



# Analytische Sensorsysteme in der Qualitätskontrolle pharmazeutischer Aromastoffe

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Florian Ernst Kiene**  
aus Vechta, Deutschland

Düsseldorf, Oktober 2014

aus dem Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Jörg Breitzkreutz

Koreferent: PD Dr. Markus Thommes

Tag der mündlichen Prüfung: 27. November 2014

# Vorwort

Die vorliegende Arbeit entstand unter der Leitung von PD Dr. Markus Thommes und Prof. Dr. Jörg Breitzkreutz am Institut für pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf in Kooperation mit Bayer Animal Health GmbH. Ich möchte mich bei allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, ganz herzlich für die vielfache und positive Unterstützung bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt PD Dr. Markus Thommes, der mich in seinen Arbeitskreis aufgenommen und mir die Arbeit am Institut ermöglicht hat. Dank seiner guten Betreuung und den häufigen fachlichen Ausflügen, habe ich stets eine konstruktive und freundschaftliche Unterstützung erfahren. So konnte ich meinen Wissenshorizont im Promotionsthema und darüber hinaus erweitern.

Als Doktorvater hat Prof. Dr. Breitzkreutz eine zentrale Rolle während meiner Tätigkeit eingenommen und mich herzlich in seinen Arbeitskreis willkommen geheißen. Seine fachliche Kompetenz und seine innovativen Ideen haben meine Arbeit in die richtige Richtung gelenkt. Mit seiner steten Hilfsbereitschaft und fachlichen Kompetenz hat mich Prof. Dr. Dr. h.c. Peter Kleinebudde vielfach positiv unterstützt. Ich möchte beiden dafür danken.

Mein Dank gilt Bayer Animal Health GmbH, vertreten durch Dr. Martina Preu und Dr. Anja Hoelscher für die finanzielle sowie Dr. Elisabeth Feldhues und Frank Peters für die fachliche Unterstützung meiner Arbeit.

Für viele „Nasen-Reisen“ und unzählige konstruktive fachliche Ratschläge sowie das Korrekturlesen vieler meiner Schriftstücke danke ich Dr. Miriam Pein.

Ebenfalls möchte ich PD Dr. Peter Boeker und Dr. Jens Fischer sowohl für die freundliche Unterstützung bei den olfaktometrischen Messungen, als auch für die Bereitstellung des OdourVectors danken.

Ich möchte allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern des Institutes für pharmazeutische Technologie und Biopharmazie für die tolle Atmosphäre, die ich erleben durfte, danken. Dass diese Jahre lange in meiner Erinnerung verbleiben, liegt dabei besonders an der „Herrenrunde“ in alphabetischer Reihung um Raphael Krampe, Haress Mangal, Robin Meier, Christian Mühlendorf, Gustavo Petrovick, Julian Quodbach, Daniel Sieber und Carl Moritz Wagner.

Meinen Eltern und meinen Brüdern möchte ich dafür danken, dass sie mich und meine Launen all die Jahre ertragen und mich jederzeit uneingeschränkt unterstützt haben. Ohne sie wäre ich nicht dort, wo ich jetzt bin! Für alles, was meine Familie für mich getan hat und alles was sie noch tun wird, ein ganz herzliches Danke.

Zuletzt möchte ich derjenigen Person danken, die wohl am meisten unter mir und meiner Promotion gelitten hat, Lena. Ob in guten oder schlechten Zeiten, ob ich müde oder überdreht war, Lena stand stets positiv und unterstützend zu mir. Dafür und für noch viel mehr möchte ich ihr von ganzem Herzen danken.

# Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Kiene, F.E., Pein, M., Thommes, M. (2014) *Orientation to Determine Quality Attributes of Flavoring Excipients containing Volatile Molecules*. akzeptiert beim Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis als wissenschaftlicher Artikel am 17. Januar 2015.

