

Aus den Arbeitsgruppen

Grundlagenpapier der AG Aromastoffe und der AG Stabilisotopenanalytik

Grundlagenpapier der Lebensmittelchemischen Gesellschaft zum Thema Vanillearomen Herkunft, Analytik und Charakterisierung der Vanillebestandteile

Stand: März 2022

1 Einleitung

Vanillearomen zählen zu den weltweit am häufigsten eingesetzten Aromen. Sie werden für die Aromatisierung zahlreicher Lebensmittel wie Eiscreme, Milchprodukte, Süßspeisen, Konfekt, Backwaren und Spirituosen, aber auch in Parfums und Körperpflegeprodukten verwendet.

Unter Aroma bzw. Aromen (Flavourings) werden lebensmittelrechtlich Erzeugnisse verstanden, die aus aromatisierenden Zutaten bestehen und zu technologischen Zwecken zugelassene Lebensmittelzusatzstoffe und/oder andere Lebensmittelzutaten enthalten können. Sie werden eingesetzt, um Lebensmitteln einen besonderen Geruch und/oder Geschmack zu verleihen oder diese zu verändern. Davon abzugrenzen ist im deutschen Sprachgebrauch die Verwendung des Begriffs Aroma als Summe der mit dem Geruchssinn wahrnehmbaren sensorischen Eigenschaften eines Lebensmittels.[1] Um zwischen diesen Begriffen klar zu unterscheiden, wird die sensorische Eigenschaft in diesem Grundlagenpapier als „Aromaeindruck“ bezeichnet.

Das vorliegende Grundlagenpapier der AGs Aromastoffe und Stabilisotopenanalytik der Lebensmittelchemischen Gesellschaft ist eine überarbeitete und aktualisierte Version der ersten Fassung von 2010.[2] Eine Neufassung wurde erforderlich, da entscheidende, neue Daten zu Vanille publiziert wurden.

Im Papier wird zunächst auf den Anbau, die Verarbeitung und die Inhaltsstoffe der Vanilleschote eingegangen. Danach werden die Verfahren zur Herstellung von Vanilleextrakten, die der Basisbestandteil vieler Vanillearomen sind, vorgestellt. Ebenso werden die am Markt verfügbaren Vanillinqualitäten beschrieben. Neu aufgenommen wurde ein Kapitel zur Zusammensetzung von Vanillearomen, in dem insbesondere auf die Rechtsgrundlagen und die Kennzeichnung von Vanillearomen in der Europäischen Union eingegangen wird. Der Hauptteil des Papiers beschäftigt sich dann mit den aktuellen Verfahren zur Beurteilung der Authentizität von Aromen mit Vanillebestandteilen.

Explizit nicht Teil des Grundlagenpapiers sind die Regelungen zur Kennzeichnung und Aufmachung von aromatisierten Lebensmitteln. Hierfür wird auf produktspezifische Regelungen des Deutschen Lebensmittelbuchs [3,4] und auf Publikationen mit zum Teil unterschiedlichen, bisweilen kontroversen Expertenauffassungen verwiesen [5, 6, 7, 8, 9].

2 Anbau und Produktion der Vanille

Hauptanbaugebiete der jährlich blühenden, ursprünglich in Mittelamerika und Mexiko beheimateten tropischen Lianengewächse der Gattung *Vanilla* aus der Familie Orchidaceae sind Madagaskar, die Komoren, La Réunion, Uganda, Mexiko, Indien, Indonesien, Tahiti, Papua-Neuguinea, Guadeloupe und Martinique. Nach wie vor erfolgt der Anbau ausschließlich durch Kleinbauern. 80 % der gehandelten Vanille stammen aus Madagaskar. Die neu gesetzten Pflanzen blühen nach drei bis vier Jahren zum ersten Mal. Nach Handbestäubung der Blüten benötigen die Früchte sechs bis acht Monate zum Reifen und werden dann von Mai bis August grün geerntet. Die Kapsel Früchte der Vanillepflanzen, die landläufig als „Vanilleschoten“ bezeichnet werden, dienen als Ausgangsmaterial für Vanilleextrakte und damit hergestellte Vanillearomen. Obwohl die Bezeichnung „Vanilleschote“ botanisch nicht korrekt ist, wird sie auch im Folgenden verwendet, weil sie in der Alltagssprache wesentlich geläufiger ist.

Die nötigen Verarbeitungsschritte bis zum Erhalt der handelsüblichen fermentierten Schote sind aufwändig und können variieren. Sie werden im Folgenden daher nur beispielhaft dargestellt. Üblicherweise werden die grün geernteten Schoten zunächst mit heißem Wasser behandelt (Killing). Danach werden sie in dicht verschlossenen Behältern mehrere Tage lang intensiv durch freigesetzte, pflanzeigene Enzyme fermentiert (Sweating). Der darauf folgende Trocknungsprozess (Drying) dauert ca. sechs bis acht Wochen und erfolgt durch regelmäßiges Umschichten an der Luft. Dabei erhalten die Schoten durch Polyphenoloxidation die typische schwarze Farbe und aus dem enthaltenen Vanillinglucosid wird durch das Enzym β -Glucosidase Vanillin (4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd), die mengenmäßig dominierende aromatische Substanz der Vanille, freigesetzt. Daneben entstehen *p*-Hydroxybenzaldehyd und später durch Oxidationsreaktion auch die korrespondierenden Säuren sowie weitere phenolische Substanzen. Während einer mehrmonatigen Lagerung in Kisten (Conditioning) bildet sich durch weitere Oxidations- und Folgereaktionen das vanille-typische Gesamtaroma

aus. Der gesamte Prozess von der grünen Schote bis zur gereiften Handelsware wird im Fachjargon als „Curing“ bezeichnet.

Der natürliche Vanillingehalt bei getrockneten und fermentierten Vanilleschoten beträgt, je nach Erntejahr und -zeitpunkt sowie ggf. beeinträchtigt durch außergewöhnliche Witterungseinflüsse, 1,6 bis 2,4 %.[10] Von 2009 bis 2020 lag der Vanillingehalt in *Vanilla planifolia*-Schoten bei 0,9 bis 2,2 %.[11] Ein Grund für diese niedrigeren Werte war, dass die Sava, die Hauptanbauregion im Norden Madagaskars, zeitweise von heftigen Stürmen heimgesucht wurde.[12] Durch die daraus resultierenden schwierigen politischen und ökonomischen Bedingungen wurden die Vanilleschoten beschädigter Flächen zu früh geerntet und hatten daher auch nicht die maximalen Gehalte an Vanillin-glucosid und anderen Aromabestandteilen gebildet.

Von den etwa 100 bekannten Vanilla-Arten werden nur drei kultiviert.[13, 14, 15]

Die größte wirtschaftliche Bedeutung besitzt mit etwa 2000 t getrockneter Schoten pro Jahr die Art *Vanilla planifolia* Andrews (syn. *Vanilla fragrans* (Salisbury) Ames), die „Gewürzvanille“. Je nach Herkunft wird sie auch unter Bezeichnungen wie Bourbon-, Madagaskar- oder Mexiko-Vanille gehandelt.

Vanilla tahitensis J. W. Moore, die „Tahiti-Vanille“, zeichnet sich durch eine in Richtung Anis gehende Note aus, zu der insbesondere Substanzen wie Anisaldehyd, Anisalkohol und Anissäure beitragen.[13, 14]

Vanilla pompona Schiede, die „Guadeloupe“- oder „Antillen“-Vanille, findet hauptsächlich für pharmazeutische Produkte und Parfüms Verwendung.

3 Gewinnung und Herstellung von Vanilleextrakten und von Vanillin

3.1 Gewinnung von Vanilleextrakten

Vanilleextrakte werden üblicherweise durch Extraktion von Vanilleschoten mit Ethanol und Wasser gewonnen. Es dürfen aber auch andere Extraktionslösungsmittel oder flüssige Lebensmittel zur Extraktion verwendet werden. Vanilleauszüge sind Extrakte, bei denen keine wesentlichen Konzentrierungsschritte stattfinden und bei denen das Extraktionsmittel vollkommen im Produkt verbleibt.

Zur Herstellung von Vanilleextrakten und anderen Aromaextrakten sind in der EU verschiedene Extraktionslösungsmittel zugelassen. Die Richtlinie 2009/32/EG, die in Deutschland in der Extraktionslösungsmittelverordnung (ElmV) umgesetzt ist, regelt die Verwendung von Extraktionslösungsmitteln, die nach der Extraktion aus dem Enderzeugnis wieder entfernt werden. Allgemein verwendbare Extraktionslösungsmittel werden in Anlage 1 der ElmV gelistet, für die Herstellung von Aromaextrakten zugelassene Stoffe sind in der Anlage 3 aufgeführt.

