Aromen Acetaldehyd, (S)-Ethyl-2-methylbutyrat, Ethylbutyrat und (Z)-3-Hexenal. β -Damascenon, Dimethylsulfid und (R)-Carvon konnten in frischem Oran-gensaft nicht nachgewiesen werden⁸⁶. Bei der Lagerung des Saftes ist eine Abnahme der Komponenten Oktanal, Dekanal, (R)- α -Pinen, Linalool und β -Damascenon zu beob-achten⁸⁷.

Zur routinemäßigen Qualitätskontrolle der produzierten Orangensafte aus Konzentrat und zur Kontrolle bestimmter Produktionsstufen wurde Ethylbutyrat als Kontrollparameter ausgewählt.

4. Analytik von Aromastoffen

4.1 Aromaanalytik

Die Analyse von Aromastoffen wird in den unterschiedlichsten Bereichen durchgeführt⁸⁸. Das wohl bekannteste Einsatzgebiet ist die Analyse von Aromastoffen in Lebensmitteln wie bei exotischen Früchten aus Brasilien⁸⁹, Acerola, Sternfrucht, Jackfrucht und weiteren, getrockneten Vanilleschoten⁹⁰, Käse⁹¹, Wein⁹² usw. Doch nicht nur die charakteristischen Aromen werden überprüft, sondern auch Fehlaromen, die z. B. von Salmonellen in Fleischprodukten erzeugt werden⁹³ oder durch Lagerung entstandene Substanzen bei Sardinen⁹⁴. Ebenso werden auch Fehlaromen, die als Abbauprodukte durch Oxidation in Speiseölen entstanden sind⁹⁵ und bei der Gärung von Eisbergsalat entstehen⁹⁶, analysiert. Diese Untersuchungen werden mittels Simultaner Destillation/Extraktion (SDE)/ Headspace (HS)/ Solid Phase Micro Extraction (SPME)-GC-MS/FID durchgeführt.

Während der Lagerung von Zwiebeln können sich Krankheiten ausbreiten, die den gelagerten Bestand gefährden und damit einen großen Verlust darstellen. Das Profil der flüchtigen Stoffe, aufgenommen mit Elektronischen Nasen, wurde mittels Hauptkomponentenanalyse ausgewertet und es erfolgte eine Zuordnung zu den gesunden Zwiebeln oder zu der entsprechenden Krankheit⁹⁷.

Auch Veränderungen in der Zusammensetzung des Schweißes bei Verzehr bestimmter Lebensmittel werden über die Aromaanalyse beobachtet. Mebazaa hat diese Änderung am Beispiel von Männerschweiß beim Konsum von Bockshornklee nachgewiesen. Die Extraktion und Anreicherung erfolgte über HS-SPME mit anschließender Trennung per GC und verschiedenen Detektoren wie MS, FID und olfaktorisch. Von 44 Substanzen konnten 8 auf den Verzehr des Bockshornklees zurückgeführt werden, welche einen Ahornsirup ähnlichen Duft haben⁹⁸.

Auch Schimmelpilze wie Neurospora sp. produzieren Duftstoffe. Pastore hat bei den in Maranhao Brasilien isolierten Stämmen einen fruchtigen Duft mittels HS-GC nachweisen können. Bei Stämmen, die in Sao Paulo isoliert wurden, konnten die Analyten die für den fruchtigen Geruch zuständig sind, wie Ethylhexanoat, 3-Methylbutanol, 1-Okten-3-ol, Ethylacetat und Ethanol, nicht nachgewiesen werden⁹⁹.

In der Kosmetikindustrie liegt ein Augenmerk auf der Analyse von potentiell Allergie auslösenden Duftstoffen. In der Kosmetikdirektive der Europäischen Union sind 26 Substanzen gelistet die mittels GC-MS nachgewiesen werden können¹⁰⁰.

4.2 Historische Entwicklung der Apfelanalytik

Zur Analyse von Aromen in Lebensmitteln müssen diese zunächst extrahiert und angereichert werden, bevor sie chromatographisch getrennt und detektiert werden können. Im Folgenden werden die Techniken zur Aufbereitung und Analyse von Apfeleromen, die 1920 ihre Anfänge fanden, beschrieben.

Die ersten Untersuchungen des Apfeleromas wurden von Power und Chestnut 1920 durchgeführt⁵⁸. Sie haben als Hauptbestandteile des Apfeleromas Acetaldehyd und die Ester der Ameisen-, Essig- und Capronsäure identifiziert. Bis zur Einführung der Gaschromatographie erfolgte die Trennung und Identifizierung der Aromastoffe zum Beispiel, wie von Henze 1954 publiziert, über Säulenchromatographie und anschließender Identifizierung mittels UV/VIS-Spektroskopie¹⁰¹. Meigh leitete 1956 einen Gasstrom, welcher zuvor über den Apfel geleitet wurde, durch Kältefallen und konnte anschließend mittels Papier- und Säulenchromatographie unterschiedliche Apfelsorten vergleichen¹⁰².

Der Durchbruch in der Erforschung der Apfeleromen kam mit der Verwendung der Gaschromatographie. Koch und Schiller¹⁰³ konnten 1964 30 Substanzen identifizieren, die in diesem Umfang bis dahin nicht gefunden wurden. Die veröffentlichten Erkenntnisse stimmten jedoch nicht überein und es bestand auch keine Einigung darüber, welche Aromastoffe maßgeblich am Apfeleroma beteiligt sind. Der Einsatz der olfaktorischen Detektion (Sniffing Port, 1966) machte es möglich, Analyten in Geruchsaktive und-inaktive Komponenten zu trennen¹⁰⁴. 1967 hat Flath als einer der ersten die Gaschromatographie mit der Massenspektrometrie (GC-MS) als Detektor in diesem Forschungsfeld kombiniert und konnte nun zusätzliche Peaks identifizieren, auch wenn es noch an Vergleichsspektren mangelte¹⁰⁵.

In Verbindung mit der GC-MS wurden verschiedene Probenvorbereitungstechniken eingesetzt, wie zum Beispiel Headspace-Technik¹⁰⁶, Flüssig-Flüssig-Extraktion^{73,107}, Destillation und Extraktion mit Ether^{108,109,110}, Solvent Assisted Flavour Evaporation (SAFE)^{63,111} und Dynamische Headspace^{67,74,112,113}. Song hat 1997 die zeit- und lösemittelparendere Methode der Solid Phase Microextraction (SPME) eingesetzt¹¹⁴ wie auch später u.a. Kato¹¹⁵ und Tienpont¹¹⁶. Am häufigsten wird derzeit für die Analytik der Apfeleromen die SDE-HS-GC-MS Technik verwendet^{62,66,67,71,72}. Neben Detektoren wie dem Massenspektrometer und dem FID werden die Analyten, nach der chromatographischen Trennung durch die GC, olfaktometrisch bestimmt^{117,118,119,120}.

Bei der Analyse von Apfeleromen ist heutzutage die SDE-HS-GC-MS-Technik etabliert, wie sie von Schumacher⁶⁷, im Projekt des Forschungskreises der Ernährungsindustrie⁶²,

Heil^{66,71} und Wolter⁷² angewendet wird, und ist als Methode 00.00.106 in der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §64 Abs.1 LFGB (Lebens- und Futtermittelgesetz), Band 1 (Lebensmittel)¹⁶³ aufgeführt. Ebenso ist es die gebräuchlichste Methode der Handelslabore. Die Anwendung der SBSE (Stir Bar Sorptive Extraction)-Technik zur Analyse von Aromastoffen im Apfelsaft wurde bislang nur von der Firma Gerstel in der Literatur beschrieben¹²¹.

4.2.1 Polydimethylsiloxan als Sorbens

Die Extraktion mit Polydimethylsiloxan (PDMS) als Sorbens wurde bereits Mitte der 1980er Jahre beschrieben¹²². Die dort verwendeten offenen Röhren, die Open Tubular Trap (OTT), waren auf der Innenseite mit einer PDMS-Phase beschichtet (1,12 m x 0,32 mm x 3 µm und 1,12 m x 0,32 mm x 12 µm). Zur Sorption der Analyten wurde die Probe durch die Kapillare geleitet und anschließend konnten diese thermisch oder flüssig desorbiert werden. Die Kapazität der Phase war durch das Durchbruchsvolumen begrenzt.

13 Jahre später haben Arthur und Pawliszyn die SPME-Technik vorgestellt¹²³. Auf der Nadel-Außenseite ist eine dünne PDMS-Schicht aufgebracht, welche die Analyten aus dem Dampfraum oder der flüssigen Probe extrahiert. Diese werden später ebenfalls thermisch oder flüssig desorbiert. Als die primären Vorteile der Technik stellen Arthur und Pawliszyn den geringen Verbrauch an hochreinen Lösemitteln, die geringen Laborkosten und den verminderten Lösemittelabfall dar.

1997 haben Baltussen et al. die Extraktion anhand einer mit PDMS Partikeln gefüllten Kartusche, der sorptive extraction-thermal desorption (SE-TD), beschrieben. Diese Kartusche kann im Gegensatz zur OTT- Technik direkt thermisch desorbiert werden und es müssen keine Lösemittel eingesetzt werden¹²⁴. Die SE-TD kann vollautomatisch betrieben werden¹²⁵. Eine weitere Möglichkeit, PDMS als Sorbens einzusetzen, haben Reichenberg et al. beschrieben. Glasfläschchen wurden mit einer Schicht von 3-12 µm PDMS ausgekleidet. Während des Rührens der Probe in den Gefäßen werden die Analyten sorbiert und anschließen flüssig extrahiert¹²⁶.

Der nächste technische Entwicklungsschritt in der Anwendung von PDMS-Phasen zur Anreicherung von Analyten war die SBSE.

4.2.2 Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE)

Die Prinzipien der SBSE wurden 1999 zum ersten Mal in einer Veröffentlichung von Baltussen, Sandra, David und Cramers präsentiert¹²⁷.

Der Twister® (Handelsname der Rührstäbchen, erhältlich bei der Firma Gerstel) ist ein mit Glas ummantelter Magnetrührstab (Abb. 15) auf dem eine 1 bzw. 2 cm lange und 0,5 bzw. 1,0 mm dicke Phase aus PDMS (Abb. 16) aufgebracht ist. Die PDMS-Phasenvolumina der vier kommerziell erhältlichen Größen sind in Tab. 10 zusammengestellt.



Abb. 15: Twister (20 mm x 1 mm)

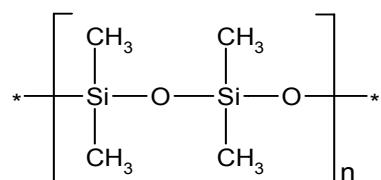


Abb. 16: Struktur der PDMS-Phase

Tab. 10: Abmessung und Phasenvolumina der kommerziell erhältlichen Twister

Abmessung des Twisters	Phasenvolumen [µL]
1 cm x 0,5 mm	24
1 cm x 1,0 mm	63
2 cm x 0,5 mm	47
2 cm x 1,0 mm	126

4.2.2.1 Charakteristika der SBSE-Technik

Die SBSE-Technik vereint folgende Vor- und Nachteile:

- Die Analyten werden nicht an einer aktiven Oberfläche adsorbiert, sondern von der PDMS-Phase absorbiert^{127,128}.
- Aufgrund schwächerer Wechselwirkungen bei der Absorption kann die Desorption bei niedrigeren Temperaturen stattfinden. Dies minimiert den Verlust von thermolabilen Substanzen¹²⁷.
- Die Sorptionskapazität für eine bestimmte Komponente wird nicht durch die Gegenwart von Wasser beeinflusst, da jeder Analyt sein eigenes Übergangs-

Gleichgewicht hat und bei wässrigen Proben keine Verdrängung der Analyten durch Wassermoleküle stattfindet^{127,129}.

- Abbauprodukte der PDMS-Phase haben charakteristische Siloxan-Massenfragmente und können so beim Einsatz eines massenselektiven Detektors erkannt werden und stören nicht bei der Identifizierung/Quantifizierung der Analyten¹²⁷.
- Die Wiederfindung ist abschätzbar und kann über den Oktanol/Wasser-Koeffizienten des entsprechenden Analyten berechnet werden¹²⁷ (siehe Kap.4.2.2.2).
- Baltussen konnte auch nach 100 Anwendungen keinen Abbau der Phase beobachten¹²⁷.
- Die Extraktion kann aus der Flüssig- wie auch aus der Gasphase stattfinden. Bei der Extraktion aus der Dampfphase spricht man von Headspace Sorptive Extraction (HSSE)^{130,160}.

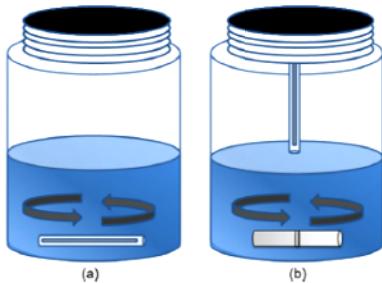


Abb. 17: Extraktionsarten der SBSE, a) aus der flüssigen Phase (SBSE), b) aus der Gasphase (HSSE)¹⁶⁰

- Die Technik zeichnet sich durch eine leichte Durchführbarkeit aus.
- Beim Einsatz als HSSE ist der Twister auch für feste Proben geeignet¹³¹.
- Es ist nur ein geringer Zeitaufwand für die Probenaufarbeitung nötig¹³². Ein Vergleich zur Probenaufarbeitung mittels SDE ist in Kap. 4.2.4 dargestellt.
- Die Twister können nach der Reinigung wiederverwendet werden¹²⁷.
- Die Probenaufarbeitung mit dem Twister kann mit nur einer geringen Menge an Lösemittel durchgeführt werden¹³³ (siehe Kap.4.2.4).
- Aufgrund der verwendeten PDMS-Phase ist der Bereich der extrahierbaren Substanzen auf unpolare Stoffe bzw. halbpolare Stoffe begrenzt ($\log K_{OW} > 2$). Dadurch können Störungen von polaren Begleitstoffen wie z. B. Wasser oder Zucker eliminiert werden¹³⁴.
- Kommerziell erhältlich sind bislang nur Twister mit einer PDMS-Phase. Mit Polyacrylat beschichtete Twister wurden jedoch bereits von der Firma Gerstel als beta-test kit herausgegeben¹³⁵.

- Die Analyten können nach der Anreicherung thermisch und flüssig desorbiert werden. Die Flüssig-Extraktion ist eine Alternative zur thermischen Desorption bei Analyse des Extrakts mittels Flüssigchromatographie oder bei thermisch labilen Analyten¹³⁶.
- Die SBSE-Technik ist im Gegensatz zur SPME-Technik nicht vollständig automatisiert¹³⁷.

Wie aus der Aufzählung der Charakteristika ersichtlich, vereint die SBSE-Technik viele Vorteile, da keine Lösemittel beim Extraktions- und Desorptionsvorgang benötigt werden, lediglich zur Reinigung des Stir Bars wird eine geringe Menge Methanol eingesetzt, kann die SBSE-Technik der sogenannten „Grünen Analytischen Chemie“ zugeordnet werden^{138,139}. Der Begriff „Green Analytical Chemistry“ entstand aus der Definition der „Grünen Chemie“.

Die ersten Ansätze zur Grünen Chemie hat Malissa 1987 in Paris präsentiert. Anastas hat darauf die Grüne Chemie 1999 wie folgt beschrieben: Die Grüne Chemie ist eine Chemie, welche Techniken und Methoden anwendet, welche den Gebrauch oder die Produktion von Rohmaterial, Produkten, Nebenprodukten, Lösemitteln, Reagenzien usw. reduziert oder eliminiert, wenn diese gefährlich für die Gesundheit des Menschen oder für die Umwelt sind^{140,141}.

Einsatz der SBSE-Technik

Im Lebensmittel- und Flavour-Bereich wird die SBSE in unterschiedlichen Matrices und bei verschiedenen Substanzklassen eingesetzt, beispielsweise zur Untersuchung von Aromakomponenten, off-flavours¹⁴², Migration aus Lebensmittelverpackungen^{143,144}, Pestiziden^{149,145,146} in Matrices, wie Himbeeren¹⁴⁷, Trauben¹⁴⁸, Salat¹⁴⁹, Tomaten¹⁴⁹, Wein¹⁵⁰, Essig¹⁵¹, sowie weiteren Getränken und Lebensmitteln. Auch im Bereich der Umweltanalytik wird die SBSE immer häufiger verwendet. Hier findet sie Anwendung bei der Analyse von Pharmaka in der Umwelt¹⁵², Endokrin-aktiven Stoffen¹⁵³, wie Herbiziden, Organochlor und Organophosphor Pestiziden, Polyzyklischen Aromatischen Kohlenwasserstoffen, Bioziden, Phthalaten in z. B. Wasser¹⁵² und Sedimenten¹⁵⁴. Des Weiteren wird die SBSE-Technik bei biologische Proben wie Urin¹⁵⁵, Plasma¹⁵⁶ und Muttermilch¹⁵⁷ angewendet.

Bei der Analyse von flüchtigen Komponenten in Sherry wurden von Delgado et al. Reproduzierbarkeiten von 4,97 - 17,88% zwischen unterschiedlichen Twistern ermittelt.

Die Methode wurde für 36 Analyten validiert. Die Arbeitsbereiche von 29 Analyten lagen im µg/L Bereich von weiteren 7 im mg/L Bereich. Die Wiederfindungen variierten von 84,1-112%¹⁵⁸.

4.2.2.2 Theoretische Grundlagen der Extraktion mit dem Twister (SBSE)

Extraktionsmaterialien aus polymerem Material werden oberhalb ihrer Glasübergangstemperatur eingesetzt. In dem Bereich verhalten sich Polymere wie Flüssigkeiten und die Analyten (unpolar bis semipolar) werden in der PDMS-Phase angereichert¹⁵⁹. Als Näherung kann der Übergangs-Koeffizient PDMS-Phase/Wasser ($K_{PDMS/W}$) proportional dem Oktanol/Wasser-Koeffizient ($K_{O/W}$) gesetzt werden:

$$K_{O/W} \approx K_{PDMS/W} = \frac{C_{SBSE}}{C_W} = \frac{m_{SBSE}}{m_W} * \frac{V_W}{V_{SBSE}} \quad (1)$$

C_{SBSE} , C_W = Konzentration des Analyten in der PDMS-Phase und in der wässrigen Probe,

m_{SBSE} , m_W = Masse des Analyten in der PDMS-Phase und in der wässrigen Probe

V_W und V_{SBSE} = Volumen der Probenlösung und der PDMS-Phase

Nach Ersetzen von V_W/V_{SBSE} durch das Phasenverhältnis β ergibt sich:

$$\frac{K_{O/W}}{\beta} = \frac{m_{SBSE}}{m_W} = \frac{m_{SBSE}}{m_o - m_{SBSE}} \quad (2)$$

m_o = Masse an Analyten in der zu untersuchenden Probe

$\beta = V_W/V_{SBSE}$

Nach dem Umstellen der Gleichung 2 nach dem Verhältnis der Masse an Analyten in der Phase zur ursprünglich in der Probenlösung vorhandenen Masse an Analyt ergibt sich:

$$\frac{m_{SBSE}}{m_o} = \frac{\left(\frac{K_{O/W}}{\beta}\right)}{1 + \left(\frac{K_{O/W}}{\beta}\right)} = WF \quad (3)$$

Hier ist zu erkennen, dass der einzige Parameter, welcher die Wiederfindung (WF) des Analyten aus der Probe beeinflusst, das Phasenverhältnis zwischen dem Volumen der PDMS-Phase und der Probe ist.

Bei der SPME ($0,5 \mu\text{L}$ PDMS-Phasenvolumen, 10 mL Probe) liegt das Phasenverhältnis bei 2000, während bei der SBSE ($50 - 300 \mu\text{L}$ PDMS-Phasenvolumen, 10 mL Probe) ein Wert von $33 - 200$ erreicht wird. In Abb. 18 sind die Kurven der Phasenverhältnisse von 100, 1 000 und 10 000 als Funktion des $\log K_{\text{O/W}}$ und der Wiederfindung gezeigt. Wie an dieser Darstellung zu erkennen ist, sind mit der SBSE-Technik auch Analyten mit kleinerem $\log K_{\text{O/W}}$ extrahierbar. Der Twister kann bereits bei Analyten mit einem $K_{\text{O/W}}$ -Wert von 100 eine 50%ige Wiederfindung erreichen, während dies bei der SPME erst bei einem $K_{\text{O/W}}$ -Wert von 10 000 möglich ist^{127,132,160}.

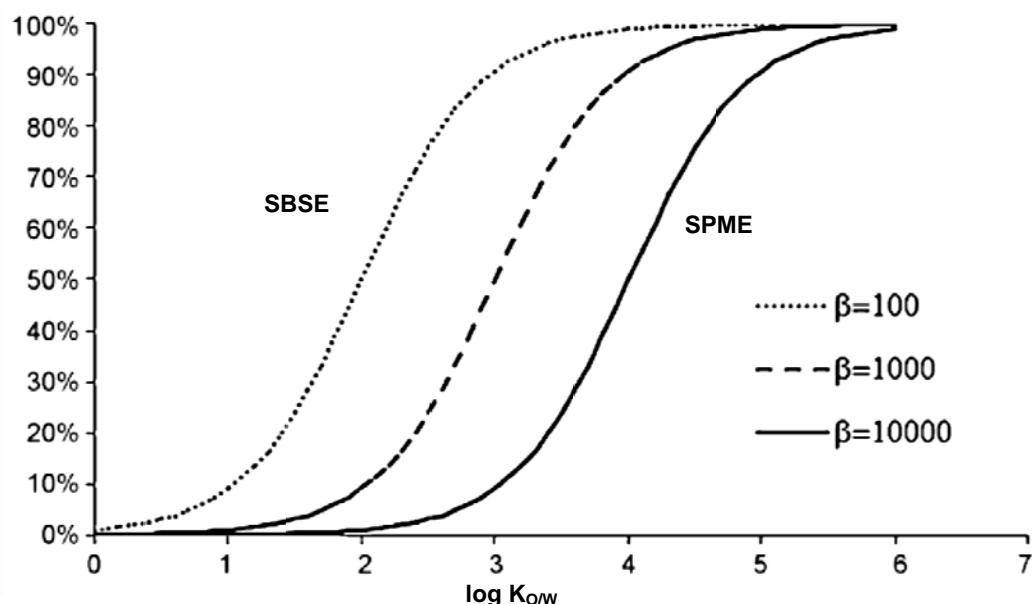


Abb. 18: Theoretische Wiederfindung aufgetragen gegen den $\log K_{\text{O/W}}$, für verschiedene β -Werte (in Anlehnung an Prieto¹⁶⁰)

4.2.2.3 Ablauf der Probenvorbereitung mit der SBSE-Technik

Der Twister wird mit der Pinzette aus der Aufbewahrungsbox entnommen, in die Probenlösung gegeben und für eine definierte Zeit und Umdrehungen/Minute zur Extraktion auf der Rührplatte platziert. Nach dem Rühren wird der Twister mit Hilfe eines Magnetrührstabes entnommen, mit VE-Wasser abgespült (Abb. 19) und nach Abtupfen mit einem fusselfreien Tuch (Abb. 20) in einen Twister-Desorptionsliner gegeben (Abb. 21), welcher mit einem Transportadapter versehen (Abb. 22) im Tray platziert wird (Abb. 23). Der Multipurposesampler entnimmt die Probe automatisch und befördert sie in die Thermo-desorptionseinheit.



Abb. 19: Abspülen des Twisters mit VE-Wasser

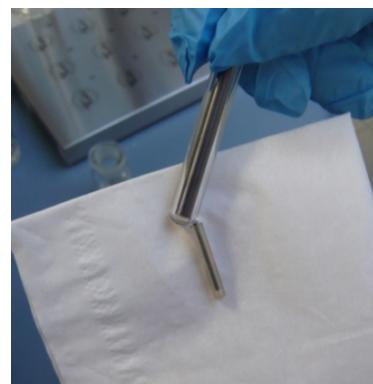


Abb. 20: Abtupfen mit einem fusselfreien Tuch

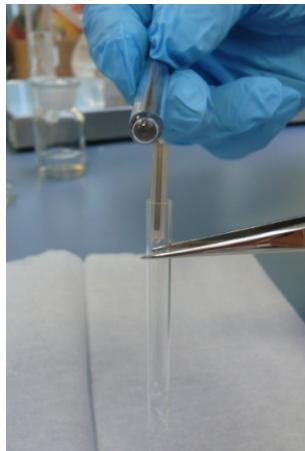


Abb. 21: Einsetzen des Twister in den Desorptionsliner



Abb. 22: Aufsetzen des Transportadapters



Abb. 23: Positionieren im Tray

Abb. 19 - Abb. 23: Ablauf der Probenvorbereitung mit der SBSE- Technik

4.2.3 Simultane Destillation-Extraktion (SDE)

Die bislang häufigste Methode zur Extraktion und Anreicherung von Aromen aus Säften stellt die 1964 von Likens und Nickerson entwickelte SDE mit anschließender Einengung des Extraktes und Quantifizierung mittels HS-GC-MS dar^{8,65,163}.

Diese Ein-Schritt-Isolation-Konzentration von Aromabestandteilen brachte eine große Zeitersparnis gegenüber den einzelnen Schritten, der Aufkonzentrierung der Aromastoffe und anschließender Extraktion, und aufgrund der kontinuierlichen Wiederverwendung des Lösemittels konnte die eingesetzte Menge verringert werden im Vergleich zur Extraktion mittels Ausschütteln⁸.

Abb. 24 zeigt den Aufbau einer SDE. Zu Beginn wird die Probe (z. B. 200 - 300 g Apfelsaft¹⁶³) unter Rühren zum Sieden gebracht. Die flüchtigen Substanzen werden mit Hilfe des Wasserdampfes aus der Probe durch den rechten Arm dampfdestilliert, während gleichzeitig Lösemittel (z. B. Pentan/Diethylether-Mischung¹⁶³) auf der linken Seite zum Sieden erhitzt wird. Die Dämpfe kondensieren am Kühlfinger. Die Analyten werden bei dem kontinuierlichen Betrieb extrahiert und reichern sich in der organischen Phase an. Die wässrige Probe und das Lösemittel, gesammelt und getrennt im Separationsteil, fließen zurück in die Kolben, das Lösemittel durch den linken Seitenarm und die Probe durch den rechten Seitenarm.

Der Probenextrakt, welcher sich nach Beendigung des Destillations-Extraktionsvorgang im linken Kolben auf der Lösemittelseite vorliegt, wird im nächsten Schritt getrocknet (z. B. mit Natriumsulfat¹⁶³) und eingeengt. Die Trennung und Quantifizierung kann anschließend mittels HS-GC-MS durchgeführt werden¹⁶¹. Die erarbeitete Arbeitsanweisung ist im Anhang im Kap. F aufgeführt. Die SDE kann unter Normaldruck und unter Vakuum durchgeführt werden¹⁶².

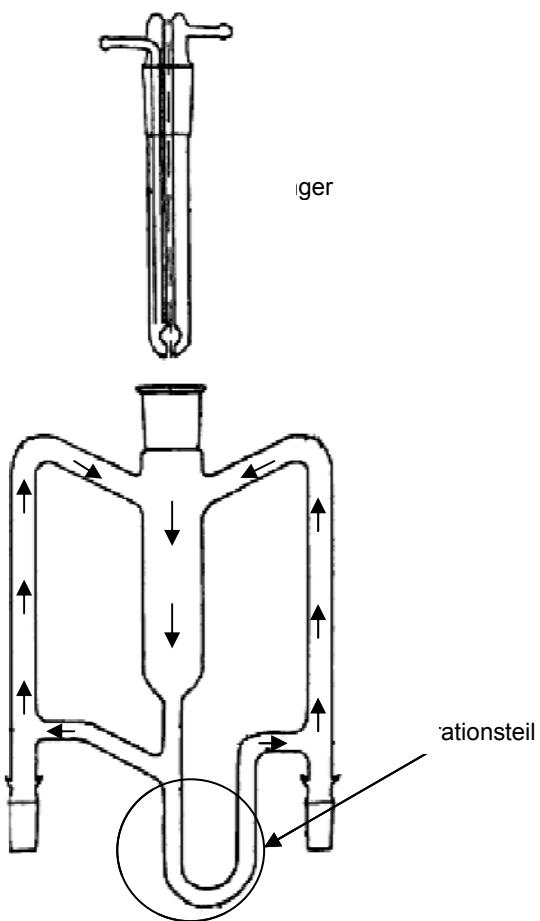


Abb. 24: SDE-Apparatur nach Likens und Nickerson⁸

4.2.4 Vergleich SBSE und SDE

Warum sollte von der bewährten und verbreiteten SDE-Methode abgewichen werden? Für den Routinebetrieb ist eine schnelle und leicht durchführbare Methode mit geringem Lösemittelverbrauch wichtig. Genau diese Vorteile sind in der Twister-Technik vereint, wie eigene Erfahrungen gezeigt haben. Diese Unterschiede sind im Folgenden genauer beschrieben:

Beim Vergleich des *Zeitaufwandes* der Probenvorbereitung einer Probe ist der Unterschied noch nicht gravierend. 2,25 h werden für die SBSE benötigt und 3 h für die SDE. Der klare zeitliche Vorteil wird beim Vergleich mehrerer Probenaufarbeitungen deutlich. Hier benötigt man für 15 Probenaufarbeitungen mit der SBSE-Technik 3 h, für die SDE jedoch 45 h, da an einer Destillations-Anlage keine Proben simultan aufgearbeitet werden können, die SBSE- Rührplatte aber mit 15 Plätzen ausgestattet ist.

Auch beim *Lösemittelverbrauch* ist die SBSE die Methode der Wahl, da dort 10 mL Lösemittel (Methanol) zur Reinigung des Twister benötigt werden. In der Methode 00.00.106 der Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §64 Abs.1 LFG¹⁶³ werden 80 mL Lösemittel (Diethylether/Pentan) zur Probenaufarbeitung eingesetzt.

Ein wichtiger Faktor für den Routinebetrieb ist, Mitarbeiter schnell einarbeiten zu können. Die SBSE ist einfacher zu bedienen und es ist weniger *Anwendererfahrung* nötig als bei der SDE. Des Weiteren nimmt die Rührplatte weniger Platz in Anspruch als die SDE mit je 2 Rührplatten und einer weiteren Rührplatte für die anschließende Einengung. Die beschriebenen methodischen Vorteile sind in Tab. 11 zusammengefasst.

Tab. 11: Vergleich der SBSE (Daten aus eigenen Erfahrungen) und SDE

	SBSE	SDE
Zeitaufwand, 1 Probe [h]	2,25	3 ¹⁶³
Zeitaufwand, 15 Proben [h]	3	47 ¹⁶³
Lösemittelverbrauch [mL]	10	80 ¹⁶³
Anwendererfahrung	geringer	höher
Platzanforderung [cm]	Rührplatte 24x42	SDE-Anlage 34x30, Umlaufkühler 20x40, Einengen am Rückfluss 17x30

Neben den erwähnten Vorteilen der SBSE-Technik gegenüber der SDE stellen Caven-Cantrill¹⁶⁴ im direkten Vergleich anhand von Traubensaft noch die erhöhte Empfindlichkeit heraus. Mit Einsatz der SDE konnten 98 Aromakomponenten identifiziert werden. Durch den Einsatz der SBSE konnte die Anzahl der identifizierten Analyten auf 126 Komponenten erhöht werden.

Ridgway et al.¹⁶⁵ haben 2010 den Vergleich zwischen der SBSE und der SDE bei der Analyse von Fehlaromen gezogen. Sie haben die Reproduzierbarkeiten anhand von gespikten Softdrinks ermittelt. Auch hier zeigte die SBSE-Technik eine höhere Empfindlichkeit, wie sie Caven-Cantrill¹⁶⁴ schon publiziert hatten. Die Reproduzierbarkeit der SBSE Methode lag zwischen 3,5 und 23,7%. Die Aufarbeitung der Probe mittels SDE ermöglichte Reproduzierbarkeiten zwischen 5,3 und 31,1%.

Dieser Vergleich zeigt die grundsätzlichen Vorteile der SBSE-Methode, die in den eigenen Untersuchungen eingesetzt wurde.

5. Untersuchungsmethodik

Um Aromastoffe in Fruchtsäften nachzuweisen, werden diese mit der SBSE-Technik extrahiert, angereichert und anschließend chromatographisch getrennt und detektiert. Das verwendete Thermodesorptions-Gaschromatographie-Massenspektrometrie (TD-GC-MS)-System ist in Abb. 26 gezeigt.

Nach Optimierung der Probenvorbereitung und der chromatographischen sowie massenspektrometrischen Bedingungen, wurde die Methode für die in Tab. 12 aufgeführten Analyten validiert und stand für den Einsatz in der Routineanalytik, zur Analyse der produzierten Apfel- und Orangensaft, zur Verfügung. Weitere Daten, wie der $\log K_{OW}$, der Siedepunkt, die CAS-Nummer und die Molekülmasse sind im Anhang in Kap. A aufgeführt.

Nach der Entwicklung der Apfelmethode wurde diese für verschiedene Anwendungen eingesetzt. Im Verlauf der Arbeit wurden im Rahmen von Ringversuchen der GDCh mehrfach Handelsproben analysiert. Im ersten Schritt wurde die Vergleichbarkeit der angewendeten Analysemethoden verschiedener Labore gesichert (Laborvergleichsuntersuchung, LVU), um in weiteren Schritten einen aktuellen Datenbestand zusammenzustellen, anhand dessen ein Parameter zur ausreichenden Rearomatisierung von Konzentratsäften ermittelt werden sollte.

Zum möglichen Nachweis von aromatisierten Apfeldirektsäften wurden Apfeldirektsäfte und Säfte aus Konzentrat auf charakteristische Markersubstanzen analysiert. Abschließend wurde anhand der Chemometrie Software Pirouette Lite Classify® ein Klassifizierungsmodell erstellt, welches eine Einteilung von Apfeldirekt- und Konzentratsäften erlaubt und erste Hinweise zu aromatisierten Direktsäften liefert. Der Untersuchungsablauf ist in Abb. 25 schematisch gezeigt.

Tab. 12: Liste der Analyten mit Summenformel und Struktur, auf welche die Methoden zur Quantifizierung optimiert wurden

Analyt/ Summenformel	Struktur	Analyt/ Summenformel	Struktur
Ethylisobutyrat $C_6H_{12}O_2$		<i>trans</i> -2-Hexenal $C_6H_{10}O$	
Methyl-2- Methylbutyrat $C_6H_{12}O_2$		Amylacetat $C_7H_{14}O_2$	
Ethylbutyrat $C_6H_{12}O_2$		Methylhexanoat $C_7H_{14}O_2$	
Butylacetat $C_6H_{12}O_2$		Ethylhexanoat $C_8H_{16}O_2$	
Hexanal $C_6H_{12}O$		Benzaldehyd C_7H_6O	
Ethyl-2- Methylbutyrat $C_7H_{14}O_2$		Hexylacetat $C_8H_{16}O_2$	
Ethylisovalerat $C_7H_{14}O_2$		<i>trans</i> -2- Hexenylacetat $C_8H_{14}O_2$	
3- Methylbutylacetat $C_7H_{14}O_2$		Hexyl-2-methylbutyrat $C_{11}H_{22}O_2$	
2- Methylbutylacetat $C_7H_{14}O_2$		Damascenon $C_{13}H_{18}O$	
Isobutylisobutyrat (IS)/ $C_8H_{16}O_2$			

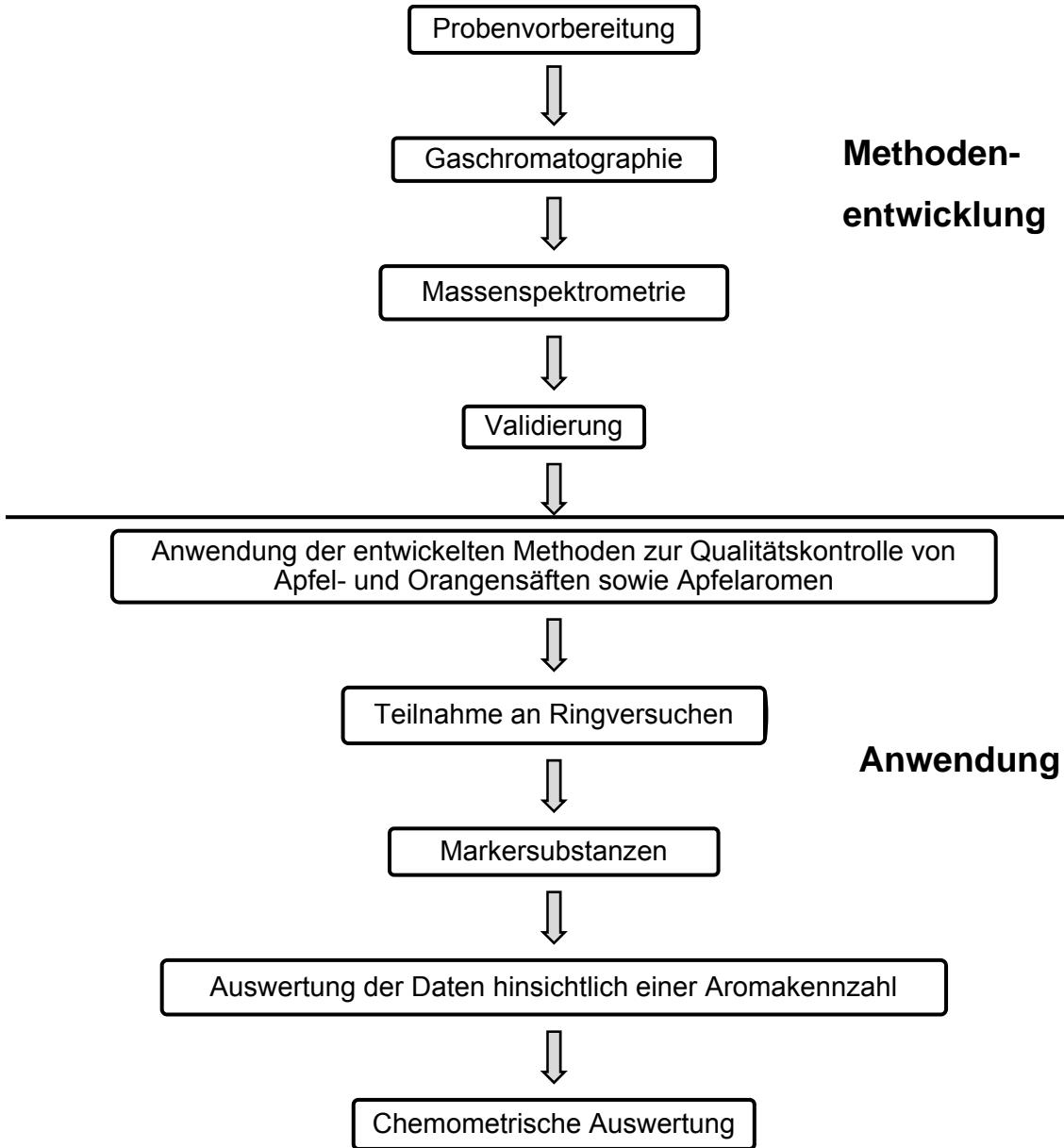
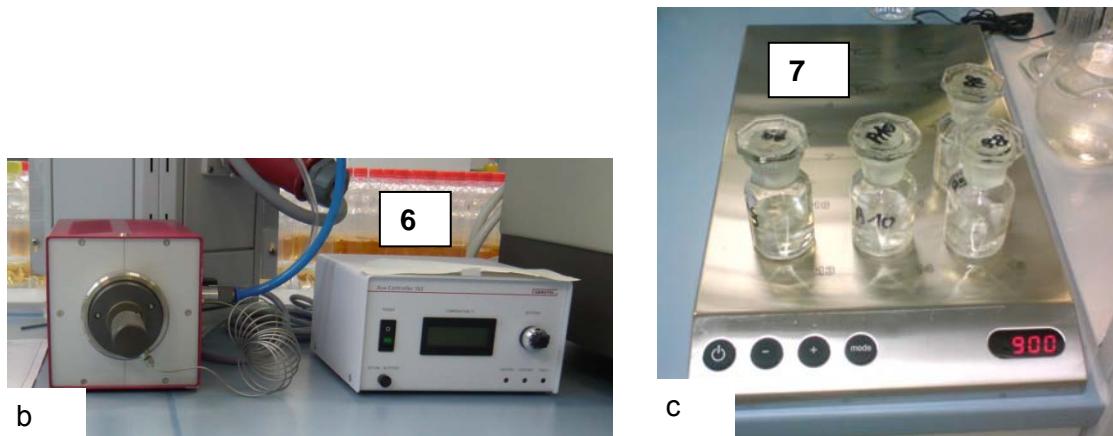
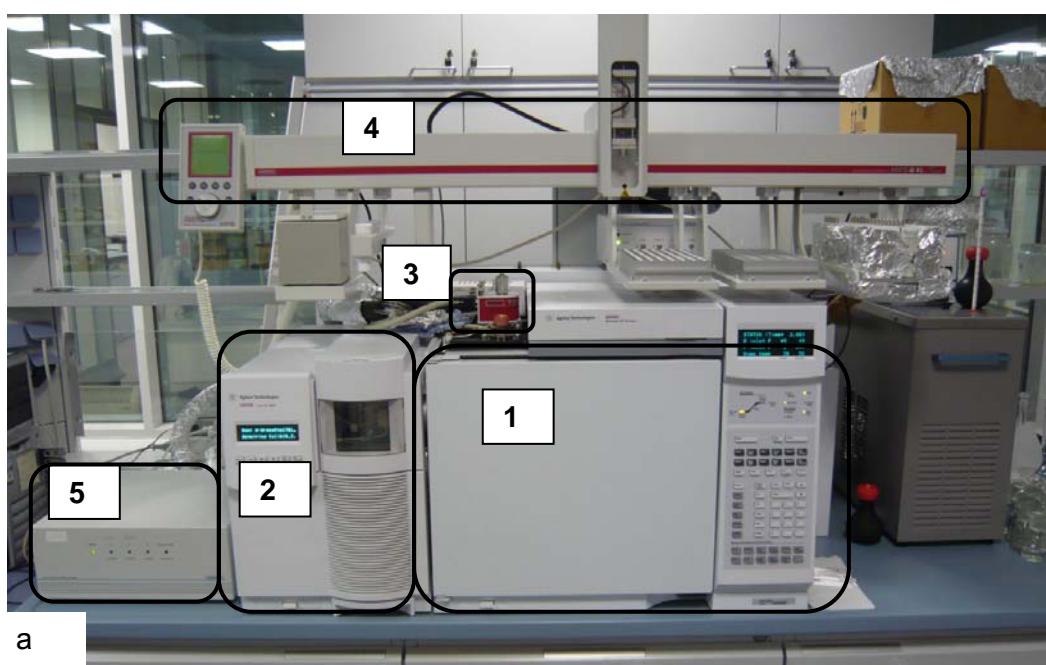


Abb. 25: Schematischer Ablauf der eigenen Untersuchungen

Tab. 13: Auflistung der einzelnen Bestandteile des SBSE-TD-GC-MS-Systems

#	Typ	Hersteller
1	6890N Network GC System	Agilent Technologies
2	5975B inert XL MSD (Massenspektrometer)	Agilent Technologies
3	TwisterDesorptionUnit TDU	Gerstel
4	MultiPurposeSampler MPS2 XL-Twister	Gerstel
5	Cryostatic Cooling Device	Gerstel
7	TubeConditioner TC 2	Gerstel
8	Rührplatte Poly 15 "Twister"	H+P Labortechnik AG

**Abb. 26:** a) GC-MS System mit MPS,
b) TubeConditioner TC 2,
c) Rührplatte Poly 15 "Twister"

6. Ergebnisse und Diskussion

6.1 Methodenentwicklung Stir Bar Sorptive Extraction-Thermo Desorption-GC-MS

In diesem Kapitel werden die Optimierung der Arbeitsschritte Probenvorbereitung, Thermodesorption-Gaschromatographie-Massenspektrometrie (TD-GC-MS), des internen Standards (IS) und der Lagerung der beladenen Twister für die Aromastoffe in den Matrices Apfel- und Orangensaft, sowie Matrix-Modelllösungen für die Apfeleromastoffe beschrieben.

6.1.1 „Apfelmethode“

6.1.1.1 Ausgangssituation

Es bestand zu Beginn dieser Arbeit bereits eine Methode zur Quantifizierung von Apfeleromastoffen. Diese sollte an dem, von der Faethe Labor GmbH zur Verfügung gestellten, SBSE-TD-GC-MS-System auf weitere aromarelevante Substanzen ausgeweitet werden. Des Weiteren sollte neben der Aromaanalytik von Apfel- und Orangensaften ein Projekt zur Bestimmung von Weichmachern und Antioxidantien in Getränken am gleichen Gerät durchgeführt werden. Dies erforderte eine Anpassung des Systems an beide Anforderungsprofile mit anschließender Methodenentwicklung und Validierung.

6.1.1.2 Probenvorbereitung

Reinigung

Um Verschleppungen zu vermeiden, ist es sehr wichtig den Twister nach jeder Analyse sorgfältig zu reinigen.

Die Optimierung wurde in zwei Schritten durchgeführt. Zunächst wurde ein Lösemittel gewählt, welches den Twister reinigt und bei darauf folgenden Analyse keine störenden Peaks im Chromatogramm zeigt.

Folgende Lösemittel wurden getestet:

- Methanol
- Dichlormethan
- Acetonitril
- Methanol:Dichlormethan 50:50 (v/v)
- Methanol:Acetonitril 50:50 (v/v)

Um den Reinigungseffekt zu untersuchen, wurden die Twister in einem 1 mg/L Multistandard für 45 min bei 1000 Upm gerührt und anschließend zur Analyse eingesetzt. Die Reinigungslösungen wurden in Schraubverschlussgläschchen vorgelegt, und jeweils drei Twister wurden für 24 h darin aufbewahrt. Nach Entnahme aus dem Lösemittel wurden die Twister im Desorber zunächst 0,5 Stunden unter Heliumfluss bei Raumtemperatur und anschließend 1 Stunde bei 300 °C desorbiert und unter Heliumfluss abgekühlt.

Nach der Behandlung mit Dichlormethan zeigte die Polymerphase des Twister eine starke Volumenzunahme und eine milchige Trübung, so dass eine Überführung in die Desorptionsglasröhrchen nicht möglich war. Nach fünf-minütiger Lagerung in Methanol war das Phasenvolumen ausreichend zurückgegangen. Bei einer Mischung aus Methanol und Dichlormethan erkannte man eine leichte Quellung und schwache weiße Trübung. Nach dem Einlegen in Methanol, Acetonitril und einer Methanol/Acetonitril-Mischung war dies nicht zu beobachten.

Danach wurden die Twister desorbiert um die Effektivität der Reinigungslösungen anhand von möglichen Analytrückständen zu überprüfen.