Pein, M., Preis, M., Eckert, C., Kiene, F.E. (2014) *Taste-masking assessment of solid oral dosage forms - A critical review* International Journal of Pharmaceutics 465(1-2):239-254

Kiene, F.E., Pein, M., Thommes, M. (2013) *Signal Prediction of Electronic Tongue Sensors*. Posterpräsentation: AAPS Annual Meeting and Exposition, San-Antonio (USA)

Kiene, F.E., Pein, M., Thommes, M. (2013) *Evaluation of Electronic Tongue Signals by Two Fitting Methods*. Posterpräsentation: 9<sup>th</sup> World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Lissabon (Portugal)

Kiene, F.E., Eeckmann, L., Thommes, M. (2012) *A Novel Method to Characterize Screw-Elements in Pharmaceutical Twin-Screw-Extrusion*. Posterpräsentation: DPhG Jahrestagung, Greifswald (Deutschland)



# Inhaltsverzeichnis

Vorwort . . . . .	i
Veröffentlichungen . . . . .	iii
Abkürzungsverzeichnis . . . . .	ix
1 Einleitung . . . . .	1
1.1 Die physiologische Wahrnehmung von Geschmack und Geruch . . . . .	1
1.2 Die analytische Erfassung von Geschmack und Geruch . . . . .	4
1.2.1 <i>In vivo</i> Bestimmung . . . . .	4
1.2.2 <i>In vitro</i> Bestimmung . . . . .	5
1.3 Qualitätskriterien pharmazeutischer Hilfsstoffe . . . . .	9
2 Ziele der Arbeit . . . . .	13
3 Ergebnisse und Diskussion . . . . .	15
3.1 Sensorsystem zur Erfassung gelöster Verbindungen . . . . .	15
3.1.1 Einleitung . . . . .	15
3.1.2 Qualitätsattribute von Sensoren mit artifiziellen Lipidmembranen . . . . .	15
3.1.2.1 Überlegungen und elektrochemische Grundlagen . . . . .	15
3.1.2.2 Beschreibung der Sensorsignale - Lineare Regression . . . . .	17
3.1.2.3 Beschreibung der Sensorsignale - Massenwirkungsgesetz . . . . .	19
3.1.2.4 Beschreibung der Sensorsignale - Modifizierte Hill-Gleichung . . . . .	21
3.1.3 Untersuchung von Fleischaromen . . . . .	23
3.1.4 Zusammenfassung . . . . .	26
3.2 Vergleich von Systemen zur Erfassung flüchtiger Verbindungen in Fleischaromen . . . . .	27
3.2.1 Einleitung . . . . .	27
3.2.2 Metall-Oxid-Halbleiter-Feldeffekttransistor - FOX 4000 . . . . .	28
3.2.3 Quarzkristall-Mikrowaage - OdourVector . . . . .	30
3.2.4 Ionen-Mobilität-Spektrometrie - FlavourSpec . . . . .	32
3.2.5 Flash Gaschromatographie - Heracles 2 . . . . .	34
3.2.6 Gaschromatographie - HP 6890 . . . . .	36
3.2.7 Zusammenfassung . . . . .	38
3.3 Erfassung flüchtiger Verbindungen eines Fleischaromas . . . . .	39
3.3.1 Einleitung . . . . .	39

---

3.3.2	Methodenentwicklung . . . . .	39
3.3.2.1	Identifikation von Leitverbindungen und einem internen Standard	39
3.3.2.2	Die Probearbeitung und die Parameter des Probengebers . .	43
3.3.3	Methodenvalidierung . . . . .	47
3.3.4	Zusammenfassung . . . . .	50
3.4	Qualitätsbezogene Veränderungen des Fleischaromas Pork Liver Powder . . . .	51
3.4.1	Einleitung . . . . .	51
3.4.2	Veränderungen des Fleischaromas Pork Liver Powder während der Lagerung	51
3.4.3	Chargenhomogenität des Fleischaromas Pork Liver Powder . . . . .	55
3.4.4	Chargenkonformität des Fleischaromas Pork Liver Powder . . . . .	58
3.4.5	Veränderungen des Fleischaromas Pork Liver Powder durch Feuchtgranulation und Trocknung . . . . .	59
3.4.6	Leitfaden . . . . .	62
3.4.7	Zusammenfassung . . . . .	63
3.5	Einfluss der Zusammensetzung auf die sensorische Wahrnehmung eines Orangenöls	64
3.5.1	Einleitung . . . . .	64
3.5.2	Gaschromatographie . . . . .	65
3.5.2.1	Methodenentwicklung . . . . .	65
3.5.2.2	Methodenvalidierung . . . . .	70
3.5.3	Zusammensetzung natürlicher Orangenöle . . . . .	72
3.5.4	Menschliche Geruchsmessungen . . . . .	74
3.5.5	Zusammenfassung . . . . .	77
4	Zusammenfassung der Arbeit . . . . .	79
5	Summary . . . . .	81
6	Experimenteller Teil . . . . .	83
6.1	Materialien . . . . .	83
6.2	Methoden . . . . .	85
6.2.1	Sensorsystem zur Erfassung gelöster Verbindungen . . . . .	85
6.2.1.1	Probearbeitung . . . . .	85
6.2.1.2	Messmethode . . . . .	85
6.2.1.3	Auswertung . . . . .	86
6.2.1.4	Beschreibung der Signalverläufe . . . . .	86
6.2.2	Vergleich von Sensorsystem zur Erfassung flüchtiger Verbindungen . . .	88
6.2.3	Stabilitätsuntersuchung . . . . .	89
6.2.4	Homogenitätsuntersuchung . . . . .	90
6.2.5	Konformitätsuntersuchung . . . . .	90