Die Wahl des Extraktionslösungsmittels hat einen wesentlichen Einfluss auf die Zusammensetzung der Aromaextrakte. Die mittels überkritischem CO₂ gewonnenen Erzeugnisse unterscheiden sich deutlich in ihrer Zusammensetzung von den alkoholischen Vanilleextrakten. Dies betrifft sowohl die absoluten Gehalte an Vanillin, Vanillinsäure, *p*-Hydroxybenzaldehyd und *p*-Hydroxybenzoesäure als auch deren Konzentrationsverhältnisse [16, 17]. Die CO₂-Extrakte der Vanille werden in der Regel zu höheren Preisen gehandelt als alkoholisch-wässrige Extrakte. Sie weisen mehr süßliche Noten als die Ethanol-extrakte auf, sind zudem kaum gefärbt und werden deshalb bevorzugt in Parfüms eingesetzt. Darüber hinaus wird das Verfahren genutzt, um vanillinangereicherte Extrakte sowie Isolate des natürlichen Aromastoffs Vanillin für die Lebensmittelherstellung zu gewinnen.[18, 19]

In den USA gibt es einen sogenannten „Standard of Identity“ für Vanilleextrakte. Im Code of Federal Regulations (CFR) der US FDA wird unter Titel 21 im Abschnitt 169.175 ein Vanilleextrakt als eine wässrig-ethanolische (mind. 35 Vol%) Lösung der geruchs- und geschmacksgebenden Bestandteile der Vanille (*V. planifolia*) definiert. Während in diesem Standard gefordert wird, dass ein Vanilleextrakt eine „Extraktstärke“ von mindestens 100 g Vanilleschoten in 1 L Extrakt hat („1-fold Vanilla extract“) und ein konzentrierter Vanilleextrakt entsprechend mindestens 200 g in 1 L Extrakt („2-fold concentrated Vanilla extract“), gibt es in der EU keine rechtsverbindlichen Regelungen zur „Extraktstärke“ bzw. Konzentration von Vanilleextrakten.



Wichtiges Export des französischen Überseedepartementes La Réunion: Vanille (Bild: Dr. Jörg Häselser)

3.2 Gewinnung und Herstellung von Vanillin

Unter Berücksichtigung der Ausgangsmaterialien und wesentlichen Herstellungsverfahren unterscheidet man drei Vanillinqualitäten die im Folgenden näher erläutert werden:

- **Vanillin aus der Schote [20]:** Ausgangsmaterial zur Isolierung des Vanillins sind fermentierte Vanilleschoten. Diese werden meist mit vergleichsweise polaren, organischen Lösungsmitteln wie Ethanol oder Aceton, ggf. im Gemisch mit Wasser, extrahiert. Die Zusammensetzung des Extraktes ist abhängig von Lösungsmitteltyp und -menge. Vanillin unterschiedlicher Reinheiten erhält man durch fraktionierte Kristallisation.
- **Fermentativ gewonnenes Vanillin [21]:** Das derzeit wirtschaftlich bedeutsamste biotechnologische Verfahren zur Gewinnung von natürlichem Vanillin nutzt Ferulasäure aus pflanzlichen Quellen wie Reis oder Mais als Substrat. Aus Eugenol, das aus Nelkenöl isoliert wurde, kann ebenfalls natürliches Vanillin auf biotechnologischem Weg erhalten werden [22]. Weiterhin ist eine fermentative Umsetzung von Curcumin möglich. Durch eine de novo Biosynthese unter Verwendung von Glucose als Kohlenstoffquelle gewonnenes Vanillin wurde erstmals 2014 auf den Markt gebracht.
- **Chemosynthetisch gewonnenes Vanillin:** Der überwiegende Anteil an chemosynthetischem Vanillin wird durch Addition von Glyoxylsäure an Guajacol und anschließende Oxidation und Decarboxylierung gewonnen.[23, 24] Nur noch ein kleiner Anteil wird durch Oxidation von Ligninsulfonsäure erhalten, die im Zuge der Sulfitaugerei bei der Cellulosegewinnung anfällt. Ein neues elektrochemisches Verfahren arbeitet mit Kraft-Lignin als Rohstoff und einem Katalysator,

um Vanillin zu produzieren. Ein anderes Verfahren, das auch nur noch untergeordnete Bedeutung besitzt, geht von Eugenol aus Nelkenöl aus, das durch Isomerisierung und oxidative Spaltung in Vanillin umgewandelt werden kann.

Der weltweite Bedarf an Vanillin liegt bei etwa 15.000 Tonnen pro Jahr. Die hohe Nachfrage nach Vanillin für Aromen kann nicht durch die Isolierung aus der Schote gedeckt werden. Rund 90 % des weltweit verwendeten Vanillins ist chemosynthetisch gewonnen. Vanillin aus der Schote ist aufgrund des aufwändigen Herstellungsprozesses und der niedrigen Gehalte in der Vanilleschote nur in kleinen Mengen verfügbar und 500- bis 1000-mal teurer als chemosynthetisch gewonnenes Vanillin. Es wird deshalb wenig verwendet. Als Alternative wird biotechnologisch, durch Fermentation gewonnenes Vanillin am Markt als natürliche Qualität angeboten und ist in wesentlich größeren Mengen verfügbar. Es ist etwa 20- bis 50-mal teurer als chemosynthetisch hergestelltes Vanillin. Folglich wird neben Vanille und Vanilleextrakten chemosynthetisches und biotechnologisches Vanillin zur Aromatisierung von Lebensmitteln eingesetzt. Dies führt dazu, dass das Problem möglicher Verfälschungen und irreführender Angaben zur Herkunft und Natürlichkeit hier besonders groß ist.

4 Zusammensetzung von Vanillearomen

Für Lebensmittel bestimmte Aromen müssen den Vorgaben der EG-AromenV [25] entsprechen und nach den Vorschriften dieser Verordnung gekennzeichnet sein. Nach Erwägungsgrund 26 der EG-AromenV soll-

Tab. 1: Kennzeichnung von Aromen mit Aromaeindruck Vanille nach EG-AromenV

Kennzeichnung des Aromas	Vorgaben zur Zusammensetzung	Sensorische Eigenschaften	Bezug zur EG-AromenV
Vanille-Extrakt	100 % aus Vanilleschoten	Aromaeindruck Vanille	Art. 15 (1) a) und Art. 3 (2) d)
natürliches Vanille-Aroma	Der Aromabestandteil besteht zu mindestens 95 Gew.-% aus Vanillebestandteilen, Zusatz von höchstens 5 Gew.-% natürliche Aromen (natürliche Aromastoffe und /oder Aromaextrakte) aus anderen Quellen	Der Vanillebestandteil ist sensorisch erkennbar, die restlichen 5 % aus anderen Quellen als Vanille dürfen nur standardisieren oder nuancieren; Aromaeindruck Vanille	Art. 15 (1) a) und Art. 16 (4)
natürliches Vanille-Aroma mit anderen natürlichen Aromen	Der Aromabestandteil besteht zu weniger als 95 Gew.-% aus Vanillebestandteilen, daneben natürliche Aromen (natürliche Aromastoffe und / oder Aromaextrakte) aus anderen Quellen	Der Vanillebestandteil muss sensorisch leicht erkennbar sein; Aromaeindruck Vanille	Art. 15 (1) a) und Art. 16 (5)
natürliches Aroma	Der Aromabestandteil besteht ausschließlich aus natürlichen Aromastoffen und/oder Aromaextrakten	Die Quelle keines Aromabestandteils spiegelt sich im Aroma sensorisch wider; Aromaeindruck Vanille	Art. 15 (1) a) und Art. 16 (6)
Aroma	Mischung aus allen definierten Aromakategorien (natürlich und nicht natürlich)	Aromaeindruck Vanille	Art. 15 (1) a) und Art. 3 (2) a)

ten spezielle Informationspflichten sicherstellen, dass die Verbraucher nicht über die bei der Herstellung natürlicher Aromen verwendeten Ausgangsstoffe getäuscht werden. Insbesondere wenn der Begriff „natürlich“ zur Bezeichnung eines Aromas verwendet wird, müssen die aromatisierenden Bestandteile des Aromas vollständig natürlichen Ursprungs sein. Zudem sollten die Ausgangsstoffe der Aromen angegeben werden, es sei denn, die genannten Ausgangsstoffe sind im Aroma oder Geschmack des Lebensmittels nicht erkennbar.