Sowohl nach der Reinigung mit Acetonitril als auch mit Dichlormethan sowie in der Mischung mit Methanol waren intensive Lösemittelpeaks im Chromatogramm zu sehen. Diese sind nach der Reinigung mit reinem Methanol nicht aufgetreten. Da alle Lösungsmittel ein ähnliches Reinigungsverhalten gezeigt haben, wurde für die weitere Arbeit Methanol verwendet, um mögliche Störungen durch Lösemittelpeaks mit anderen Substanzen im Chromatogramm zu vermeiden.

Im nächsten Schritt wurde getestet, welche Unterschiede sich bei der Reinigung ergaben, wenn die Twister in Methanol eingelegt werden oder kontinuierlich bei 1000 Upm gerührt werden. Die Behandlung durch 24-stündiges Rühren zeigte einen stärkeren Reinigungseffekt.

Fazit: Die Twister werden durch 24-stündiges Röhren in Methanol und anschließende Desorption für 0,5 Stunden bei Raumtemperatur und 1 Stunde bei 300 °C im Tube Conditioner TC2, gereinigt. Zum Abkühlen verbleiben die Twister im Heliumstrom.

Probenvolumen

Das Ziel der Probenvorbereitung war, möglichst effektiv und reproduzierbar die Analyten in der PDMS-Phase anzureichern. Neben der PDMS-Phasenmenge ist das Probenvolumen ein weiterer Faktor, welcher bei der Anreicherung betrachtet werden muss.

Die Probenvorbereitung wurde mit 10, 20, 30 und 40 mL eines Realstandards (Daten im Anhang, Kap. B) getestet. Nach 1-stündigem Röhren bei 1000 Upm wurden die extrahierten Analyten desorbiert und analysiert. In Abb. 27 sind die ermittelten Flächen der jeweiligen Analytpeaks gegen das eingesetzte Probenvolumen aufgetragen. Beim Einsatz von 40 mL Probe wurden die Aromen am effektivsten extrahiert. Es hat sich jedoch gezeigt, dass ein kontinuierliches Röhren des Twisters in 40 mL Orangensaft mit Fruchtfleisch nicht möglich war. Es zeigt sich außerdem eine Steigerung der Standardabweichung bei erhöhten Probenvolumina. Exemplarisch ist dies in Abb. 28 für Ethylbutyrat und Damascenon gezeigt.

Bei geringen Probenvolumina und gleicher Extraktionszeit, wurde eine geringere Standardabweichung zwischen den Messwerten ermittelt, da sich unter diesen Bedingungen das Extraktionsgleichgewicht schneller einstellt. Beim Ethylbutyrat vergrößert sich die Standardabweichung um 7,7% von 2,8 auf 10,5% bei Verdopplung des Volumens von 20 auf 40 mL, beim Damascenon um 2,3% von 3,1 auf 5,4%.

Fazit: Als Kompromiss zwischen Extraktionsausbeute und Reproduzierbarkeit der Messwerte wurde das eingesetzte Probenvolumen für die Analyse von Aromastoffen in Apfelsäften auf 20 mL festgelegt.

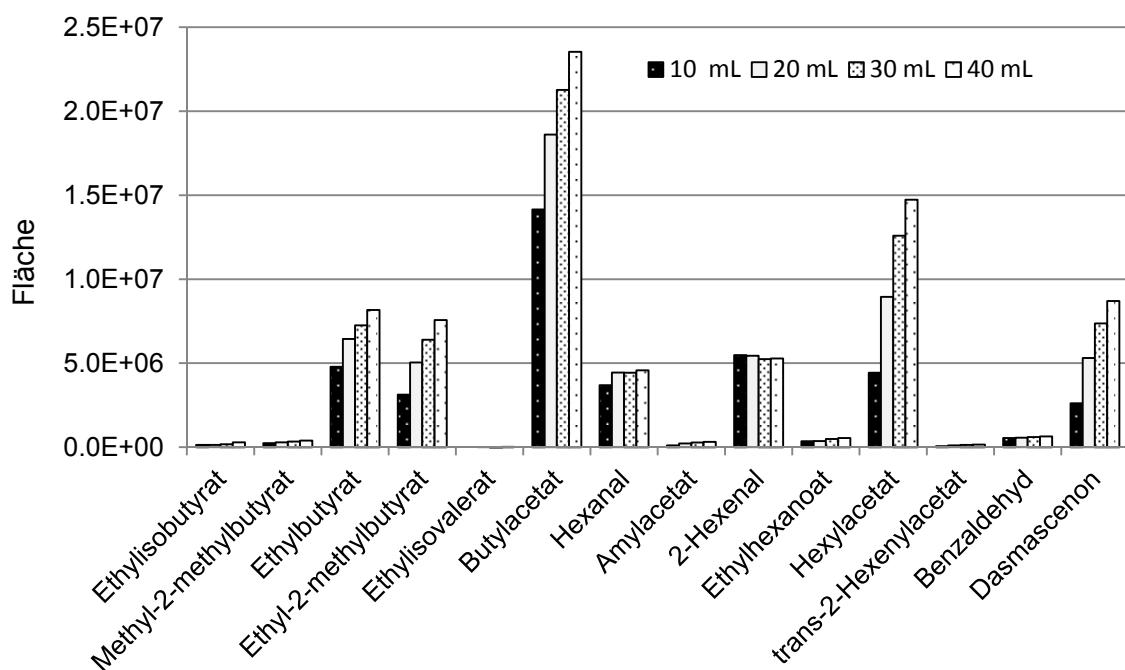


Abb. 27: Einfluss des Probenvolumens auf die Peakflächen eines Realstandards
(1h Rühren bei 1000 Upm)

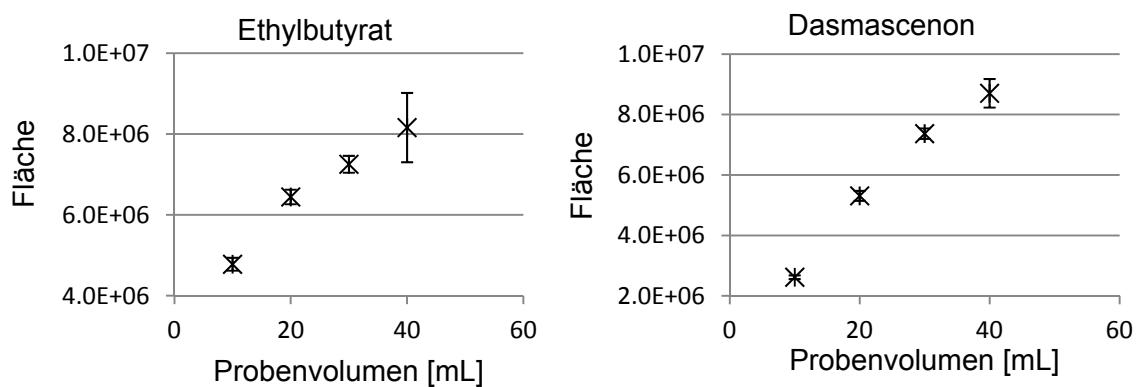


Abb. 28: Einfluss des Probenvolumens auf die Standardabweichung (N=3) eines 100 µg/L-Multistandards (1h Rühren bei 1000 Upm)

Extraktionszeit

Der Einfluss der Extraktionszeit auf die Anreicherung der Analyten auf dem Twister wurde anhand von vier Zeitintervallen getestet: 30, 60, 90 und 120 Minuten. Die Twister wurden mit 1000 Upm in 40 mL eines 100 µg/L Multistandards gerührt. In Abb. 29 sind die Peakflächen der Substanzen bei verschiedenen Extraktionszeiten abgebildet. Von 30 bis 90 Minuten Extraktionszeit steigen die Peakflächen bei allen Analyten an, bei einer Extraktionszeit von 120 Minuten stellt sich bei vielen Aromastoffen ein Maximum ein.

Fazit: Eine Extraktionszeit von 120 Minuten wurde für die weiteren Probenaufarbeitungen als optimal angesehen.

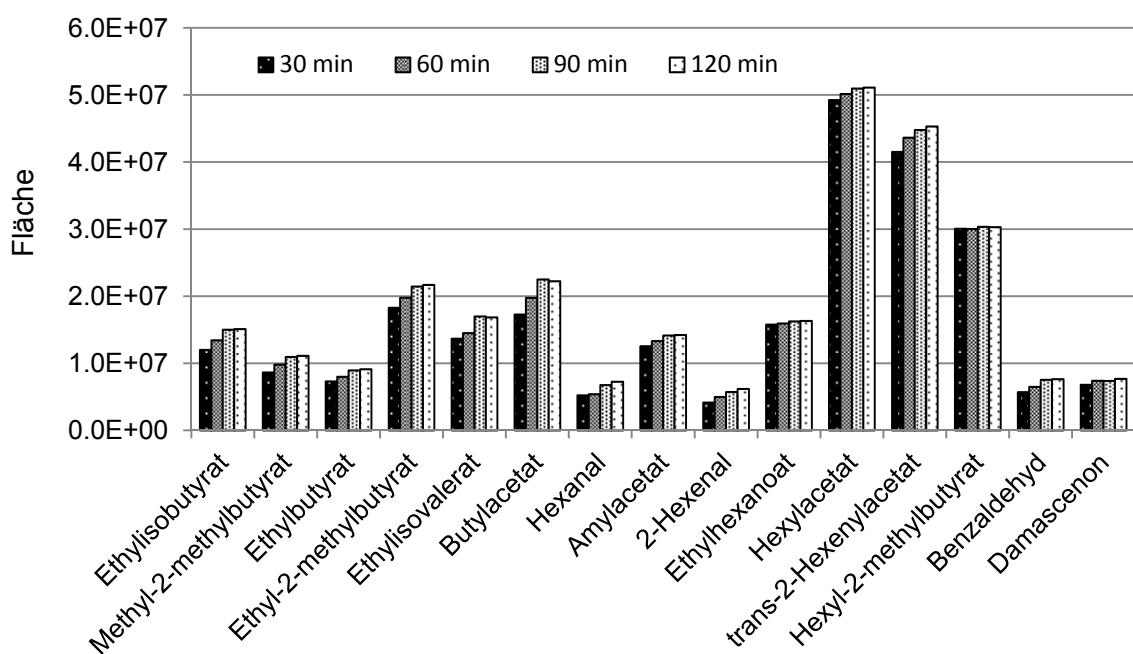


Abb. 29: Einfluss der Extraktionszeit auf die Peakflächen der Aromen eines 100 µg/L Standards (N=3), Probenvolumen 40 mL

6.1.1.3 TD-GC-MS

Thermodesorption und Kryofokussierung

In der pneumatisch gasdicht verschlossenen Thermodesorptionseinheit (TDU) werden die Analyten desorbiert und im Kaltaufgabesystem (KAS) kryofokussiert. Die Pneumatik wird über Stickstoff betrieben und als Trägergas wird Helium eingesetzt. Die Desorptionstemperatur darf max. 300 °C betragen, um die Twister nicht zu beschädigen. Nach der Desorption der Analyten vom Twister werden sie direkt auf Tenax TA kryofokussiert. Die minimale Betriebstemperatur des Kaltaufgabesystems beträgt -40 °C.

Die Thermodesorptionseinheit beginnt mit einer Starttemperatur von 20 °C und heizt mit 720 °C/min auf 290 °C auf. Diese Temperatur wird zur vollständigen Ausheizung der Analyten 6 min gehalten.

Desorptionsparameter der Thermodesorptionseinheit

Starttemperatur [°C]	Heizrate [°C/s]	Endtemperatur [°C]	Halten [min]
20	720	290	6

Die Analyten werden bei -35 °C kryofokussiert. Mit einer Heizrate von 10 °C/s werden die Analyten vom Tenax TA desorbiert und auf die Säule gebracht. Anschließend wird das Sorbens 5 min bei 300 °C zur Reinigung ausgeheizt.

Parameter des Kaltaufgabesystems

Starttemperatur [°C]	Heizrate [°C/s]	Endtemperatur [°C]	Halten [min]
-35	10	300	5

Auswahl der GC-Säule

Um zeitgleich die Anforderungen der Aromaanalytik, wie auch der Phthalat-Analytik die in einem Begleitprojekt durchgeführt wurde, an einem GC-MS-System zu erfüllen, musste bei der Auswahl der GC-Säule das breite Spektrum an physikalischen und chemischen Eigenschaften der Analyten beachtet werden. Die Phthalate sind hochsiedende und unpolare Analyten, für die eine DB-5 Säule geeignet ist^{166,167,168}. Die Aromastoffe bilden eine polarere und niedrigsiedendere Stoffgruppe im Vergleich zu den Phthalaten, welche häufig auf einer WAX-Säule getrennt werden^{62,108,169,170,171}.

Die zu Beginn der Phthalat-Analytik eingebaute TR-Wax-Säule zeigte aufgrund der hohen Betriebstemperaturen bei den höhersiedenden Phthalaten einen Abbau der stationären Phase der sich in einer starken Verschiebung der Retentionszeiten bemerkbar machte. Daraufhin wurde nach einer Alternative zur TR-Wax-Säule gesucht. In der Literatur^{62,63} werden bei der Aromaanalytik auch DB-5 Säulen verwendet, dort wurden jedoch weniger Substanzen in einem chromatographischen Lauf analysiert.

Der Vorteil der DB-5-Säulen liegt in der Stabilität der Phase, welche einen dauerhaften Betrieb bei höheren Temperaturen erlaubt, ein geringeres Säulenbluten zeigt und dadurch ein geringeres Rauschen. Bei einem breiten Spektrum an Analyten, wie es in dieser Arbeit geplant war, war es nicht möglich, mit der DB-5-Säule eine zufriedenstellende Trennung zu erreichen. Mit der Rtx-1701 Säule (30 m x 0,25 mm x 0,5 µm) wurde eine Säule ausgewählt, welche für die Aroma- und die Phthalat-Analytik geeignet ist. Die Trennung ist bei der Detektion im SIM-Modus ausreichend für die Aromen und bei dauerhaftem Betrieb von 270 °C ausreichend stabil zur Trennung der Phthalate.

Die stationäre Phase besteht aus 14%-Cyanopropylphenyl/ 86%-Dimethylpolysiloxan (Abb. 30). Da bei Verwendung der TDU ein Sauerstoffeintrag in das GC-System nicht vermeidbar ist, eignet sich diese Säule besser, da sie unempfindlicher ist, als die Polyethylen glycol-Phase der Wax-Säule.

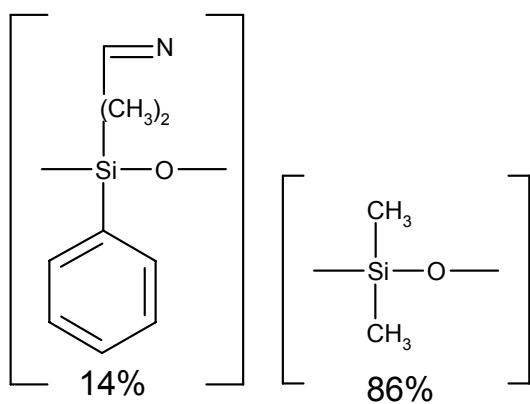


Abb. 30: Struktur der Cyanopropylphenyl- und Dimethylpolysiloxangruppen der statio-nären Phase der Rtx-1701-Säule

GC-Ofen Temperaturprogramm

Nach Auswahl der analytischen Säule wurde ein entsprechendes Temperaturprogramm entwickelt, welches die Analyten möglichst zur Basislinie trennt, aber dennoch keine lange Laufzeit benötigt. Des Weiteren müssen die maximale Heizrate der Säule und die maximale Betriebstemperatur beachtet werden. Zusätzlich sollte die Starttemperatur auch bei erhöhten Raumtemperaturen möglichst schnell zu erreichen sein. Folgendes Temperaturprogramm (siehe Tab. 14) wurde für die Trennung der Apfeleromastoffe auf der Rtx-1701-Säule entwickelt:

Tab. 14: Temperaturprogramm zur gaschromatographischen Trennung von Apfeleromastoffen mit einer Rtx-1701 Säule

Starttemperatur [°C]	Haltezeit [min]	Heizrate [°C/min]	Haltetemperatur [°C]	Halten [min]
38 °C	35 min	10	130	0
-	-	20	270	10

Quantifizierung und Qualifizierung

Die Identifizierung und Quantifizierung der Substanzen erfolgte mit einem Quadrupol-Massenspektrometer der Firma Agilent. Das Chromatogramm wurde im TIC (Total-Ion-Current)- und im SIM (Selected-Ion-Monitoring)-Modus aufgezeichnet. Nach Auswahl der Quantifizierungs- und Qualifizierungs-Ionen wurden die Scanevents entsprechend der erwarteten Analyten erstellt und eine Lösemittelausblendung bis zur 8. Minute programmiert. Für den SIM-Modus werden pro Substanz je ein Quantifizierungs (Quant)-Ion und zwei bzw. drei Qualifizierungs (Qual)-Ionen aufgenommen.

Tab. 15: Quantifizierungs- und Qualifizierungssionen

	Quant-Ion	Qual-Ion 1	Qual-Ion 2	Qual-Ion 3
Ethylisobutyrat	71	43	116	88
Methyl-2-methylbutyrat	57	88	41	101
Ethylbutyrat	71	43	88	101
Butylacetat	71	73	55	-
Hexanal	82	72	57	-
Ethyl-2-methylbutyrat	57	102	85	115
Ethylisovalerat	88	85	57	130
3-Methylbutylacetat	43	70	55	87
2-Methylbutylacetat	43	70	55	73
<i>trans</i> -2-Hexenal	55	98	69	83
Amylacetat	43	70	55	61
Methylhexanoat	74	87	43	99
Ethylhexanoat	88	99	101	144
Benzaldehyd	106	105	77	51
Hexylacetat	43	56	84	61
<i>trans</i> -2-Hexenylacetat	43	67	82	100
Hexyl-2-methylbutyrat	57	41	103	85
Damascenon	69	121	190	-

6.1.1.4 Interner Standard und Lagerung

Der interne Standard (IS) wird als qualitätssicherndes Mittel eingesetzt, um die Reproduzierbarkeit zu erhöhen. Als IS für die Analyse der Apfeleromene wurde Isobutylisobutyrat eingesetzt (Abb. 31). Diese Substanz zeigt eine gute strukturelle Übereinstimmung mit vielen zu quantifizierbaren Aromen, liegt im mittleren Bereich der log K_{OW} -Werte und der Siedepunkte und eluiert im mittleren Retentionszeitensbereich.

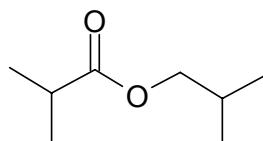


Abb. 31: Struktur des internen Standards für die Apfeleromenanalyse: Isobutylisobutyrat

Nach der Extraktion der Analyten werden die Twister bis zur Analyse im Tray gelagert. Dieser ist über einen Umlaufkühler auf circa 15-16 °C gekühlt, um schwankende Umgebungstemperaturen auszugleichen und um die Desorption der Analyten vom Twister vor der Analyse zu minimieren.

Der Einsatz eines internen Standards ist besonders bei der Analyse von Aromastoffen wichtig, da es sich um flüchtige Substanzen handelt, welche leicht desorbieren und so nach kurzer Zeit ein Verlust an Analyten eintritt.

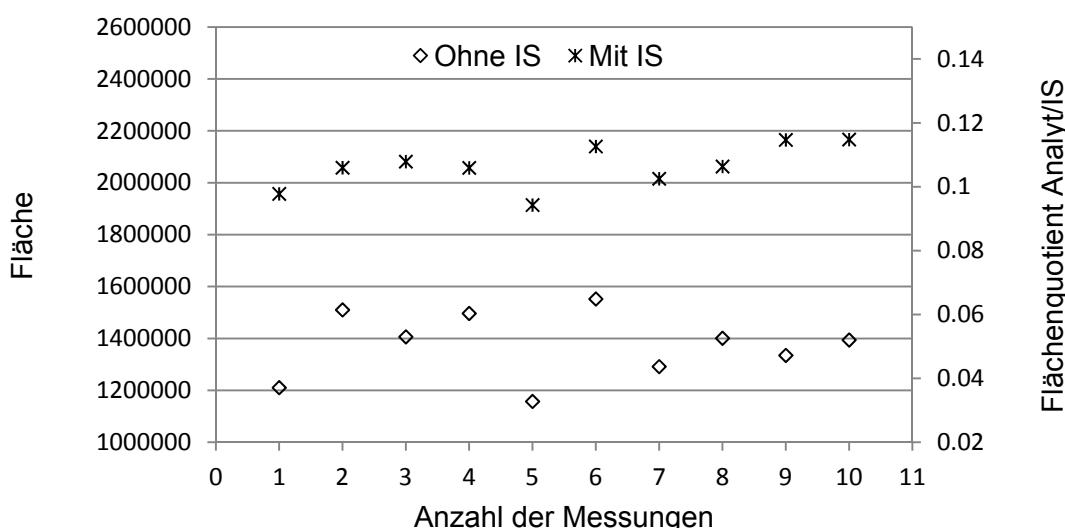


Abb. 32: Einfluss des internen Standards auf die Standardabweichung innerhalb einer Messreihe ($N=10$) eines 100 µg/L Multistandards in Apfelsaftmatrix

Da bei längeren Messsequenzen oder nach unerwarteten Messunterbrechungen die vorbereiteten Twister länger im Tray verbleiben, ist es wichtig, mögliche Konzentrationsänderungen des Analyten auf dem Twister anhand des internen Standards zu erkennen und auszugleichen. Die Analyse von beladenen Twistern direkt nach der Beladung (null) und nach bis zu fünf Tagen Lagerung im Tray zeigt die Abnahme der Konzentration der Analyten mit steigender Lagerungsdauer. Hierzu wurden 12 Twister mit einer 100 µg/L-Multistandard-Lösung beladen und pro Tag jeweils 3 Twister analysiert und der Mittelwert gebildet.

Beim Analyten Ethylbutyrat hat sich innerhalb eines Tages, bei Lagerung im Tray, die quantifizierte Fläche um 9,5% verringert (Abb. 33). Bei Einberechnung des IS beträgt diese Verringerung nur 2,1%. Der beladene Twister sollte jedoch in der Routine immer nur so kurz wie nötig gelagert werden.

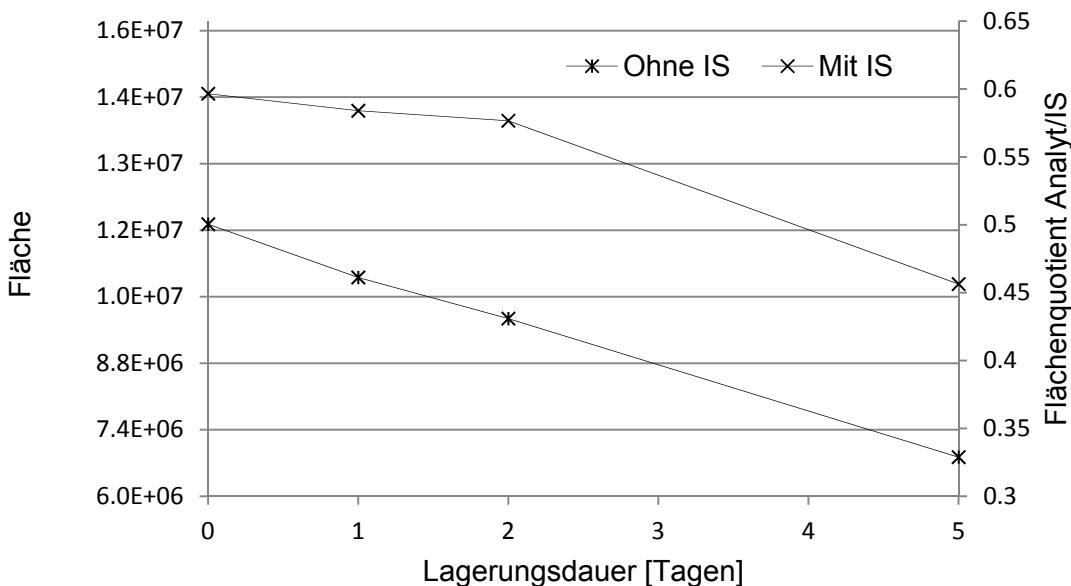


Abb. 33: Abnahme der Flächen von Ethylisobutyrate während der Lagerung eines Twisters über 5 Tage mit und ohne Berücksichtigung des internen Standards

6.1.1.5 Matrixinterferenzen und Modelllösungen

Apfelsaft besteht zum großen Teil, wie in Tab. 1 gezeigt, aus verschiedenen Mineralstoffen, Vitaminen, Zuckern und Säuren. Beim Vergleich der Kalibrationsgeraden eines Multistandards in Wasser und in rückverdünntem Apfelsaftkonzentrat (ASK) zeigten sich beim Standard im ASK verringerte Signalintensitäten. Diese Verringerung, welche bei allen untersuchten Analyten auftrat, führt zu Kalibriergeraden mit verringelter Steigung und ist in Abb. 34 exemplarisch für Ethylisobutyrat gezeigt.

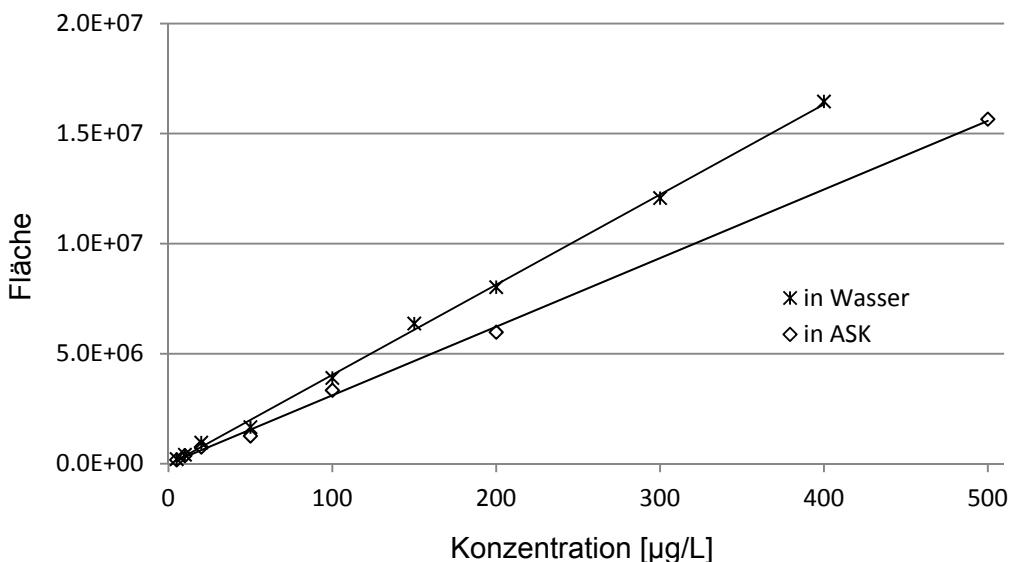


Abb. 34: Kalibriergeraden von Ethylisobutyrat in Wasser und rückverdünntem Apfelsaftkonzentrat

Um den Einfluss einiger Matrix-Bestandteile auf die Signalintensität zu ermitteln, wurden Modelllösungen mit ausgesuchten Matrixbestandteilen angefertigt. Dazu wurden Konzentrationsreihen mit 10, 40, 160 und 200 µg/L eines Multistandards in Wasser, in rückverdünntem ASK, in einer Wasser/Zucker-, Wasser/Zucker/Säure- und Wasser/Zucker/Säure/Mineralstoff-Lösung angesetzt (siehe Tab. 16) und mit dem SBSE-GC-MS-System aufgearbeitet und analysiert. Die Lösungen beinhalten die Matrixbestandteile in folgenden Konzentrationen:

Zucker:

- 25 g/L Glucose
- 80 g/L Fructose
- 15 g/L Saccharose

Säuren:

- 0,2 g/L Citronensäure
- 6,0 g/L Äpfelsäure

Mineralstoffe:

- 1000 mg/L Kalium
- 80 mg/L Calcium
- 20 mg/L Natrium
- 50 mg/L Magnesium

Tab. 16: Zusammensetzung der Modelllösungen zum Testen des Einflusses einzelner Apfelsaftmatrix-Bestandteile

	Multistandard	ASK	Zucker	Säuren	Mineralstoffe
Lösung 1	X				
Lösung 2	X	X			
Lösung 3	X		X		
Lösung 4	X		X	X	
Lösung 5	X		X	X	X

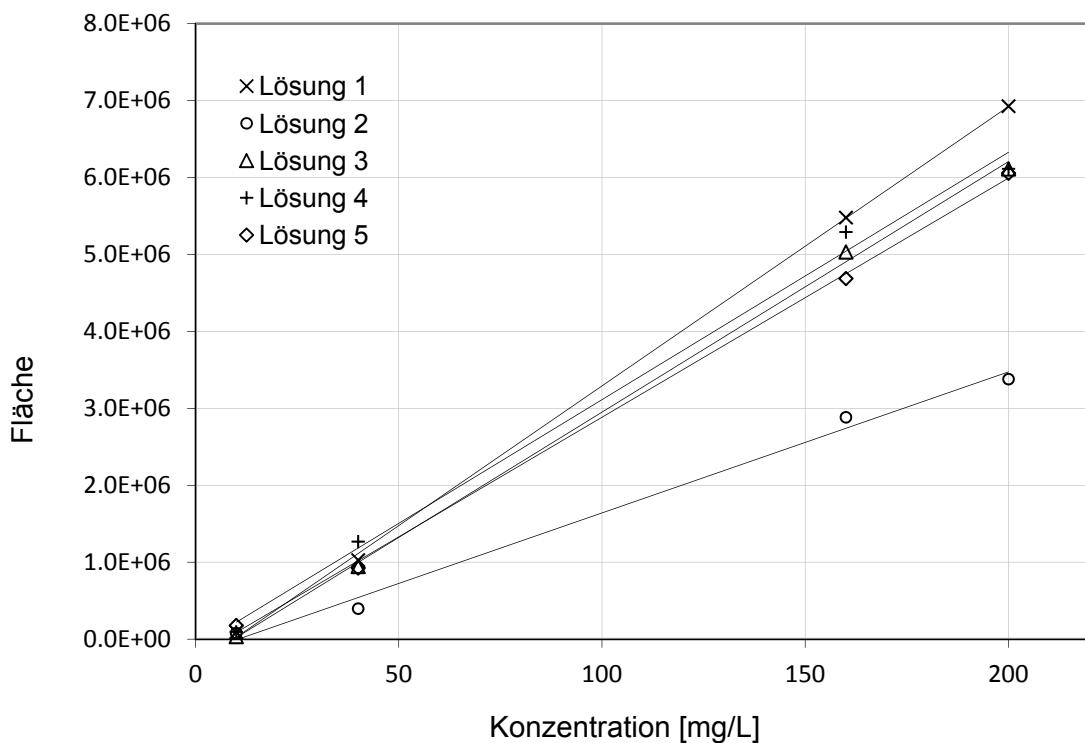
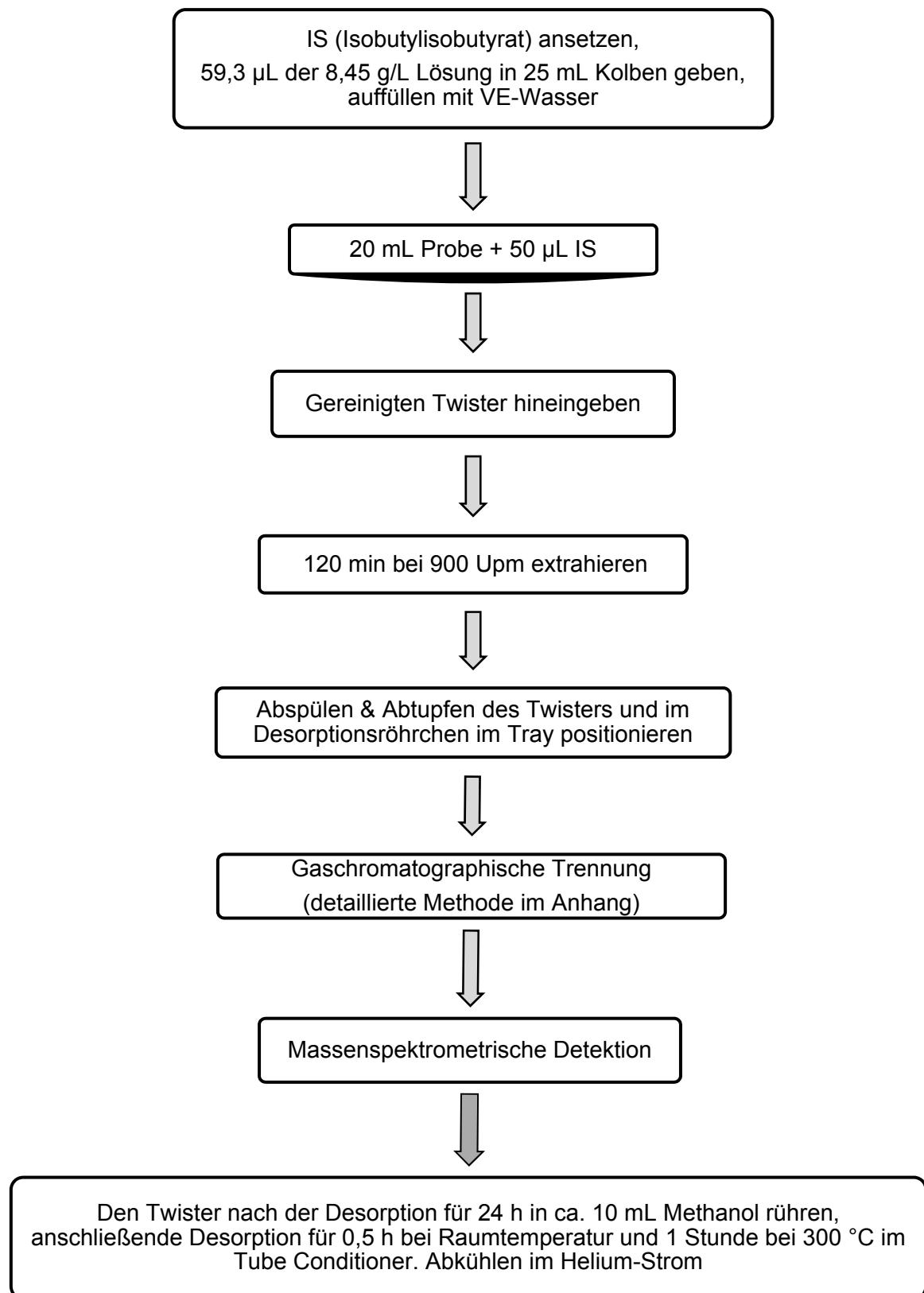


Abb. 35: Kalibriergeraden der Modelllösungen 1 bis 5 (s. Tab. 16) am Beispiel des Hexyl-2-methylbutyrats zur Ermittlung des Matrix-Einflusses

Bei keiner der verwendeten Modell-Lösungen ließ sich die zuvor beobachtete Signalsuppression, welche beim Standard in rückverdünntem Apfelsaft-Konzentrat auftrat, erkennen. Da keine Matrix nachgebildet werden konnte, die eine vergleichbare Signalverringerung hervorruft, wurde zur Kalibration und zum Ansetzen der Restaurationsaromen für die Analyse weiterhin Apfelsaftkonzentrat verwendet.

6.1.1.6 Zusammenfassung der „Apfelmethode“

Nach der Optimierung der einzelnen Arbeitsschritte ist folgende schematisch dargestellte Arbeitsvorschrift für die Aufarbeitung und Analyse der Apfeleromastoffe anzuwenden:



Ergebnisse und Diskussion

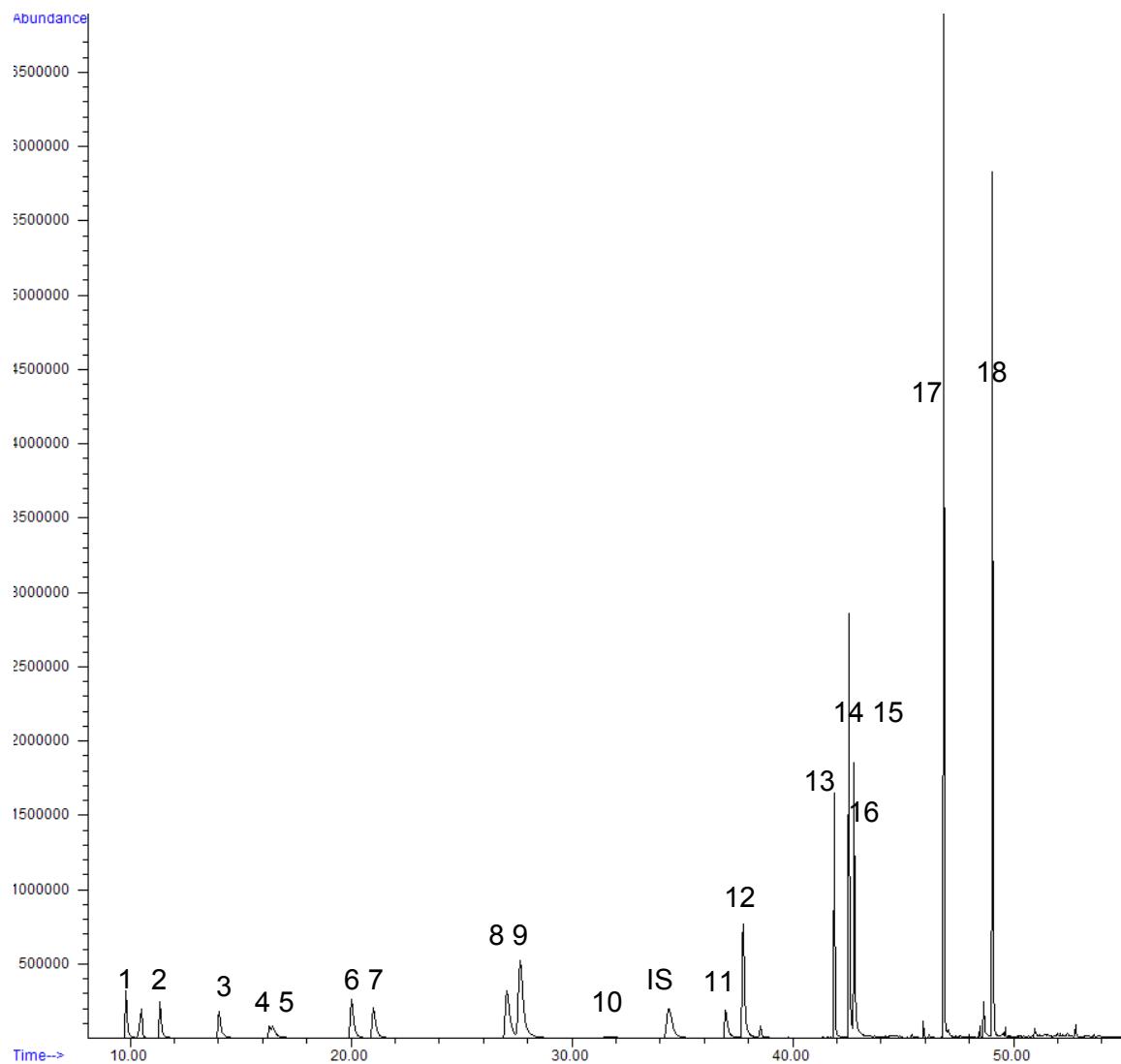


Abb. 36: SIM-Chromatogramm eines Apfelsaftes mit den angegebenen SBSE-TD-GC-MS-Bedingungen aus Kap. 6.1.1.5,

- | | |
|--------------------------|----------------------------------|
| 1 Ethylisobutyrat | 10 <i>trans</i> -2-Hexenal |
| 2 Methyl-2-methylbutyrat | 11 Amylacetat |
| 3 Ethylbutyrat | 12 Methylhexanoat |
| 4 Butylacetat | 13 Ethylhexanoat |
| 5 Hexanal | 14 Benzaldehyd |
| 6 Ethyl-2-methylbutyrat | 15 Hexylacetat |
| 7 Ethylisovalerat | 16 <i>trans</i> -2-Hexenylacetat |
| 8 3-Methylbutylacetat | 17 Hexyl-2-methylbutyrat |
| 9 2-Methylbutylacetat | 18 Damascenon |

6.1.2 „Orangenmethode“

Zur Kontrolle der in der Produktion eingesetzten Entgaser sollte der Gehalt an Ethylbutyrat im Orangensaft im Routinebetrieb ermittelt werden. Auf Basis der bereits vorliegenden Analysenmethode zur Quantifizierung von Aromastoffen in Apfelsaft wurde die Methode zur Quantifizierung von Ethylbutyrat in Orangensaft entwickelt.

6.1.2.1 Probenvorbereitung

Bei der Analyse von unverdünntem Orangensaft trat Tailing beim Ethylbutyrat auf (s. Abb. 37, A), welches durch das im Orangensaft vorhandene Limonen (s. Abb. 37, Komponente B) verursacht wird.

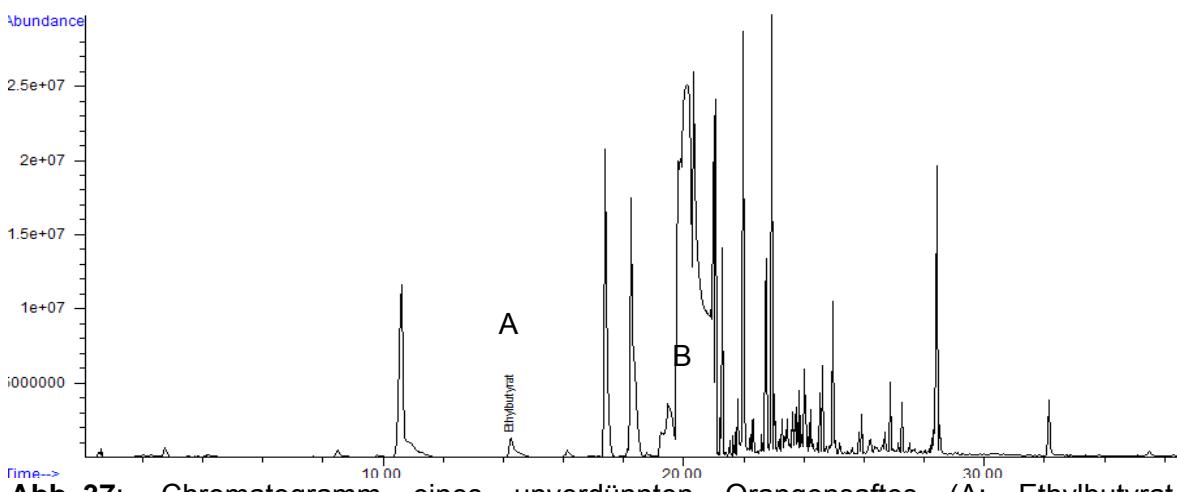


Abb. 37: Chromatogramm eines unverdünnten Orangensaftes (A: Ethylbutyrat, B: Limonen)

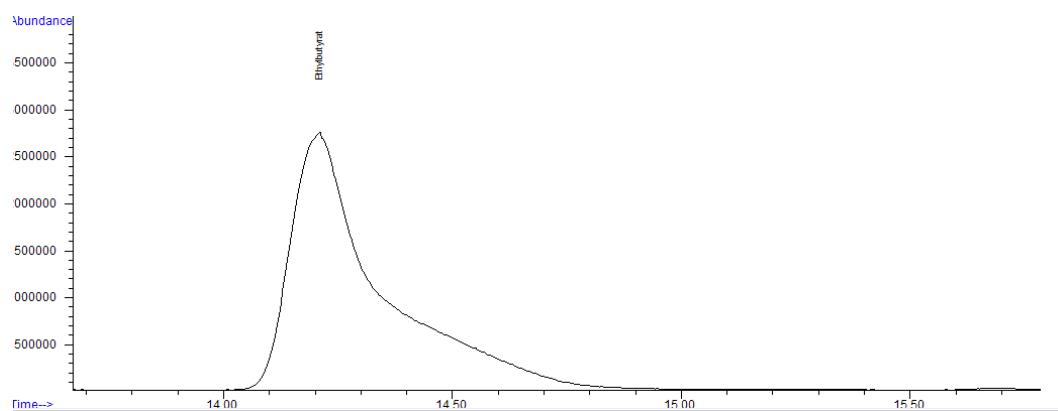


Abb. 38: Vergrößerte Ansicht von Peak A aus Abb. 37

Ergebnisse und Diskussion

Dieser Effekt wurde bei Multivitaminsäften nicht beobachtet. Bei der Analyse von Nektaren, die einen Fruchtgehalt von 50% haben, war das Tailing geringer ausgeprägt. Im nächsten Schritt wurde getestet, ob durch einen geringeren Orangensaftanteil in der Probe, wie es bei Multivitaminsäften und Nektaren der Fall ist, das Tailing verringert werden kann.

Der Orangensaft wurde hierzu in einer Verdünnung mit dem Faktor 6 (5 mL Probe + 25 mL dest. Wasser) eingesetzt. Abb. 39 zeigt das entsprechende Chromatogramm.

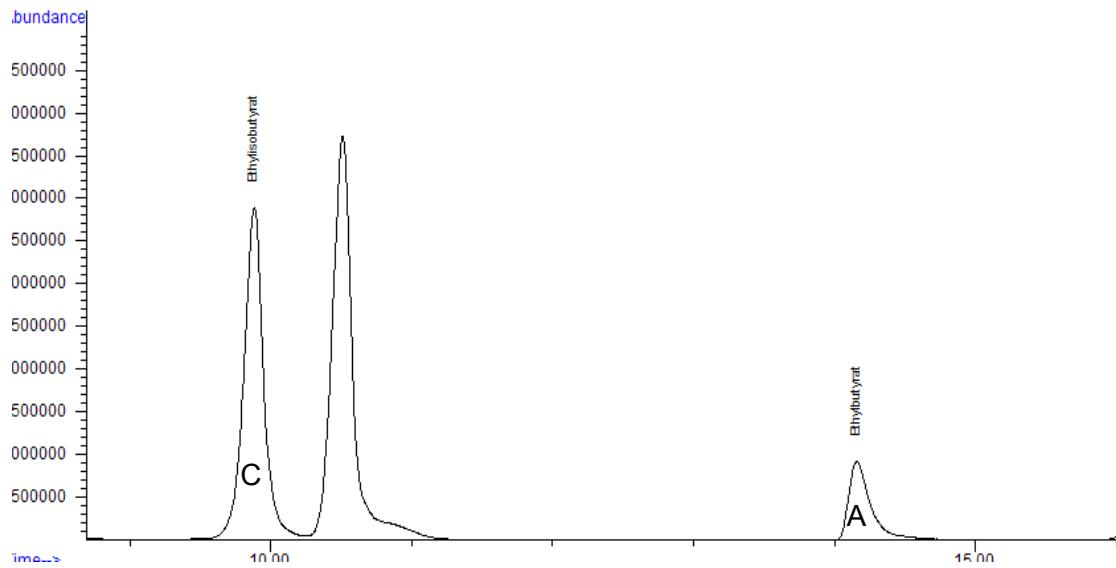


Abb. 39: Chromatogramm eines 1:5 (v/v) verdünnten Orangensaftes (A Ethylbutyrat, C Ethylisobutyrat)

TD-GC-MS

Die Parameter zur Thermodesorption und zur Kryofokussierung wurden aus den bereits optimierten Einstellungen der Apfeleromen-Methode übernommen. Ebenso die Quantifizierungs- und Qualifizierungs-Ionen für Ethylbutyrat:

Quant-Ion	Qual-Ion 1	Qual-Ion 2	Qual-Ion 3
71	43	88	101

6.1.2.2 Interner Standard und Lagerung der beladenen Twister

Bei der Quantifizierung von Ethylbutyrat wurde, wie auch bei der Apfelaromaanalyse, ein interner Standard als qualitätssicherndes Mittel eingesetzt. Ethylisobutyryat (Abb. 40) zeigt eine gute strukturelle Übereinstimmung mit dem zu quantifizierbaren Ethylbutyrat, einen ähnlichen $\log K_{OW}$ -Wert und Siedepunkt. Der IS eluiert früher als das Ethylbutyrat und wird weniger stark vom Limonen beeinflusst.