---

6.2.6	Granulation und Trocknung von Pork Liver Powder . . . . .	91
6.2.7	Bestimmung des Wassergehaltes eines Pulvers - Karl Fischer Titration .	91
6.2.8	Dynamische Wasserdampfsorption /-desorption . . . . .	92
6.2.9	Gaschromatographie . . . . .	92
6.2.9.1	Gehaltsbestimmung von Pork Liver Powder . . . . .	92
6.2.9.2	Gehaltsbestimmung von Orangenölen . . . . .	94
6.2.9.3	Auswertung . . . . .	97
6.2.10	Probandenstudie mit Orangenölen . . . . .	98
7	Anhang . . . . .	101
7.1	Anhang Methodenentwicklung Pork Liver Powder . . . . .	101
7.1.1	Auswahl einer geeigneten Trennsäule . . . . .	101
7.1.2	Temperaturprogramm und Trägergasfluss des Gaschromatographen . . .	104
7.1.3	Methoden zur Wahl einer Trennsäule . . . . .	105
7.1.3.1	Messungen mit der Trennsäule Optima-5 . . . . .	105
7.1.3.2	Messungen mit den Trennsäulen ZB-624, DB-FFAP und DB624	106
8	Literaturverzeichnis . . . . .	107



# Abkürzungsverzeichnis

<b><sup>1</sup>H-NMR</b>	Protonen-Kernspinresonanzspektroskopie
<b>ABF</b>	<i>Artificial Beef Flavor</i> (Aromastoff aus Schweineleber)
<b>ANOVA</b>	Varianzanalyse (engl. <i>Analysis of Variance</i> )
<b>BG</b>	Bestimmungsgrenze
<b>chemFET</b>	chemisch sensitiver Feldeffekttransistor
<b>CP</b>	leitende Polymere (engl. <i>Conducting Polymers</i> )
<b>Ctr</b>	Centered Scaling, Einstellung der multivariaten Auswertung
<b>Da</b>	Atomare Masseneinheit: Dalton ( $1 \text{ Da} = 1,6607 \cdot 10^{-27} \text{ kg}$ )
<b>DIN</b>	Deutsches Institut für Normung
<b>FD</b>	Filmdicke
<b>GC</b>	Gaschromatograph
<b>HP</b>	Hewlett-Packard
<b>ICH</b>	<i>International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use</i>
<b>ISO</b>	<i>International Organization for Standardization</i>
<b>ID</b>	Innendurchmesser
<b>IMS</b>	Ionenmobilitätsspektroskopie
<b>KI</b>	Konfidenzintervall
<b>MOS</b>	Metalloxidhalbleiter (engl. <i>Metal Oxid Semiconductors</i> )