Der Artikel 16 der EG-AromenV definiert die besonderen Anforderungen an die Verwendung des Begriffs „natürlich“.

Die Tabelle 1 beschreibt anhand verschiedener Aromen mit dem Aromaeindruck Vanille die jeweils geltenden rechtlichen Vorgaben gemäß EG-AromenV und gibt einen Einblick in die Vielfalt dieser Erzeugnisse.

Bei der Bezeichnung **Vanille-Extrakt** müssen die Aromabestandteile zu 100 % aus Vanilleschoten stammen. Der Hinweis „Bourbon“ ist als geografische Herkunftsbezeichnung zu betrachten. Das Ausgangsmaterial muss bei einem entsprechenden Hinweis von den „Vanille-Inseln“ (Madagaskar, Komoren, Réunion, Seychellen, Mauritius, Nosy Be, Rodrigues und Mayotte) stammen und ist nur bei ausschließlicher Verwendung von *V. planifolia* zulässig.[8, 15]

Die Bezeichnung **natürliches Vanille-Aroma** setzt voraus, dass der Aromabestandteil ausschließlich oder fast ausschließlich (mind. 95 Gew.-%) aus der Vanille gewonnen wird. Bis zu 5 Gew.-% vanillefremde Aromaextrakte und/oder natürliche Aromastoffe dürfen in diesem Aroma enthalten sein (sogenannte „95/5-Regel“). Nach dem Erwägungsgrund 26 der EG-AromenV darf der 5 % Anteil „nur für die Standardisierung verwendet werden oder zur Verleihung zum Beispiel einer frischeren, schärferen, reiferen oder grüneren Aromanote“.

Die 95/5-Regel wird unterschiedlich ausgelegt. Das Urteil des OLG Düsseldorf vom 21.03.2012 (Az. I-15 U 173/1) und die ALS Stellungnahme Nr. 2012/29 [26] stehen im Widerspruch zur Interpretation der EU-Kommission (SANCO E, 2013, Brussels, 165520).

Werden weniger als 95 Gew.-% des aus dem genannten Ausgangsstoff gewonnenen Aromabestandteils verwendet und ist das Aroma des Ausgangsstoffs immer noch leicht erkennbar, so muss der Ausgangsstoff (hier Vanille) mit dem Hinweis auf den Zusatz von anderen natürlichen Aromen kenntlich gemacht werden (**Natürliches Vanille-Aroma mit anderen natürlichen Aromen**).

Natürliches Aroma muss zu 100 % natürliche Aromabestandteile enthalten. Vanillin aus biotechnologischer Herstellung kann beispielsweise als natürliches Aroma mit Aromaeindruck Vanille bzw. als Zutat in solchen Aromen verwendet werden.

Bei Bezeichnungen wie **Aroma mit Vanilleschmack oder Aroma Typ Vanille** darf auch Vanillin verwendet werden, welches durch chemische Synthese hergestellt wurde.

5 Instrumentelle Analyseverfahren für bestimmte Inhaltsstoffe und Beurteilungskriterien für die Authentizitätsprüfung von Vanillearomen

Zur Authentizitätsanalytik von Aromen mit Vanillebestandteilen und von mit Vanille aromatisierten Lebensmitteln können im Rahmen der Qualitätskontrolle in der Aromen- und Lebensmittelindustrie, in Handelslaboren und in der amtlichen Überwachung folgende Analyseverfahren in der Routine eingesetzt werden:

- Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (HPLC)
- Kapillargaschromatografie (GC)
- Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (IRMS)
- ¹⁴C-Aktivitätsmessung (Radiocarbonmessung)
- Kernresonanzspektroskopie (²H-NMR, ¹³C-NMR)

Eine wichtige Voraussetzung aller genannten Methoden ist ein validiertes Verfahren zur Isolierung des Vanillins und anderer charakteristischer Inhaltsstoffe aus dem Aroma oder dem aromatisierten Lebensmittel. Dabei sind auch Parameter wie Wiederfindung, Wiederholbarkeit, Messunsicherheit, Nachweis- und Bestimmungsgrenze zu beachten.

Die erweiterte Messunsicherheit von Analysenwerten (Messunsicherheit mit einem Vertrauensniveau von 95 % und dem Erweiterungsfaktor 2) ist in Spezifikationen, Befunden oder Gutachten anzugeben.[27] Bei der Beurteilung ist zu berücksichtigen, dass der „wahre Wert“ mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % innerhalb des Bereichs der erweiterten Messunsicherheit liegt.

In Zweifelsfällen ist eine sachgerechte Beurteilung eines Vanillearomas oder eines mit Vanillearomen hergestellten Lebensmittels jedoch nur nach Offenlegung der Rohstoffquellen sowie der Herstellungsbedingungen und Rezepturen für Aromen und aromatisierte Lebensmittel möglich. Auf das Positionspapier „Authentizität von Aromastoffen“ der Arbeitsgruppe Aromastoffe in der Lebensmittelchemischen Gesellschaft im Hinblick auf die Beweislast des Herstellers wird verwiesen.[28]

5.1 Chromatografische Verfahren zur Analyse von Vanillin und Begleitstoffen

Für eine Authentizitätsbewertung sind neben Vanillin zahlreiche weitere Inhaltsstoffe der Vanilleschote in Betracht zu ziehen. Bisher konnten mehr als 400 Verbindungen in der Vanilleschote identifiziert werden, darunter Carbonylverbindungen, Phenole, Alkohole, Säuren, Ester, Lactone, Kohlenwasserstoffe, Terpenoide und Heterozyklen.

HPLC-Analyse von Vanillin und Begleitstoffen

Die Konzentrationen von Vanillin und den Hauptbegleitstoffen, *p*-Hydroxybenzaldehyd, Vanillin-säure und *p*-Hydroxybenzoesäure (sogenannte „Vanillebegleitstoffe“), stehen in der Vanilleschote und den daraus hergestellten Vanilleextrakten in charakteristischen Verhältnissen zueinander und können somit in Form der sogenannten Verhältniszahlen zur Authentizitätsprüfung daraus hergestellter Aromen bzw. damit aromatisierter Lebensmittel herangezogen werden. Für komplexe Aromen (insbesondere andere als natürliche Vanillearomen) sind die Verhältniszahlen jedoch in der Regel nicht anwendbar, da die entsprechenden Aromastoffe auch als solche zugesetzt sein können.

Für die quantitative Bestimmung von Vanilleinhaltsstoffen kommen in der Regel HPLC-Methoden zum Einsatz [29, 30], da eine gaschromatografische Analyse für die Bestimmung der Säuren nur bedingt geeignet ist.

Zur Probenvorbereitung wird üblicherweise mit Methanol oder Ethanol verdünnt bzw. extrahiert [30]. Aus komplexen Lebensmitteln können Dickungsmittel mit Ethanol gefällt werden, oft ist hier auch eine Klärung nach Carrez [31, 32] und/oder eine Entfettung mit einem unpolaren Lösungsmittel erforderlich. Die Chromatografie erfolgt an RP-Phasen, die Detektion mittels UV oder MS [30]. Für die Analytik von Vanillin und seinen Begleitstoffen ist es entscheidend, geeignete Extraktionssysteme, vornehmlich alkoholisch-wässrige, einzusetzen. Andere Extraktionslösungsmittel wie Acetonitril, TBME, Diethylether und Ethylacetat resultieren in verminderten Ausbeuten.[33]

Die Tabelle 2 zeigt in einer Übersicht die Schwankungsbreiten der Verhältniszahlen von Vanillin und seinen Begleitstoffen in alkoholisch-wässrigen Extrakten aus *Vanilla planifolia*-Schoten, wie sie in verschiedenen wissenschaftlichen Studien ermittelt worden sind. Die angegebenen Schwankungsbereiche spiegeln, wie bei Naturprodukten üblich, die Anbau- und Bearbeitungsbedingungen (Klima, Boden, Erntezeitpunkt) wider,[29] siehe hierzu auch Abschnitt 2.