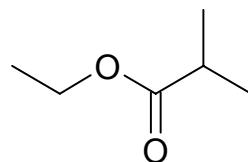


Abb. 40: Struktur des internen Standards Ethylisobutyryat für die Analyse von Ethylbutyrat in Orangensaften

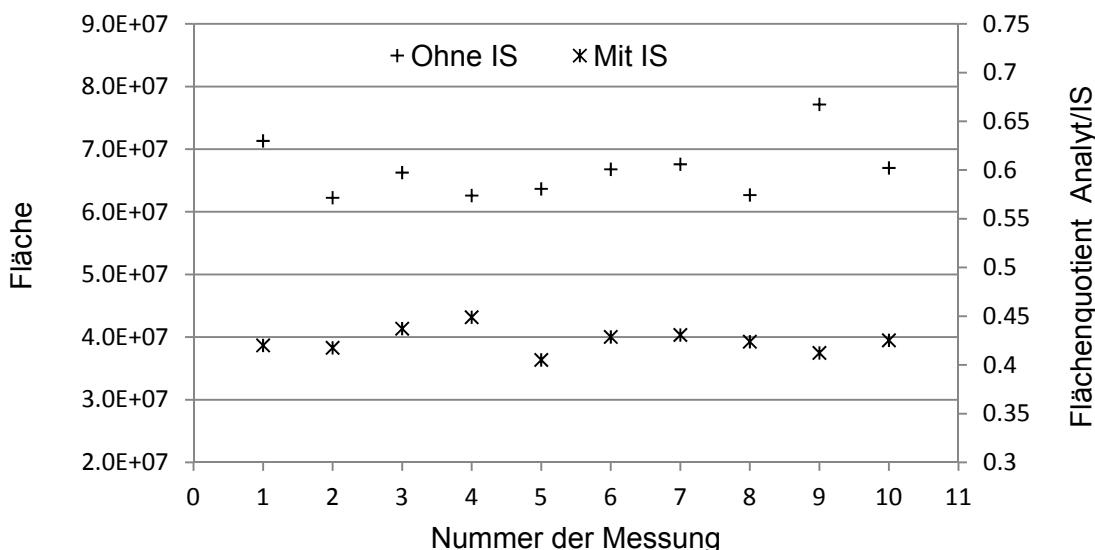


Abb. 41: Einfluss des internen Standards auf die Standardabweichung innerhalb einer Messreihe ($N=10$) eines 100 µg/L Ethylbutyratstandards in Orangensaftmatrix

Die Verwendung des internen Standards innerhalb einer Messreihe eines 100 µg/L-Ethylbutyratstandards in rückverdünntem Orangensaftkonzentrat zeigt einen deutlichen Einfluss auf die Standardabweichung der Messwerte (siehe Abb. 41). Die relative Standardabweichung konnte von 6,9 auf 2,9% reduziert werden, wie die Berechnung des Quotienten aus Fläche des Analyten und der Fläche des internen Standards zeigt.

Lagerung des beladenen Twisters

Bei der Lagerung des beladenen Twisters können die flüchtigen Aromastoffe aus der PDMS-Phase in die Gasphase diffundieren und sind demnach nicht mehr nachweisbar. Geringer Verlust an Analyten kann durch die Quantifizierung mit dem internen Standard rechnerisch ausgeglichen werden, da auch die Menge des IS mit der Lagerungsdauer abnimmt.

Die Abnahme der Peakflächen und des Flächenquotienten ist in Abb. 42 graphisch dargestellt. Die Abnahme der Konzentration des Ethylbutyrats nach einem Tag Lagerung beträgt 15%. Bei Einsatz des internen Standards beträgt der Verlust nur noch 9%. Der beladene Twister sollte jedoch in der Routine immer nur so kurz wie nötig gelagert werden.

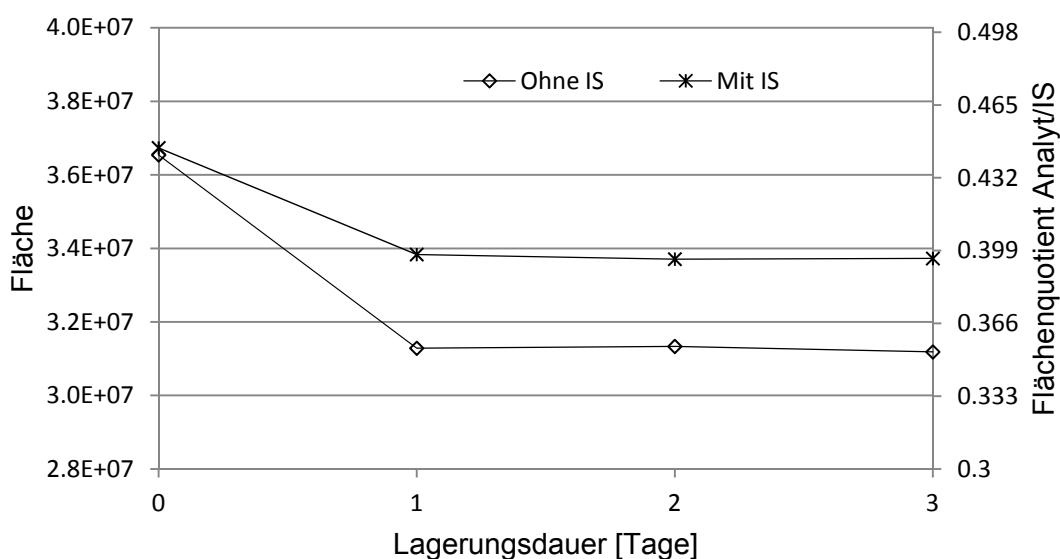
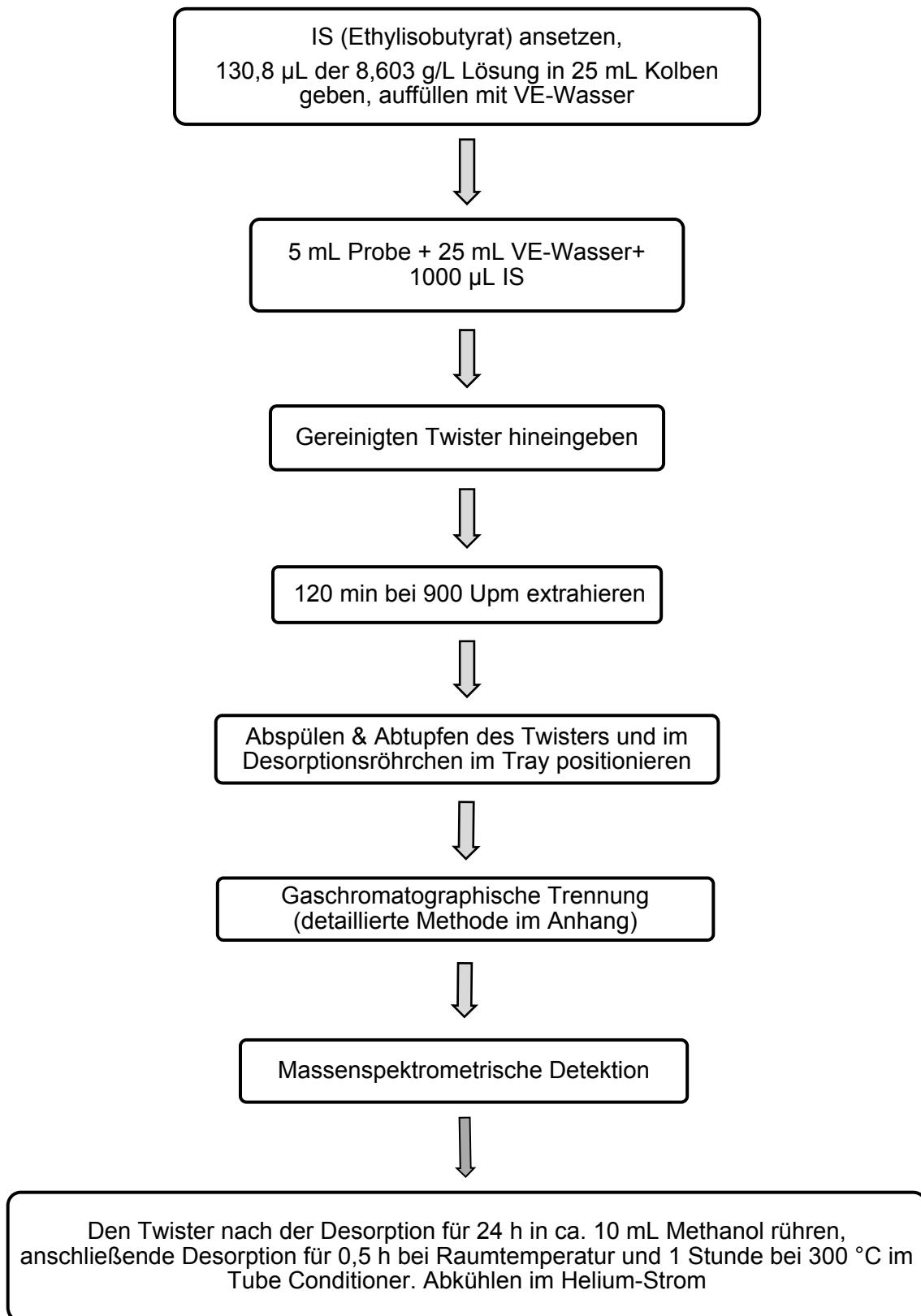


Abb. 42: Vergleich der Abnahme der Peakflächen während der Lagerung der beladenen Twister mit und ohne Korrektur durch den internen Standard über drei Tage

6.1.2.3 Zusammenfassung der „Orangenmethode“

Nach der Optimierung der einzelnen Arbeitsschritte ist folgende schematisch dargestellte Arbeitsvorschrift für die Aufarbeitung und Analyse der Orangensaftes anzuwenden:



6.2 Validierung

Die Validierung ist gemäß ISO/IEC 17025 „die Bestätigung durch Untersuchung und Bereitstellung eines Nachweises, dass die besonderen Anforderungen für einen speziellen beabsichtigten Gebrauch erfüllt werden. Die Validierung muss in dem Umfang durchgeführt werden, der zur Erfüllung der Erfordernisse der beabsichtigten Anwendung oder des betreffenden Anwendungsgebiets notwendig ist“. Die ISO/IEC 17025 kann als wichtiger Bezugspunkt für Analytische Prüflaboratorien angesehen werden, da diese aus dem ISO Guide 25 und der EN 45001 als neue internationale Norm geschaffen wurde. Sie ist 1999 in Kraft getreten und definiert die allgemeinen Anforderungen an die Kompetenz von Prüf- und Kalibrierlaboratorien.

Die Validierung der SBSE-TD-GC-MS-Methode wurde anhand folgender Richtlinien, Normen und Fachliteratur durchgeführt:

- DIN ISO/IEC 17025¹⁷²
- S. Kromidas; *Handbuch der Validierung in der Analytik*¹⁷³
- DIN 38402-51¹⁷⁴
- W. Funk, V. Dammann, G. Donnevert; *Qualitätssicherung in der Analytischen Chemie*¹⁷⁵
- DIN 32645¹⁷⁶
- G. Wächter, J. Kleiner; *Forderung nach Varianzhomogenität- ein Ärgernis?*¹⁷⁷
- DIN ISO 11843-2¹⁷⁸
- DIN ISO 11843-1¹⁷⁹
- J. N. Miller, J. C. Miller; *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*¹⁸⁰
- Entscheidung der Kommission (2002/657/EG) vom 12.August 2002 zur Umsetzung der Richtlinie 96/23/EG betreffend die Durchführung von Analysemethoden und die Auswertung von Ergebnissen¹⁸¹

Für die Bestimmung von Aromastoffen in den Matrices Apfelsaft und Orangensaft wurden die folgenden Parameter im Rahmen dieser Validierung ermittelt und beurteilt, bevor die entwickelte Methode für die Routineanalytik einsatzfähig war.

- Arbeitsbereich
- Linearität
- Varianzhomogenität
- Erkennungs-, Bestimmungs- und Erfassungsgrenze und Erfassungsvermögen
- Verfahrenskenndaten
- Präzision
- Richtigkeit
- Spezifität, Selektivität

Die Validierung wird am Beispiel des Analyten Ethylisobutyrat in Apfelsaft gezeigt. Die Daten der aufgelisteten Analyten in Apfelsaft sowie Ethylbutyrat in Orangensaft sind im Anhang (Kap. G) aufgeführt. Ebenso die Berechnungsformeln, anhand derer die Validierungsdaten ermittelt wurden.

Methyl-2-methylbutyrat	Ethylbutyrat	Butylacetat
Hexanal	Ethyl-2-methylbutyrat	Ethylisovalerat
3-Methylbutylacetat	2-Methylbutylacetat	<i>trans</i> -2-Hexenal
Amylacetat	Methylhexanoat	Ethylhexanoat
Benzaldehyd	Hexylacetat	<i>trans</i> -2-Hexenylacetat
Hexyl-2-methylbutyrat	Damascenon	

6.2.1 Ausreißer-Tests

Bevor die Messwerte zur Ermittlung der Validierungsparameter eingesetzt wurden, mussten diese auf Ausreißer geprüft werden.

Bei Mehrfachmessung einer Probe oder einer Lösung einer bestimmten Konzentration schwanken die Messwerte unterschiedlich stark. Durch einen Ausreißertest lässt sich herauszufinden, ob die Schwankung rein zufällig ist oder ob ein echter Ausreißer vorliegt. Im Fall eines Ausreißers muss der Wert gestrichen werden und durch einen oder mehrere neue Messwerte ersetzt werden. Dazu, wie bei Streichung vorzugehen ist, liegt jedoch keine einheitliche Meinung vor.

Zu den bekanntesten Tests gehören der Dixon- und der Grubbs-Test. Für den Dixon-Test werden nur der ausreißerverdächtige Wert, der Nachbarwert und der größte bzw. kleinste Wert der Serie benötigt. Er wurde zur Ausreißerbestimmung der Messwerte der einzelnen Kalibrationsstufen angewendet. Hier wurden jeweils dreifach Bestimmungen durchgeführt. Der Grubbs-Test berücksichtigt alle Werte und eignet sich für Messreihen mit mehr als

6 Werten. Dieser Test wird für die Messwerte der oberen und unteren Arbeitsgrenze angewendet. Hier wurden jeweils zehnfach Messungen durchgeführt. Bei einem Ausreißer wurde dieser Messwert aus dem Datenkollektiv entfernt und durch einen neuen ersetzt und erneut überprüft. Die weiteren Validierungsschritte wurden mit ausreißerfreien Messreihen durchgeführt. Ausführliche Berechnungen sind im Anhang in Kap. G.1 aufgeführt.

6.2.2 Normalverteilung

Um aus den gewonnenen Messdaten anhand statistischer Methoden Kenndaten zu ermitteln, muss von einer repräsentativen Probe ausgegangen werden. Zur Anwendung von Berechnungen, die eine Zuordnung der Wahrscheinlichkeit zur Standardabweichung beinhalten, müssen die Werte auf Normalverteilung überprüft werden. Für Messreihen von 3 bzw. 10 Messwerten eignet sich der Schnelltest auf Normalverteilung nach David.

Nach der Prüfung stand fest, dass die Messreihen normalverteilt sind und zur weiteren Validierung genutzt werden konnten. Ausführliche Berechnungen sind im Anhang in Kap. G.2 aufgeführt.

6.2.3 Arbeitsbereich

Der Arbeitsbereich wird nach folgenden Kriterien festgelegt:

- Der Arbeitsbereich sollte den Konzentrationsbereich umfassen, welcher für den jeweiligen Analyten in einer Probe (einem durchschnittlichen Saft) zu erwarten ist (praxisbezogenes Anwendungsziel).
- Gesetzlich festgelegte Mindestleistungsgrenzen müssen beachtet werden.
- Ein akzeptables Maß an Präzision, Richtigkeit und Linearität muss erreicht sein.
- Die untere Arbeitsbereichsgrenze muss gleich oder größer der Nachweigrenze sein.

Die Arbeitsbereiche für die Aromaanalytik in Apfel- und Orangensaft sind in Tab. 17 aufgeführt. Die Forderung nach Mindestleistungsgrenzen liegt für die Bestimmung von Aromastoffen in Apfel- und Orangensaften nicht vor.

Tab. 17: Arbeitsbereiche der Aromen in Apfel- und Orangensaft

	Arbeitsbereiche [µg/L]
Ethylisobutyrat	0,5 - 100
Methyl-2-methylbutyrat	0,5 - 100
Ethylbutyrat (in Apfelsaft)	10 - 500
Ethylbutyrat (in Orangensaft)	90 - 600
Butylacetat	10 - 1000
Hexanal	10 - 1000
Ethyl-2-methylbutyrat	10 - 250
Ethylisovalerat	0,5 - 100
3-Methylbutylacetat	0,5 - 100
2-Methylbutylacetat	10 - 750
<i>trans</i> -2-Hexenal	10 - 1000
Amylacetat	0,5 - 500
Methylhexanoat	0,5 - 10
Ethylhexanoat	0,5 - 100
Benzaldehyd	0,5 - 250
Hexylacetat	10 - 500
<i>trans</i> -2-Hexenylacetat	0,5 - 500
Hexyl-2-methylbutyrat	0,5 - 100
Damascenon	0,5 - 100

Als Datengrundlage zur Bestimmung der durchschnittlichen Konzentration lagen 650 Analysen von Apfeldirektsäften, Apfelsäften aus Konzentrat und Apfelschorlen sowie 500 Analysen von Orangendirektsäften, Orangensaften aus Konzentrat und Orangen-nectaren vor.

6.2.4 Linearität

Eine zentrale Forderung der Validierung ist die Überprüfung der Linearität. Zur Prüfung auf Linearität gibt es folgende Möglichkeiten:

- Visueller Linearitätstest
- Vergleich der Reststandardabweichungen der Funktionen 1. und 2. Grades

Funktion 1. Grades $y = a + bx$ (4)

Funktion 2. Grades $y = a + bx + cx^2$ (5)

Aus den Kalibrierdatenpaaren (x_i und y_i) können der Ordinatenabschnitt (a) und die Steigung (b) der Kalibriergeraden, die Konstante der quadratischen Funktion (c) und die Reststandardabweichung (s_y) für eine ungewichtete Funktion berechnet werden.

- Rechnerische Überprüfung: Anpassungstest nach Mandel
Residualanalyse

Anpassungstest nach Mandel

Dieser Test passt eine Funktion 1. Grades (linear) und eine Funktion 2. Grades (gekrümmt) an die Messdaten der Kalibration an, berechnet jeweils die Restvarianzen (s_{y1}^2 , s_{y2}^2), aus welchen im nächsten Schritt die Differenz der Abweichungsquadratsumme (DS^2) ermittelt werden.

Bei der Berechnung für Ethylisobutyrat ergab sich ein Prüfwert von 2,8. Dieser ist kleiner als der F-Wert von 7,82. Damit konnte die Funktion als linear angesehen werden.

Residualanalyse

Bei der Residualanalyse trägt man die vertikalen Abstände der Messwerte von der Regressionskurve auf (Residuen, d_i). Die Residuen zeigen eine Normalverteilung um das Nullniveau, wenn das richtige mathematische Modell gewählt wurde. Bei erkennbarem Trend der Residuenverteilung ist das angewendete Regressionsmodell zu prüfen.

Abb. 43 zeigt ist die graphische Darstellung der Abweichung der Messpunkte von der Regressionsgeraden. Am Beispiel des Ethylbutyrats war kein Trend im Verlauf zu erkennen. Damit wurde, wie auch beim Test nach Mandel, die Anwendung des Linearen Modells gerechtfertigt.

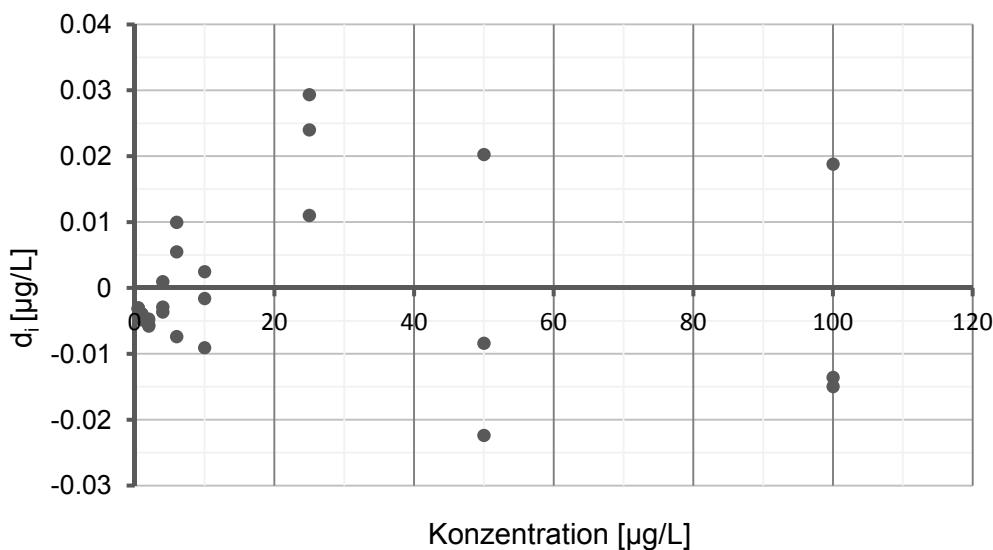


Abb. 43: Graphische Darstellung der Residuen in Abhängigkeit von der Konzentration für die Bestimmung von Ethylisobutyrat in Apfelsaft

Ausführliche Berechnungen sind im Anhang in Kap. G.3 aufgeführt.

6.2.5 Varianzhomogenität

Der Reststandardabweichung kommt eine Schlüsselrolle unter den Verfahrenskenndaten zu. Wenn die daraus berechneten Varianzen am oberen und unteren Ende des Arbeitsbereiches keinen signifikanten Unterschied, zeigen liegt Varianzhomogenität vor.

Zur Überprüfung wurden jeweils die Messwerte der niedrigsten und der höchsten Konzentration eines Arbeitsbereiches zehnfach ermittelt und daraus die Varianzen (s_1^2, s_2^2) berechnet. Die Anzahl der Messpunkte pro Messreihe muss nicht gleich groß sein.

Die Berechnung der Varianzhomogenität für den Arbeitsbereich von 0,5 - 100 µg/L für Ethylbutyrat zeigte Inhomogenität. Auch bei einer, vom Aufwand her vertretbaren Verkleinerung des Arbeitsbereiches, herrschte keine Varianzhomogenität. Diese konnte erst bei Arbeitsbereichen erreicht werden, die in der Größe einer Zehnerpotenz lagen. Diese Vorgehensweise ist jedoch bei einem Naturprodukt wie Fruchtsäften nicht umsetzbar, da die Analyten große Konzentrationsunterschiede, je nach Sorte, Lagerung, Verarbeitung, usw. aufweisen. Die Varianzhomogenität ist bei allen Analyten unterschiedlich stark ausgeprägt.

In diesem Fall wäre der nächste Schritt die Bereiche soweit zu verkleinern bis Varianzhomogenität erreicht ist. Wenn dies nicht durchgeführt wird, müssen andere Modelle als die ungewichtete lineare Regressionsrechnung angewendet werden.

Dazu gehören z. B. die gewichtete Regression und Regressionsfunktionen höheren Grades. Im folgenden Verlauf wird das Modell der gewichteten Regression angewendet. Ausführliche Berechnungen sind im Anhang in Kap. G.4 aufgeführt.

6.2.6 Erkennungs-, Bestimmung-/ Erfassungsgrenze und Erfassungsvermögen

Folgende Anforderungen müssen erfüllt werden, um die lineare Regressionsrechnung zur Ermittlung der Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze nach DIN 32645 anwenden zu dürfen:

- Im gewählten Arbeitsbereich muss Varianzhomogenität vorliegen.
- Zwischen der Konzentration und dem Messwert muss ein linearer Zusammenhang vorliegen.
- Alle Messwerte können als normalverteilt angenommen werden.

Je größer der gewählte Arbeitsbereich ist, umso wahrscheinlicher ist es, dass sich die Varianzen signifikant unterscheiden. Dies ist auch in der Praxis häufig der Fall. Um Varianzhomogenität zu erreichen, muss der Arbeitsbereich soweit verkleinert werden, bis sich die Varianzen nicht mehr signifikant unterscheiden.

Zur Ermittlung der Erkennungs-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze, sowie dem Erfassungsvermögen, wurde ein anderes Regressionsmodell gewählt, die gewichtete lineare Regression, welche angewendet werden kann, wenn keine Varianzhomogenität vorliegt. Die Rechenvorlagen für das Modell der gewichteten linearen Regression liefert die DIN 11843-2. Diese beachtet die Werte mit größeren Varianzen weniger stark als Messwerte mit kleineren Varianzen, im Gegensatz zur linearen Regression, welche alle gleich bewertet, d.h. gleiche Varianzen über den Arbeitsbereich voraussetzt.

Es müssen keine gesetzlichen Mindestgrenzen erreicht werden, aber die Methode sollte die jeweiligen Analyten in dem Bereich erfassen können in dem sie in einem durchschnittlichen Apfelsaft vorkommen.

Die Berechnung des Achsenabschnitts a und der Steigung b am Beispiel des Analyten Ethylisobutyrat ergaben:

Achsenabschnitt a	Steigung b
0,00072	0,00478

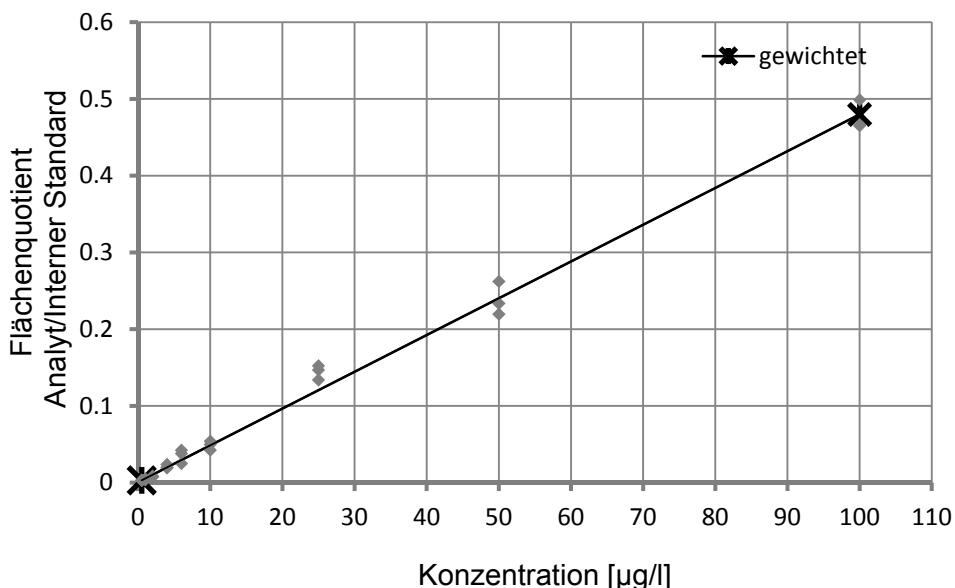


Abb. 44: Kalibrierfunktion nach gewichteter linearer Regression für die Bestimmung von Ethylisobutyrat in Apfelsaft

Erkennungsgrenze y_c

Die Definition der Erkennungsgrenze nach DIN 11843 lautet: „Wert der Messgröße, dessen Überschreitung für eine festgelegte Wahrscheinlichkeit eines Fehlers 1. Art α zum Schluss führt, dass das betrachtete System nicht in seinem Grundzustand ist.“

Die Erkennungsgrenze entspricht nach DIN 32645 dem kritischen Wert der Messgröße.

Erfassungsgrenze x_c

Die Definition nach DIN 11843 lautet: „Wert der Zustandsgrößendifferenz, dessen Überschreitung für eine festgelegte Wahrscheinlichkeit eines Fehlers 1. Art α zum Schluss führt, dass das betrachtete System nicht in seinem Grundzustand ist.“ Die Erfassungsgrenze ist der Wert der Zustandsgrößendifferenz, der dem kritischen Wert der Messgröße durch Anwendung der geschätzten Kalibrierfunktion zugeordnet wird. Einheit: µg/L

Die Erfassungsgrenze entspricht nach DIN 32645 der Nachweisgrenze.

Erfassungsvermögen x_D

Die Definition nach DIN 11843 lautet: „Wert der Zustandsgrößendifferenz beim Ist-Zustand, der mit einer Wahrscheinlichkeit ($1-\beta$) zum Schluss führt, dass sich das System nicht im Grundzustand befindet.“ Einheit: $\mu\text{g/L}$

Das Erfassungsvermögen entspricht nach DIN 32645 der Erfassungsgrenze.

Bestimmungsgrenze x_{BG}

Definition nach DIN 32645: „Die Bestimmungsgrenze dient als a-priori-Entscheidungskriterium zur Auswahl eines Verfahrens zur quantitativen Bestimmung eines Analyten bzw. Stoffes. Sie repräsentiert den kleinsten Gehalt des Analyten, der „quantitativ bestimmt“ werden kann.“

Folgende Werte wurden für die Erkennungs-, Bestimmungs- und Erfassungsgrenze, sowie Erfassungsvermögen von Ethylisobutyrat in Apfelsaft anhand der gewichteten linearen Regression ermittelt:

Erkennungs-grenze y_C	Erfassungsgrenze [$\mu\text{g/L}$] x_C	Erfassungsvermögen [$\mu\text{g/L}$] x_D	Bestimmungsgrenze [$\mu\text{g/L}$] x_{BG}
0,001	0,09	0,14	0,26

Ausführliche Berechnungen wie die Erklärung des angewandten Regressionsmodells sind im Anhang in Kap. G.5 aufgeführt.

6.2.7 Verfahrenskenndaten

Die Verfahrensstandardabweichung (s_{x0}) ist ein Maß für die Leistungsfähigkeit eines analytischen Verfahrens. Je größer die Steigung der Kalibriergeraden (b) und je kleiner die Reststandardabweichung (s_y) ist, umso leistungsfähiger ist eine Methode. Nach der Division der Verfahrensstandardabweichung durch den Mittelwert der Kalibrier-konzentrationen (\bar{x}), zur Normierung, erhält man die relative Verfahrensstandard-abweichung (V_{x0}). Die entsprechenden Formeln sind im Anhang in Kap. G.6 aufgeführt.

Hierdurch ist ein Vergleich unterschiedlicher Verfahren in gleichen Konzentrationsbereichen möglich. Nach Miller und Miller¹⁸⁰ wird die gewichtete lineare Regression zur Bestimmung eines einzelnen Analyten angewendet und nicht für den Vergleich von zwei separaten Methoden. Daher können mit dem Modell der gewichteten linearen Regression keine Verfahrenskennwerte bestimmt werden.

6.2.8 Präzision

Die Präzision beschreibt die Streuung von Analysenergebnissen bei mehrfacher Anwendung eines festgelegten Analysenverfahrens unter vorgegebenen Bedingungen. Als Streuungsmaß wird die Standardabweichung s_i , die relative Standardabweichung s_{rel} (gleich dem Variationskoeffizienten V_k) und die Varianz s_i^2 berechnet. Die Formeln zur Berechnung der Präzision sind im Anhang in Kap. G.7 aufgeführt.

Folgende Präzisionsarten können unterschieden werden:

- Wiederholpräzision

Zur Ermittlung der Wiederholpräzision werden Mehrfachmessungen in kurzen Zeitabständen, mit demselben Verfahren, an identischem Material, in demselben Labor, durch denselben Bearbeiter und dieselbe Geräteausstattung durchgeführt.

Zur Bestimmung der Wiederholpräzision wurde ein 100 µg/L-Multistandard nach der Apfelmethode und ein 100 µg/L Ethylbutyratstandard nach der Orangenmethode zehnfach aufgearbeitet und analysiert. Anhand der Peakflächen wurde die relative Standardabweichung bestimmt. Die Wiederholpräzision für die zu validierenden Apfel- und Orangenaromastoffe liegt zwischen 4,5 und 11,3%.

- Präzision von Tag zu Tag

Zur Ermittlung der Tag-zu-Tag-Präzision werden Mehrfachmessungen an unterschiedlichen Tagen, mit demselben Verfahren, an identischem Material, in demselben Labor, durch denselben Bearbeiter und derselben Geräteausstattung durchgeführt.

Zur Bestimmung der Tag-zu-Tag-Präzision wurden über 3 Tage, jeweils N=3, Analysen eines 100 µg/L-Multistandards nach der Apfelmethode und eines 100 µg/L Ethylbutyratstandards nach der Orangenmethode durchgeführt. Die Tag-zu-Tag Präzision liegt zwischen 4,2 und 8,8%.

- Vergleichspräzision

Zur Ermittlung der Vergleichspräzision werden Messungen mit demselben Verfahren an identischem Material aber in unterschiedlichen Laboren, durch verschiedene Bearbeiter und verschiedene Geräteausstattung durchgeführt. Die Vergleichspräzision kann von der Validierung abgekoppelt werden, da mit dieser Methode nicht in verschiedenen Laboren gearbeitet wird.

- Laborpräzision

Zur Ermittlung dieser Präzisionsart werden Messreihen innerhalb eines Labors bei bewusster Änderung eines Parameters, wie z. B. dem Gerät oder dem Bearbeiter, durchgeführt. Die Laborpräzision wurde nicht ermittelt, da für den Routinebetrieb nur ein Gerät und keine wechselnden Mitarbeiter eingeteilt waren.

6.2.9 Richtigkeit

Das Maß der Übereinstimmung zwischen dem ermittelten Wert und einem als Richtig angesehenen Wert, ist die Richtigkeit. Eine Möglichkeit der Bestimmung ist die Überprüfung mit zertifiziertem Referenzmaterial oder über Wiederfindungsexperimente.

Wiederfindung

Das Verhältnis des Mittelwertes (\bar{x}) zum richtigen Wert des Analyten (x_R) in der Probe wird als Wiederfindung, bzw. Wiederfindungsrate (WF) bezeichnet (siehe Kap. F.8 im Anhang). Bei minimalen Verlusten während der einzelnen Schritte, die eine Probe durchlaufen muss, liegt eine hohe Wiederfindungsrate vor. Liegt eine Wiederfindungsrate von 100% vor, ist das geprüfte Verfahren frei von konstant- und/oder proportional-systematischen Fehlern.

Bei Verwendung der SBSE-TD-Technik erfolgt die Überführung der Analyten in den Gaschromatographen ausschließlich über die Beladung des Twisters und der anschließenden thermischen Desorption. Daher kann die Wiederfindung nicht über die Injektion eines Standards bestimmt werden, welcher nicht die Probenvorbereitung durchlaufen hat.

Eine rechnerische Abschätzung der Wiederfindung mit dem SBSE-System kann über den K_{OW} -Wert und die eingesetzte Probenmenge mit der Software „Twister Recovery Calculator“ von Gerstel gemacht werden (siehe Kap.4.2.2.2, Gleichung 3). Die berechnete Wiederfindung für Ethylisobutyrat ($\log K_{OW}$ 1,77; Probenvolumen 20 mL) beträgt 27,1%.

Da das SBSE-TD-GC-MS-System mit dem Einsatz des Twisters kalibriert wird stellt die Wiederfindung keinen Wert dar, welcher die Differenz zwischen dem Messwert und dem richtigen Wert beschreibt. Die Kalibrierstandards werden analog den Proben aufgearbeitet. Eine Berücksichtigung der berechneten Wiederfindung ist daher nicht nötig.

6.2.10 Selektivität und Spezifität

Eine selektive Methode kann verschiedene, nebeneinander zu bestimmenden Komponenten ohne gegenseitige Störung erfassen und sie somit eindeutig identifizieren. Eine spezifische Methode kann eine Substanz oder eine Substanzklasse in allen relevanten Formen erfassen, wobei andere Bestandteile der Probe das Ergebnis nicht beeinflussen. Die Spezifität wird daher auch als ultimative Selektivität bezeichnet¹⁸².

Durch den Einsatz eines massenselektiven Detektors können die detektierten Signale nicht nur durch den Vergleich der Retentionszeit zugeordnet werden, sondern auch anhand der charakteristischen Ionen. Stimmt das Spektrum des Signals mit dem der Vergleichssubstanz überein, kann von derselben Substanz ausgegangen werden. Nach der EU-Richtlinie 96/23/EG werden Signale anhand der Retentionszeit mit einem zuvor analysierten Substanztandard verglichen und dürfen eine Toleranz von 0,5% nicht überschreiten.

Die Retentionszeit des Ethylisobutyrat weist zwischen der Analyse in Wasser und in Apfelsaft eine Differenz von 0,2% auf:

t_R in Wasser [min]	t_R in Apfelsaft [min]	Abweichung [%]
9,86	9,84	0,2

Zum Vergleich der detektierten Ionen werden jeweils ein Quantifizierungs (Quant)- und zwei Qualifizierungs-Ionen (Qual-Ionen) detektiert, welche eine maximale Abweichung der Intensitäten von 50% aufweisen dürfen. Bei den Intensitäten der Qualifizierungs- und Quantifizierungs-Ionen wurde eine maximale Abweichung von 35% ermittelt (s. Tab. 18).

Ergebnisse und Diskussion

Die Abweichungen liegen damit innerhalb der geforderten Grenzen. Dies konnte auch für alle weiteren Analyten bestätigt werden. Eine ausreichende Identifizierung ist somit gesichert.

Tab. 18: Signalintensitäten von Ethylisobutyrat in einem 100 µg/L-Multistandard in Wasser und rückverdünntem Apfelsaft

	Quant-Ion [m/z]	Qual-Ion 1 [m/z]	Qual -Ion 2 [m/z]	Qual -Ion 3 [m/z]
Ethylisobutyrat	71	43	116	88
Ionen-Intensität in Wasser [%]	100	205	37	19
Ionen-Intensität in Matrix [%]	100	172	24	22
Abweichung [%]	0	17	35	13

Die Daten der Retentionszeiten sowie der Ionen-Intensitäten sind im Anhang für alle validierten Analyten aufgeführt. Exemplarisch werden beide Vorgehensweisen am Beispiel des Ethylisobutyrats gezeigt.

Zusammenfassung der Validierungsergebnisse:

Die SBSE-TD-GC-MS-Methode zur Quantifizierung von Methyl-2-methylbutyrat, Ethylbutyrat, Butylacetat, Hexanal, Ethyl-2-methylbutyrat, Ethylisovalerat, 3-Methylbutylacetat, 2-Methylbutylacetat, *trans*-2-Hexenal, Amylacetat, Methylhexanoat, Ethylhexanoat, Benzaldehyd, Hexylacetat, *trans*-2-Hexenylacetat, Hexyl-2-methylbutyrat und Damascenon in Apfelsäften und Ethylbutyrat in Orangensaften validiert. Dazu wurde der jeweilige Arbeitsbereich definiert und Linearität im geforderten Bereich nachgewiesen. Die Bestimmungsgrenzen lagen im Bereich von 0,1 µg/L und 27,7 µg/L. Da keine Varianzhomogenität gegeben war, wurde die Bestimmung der Erkennungs-, Bestimmungs- und Erfassungsgrenze und des Erfassungsvermögens anhand einer gewichteten Regression durchgeführt. Die rechnerische Wiederfindung liegt zwischen 19 und 99%, die Präzision, innerhalb eines Tages und zwischen verschiedenen Tagen, liegt zwischen 2,9 und 11,3 %. Alle ermittelten Daten sind im Anhang (Kap. G) aufgeführt.

6.3 Ringversuch

Neben internen qualitätssichernden Maßnahmen, wie dem Einsatz einer validierten Methode an kalibrierten Messgeräten mit qualitativ entsprechenden Arbeitsmaterialien durch geschulte Mitarbeiter, die zur Absicherung, dass ein Verfahren bei zuverlässiger Anwendung vergleichbare Ergebnisse liefert ergriffen werden müssen, können zusätzlich externe Maßnahmen eingesetzt werden. Dazu zählen Audits und Ringversuche die zur Überprüfung der Analysenqualität durchgeführt werden können¹⁷⁵.

Ein Audit beinhaltet eine systematische und unabhängige Evaluation durch einen externen Auditor. Dies kann zur Zertifizierung der Qualitätssicherung nach ISO- oder EN-Normen durchgeführt werden oder zur Akkreditierung eines Verfahrens oder der gesamten Arbeit, um zum Beispiel im gesetzlich geregelten Bereich arbeiten zu dürfen.

Die zweite externe Maßnahme, der Ringversuch, kann zu verschiedenen Bewertungs-zwecken eingesetzt werden. Zum einen zur Bewertung von Analysenverfahren wie in Kap. 6.3.1 beschrieben, und zum anderen zur Bewertung der Leistungsfähigkeit eines Labors.

6.3.1 Laborvergleichsuntersuchung anhand von Apfeldirektsäften

Im Januar 2008 hat die Faethe Labor GmbH an einer Laborvergleichsuntersuchung (LVU) teilgenommen. Diese wurde von der Projektgruppe „Beurteilungskriterien für Apfelsaftaromen“ initiiert. Diese Gruppe wurde von Sachverständigen aus den Arbeitsgruppen „Fruchtsaft und fruchtsafthaltige Getränke“ sowie „Aromastoffe“ gebildet. Die Aufgabe bestand darin, 3 naturtrübe Apfelsäfte auf die Gehalte der aufgelisteten Komponenten zu analysieren. Die Substanzen in der linken und mittleren Spalte wurden mit der Twister-Methode quantifiziert:

<i>trans</i> -2-Hexenylacetat	Methyl-2-methylbutyrat	<i>cis</i> -3-Hexenylacetat
Ethyl-2-methylbutyrat	Ethyl-3-methylbutyrat	1-Butanol
3-Methylbutylacetat	Hexyl-2-methylbutyrat	2-Methylbutanol
Ethylhexanoat	2-Methylbutylacetat	<i>cis</i> -2-Hexen-1-ol
Ethylbutyrat	<i>trans</i> -2-Hexenal	<i>cis</i> -3-Hexen-1-ol
Butylacetat	Damascenon	3-Methylbutanol
Hexanal	Benzaldehyd	<i>trans</i> -2-Hexen-1-ol
Hexylacetat		<i>trans</i> -3-Hexen-1-ol
Ethylisobutyrat		1-Hexanol

Die Wahl der Probenvorbereitungstechnik wurde freigestellt. Die chromatographische Trennung und Detektion sollte mittels GC-MS erfolgen. Weiterhin festgelegt war, dass eine ausreißerfreie Fünffache-Bestimmung mit getrennter Probenaufarbeitung durchgeführt werden soll. Von den teilnehmenden Laboratorien wurden verschiedene Probenaufarbeitungstechniken eingesetzt:

- SDE (6 mal eingesetzt)
- Headspace (2 mal eingesetzt)
- SBSE (1 mal eingesetzt)
- zweistufige Isolierung (1 mal eingesetzt)

Das Ziel dieses Teils des Ringversuches war es, eine Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Methoden die in den einzelnen Laboratorien angewendet werden, sicherzustellen.

Fazit der LVU: Der Vergleich der Ergebnisse zeigte, dass die unterschiedlichen Methoden vergleichbare Ergebnisse liefern und die Untersuchungen der Direktsäfte mit verschiedenen Methoden fortgesetzt werden konnten.

6.3.2 Untersuchung von handelsüblichen Apfelsäften

Nach bestätigter Vergleichbarkeit der eingesetzten Methoden zur Quantifizierung der Aromastoffe in Apfelsäften wurde mit der Untersuchung fortgefahrene. Die Ziele des Versuchs waren:

- Bestandsaufnahme, wie das Apfelsaftaroma (ausschließlich Direktsäfte) üblicherweise beschaffen ist
- Ableitung von Bewertungskriterien für Apfelsaftaroma
- Aufstellung einer möglichst umfangreichen Datensammlung
- Statistische Auswertung der Datensammlung

Nach der LVU hat die Gruppe beschlossen den Untersuchungsumfang auf folgende Aromen zu beschränken:

Ethyl-2-methylbutyrat	2-Methylbutylacetat	2-Methylbutanol
Ethylbutyrat	<i>trans</i> -2-Hexenal	<i>trans</i> -2-Hexen-1-ol
Butylacetat	Hexylacetat	1-Hexanol
Hexanal		

Untersuchung von handelsüblichen Apfeldirektsäften:

20 Apfeldirektsäfte aus dem deutschen Handel wurden analysiert. Die Proben wurden wie bei der Laborvergleichsuntersuchung mit der Twister-Technik aufgearbeitet und mit GC-MS quantifiziert. Es wurden Zweifach-Bestimmungen durchgeführt. Die Daten aller teilnehmenden Laboratorien wurden zusammengetragen, um eine möglichst aussagekräftige Datensammlung zu erstellen, welche eine Aussage über den Aromengehalt der Apfeldirektsäfte erlaubt. Aufgrund dieser Daten soll ein Beurteilungswert für die ausreichende Rearomatisierung von Apfelsäften aus Konzentrat abgeleitet werden.

Untersuchung von handelsüblichen Apfelsäften aus Konzentrat:

Im letzten Schritt wurden 19 Apfelsäfte aus Konzentrat, wie auch die Direktsäfte, mittels SBSE-GC-MS und Doppelbestimmung quantifiziert. Nach dem Zusammentragen der Daten aller teilnehmenden Laboratorien konnte ein umfassendes Bild der Rearomatisierung der zu dem Zeitpunkt auf dem Markt erhältlichen Säfte aus Konzentrat erstellt werden.

6.3.3 Fazit des Ringversuches

Durch die Laborvergleichsuntersuchung wurde für die Aufarbeitung und Quantifizierung mit dem Twister-GC-MS-System die Vergleichbarkeit mit der, momentan am häufigsten angewendeten, SDE- und der HS-GC-MS bestätigt.

Die im Rahmen dieser Untersuchungen gewonnenen Daten wurden von der Arbeitsgruppe „Aromastoffe“ und der Arbeitsgruppe „Fruchtsaft und fruchtsafthaltige Getränke“ der Lebensmittelchemischen Gesellschaft der GDCh im Oktober 2011 veröffentlicht worden und sollen zur Unterstützung weiterer Diskussionen über Beurteilungskriterien genutzt werden¹⁸³.