Vanille vor der Sortierung nach Größe auf La Réunion (Bild: Dr. Jörg Häselner)

Tab. 2: Schwankungsbreiten der Verhältniszahlen von Vanillin und seinen Begleitstoffen in alkoholisch-wässrigen Extrakten aus *Vanilla planifolia*-Schoten [29, 31, 32, 34]

Verhältniszahl (Konzentrationsverhältnis)	Schwankungsbreite
Vanillin/ <i>p</i> -Hydroxybenzaldehyd	9–28
Vanillin/ <i>p</i> -Hydroxybenzoesäure	14–152
Vanillin/Vanillinsäure	4–29
<i>p</i> -Hydroxybenzoesäure/ <i>p</i> -Hydroxybenzaldehyd	0,14–1,40
Vanillinsäure/ <i>p</i> -Hydroxybenzaldehyd	0,61–3,48

Bei der Beurteilung der Verhältniszahlen in Lebensmitteln ist zu beachten, dass Vanillin und die in der Vanilleschote vorhandenen Begleitstoffe *p*-Hydroxybenzaldehyd, Vanillinsäure und *p*-Hydroxybenzoesäure auch in anderen Zutaten enthalten sein können. Diese Stoffe werden in der Natur im weitverbreiteten Phenylpropanoid-Stoffwechsel gebildet. [35] Somit können die Verhältniszahlen in Lebensmitteln aufgrund anderer Zutaten je nach natürlich vorhandener Menge dieser Stoffe bis außerhalb der Schwankungsbreite verschoben sein. Dies ist im jeweiligen Einzelfall zu berücksichtigen.

Daneben sind etwaige Abbaureaktionen bei der Lebensmittelverarbeitung bzw. Wechselwirkungen mit bestimmten Lebensmittelinhaltsstoffen zu beachten. Oxidationen durch Mikroorganismen oder milcheigene Enzyme treten besonders bei mit frischer oder pasteurisierter Milch hergestellten Lebensmitteln und bei Produktionsbedingungen mit hoher thermischer Belastung auf.[36] Da bei der Lebensmittelherstellung eine Oxidation von Vanillin zu Vanillinsäure und von *p*-Hydroxybenzaldehyd zu *p*-Hydroxybenzoesäure möglich ist [37, 38], wurde eine modifizierte Verhältniszahl (VZ (A+S)) eingeführt,[34] die diesem Effekt dadurch Rechnung trägt, dass die Oxidationsprodukte in die Berechnung mit einbezogen werden

$$VZ_{(A+S)} = \frac{\text{Vanillin} + \text{Vanillinsäure}}{p\text{HBA} + p\text{HBS}}$$

(Vanillin: Massegehalt an Vanillin in mg/kg, Vanillinsäure: Massegehalt an Vanillinsäure in mg/kg, pHBA: Massegehalt an *p*-Hydroxybenzaldehyd in mg/kg, pHBS: Massegehalt an *p*-Hydroxybenzoesäure in mg/kg)

Auf der Basis der in der Tabelle 2 angeführten Verhältniszahlen errechnet sich für die modifizierte Verhältniszahl VZ(A+S) ein charakteristischer Wertebereich von 8,3 bis 18,3. Bei starker Oxidation des Vanillins sollte allerdings hinterfragt werden, inwieweit das abweichende Profil in stofflicher und sensorischer Hinsicht noch einem verkehrstüblichen Vanillearoma entspricht.

Die Verhältniszahlen sind folglich nur bedingt für die Authentizitätsprüfung von Vanille in Lebensmitteln geeignet; die Produktionsbedingungen und Einflussfaktoren der Lebensmittelherstellung sollten berücksichtigt werden. Liegen die Verhältniszahlen innerhalb der in der Literatur beschriebenen Schwankungsbreite (s. Tab. 2), ist dies zunächst nur ein erstes wichtiges Indiz dafür, dass das verwendete Vanillearoma überwiegend aus der Vanilleschote stammen kann. Insofern ist es unerlässlich, auch weitere Inhaltsstoffe der Vanille in der Authentizitätsprüfung zu berücksichtigen.

Bei einem Konzentrationsverhältnis Vanillin/*p*-Hydroxybenzaldehyd deutlich größer als 28 besteht der Verdacht, dass Vanillin zugesetzt wurde. In diesem Fall ist eine Authentizitätsprüfung des Vanillins durch weitere Verfahren notwendig, um auszuschließen, dass Vanillin aus anderen Quellen (s. Abschnitt 3.2) zugesetzt wurde.

Beträgt dieses Konzentrationsverhältnis 20 oder weniger, so ist ein zweifelsfreier Nachweis der Echtheit jedoch noch nicht gegeben, da beispielsweise eine Verfälschung durch den Zusatz von Vanillebegleitstoffen nicht auszuschließen ist.

Die HPLC-MS kann neben der Analytik von Vanillin und seinen Hauptbegleitstoffen auch zur Bestimmung von schwerflüchtigen, phenolischen Inhaltsstoffen der Vanilleschoten bzw. von Vanilleextrakten herangezogen werden, die nur in sehr geringen Konzentrationen vorkommen. Auch kann im Hinblick auf eine Prüfung der Authentizität und Verfälschung von Vanillearomen z. B. auf Zusatz von natürlich nicht vorkommendem Ethylvanillin geprüft werden oder die Konzentrationen von natürlich vorkommenden Aromastoffen wie Piperonal [39] bestimmt werden. Piperonal wurde in Vanilleschoten nur im unteren µg/kg-Bereich nachgewiesen. Insofern ist ein Nachweis von Piperonal in Lebensmitteln bis zu den laborüblichen Nachweisgrenzen im unteren µg/kg-Bereich (ppb-Bereich) nicht auf einen Eintrag aus der Vanille, sondern auf einen anderweitigen Zusatz zurückzuführen.

GC-Analyse flüchtiger Stoffe

Die Probenvorbereitung für die GC kann in vergleichbarer Weise wie bei der HPLC durchgeführt werden [29, 30, 33]. Bei komplexeren Lebensmittelmatrizes kann eine zusätzliche Extraktion mit einem unpolaren Lösungsmittel (z. B. Pentan/Diethylether) und/oder eine Isolierung an Festphasen erforderlich sein [30]. Die chromatografische Trennung erfolgt vorzugsweise auf mittelpolaren oder stark polaren Fused Silica Kapillarsäulen. [29, 30]

Die besondere Stärke der GC liegt in der Möglichkeit, die in der Vanilleschote enthaltenen Minorcomponenten wie beispielsweise Guajacol, *p*-Anisaldehyd, *p*-Anisalkohol, Methylcinnamat, Piperonal [40], ver-

schiedene Lactone und Monoterpene miteinfassen zu können.

Speziell die Gehalte an *p*-Anisaldehyd und *p*-Anisalkohol können im Fall von *V. planifolia*-Extrakten und -aromen einen Hinweis auf Verfälschung liefern, da sich diese stark von den in *V. tahitensis* vorkommenden Mengen unterscheiden [32, 41]. Einen Überblick zu publizierten Daten flüchtiger Verbindungen in Vanille verschiedener Herkunft und Spezies bietet das „*Handbook of Vanilla Science and Technology*“.[40]

Vanilla tahitensis zeichnet sich durch eine in Richtung Anis gehende Note aus, zu der insbesondere Substanzen wie *p*-Anisalkohol und *p*-Anissäure und in geringerem Maße *p*-Anisaldehyd beitragen. Mit etwa 1 % liegt der Anteil des Vanillins niedriger als bei *Vanilla planifolia* Andrews, der Anteil der *p*-Hydroxybenzoesäure dagegen höher.[34, 41, 42]

Weiterhin hat die Enantiomerenanalytik an chiralen Säulen gezeigt, dass insbesondere Limonen und β -Pinen in Vanilleextrakten jeweils eine Enantiomerenverteilung mit einem signifikanten Überschuss einer der beiden optisch aktiven Formen aufweisen.[29]

5.2 Analytik mittels Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (IRMS)

Zur Authentizitätsbewertung von Vanillin wird üblicherweise das Stabilisotopenverhältnis des Kohlenstoffs bestimmt. Auch das Wasserstoff-Stabilisotopenverhältnis kann zur Überprüfung der Authentizität herangezogen werden.[43] Unter dem Stabilisotopenverhältnis versteht man das Verhältnis der Konzentration des schwereren Isotops zur Konzentration des entsprechenden leichteren Isotops ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ bzw. $^2\text{H}/^1\text{H}$).

Die Angabe des Stabilisotopenverhältnisses erfolgt als δ -Wert in ‰ ($\delta^{13}\text{C}$ bzw. $\delta^2\text{H}$) und bezeichnet die normalisierte Abweichung δ von international vereinbarten Referenzstandards, dem Vienna Pee Dee Belemnite (VPDB) für Kohlenstoff und dem Vienna Standard Mean Ocean Water (VSMOW) für Wasserstoff.[44]

Der reine Aromastoff Vanillin wird zur Bestimmung der Stabilisotopenverhältnisse direkt mittels eines Elementaranalysators bzw. mittels einer Pyrolyseeinheit in die entsprechenden Messgase CO_2 bzw. H_2 umgesetzt und diese werden online dem IRMS zugeführt.

Bei komplexen Matrizes kommt die Gaschromatografie-IRMS zum Einsatz. Der Aromastoff Vanillin wird dabei zunächst gaschromatografisch isoliert, online über entsprechende Reaktoren zu CO_2 für die Messung von Kohlenstoff bzw. zu H_2 für die Messung von Wasserstoff umgesetzt und diese werden dann dem IRMS zugeführt.

Bei der Bestimmung von Stabilisotopenverhältnissen kommt der Vermeidung von Fraktionierungen der Isotopologie eine besondere Bedeutung zu.

Tab. 3: Stabilisotopenverhältnisse des Kohlenstoffs und Wasserstoffs von Vanillin verschiedener Herkunft und Herstellungsverfahren

Herkunft/Rohstoff des Vanillins	Herstellungsverfahren	$\delta^{13}\text{C}$ VPDB (‰)	$\delta^2\text{H}$ VSMOW (‰)	Literatur
<i>V. planifolia</i> -Schote, (z. B. Bourbon-Vanille)	Extraktion	-21,5 bis -17,8	-92 bis -10	[43, 45, 46, 47, 48]
<i>V. tahitensis</i> -Schote	Extraktion	-19,1 bis -14,6	-82 bis -3	[45, 46, 48]
Ferulasäure aus C_3 -Pflanzen (z. B. Reis)	biotechnologisch	-37,4 bis -35,4	-174 bis -158	[47, 48]
Ferulasäure aus C^4 -Pflanzen (z. B. Mais)	biotechnologisch	-19,9 bis -18,2	-99 bis -97	[47]
Curcumin (Kurkuma)	biotechnologisch	-30,4 bis -27,8	-155 bis -128	[47]
Eugenol, Isoeugenol (Nelke)	chemosynthetisch/ biotechnologisch	-32,4 bis -30,4	-114 bis -62	[46, 47]
Lignin (Holz)	chemosynthetisch	-32,5 bis -27,4	-182 bis -62	[45, 47]
Glucose (unbek. Herkunft; Einzelwert)	biotechnologisch	-12,5	-95	[48, 49]

Beurteilung der Authentizität von Vanillin über den $\delta^{13}\text{C}$ - und $\delta^2\text{H}$ -Wert

- Beurteilung des $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes von Vanillin

In der Praxis wird überwiegend der $\delta^{13}\text{C}$ -Wert zur Prüfung der Frage herangezogen, ob das Vanillin ausschließlich aus der Schote stammt, oder etwa aus anderen Rohstoffen biotechnologisch bzw. durch andere Verfahren hergestellt worden ist.

Basierend auf den in der Literatur veröffentlichten mehr als 120 Daten für Vanillin, das ausschließlich aus der Vanilleschote stammt, liegt der $\delta^{13}\text{C}$ -Wert im Bereich von -14,6 bis -21,5 ‰ VPDB (s. Tabelle 3). Bei einem $\delta^{13}\text{C}$ -Wert der negativer als -21,5 ‰ VPDB ist, kann davon ausgegangen werden, dass das Vanillin nicht bzw. nicht ausschließlich aus der Schote stammt. Dieser sog. „Cut-Off Wert“ von -21,5 ‰ VPDB berücksichtigt dabei bereits die natürlichen Schwankungsbreiten des Isotopenverhältnisses von Vanillin bedingt z. B. durch geografische Herkunft, klimatische oder jahrgangsspezifische Besonderheiten oder technologischer Verfahren.

Bei der Beurteilung des $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes von Vanillin ist die erweiterte Messunsicherheit zu berücksichtigen (Abschnitt 5).

Einzelne in der Fachliteratur veröffentlichte, negativere $\delta^{13}\text{C}$ -Werte als -21,5 ‰ VPDB, z. B. für Vanillin isoliert aus grünen, unreifen, nicht fermentierten Vanilleschoten durch Säurebehandlung [50], bleiben hier außen vor, da das Herstellungsverfahren nicht den rechtlichen Vorschriften für die Gewinnung von natürlichem Vanillin bzw. von Vanilleschotenextrakten entspricht.

Biotechnologisch hergestelltes Vanillin, welches als natürlicher Aromastoff gekennzeichnet werden darf, wird überwiegend aus Ferulasäure von C_3 -Pflanzen hergestellt und weist mit -37,4 bis -35,4 ‰ VPDB die negativsten $\delta^{13}\text{C}$ -Werte auf. Die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von Vanillin hergestellt aus Vorstufen anderer C_3 -Pflanzen wie Curcumin aus Kurkuma, Eugenol, Isoeugenol aus Nelken oder Lignin aus Holz liegen im Bereich von -27,4 und -32,5 ‰ VPDB. Vanillin kann biotechno-

logisch auch aus Vorstufen von C_4 -Pflanzen wie Ferulasäure oder Glucose aus Mais oder Zuckerrohr hergestellt werden und weist dann entsprechend positivere $\delta^{13}\text{C}$ -Werte auf als Vanillin, welches aus C_3 -Pflanzen gewonnen wurde.

Eine Überprüfung der geografischen Herkunft von Vanillebestandteilen über den $\delta^{13}\text{C}$ -Wert von Vanillin ist nicht möglich [51]. Unterschiede bestehen jedoch bei den Vanille-Arten; während bei Schoten der Art *V. planifolia* die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte des Vanillins zwischen -21,5 und -17,8 ‰ VPDB liegen, weisen Schoten der Art *V. tahitensis*, die überwiegend in Französisch Polynesien und in Papua Neuguinea angebaut werden, weniger negative Werte im Bereich von -19,1 bis -14,6 ‰ VPDB auf.

Bei milchhaltigen Lebensmitteln wurde festgestellt, dass sich im Zuge einer enzymatischen Oxidation von Vanillin zu Vanillinsäure das Kohlenstoffisotopenverhältnis des verbleibenden Vanillins zu positiveren $\delta^{13}\text{C}$ -Werten verschieben kann.[37] Hier besteht jedoch nicht die Gefahr eines falsch-positiven Befundes im Hinblick auf einen Anteil von Vanillin, welcher nicht aus der Schote kommt. In jedem Falle müssen aber auch solche Effekte berücksichtigt werden.

Beurteilung des $\delta^2\text{H}$ -Wertes von Vanillin

Der $\delta^2\text{H}$ -Wert von Vanillin, das ausschließlich aus der Schote stammt, liegt zwischen -3 und -92 ‰ VSMOW. Vanillin, biotechnologisch hergestellt aus Ferulasäure oder anderen Vorstufen aus C_3 -Pflanzen, hat negativere Werte als Vanillin aus der Schote.

Eine Zuordnung oder Überprüfung der geografischen Herkunft ist anhand des $\delta^2\text{H}$ -Wertes nicht möglich.

Gemeinsame Betrachtung der $\delta^{13}\text{C}$ - und $\delta^2\text{H}$ -Werte von Vanillin

Da die $\delta^{13}\text{C}$ - und $\delta^2\text{H}$ -Werte des Vanillins miteinander in Zusammenhang stehen, ist es möglich, durch gemeinsame Betrachtung der Werte die Beurteilung der Einzelwerte zu verifizieren [45, 46, 47]. Insofern ergeben sich mit diesen Verfahren im Hinblick auf die

Fragestellung, ob Vanillin ausschließlich aus der Schote stammt, Möglichkeiten einer Plausibilitätsprüfung.

5.3 Weitere spezielle Untersuchungsmöglichkeiten von Vanillin

Zur Prüfung der Vanillinqualität gibt es noch weitere Methoden der Isotopen- bzw. Stabilisotopenanalytik. Diese Methoden erfordern höhere Substanzmengen oder Reinheiten und sind daher vor allem zur Rein- stoff- bzw. Rohstoffprüfung (Vanilleextrakte, Vanillin aus der Schote etc.) geeignet. Die Methoden werden im Folgenden nur kurz angesprochen. Es werden das Prinzip und die Methode vorgestellt, Möglichkeiten und Grenzen aufgezeigt und ansonsten auf die entsprechenden Publikationen verwiesen.