6.4 Erkennung von aromatisierten Direktsäften

Markersubstanzen im Apfelsaft

Bei der Herstellung eines Direktsafes wird dem Frischsaft kein Aroma entzogen, daher darf laut Fruchtsaftverordnung auch kein Aroma zugesetzt werden². Wenn Apfeldirektsäfte mit wenig Aroma (zum Beispiel bei Saft aus überlagerten Äpfeln) durch den Zusatz von Aromawasserphase oder durch den Zusatz von Apfelsaft aus Konzentrat aufgewertet werden, würde dies einen Verstoß gegen die Fruchtsaftverordnung darstellen, und ein solcher Saft wäre nicht verkehrsfähig. Um diese Vorgehensweise nachzuweisen, wurden Apfeldirekt- und Konzentratsäfte auf, für Konzentratsäfte/Aromen charakteristische Komponenten, sog. Markersubstanzen analysiert.

Dazu wurde eine Analysenmethode entwickelt („Markermethode“, siehe Anhang Kap. G), um mögliche Aromen und andere Komponenten zu identifizieren, die charakteristisch für Konzentratsäfte sind.

Mit dieser Methode wurden 40 Apfeldirektsäfte, 49 Apfelschorlen, 26 Apfelsäfte aus Apfelsaftkonzentrat und 2 Apfelnektare, analysiert. Abb. 45 zeigt zwei gemittelte Chromatogramme (TIC) von jeweils drei Konzentratsäften und drei naturtrüben Apfelsäften, die zum Vergleich übereinandergelegt wurden.

Bei der Auswertung konnten keine charakteristischen Komponenten identifiziert werden, die nur im Konzentratsaft, jedoch nicht im Direktsaft vorhanden sind. Die Substanzen der Konzentratsäfte sind in unterschiedlicher Konzentration auch im Direktsaft enthalten (z. B. Damascenon in Abb. 45 B). In Direktsäften aber sind Komponenten vorhanden, die nicht im Konzentratsaft zu finden sind (z. B. Komponenten 1 und 2 Abb. 45 C). Daher kann durch diese Methode keine Aussage darüber getroffen werden, ob ein Direktsaft mit Konzentrat versetzt wurde.

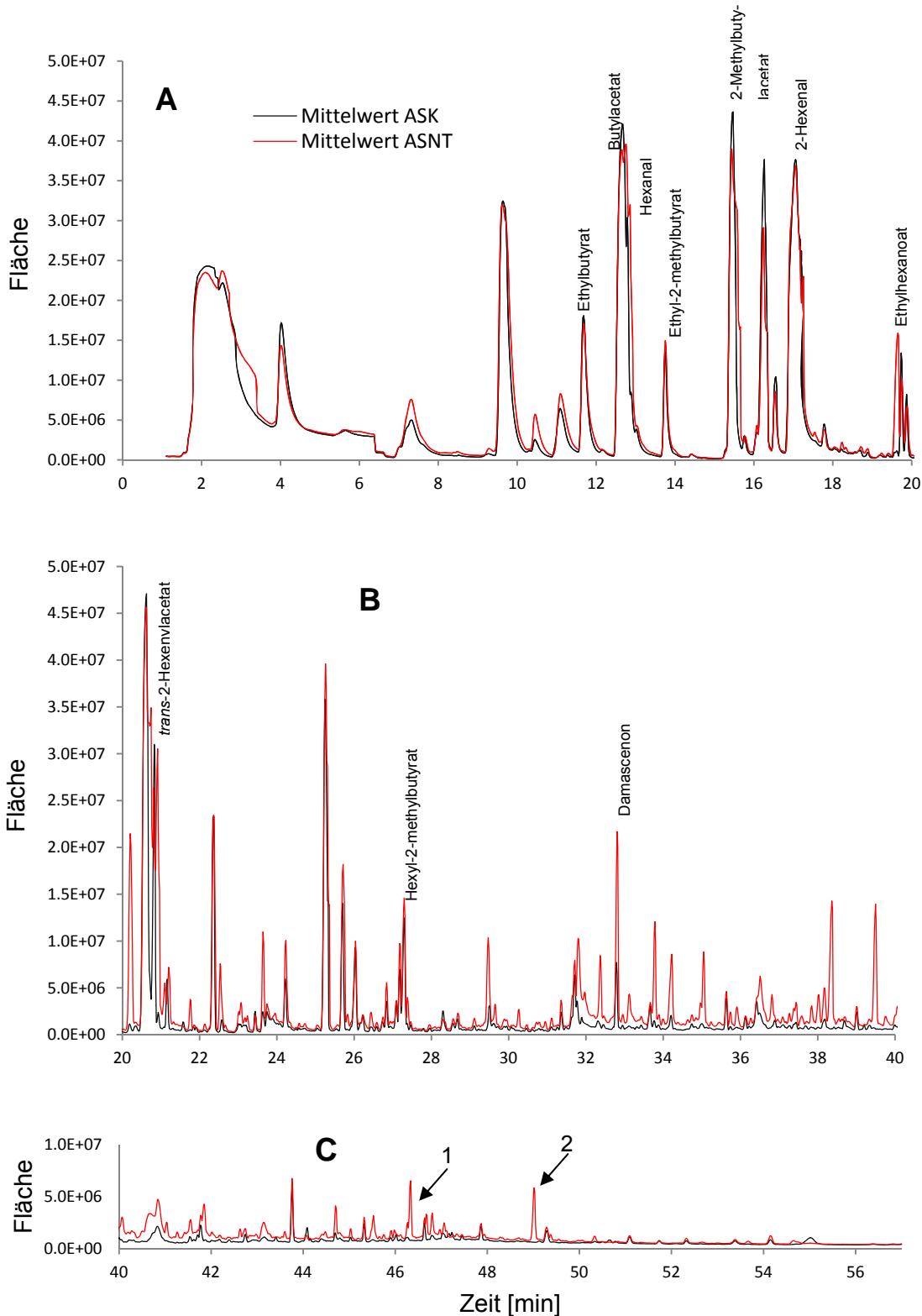


Abb. 45: Chromatogramme (TIC) eines Konzentratsaftes und eines naturtrüben Saftes (N=3)

A 0 - 20 min, **B** 20 - 40 min, **C** 40 - 57 min, markierte Peaks 1, 2: Komponenten, die nur im Direktsaft, jedoch nicht im Konzentratsaft vorkommen, Messmethode: Markermethode

Ermittlung von Verhältniszahlen von Aromakomponenten in Apfeldirekt- und Konzentratsäften

Eine weitere Möglichkeit zur Charakterisierung von Direkt- und Konzentratsäften wurde anhand der Berechnung von Verhältnissen der Peakflächen der jeweiligen Aromen überprüft. Über die ermittelten Konzentrationen der Aromastoffe kann bei einem Naturprodukt wie dem Apfelsaft keine genaue Aussage über die Unterscheidung getroffen werden, da diese, abhängig von der Sorte, den Anbaubedingungen, dem Klima, dem Witterungsverlauf, dem Reifestadium und den Lagerungsbedingungen, stark schwanken. Dazu wurde aus den Peakflächen der bekannten Aromen der Quotient Q_{Aroma} bestimmt.

Beispiel:

Für den Konzentratsaft ASK1 ergab die Auswertung für 2-Hexenal eine Peakfläche von $29,74 \cdot 10^7$ und für Hexanal eine Peakfläche von $50,89 \cdot 10^6$.

$$Q_{Aroma} = \frac{Fläche_{(2-Hexenal)}}{Fläche_{(Hexanal)}} = \frac{29,74 \cdot 10^7}{50,89 \cdot 10^6} = 5,943$$

Die Ergebnisse von drei weiteren Säften aus Konzentrat und drei Direktsäften sind in Tab. 19 aufgeführt.

Tab. 19: Die Peakflächen von Hexanal und 2-Hexenal für drei Säfte aus Konzentrat (ASK 1 - 3) und drei Direktsäfte (ASD1 - 3) und die entsprechenden Werte für Q_{Aroma}

	ASK1	ASK2	ASK3	ASD1	ASD2	ASD3
Hexanal	50.897.795	43.318.996	40.986.395	102.718.015	22.641.375	46.647.024
2-Hexenal	297.406.957	521.091.638	353.317.624	291.450.842	146.936.850	224.866.782
Q_{Aroma}	5,94	12,03	8,62	2,84	6,49	4,82

Anhand dieser sechs Säfte lässt sich erkennen, dass sich während der Konzentratsherstellung das Verhältnis der Konzentrationen von 2-Hexenal und Hexanal ändert. Bei dem Vergleich der Verhältniszahlen aller Analyten von 40 Apfeldirektsäften, 49 Apfelschorlen und 26 Apfelsäften aus Apfelsaftkonzentrat wurden keine Aromasubstanzen gefunden, die einen signifikanten Unterschied zwischen Direkt- und Konzentratsäften erkennen ließen.

6.5 Vorschlag zur Mindestaromatisierung

Analog zur Vorgehensweise der Projekt-Gruppe „Beurteilungskriterien für Apfelsaftaromen“ wurde der Median der Estersumme von 110 authentischen Apfeldirektsäften aus industrieller Pressung ermittelt und dieser zur weiteren Betrachtung eines möglichen Grenzwertes herangezogen. Die zur Bestimmung eines Grenzwertes analysierten Säfte mussten folgende Kriterien erfüllen:

- aus industrieller Herstellung
- keine Halbprodukte oder Zwischenprodukte, nur das abgefüllte Endprodukt
- keine Verfälschung durch unerlaubten Aromenzusatz
- keine sortenreinen Apfelsäfte

Die Häufigkeitsverteilung der Estersumme der Apfelsäfte ist in Abb. 46 graphisch dargestellt. Das Maximum liegt in der Gruppe 401 - 600 µg/L Estersumme, welcher 29,1% der Säfte zugeordnet werden, mit einem Median von 520 µg/L Estersumme.

- Minimum: 29 µg/L
- Maximum: 1496 µg/L
- Median: 520 µg/L

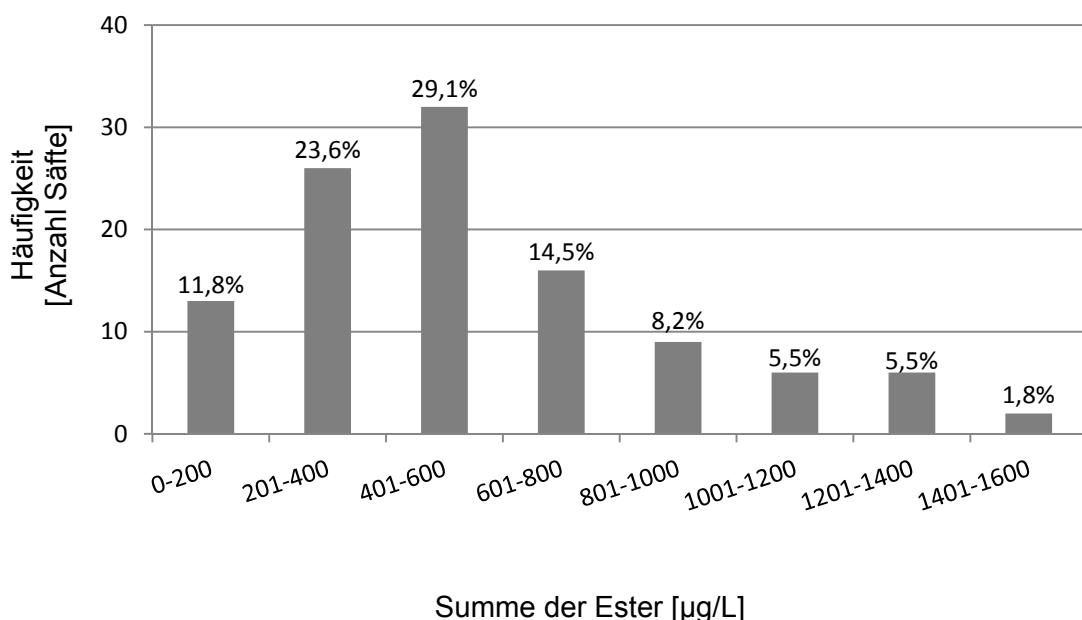


Abb. 46: Häufigkeitsverteilung der Summe der Ester von 110 authentischen Apfeldirektsäften aus industrieller Pressung mit prozentualer Angabe

Bei der Analyse von 31 Apfeldirektsäften aus dem Handel wurde ein ähnliches Bild ermittelt:

- Minimum: 56 µg/L
- Maximum: 1215 µg/L
- Median: 519 µg/L

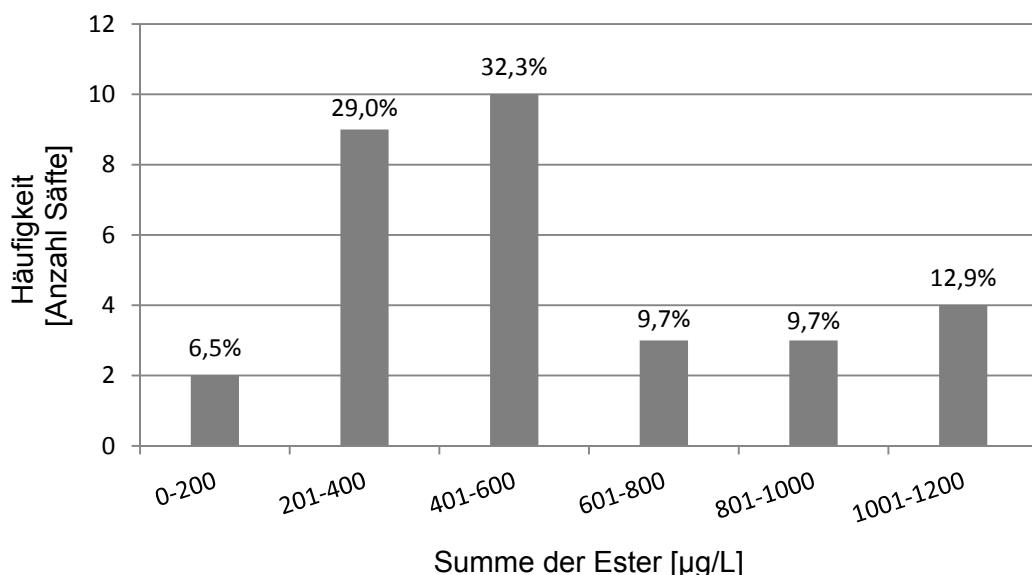


Abb. 47: Häufigkeitsverteilung der Summe der Ester von 31 industriell hergestellten Apfeldirektsäften (Handelsproben) mit prozentualer Angabe

Auch hier liegt der Median mit einem Wert von 519 µg/L in der Gruppe 401 - 600 µg/L in der sich 32,3% der Säfte befinden. Bei den Handelssäften wurde auf frische Qualität geachtet, um mögliche Aromastoffverluste durch die Lagerung auszuschließen.

Die ermittelten Werte zeigen, dass die Estersumme der Handelssäfte mit der von authentischen industriell hergestellten Apfeldirektsäften vergleichbar ist und die ermittelten Werte auf den Markt übertragen werden können.

Die Stiftung Warentest hat im Rahmen ihrer Studie für den Bericht „Das Aroma macht den Unterschied“, veröffentlicht in test 09/2009, 18 Direktsäfte hinsichtlich der Aromaqualität untersucht. Im Durchschnitt wurde eine Summe der Ester von 550 µg/L nach Extraktion-Anreicherung-GC-MS-Analyse ermittelt⁶. Wolter hat anhand von 122 Analysen einen Mittelwert der Estersumme von 457 µg/L im Direktsaft ermittelt¹⁸⁴.

Diese Werte bestätigen die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen von Handelsproben und authentisch hergestellten Apfeldirektsäften.

Wolter beschrieb 2010 zu welchem Zeitpunkt der Herstellung und Lagerung von Apfelsäften Aromen (Summe der Ester, Summe C₆-Alkohole/Aldehyde und Aromaindex) verloren gehen bzw. abgebaut werden¹⁸⁵.

- Verluste bei der Aromarückgewinnung während des Konzentrierprozesses¹⁸⁵

Summe der Ester	28%
Summe C ₆ -Alkohole/Aldehyde	6%
Aromaindex	19%

- Verluste bei Mischung, Entgasung und Abfüllung¹⁸⁵

Summe der Ester	10%
Summe C ₆ -Alkohole/Aldehyde	keine Angabe
Aromaindex	keine Angabe

- Verlust während der Lagerung der Fertigware¹⁸⁵

Zehn-monatige Lagerung bei 20 °C in TetraPak	
Summe der Ester	60%
Summe C ₆ -Alkohole/Aldehyde	10%
Aromaindex	30%

Neun-monatige Lagerung bei 40 °C in TetraPak ¹⁸⁵	
Summe der Ester	84%
Summe C ₆ -Alkohole/Aldehyde	20%
Aromaindex	50%

Der Verlust an Aromastoffen, der während der Aromakonzentratherstellung beobachtet wurde, sollte bei der Rearomatisierung durch die Dosierung wieder ausgeglichen werden und spielt bei der Festlegung der Mindestaromatisierung keine Rolle.

Auch die Verluste, die bei Mischung, Entgasung und Abfüllung des Saftes ermittelt wurden, werden bei der Festlegung nicht beachtet, da der Saft aus Konzentrat, wie auch der Direktsaft, diese Prozessschritte durchlaufen.

Das bedeutet, dass nur der Verlust, der während der Lagerung des abgefüllten Fertigproduktes auftritt, bei der Grenzwertbetrachtung mit einbezogen werden muss. Hier werden die Ergebnisse der Abbaustudie in Tetra Pak bei 20 °C betrachtet, da dies eher der tatsächlichen Lagerung beim Verbraucher entspricht. Bei der Lagerung in den Verpackungsarten Glas und PET wurde ein geringerer Abbau beobachtet.

Ergebnisse und Diskussion

In Tab. 20 ist die von Wolter¹⁸⁵ ermittelte Abbaurate auf den Median der Estersumme angewendet worden, um somit die Estersumme nach zehn-monatiger Lagerung zu bestimmen.

Tab. 20: Anwendung der Abbaurate der Lagerung des Fertigproduktes auf den Median der Estersumme der authentischen, industriell hergestellten Apfeldirektsäfte

	Estersumme [$\mu\text{g}/\text{L}$]
Median [$\mu\text{g}/\text{L}$]	520
Verlust von 60% [$\mu\text{g}/\text{L}$]	312
Nach Abzug des Verlustes [$\mu\text{g}/\text{L}$]	208

Aufgrund des ermittelten MedIANES, aus den Analysen dieses Projektes, der Estersumme der authentischen Säfte aus industrieller Pressung wird für die Mindestaromatisierung unter Berücksichtigung möglicher Verluste während der Lagerung von Apfelsäften aus Konzentrat ein Gehalt 200 $\mu\text{g}/\text{L}$ Estersumme vorgeschlagen.

6.6 Chemometrische Datenanalyse zur Klassifizierung von Apfelsäften

Bei großen Datenmengen oder komplexen Zusammenhängen ist es dem Anwender nicht immer möglich, den Blick für die wesentlichen Merkmale zu schärfen. Ein Hilfsmittel stellt in diesem Fall die multivariate Datenanalyse dar. Sie systematisiert Merkmale und kann die betrachteten Proben daraufhin klassifizieren. Eine Einteilung ist häufig nicht anhand einzelner Merkmale oder Kennzahlen zu ermitteln sondern ist erst nach Vergleich vieler markanter Punkte ersichtlich¹⁸⁶. Mit chemometrischer Software kann die multivariate Datenanalyse durchgeführt werden. Ein Beispiel für eine solche Software ist das Programm Pirouette Lite Classify® der Firma Infometrix, welche für die Erstellung des Modells zur Klassifizierung von Apfeldirekt- und Konzentratsäften genutzt wurde.

Basierend auf einer Definition von Kowalski^{187,188}, welche auch von der International Chemometrics Society offiziell verwendet wird, kann man die Chemometrie wie folgt beschreiben¹⁸⁹.

„Die Chemometrie ist eine chemische Teildisziplin, die mathematische und statistische Methoden nutzt, um chemische Verfahren und Experimente optimal zu planen, durchzuführen und auszuwerten, um so ein Maximum an chemisch relevanten, problembezogenen Informationen aus den experimentellen Messdaten zu gewinnen.“ Die Bezeichnung „Chemometrics“ wurde 1971 von Wold etabliert¹⁸⁹.

Die erste Formulierung der Hauptkomponentenanalyse (PCA) geschah durch Pearson¹⁹⁰. Malinowski hat die PCA 1960 in der Chemie bekannt gemacht¹⁹¹. Einige der frühen Anwendungen haben sich mit der Herkunftsbestimmung von Olivenöl¹⁹², Brandy¹⁹³, Wein¹⁹⁴ und Mineralwasser¹⁹⁵ beschäftigt.

Ebenso kann die Chemometrie bei der Aufklärung von komplexen Wechselwirkungen zwischen Antibiotika und DNA¹⁹⁶, zur Differenzierung von Substanzgemischen verschiedener Hersteller¹⁹⁷, bei der Herkunftsbestimmung von Honigen¹⁹⁸, zur Vorhersage von Aromaeigenschaften von Wein¹⁹⁹ usw. eingesetzt werden.

Bei Früchten wird die Chemometrie zum Beispiel zur Bestimmung der Herkunft von Orangensaft (Florida oder Brasilien)²⁰⁰, der Reife von Äpfeln²⁰¹, der Apfelsorte²⁰² und der Hitzebehandlung von Apfelsäften²⁰³ angewendet.

Allgemeine Vorangehensweise bei der Erstellung und Anwendung eines chemometrischen Modells^{204,205}:

- Daten sichten
- Preprocessing wie benötigt
- Berechnen des Modells
- Sichten der Ergebnisse/Validierung des Modells
- Einsatz des Modells für Vorhersagen
- Validierung der Vorhersagen

Für folgende Fragestellungen/Aufgaben sollte ein chemometrisches Modell erstellt werden:

- Routinemäßige Prozesskontrolle ohne Einzelauswertung
- Beurteilung von Handelsproben
- Nachweis von Aromenzusätzen zu Direktsäften

Häufig werden zur Erstellung eines chemometrischen Modells, bei Einsatz eines Massenselektiven Detektors (MSD), die Scan-Nummer, das m/z- Verhältnis und die jeweilige Intensität verwendet. Bei der Analyse von Apfeleromastoffen lassen die MSD-Daten keine aussagekräftige Klassifizierung zu, da die detektierten Fragmente aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der Aromastoffe untereinander nicht charakteristisch für einen Analyten sind. Als Datengrundlage (Rohdaten) wurden die ermittelten Konzentrationen (in µg/L) folgender Aromastoffe von 49 Apfeldirektsäfte (ASD) und 119 Apfelsäfte aus Konzentrat (ASK) genutzt:

- | | |
|--------------------------------------|------------------------------|
| • Ethylisobutyrat (1) | • Methyl-2-methylbutyrat(2) |
| • Ethylbutyrat (3) | • Butylacetat (4) |
| • Hexanal (5) | • Ethyl-2-methylbutyrat (6) |
| • 3-Methylbutylacetat (7) | • 2-Methylbutylacetat (8) |
| • <i>trans</i> -2-Hexenal (9) | • Amylacetat (10) |
| • Methylhexanoat (11) | • Ethylhexanoat (12) |
| • Benzaldehyd (13) | • Hexylacetat (14) |
| • <i>trans</i> -2-Hexenylacetat (15) | • Hexyl-2-methylbutyrat (16) |
| • Damascenon (17) | |

6.6.1 Hauptkomponentenanalyse (PCA)

Die Hauptkomponentenanalyse (PCA, Principal Component Analysis) ist, wie auch die HCA (Hierarchical Cluster Analysis), eine untersuchende Analyse. Aus den Daten werden optimale Linearkombinationen gebildet. Linearkombinationen kann man als neue künstliche Variablen ansehen, die nicht direkt messbar sind. Sie können mehr Informationen übermitteln als die ursprünglichen Variablen. Die PCA beruht auf der Varianz der neuen Variablen, die in einem orthogonalen Koordinatensystem platziert werden.

Bevor das Modell berechnet werden kann, müssen die Daten preprocessed (vorbearbeitet) werden. Durch diese Bearbeitungen können irrelevante Varianzen entfernt oder reduziert werden.

Für die Hauptkomponentenanalyse, zur Gruppierung der Direkt- und Konzentratsäfte, wurden die Operationen Autoskalierung und Normalisieren gewählt.

Autoskalierung

Das „preprocessing“ wird vor der ersten Analyse auf die Daten angewendet, um unerwünschte Quellen von Varianz zu entfernen oder zu reduzieren²⁰⁵. Autoscaling beinhaltet die Anwendung des „Variance scaling“ und „mean centering“. Der Mittelwert der Variable wird auf 0 gesetzt und die Standardabweichung auf 1. Nach dieser Operation haben kleinere Werte eine größere diagnostische Wirkung²⁰⁶. Dieser Schritt sollte bei dem Einsatz von MSD Daten überdacht werden, da hierdurch auch das Rauschen einen größeren Einfluss hat, welcher aber bei nicht aussagekräftigen Signalen nicht erwünscht ist.

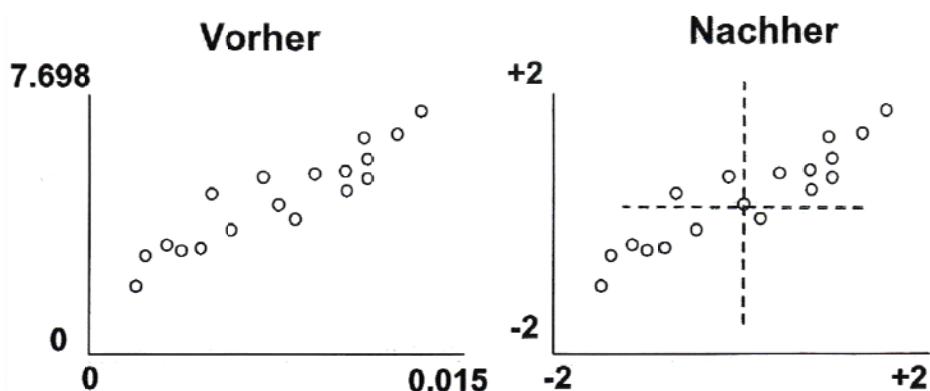


Abb. 48: Lage von Datenpunkten vor und nach der Anwendung der Funktion Autoskalierung²⁰⁶, links: Koordinatensystem vor Autoskalierung, rechts: Nach der Skalierung mit einer Standardabweichung von 1

Normalisierung

Beim Normalisieren der Rohdaten werden alle Proben auf die gleiche Größenordnung gesetzt. Damit wird der Einfluss des absoluten Wertes eliminiert. Abb. 49 und Abb. 50 zeigen den Effekt der Normalisierung auf die für die Klassifizierung von Apfelsäften eingesetzten Rohdaten. Die Rohdaten lassen noch keinen eindeutigen Unterschied zwischen den ASD (rot) und den ASK (blau) erkennen. Die normalisierten Daten zeigen bereits besser zu unterscheidende Gruppen.

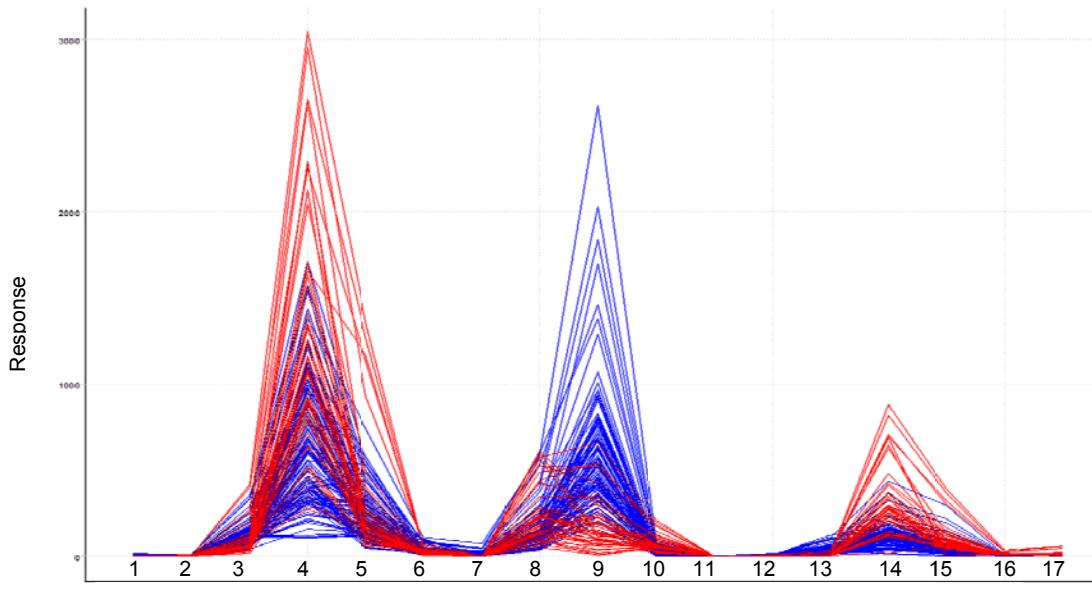


Abb. 49: Rohdaten für die Klassifizierung von Apfeldirekt- und Konzentratsäften
(Datenbeschriftung siehe S. 95)

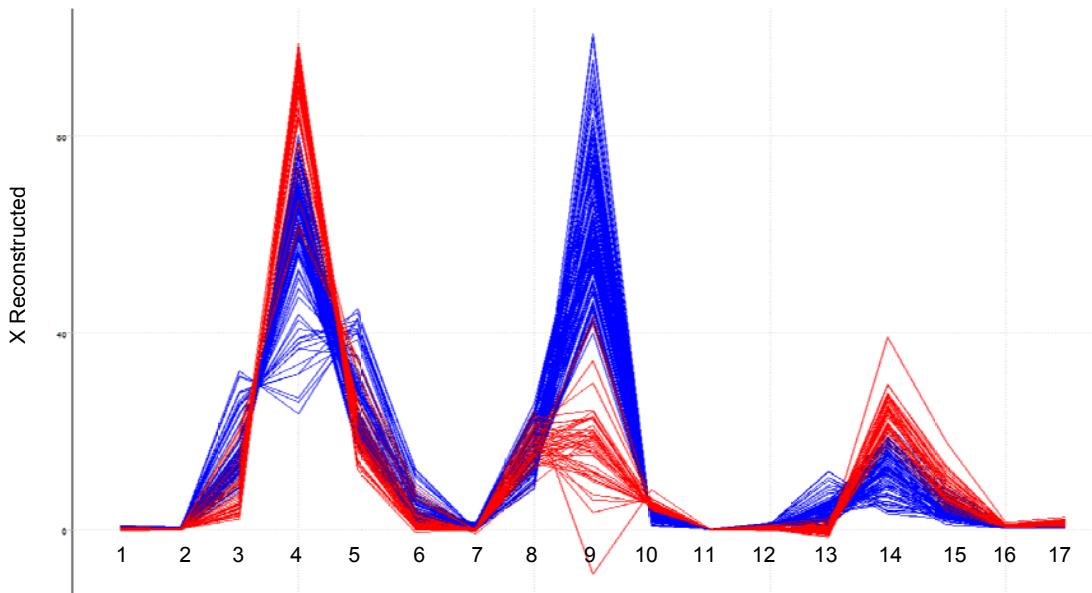
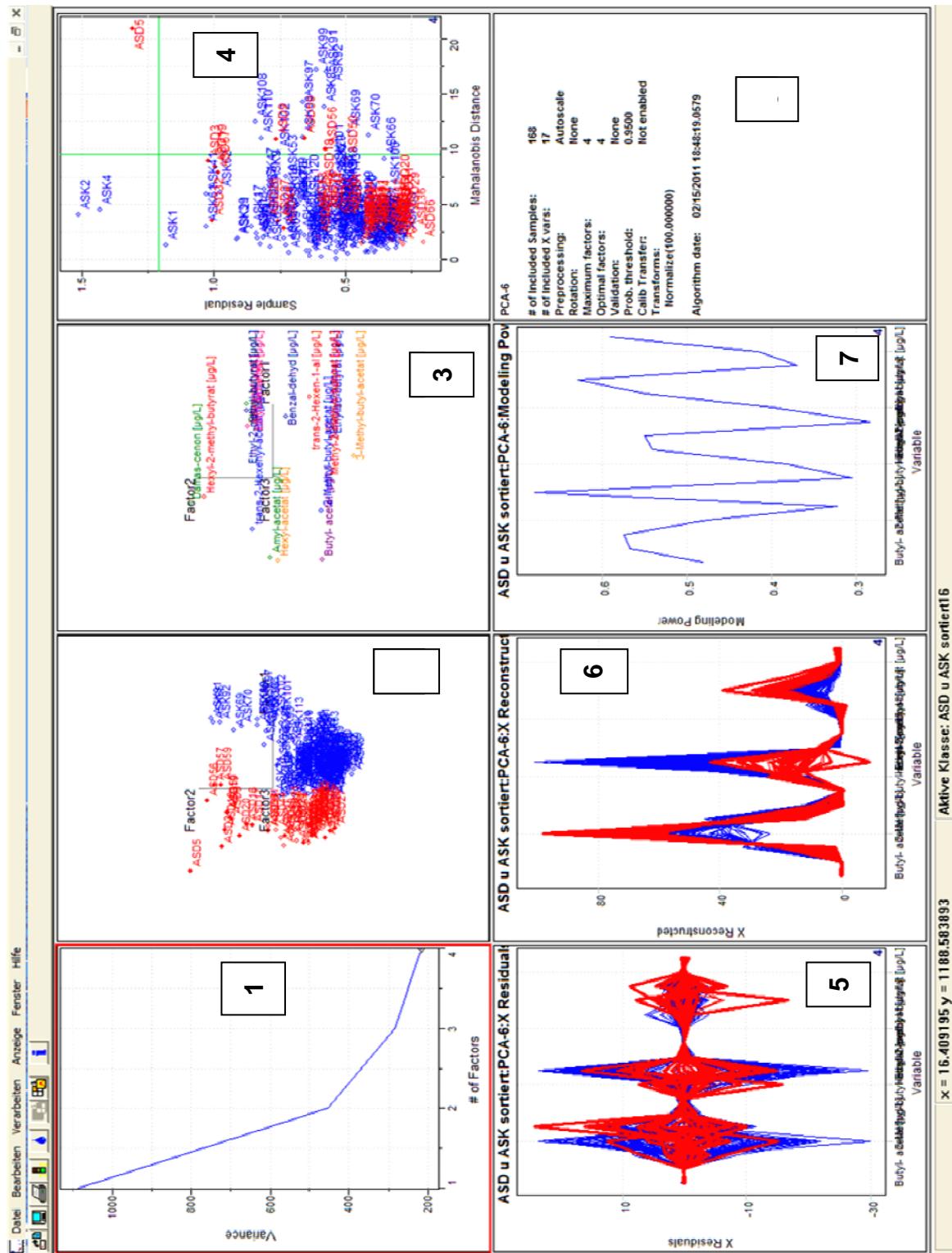


Abb. 50: Normalisierte Daten für die Klassifizierung von Apfeldirekt- und Konzentrat-
säften (Datenbeschriftung siehe S. 95)

Ergebnis der Hauptkomponentenanalyse

Abb. 51 zeigt die einzelnen Ergebnisfenster der PCA der Pirouette Software.

- 1: Factor Select - Das erste Ergebnisfenster zeigt an, dass bei Einbeziehung von 4 Hauptkomponenten bereits 71,85% der Varianz berücksichtigt wird.
- 2: Scores - Das Feld „Scores“ (Vergrößerung siehe Abb. 52) zeigt graphisch die Gruppenbildung. Die Direksäfte (rot) bilden eine Gruppe, ebenso die Konzentratsäfte (blau). Die Proben sind im neuen Koordinatensystem abgebildet.
- 3: Loading - Die „Loadings“ zeigen an, welche Variable am wichtigsten ist und zu jeder Hauptkomponente beiträgt.
- 4: Outlier Diagnostics - „Outlier Diagnostics“ zeigt an, wie gut jede Probe anhand der Faktoren Sample Residuals, Mahalanobis Abstand und Wahrscheinlichkeit beschrieben wird.
- 5: X Residuals - „Residuals“ zeigt den Unterschied der transformierten Daten.
- 6: X Reconstructed - Das “X Reconstructed”-Fenster (vergrößert Abb. 50) zeigt die transformierten Daten jeder Probe über alle Variablen.
- 7: Modeling Power - Bei der „Modeling Power“ wird der Einfluss jeder Variablen auf die Modellierung dargestellt und ist ein Maß für die Wichtigkeit. Bei Variablen mit niedrigen Werten kann geprüft werden, ob eine Ausschließung sinnvoll ist.
- 8: Notes - „Notes“ stellt die Auflistung einiger Kenndaten der durchgeführten PCA dar.



Die Gruppierung der Apfeldirektsäfte (rote Datenpunkte) und der Apfelsäfte aus Konzentrat (blaue Datenpunkte) nach Anwendung der Autoskalierung und der Normalisierung mit der Hauptkomponentenanalyse war erfolgreich. Die Gruppen zeigen eine klare Trennung.

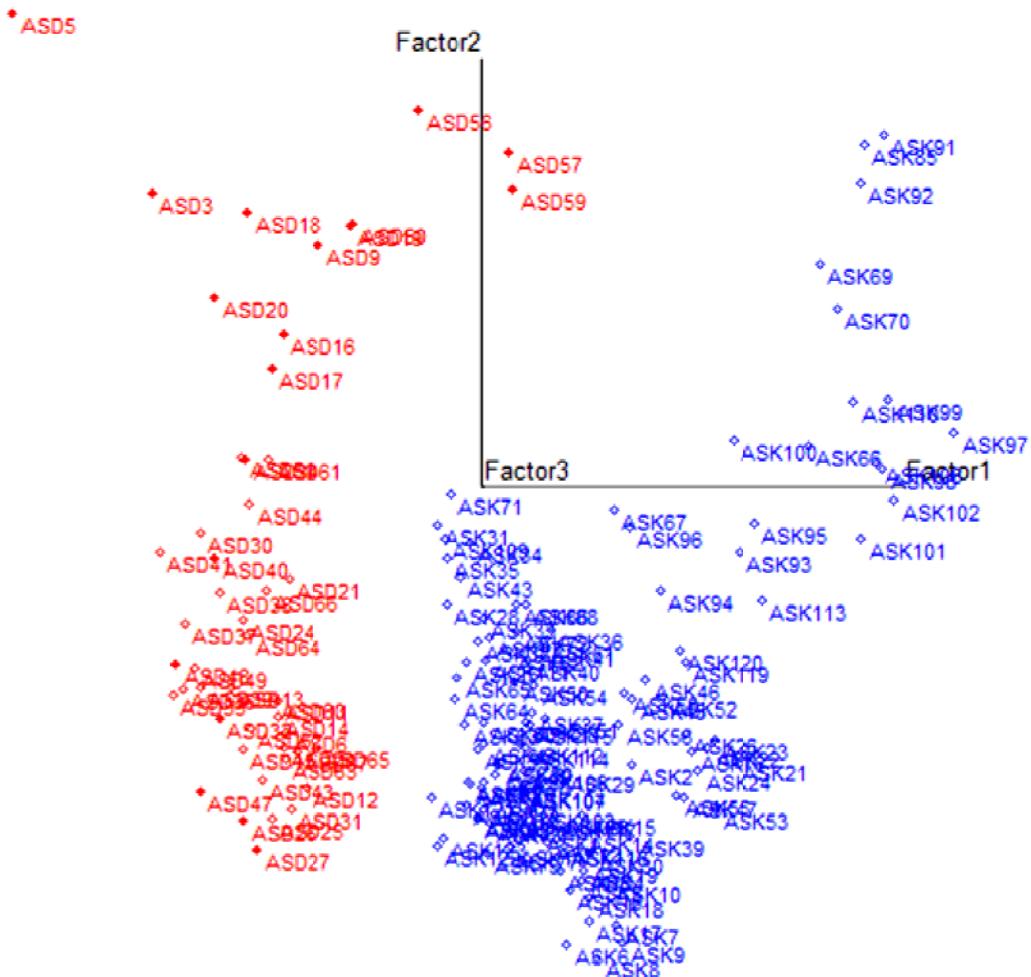


Abb. 52: Scores Diagramm der PCA

6.6.2 Soft Independent Modeling of Class Analogy (SIMCA)

SIMCA gehört zu den Klassifizierungsmethoden. Sie basiert, wie auch die KNN-Methode (K Nearest Neighbors), auf dem Konzept der Nähe. Es wird angenommen, dass wenn ein Satz von Proben einer unbekannten Probe sehr ähnlich ist, diese ein Mitglied dieser Gruppe ist. Vorgestellt wurde die SIMCA Methode erstmals 1974 von Wold²⁰⁷.

SIMCA entwickelt eine Hauptkomponentenanalyse für jede Gruppe. Die unbekannte Probe wird jeder Hauptkomponente angepasst und anschließend der Gruppe zugeordnet, welche die beste Übereinstimmung aufzeigt. Wenn keine Übereinstimmung zu finden ist, wird die Probe nicht der nächsten Gruppe zugeordnet, sondern als keiner Gruppe zugehörig definiert.

Ergebnisfenster der SIMCA Analyse (Abb. 53)

- 1: Class Projections
 - Die „Class Projections“ sind eine graphische Darstellung der gebildeten Klassen (CS 1, ASK und CS 2, ASD), vergrößerte Darstellung in Abb. 54.
- 2: Class Distances
 - Bei der Vorhersage einer Probe wird diese jeder Klasse angepasst. Die dabei berechneten Abstände werden in dem Class Distances Objekt angehäuft.
- 3: Class Predicted
 - Bei „Class Predicted“ werden die Proben und ihre zugeordneten Klassen und nächstpassende Klasse aufgelistet.
- 4: Interclass Residuals
 - Anhand der „Interclass Residuals“ kann die Trennung der Klassen untereinander verglichen werden. Das Residuum innerhalb einer Klasse muss dabei geringer sein als das der anderen Elemente.
- 5: Interclass Distances
 - Das Fenster „Interclass Distances“ gibt den Unterschied der Klassen an. Ab einem Wert von 5 sind die Klassen ausreichend getrennt. Für die Gruppen ASD und ASK beträgt der Unterschied 12,5.
- 6: Discriminating Power
 - Die „Discriminating Power“ gibt an, wie stark jede Variable Unterschiede beeinflusst.
- 7: Total Modeling Power
 - „Total Modeling Power“ zeigt die Wichtigkeit einer Variable an (siehe Modeling Power PCA)
- 8: CS 1
 - „CS 1“ zeigt die PCA der Klasse 1
- 9: CS 2
 - „CS 2“ zeigt die PCA der Klasse 2
- 10: Notes
 - „Notes“ stellt die Auflistung einiger Kenndaten der durchgeführten SIMCA dar.

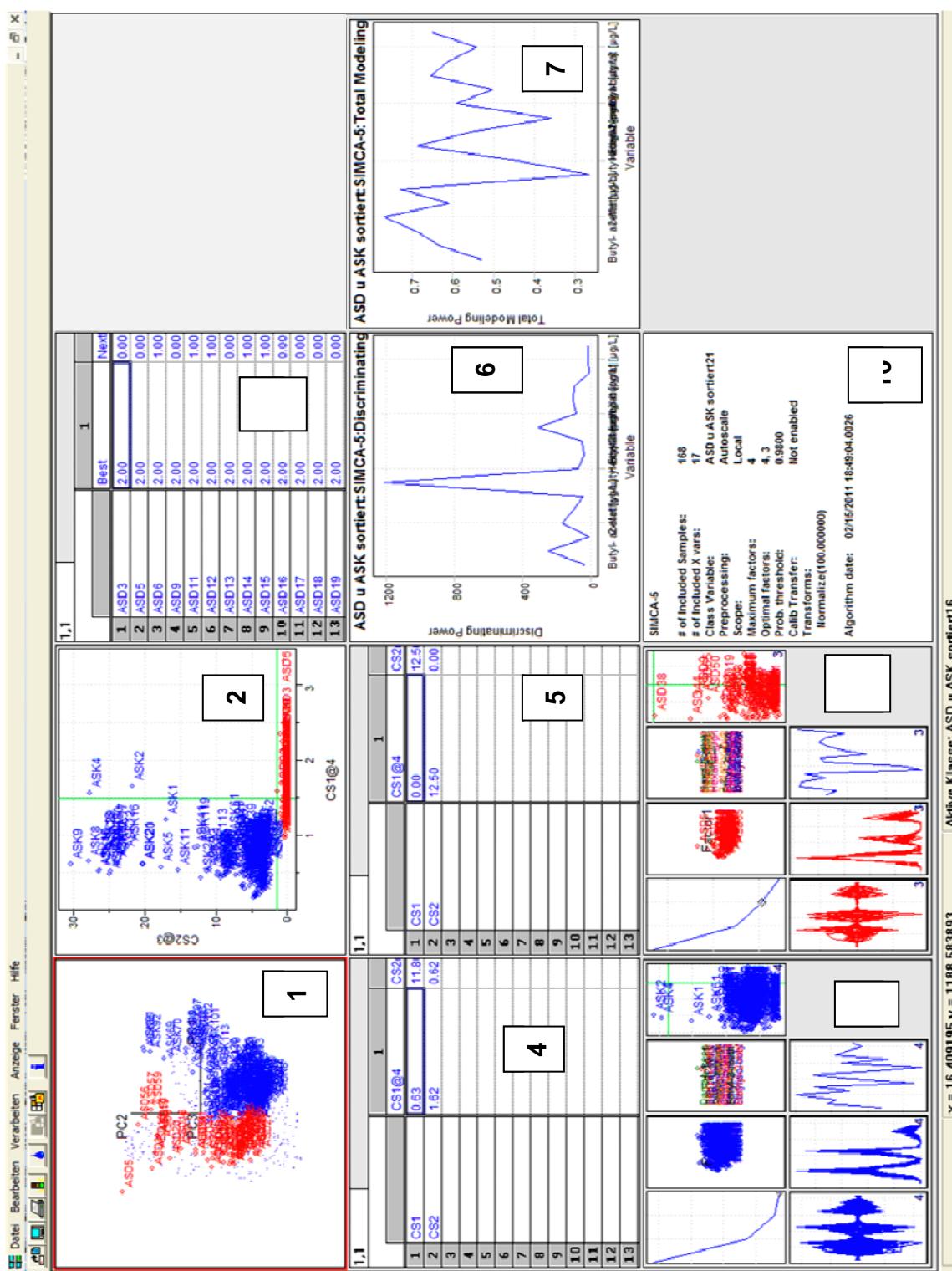


Abb. 53: Ergebnisfenster der SIMCA Analyse zur Klassifizierung von unbekannten Apfeldirektsäften und Apfelsäften aus Konzentrat, Ergebnissfenster 1 in vergrößerter Darstellung in Abb. 54

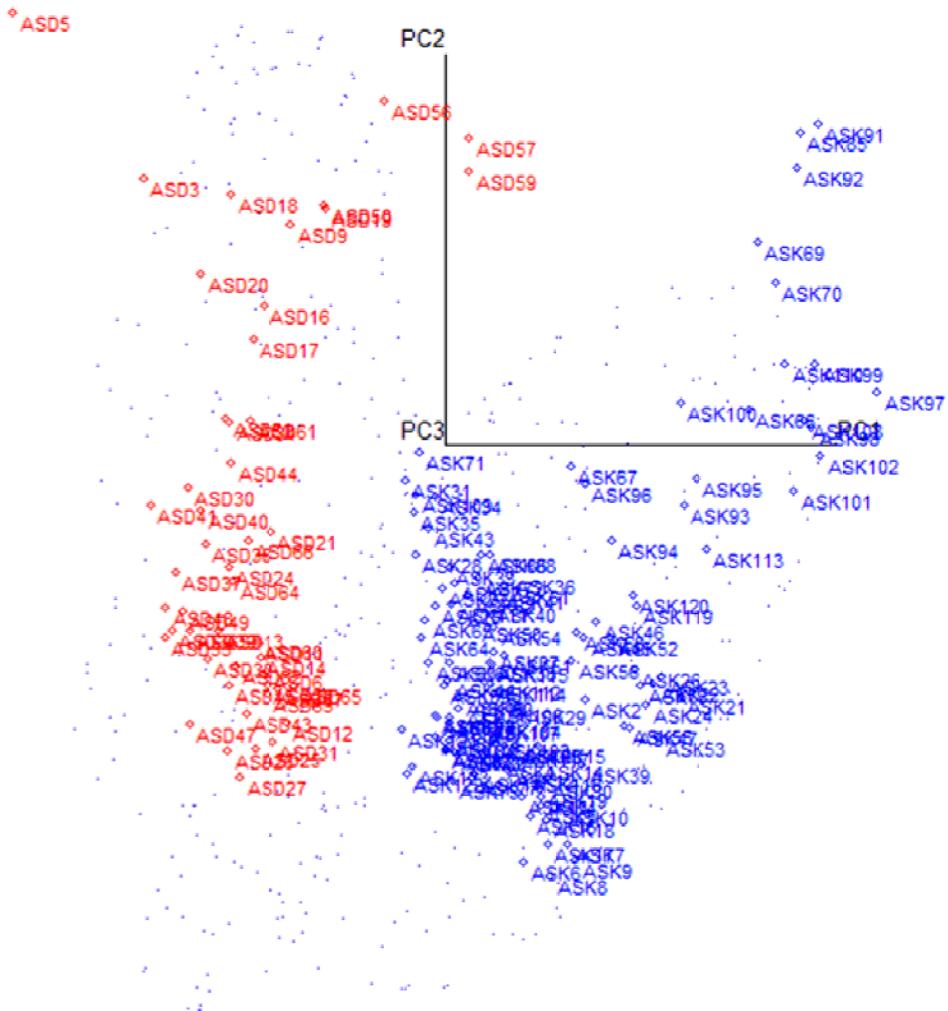


Abb. 54: Graphische Darstellung der gebildeten Klassen (CS 1, blaue Datenpunkte, Apfelsaft aus Konzentrat und CS 2, rote Datenpunkte, Apfeldirektsaft bei 2 Gruppen)

Die „Class Projections“ (Abb. 54) geben ein Bild der Klassentrennung wieder mit den entsprechenden Vertrauensintervallen. Diese Vertrauensintervalle sind als Punktwolke dargestellt. Die unbekannte Probe muss in dem Vertrauensintervall liegen, um der Klasse zugeordnet zu werden.