Bestimmung des $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes und $\delta^2\text{H}$ -Wertes der Methoxygruppe von Vanillin mittels IRMS

Durch $\delta^{13}\text{C}$ - und $\delta^2\text{H}$ -Analyse von Methyljodid (CH_3I), das durch Abspaltung aus der Methoxygruppe des Vanillins mit Iodwasserstoffsäure erzeugt wird, kann mittels Headspace-IRMS Vanillin ex Schote und Vanillin ex C_4 -Ferulasäure unterschieden werden [47, 48, 49]. Ebenso kann damit Vanillin ex Eugenol deutlicher von Vanillin ex Curcumin und ex Lignin abgegrenzt werden. Durch multivariate Auswertung der Kohlenstoff- und Wasserstoff-Isotopenverhältnisse des Gesamtmoleküls und der Methoxygruppe konnten Geißler et al. deutlich verbesserte Unterscheidungsmöglichkeiten verschiedenster Vanillinqualitäten erreichen.[47]

Bestimmung des $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes von Vanille-Begleitstoffen

Als weitere Kriterien für die Beurteilung der Authentizität von Aromen mit Vanillebestandteilen können die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der Vanillebegleitstoffe herangezogen werden. Voraussetzung für die Messung ist, dass ausreichend hohe Konzentrationen dieser Stoffe in der Probenmatrix vorhanden sind.[52]

^{14}C -Aktivitätsmessung von Vanillin

Mittels der ^{14}C -Aktivitätsmessung bzw. Radiocarbonmethode an Vanillin kann ermittelt werden, ob dieses aus Erdöl oder anderen fossilen Quellen stammt. Wird Vanillin aus fossilen Rohstoffen synthetisiert, dann ist die ^{14}C -Aktivität null [53], wohingegen Vanillin aus biologischen Quellen (Schote, Mais, Reis, Holz, Nelke, Kurkuma usw.) eine ^{14}C -Aktivität um die 100 % aufweist. Allerdings ist zu beachten, dass eine ^{14}C -Aktivität von 100 % nicht automatisch bedeutet, dass es sich dabei um einen natürlichen Aromastoff im Sinne der EG-AromenV handelt.

Kernresonanzspektroskopie (^2H -NMR, ^{13}C -NMR) von Vanillin

Die Anwendung der Deuterium-Kernresonanzspektroskopie (^2H -NMR) zur Analyse von Vanillin

basiert darauf, dass die Verteilung der ^2H -Isotope an den verschiedenen Positionen eines Moleküls nicht statistisch erfolgt. Sie hängen von Diskriminierungseffekten während der (Bio)Synthese ab. Über die vier zur Beurteilung relevanten (D/H)-Isotopenverhältnisse des Vanillin-Moleküls können Mischungen von natürlichem und chemosynthetischem Vanillin nachgewiesen werden.[54]

Die Methode wurde in einem AOAC-Ringversuch getestet [55] und wird insbesondere dann zur Authentizitätskontrolle eingesetzt, wenn relativ hohe Substanzmengen an Vanillin mit größtmöglicher Reinheit vorliegen, z. B. bei der Rohstoffkontrolle von purem Vanillin oder von aufgereinigtem Vanillin aus Vanilleextrakten. Wie eine erste Untersuchung zeigte, ermöglicht die ^2H -NMR-Analyse auch die Klassifizierung bzw. Differenzierung biotechnologisch hergestellten Vanillins (ex Ferulasäure) und Vanillins ex Schote [56]. Veröffentlichungen mit ersten Ergebnissen zur Bestimmung der positionellen ^{13}C -Verteilung im Vanillin-Molekül mittels ^{13}C -NMR versprechen Vorteile gegenüber der ^2H -NMR, da die ^{13}C -NMR deutlich empfindlicher ist. So wäre mit dieser Methode die Abgrenzung von Vanillin aus chemo-synthetischer und biotechnologischer Herstellung besser möglich. [57, 58, 59, 60, 61]

6 Sensorische Prüfverfahren für Vanillearomen

Sensorische Standardmethoden

Zur sensorischen Prüfung von Lebensmitteln wird auf eine Reihe von internationalen sensorischen Standards zurückgegriffen, den sogenannten ISO-Methoden. Man unterscheidet im Allgemeinen zwischen Unterschiedstests und beschreibenden Methoden. Beide werden auch bei der Prüfung von Vanilleprodukten angewendet. Sie stellen sicher, dass die Prüfergebnisse statistisch validiert sind und signifikante Aussagen getroffen werden können.[62, 63, 64]. In vielen Fällen reicht es aber auch aus, qualitative Methoden für einfache Geschmacksbeschreibungen zu benutzen.

Abhängig von der Methode, sind Auswahl- und Schulungskriterien festgelegt. Man kann geschulte oder ungeschulte Prüfpersonen einsetzen, z. B. werden für Dreiecks- oder Duo-Trio-Prüfungen die Prüfer nicht geschult [65, 66, 67], während für die quantitative beschreibende Analyse die Prüfer auf Geschmacksdeskriptoren und -intensitäten trainiert werden müssen.

Auswahl- und Schulungskriterien für die Prüfpersonen sind bindend festgelegt. Die Eignung der Prüfpersonen ist regelmäßig zu kontrollieren.[68]

Deutliche Wahrnehmung von Vanillegeschmack

In den Leitsätzen für Puddinge, andere süße Desserts und verwandte Erzeugnisse und in den Leitsätzen für Speiseeis wird eine deutliche Wahrnehmung des Va-

nilligeschmacks gefordert [3, 4]. Die sensorische Erkennbarkeit eines bekannten Geschmacks erfolgt mit geschulten Prüfern [69].

So besitzt z. B. Vanillin einen charakteristischen, angenehm süßlichen Aromaeindruck. Sein retronasaler Wahrnehmungsschwellenwert in Lebensmitteln liegt je nach Matrix bei 30 bis 200 µg/kg.[70] Die Wahrnehmung eines Vanille-Aromaeindrucks hängt aber, wie vorher beschrieben, von vielen Vanille-eigenen Aromastoffen ab, die andere Aromaeindrücke und Wahrnehmungsschwellenwerte besitzen.

Sensorische Prüfung von natürlichen Vanillearomen

Nach Erwägungsgrund 26 der EG-Aromen-V muss der Vanillebestandteil sensorisch wahrnehmbar sein und die maximal 5 % nicht aus Vanille stammenden Aromabestandteile dürfen nur zur Standardisierung oder Verleihung zum Beispiel einer fruchtigen, würzigeren oder cremigen Aromanote verwendet werden.

Dazu werden die Aromabestandteile aus Vanille (=95 %-Anteil) und der verbleibende 5 %-Anteil (nicht aus Vanille) jeweils separat sensorisch beschrieben und hinsichtlich der sensorischen Qualität und Intensität für das gesamte 95/5-Aroma bewertet.[71, 72, 73]

7 Zusammenfassung

Das Grundlagenpapier „Vanillearomen – Herkunft, Analytik und Charakterisierung der Vanillebestandteile“ gibt einen Überblick zum Anbau und der Produktion der Gewürzvanille, zu Gewinnungs- und Herstellungsverfahren von Vanilleextrakten und von Vanillin, zur Zusammensetzung und Kennzeichnung von Vanillearomen nach EG-AromenV, zu Analyseverfahren und Beurteilungskriterien bestimmter Inhaltsstoffe zur Echtheitsprüfung von Vanillearomen sowie zu sensorischen Prüfverfahren. Auf spezielle gesetzliche Regelungen der Kennzeichnung oder Aufmachung von Lebensmitteln, die Aromen mit Vanille enthalten, wird nicht eingegangen.

Schwerpunkt des Grundlagenpapiers ist die Überprüfung der Echtheit (Authentizität) von Vanillearomen bzw. von Vanillebestandteilen, sowie des Aromastoffes Vanillin auf der Grundlage analytischer Daten. Es wird ein Überblick über die Verfahren der Chromatografie (HPLC, GC), ¹³C- und ²H-Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (IRMS) und spezieller Verfahren wie der ²H- und ¹³C-Kernresonanzspektroskopie (NMR) gegeben. Die in der Fachliteratur vorhandenen Analyseergebnisse authentischer Proben die als Beurteilungsgrundlage dienen können, werden vorgestellt und diskutiert.

Durch Bestimmung der Konzentrationen und Konzentrationsverhältnisse von Vanillin und seiner charakteristischen Begleitkomponenten Vanillinsäure, *p*-Hydroxybenzaldehyd und *p*-Hydroxybenzoe-

säure mittels Flüssigchromatografie (LC) kann geprüft werden, ob ein Produkt überhaupt Bestandteile der Vanilleschote enthält und ob gegebenenfalls ein Zusatz von Vanillin vorliegt.

Flüchtige Stoffe können mittels Gaschromatografie (GC) qualitativ und quantitativ bestimmt werden und können einerseits zur Überprüfung der Echtheit eines natürlichen Vanillearomas als auch zum Nachweis von Aromastoffen, die nicht aus der Vanilleschote stammen, eingesetzt werden.

Zur Prüfung, ob ein Aroma ausschließlich Vanillin aus der Schote enthält, sollte auch das Kohlenstoffisotopenverhältnis ($\delta^{13}\text{C}$ -Wert) des Vanillins mittels Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (IRMS) bestimmt werden. Ein $\delta^{13}\text{C}$ -Wert negativer als $-21,5\text{‰}$ VPDB weist darauf hin, dass das Vanillin nicht ausschließlich aus Vanilleschoten stammt.

Sind reine Vanilleextrakte bzw. hinreichende Substanzmengen Vanillin für die Analytik verfügbar, können weitere Methoden, wie die ²H-IRMS von Vanillin, die ¹³C- und ²H-IRMS der Methoxygruppe des Vanillins oder die ²H-NMR-Analytik zur Authentizitätsprüfung eingesetzt werden.

Von Bedeutung ist auch die sensorische Prüfung, um normative Vorgaben hinsichtlich des Aromaeindrucks zu verifizieren.

Eine sachgerechte Beurteilung analytischer Ergebnisse sollte unter Berücksichtigung der Herstellung und Zusammensetzung des Vanillearomas oder des mit Vanillearomen hergestellten Lebensmittels erfolgen. Die Beweislast des Herstellers soll daran mitwirken.[28]

8 Summary

The framework document “Vanilla Flavourings - Origin, Analysis and Characterization of Vanilla Ingredients” provides an overview of the cultivation and production of the vanilla spice plants, the extraction and production methods of vanilla extracts and vanillin, the composition and declaration of vanilla flavourings according to the EC Regulation on Flavourings as well as the analytical methods and evaluation criteria for authenticity testing of vanilla flavourings and the sensory testing methods. It does not deal with specific legal requirements on the labelling or presentation of foods containing vanilla flavourings.

The main focus of the framework document is the verification of the authenticity of the vanilla constituents in vanilla flavourings and the flavouring substance vanillin on the basis of analytical data. An overview of chromatographical (HPLC, GC), ¹³C and ²H isotope ratio mass spectrometry (IRMS) and special further methods such as ²H and ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy is given. The corresponding data available in the literature and obtained from aut-

hentic samples are summarized and discussed as a basis for the evaluation of flavourings with vanilla according to the EC Regulation on Flavourings.

By determining the concentrations and concentration ratios of vanillin and its characteristic accompanying components vanillic acid, *p*-hydroxybenzaldehyde and *p*-hydroxybenzoic acid by means of liquid chromatography (LC), it is possible to verify whether a flavouring contains vanilla bean components at all and whether vanillin has been added.

Volatiles can be determined qualitatively and quantitatively by means of gas chromatography (GC) and can be used on the one hand to verify the authenticity of a natural vanilla flavouring and on the other hand to detect flavouring substances that do not originate from the vanilla bean.

To check whether a flavouring contains only vanillin from the pod, the carbon isotope ratio ($\delta^{13}\text{C}$ value) of vanillin should also be determined by isotope ratio mass spectrometry (IRMS). A $\delta^{13}\text{C}$ value more negative than -21.5‰ VPDB indicates that the vanillin is not derived exclusively from vanilla beans.

If pure vanilla extracts or sufficient amounts of vanillin are available for analysis, other methods such as ^2H -IRMS of vanillin, ^{13}C - and ^2H -IRMS of the methoxy group of vanillin, or ^2H -NMR analysis can be used for proof of authenticity.

Sensory testing is also of importance to verify normative specifications regarding the flavour impression.

A proper assessment of analytical results should consider the production and composition of the vanilla flavouring or the food product manufactured with a vanilla flavouring. The burden of proof is with the manufacturer.[28]

Literatur

- [1] AG Aromastoffe der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, Fachgruppe der Gesellschaft Deutscher Chemiker (2019) Aromastoffe – Ein wichtiges Stück Lebens(mittel)qualität. URL: https://www.gdch.de/fileadmin/downloads/Netzwerk_und_Strukturen/Fachgruppen/Lebensmittelchemiker/Arbeitsgruppen/aromastoffe/broschuere_2019.pdf [19.04.2021]
- [2] AGs Aromastoffe und Stabilisotopenanalytik der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, Fachgruppe in der Gesellschaft Deutscher Chemiker (2010), Grundlagenpapier Herkunft und Authentizität von Vanillearomen. Lebensmittelchemie 64: 43–48
- [3] Leitsätze für Puddinge, andere süße Desserts und verwandte Erzeugnisse des Deutschen Lebensmittelbuches in der Neufassung vom 26.03.2021, Kapitel 2.17 URL: https://www.bmel.de/SharedDocs/Downloads/DE/_Ernaehrung/Lebensmittel-Kennzeichnung/LeitsaetzePuddinge.pdf?__blob=publicationFile&v=3&msckid=7660d196ac3811ec9833624edf4917e4 [25.03.2022]
- [4] Leitsätze für Speiseeis des Deutschen Lebensmittelbuches in der Neufassung vom 29.11.2016, Kapitel 2.2.2. URL: https://www.bmel.de/SharedDocs/Downloads/DE/_Ernaehrung/Lebensmittel-Kennzeichnung/LeitsaetzeSpeiseeis.pdf?__blob=publicationFile&v=2&msckid=1f7d1a8fac3811ecb4c10fb456d70c3a [25.03.2022]
- [5] Bund für Lebensmittelrecht und Lebensmittelkunde (2007) Richtlinie für Vanille-Zucker und Vanillin-Zucker. URL: <https://www.lebensmittelverband.de/download/richtlinie-vanille-zucker> [04.11.2021]
- [6] Arbeitskreis Aromen und Aromastoffanalytik (2021) Grundlagenpapier: Sammlung von Regelungen zur Zulässigkeit der Abbildung von Früchten und Gewürzen beim Inverkehrbringen von Aromen und aromatisierten Lebensmitteln. Dtsch. Lebensm.-Rundsch. 117: 165–173
- [7] AG Milch und Milchprodukte der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, Fachgruppe der Gesellschaft Deutscher Chemiker (2011) Positionspapier zur Kennzeichnung „Vanille“ bei Milcherzeugnissen. URL: https://www.gdch.de/fileadmin/downloads/Netzwerk_und_Strukturen/Fachgruppen/Lebensmittelchemiker/Arbeitsgruppen/milch/posi_milch_vanille.pdf [19.04.2021]
- [8] DVAI (2022) Positionspapier Vanille. URL: http://aromenverband.de/wp-content/uploads/2022/03/dvai-positionspapier_vanille_ueberarbeitet_final.pdf [05.04.2022]
- [9] Arbeitskreis der auf dem Gebiet der Lebensmittelhygiene und der vom Tier stammenden Lebensmittel tätigen Sachverständigen (2021) 86. Arbeitstagung, Stellungnahme Nr. 2020/86/34. J. Consum. Prot. Food Saf. 16: 275–290
- [10] International Organization for Standardization (1999) ISO 5565-1
- [11] AG Aromastoffe der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, Fachgruppe in der Gesellschaft Deutscher Chemiker (2020) Jahresmittelwerte, Umfrageergebnisse, 42. Sitzung, 24. November 2020
- [12] Brown M L (2009) in: Jones E C, Murphy A D (Hrsg.) Political Economy of Hazards and Disasters, AltaMira Press, Lanham, MD, USA: 241–264
- [13] Adeji J, Hartmann T G, Ho C T (1993) Perfum. Flavor. 18: 25–33
- [14] Ehlers D, Pfister M, Bartholomae S (1994) Z. Lebensm.-Unters. Forsch. 199: 38–42
- [15] DIN EN ISO 3493: 2007
- [16] Ehlers D, Bartholomae S (1993) Z. Lebensm.-Unters. Forsch. 197: 550–557
- [16] Quirin K W, Gerard D (1998) The European Food and Drink Review 10: 53–55
- [18] Synthite Supercritical CO₂ Extracts. URL: <http://www.synthite.com/synthite/our-products/Industrial-Products-By-Category/Supercritical-CO2-Extracts> [19.04.2021]
- [19] Firmenich Flavour Ingredients Catalog. URL: <https://www.firmenich.com/ingredients/ingredient-flavor-catalog?query=vanilla> [19.04.2021]
- [20] Surburg H und Panten J (2006) Common Fragrance and Flavor Materials. 5. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim
- [21] Gallage N J und Möller B L (2018) in: Schwab W, Lange B M und Wüst M (Hrsg.) Biotechnology of Natural Products. 1. Auflage, Springer, Cham, Schweiz: 3–24
- [22] Desmurs J R, Giannotta D, Gelo-Pujic M, Role C, Lancelin P (2004) Perfum. Flavor. 29: 32–42
- [23] Berger R (Hrsg.) (2007) Flavours and Fragrances, 1. Aufl., Springer, Berlin, Heidelberg
- [24] Ziegler E, Ziegler H (Hrsg.) (2007) Flavourings – Production, Composition, Applications, Regulations, 2. Aufl., Wiley-VCH, Weinheim
- [25] VERORDNUNG (EG) Nr. 1334/2008 DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTES UND DES RATES vom 16. Dezember 2008 über Aromen und bestimmte Lebensmittelzutaten mit Aromaeigenschaften zur Verwendung in und auf Lebensmitteln sowie zur Änderung der Verordnung (EWG) Nr. 1601/91 des Rates, der Verordnungen (EG) Nr. 2232/96 und (EG) Nr. 110/2008 und der Richtlinie 2000/13/EG
- [26] Arbeitskreis Lebensmittelchemischer Sachverständiger der Länder und des Bundesamtes für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (2012) 100. Sitzung, Stellungnahme Nr. 2012/29. URL: <https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Down>