6.6.3 Anwendungen des chemometrischen Modells

Prozesskontrolle von Apfelsäften

Als erste Anwendung des chemometrischen Modells bot sich die Prozesskontrolle an. Bei der Klassifizierung konnten fast alle Proben einer Klasse zugeordnet werden. Bis auf wenige Ausnahmen wurden die unbekannten Proben den richtigen Klassen zugeordnet. Um den Grund der „fehlerhaften“ Zuordnung zu identifizieren, sollten noch weitere Parameter der Probe im Vorfeld erhoben werden.

Beurteilung von Handelsproben

Im nächsten Schritt wurde geprüft, ob das Modell nur für Säfte der gleichen Herkunft geeignet ist oder auch für Handelsproben. Dazu wurden 30 Apfelsäfte aus Konzentrat und 6 Direktsäfte analysiert und anschließend mit der Pirouettesoftware anhand des beschriebenen Modells klassifiziert.

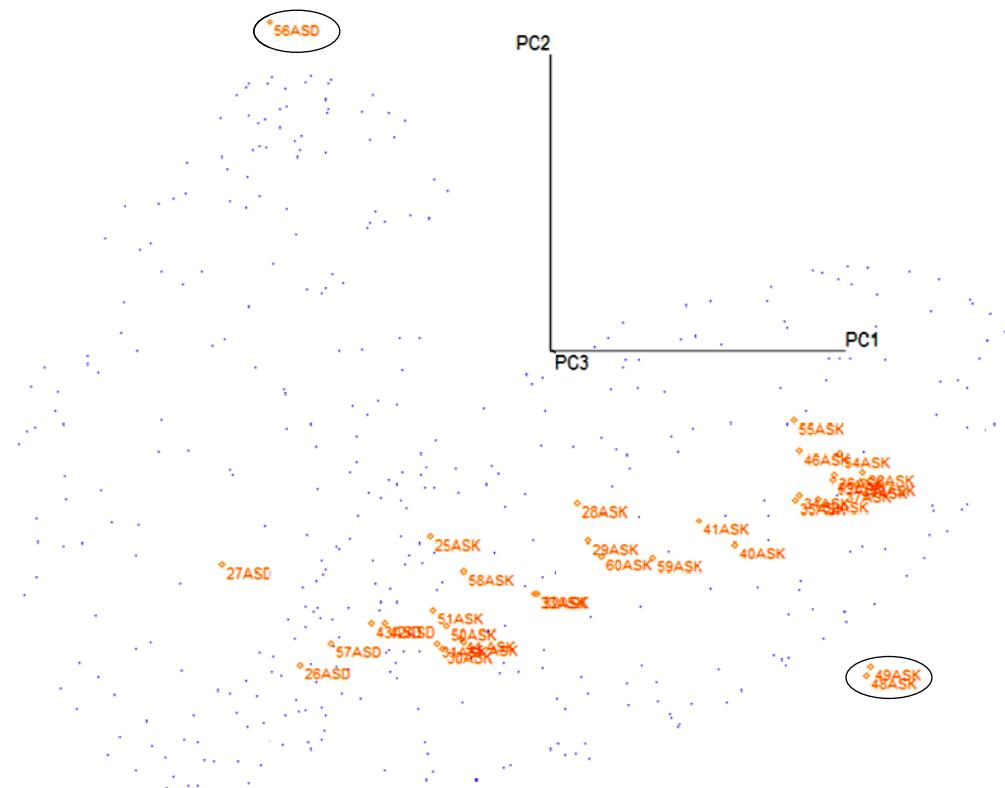


Abb. 55: Graphische Darstellung der Klassifizierung von Handelsproben anhand des chemometrischen Modells, markierte Proben wurden keiner Klasse zugeordnet

Mit Ausnahme von drei Säften (1 ASD, 2 ASK, markiert in Abb. 55), wurden die Säfte entsprechend der Deklaration eingeordnet. Die graphische Darstellung ist in Abb. 55 gezeigt, die Ausnahmen sind markiert. Die drei Ausnahmen wurden nicht der „falschen“ Klasse zugeordnet, sondern keiner Klasse. Damit konnte gezeigt werden, dass das Modell auch auf handelsübliche Apfelsäfte anwendbar ist. Auch bei den hier gefundenen Ausreißern müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden, um die Gründe für die Klassifizierung zu verstehen.

Verfälschung

Ein aromatisierter Direktsaft ist nach derzeitiger FruchtsaftVO als nicht verkehrsfähig einzustufen. Um eine solche Aromatisierung, von z. B. Saft aus überlagerten Äpfeln, nachzuweisen wurde ein chemometrisches Modell verwendet (Kap.6.6.2).

Zur Prüfung der Anwendbarkeit des Modells auf die Aromatisierung eines Direktsaftes wurden damit unterschiedlich stark aromatisierte Direktsäfte klassifiziert. Die Daten dieser Direktsäfte wurden rechnerisch ermittelt. Die Konzentrationen der Aromastoffkomponenten und die Estersumme eines Apfeldirektsaftes wurden mittel SBSE-GC-MS bestimmt. Die Konzentrationen wurden auf 50 - 95% reduziert, und anschließend wurde mit einer 150- und 2500-fachen Apfelwasserphase der Saft rechnerisch rearomatisiert, bis der Wert der Estersumme des ursprünglichen Direktsaftes erreicht war.

Ein Rechenbeispiel ist in Tab. 21 gezeigt. Die Summe wurde von jedem einzelnen Aromastoff vom verdünnten Apfeldirektsaft und der Wasserphase gebildet. Dieses Konzentrationsmuster wurde in die Software eingeben und klassifiziert.

Die in Tab. 22 aufgelisteten Mischungen wurden zur Klassifizierung eingesetzt. Die jeweils zugesetzten Wasserphasen sind mit x gekennzeichnet. Zur Kontrolle des Systems wurden der unverdünnte Direktsaft sowie die beiden Aromen einzeln klassifiziert.

Tab. 21: Beispiel zur Berechnung einer Apfeldirektsaft/Apfelwasserphase-Mischung zur Klassifizierung anhand eines chemometrischen Modells, Angaben in µg/L

Angaben in µg/L	Estersumme	Ethyliso-butyrat	Methyl-2-methylbutyrat	Ethyl-butyrat	Butyl-acetat
ADS	517	0,0	0,9	69,7	1077,0
50% verdünnter ADS	256	0,0	0,6	34,9	538,0
Aroma-WP (150fach)	261	1,7	1,6	62,6	430,5
Mischung (Summe der Aromastoffe)	517	1,7	2,0	97,5	968,5

Hexanal	Ethyl-2-methylbutyrat	3-Methylbutylacetat	2-Methylbutylacetat	trans-2-Hexenal	Amyl-acetat	Methylhexanoat
246,9	12,0	0,0	221,5	168,4	58,1	0,0
123,0	6,1	0,0	110,7	84,2	29,0	0,0
177,8	25,9	0,6	96,6	377,3	21,7	0,6
300,8	31,9	0,6	206,6	461,5	50,7	0,6

Ethylhexanoat	Benzaldehyd	Hexylacetat	trans-2-Hexenylacetat	Hexyl-2-methylbutyrat	Damasceno n
1,5	1,8	210,3	64,5	5,1	9,4
0,8	0,9	105,0	32,0	2,5	4,7
7,5	3,9	65,3	31,3	2,4	1,7
8,2	4,8	170,3	63,3	4,9	6,4

Tab. 22: Mischungen aus Apfeldirektsaft und Apfelwasserphase zur Klassifizierung anhand des chemometrischen Modells

Gehalt an Apfeldirektsaft [%]	Verwendete Abkürzung	Apfel-Wasserphase 150-fach	Apfel-Wasserphase 2500-fach
0	Aroma150	x	-
0	Aroma2500	-	x
50	Vf1	x	-
50	Vf2	-	x
50	Vf3	x	x
70	Vf4	x	-
70	Vf5	-	x
70	Vf6	x	x
90	Vf7	x	-
90	Vf8	-	x
90	Vf9	x	x
95	Vf10	x	-
95	Vf11	-	x
95	Vf12	x	x
100	VfASD	-	-

Das chemometrische Modell hat die beschrieben Säfte/Saftmischungen wie folgt eingeordnet:

Direktsaft: Der Direktsaft wurde der Gruppe der Direksäfte zugeordnet. Dieser konnte daher für die weiteren Berechnungen verwendet werden.

Aromawasserphase: Das *150-fache Aroma* wurde der Konzentratsaftgruppe zugeordnet. Diese Zuordnung wurde erwartet, da diese Wasserphase üblicherweise verwendet wird, um Apfelsaft aus Apfelsaftkonzentrat zu rekonstituieren. Die *2500-fache Apfeleroma-wasserphase* konnte keiner Gruppe zugeordnet werden. Dies kann möglicherweise im Unterschied beim Herstellungsverfahren begründet liegen. Mittels physikalischer Verfahren können bestimmte Aromafraktionen angereichert werden, um damit das Aroma im Endprodukt in eine bestimmte Richtung zu beeinflussen²⁰⁸.

Mischungen: Die Mischungen mit einem Anteil von 50% Direktsaft wurden zu den Konzentratsäften zugeordnet, da hier eine ausreichende Ähnlichkeit zu der Gruppe gegeben ist. Bei den Mischungen mit einem Saftanteil von 70% wurden zwei Proben der Konzentratgruppe zugeordnet. Die dritte konnte, wie auch die Mischungen mit einem Direktsaftanteil von 90 und 95%, keiner Gruppe zugeordnet werden.

Die graphische Auftragung der Zuordnung ist in Abb. 56 dargestellt. In Tab. 23 sind die Zuordnungen der Proben zu den Klassen anhand des Ergebnisfensters „Class Predicted“ aufgelistet, da dies anhand der Abb. 56 nicht eindeutig möglich ist. Die Klasse 1.00 bezeichnet die Konzentratsaftgruppe, 2.00 die Direktsaftgruppe und 0.00 bedeutet das kein Klassenzugehörigkeit gefunden wurde.

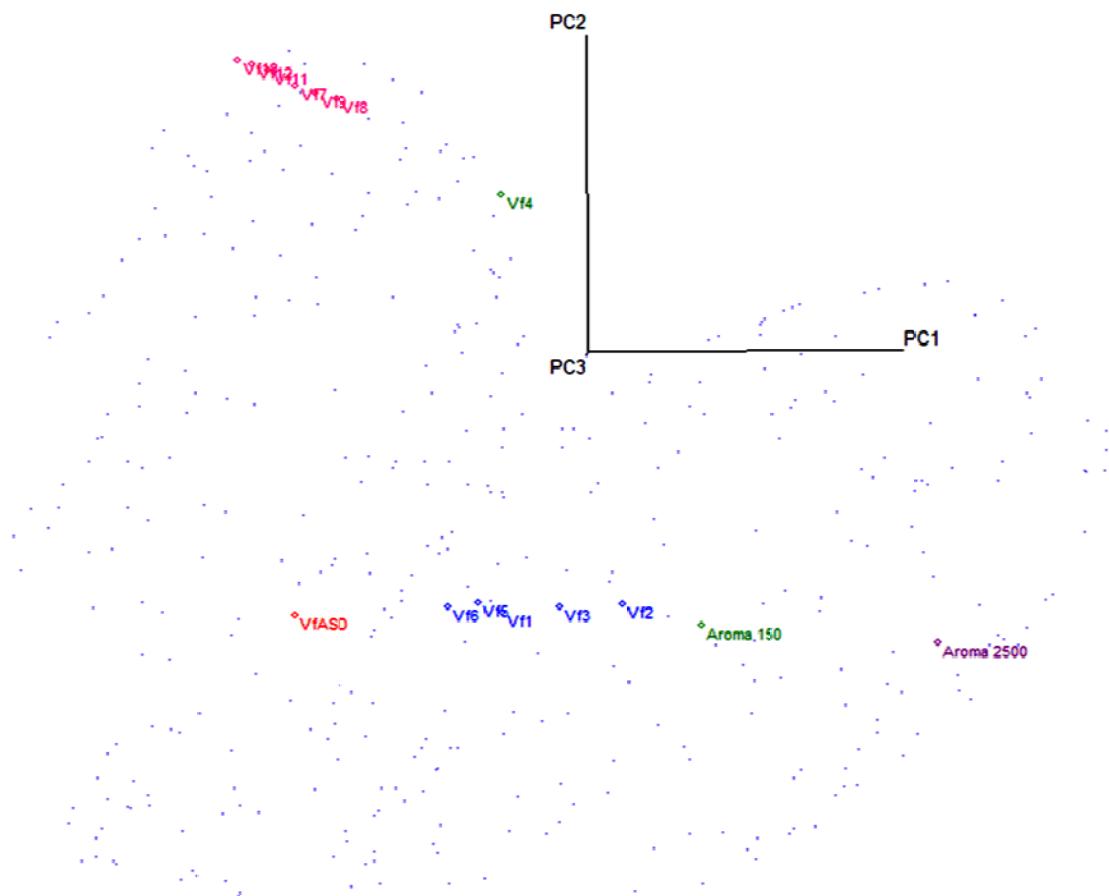


Abb. 56: Ergebnisfenster „Class Projections“ der SIMCA Analyse der Direktsaft/Aromakonzentrat-Mischungen

Tab. 23: Ergebnistabelle der SIMCA Berechnung der Direktsaft/Aromakonzentrat-Mischungen

		1
		Best
1	Vf1	1.00
2	Vf2	1.00
3	Vf3	1.00
4	VfASD	2.00
5	Vf7	0.00
6	Vf8	0.00
7	Vf9	0.00
8	Vf10	0.00
9	Vf11	0.00
10	Vf12	0.00
11	Aroma 150	1.00
12	Aroma 2500	0.00
13	Vf4	0.00
14	Vf5	1.00
15	Vf6	1.00

Das hier vorgestellte chemometrische Modell hat eine Möglichkeit zur Klassifizierung von authentischen industriell gepressten Apfelsäften wie auch Apfelsäften aus dem Handel geliefert. Mit dem Modell war es zudem möglich erste Ansätze zur Klassifizierung von aromatisierten Direktsäften aufzuzeigen. Es ist jedoch unumgänglich, den Datenbestand um eine größere Anzahl an Analysen und weitere Parameter je Probe zu erweitern. Nur so können präzisere Aussagen getroffen werden.

7. Zusammenfassung und Ausblick

Die Fruchtsaft-Verordnung sagt über einen Saft aus Konzentrat: „Das auf diese Art gewonnene Erzeugnis muss im Vergleich zu einem durchschnittlichen [...] Saft zumindest gleichartige organoleptische und analytische Eigenschaften aufweisen“². Um dies zu gewährleisten, bedarf es einer gleichberechtigten analytischen und sensorischen Begutachtung. Eine aussagekräftige Aroma-Analytik mit nachvollziehbaren Mindestwerten und einer sensorischen Bewertung nach anerkannten Prüfmethoden ist wichtig, um dem Verbraucher ein qualitativ hochwertiges Produkt anbieten zu können.

Die bislang am häufigsten angewendete Methode zur Quantifizierung von Aromastoffen in Apfelsäften ist die Simultane Destillation-Extraktion-Headspace-Gaschromatographie-Massenspektrometrie (SDE-HS-GC-MS). Diese ist jedoch sehr zeit- und Lösemittel-aufwendig und braucht einen erfahrenen Anwender zur Durchführung^{8,163}.

Eine Methode der Probenaufarbeitung, die weniger Zeit und Lösemittel benötigt, und auch von Mitarbeitern mit weniger Erfahrung anwendbar ist, ist die Stir-Bar-Sorptive-Extraction-Gaschromatographie-Massenspektrometrie (SBSE-GC-MS).

Nach der Entwicklung und Optimierung der Probenvorbereitung mit dem Twister®, der chromatographischen Trennung und der Detektion wurden die Methoden zur Quantifizierung von Aromastoffen in Apfeldirektsäften, Apfelsäften aus Konzentrat und Apfelaromawasserphasen und zur Quantifizierung von Ethylbutyrat in Orangensaft validiert und in der Routineanalytik angewendet. Alle Analyten zeigten in den jeweiligen Arbeitsbereichen Linearität mit Bestimmungsgrenzen der Aromastoffe zwischen 0,1 - 27,7 µg/L und entsprechen den Anforderungen der gewählten Arbeitsbereiche. Die Präzision, innerhalb eines Tages und nach mehreren Tagen, liegt zwischen 2,9 und 11,3%. Im Vergleich zu anderen SBSE Methoden zeigen die hier entwickelten Methoden zur Aromastoffquantifizierung in Apfel- und Orangensaft gute Reproduzierbarkeiten¹⁵⁸. Literaturdaten zum direkten Vergleich der Anwendungen des Twister bei Apfelsäften liegen bislang nicht vor.

Die Vergleichbarkeit der SBSE-Methode zur SDE- und HS-Methode wurde anhand der Teilnahme an einer Laborvergleichsuntersuchung (LVU) bestätigt. Diese LVU mit anschließender Analyse von Apfeldirekt- und Konzentratsäften wurde von der Projektgruppe „Beurteilungskriterien für Apfelsaftaromen“ initiiert. Die gewonnenen Daten sollten einen Beitrag zur Diskussion über mögliche Beurteilungskriterien und Summenparameter leisten. Die Ergebnisse wurden im Flüssigen Obst 2011 veröffentlicht¹⁸³.

Anhand der gewonnenen Daten aus eigenen Analysen von authentisch gepressten Apfeldirektsäften wurde ein Mindestwert der Estersumme von 200 µg/L für die Rearomatisierung eines Apfelsaftes aus Konzentrat vorgeschlagen. Dieser wurde aus dem Median der Esterumme von 520 µg/L (aus 110 Analysen) unter Berücksichtigung des Abbaus von Aromastoffen während der Lagerung ermittelt. Der Median der authentischen, industriell gepressten Säfte wurde durch die Analyse von 41 Handelssäften (Direktsäfte, Median der Esterumme 519 µg/L) und durch die Testergebnisse der Stiftung Warentest (Summe der Ester im Durchschnitt 550 µg/L) bestätigt⁶.

Durch die Festlegung eines Wertes zur Mindestaromatisierung von Apfelsaft soll nicht nur der Produzent bei der Herstellung gesetzeskonformer Produkte mehr Sicherheit erhalten, auch der Verbraucherschutz hat damit die Möglichkeit die in Verkehr gebrachten Apfelsäfte objektiv nach ihrer Aromaqualität zu beurteilen.

Die Fruchtsaftverordnung definiert das einem Direktsaft nur Bestandteile wieder zugefügt werden dürfen die bei der Verarbeitung abgetrennt wurden, wie aus dem Saft stammendes Aroma, Fruchtfleisch und Zellen. Um eine, demnach verbotene, Aromatisierung eines Apfeldirektsaftes nachzuweisen, wurden Apfeldirektsäfte und Säfte aus Konzentrat auf Markersubstanzen analysiert. In Säften aus Konzentrat konnten unter Einsatz der SBSE-TD-GC-MS-Technik keine charakteristischen Substanzen (Markersubstanzen) identifiziert werden, die auf eine Rearomatisierung hingewiesen haben. Auch beim Vergleich von Verhältniszahlen (Quotienten) verschiedener Aromastoffe untereinander konnten keine charakteristischen Unterschiede festgestellt werden.

Im nächsten Schritt wurde für diese Fragestellung mit der chemometrischen Software Pirouette® ein Modell auf Grundlage von authentischen, industriell gepressten Direktsäften und Konzentratsäften erstellt. Dieses Modell kann auch auf unbekannte Handelsproben angewendet werden. Bei der Klassifizierung eines mit Aroma versetzten Direktsaftes konnte anhand des chemometrischen Modells eine Veränderung festgestellt werden. Bei starker Rearomatisierung zeigte dieser Saft eine große Ähnlichkeit zu Konzentratsäften und wurde der Gruppe der Konzentratsäfte zugeordnet, bei geringerer Rearomatisierung konnte das Modell erkennen, dass weder mit der Gruppe der Konzentratsäfte noch mit der Gruppe der authentischen, industriell gepressten Direktsäfte ausreichende Übereinstimmung besteht.

Dieses chemometrische Modell sollte durch die Erhebung weiterer Daten, wie z. B. dem Methanolgehalt, und weitere Analysen von Säften aussagekräftiger gemacht werden. Die Aromatisierung der Direktsäfte sollte in der Praxis erprobt werden um die Klassifizierung des Modells zu überprüfen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die SBSE-TD-GC-MS-Methoden zur Quantifizierung von Aromastoffen in Apfel- und Orangensaft erfolgreich optimiert, validiert und in der Routine eingesetzt wurden. Das chemometrische Modell hat eine Möglichkeit zur Erkennung von aromatisierten, und damit nicht verkehrsfähigen, Direktsäften gezeigt. Ein Wert von 200 µg/L wurde für die Mindestaromatisierung von Apfelsaft aus Konzentrat auf Grundlage von Analysen von authentischen Direktsäften vorgeschlagen.

8. Literatur

- 1 DLG; "Flüssiges Obst" im Expertentest; Pressemitteilung, http://www.dlg.org/aktuelles_ernaehrung.html?detail/dlg.org/4/1/3158 (25.09.2011)
- 2 Fruchtsaftverordnung vom 24. Mai 2004 (BGBl. I S. 1016); *Mit dieser Verordnung wird die Richtlinie 2001/112/EG des Rates vom 20. Dezember 2001 über Fruchtsäfte und bestimmte gleichartige Erzeugnisse für die menschliche Ernährung (ABl. EG 2002 Nr. L 10 S. 58) in deutsches Recht umgesetzt*, http://www.gesetze-im-internet.de/bundesrecht/frsaftv_2004/gesamt.pdf
- 3 RSK-Werte- Die Gesamtdarstellung, Richtwerte und Schwankungsbreiten bestimmter Kennzahlen mit überarbeiteten Analysemethoden; Verlag Flüssiges Obst GmbH, 1. Auflage, 1987
- 4 H.-J. Hofsommer, H.-J. Bielig, *Ein Beitrag zur Aussagekraft der RSK-Werte*; Flüssiges Obst, 237-243, **1982**
- 5 A.I.J.N. CODE OF PRACTICE, Reference Guide Apple - Revision May 2011, Reference Guide Orange Revision July 2009
- 6 Stiftung Warentest; *Das Aroma macht den Unterschied*; test, 20-26, 9, **2009**
- 7 Stiftung Warentest; *Billig und schlecht*; test, 18-23, 5, **2007**
- 8 A. Chaintreau, *Simultaneous distillation-extraction: from birth to maturity-review*, Flavour and Fragrance Journal, Flavour Fragrance, 16, 136-148, **2001**
- 9 Wirtschaftsvereinigung Alkoholfreie Getränke e.V., <http://www.wafg.de/pdf/branche/prokopf.pdf> (25.09.2011)
- 10 Birnbaum, G.; *Weitere Strukturveränderungen - der Markt der fruchthaltigen Getränke*; Getränkefachgroßhandel, 3, 135-139, **1999**
- 11 Sattler, S.; *Auf das "Extra" kommt es an*; gv praxis; 6, 56-58, **2007**
- 12 Verband der deutschen Fruchtsaft-Industrie e. V., http://www.fruchtsaft.org/downloads/information_verbraucher//VdF_DatenFakten_10_de.pdf (25.09.2011)
- 13 *Leitsätze für Erfrischungsgetränke vom 27.11.2002*, <http://www.bmelv.de/cae/servlet/contentblob/379756/publicationFile/25947/LeitsaetzeErfrischungsgetraenke.pdf> (25.09.2011)
- 14 R. Silbereisen, G. Götz, W. Hartmann; *Obstsortenatlas*; Verlag Eugen Ulmer, 2. Auflage, **1996**
- 15 F. Mühl; *Alte und neue Apfelsorten*, Obst- und Gartenbauverlag München, 6. Auflage, **2007**
- 16 U. Schobinger; *Handbuch der Lebensmitteltechnologie Frucht- und Gemüsesäfte*; 3. Auflage, Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, **2001**
- 17 *Obst- und Gemüseverzehr in Deutschland*; Zentrale Markt- und Preisberichtsstelle für Erzeugnisse der Land-, Forst- und Ernährungswirtschaft GmbH, **2001**

-
- 18 K. Herrmann; *Inhaltsstoffe von Obst und Gemüse*; Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, **2001**
- 19 Verband der deutschen Fruchtsaft-Industrie e. V.; *Wertvoller Genuss*,
http://www.fruchtsaft.net/index.php?menu_sel=1&menu_sel2=5&menu_sel3=&menu_sel4=&msg=37 (25.09.2011)
- 20 Verband der deutschen Fruchtsaft-Industrie e. V.; *Apfelsaft in aller Munde*,
<http://cms3.fruchtsaft.net/downloads/information/Apfelsaft.pdf> (25.09.2011)
- 21 Verband der deutschen Fruchtsaft-Industrie e. V.; *Fachinformation Fruchtsaft-Ein pflanzliches Lebensmittel*;
http://cms3.fruchtsaft.net/downloads/produkte/Erbaehrung/Download_Fachtexte.pdf (25.09.2011)
- 22 J. Orzmienski, M. Wolniak, A. Wojdylo, I. Wawer; *Comparative study of polyphenolic content and antiradical activity of cloudy and clear apple juices*; Journal of the Science of Food and Agriculture, 87, 573-579, **2007**
- 23 S.W. Barth, C. Faehndrich, A. Sub, B. Watzl, F. Will, H. Dietrich, G. Rechkemmer, K. Briviba; *Cloudy Apple Juice is More Effective than Apple Polyphenols and an Apple Juice Derived Cloud Fraction in a Rat Model of Colon Carcinogenesis*; Journal of Agricultural and Food Chemistry; 55; 4; 1181-1187; **2007**
- 24 C. Schirarend, M. Heilmeyer; *Die Goldenen Äpfel: Wissenswertes rund um die Zitrusfrüchte*; GH Verlag Berlin, **1996**
- 25 P. Klock, M. Klock, T. Klock; *Das große Ulmer-Buch der Zitruspflanzen*; Eugen Ulmer KG; Stuttgart; **2007**
- 26 I. Goñi, M. E. Díaz-Rubio, J. Pérez-Jiménez, F. Saura-Calixto; *Towards an updated methodology for measurement of dietary fiber, including associated polyphenols, in food and beverages*; Food Research International, 42, 7, 840-846, **2009**
- 27 C. Heineken; *Aromafraktion der Citrusfrüchte*; Vortrag, Fruchtsäfte, fruchtsafthaltige Getränke: Technologie, Untersuchung und Beurteilung, Berlin, 10.-12. September, **2008**
- 28 R. Ebermann, I. Elmada; *Lehrbuch Lebensmittelchemie und Ernährung*; Springer, Kap. 10, **2008**
- 29 D. G. Laing, A. Jinks; *Flavour perception mechanisms*; Trends in Food Science & Technology, 7, 387-389, **1996**
- 30 Patrick J. Lynch; Illustrator; C. Carl Jaffe; MD; Cardiologist Yale University Center for Advanced Instructional Media Medical Illustrations by Patrick Lynch, generated for multimedia teaching projects by the Yale University School of Medicine, Center for Advanced Instructional Media, 1987-2000, <http://patricklynch.net>, Head anatomy with olfactory nerve
- 31 F. Netter, A. Brass, G. Krämer; *Nervensystem 1. Neuroanatomie und Physiologie*; Stuttgart, Thieme (Farbatlanten der Medizin = The Ciba collection of medical illustrations / Konzept und Ill.: Frank H. Netter), Sek. 5 und 8, **1987**
-

- 32 Marian Sigler, Aufbau der Riechschleimhaut,
<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/1/1b/Riechschleimhaut.svg?uselang=de> (25.09.2011)
- 33 *Der Mensch*; Dorling Kindersley Limited, London; S. 128, **2005**
- 34 K.-H. Plattig; *Spürnasen und Feinschmecker*; Springer Verlag; **1995**
- 35 M. Morrison, S. Gan, C. Dubelaar, H. Oppewal; *In-store music and aroma influences on shoppers behavior and satisfaction*; *Journal of Business research*; Journal of business Research, 64, 6, 558-564, **2011**
- 36 Der Geschmackssinn, http://www.schule-untervaz.ch/netdays/riechen_schmecken_tommy/geschmacksinn.htm(25.09.2011)
- 37 JE. Stewart, C. Feinle-Bisset, M. Golding, C., Clifton, PM. Keast; *Oral sensitivity of fatty acids, food consumption and BMI in human subjects*; British Journal of Nutrition, 104, 145-152, **2010**
- 38 J. Todrank, G. Heth, D. Restrepo; *Effects of in utero odorant exposure on neuro-anatomical development of the olfactory bulb and odour preferences*; Proceedings of the Royal Society B; 278, 1714, 1949-1955, **2011**
- 39 K. J. Eskine, N. A. Kacinik, J. J. Prinz; *A Bad Taste in the Mouth: Gustatory Disgust Influences Moral Judgment*; Psychological Science, 22, 3, 295-299, **2011**
- 40 H.-D. Belitz, W. Grosch, P. Schieberle; *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*; 6.Auflage, Springer; Berlin, Kap. 5, **2008**
- 41 K. Schumacher, U. Hener, C. Patz, H. Dietrich, A. Mosandl; *Authenticity assessment of 2- and 3-methylbutanol using enantioselective and/or 13C/12C isotope ratio analysis*; European Food Research and Technology, 209, 12-15, **1999**
- 42 K. Peter, C. Vollhardt; *Organische Chemie*; VCH Verlag, 1. Auflage, Kap. 5, **1988**
- 43 E. Brenna, C. Fuganti, S. Serra; *Enantioselective perception of chiral odorants*; Tetrahedron: Asymmetry. 14, 1, 1-42, **2003**
- 44 A. Mosandl; *Echtheitsbewertung von Fruchtaromen mittels enantio-selektiver Kapillargaschromatographie*; Flüssiges Obst, 63, 7, 386-390, **1996**
- 45 C. Bicchi, A. D'Amato, P. Rubiolo; *Cyclodextrin derivatives as chiral selectors for direct gas chromatographic separation of enantiomers in the essential oil, aroma and flavour fields*; Journal of Chromatography A, 843, 1-2, 99-121, **1999**
- 46 E. Ziegler; *Die natürlichen und künstlichen Aromen*; Huthig-Verlag; Heidelberg, Kap. 2, **1982**
- 47 *Aromenverordnung (Artikel 22 d. Verordnung zur Neuordnung lebensmittelrechtlicher Kennzeichnungsvorschriften) in der Fassung der Bekanntmachung vom 2. Mai 2006 (BGBl. I S. 1127), die zuletzt durch Artikel 1 der Verordnung vom 30. September 2008 (BGBl. I S. 1911) geändert worden ist;*
<http://bundesrecht.juris.de/bundesrecht/aromv/gesamt.pdf>
-

-
- 48 U. Meier, H. Graf, H. Hack; *Phänologische Entwicklungsstadien des Kernobstes, des Steinobstes der Johannisbeere und der Erdbeere*; Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes, 46, 141-153, **1994**
- 49 A. Gessler; *Untersuchung der Aromastoffe von Apfelsäften während des Ernteverlaufs, der Lagerung und Verarbeitung*; Vortrag, Fruchtsäfte, fruchtsafthaltige Getränke: Technologie, Untersuchung und Beurteilung, Berlin, 10.- 12. September, **2008**
- 50 Y. Zhang, L. Pengmin, C. Lailiang; *Developmental changes of carbohydrates, organic acids, amino acids and phenolic compounds in „Honeycrisp“ apple flesh*; Food Chemistry, 123, 4, 1013-1018, **2010**
- 51 J. K. Fellmann, T. W. Miller, D. S. Mattinson; *Factors that influence biosynthesis of volatile Flavor Compounds in apple fruits*; HortScience, 35, 6, 1026-1033, **2000**
- 52 T. Birus; *Moderne Apfelsaft-Technologie: das Fruchtsaft-Handbuch für den Praktiker*; Schönborn, Fachverlag Flüssiges Obst, **2001**
- 53 J. Song, F. Bangerth; *Production and development of volatile aroma compounds of apple fruits at different times of maturity*; Acta Horticulturae, 368, 150-159, **1994**
- 54 D.G. Guadagni, J.L. Bomben, J.S. Hudson; *Factors influencing the Development of aroma in apple peels*; Journal of the Science of Food and Agriculture, 22, 3, 110-115, **1971**
- 55 F. Drawert, W. Heimann, R. Emberger, R. Tressl; *Enzymatische Bildung von Hexen-(2)-al-(1), Hexanal und deren Vorstufen, Biogenese von Aromastoffen bei Pflanzen und Früchten II*; Justus Liebigs Annalen der Chemie, 694;1, 200-208, **1966**
- 56 R. Tressl; *Über die Bildung und enzymatische Veränderung einiger Fruchtaroma-stoffe*; Dissertation; Technische Hochschule Karlsruhe, **1967**
- 57 J. Dixon, E. Hewett; *Factors affecting apple aroma/flavour volatile concentration: a review*; New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 28, 155-173, **2000**
- 58 F. B. Power; V. K. Chesnut; *The odorous constituents of apples; Emanation of acetaldehyde from the ripe fruit*; Journal of the American Chemical Society, 42, 1509-1526, **1920**
- 59 P.S. Dimick, J. C. Hoskin; *Review of apple flavor- state of the art*; CRC critical reviews in food science and nutrition, 18, 387-409; **1983**
- 60 N. M. M. Paillard; *The flavor of apples, pears and quinces*; In Developments in Food Science; Eds. Elsevier: Amsterdam; 3C, 1-41, **1990**
- 61 A. Omata, K. Yomogida, S. Nakamura; *Volatile Components of Apple Flowers*; Flavour and Fragrance Journal, 5, 19-22, **1990**
- 62 FEI, Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V.; *Bewertung technologiebedingter Veränderungen des Profils flüchtiger Inhaltsstoffe von Fruchtsäften*; Schlussbericht 2004, **2004**
-

- 63 FEI, Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V.; *Einfluss von Sorte und Herstellungsverfahren auf Veränderungen in wertgebenden Aromastoffen von Apfelsäften*; Schlussbericht 2006, **2006**
- 64 M. Steinhaus, J. Bogen, P. Schieberle; *Schlüsselaromastoffe in Apfelsaft- Malus domestica Borkh. Cv. Golden Delicious*; Lebensmittelchemie, 59, 91, **2005**
- 65 S. Elß, Studien über technologiebedingte Veränderungen der Aromaprofile von Fruchtsäften, Dissertation, Julius-Maximilian-Universität Würzburg, **2007**
- 66 M. Heil, H. Hahn, N. Christoph, D. Stingel, A. Gessler, V. Ara; Über das Vorkommen von 3-Methylbutanol in Apfelsäften; Flüssiges Obst, 5, 226-237, **2007**
- 67 K. Schuhmacher, S. Asche, M. Heil, F. Mittelstädt, H. Dietrich, A. Mosandl; *Methyl-branched Flavor Compounds in Fresh and Processed Apples*; Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46, 4496-4500, **1998**
- 68 F. Drawert, W. Heimann, R. Emberger, R. Tressl; Über die Biogenese von Aromastoffen bei Pflanzen und Früchten; Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung, 140, 2, 65-88, **1969**
- 69 H. Brunner, G. Senn; Beitrag zur Analytischen Qualitätsbezeichnung von Aromastoffen; Schweizerische Zeitschrift für Obst- und Weinbau einschließlich Verwertung, 67, 8-11, **1958**
- 70 G. Senn; Die Alkoholbestimmung in Fruchtsäften und Aromakonzentraten; Die Fruchtsaftindustrie: Zeitschrift für die Herstellung und Untersuchung von Frucht-, Obst- und Gemüsearten, 5, 165-173, **1960**
- 71 M. Heil, V. Ara; Fruchtsaftaromen II: Über die Zusammensetzung und Bewertung von Apfelsaftaroma; Flüssiges Obst, 9, 444-452, **2007**
- 72 C. Wolter, A. Gessler, P. Winterhalter; Aspekte zur Beurteilung des Apfelsaftaromas; Flüssiges Obst, 03, 122-134, **2008**
- 73 A. Quadt, E. Jülich, J. Tretzel; Sensorische und Analytische Beurteilung von Apfelsaftaromen; Flüssiges Obst, 09, 448-457, **2008**
- 74 M. P. Nikfardjam, D. Maier; Summenparameter zur Bewertung der Qualität von Apfelsäften mittels HS-Trap-Technologie; Deutsche Lebensmittel-Rundschau; 106, 2, 92-96, **2010**
- 75 Forschungskreis der Ernährungsindustrie e. V.; *Forschungsstrategien der Gegenwart- Chancen der Zukunft*; Dokumentation der FEI Jahrestagung, **2010**
- 76 Datenbank des Forschungskreises der Ernährungsindustrie,
www.fei-bonn.de/download/projekte/projektdatenbank.html/fv_17010/ (25.09.2011)
- 77 G. Moshonas, P. E. Shaw; *Flavor evaluation of fresh and aseptically packed orange juices*; In Frontiers of flavor, Proceedings of the 5th international flavor conference, G. Charalambous, Elsevier, **1988**
- 78 Á. Högnadóttir, R. L. Rouseff; *Identification of aroma active compounds in orange essence oil using gas chromatography-olfactometry and gas chromatography-mass spectrometry*; Journal of Chromatography A, 998, 1-2, 201-211, **2003**
-

- 79 S. Nagy, P. E. Shaw; *Factors affecting the flavour of citrus fruit*; in I. Morton, A. J. MacLeod; Food flavours, Elsevier, **1990**
- 80 R. W. Wolford, J. W. Kesterson, J. A. Attaway; *Physicochemical properties of citrus essential oils from Florida*; Journal of Agricultural and Food Chemistry, 19, 6, 1097-1105, **1971**
- 81 R. L. Rouseff, P. Ruiz Perez-Cacho, F. Jabalpurwala; *Historical Review of Citrus Flavor Research during the Past 100 Years*; Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57, 18, 8115-8124, **2009**
- 82 P. R. Perez-Cacho, R. L. Rouseff; *Fresh squeezed orange juice odor: A review*; Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 48, 7, 681-695, **2008**
- 83 L. M. Nijssen, C. A. Visscher, H. Maarse, L. C. Willemse, *Volatile Compounds in Foods*, TNO Nutrition and Food Research Institute, The Netherlands, **1996**
- 84 M. Averbeck, P. Schieberle, Peter; *Characterisation of the key aroma compounds in a freshly reconstituted orange juice from concentrate*; European Food Research and Technology, 229, 4, 611-622, **2009**
- 85 D. Martinetz, R. Hartwig; *Taschenbuch der Riechstoffe: ein Lexikon von A-Z*; Verlag Harri Deutsch, Kap. 2, **1998**
- 86 A. Buettner, P. Schieberle; *Evaluation of Aroma Differences between Hand-Squeezed Juices from Valencia Late and Navel Oranges by Quantitation of Key Odorants and Flavor Reconstitution Experiments*; Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49, 5, 2387-2394, **2001**
- 87 M. Averbeck, P. Schieberle; *Influence of different storage conditions on changes in the key aroma compounds of orange juice reconstituted from concentrate*; European Food Research and Technology, 232, 1, 129-142, **2011**
- 88 F. Augusto, A. Leite e Lopes, C. A. Zini; *Sampling and sample preparation for analysis of aromas and fragrances*; Trends in Analytical Chemistry, 22, 3, 160-169, **2003**
- 89 J. L. Bicas, G. Molina, A. P. Dionisio, F. F. C. Barros, R. Wagner, M. R. Marostica JR.; G. M. Pastore; *Volatile constituents of exotic fruits from Brazil*; Food Research International, 44, 7, 1843-1855, **2011**
- 90 A. Perez-Silva, E. Odoux, P. Brat, F. Ribeyre, G. Rodriguez-Jimenes, V. Robles-Olvera; *GC-MS and GC-olfactometry analysis of aroma compounds in a representative organic aroma extract from cured vanilla (*Vanilla planifolia* G. Jackson) beans*; Food Chemistry, 99, 4, 728-735, **2006**
- 91 D. C. Frank, C. M Owen, J. Patterson; *Solid phase microextraction (SPME) combined with gas-chromatography and olfactometry-mass spectrometry for characterization of cheese aroma compounds*; Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie, 37, 2, 139-154, **2004**

- 92 S. M. Rocha, P. Coutinho, E. Coelho, A. S. Barros, I. Delgadillo, M A. Coimbra; *Relationships between the varietal volatile composition of the musts and white wine aroma quality. A four year feasibility study. Wine: Parameters impacting composition and quality;* LWT - Food Science and Technology, 43, 10, 1508-1516, 2010
- 93 H. Ogihara, Y. Horimoto, Z. H. Wang, B. J. Skura, S. Nakai; *Solid Phase Microextraction/Gas Chromatography of Salmonella- Infected Beef;* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48, 6, 2253-2259, 2000
- 94 R. Triqui, N. Bouchriti; *Freshness Assessments of Moroccan Sardine (Sardina pilchardus);* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 26, 7540-7546, 2003
- 95 A. Jimenez, G. Beltran, M. P. Aguilera; *Application of solid-phase microextraction to the analysis of volatile compounds in virgin olive oils;* Journal of Chromatography A, 1028, 2, 321-324, 2004
- 96 A. B. Smyth, J. Song, A. C. Cameron; *Modified Atmosphere Packaged Cut Iceberg Lettuce: Effect of Temperature and O₂ Partial Pressure on Respiration and Quality;* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46, 11, 4556-4562, 1998
- 97 C. Li, N. E. Schmidt, R. Gitaitis; *Detection of onion postharvest diseases by analyses of headspace volatiles using a gas sensor array and GC-MS;* LWT - Food Science and Technology, 44, 4, 1019-1025, 2011
- 98 R. Mebazaa, B. Rega, V. Camel; *Analysis of human male armpit sweat after fenugreek ingestion: Characterisation of odour active compounds by gas chromatography coupled to mass spectrometry and olfactometry;* Food Chemistry, 128, 1, 227-235, 2011
- 99 G. M. Pastore, Y. K. Park, D. B. Min; *Production of fruity aroma by Neurospora from beiju;* Mycological Research, 98, 11, 1300-1302, 1994
- 100 A. Chaintreau; *Analytical Methods to Determine Potentially Allergenic Fragrance-Related Substances in Cosmetics;* Analysis of Cosmetic Products, Elsevier 2007
- 101 R. E. Henze, C. E. Baker, F. W. Quackenbush; *Fruit Storage Effects, Carbonyl Compounds in Apple Storage Volatiles;* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2, 22, 1118-1120, 1954
- 102 D. F. Meigh; *Volatile compounds produced by apples. I.-Aldehydes and ketones;* Journal of the Science of Food and Agriculture, 7, 6, 396-41, 1956
- 103 J. Koch, H. Schiller; *Beitrag zur Kenntnis des Apfeleromas;* Zeitschrift für Lebensmittel- Untersuchung und Forschung, 125, 5, 364-368, 1964
- 104 A. Stephan, M. Bücking, H. Steinhart; *Novel analytical tools for food flavours;* Food Research International, 33, 3-4, 199-209, 2000
- 105 R. A. Flath, D. R. Black, D. G. Guadagni, W. H. McFadden, T. H. Schultz; *Identification and organoleptic evaluation of compounds in Delicious apple essence;* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 15, 1, 29-35, 1967