- loads/01_Lebensmittel/ALS_ALTS/ALS_Stellungnahmen_100_Sitzung_2012.html [19.04.2021]
- [27] AG Elemente und Elementspezies der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, Fachgruppe in der Gesellschaft Deutscher Chemiker (2019) *Lebensmittelchemie* 73: 25–26
- [28] AG Aromastoffe der Lebensmittelchemischen Gesellschaft Fachgruppe in der Gesellschaft Deutscher Chemiker, Authentizität von Aromastoffen (2004) *Lebensmittelchemie* 58: 54. URL: https://www.gdch.de/fileadmin/downloads/Netzwerk_und_Strukturen/Fachgruppen/Lebensmittelchemiker/Arbeitsgruppen/aromastoffe/aroma_posi1.pdf [19.04.2021]
- [29] Scharer A (2002) Vanille: Neues zur Authentizität, Dissertation, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, URN: urn:nbn:de:hebis:30-0000000818. URL: <http://publikationen.uni-frankfurt.de/volltexte/2003/161/pdf/00000263.pdf> [06.04.2022]
- [30] Sinha A K, Sharma U K, Sharma N. (2008) *Int. J. Food Sci. Nutr.* 59: 299–326
- [31] Mosandl A (2001) GC/IRMS-Multielementanalyse zur Authentizitätsbewertung von Vanilleschoten. FEI-Bericht AiF-FV 12062 N
- [32] Scharer A, Mosandl A (2001) *Dtsch. Lebensm.-Rundsch.* 97: 449–456
- [33] Pérez-Silva A, Odoux E, Brat P, Ribeyre F, Rodriguez-Jimenes G C, Robles-Olvera V, Garcia-Alvarado M A, Günata Z (2006) *Food Chemistry* 99: 728–735
- [34] Littmann-Nienstedt S, Ehlers D (2005) *Dtsch. Lebensm.-Rundsch.* 101: 182–187
- [35] Walton N J, Mayer M J and Narbad A (2003) *Phytochemistry* 63: 505–515
- [36] Mourtzinos I, Konteles S, Kalogeropoulos N, Karathanos V T (2009) *Food Chemistry* 114: 791–797
- [37] Kempe K, Kohnen M (1999) *Adv. Food Sci.* 21: 48–53
- [38] Anklam E, Gaglione S, Müller A (1997) *Food Chemistry* 60: 43–51
- [39] Sinha A K, Verma S C, Sharma, U K (2007) *J. Sep. Sci.* 30: 15–20
- [40] Toth S, Lee K J, Havkin-Frenkel D, Belanger F C, Hartman T G (2011) in: Havkin-Frenkel D & Belanger F C (Hrsg.) *Handbook of Vanilla Science and Technology*, Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK: 183–219
- [41] Brunswig C, Rochard S, Pierrat A., Rouger A, Senger-Emonnot P, George G., Raharivelomanana P. (2016) *J. Sci. Food Agric.* 96: 848–858
- [42] Brunswig C, Collard F X, Lepers-Andrzewski S, Raharivelomanana P (2017) in: El-Shemy H (Hrsg.) *Active Ingredients from Aromatic and Medicinal Plants*, IntechOpen, London, UK: 29–48
- [43] Christoph N, Schellenberg A, Zander W, Krammer G (2017) in: Büttner A (Hrsg.) *Handbook of Odor* Springer Dordrecht, Heidelberg 2017: 439–457
- [44] Brand W A, Copen T B, Vogl J, Rosner M, Prohaska T (2014) *Pure Appl. Chem.* 86: 425–467
- [45] Greule M, Tumino L D, Kronewald T, Hener U, Schleucher J, Mosandl A (2010) *Eur. Food Res. Technol.* 231: 933–941
- [46] Hansen, A M S, Fromberg A, Frandsen, H L (2014) *J. Agric. Food Chem.* 62: 10326–10331
- [47] Geißler K, Greule M, Schäfer U, Hans J, Geißler T, Meier L, Keppler F, Krammer G (2017) *Flavour Fragrance J.* 32: 228–237
- [48] Wilde, A S (2019) Detection of Food Fraud in high value products – Exemplary authentication studies on Vanilla, Black Pepper and Bergamot oil. Kgs. Lyngby, Denmark, Technical University of Denmark. URL: https://backend.orbit.dtu.dk/ws/portalfiles/portal/195890184/PhD_thesis_Amelie_Wilde.pdf [19.04.2021]
- [49] Wilde A S, Frandsen H L, Fromberg A, Smedsgaard J, Greule M (2019) *Food Control* 106: 106735
- [50] Gassenmeier K, Bingelli E, Kirsch T, Otv S (2011) *Flavour Fragrance J.* 28: 25–29
- [51] Greule M, Mosandl A, Hamilton JTG, Keppler F (2015) *J. Agric. Food Chem.* 63: 5305–5306
- [52] Kaunzinger A, Juchelka D, Mosandl A (1997) *J. Agric. Food Chem.* 45: 1752–1757
- [53] Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (1986) in: *Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren L 00.00-14*, Beuth Verlag Berlin
- [54] Bonniot T T, Berdague P, Robins R J, Remaud G, Lesot P (2018) *Flavour Fragrance J.* 33: 217–229
- [55] Jamin E, Martin F, Martin G G (2007) *J. of AOAC Int.* 90: 187–195
- [56] Cochennec C (2013) *Perfum. Flavor.* 38: 20–25
- [57] Tenailleau E, Lancelin P, Robins R J, Akoka S (2004) *Anal. Chem.* 76: 3818–3825
- [58] Caytan E, Botosoa E P, Silvestre V, Robins R J, Akoka S, Remaud G S (2007) *Anal. Chem.* 79: 8266–8269
- [59] Botosoa E P, Blumenstein C, MacKenzie D A, Silvestre V, Remaud G S, Kweicien R A, Robins R J (2009) *Anal. Biochem.* 393: 182–188
- [60] Botosoa E P, Silvestre V, Robins R J, Rojas J M M, Guillou C, Remaud G S (2009) *J. Chromatogr. A* 1216: 7043–7048
- [61] Portaluri V, Thomas F, Jamin E, Lorandel B, Silvestre V, Akoka S, Remaud G S (2021) *Food Control* 130: 108345
- [62] International Organization for Standardization: ISO 3972 (Oct. 2011)
- [63] International Organization for Standardization: ISO 6658 (July 2017)
- [64] International Organization for Standardization: ISO 13299 (Sep. 2016)
- [65] International Organization for Standardization: ISO 5495 (Nov. 2005, Amendment Dec. 2015)
- [66] International Organization for Standardization: ISO 4120 (June 2004)
- [67] International Organization for Standardization: ISO 10399 (June 2004)
- [68] International Organization for Standardization: ISO 8586 (Dec. 2012)
- [69] International Organization for Standardization: ISO 5496 (Aug. 2006, Amendment May 2018)
- [70] Kreissl J, Mall V, Steinhaus P, Steinhaus M. Leibniz-LSB@TUM Odorant Database, Version 1.2. Leibniz Institute for Food Systems Biology at the Technical University of Munich: Freising, Germany, 2022 (<https://www.leibniz-lsb.de/en/databases/leibniz-lsb-tum-odorant-database>)
- [71] International Organization for Standardization: ISO 11053 (Dec. 1994)
- [72] International Organization for Standardization: ISO 5492 (Oct. 2008, Amendment May 2016)
- [73] International Organization for Standardization: ISO 4121 (Nov. 2003)

Kontakt:

Dr. Martin Steinhaus

Obmann der AG Aromastoffe

Lise-Meitner-Str. 34

85354 Freising

Tel.: 08161/71-2991

E-Mail: martin.steinhaus@tum.de

doi: 10.1002/lemi.202251002