-
- 106 A. A. Williams, O. G. Tucknott, M. J. Lewis; *4-methoxyallylbenzene: An important aroma component of apples*; Journal of the Science of Food and Agriculture, 28, 2, 185-190, **1977**
- 107 R G. Berger, F. Drawert; *Changes in the composition of volatiles by post-harvest application of alcohols to red delicious apples*; Journal of the Science of Food and Agriculture, 35, 12, 1318-1325, **1984**
- 108 M. Hey, P. Kürbel, I. Hopf, H. Dietrich; *Untersuchung sortenreiner Apfelsaftarten, Flüssiges Obst*, 2, 62-67; **2007**
- 109 R. A. Flath, D. R. Black, R. R. Forrey, G. M. McDonald, T. R. Mon, R. Teranishi; *Volatiles in Gravenstein Apple Essence Identified by GC-Massspectrometry*; Journal of Chromatographic Science, 7, 508-512, **1969**
- 110 I. Yajima, T. Yanai, M. Nakamura; *Volatile Flavor Components of Kogyoku Apples*; Agricultural and Biological Chemistry, 48, 4, 849-855, **1984**
- 111 M. Steinhaus, J. Bogen, P. Schieberle; *Key aroma compounds in apple juice-changes during juice concentration*, Wender L.P. Bredie and Mikael Agerlin Petersen (Hg.): *Developments in Food Science : Flavour Science - Recent Advances and Trends*, 43, Elsevier, 189-192, **2006**
- 112 P. Werkhoff, W. Bretschneider; *Dynamic headspace gas chromatography: concentration of volatile components after thermal desorption by intermediate cryofocusing in a cold trap. I. Principle and applications*; Journal of Chromatography A, 405, 87-98, **1987**
- 113 G. Echeverría, T. Fuentes, J. Graell, I. Lara, M. L. López, M. L.; *Aroma volatile compounds of Fuji' apples in relation to harvest date and cold storage technology: A comparison of two seasons*; Postharvest Biology and Technology, 32, 1, 29-44, **2004**
- 114 J. Song, B. D. Gardner, J. F. Holland, R. M. Beaudry; *Rapid Analysis of Volatile Flavor Compounds in Apple Fruit Using SPME and GC/Time-of-Flight Mass Spectrometry*; Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45, 5, 1801-1807, **1997**
- 115 T. Kato, M. Shimoda, J. Suzuki, A. Kawaraya, N. Igura, I. Hayakawa; *Changes in the odors of squeezed apple juice during thermal processing*; Food Research International, 36, 8, 777-785, **2003**
- 116 B. Tienpont, F. David, P. Sandra, Pat; *Fast Screening of Apple Flavor Compounds by SPME in Combination with Fast Capillary GC-MS using a Modular Accelerated Column Heater (MACH) and Quadrupole Mass Spectrometric Detector (qMSD)*; AppNote, 8, **2006**
- 117 M. P. Nikfardjam, D. Maier, *Development of a headspace trap HRGC/MS method for the assessment of the relevance of certain aroma compounds on the sensorial characteristics of commercial apple juice*; Food Chemistry, 126, 4, 1926-1933, **2011**
- 118 T. Beuerle, P. Schreier, P. Brunerie, C. Bicchi, W. Schwab; *Absolute configuration of octanol derivatives in apple fruits*; Phytochemistry, 43, 1, 145-149, **1996**
-

- 119 E. Fuhrmann, W. Grosch; *Character impact odorants of the apple cultivars Elstar and Cox Orange*, Nahrung, 46, 3, 187-193, **2002**
- 120 B. Plutowska, W. Wardencki; *Aromagrams - Aromatic profiles in the appreciation of food quality*; Food Chemistry, 101, 2, 845-872, **2007**
- 121 A. Hoffmann, A. Heiden; *Flavor Profiling of Beverages by Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE) and Thermal Desorption GC/MS/PFPD*; AppNote, 4, **2000**, <http://www.gerstel.de/pdf/p-gc-an-2000-04.pdf>
- 122 B. V. Burger, Z. Munro; *Headspace gas analysis. Quantitative trapping and thermal desorption of volatiles using fused-silica open tubular capillary traps*; Journal of Chromatography A, 370, 449-464, **1986**
- 123 C. Arthur, J. Pawliszyn; *Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers*; Analytical Chemistry, 62, 19, 2145-2148, **1990**
- 124 E. Baltussen, H. G. Janssen, P. Sandra, C. A. Cramers; *A novel type of liquid/liquid extraction for the preconcentration of organic micropollutants from aqueous samples: Applications to the analysis of PAH's and OCP's in water*; Journal of High Resolution Chromatography, 20, 7, 395-399, **1997**
- 125 E. Baltussen, F. David P. Sandra, H.-G. Janssen; *Retention model for sorptive extraction-thermal desorption of aqueous samples: application to the automated analysis of pesticides and polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples*; Journal of Chromatography A, 805, 237-247, **1998**
- 126 F. Reichenberg, F. Smedes, J.-Å. Jönsson, P. Mayer; *Determining the chemical activity of hydrophobic organic compounds in soil using polymer coated vials*; Chemistry Central Journal, 2, 8, **2008**
- 127 E. Baltussen, P. Sandra, C. Cramers; *Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: Theory and principles*; Journal of Microcolumn Separations, 11, 10, 737-747, **1999**
- 128 E. Pfannkoch, J. Whitecavage, A. Hoffmann; *Stir Bar Sorptive Extraction: Capacity and Competition Effects*; AppNote, 4, **2002**
- 129 E. Pfannkoch, J. Whitecavage; *Elimination of Polar Matrix Components Prior to GC Analysis using Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE)*; AppNote, 3, **2001**
- 130 C. Bicchi, C. Cordero, E. Liberto, P. Rubiolo, B. Sgorbini, P. Sandra; *Impact of phase ratio, polydimethylsiloxane volume and size, and sampling temperature and time on headspace sorptive extraction recovery of some volatile compounds in the essential oil field*; Journal of Chromatography A, 1071, 1-2, 111-118, **2005**
- 131 F. David, P. Sandra; *Stir bar sorptive extraction for trace analysis*; Journal of Chromatography A, 1152, 54-69, **2007**
- 132 A. Hoffmann, R. Bremer, P. Sandra, F. David; *Neuartige Extraktionstechnik*; Gerstel Aktuell, 24, März, 4-7, **2000**
- 133 M. Tobiszewski, A. Mechlińska, B. Zygmunt, J. Namieśnik; *Green analytical chemistry in sample preparation for determination of trace organic pollutants*; Trends in Analytical Chemistry, 28, 8, 943-951, **2009**
-

-
- 134 K. Ridgway, S. Lalljie, R. Smith; *Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods*; Journal of Chromatography A, 1153, 36-53, **2007**
- 135 E. Fries; *Determination of benzothiazole in untreated wastewater using polar-phase stir bar sorptive extraction and gas chromatography-mass spectrometry*; Analytica Chimica Acta, 689, 1, 65-68, **2011**
- 136 E. Pfannkoch, J. Cavage, A. Hoffmann; *Stir Bar Sorptive Extraction: Enhancing Selectivity of the PDMS Phase*; AppNote, 2, **2001**
- 137 F. Sánchez-Rojas, C. Bosch-Ojeda, J. Cano-Pavón; *A Review of Stir Bar Sorptive Extraction*; Chromatographia, 69, 79-94, **2009**
- 138 S. Armenta, S. Garrigues, M. de la Guardia; *Green Analytical Chemistry*; Trends in Analytical Chemistry, 27, 6, 497-511, **2008**
- 139 M. Tobiszewski, A. Mechlińska, B. Zygmunt, J. Namieśnik; *Green analytical chemistry in sample preparation for determination of trace organic pollutants*; Trends in Analytical Chemistry, 28, 8, 943-951, **2009**
- 140 P. T. Anastas; *Green Chemistry and the Role of Analytical Methodology Development*; Critical Reviews in Analytical Chemistry, 29, 3, 167-175, **1999**
- 141 R. Majors, D. Raynie; *The Greening of the Chromatography Laboratory*; LC-GC Europe; 78-90; **2011**
- 142 D. Benanou, F. Acobas, M. R. Deroubin, F. David, P. Sandra; *Analysis of off-flavors in the aquatic environment by stir bar sorptive extraction-thermal desorption-capillary GC/MS/olfactometry*; Analytical Bioanalytical Chemistry 376, 1, 69-77, **2003**
- 143 A. Strube, F. Welle; *Application of stir bar sorptive extraction (SBSE) for migration testing of food packaging materials*; Deutsche Lebensmittel-Rundschau 101, 3, 92-99, **2005**
- 144 E. Pfannkoch, J. Whitecavage; *Stir Bar Sorptive Extraction from Food Simulating Solvents: Preliminary Studies*; AppNote, 3, **2002**
- 145 C. Blasco, M. Fernandez, Y. Pico, G. Font; *Comparison of solid-phase microextraction and stir bar sorptive extraction for determining six organophosphorus insecticides in honey by liquid chromatography-mass spectrometry*; 27th International Symposium on High-Performance Liquid-Phase Separations and Related Techniques. Part I.; Journal of Chromatography, 1030, 1-2, 77-85, **2004**
- 146 C. Bicchi, C. Cordero, P. Rubiolo, P. Sandra; *Impact of water/PDMS phase ratio, volume of PDMS, and sampling time on Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE) recovery of some pesticides with different K_{ow}* ; Journal of Separation Science, 26, 1650-1656, **2003**
- 147 S. Sewenig, D. Bullinger, U. Hener, A. Mosandl; *Comprehensive Authentication of (E)- α (β)-Ionone from Raspberries, Using Constant Flow MDGC-C/P-IRMS and Enantio-MDGC-MS*; Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 4, 838–844, **2005**
-

- 148 F. Luan, A. Mosandl, M. Gubesch, M. Wuest; *Enantioselective analysis of monoterpenes in different grape varieties during berry ripening using stir bar sorptive extraction- and solid phase extraction-enantioselective-multidimensional gas chromatography-mass spectrometry*; Journal of Chromatography A, 1112, 1-2, 369-374, **2006**
- 149 A. Juan-Garcia, Y. Pico, G. Font; *Capillary electrophoresis for analyzing pesticides in fruits and vegetables using solid-phase extraction and stir-bar sorptive extraction*; 28th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques; Journal of Chromatography A, 1073, 1-2, 229-236, **2005**
- 150 J. Díez, C. Domínguez, D. Guillén, R. Veas, C. Barroso; *Optimisation of stir bar sorptive extraction for the analysis of volatile phenols in wines*; Journal of Chromatography A , 1025, 2, 263-267, **2004**
- 151 E. D. Guerrero, R. N. Marín, R. C. Mejías; Stir bar sorptive extraction of volatile compounds in vinegar: Validation study and comparison with solid phase microextraction; Journal of Chromatography A, 1167, 1, 18-26, **2007**
- 152 A. R. Silva, F. C. M. Portugal, J. M. F. Nogueira; *Advances in stir bar sorptive extraction for the determination of acidic pharmaceuticals in environmental water matrices Comparison between polyurethane and polydimethylsiloxane polymeric phases*; Journal of Chromatography A, 1209, 10-16, **2008**
- 153 P. Serôdio, J. M. F. Nogueira; *Multi-residue screening of endocrine disrupters chemicals in water samples by stir bar sorptive extraction-liquid desorption-capillary gas chromatography-mass spectrometry detection*; Analytica Chimica Acta, 517, 1-2, 21-32, **2004**
- 154 P. Tölgessy, B. Vrana, M. Bartal, Z. Kracsenits, K. Šilhárová; *Determination of Chlorophenols in Sediments Using Ultrasonic Solvent Extraction Followed by Stir Bar Sorptive Extraction Coupled to TD-GC-MS*; Chromatographia, 69, 3, 389-392, **2009**
- 155 A. Stopforth, B. V. Burger, A. M. Crouch, P. Sandra; *The analysis of estrone and 17[beta]-estradiol by stir bar sorptive extraction-thermal desorption-gas chromatography/mass spectrometry: Application to urine samples after oral administration of conjugated equine estrogens*; Journal of Chromatography B, 856, 1-2, 156-164, **2007**
- 156 C. Fernandes, P. Jiayu, P. Sandra, F. Lanças, F; *Stir Bar Sorptive Extraction-LC-MS for the Analysis of Fluoxetine in Plasma*; Chromatographia, 64, 9, 517-521, **2006**
- 157 A. Buettner, F. Welle; *Intra-oral detection of potent odorants using a modified stir-bar sorptive extraction system in combination with HRGC-O, known as the buccal odour screening system (BOSS)*; Flavour and Fragrance Journal, 19, 6, 505-514, **2004**

-
- 158 R. Delgado, E. Durán, R. Castro, R. Natera, C. G. Barroso; *Development of a stir bar sorptive extraction method coupled to gas chromatography-mass spectrometry for the analysis of volatile compounds in Sherry brandy*; *Analytica Chimica Acta*, 672, 130-136, **2010**
- 159 E. Baltussen, C. Cramers, P. Sandra; *Sorptive sample preparation - a review*; *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 373, 1, 3-22, **2002**
- 160 A. Prieto, O. Basauri, R. Rodil, A. Usobiaga, L.A. Fernandez, N. Extebarria, O. Zuloaga; *Stir-bar sorptive extraction: A view on method optimisation, novel applications, limitations and potential solutions*; *Journal of Chromatography A*, 1217, 2642-2666, **2010**
- 161 B. Siegmund, E. Leitner, I. Mayer, P. Farkas, J. Sádecká, W. Pfannhauser, M. Kovác; *Untersuchungen zur Problematik der Extraktion von Aromastoffen mit der simultanen Destillation- Extraktion nach Likens-Nickerson*; *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 92, 9, 286-290, **1996**
- 162 L. Maignial, P. Pibarot, G. Bonetti, A. Chaintreau, J. P. Marion; *Simultaneous distillation-extraction under static vacuum: Isolation of volatile compounds at room temperature*; *Journal of Chromatography*, 606, 87-94, **1992**
- 163 Methode 00.00.106 in der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 Abs.1 LFGB (Lebens- und Futtermittelgesetz), Band 1 (Lebensmittel), *Bestimmung der Konzentrationen und Enantiomerenverhältnisse chiraler Aromastoffe in Lebensmitteln*, Abs.1 LFGB (Lebens- und Futtermittelgesetz), Band 1 (Lebensmittel)
- 164 D. J. Caven-Quantrill, A. J. Buglass; *Comparison of micro-scale simultaneous distillation-extraction and stir bar sorptive extraction for the determination of volatile organic constituents of grape juice*; *Journal of Chromatography A*, 1117, 2, 121-131, **2006**
- 165 K. Ridgway, S. P. D. Lalljie, R. M. Smith; *An alternative method for analysis of food taints using stir bar sorptive extraction*; *Analytica Chimica Acta*, 677, 1, 29-36, **2010**
- 166 B. Tienpont; *Evaluation of sorptive enrichment for the analysis of phthalates in air samples*; *Journal of Microcolumn Separations*, 12, 4, 194-203, **2000**
- 167 B. Cavaliere; *Tandem mass spectrometry in food safety assessment: The determination of phthalates in olive oil*; *Journal of Chromatography A*, 1205, 1-2, 137-143, **2008**
- 168 R. Rodil, M. Moeder; *Stir bar sorptive extraction coupled to thermodesorption-gas chromatography-mass spectrometry for the determination of insect repelling substances in water samples*; *Journal of Chromatography A*, 1178, 1-2, 9-16, **2008**
- 169 T. König, P. Schreier; *Application of multivariate statistical methods to extend the authenticity control of flavour constituents of apple juice*; *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A*, 208, 2, 130-133, **1999**
-

- 170 S. Elss, C. Preston, M. Appel, F. Heckel, P. Schreier; *Influence of technological processing on apple aroma analysed by high resolution gas chromatography-mass spectrometry and on-line gas chromatography-combustion/pyrolysis-isotope ratio mass spectrometry*; Food Chemistry, 98, 2, 269-276, **2006**
- 171 P. Komthong, N. Igura, M. Shimoda; *Effect of ascorbic acid on the odours of cloudy apple juice*; Food Chemistry, 100, 4, 1342-1349, **2007**
- 172 DIN ISO/IEC 17025, *Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Prüf- und Kalibrierlaboratorien*
- 173 S. Kromidas; *Handbuch der Validierung in der Analytik*, Wiley VCH, Weinheim, **2003**
- 174 DIN 38402-51; *Kalibrierung von Analysenverfahren, Auswertung, von Analyseergebnissen und lineare Kalibrierfunktionen für die Bestimmung von Verfahrenskenngrößen*
- 175 W. Funk, V. Dammann, G. Donnevert; *Qualitätssicherung in der Analytischen Chemie*; Zweite, vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage, Wiley VCH, Weinheim, **2005**
- 176 DIN 32645; *Chemische Analytik- Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze unter Wiederholbedingungen- Begriffe, Verfahren, Auswertung*
- 177 G. Wächter, J. Kleiner; *Forderung nach Varianzhomogenität- ein Ärgernis?*; CLB Chemie in Labor und Biotechnik, 55, 2, 52-55, **2004**
- 178 DIN ISO 11843-2; *Erkennungsfähigkeit- Teil 2: Verfahren im Fall der linearen Kalibrierung*
- 179 DIN ISO 11843-1; *Erkennungsfähigkeit- Teil 1: Begriffe*
- 180 J. N. Miller, J. C. Miller; *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, 5th Edition, Kap. 5, Prentice Hall, **2005**
- 181 ENTScheidung DER KOMMISSION vom 12. August 2002 zur Umsetzung der Richtlinie 96/23/EG des Rates betreffend die Durchführung von Analysemethoden und die Auswertung von Ergebnissen
- 182 G. den Boef, A. Hulanicki; *Recommendations for the usage of selective, selectivity and related terms in analytical chemistry*; Pure & Applied Chemistry, 55, 3, 553-556, **1983**
- 183 GDCh-Arbeitsgruppen „Aromastoffe“ und „Fruchtsaft und fruchtsafthaltige Getränke“; *Datensammlung zur Bestimmung von Beurteilungskriterien für die Rearomatisierung von Apfelsaft aus Apfelsaftkonzentrat*; Flüssiges Obst, 10, 404-414, **2011**
- 184 C. Wolter; *Veränderungen der Aromen von Fruchtsäften während Produktion und Lagerung*; Vortrag, GDCh- Fortbildung Fruchtsäfte, fruchtsafthaltige Getränke Technologie, Untersuchung und Beurteilung, Paderborn, 21.-23. September, **2011**
- 185 C. Wolter, A. Gessler P. Winterhalter; *Veränderungen im Aromastoffprofil von Apfelsaft*; Flüssiges Obst, 10, 424-430, **2010**
-

-
- 186 R. Henrion, G. Henrion; *Multivariate Datenanalyse*; Springer Verlag Berlin Heidelberg, **1995**
- 187 B. R. Kowalski; *Chemometrics*; Analytical Chemistry, 52, 5, 112-122, **1980**
- 188 B. R. Kowalski; *Chemometrics*; Chemistry and Industry, 18, 882-884, **1978**
- 189 K. Danzer, H. Hobert, C. Fischbacher, K.-U. Jagemann; *Chemometrik, Grundlagen und Anwendungen*; Springer, **2001**
- 190 K. Pearson; *On lines and planes of closest fit to systems of points in space*; The philosophical Magazine, 2, 559-572, **1901**
- 191 E. R. Malinowski; *Factor Analysis in Chemistry*; Wiley VCH, 3. Ausgabe, Weinheim, **2002**
- 192 C. Armanino, R. Leardi, S. Lanteri; *Chemometric analysis of Tuscan olive oils*; Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 5, 343-354, **1989**
- 193 Y. Miyashita, M. Ishikawa, S. Sasaki; *Classification of brandies by pattern recognition of chemical data*; Journal of the Science of Food and Agriculture, 49, 325-333, **1989**
- 194 I. Moret, G. Scarponi, G. Capodaglio, P. Cescon; *Characterisation Soave wine by determining the aromatic composition and applying the SIMCA chemometric method*; Rivista di Viticoltura e di Enologia, 38, 4, 254-262, **1985**
- 195 I. S. Scarminio, R. E. Bruns, E. A. G. Zagatto; *Pattern recognition classification of mineral waters based on spectrochemical analysis*; Journal of Food Science, 43, 1320-1323, **1978**
- 196 X. Lu, L. Wang, H. Liu, R. Wang, J. Chen; *Studies on the interaction between antibiotics and DNA*; Talanta, 73, 444-450, **2007**
- 197 Y. Ni, L. Zhang, J. Churchill, S. Kokot; *Application of high performance liquid chromatography for the profiling of complex chemical mixtures with the aid of chemometrics*; Talanta, 72, 1533-1539, **2007**
- 198 E. Corbella, D. Cozzolino; *Classification of the floral origin of Uruguayan honeys by chemical and physical characteristics combined with chemometrics*; LWT-Food Science and Technology, 39, 534-539, **2006**
- 199 D. Cozzolino, H. E. Smyth, W. Cynkar, L. Janik, R. G. Dambergsa, M. Gishena; *Use of direct headspace-mass spectrometry coupled with chemometrics to predict aroma properties in australian riesling wine*; Analytica Chimica Acta, 621, 1, 2-7, **2008**
- 200 S. Nikdel, V. Fishback; *Chemometric Sleuthing: Is It Really Orange Juice*; Scientific Computing & Automation, 5, 6, 19-23, **1989**
- 201 R. M. Alonso-Salces, C. Herrero, A. Barranco, L. A. Berrueta, B. Gallo, F. Vicente; *Classification of apple fruits according to their maturity state by the pattern recognition analysis of their polyphenolic compositions*; Food Chemistry, 93, 1, 113-123, **2005**
-

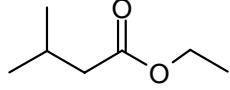
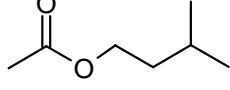
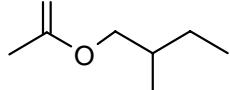
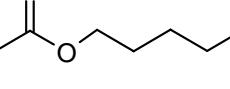
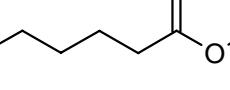
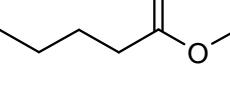
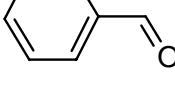
- 202 P. S. Belton, I. J. Colquhoun, E. K. Kemsley, I. Delgadillo, P. Roma, M. J. Dennis; *Application of chemometrics to the ^1H NMR spectra of apple juices: discrimination between apple varieties*; Food Chemistry, 61, 1-2, 207-213, **1998**
- 203 L. M. Reid, T. Woodcock, C. P. O'Donnell, J. D. Kelly, G. Downey; *Differentiation of apple juice samples on the basis of heat treatment and variety using chemometric analysis of MIR and NIR data*; Food Research International, 38, 10, 1109-1115, **2005**
- 204 Pirouette User Manual; *Multivariate Data Analysis*; Version 3.11, Infometrix Inc. Woodinville
- 205 K. R. Beebe, R. J. Pell, M. B. Seasholtz; *Chemometrics: A practical guide*; Wiley-Interscience, **1998**,
- 206 Schulungsunterlagen, Rapid Data Interpretation und Pirouette Trainingskurs, Gersotel, März, **2007**
- 207 S. Wold; *Pattern recognition by Means of Disjoint Principal Components Models*; Pattern Recognition, 8, 127-139, **1976**
- 208 M. Pietzke; Trend zur Natürlichkeit, Getränkeindustrie, 6, 20-22, **2010**

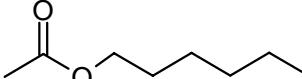
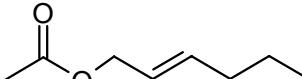
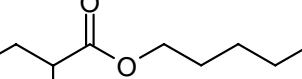
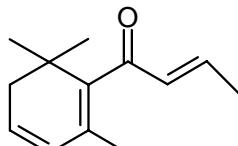
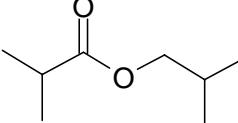
Anhang

A. Analyten

Tab. i: Liste der quantifizierten Aromastoffe und des internen Standards mit Angabe der Summenformel, Struktur, dem log K_{O/W}-Wert, dem Siedepunkt, der CAS-Nummer und der Molekülmasse

Analyt/ Summenformel	Struktur	log K _{O/W} berechnet mit KOWWIN v.1.67	Siede- punkt [°C]	CAS- Nummer	Molekül- masse aus NIST Mass Spektral Search Programm v2.0d
Ethylisobutyrat C ₆ H ₁₂ O ₂		1,77	112-113	97-62-1	116
Methyl-2- Methylbutyrat C ₆ H ₁₂ O ₂		1,77	113-115	868-57-5	116
Ethylbutyrat C ₆ H ₁₂ O ₂		1,85	120	105-54-4	116
Butylacetat C ₆ H ₁₂ O ₂		1,85	126-127	123-86-4	116
Hexanal C ₆ H ₁₂ O		1,80	119-124	66-25-1	101
Ethyl-2- Methylbutyrat C ₇ H ₁₄ O ₂		2,26	132-133	53956-13-1	130

Analyt/ Summenformel	Struktur	$\log K_{OW}$ berechnet mit KOWWIN v.1.67	Siede- punkt [°C]	CAS- Nummer	Molekül- masse aus NIST Mass Spektral Search Programm v2.0d
Ethylisovalerat $C_7H_{14}O_2$		2,26	132-134	108-64-5	130
3-Methylbutylacetat $C_7H_{14}O_2$		2,26	142 bei 756 mmHg	123-92-2	130
2-Methylbutylacetat $C_7H_{14}O_2$		2,26	140	624-41-9	130
trans-2-Hexen-1-al $C_6H_{10}O$		1,58	146-149	6728-26-3	199
Amylacetat $C_7H_{14}O_2$		2,34	142	628-63-7	130
Methylhexanoat $C_7H_{14}O_2$		2,34	149-151	106-70-7	130
Ethylhexanoat $C_8H_{16}O_2$		2,83	166	123-66-0	144
Benzaldehyd C_7H_6O		1,71	178-179	100-52-7	106

Analyt/ Summenformel	Struktur	log K _{o/w} berechnet mit KOWWIN v.1.67	Siede- punkt [°C]	CAS- Nummer	Molekül- masse aus NIST Mass Spektral Search Programm v2.0d
Hexylacetat <chem>C8H16O2</chem>		2,83	173-174	142-92-7	144
trans-2- Hexenylacetat <chem>C8H14O2</chem>		2,61	165-166	2497-18-9	142
Hexyl-2- methylbutyrat <chem>C11H22O2</chem>		4,23	203-204	10032-15-2	186
Damascenon <chem>C13H18O</chem>		4,21	274-275 bei 760.00 mm Hg	23726-93-4	190
Isobutylisobutyrat <chem>C8H16O2</chem>		2,68	145-152	97-85-8	144

B. Experimenteller Teil

Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Die im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen eingesetzten Chemikalien sind nachfolgend alphabetisch geordnet aufgeführt.

Amylacetat, Aldrich

Benzaldehyd, Merck

Butylacetat, Fluka

Damascenon, Firmenich

Diethylether; Merck

Ethanol, Merck

Ethylbutyrat, Merck

Ethylhexanoat, Fluka

Ethylisobutyrat, Aldrich

Ethylisovalerat, Aldrich

Ethyl-2-methylbutyrat, Aldrich

Hexanal, Fluka

Hexylacetat, Fluka

Hexyl-2-methylbutyrat, SAFC

Isobutylisobutyrat; Aldrich

Methanol, Merck

2-Methylbutylacetat, Aldrich

3-Methylbutylacetat, Aldrich

Methylhexanoat, Fluka

Methyl-2-methylbutyrat, Fluka

Pantan, Merck

trans-2-Hexenal, Fluka

trans-2-Hexenylacetat, Aldrich

Natriumsulfat wasserfrei, Merck

Geräte

SBSE:

TDU, Gerstel, Mühlheim a. d. Ruhr
KAS 4, Gerstel, Mühlheim a. d. Ruhr
Rührplatte 15-fach, Poly 15 "Twister"
Thermodesorber, Gerstel, Mühlheim a. d. Ruhr
Twister 20 * 1 mm, Gerstel, Mühlheim a. d. Ruhr
Transportadapter für Twister, Gerstel, Mühlheim a. d. Ruhr
Glasröhrchen für Twister, Gerstel, Mühlheim a. d. Ruhr

GC-MS-System:

6890N Network GC Station, Agilent
5975B inert XL MSD, Agilent
MPS 2 XL Twister, Gerstel, Mühlheim a. d. Ruhr
Cryostatic Cooling Device, Gerstel, Mühlheim a. d. Ruhr
Helium 5.0
Stickstoff 5.0
TR-WaxMS (30m x 0,25 mm x 0,25 µm) Säule, Thermo Scientific
HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25µm) , Agilent
Rtx-1701 (30m x 0,25 mm x 0,5µm), Restek

SDE:

SDE-Anlage,
Magnetrührer, IKA RH basic 2
Kühlung
Vigreuxkolonne

Sonstige Laborgeräte:

pH-Meter, Knick pH-Meter 766 Calimatic; Knick
Waage, Kern& Söhne GmbH ABJ
Ultraschallbad, Bandelin Sonorex

Lösungen

Stammlösungen

Zur Herstellung der jeweiligen Stammlösungen werden in 50 mL Messkolben 40 mL Methanol vorgelegt, 500 µL des entsprechenden Aromas pipettiert und dann mit Methanol bis zur Marke aufgefüllt. Daraus ergeben sich folgende Konzentrationen (siehe Tab. 2):

Tab. 2: Konzentration der Stammlösungen (500 µL Standard mit Methanol auf 50 mL aufgefüllt)

Analyt	Konzentration [mg/L]
Ethylisobutyrat	8603
Methyl-2-methylbutyrat	8673
Ethylbutyrat	8763
Butylacetat	8722
Hexanal	7896
Ethyl-2-methylbutyrat	8603
Ethylisovalerat	8467
3-Methylbutylacetat	8623
2-Methylbutylacetat	8234
<i>trans</i> -2-Hexenal	8206
Amylacetat	8672
Methylhexanoat	8752
Ethylhexanoat	8585
Benzaldehyd	10500
Hexylacetat	8704
<i>trans</i> -2-Hexenylacetat	8800
Hexyl-2-methylbutyrat	8151
Damascenon	9490

10 mg/L Multistandard

In einem 100 mL Kolben werden ca. 50 mL Apfelsaftkonzentrat (verdünnt auf 11 °Brix, relative Dichte entspricht einer 11%-igen Saccharose Lösung) vorgelegt, die in Tab. 3 aufgeführten Mengen der Analyt-Stammlösungen zupipettiert und mit Apfelsaftkonzentrat (verdünnt auf 11 °Brix) auf 100 mL aufgefüllt.

Tab. 3: Volumina der Analyten-Stammlösung zur Herstellung eines 10 mg/L Multistandards in einem 100 mL Kolben

Analyt	Volumen [µL]
Ethyl-isobutyryat	116,2
Methyl-2-methylbutyryat	115,3
Ethylbutyryat	114,2
Butylacetat	114,6
Hexanal	126,6
(Z)-3-Hexenal	205,0
Ethyl-2-methylbutyryat	116,2
Ethyl-isovalerate	118,1
3-Methylbutylacetat	116,0
2-Methylbutylacetat	121,4
trans-2-Hexen-1-al	121,8
Amylacetat	115,4
Methylhexanoat	114,2
Ethylhexanoat	116,4
1-Octen-3-on	121,6
Benzaldehyd	95,2
Hexylacetat	114,8
trans-2-Hexenylacetat	113,6
Hexyl-2-methylbutyryat	122,6
Damascenon	105,4

Isobutylisobutyryat (IS Apfel)

Stammlösung 8,45 g/L: 1000 µL Isobutylbutyryat in einen 100 mL Messkolben pipettieren und mit Methanol zur Markierung auffüllen.

59,3 mL der Isobutylisobutyryat- Stammlösung wird in einen 25 mL Messkolben pipettieren, der zuvor mit ca. 20 mL VE-Wasser gefüllt wurde. Danach auffüllen mit VE Wasser bis zur Markierung (20 mg/L).

Ethylisobutyryat (IS Orange)

Stammlösung 8,603 g/L: 1000 µL Ethylisobutyryat in einen 100 mL Messkolben pipettieren und mit Methanol zur Eichstrich auffüllen. 130,8 µL der Ethylisobutyryat-Stammlösung werden in einen 25 mL Messkolben pipettieren und mit VE-Wasser aufgefüllt bis zur Markierung (45 mg/L).

C. Konzentration der Aromen im Realstandard

Um die Apfelmethode auf reale, im Apfelsaft vorkommende Konzentrationen zu optimieren, wurde ein Multi-Standard mit Analyt-Konzentrationen, wie sie in einem durchschnittlichen Direktsaft vorkommen, durchgeführt. Dieser setzt sich, wie in Tab. iv aufgeführt, zusammen.

Tab. iv: Konzentration der Aromen in einem durchschnittlichen Direktsaft

Aromen	Konzentration der Aromen in handelsüblichem Direktsaft [µg/L]
Damascenon	10
2-Methylbutylacetat	166
Ethyl-2-methylbutyrat	37
3-Methylbutylacetat	1
Ethylhexanoat	5
Amylacetat	7
Benzaldehyd	16
Hexanal	143
Butylacetat	455
Hexyl-2-methylbutyrat	2
Hexylacetat	103
trans-2-Hexenal	720
trans-2-Hexenylacetat	19
Methyl-2-methylbutyrat	3
Ethylbutyrat	111
Ethylisobutyrat	3
Ethylisovalerat	0,3

D. Messmethode zur Aromenanalyse in Apfelsäften

Sample Inlet : GC

Injection Source : External Device

Injection Location: Rear

Mass Spectrometer : Enabled

OVEN

Initial temp: 38 °C (On) Maximum temp: 300 °C

Initial time: 35.00 min Equilibration time: 3.00 min

Ramps:

#	Rate	Final temp	Final time
---	------	------------	------------

1	10.00	130	0.00
---	-------	-----	------

2	20.00	270	10.00
---	-------	-----	-------

3	0.0(Off)		
---	----------	--	--

Post temp: 0 °C

Post time: 0.00 min

Run time: 61.20 min

FRONT INLET (SPLIT/SPLITLESS)

Mode: Split

Initial temp: 50 °C (Off)

Pressure: 0.0 kPa (Off)

Total flow: 0.1 mL/min

Gas saver: Off

Gas type: Helium

BACK INLET (CIS3)

Mode: Solvent Vent

Initial temp: 250 °C (Off)

Pressure: 48.5 kPa (On)

Vent time: 0.01 min

Vent flow: 40.0 mL/min

Vent Pressure: 48 kPa

Purge flow: 18.6 mL/min

Purge time: 0.40 min

Total flow: 22.9 mL/min

Gas saver: On

Saver flow: 40.0 mL/min

Saver time: 48.33 min

Gas type: Helium

COLUMN 1

(not installed)

COLUMN 2

Capillary Column

Model Number: Restek

RTX-1701

Max temperature: 300 °C

Nominal length: 30.0 m

Nominal diameter: 250.00 um

Nominal film thickness: 0.50 um

Mode: constant pressure

	Pressure: 48.5 kPa
	Nominal initial flow: 1.0 mL/min
	Average velocity: 36 cm/sec
	Inlet: Back Inlet
	Outlet: MSD
	Outlet pressure: vacuum
FRONT DETECTOR (NO DET)	BACK DETECTOR (NO DET)
SIGNAL 1	SIGNAL 2
Data rate: 20 Hz	Data rate: 20 Hz
Type: oven temperature	Type: col 2 head pressure
Save Data: Off	Save Data: Off
Zero: 0.0 (Off)	Zero: 0.0 (Off)
Range: 0	Range: 0
Fast Peaks: Off	Fast Peaks: Off
Attenuation: 0	Attenuation: 0
COLUMN COMP 1 (No Detectors Installed)	COLUMN COMP 2 (No Detectors Installed)
THERMAL AUX 2	
Use: MSD Transfer Line Heater	
Description: TransferLine	
Initial temp: 270 °C (On)	
Initial time: 0.00 min	

GERSTEL MAESTRO

SYSTEM SETTINGS

Maestro Runtime	: 61.20 min
GC Cool Down Time	: 15.00 min
Cryo Timeout	: 20.00 min

GERSTEL CIS

CRYO COOLING

Cryo Cooling	: used
--------------	--------

TEMPERATURE PROGRAM

Initial Temperature	: -35 °C
Equilibration Time	: 0.50 min
Initial Time	: 0.00 min
Ramp 1	
Rate	: 10.0 °C/s
End Temp	: 300 °C
Hold Time	: 5.00 min

Ramp 2	
Rate : 0.0 °C/s	
GERSTEL TDU	
TEMPERATURE PROGRAM	
Initial Temperature : 20 °C	
Delay Time : 0.40 min	
Initial Time : 0.00 min	
Ramp 1	
Rate 1 : 720.0 °C/min	
End Temp 1 : 290 °C	
Hold Time 1 : 6.00 min	
Ramp 2	
Rate 2 : 0.0 °C/min	
TDU SETTINGS	
Desorption Mode : Splitless	
Sample Mode : Sample Remove	
MS ACQUISITION PARAMETERS	
General Information	

Tune File : atune.u	
Acquisition Mode : Scan/SIM	
MS Information	

Solvent Delay : 8.00 min	
EM Absolute : False	
EM Offset : 0	
Resulting EM Voltage : 1600.0	
[Raw Scan Parameters]	
Low Mass : 15.0	
High Mass : 250.0	
Threshold : 150	
Sample # : 2 A/D Samples 4	
[MSZones]	
MS Quad : 150 C maximum 200 C	
MS Source : 230 C maximum 250 C	

E. Messmethode zur Bestimmung von Ethylbutyrat in Orangensaft

Sample Inlet : GC

Injection Source : External Device

Injection Location: Rear

Mass Spectrometer : Enabled

OVEN

Initial temp: 38 °C (On) Maximum temp: 300 °C

Initial time: 15.00 min Equilibration time: 3.00 min

Ramps:

Rate Final temp Final time

1 20.00 270 15.00

2 0.0(Off)

Post temp: 0 °C

Post time: 0.00 min

Run time: 41.60 min

FRONT INLET (SPLIT/SPLITLESS) BACK INLET (CIS3)

Mode: Split Mode: Solvent Vent

Initial temp: 50 °C (Off) Initial temp: 250 °C (Off)

Pressure: 0.0 kPa (Off) Pressure: 48.5 kPa (On)

Total flow: 0.1 mL/min Vent time: 0.01 min

Gas saver: Off Vent flow: 40.0 mL/min

Gas type: Helium Vent Pressure: 48 kPa

Purge flow: 18.6 mL/min

Purge time: 0.50 min

Total flow: 22.9 mL/min

Gas saver: On

Saver flow: 40.0 mL/min

Saver time: 48.33 min

Gas type: Helium

COLUMN 1

(not installed)

COLUMN 2

Capillary Column

Model Number: Restek

RTX-1701

Max temperature: 300 °C

Nominal length: 30.0 m

Nominal diameter: 250.00 um

Nominal film thickness: 0.50 um

Mode: constant pressure

Pressure: 48.5 kPa

Nominal initial flow: 1.0 mL/min
Average velocity: 36 cm/sec
Inlet: Back Inlet
Outlet: MSD
Outlet pressure: vacuum

FRONT DETECTOR (NO DET) BACK DETECTOR (NO DET)

SIGNAL 1 SIGNAL 2

Data rate: 20 Hz Data rate: 20 Hz
Type: oven temperature Type: col 2 head pressure
Save Data: Off Save Data: Off
Zero: 0.0 (Off) Zero: 0.0 (Off)
Range: 0 Range: 0
Fast Peaks: Off Fast Peaks: Off
Attenuation: 0 Attenuation: 0

COLUMN COMP 1 COLUMN COMP 2

(No Detectors Installed) (No Detectors Installed)

THERMAL AUX 2

Use: MSD Transfer Line Heater

Description: TransferLine

Initial temp: 260 °C (On)

GERSTEL MAESTRO

SYSTEM SETTINGS

Maestro Runtime : 76.90 min
GC Cool Down Time : 10.00 min
Cryo Timeout : 20.00 min

GERSTEL CIS

TEMPERATURE PROGRAM

Initial Temperature : -35 °C
Equilibration Time : 0.50 min
Initial Time : 0.00 min

Ramp 1

Rate : 10.0 °C/s
End Temp : 300 °C
Hold Time : 5.00 min

Ramp 2

Rate : 0.0 °C/s

CRYO COOLING

Cryo Cooling : used

GERSTEL TDU

TEMPERATURE PROGRAM

Initial Temperature : 20 °C
Delay Time : 0.40 min
Initial Time : 0.00 min

Ramp 1
Rate 1 : 720.0 °C/min
End Temp 1 : 290 °C
Hold Time 1 : 6.00 min

Ramp 2
Rate 2 : 0.0 °C/min

TDU SETTINGS

Transfer Temp : 320 °C
Desorption Mode : Splitless
Sample Mode : Sample Remove

MS ACQUISITION PARAMETERS

MS Information

Solvent Delay : 0.00 min
EM Absolute : False
EM Offset : 0
Resulting EM Voltage : 2200.0

[Scan Parameters]

Low Mass : 33.0
High Mass : 400.0
Threshold : 150
Sample # : 2 A/D Samples 4

[MSZones]

MS Quad : 150 C maximum 200 C
MS Source : 230 C maximum 250 C

F. Messmethode zur Bestimmung von Markersubstanzen in Apfelsaft

OVEN

Initial temp: 40 °C (On) Maximum temp: 300 °C
 Initial time: 8.00 min Equilibration time: 3.00 min

Ramps:

#	Rate	Final temp	Final time
1	5.00	200	0.00
2	10.00	270	10.00
3	0.0(Off)		

Post temp: 0 °C

Post time: 0.00 min

Run time: 57.00 min

FRONT INLET (SPLIT/SPLITLESS) BACK INLET (CIS3)

Mode: Split	Mode: Solvent Vent
Initial temp: 50 °C (Off)	Initial temp: 250 °C (Off)
Pressure: 0.0 kPa (Off)	Pressure: 49.3 kPa (On)
Total flow: 0.1 mL/min	Vent time: 0.08 min
Gas saver: Off	Vent flow: 80.0 mL/min
Gas type: Helium	Vent Pressure: 57 kPa
	Purge flow: 80.0 mL/min
	Purge time: 5.00 min
	Total flow: 84.3 mL/min
	Gas saver: On
	Saver flow: 40.0 mL/min
	Saver time: 60.00 min
	Gas type: Helium

COLUMN 1

(not installed)

COLUMN 2

Capillary Column

Model Number: Restek
 RTX-1701
 Max temperature: 300 °C
 Nominal length: 30.0 m
 Nominal diameter: 250.00 um
 Nominal film thickness: 0.50 um
 Mode: constant flow
 Initial flow: 1.0 mL/min
 Nominal init pressure: 49.3 kPa
 Average velocity: 36 cm/sec
 Inlet: Back Inlet
 Outlet: MSD

Outlet pressure: vacuum

FRONT DETECTOR (NO DET)	BACK DETECTOR (NO DET)	
SIGNAL 1	SIGNAL 2	
Data rate: 20 Hz	Data rate: 20 Hz	
Type: oven temperature	Type: col 2 head pressure	
Save Data: Off	Save Data: Off	
Zero: 0.0 (Off)	Zero: 0.0 (Off)	
Range: 0	Range: 0	
Fast Peaks: Off	Fast Peaks: Off	
Attenuation: 0	Attenuation: 0	
COLUMN COMP 1 (No Detectors Installed)	COLUMN COMP 2 (No Detectors Installed)	
THERMAL AUX 2		
Use: MSD Transfer Line Heater		
Description: TransferLine		
Initial temp: 270 'C (On)		
Initial time: 0.00 min		
# Rate Final temp Final time		
1 0.0(Off)		
POST RUN		
Post Time: 0.00 min		
TIME TABLE		
Time	Specifier	Parameter & Setpoint
GC Injector		
Front Injector:		
No parameters specified		
Back Injector:		
No parameters specified		
Column 1 Inventory Number : AB008		
Column 2 Inventory Number : AB008		
GERSTEL MAESTRO		
SYSTEM SETTINGS		
Maestro Runtime : 57.00 min		
GC Cool Down Time : 15.00 min		
Cryo Timeout : 30.00 min		
GERSTEL CIS		
CRYO COOLING		
Cryo Cooling : used		
TEMPERATURE PROGRAM		
Initial Temperature : -35 'C		

Equilibration Time : 0.50 min
Initial Time : 0.00 min
Ramp 1
Rate : 8.0 °C/s
End Temp : 300 °C
Hold Time : 5.00 min
Ramp 2
Rate : 0.0 °C/s

GERSTEL TDU

TEMPERATURE PROGRAM

Initial Temperature : 20 °C
Delay Time : 0.40 min
Initial Time : 0.00 min
Ramp 1
Rate 1 : 720.0 °C/min
End Temp 1 : 290 °C
Hold Time 1 : 6.00 min
Ramp 2
Rate 2 : 0.0 °C/min

TDU SETTINGS

Desorption Mode : Splitless
Sample Mode : Sample Remove

MS ACQUISITION PARAMETERS

Solvent Delay : 1.00 min
EM Absolute : False
EM Offset : 0
Resulting EM Voltage : 2482.4

[Scan Parameters]

Low Mass : 10.0
High Mass : 500.0
Threshold : 150
Sample # : 2 A/D Samples 4

[MSZones]

MS Quad : 150 C maximum 200 C
MS Source : 230 C maximum 250 C

G. Validierung

G.1 Ausreißer-Tests

Dixon-Test

Beim Dixon-Test berechnet man die Prüfgröße Q aus der Differenz zwischen dem ausreißerverdächtigen Wert (x_1) und dem benachbarten Wert (x_2) und dividiert durch die Spannweite (R) der Messwerte.

$$Q = \frac{|x_1 - x_2|}{R} \quad (\text{i})$$

Die Prüfgröße Q wurde mit dem Dixon-Tabellenwert für ein Signifikanzniveau von P = 99% verglichen.

- Wenn Q < Tabellenwert, dann ist der Messwert zu 99% kein Ausreißer
- Wenn Q > Tabellenwert, dann ist der Messwert als Ausreißer zu betrachten

Grubbs-Test

Im ersten Schritt wurde der Mittelwert der Messreihe (\bar{x}), Gl. (ii), und die Standardabweichung (s), Gl. (iii), bestimmt, mit x_i = Messwert und N = Anzahl der Messungen:

$$\bar{x} = \frac{1}{N} * \sum_{i=1}^N x_i \quad (\text{ii})$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{(N-1)}} \quad (\text{iii})$$

Für den Messwert, welcher nun die größte Differenz zum Mittelwert aufweist, wurde durch Einsetzen in Gleichung (iv) die Prüfgröße (Q) ermittelt.

$$Q = \frac{|x_i - \bar{x}|}{s} \quad (\text{iv})$$

Diese Prüfgröße wurde mit dem Grubbs- Tabellenwert (N = f, P: 99%) verglichen.

- Wenn Q < Tabellenwert, dann ist der Messwert zu 99% kein Ausreißer
- Wenn Q > Tabellenwert, dann ist der Messwert als Ausreißer zu betrachten

Bei einem Ausreißer wurde dieser Wert gestrichen und durch einen neuen Messwert ersetzt und erneut überprüft. Die weiteren Validierungsschritte wurden mit ausreißerfreien Messreihen durchgeführt.

Bei statistischen Tests sollten nur signifikante (99%) und nicht lediglich wahrscheinliche (95%) Unterschiede berücksichtigt werden.

G.2 Normalverteilung

Beim Test nach David bildet man die Prüfgröße (PG, Gl. (v)) aus dem Quotienten aus der Spannweite (R) und der Standardabweichung (s) und prüft ob dieser innerhalb der oberen (g_o) und unteren (g_u) Schranke der Werte der Tabelle nach David liegen (kleinster Messwert: x_{\min} , größter Messwert: x_{\max}).

$$PG = \frac{x_{\max} - x_{\min}}{s} = \frac{R}{s} \quad (v)$$

In der David-Tabelle wurden für die entsprechende Anzahl an Messungen (N=3, N=10) und dem Signifikanzniveau (P=95%) die Grenzen nachgeschlagen und mit der Prüfgröße verglichen:

- Liegt die Prüfgröße innerhalb der Grenzen, kann eine Normalverteilung der Werte angenommen werden.
- Ist die Prüfgröße größer als g_o oder kleiner als g_u , ist die Verteilung signifikant unterschiedlich zu einer Normalverteilung.

Nach der Prüfung stand fest, dass die Messreihen normalverteilt sind und zur weiteren Validierung genutzt werden konnten.

G.3 Linearität

Anpassungstest nach Mandel

Dieser Test passt eine Funktion 1. Grades (linear) und eine Funktion 2. Grades (gekrümmt) an die Messdaten der Kalibration an, berechnet jeweils die Restvarianzen (s_{y1}^2, s_{y2}^2), aus welchen im nächsten Schritt die Differenz der Abweichungsquadratsumme (DS², Gl. (vi)) ermittelt werden.

$$DS^2 = (N - 2) * s_{y1}^2 - (N - 3) * s_{y2}^2 \quad (vi)$$

$$PW = \frac{DS^2}{s_{y2}^2} \quad (vii)$$

Der anhand der Gleichung (vii) ermittelte Prüfwert PW wurde mit dem Wert aus der F-Tabelle für $f_1=1, f_3=N-3$ und einem Signifikanzniveau von 99% verglichen.

- Wenn PW < Tabellenwert, dann kann die Funktion in dem untersuchten Arbeitsbereich als linear angesehen werden, da kein signifikanter Unterschied zwischen der Differenz der Abweichungsquadratsumme und der Restvarianz s_y^2 zu erkennen ist.
- Wenn PW > Tabellenwert, dann liegt ein signifikanter Unterschied vor und die Funktion ist in dem Arbeitsbereich nicht linear. In diesem Fall muss der Arbeitsbereich soweit eingegrenzt werden bis der Prüfwert unter dem Tabellenwert liegt und die Funktion linear ist, oder es müssen Regressionsmodelle höherer Ordnung angewendet werden.

Residualanalyse

$$d_i = y_i - \hat{y}_i \quad (\text{viii})$$

y_i = Messwert der Peakfläche

\hat{y}_i = zu y_i gehöriger Schätzwert aus der Regressionsgeraden

G.4 Varianzhomogenität

Die Messwerte der niedrigsten und der höchsten Konzentration eines Arbeitsbereiches wurden zehnfach ermittelt und daraus die Varianzen (s_1^2, s_2^2) nach Gleichung (ix) berechnet.

$$s_i^2 = \frac{\sum_{j=1}^{10} (x_{ij} - \bar{x}_i)^2}{n_i - 1} \quad (\text{ix})$$

x_{ij} = j-ter Messwert für die Konzentration

Aus dem Quotienten der Varianzen konnte anschließend die Prüfgröße F, wie in Gleichung (x) beschrieben, gebildet werden, wobei $s_1 > s_2$ ist.

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad (\text{x})$$

Diese Prüfgröße wurde mit dem Tabellenwert F (P, f₁, f₂) verglichen.

- Wenn F < Tabellenwert (99%, 9, 9), dann ist zwischen den Varianzen kein signifikanter Unterschied zu erkennen und es herrscht Varianzhomogenität zwischen beiden Messreihen.
- Wenn F > Tabellenwert (99%, 9, 9), gilt der Unterschied der Varianzen als bestätigt und die untersuchten Messreihen weisen Varianzinhomogenität auf.

G.5 Erkennungs-, Bestimmungs und Erfassungsgrenze und Erfassungsvermögen

Erklärung des Regressionsmodells

Da alle Bezugszustände, eingeschlossen dem Grundzustand ($c_{\text{Analyt}} = 0$), nie als Werte der Zustandsgröße selbst bekannt sind, sondern nur als Differenz zum Grundzustand, wird die lineare Regression in der DIN 11843-2 über Iterationsverfahren durchgeführt. Um mit den ermittelten Werten in der Praxis arbeiten zu können, wird der Wert der Zustandsgröße im Grundzustand auf Null gesetzt.

Bei der gewichteten linearen Regression lässt sich die lineare Kalibrierfunktion wie folgt beschreiben:

$$Y_{ij} = a + bx_i + \varepsilon_{ij} \quad (\text{xi})$$

a = Achsenabschnitt

b = Steigung

x = Einzelwert der Zustandsgrößendifferenz

ε_{ij} = Komponente der Messgröße, welche die Zufallsvariable der Abweichungen darstellt

i = Identifizierungsvariable für die Bezugszustände (1...I)

j = Identifizierungsvariable für Vorbereitungen für den Bezugszustand und den Grundzustand (1...J)

Die Reststandardabweichung (σ , Gl. (xii)) hängt linear von x (Einzelwert der Zustandsgrößendifferenz) ab:

$$\sigma(x_i) = c + dx_i \quad (\text{xii})$$

c = Achsenabschnitt im Ausdruck für die Reststandardabweichung

d = Steigungsfaktor im Ausdruck für die Reststandardabweichung

Schätzung der linearen Beziehung zwischen der Reststandardabweichung und der Zustandsgrößendifferenz

Die Standardabweichungen (s_i), welche zur Schätzung der Parameter c und d eingesetzt wurden, lassen sich nach folgender Gleichung berechnen:

$$s_i = \sqrt{\frac{1}{J-1} \sum_{j=1}^J (y_{i,j} - \bar{y}_i)^2} \quad (\text{xiii})$$

Die gewichtete lineare Regression wurde mit der in Gleichung (xiv) beschriebenen Wichtung (w_i) durchgeführt:

$$w_i = \frac{1}{\sigma^2(x_i)} = \frac{1}{(c+dx_i)^2} \quad (\text{xiv})$$

Um die unbekannten Parameter c und d für die Wichtung zu schätzen wurde ein Iterationsverfahren mit folgender Wichtung (\hat{w}_{qi}) durchgeführt:

$$\hat{w}_{qi} = \frac{1}{(\hat{\sigma}_{qi})^2} \quad (\text{xv})$$

q = Anzahl der Iterationsschritte
 $\hat{\sigma}$ = Schätzwert der Reststandardabweichung

Für den ersten Iterationsschritt ($q=0$) gilt $\hat{\sigma}_{0i=s_i}$. Die Werte von s_i sind die empirischen Standardabweichungen. Für die weiteren Iterationsschritte $q=1,2,\dots$ gilt:

$$\hat{\sigma}_{qi} = \hat{c}_q + \hat{d}_q x_i \quad (\text{xvi})$$

\hat{c} = Schätzwert für den Achsenabschnitt c
 \hat{d} = Schätzwert für den Steigungsfaktor d

Folgende Hilfswerte werden zur Berechnung eingesetzt:

$$T_{q+1,1} = \sum_{i=1}^I \hat{w}_{qi} \quad (\text{xvii})$$

$$T_{q+1,2} = \sum_{i=1}^I \hat{w}_{qi} x_i \quad (\text{xviii})$$

$$T_{q+1,3} = \sum_{i=1}^I \hat{w}_{qi} x_i^2 \quad (\text{xix})$$

$$T_{q+1,4} = \sum_{i=1}^I \hat{w}_{qi} s_i \quad (\text{xx})$$

$$T_{q+1,5} = \sum_{i=1}^I \hat{w}_{qi} x_i s_i \quad (\text{xxi})$$

$$\hat{c}_{q+1} = \frac{T_{q+1,3} T_{q+1,4} - T_{q+1,2} T_{q+1,5}}{T_{q+1,1} T_{q+1,3} - T_{q+1,2}^2} \quad (\text{xxii})$$

$$\hat{d}_{q+1} = \frac{T_{q+1,1} T_{q+1,5} - T_{q+1,2} T_{q+1,4}}{T_{q+1,1} T_{q+1,3} - T_{q+1,2}^2} \quad (\text{xxiii})$$

s = empirische Standardabweichung

Dass das Ergebnisse für q=3 konnte als Schlussergebnis betrachtet werden.

$$\hat{\sigma}_3 = \hat{c}_3 + \hat{d}_3 x \quad (\text{xxiv})$$

mit $\hat{\sigma}_3 = \hat{c}(x)$ (xxv)

$$\hat{c}_3 = \hat{c}_0 \quad (\text{xxvi})$$

$$d_3 = \hat{d} \quad (\text{xxvii})$$

$$\hat{\sigma}_x(x) = \hat{\sigma}_0 + \hat{d}x \quad (\text{xxviii})$$

Schätzung der Kalibrierfunktion

Im nächsten Schritt wurden die Parameter a und b mit der Gewichtung $w_i = \frac{1}{\hat{\sigma}^2(x_i)}$ geschätzt. Folgende Hilfswerte werden zur Schätzung berechnet: $T_1 = J \sum_{i=1}^I w_i$ (xxix)

$$T_2 = J \sum_{i=1}^I w_i x_i \quad (\text{xxx})$$

$$T_3 = J \sum_{i=1}^I w_i x_i^2 \quad (\text{xxxi})$$

$$T_4 = \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i \bar{y}_{ij} \quad (\text{xxxii})$$

$$T_5 = \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i x_i \bar{y}_{ij} \quad (\text{xxxiii})$$

\bar{y}_{ij} = Mittelwert der Messwerte der j-ten Vorbereitung des i-ten Bezugszustandes

Mit den Gleichungen (xxxiv) und (xxxv) wurden die Schätzwerte für a und b ermittelt:

$$\hat{a} = \frac{T_3 T_4 - T_2 T_5}{T_1 T_3 - T_2^2} \quad (\text{xxxiv})$$

$$\hat{b} = \frac{T_1 T_5 - T_2 T_4}{T_1 T_3 - T_2^2} \quad (\text{xxxv})$$

Erkennungsgrenze y_c

Die Erkennungsgrenze wird anhand der Gleichung (xxxvi) berechnet:

$$y_c = \hat{a} + t_{0,95}(v) \sqrt{\frac{\hat{\sigma}_0^2}{K} + \left(\frac{1}{T_1} + \frac{\bar{x}_w^2}{s_{xxw}} \right) \hat{\sigma}^2} \quad (\text{xxxvi})$$

mit:

$$\bar{x}_w = \frac{T_2}{T_1} \quad (\text{xxxvii})$$

$$s_{xxw} = \frac{T_3 - T_2^2}{T_1} \quad (\text{xxxviii})$$

$$\hat{\sigma}^2 = \frac{1}{I*J-2} \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i (\bar{y}_{ij} - \hat{a} - \hat{b}x_i)^2 \quad (\text{xxxix})$$

$t_{0,95}(v)$ = 95%-Quantil der t-Verteilung mit $v=I*J-2$ Freiheitsgrade

$K= 1$, Anzahl der Vorbereitungen der Probe

$I=$ Anzahl der Kalibrierstufen

$J=3$, Anzahl der Vorbereitungen der jeweiligen Kalibrierstufe

Erfassungsgrenze x_c

Die Erfassungsgrenze nach DIN 11843 entspricht der Nachweisgrenze nach DIN 32645 und wird nach folgender Gleichung bestimmt:

$$x_c = \frac{t_{0,95}(v)}{\hat{b}} \sqrt{\frac{\hat{\sigma}_0^2}{K} + \left(\frac{1}{T_1} + \frac{\bar{x}_w^2}{s_{xxw}} \right) \hat{\sigma}^2} \quad (\text{xli})$$

mit:

$$\bar{x}_w = \frac{T_2}{T_1} \quad (\text{xli})$$

$$s_{xxw} = \frac{T_3 - T_2^2}{T_1} \quad (\text{xlii})$$

$$\hat{\sigma}^2 = \frac{1}{I*J-2} \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J w_i (\bar{y}_{ij} - \hat{a} - \hat{b}x_i)^2 \quad (\text{xliii})$$

Erfassungsvermögen x_d

Das Erfassungsvermögen wird nach Gleichung (xlv) bestimmt:

$$x_d = \frac{\delta}{\hat{b}} \sqrt{\frac{\hat{\sigma}^2(x_d)}{K} + \left(\frac{1}{T_1} + \frac{\bar{x}_w^2}{s_{xxw}} \right) \hat{\sigma}^2} \quad (\text{xlv})$$

$\delta = \delta(\nu, \alpha, \beta)$ der Wert des Nichtzentralitätsparameters

$\nu = I^*J-2$

$\alpha = \text{Wahrscheinlichkeit eines Fehlers 1. Art}$

$\beta = \text{Wahrscheinlichkeit eines Fehlers 2. Art}$

$\hat{\sigma}^2(x_d)$ hängt von x_d ab, welcher noch iterativ zu berechnen war. Der Beginn der Iteration lautet: $\hat{\sigma}(x_d)_0 = \hat{\sigma}_0$ und führt zum Ergebnis x_{d0} .

Für den nächsten Iterationsschritt zur Berechnung von x_{d1} wurde $\hat{\sigma}(x_d)_1 = \hat{\sigma}(x_{d0})$ errechnet und in der Gleichung (xlv) verwendet. Nach dem dritten Iterationsschritt wurde von einem akzeptablen Wert von x_d ausgegangen.

Bestimmungsgrenze x_{BG}

In der DIN 11843 ist keine Berechnung der Bestimmungsgrenze gegeben. Laut DIN 32645 wird eine Schnellabschätzung der Bestimmungsgrenze durch Multiplizieren der Nachweigrenze mit dem Faktor 3 erhalten. Wenn dieses Verfahren auf die ermittelten Werte aus der DIN 11843 angewendet wird ergibt sich folgende Formel:

$$x_C * 3 = x_{BG} \quad (\text{xlv})$$

Abb. 1 veranschaulicht die in der DIN 11843-2 verwendeten und berechneten Kenngrößen.

$Z = \text{Zustandsgröße}$

$x_d = \text{Erfassungsvermögen}$

$X_0 = \text{Wert der Zustandsgröße im Grundzustand}$

$Y = \text{Messgröße}$

$X = \text{Zustandsgrößendifferenz}$

$y_c = \text{Erkennungsgrenze}$

$x_C = \text{Erfassungsgrenze}$

$\beta = \text{Wahrscheinlichkeit eines Fehlers 2. Art für } X=x_d$

$\alpha = \text{Wahrscheinlichkeit eines Fehlers 1. Art}$

$I = \text{Kalibrierfunktion}$

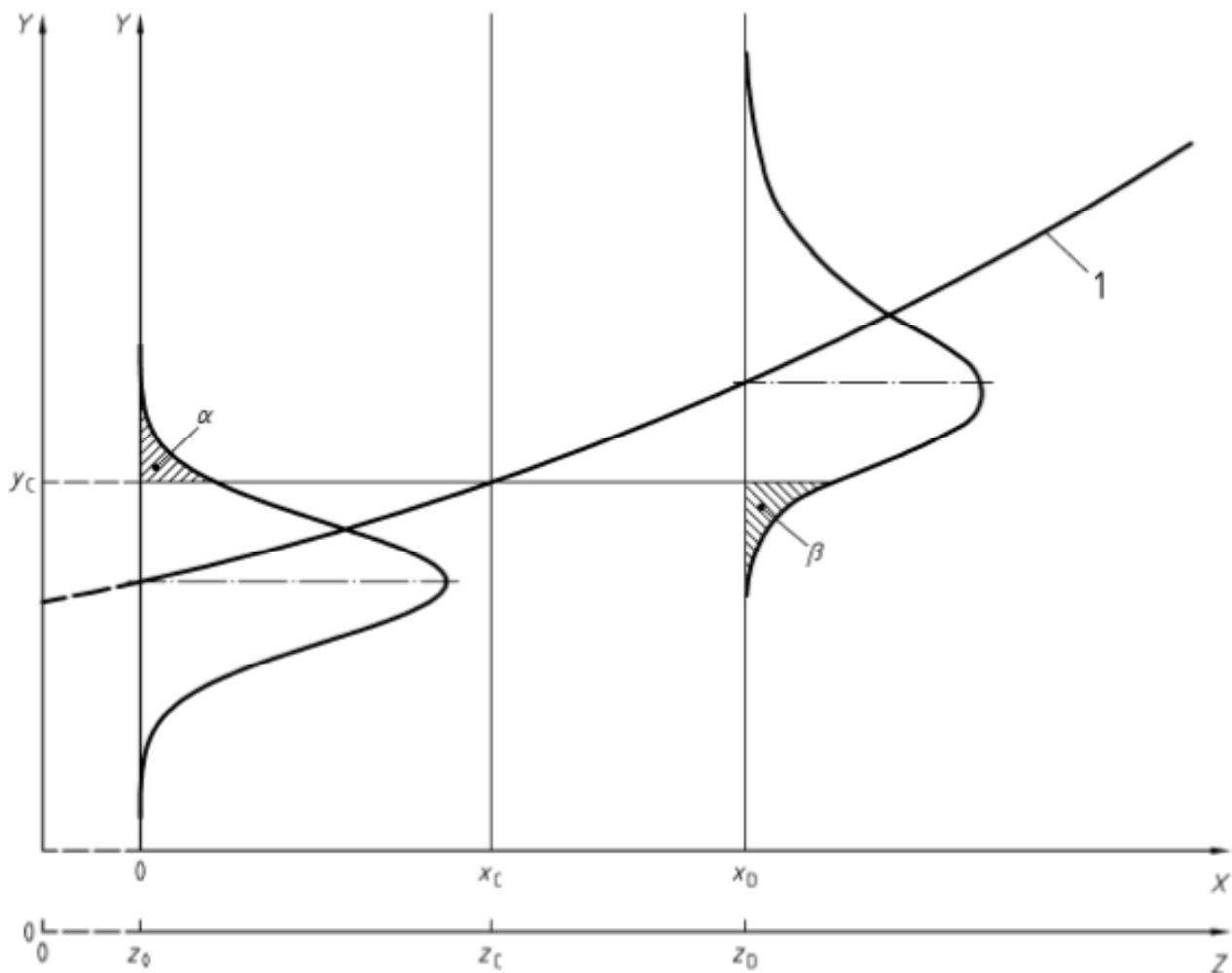


Abb. 1: Kalibrierfunktion, Erkennungsgrenze, Erfassungsgrenze und Erfassungsvermögen

G.6 Verfahrenskenndaten

$$s_{x0} = \frac{s_y}{b} \quad (\text{xlvi})$$

$$V_{x0} = \frac{s_{x0}}{\bar{x}} * 100 \quad (\text{xlvii})$$

G.7 Präzision

Die Präzision beschreibt die Streuung von Analysenergebnissen bei mehrfacher Anwendung eines festgelegten Analysenverfahrens unter vorgegebenen Bedingungen. Als Streuungsmaß wird die Standardabweichung s_i (Gl. (xlviii)), die relative Standardabweichung s_{rel} (gleich dem Variationskoeffizienten V_k , Gl. (xlix)) und die Varianz s_i^2 (Gl. (I)) berechnet.

$$s_i = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^{n_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2}{n_i - 1}} \quad (\text{xlviii})$$

$$V_k = \frac{s}{\bar{x}} * 100\% \quad (\text{xlix})$$

$$s_i^2 = \frac{\sum_{j=1}^{n_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2}{n_i - 1} \quad (\text{li})$$

G.8 Richtigkeit

Wiederfindung

$$W = \frac{\bar{x}}{x_R} * 100\% \quad (\text{li})$$

Tab. v: Validierungsdaten für die Linearität nach Mandel, der anhand der gewichteten Linearen Regression ermittelte Achsenabschnitt und Steigung für die Apfeleromastoffe in rückverdünntem Apfelsaftkonzentrat und für Ethylbutyrat in rückverdünntem Orangensaftkonzentrat

	Linearität nach Mandel		Achsenabschnitt	Steigung
	F-Wert	Prüfwert	a	b
Matrix: Apfelsaftkonzentrat				
Ethylisobutyrat	7,82	2,800	0,0007	0,0048
Methyl-2-methylbutyrat	7,82	2,080	0,0004	0,0059
Ethylbutyrat (in Apfelsaft)	8,68	1,030	0,0326	0,0045
Butylacetat	8,01	7,300	0,0285	0,0013
Hexanal	8,01	0,020	0,0040	0,0004
Ethyl-2-methylbutyrat	9,33	4,580	0,0075	0,0105
Ethylisovalerat	8,68	0,003	0,0000	0,0076
3-Methylbutylacetat	7,82	2,850	-0,0004	0,0144
2-Methylbutylacetat	8,28	0,490	0,1157	0,0322
trans-2-Hexen-1-al	8,68	5,210	-0,0044	0,0027
Amylacetat	7,67	6,980	0,0003	0,0015
Methylhexanoat	8,68	3,570	-0,0016	0,0133
Ethylhexanoat	7,82	0,330	-0,0002	0,0030
Benzaldehyd	7,82	6,660	0,0065	0,0040
Hexylacetat	8,68	0,003	0,0040	0,0100
trans-2-Hexenylacetat	7,56	4,850	-0,0006	0,0079
Hexyl-2-methylbutyrat	7,82	0,150	-0,0010	0,0134
Damascenon	8,68	0,700	0,0372	0,0208
Matrix: Orangensaftkonzentrat				
Ethylbutyrat (in Orangensaft)	8,68	0,009	0,0058	0,0007

Tab. vi: Validierungsdaten für die Erkennungs-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze und das Erfassungsvermögen für die Apfeleromastoffe in rückverdünntem Apfelsaftkonzentrat und für Ethylbutyrat in rückverdünntem Orangensaftkonzentrat

	Erkennungs-grenze	Erfassungs-grenze	Erfassungs-vermögen	Bestimmungs-grenze
	y_c	x_c [µg/L]	x_D [µg/L]	x_{BG} [µg/L]
Matrix: Apfelsaftkonzentrat				
Ethylisobutyrat	0,0010	0,09	0,14	0,26
Methyl-2-methylbutyrat	0,0007	0,07	0,11	0,21
Ethylbutyrat (in Apfelsaft)	0,0700	7,59	17,02	22,76
Butylacetat	0,0400	9,25	20,84	27,73
Hexanal	0,0100	5,44	12,53	11,38
Ethyl-2-methylbutyrat	0,0200	0,89	1,78	2,67
Ethylisovalerat	0,0002	0,04	0,07	0,11
3-Methylbutylacetat	0,0001	0,04	0,07	0,12
2-Methylbutylacetat	0,1800	2,15	4,48	6,27
trans-2-Hexen-1-al	0,00005	1,69	3,76	5,13
Amylacetat	0,0005	0,14	0,32	0,42
Methylhexanoat	0,0003	0,15	0,33	0,44
Ethylhexanoat	0,00008	0,07	0,16	0,25
Benzaldehyd	0,0100	0,48	1,43	1,45
Hexylacetat	0,0300	2,74	6,71	8,22
trans-2-Hexenylacetat	0,00004	0,09	0,23	0,26
Hexyl-2-methylbutyrat	0,00006	0,08	0,16	0,24
Damascenon	0,040	0,19	0,43	0,57
Matrix: Orangensaftkonzentrat				
Ethylbutyrat (in Orangensaft)	0,0100	7,46	13,53	22,3

Tab. vii: Wiederholpräzision (10 µg/L-Apfelaroma-Multistandard, 90 µg/L-Ethylbutyratstandard), Tag zu Tag-Präzision und Wiederfindung (20 mL Probenvolumen) der Analyten in rückverdünntem Apfelsaftkonzentrat und von Ethylbutyrat in rückverdünntem Orangensaftkonzentrat

	Wiederhol- präzision	Tag zu Tag Präzision	Wiederfindung
	S _{rel} [%]	S _{rel} [%]	[%]
Matrix: Apfelsaftkonzentrat			
Ethylisobutyrat	9,7	7,3	27,1
Methyl-2-methylbutyrat	8,5	7,5	27,1
Ethylbutyrat (in Apfelsaft)	5,5	8,4	30,8
Butylacetat	6,6	8,2	30,8
Hexanal	6,0	7,9	28,4
Ethyl-2-methylbutyrat	5,8	6,8	53,4
Ethylisovalerat	5,7	6,8	53,4
3-Methylbutylacetat	7,8	6,7	53,4
2-Methylbutylacetat	7,3	7,3	53,4
trans-2-Hexen-1-al	11,3	8,8	19,3
Amylacetat	6,8	7,6	58,0
Methylhexanoat	6,0	6,6	58,0
Ethylhexanoat	4,4	4,4	81,0
Benzaldehyd	9,6	4,2	24,4
Hexylacetat	4,5	5,0	81,0
trans-2-Hexenylacetat	6,7	4,3	72,0
Hexyl-2-methylbutyrat	8,4	7,5	99,1
Damascenon	4,2	6,5	99,0
Matrix:Orangensaftkonzentrat			
Ethylbutyrat (in Orangensaft)	2,9	8,2	30,8

Kalibrierfunktionen:

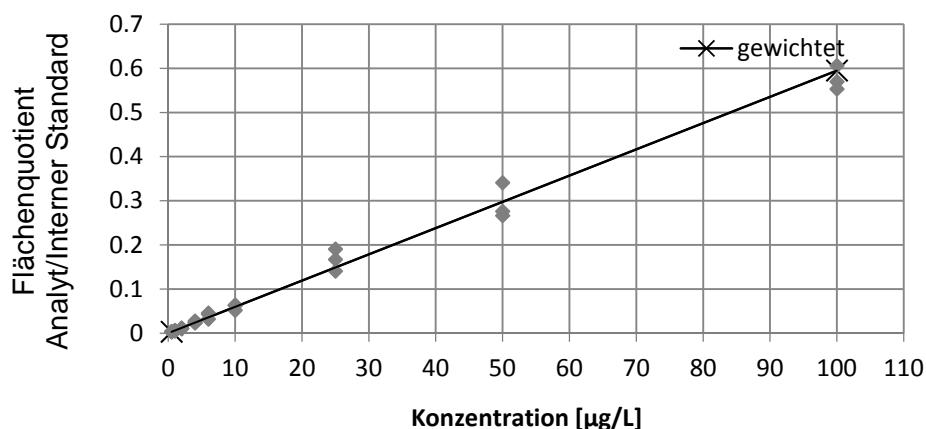


Abb. ii: Kalibrierfunktion nach gewichteter linearer Regression zur Bestimmung von Methyl-2-methylbutyrat in rückverdünntem Apfelsaftkonzentrat

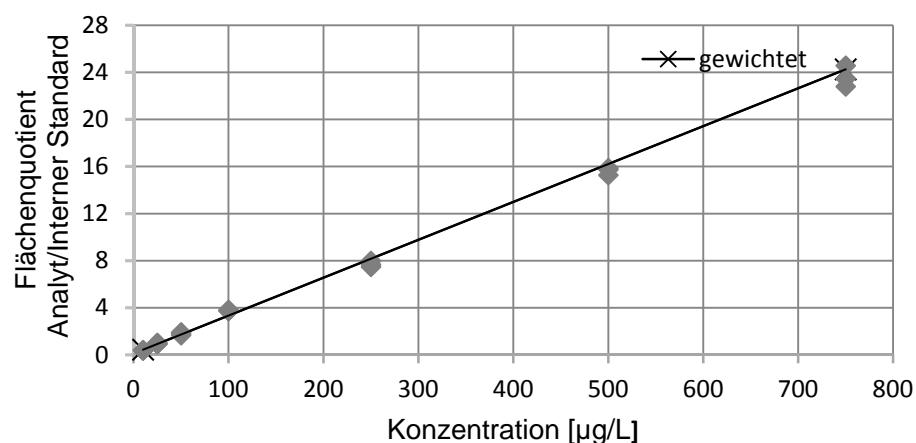


Abb. iii: Kalibrierfunktion nach gewichteter linearer Regression zur Bestimmung von 2-Methylbutylacetat in rückverdünntem Apfelsaftkonzentrat

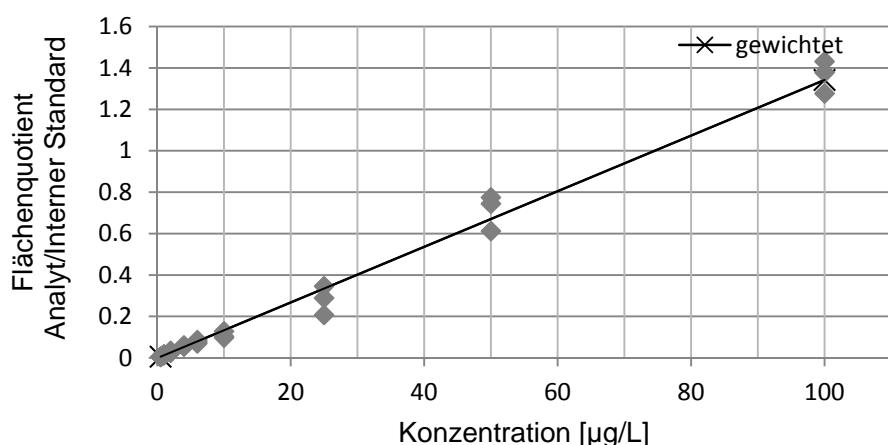


Abb. iv: Kalibrierfunktion nach gewichteter linearer Regression zur Bestimmung von Hexyl-2-methylbutyrat in rückverdünntem Apfelsaftkonzentrat

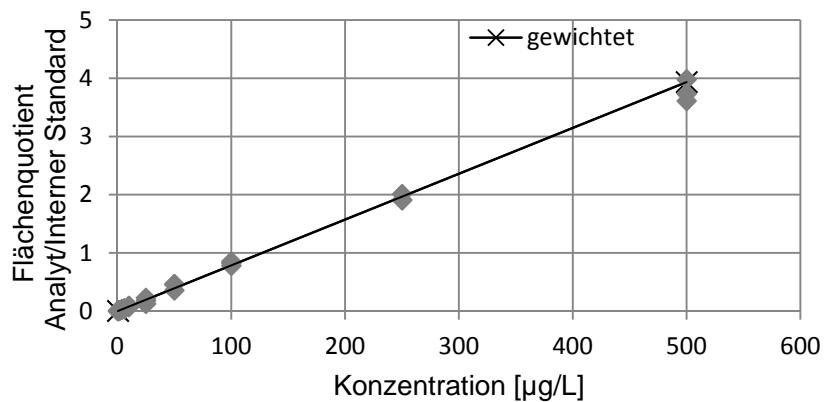


Abb. v: Kalibrierfunktion nach gewichteter linearer Regression zur Bestimmung von trans-2-hexenylacetat in rückverdünntem Apfelsaftkonzentrat

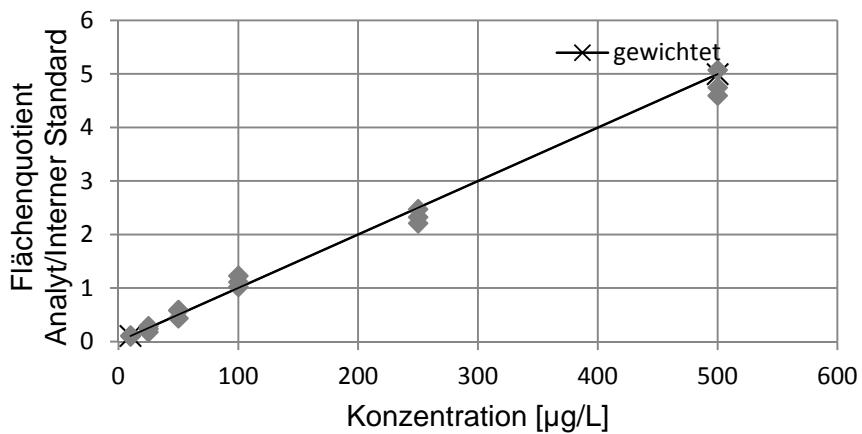


Abb. vi: Kalibrierfunktion nach gewichteter linearer Regression zur Bestimmung von Hexylacetat in rückverdünntem Apfelsaftkonzentrat

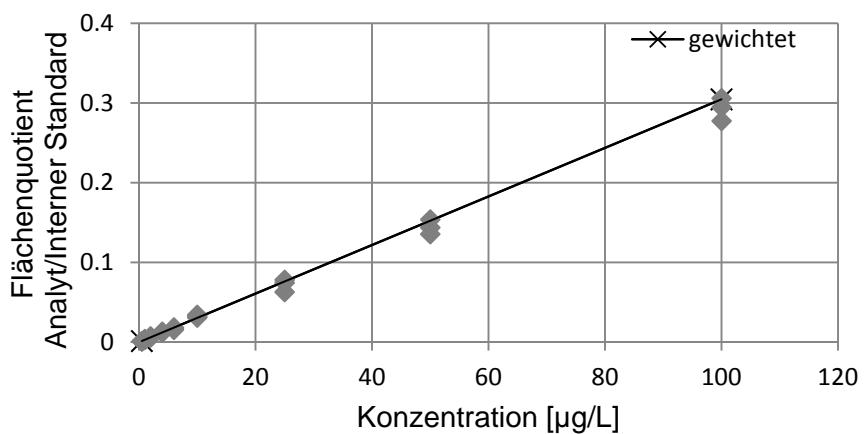


Abb. vii: Kalibrierfunktion nach gewichteter linearer Regression zur Bestimmung von Ethylhexanoat in rückverdünntem Apfelsaftkonzentrat

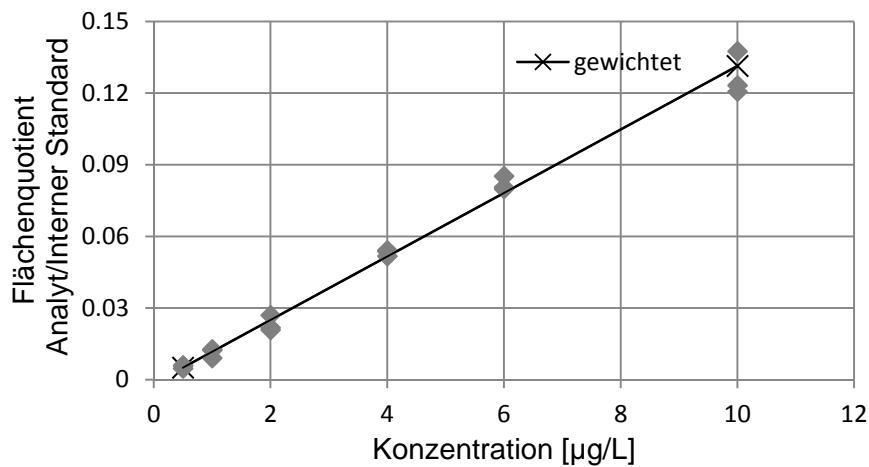


Abb. viii: Kalibrierfunktion nach gewichteter linearer Regression zur Bestimmung von Methylhexanoat in rückverdünntem Apfelsaftkonzentrat

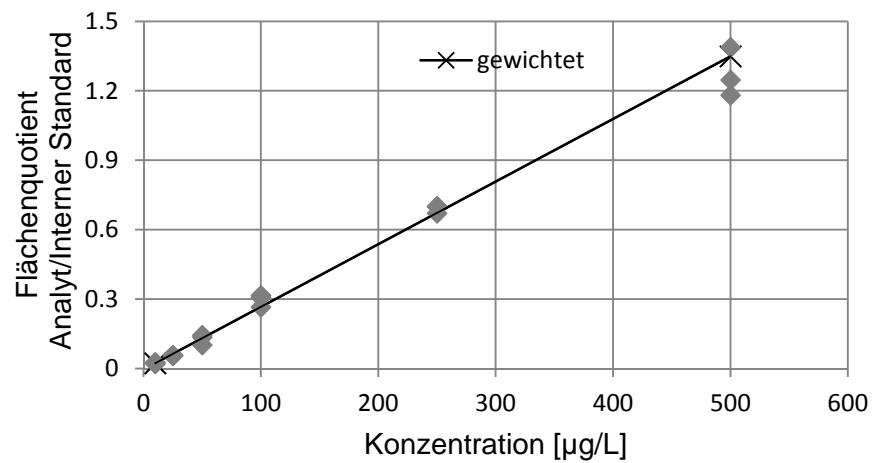


Abb. ix: Kalibrierfunktion nach gewichteter linearer Regression zur Bestimmung von trans-2-Hexenal in rückverdünntem Apfelsaftkonzentrat

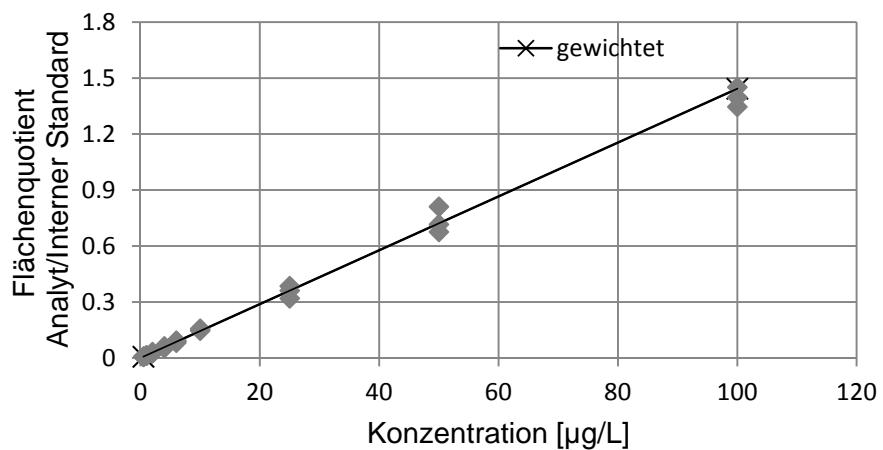


Abb. x: Kalibrierfunktion nach gewichteter linearer Regression zur Bestimmung von 3-Methylbutylacetat in rückverdünntem Apfelsaftkonzentrat

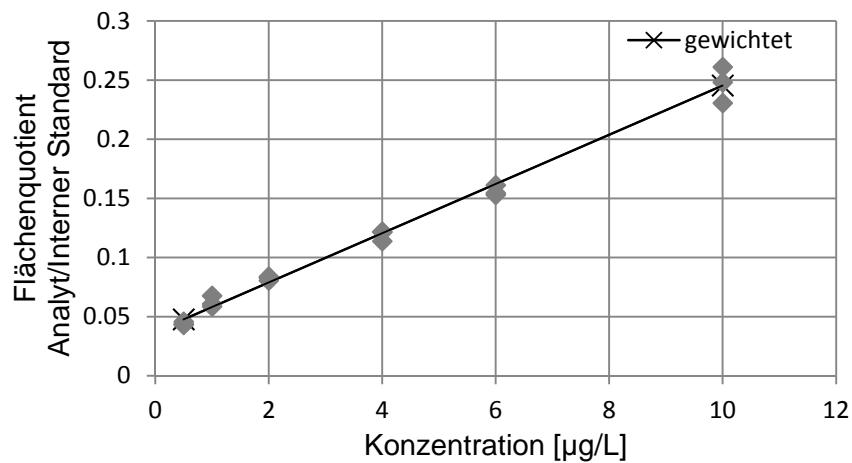


Abb. xi: Kalibrierfunktion nach gewichteter linearer Regression zur Bestimmung von Damascenon in rückverdünntem Apfelsaftkonzentrat

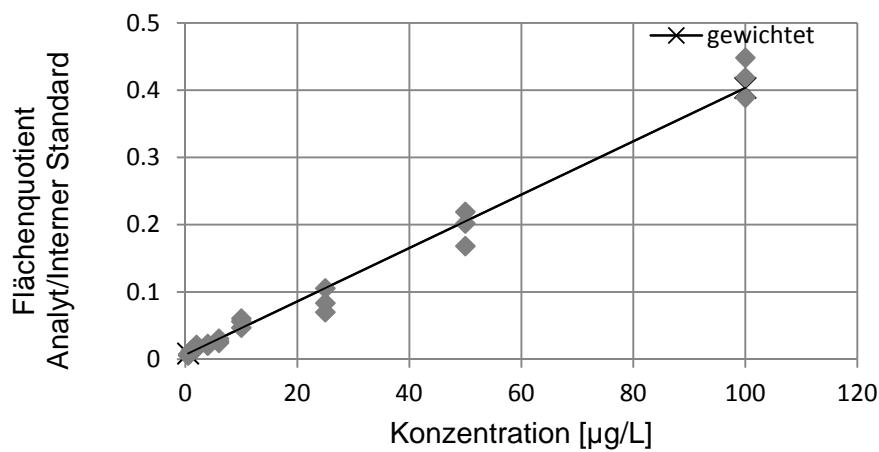


Abb. xii: Kalibrierfunktion nach gewichteter linearer Regression zur Bestimmung von Benzaldehyd in rückverdünntem Apfelsaftkonzentrat

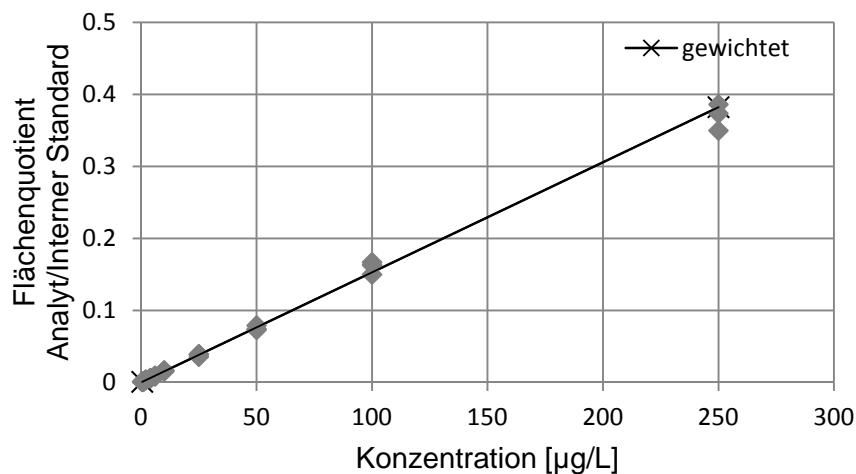


Abb. xiii: Kalibrierfunktion nach gewichteter linearer Regression zur Bestimmung von Amylacetat in rückverdünntem Apfelsaftkonzentrat

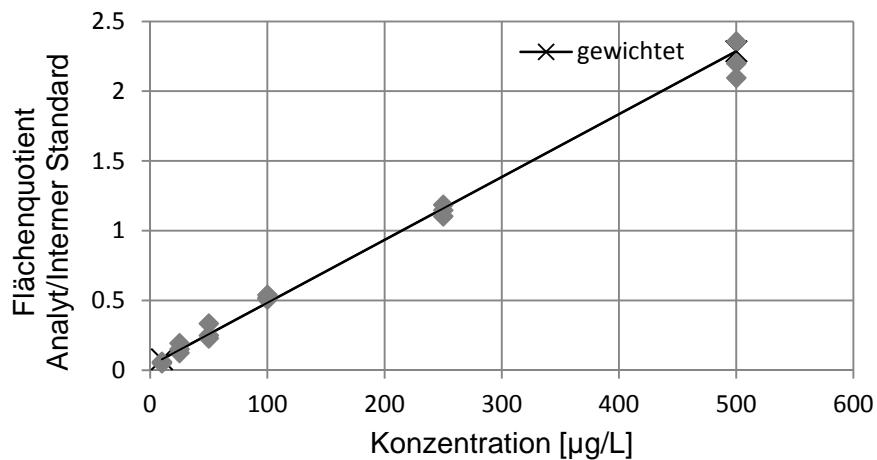


Abb. xiv: Kalibrierfunktion nach gewichteter linearer Regression zur Bestimmung von Ethylbutyrat in rückverdünntem Apfelsaftkonzentrat

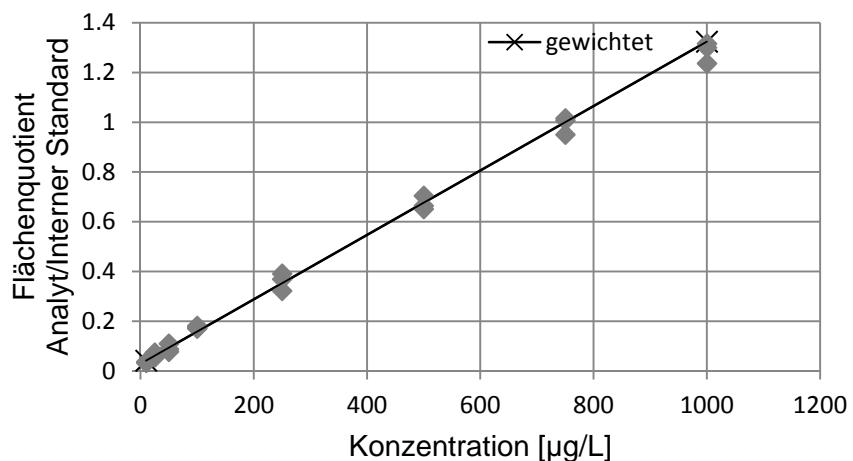


Abb. xv: Kalibrierfunktion nach gewichteter linearer Regression zur Bestimmung von Butylacetat in rückverdünntem Apfelsaftkonzentrat

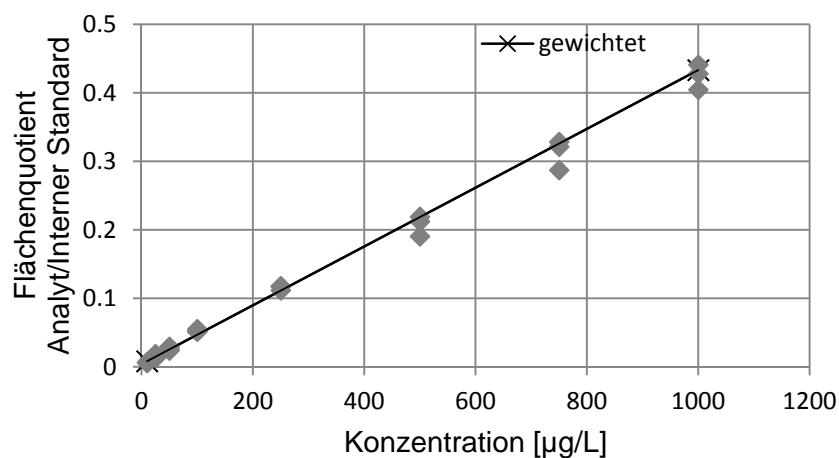


Abb. xvi: Kalibrierfunktion nach gewichteter linearer Regression zur Bestimmung von Hexanal in rückverdünntem Apfelsaftkonzentrat

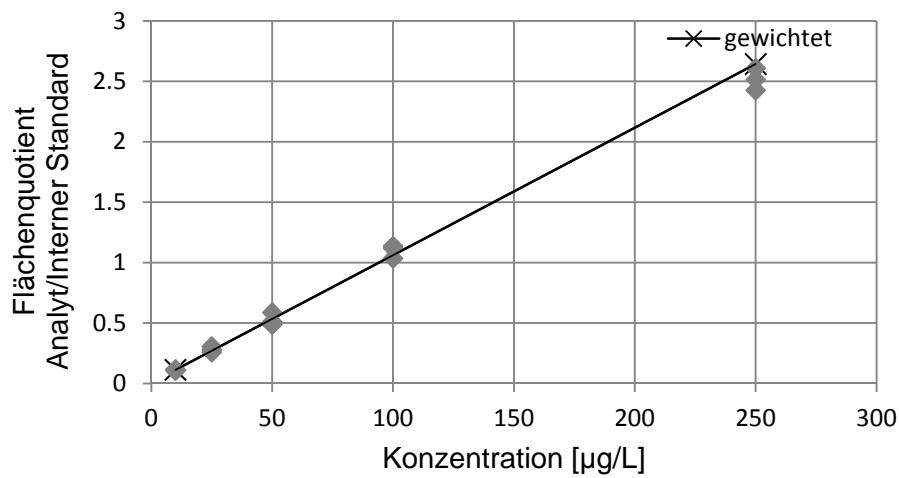


Abb. xvii: Kalibrierfunktion nach gewichteter linearer Regression zur Bestimmung von Ethyl-2-methylbutyrat in rückverdünntem Apfelsaftkonzentrat

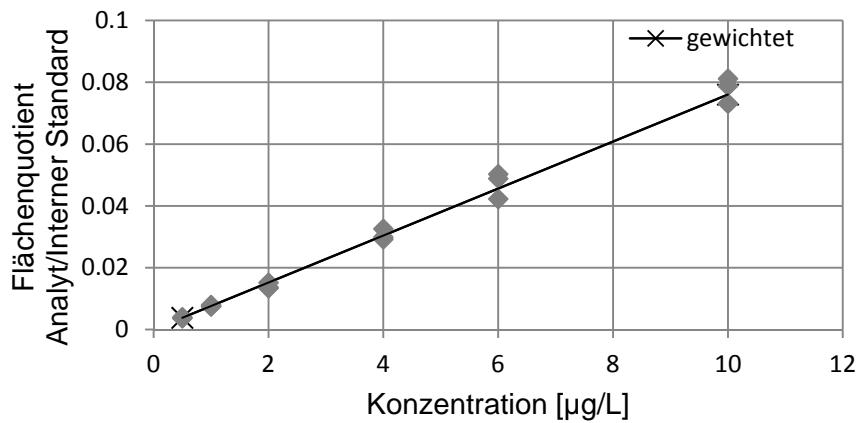


Abb. xviii: Kalibrierfunktion nach gewichteter linearer Regression zur Bestimmung von Ethylisovalerat in rückverdünntem Apfelsaftkonzentrat

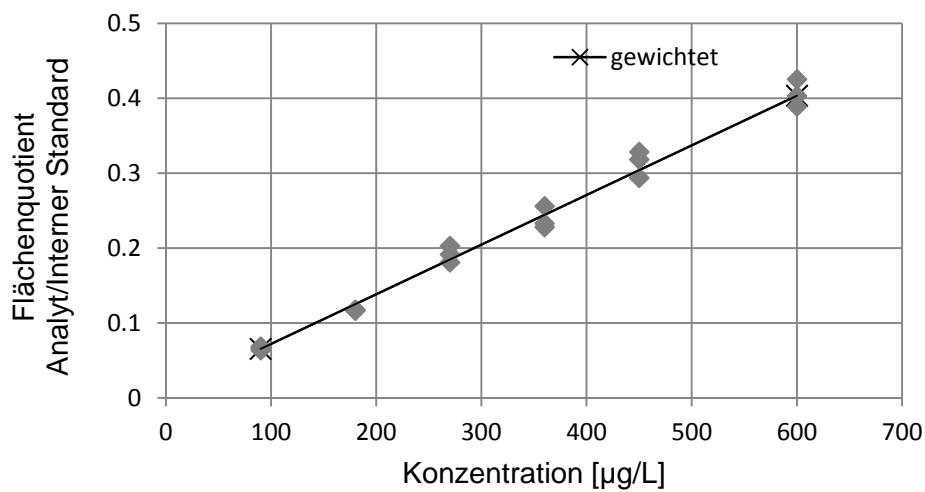
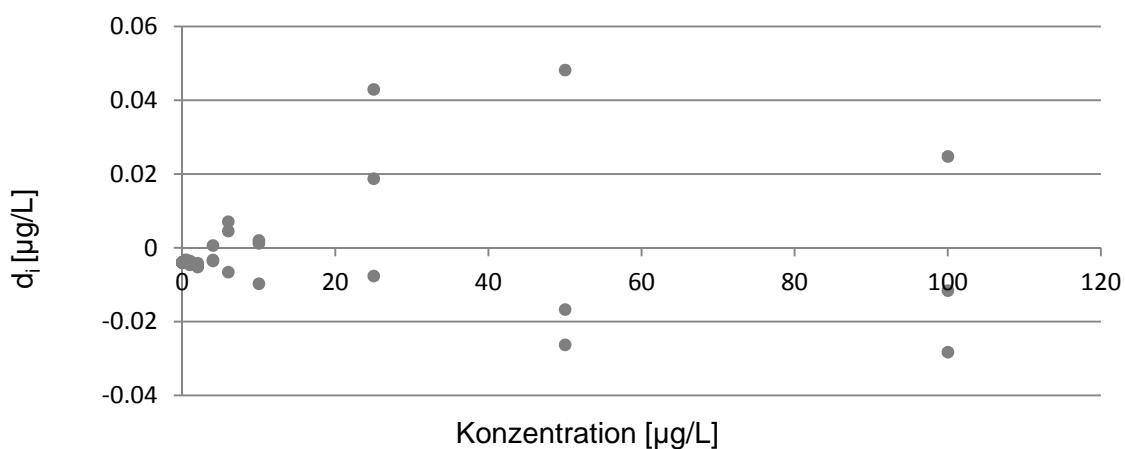
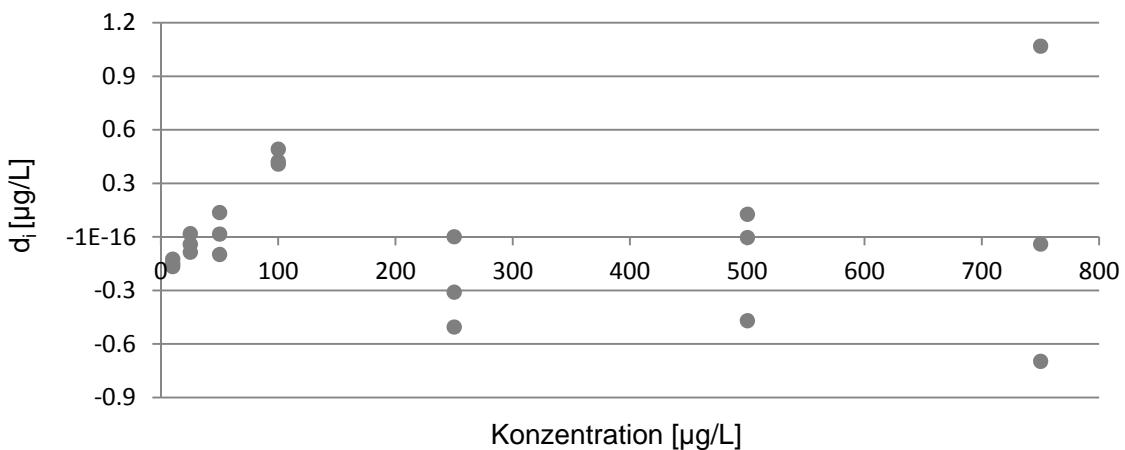
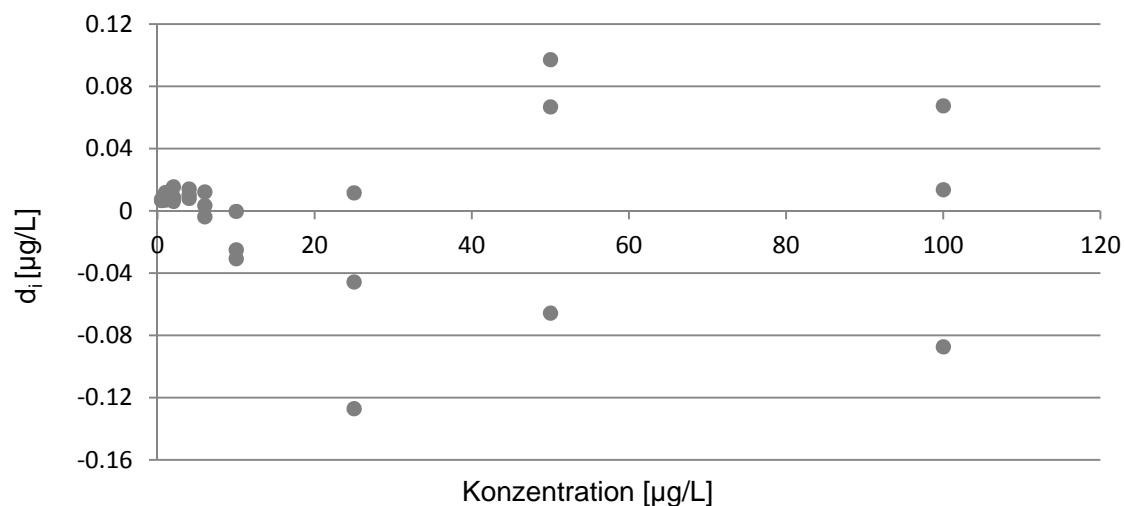


Abb. xix: Kalibrierfunktion nach gewichteter linearer Regression zur Bestimmung von Ethylbutyrat in rückverdünntem Orangensaftkonzentrat

Residualanalyse:**Abb. xx:** Residualanalyse: Methyl-2-methylbutyrat in rückverdünntem Apfelsaftkonzentrat**Abb. xxi:** Residualanalyse: 2-Methylbutylacetat in rückverdünntem Apfelsaftkonzentrat**Abb. xxii:** Residualanalyse: Hexyl-2-methylbutyrat in rückverdünntem Apfelsaftkonzentrat

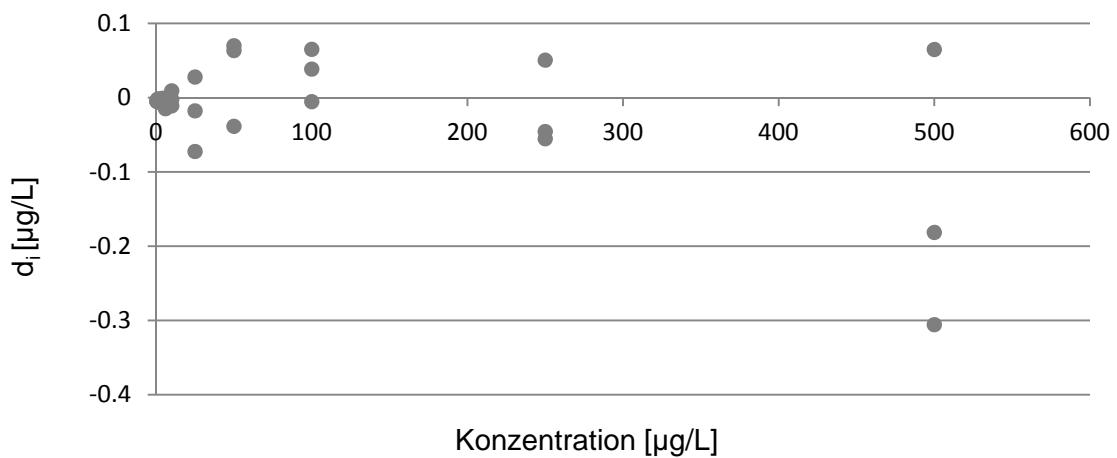


Abb. xxiii: Residualanalyse: trans-2-hexenylacetat in rückverdünntem Apfelsaftkonzentrat

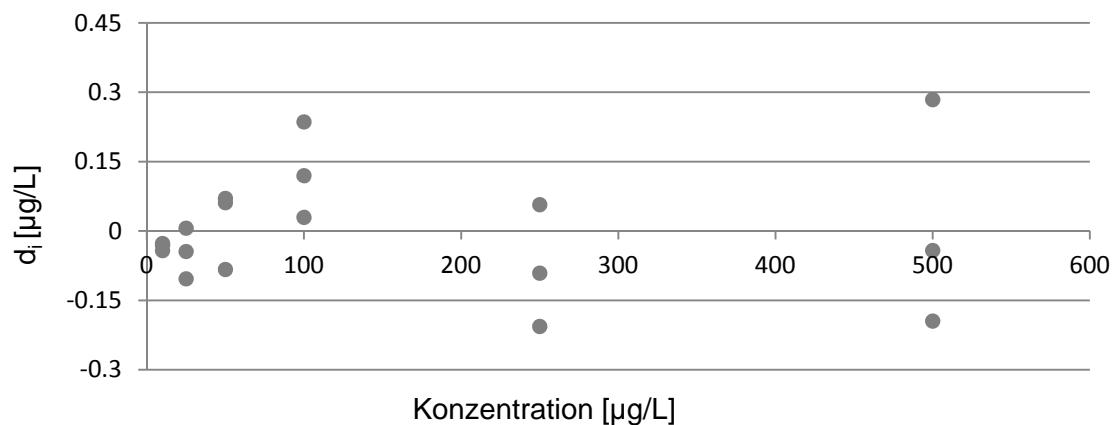


Abb. xxiv: Residualanalyse: Hexylacetat in rückverdünntem Apfelsaftkonzentrat

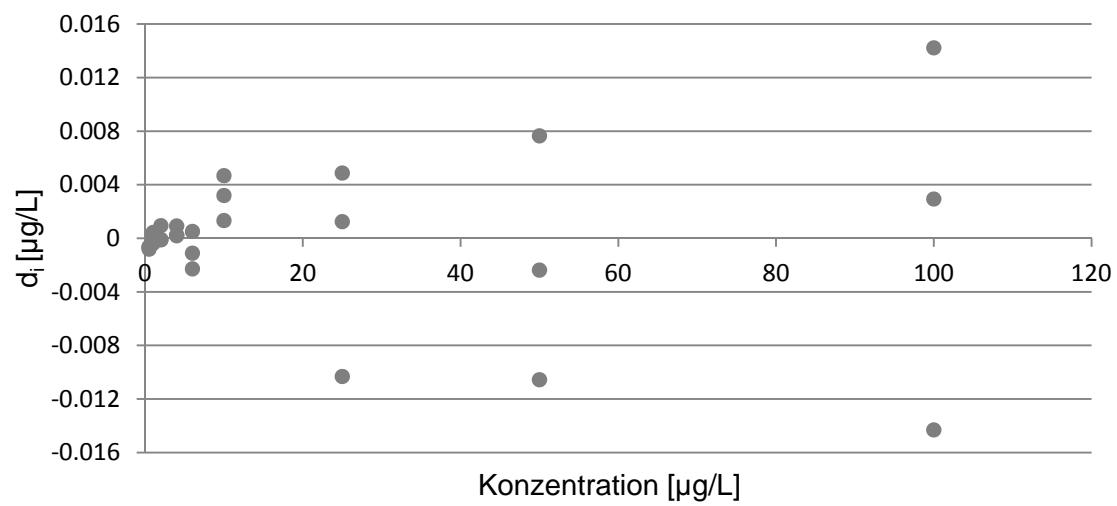


Abb. xxv: Residualanalyse: Ethylhexanoat in rückverdünntem Apfelsaftkonzentrat

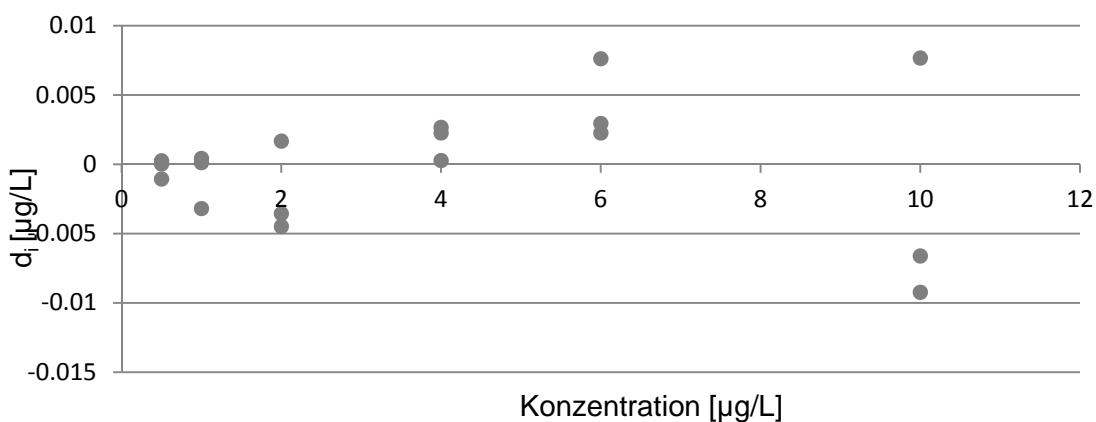


Abb. xxvi: Residualanalyse: Methylhexanoat in rückverdünntem Apfelsaftkonzentrat

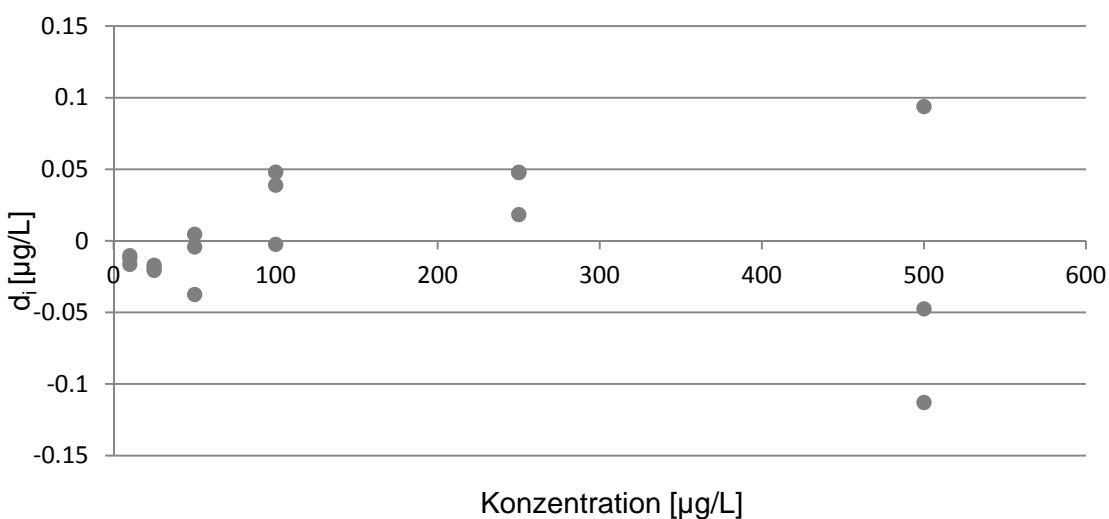


Abb. xxvii: Residualanalyse: trans-2-Hexenal in rückverdünntem Apfelsaftkonzentrat

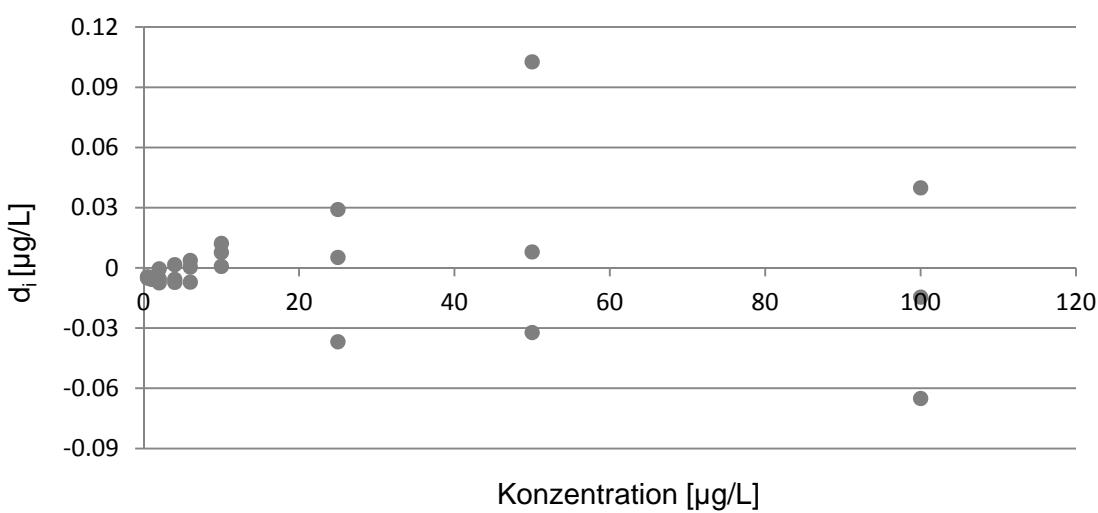


Abb. xxviii: Residualanalyse: 3-Methylbutylacetat in rückverdünntem Apfelsaftkonzentrat

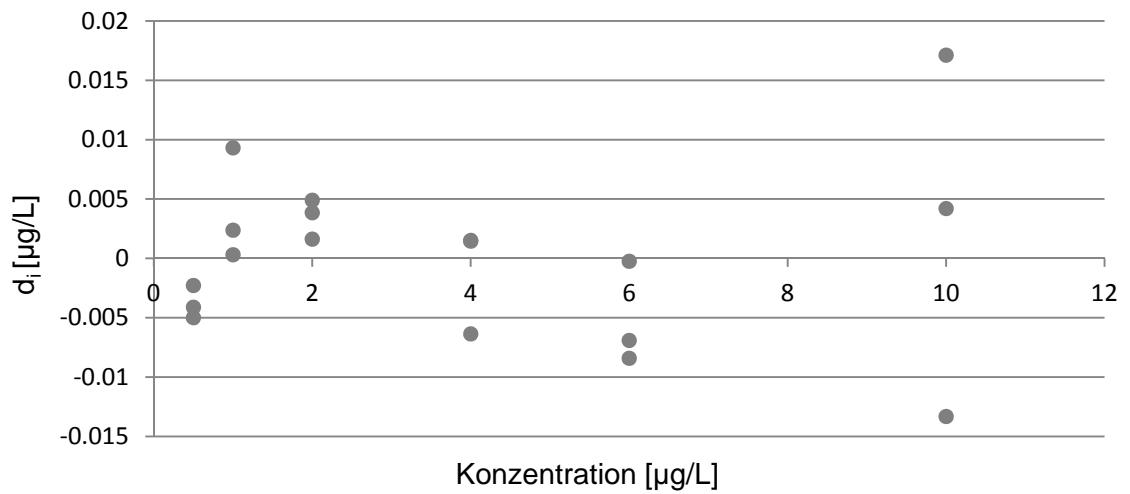


Abb. xxix: Residualanalyse: Damascenon in rückverdünntem Apfelsaftkonzentrat

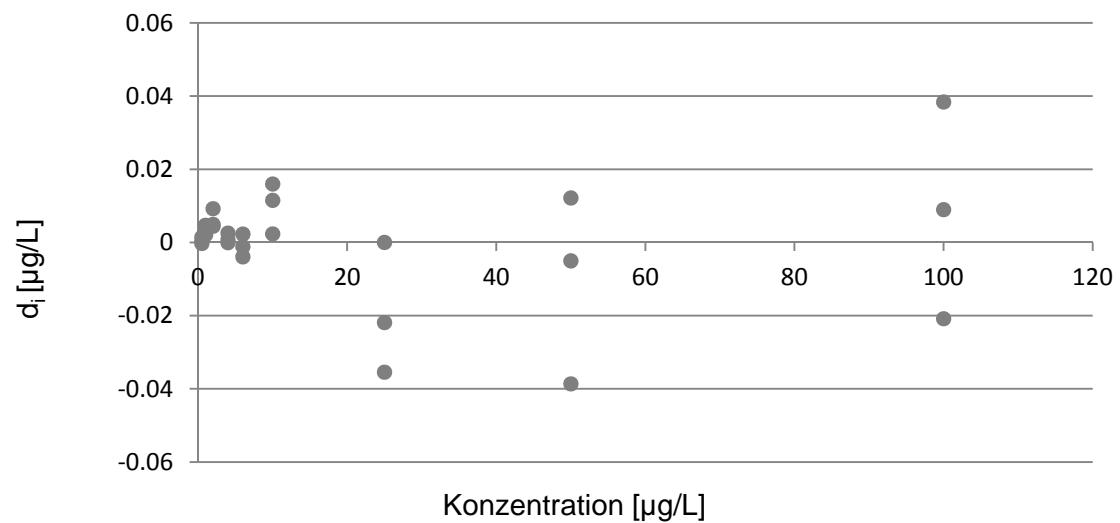


Abb. xxx: Residualanalyse: Benzaldehyd in rückverdünntem Apfelsaftkonzentrat

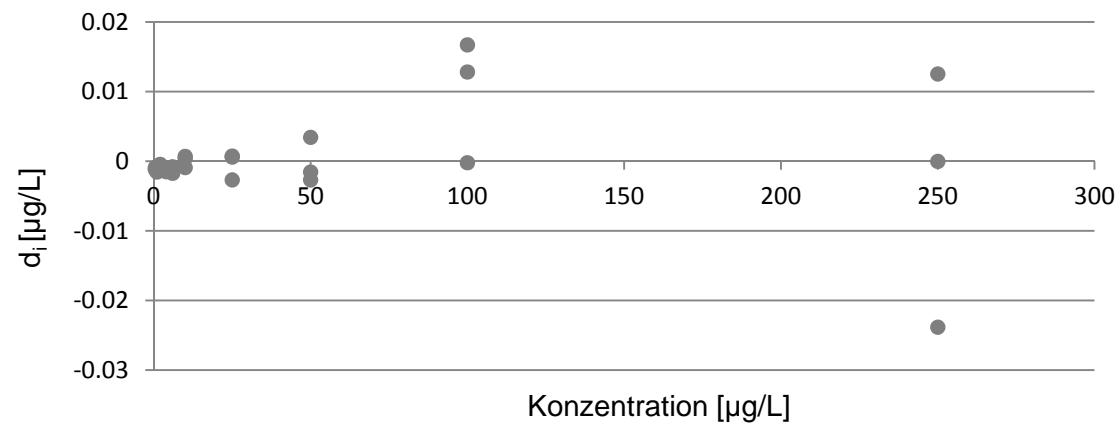


Abb. xxxi: Residualanalyse: Amylacetat in rückverdünntem Apfelsaftkonzentrat

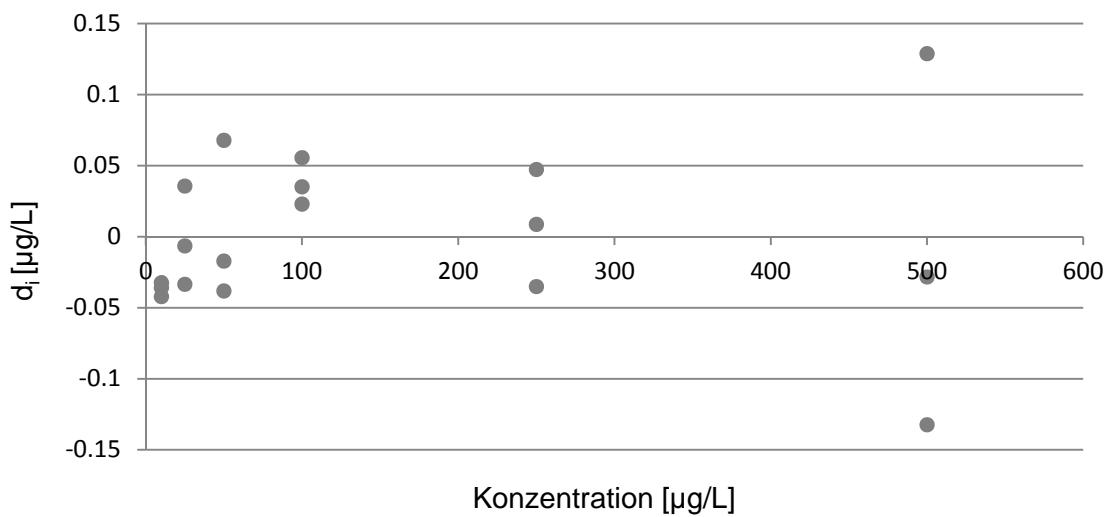


Abb. xxxii: Residualanalyse: Ethylbutyrat in rückverdünntem Apfelsaftkonzentrat

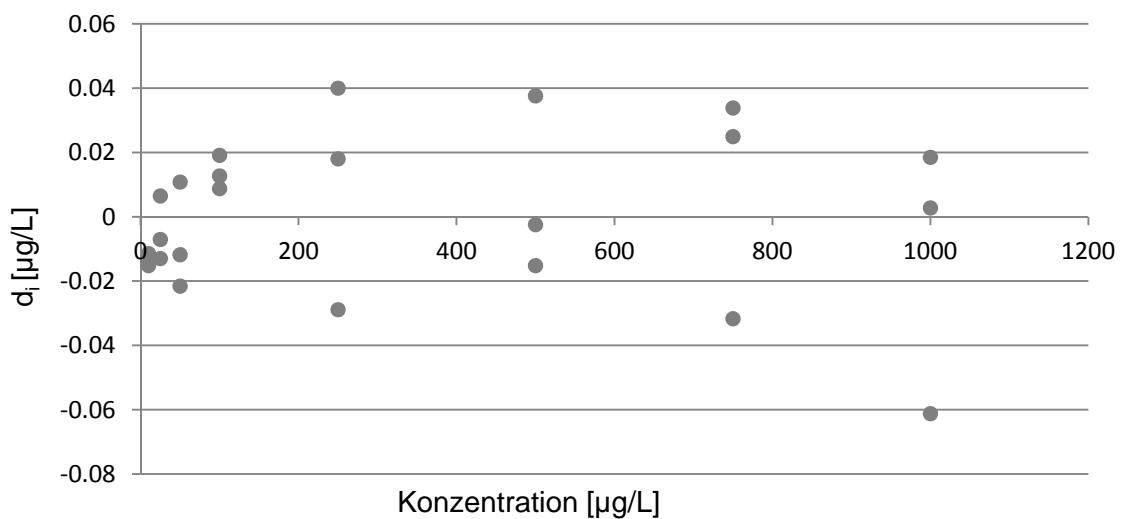


Abb. xxxiii: Residualanalyse: Butylacetat in rückverdünntem Apfelsaftkonzentrat

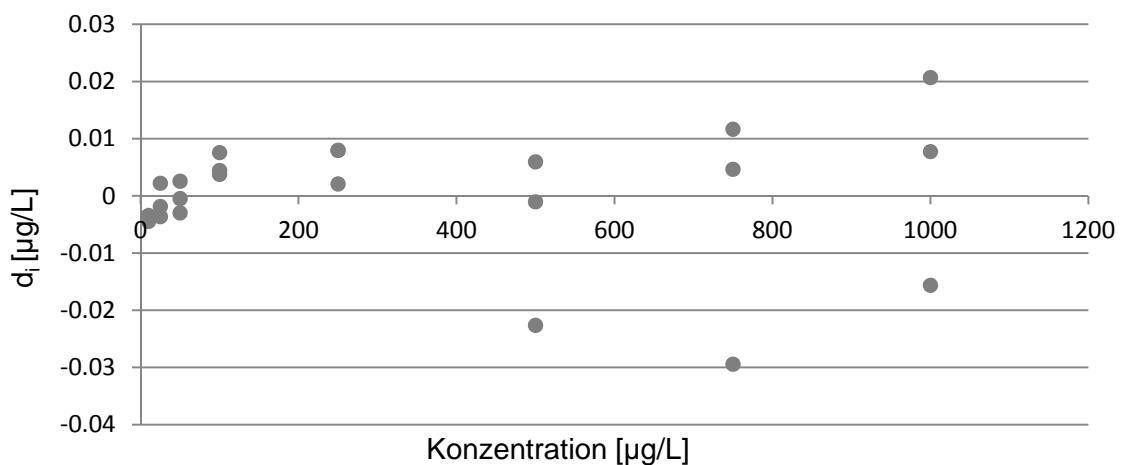


Abb. xxxiv: Residualanalyse: Hexanal in rückverdünntem Apfelsaftkonzentrat

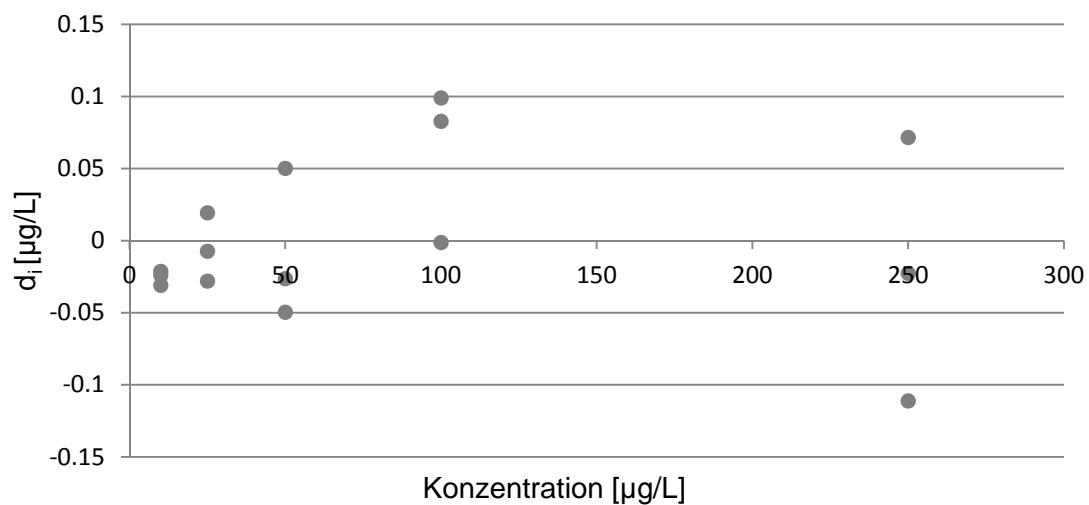


Abb. xxxv: Residualanalyse: Ethyl-2-methylbutyrat in rückverdünntem Apfelsaftkonzentrat

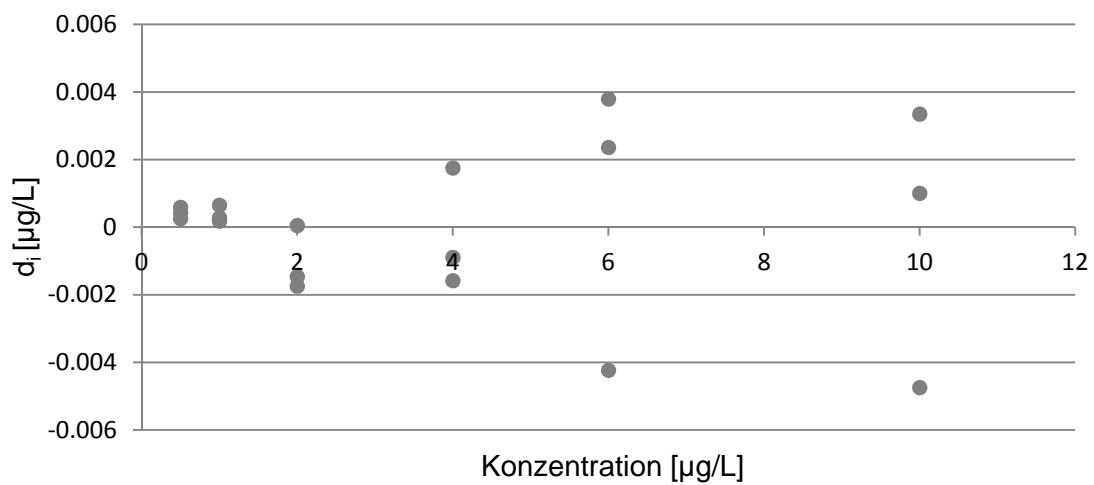


Abb. xxxvi: Residualanalyse: Ethylisovalerat in rückverdünntem Apfelsaftkonzentrat

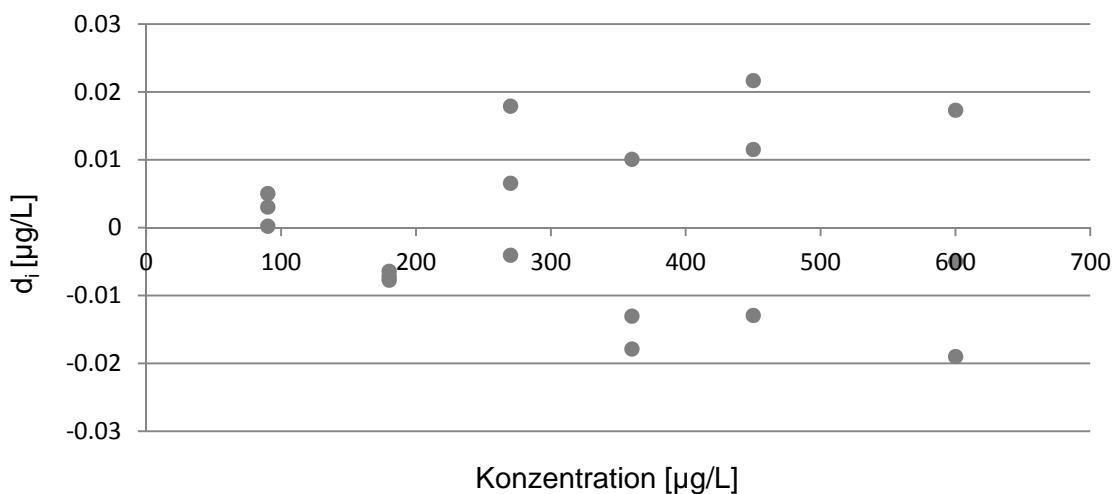


Abb. xxxvii: Residualanalyse: Ethylbutyrat in rückverdünntem Orangensaftkonzentrat

Signalintensitäten:

Signalintensitäten eines 100 µg/L-Multistandards in Wasser und rückverdünntem Apfelsaftkonzentrat und eines 100 µg/L-Ethylbutyrat-Standards in rückverdünntem Orangensaftkonzentrat

	Quant-Ion	Qual-Ion 1	Qual-Ion 2	Qual-Ion 3
Isobutylisobutyrat	71	56	57	89
Ionen-Intensität in Wasser [%]	100	42	33	26
Ionen-Intensität in Matrix [%]	100	42	33	26
Ethylisobutyrat	71	43	116	88
Ionen-Intensität in Wasser [%]	100	205	40	19
Ionen-Intensität in Matrix [%]	100	172	23	22
Methyl-2-methylbutyrat	57	88	41	101
Ionen-Intensität in Wasser [%]	100	110	54	25
Ionen-Intensität in Matrix [%]	100	108	55	25
Ethylbutyrat (Apfelsaft)	71	43	88	101
Ionen-Intensität in Wasser [%]	100	81	54	8
Ionen-Intensität in Matrix [%]	100	83	54	8
Ethylbutyrat (Orangensaft)	71	43	88	101
Ionen-Intensität in Wasser [%]	100	95	55	8
Ionen-Intensität in Matrix [%]	100	96	58	9
Butylacetat	71	73	55	-
Ionen-Intensität in Wasser [%]	100	114	35	-
Ionen-Intensität in Matrix [%]	100	113	39	-
Hexanal	82	72	57	-
Ionen-Intensität in Wasser [%]	100	154	436	-
Ionen-Intensität in Matrix [%]	100	154	437	-
Ethyl-2-methylbutyrat	57	102	85	115

Ionen-Intensität in Wasser [%]	100	64	38	8
Ionen-Intensität in Matrix [%]	100	64	38	8
Ethylisovalerat	88	85	57	130
Ionen-Intensität in Wasser [%]	100	72	63	1
Ionen-Intensität in Matrix [%]	100	72	63	1
3-Methylbutylacetat	43	70	55	87
Ionen-Intensität in Wasser [%]	100	49	42	12
Ionen-Intensität in Matrix [%]	100	48	41	11
2-Methylbutylacetat	43	70	55	73
Ionen-Intensität in Wasser [%]	100	39	16	18
Ionen-Intensität in Matrix [%]	100	38	16	17
trans-2-Hexen-1-al	55	98	69	83
Ionen-Intensität in Wasser [%]	100	13	80	79
Ionen-Intensität in Matrix [%]	100	22	84	81
Amylacetat	43	70	55	61
Ionen-Intensität in Wasser [%]	100	38	22	25
Ionen-Intensität in Matrix [%]	100	37	21	25
Methylhexanoat	74	87	43	99
Ionen-Intensität in Wasser [%]	100	32	49	19
Ionen-Intensität in Matrix [%]	100	32	48	18
Ethylhexanoat	88	99	101	144
Ionen-Intensität in Wasser [%]	100	50	27	2
Ionen-Intensität in Matrix [%]	100	50	27	2
Benzaldehyd	106	105	77	-
Ionen-Intensität in Wasser [%]	100	97	98	-
Ionen-Intensität in Matrix [%]	100	99	97	-

Hexylacetat	43	56	84	61
Ionen-Intensität in Wasser [%]	100	45	17	29
Ionen-Intensität in Matrix [%]	100	44	17	30
trans-2-Hexenylacetat	43	67	82	100
Ionen-Intensität in Wasser [%]	100	46	39	11
Ionen-Intensität in Matrix [%]	100	45	38	10
Hexyl-2-methylbutyrat	57	41	103	85
Ionen-Intensität in Wasser [%]	100	53	116	55
Ionen-Intensität in Matrix [%]	100	54	113	60
Damascenon	69	121	190	-
Ionen-Intensität in Wasser [%]	100	52	12	-
Ionen-Intensität in Matrix [%]	100	51	12	-

Retentionszeiten:**Tab viii:** Retentionszeiten eines 100 µg/L-Multistandards in Wasser und rückverdünntem Apfelsaftkonzentrat und eines 100 µg/L-Ethylbutyratstandards in Wasser und rückverdünntem Orangensaftkonzentrat

	t_R in Wasser [min]	t_R in Apfelsaftmatrix/ Orangensaftmatrix [min]	Abweichung [%]
Isobutylisobutyrat	34,13	34,12	0,03
Ethylisobutyrat	9,86	9,84	0,2
Methyl-2-methylbutyrat	11,24	11,23	0,09
Ethylbutyrat (Apfelsaft)	13,90	13,89	0,07
Ethylbutyrat (Orangensaft)	13,91	13,98	0,5
Butylacetat	16,17	16,15	0,12
Hexanal	16,34	16,32	0,12
Ethyl-2-methylbutyrat	19,84	19,84	0,0
Ethylisovalerat	20,84	20,83	0,05
3-Methylbutylacetat	26,83	26,82	0,04
2-Methylbutylacetat	27,43	27,42	0,04
trans-2-Hexen-1-al	31,44	31,32	0,4
Amylacetat	36,86	36,85	0,03
Methylhexanoat	37,67	37,66	0,03
Ethylhexanoat	41,85	41,85	0,0
Benzaldehyd	42,57	42,59	0,0
Hexylacetat	42,52	42,52	0,0
trans-2-Hexenylacetat	42,77	42,77	0,0
Hexyl-2-methylbutyrat	46,83	46,84	0,02
Damascenon	49,03	49,03	0,0

H. Arbeitsanweisung SDE zur Bestimmung von Aromastoffen in Apfelsaft

Geräte:

2 Laborboys, 2 Magnetrührer, Kontaktthermometer, Heizpilz, Kochtopf, Mikro-SDE-Anlage mit Kryostatenkühlung, drei 5mL Pipetten, Probenrundkolben, Lösemittelrundkolben, Spitzkolben, Vigreuxkolonne

Chemikalien:

Pentan, Diethylether, dest. Wasser, Natriumsulfat wasserfrei

Durchführung:

Der Kryostat muss frühzeitig eingeschaltet und auf die minimal mögliche Kühltemperatur gestellt werden. Nach ca. 60 min ist eine Temperatur von -8 °C erreicht. Tieferen Temperaturen können nicht erreicht werden. Nach dem Einschalten der lösemittelseitigen Heizplatte muss die Soll-Temperatur am Kontaktthermometer auf 44 °C eingestellt werden.

Der Apfelsaft (100 mL) wird in den Kolben pipettiert. Ein Rührfisch und der interne Standard werden hinzugegeben. Während der Montage sollte der Kryostat ausgeschaltet sein, da bei einem Bruch des Kühlfingers Ethylenglykol auslaufen würde. Nach dem Anschließen des Probenkolbens und der Befüllung des Separationsteils mit ca. 5 mL dest. Wasser werden in den Lösemittelkolben die Pentan/Diethylether-Mischung und ein Rührfisch gegeben und amontiert. Nun kann der Kühlfinger montiert und der Kryostat wieder eingeschaltet werden. Alle Schliffverbindungen müssen auf Dichtigkeit überprüft werden. Das mit einem Rührfisch versehene Wasserbad heizt den Lösemittelkolben und der Heizpilz den Probenkolben. Zu Beginn der Destillation sind folgende Einstellungen zu beachten:

Tab ix: Geräteeinstellungen für die SDE

Saftseite	Lösemittelseite	Kryostat
Mot (Motor): 2	Mot am Lösemittelkolben: 2	Drehknopf nach links auf minimale Einstellung
Heizpilz: Stufe 3	Temp am Magnetrührer: 6	
Temp am Magnetrührer: 0	Soll-Temp Kontaktthermometer:	
Energieregler: Stufe 10 nach 10 min auf 8	44 °C	

Nach dem Anheizen (ca. 10 min) muss der Energieregler auf Stufe 8 zurückgestellt werden, um ein „Überkochen“ zu verhindern. Der Destillationsbogen wird auf der Saftseite mit Alufolie zur Isolation umwickelt und die Destillation bis zum gleichmäßigen Sieden beobachtet.

Zum Ende der Destillation werden der Heizpilz und das Wasserbad entfernt. Nach dem Abkühlen der Etherseite wird die Saftseite entfernt und die Apparatur zur Etherseite gedreht, um die Etherphase im Abscheider in den Kolben zu dekantieren. Anschließend wird die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet. Zum Einengen auf 1 mL wird der Inhalt in einen Spitzkolben mit einer Marke bei 1 mL über einen Trichter dekantiert und an die Vigreuxkolonne angeschlossen. Das Wasserbad wird auf 50°C eingestellt. Wenn das Extrakt abkühlt, läuft wieder etwas Flüssigkeit aus der Kolonne zurück, daher ist bis kurz unter die 1 mL-Marke einzuhängen. Das Extrakt wird anschließend in ein GC-Headspace-Vial überführt.