<b>MOSFET</b>	Metalloxidfeldeffekttransistor (engl. <i>Metal Oxide Semiconductor Field Effect Transistor</i> )
<b>MS</b>	Massenspektrometer
<b>NG</b>	Nachweisgrenze
<b>NIST</b>	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
<b>OG</b>	Obere Bestimmungsgrenze
<b>p</b>	Wahrscheinlichkeitswert
<b>P356</b>	<i>Provesta 356</i> (Aromastoff aus Hefen)
<b>P400</b>	<i>Provesta 400</i> (Aromastoff aus Hefen)
<b>PLP</b>	<i>Spray dried Pork Liver Powder EHT</i> (Aromastoff aus Schweineleber)
<b>PolFET</b>	Feldeffekttransistor mit leitendem Polymeren (engl. <i>Polymeric Field Effect Transistor</i> )
<b>ppb</b>	Teile von einer Milliarde (engl. <i>Parts per Billion</i> )
<b>ppm</b>	Teile von einer Million (engl. <i>Parts per Million</i> )
<b>PTFE</b>	Polytetrafluorethylen
<b>R<sup>2</sup></b>	Bestimmtheitsmaß
<b>r</b>	Signalauflösung
<b>r.F.</b>	relative Luftfeuchte
<b>RIP</b>	Reaktions-Initiations-Signal
<b>RMSEP</b>	Wurzel des mittleren Quadratfehlers der Vorhersage (engl. <i>Root Mean Square Error of Prediction</i> )
<b>RT</b>	Retentionszeit
<b>RSBY</b>	<i>Red Star Basic Yeast</i> (Aromastoff aus Hefen)
<b>Sdp.</b>	Siedepunkt

---

Die verwendeten Bezeichnungen und Warenzeichen müssen nicht frei von gewerblichen Schutzrechten sein. Alle geschützten Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenzeichen, eingetragenen Warenzeichen etc. sind Marken der entsprechenden Firmen, deren Rechte sind zu respektieren. Das Fehlen einer entsprechenden Kennzeichnung bedeutet nicht, dass es sich um einen freien Namen im Sinne der Waren- und Markenzeichengesetzgebung handelt.



# 1 Einleitung

## 1.1 Die physiologische Wahrnehmung von Geschmack und Geruch

Der tägliche Nahrungsgenuss erfolgt nicht nur aus Gründen der Ernährung, sondern auch aufgrund der positiven Empfindung während des Verzehrs, dem Genuss. Die Aufnahme erzeugt bei Säugetieren durch Sehen, Fühlen, Riechen, Schmecken und Hören einen Gesamtsinneseindruck. Anhand dessen kognitiver Interpretation und dem Abgleich mit Erfahrungen entscheidet das Säugetier abschließend über Akzeptanz oder Ablehnung bzw. Gefallen oder Nichtgefallen der Nahrung (Mesulam 1998; Small und Prescott 2005). Die Sinneswahrnehmung während der Nahrungsaufnahme dient dem Schutz des jeweiligen Organismus vor Verdorbenem, Vergiftetem und Ungenießbarem. Das Aroma der Nahrung, welches sich aus Geruch und Geschmack zusammensetzt, hat dabei eine besondere Bedeutung. Diese Begriffe sollen im Folgenden gemäß der Leitlinie ISO-5492 (2008) erläutert werden.

In der Sensorik ist der Begriff Geschmack (engl. *taste*) als die gustatorische Sinneswahrnehmung und der Geruch (engl. *odour*) als die olfaktorische Sinneswahrnehmung definiert. Das Aroma (engl. *flavour*) der Nahrung wird als die Kombination von gustatorischen, olfaktorischen und trigeminalen Reizen definiert, wobei deren Interpretation durch Aussehen, Temperatur, taktile Beschaffenheit und Schmerzen während der Nahrungsaufnahme, von beispielsweise scharfem Essen, beeinflusst werden (ISO-5492 2008).

### Die Geschmackswahrnehmung

Rezeptoren der Geschmackswahrnehmung sind als transmembranäre Strukturen in der Zellmembran von Geschmackszellen lokalisiert, die sich in Geschmacksporen auf Papillen der Zunge, des Nasenrachenraums und des Gaumens befinden. Für die Wahrnehmung der Geschmacksqualitäten süß, sauer, salzig, bitter und umami sind unterschiedliche Rezeptoren verantwortlich. Für die Erfassung der Geschmackswahrnehmung sind unterschiedliche Rezeptoren verantwortlich, die in unterschiedlichen Zellen ausgebildet werden (Pfaffmann 1955; Chandrashekar et al. 2006). Aus der Gruppe der G-Protein gekoppelten Rezeptoren

erfasst der heterodimere Rezeptor T1R1+T1R3 vornehmlich Aminosäuren und damit die Geschmacksrichtung umami (Nelson et al. 2002). Der Rezeptor T1R2+T1R3 erfasst den süßen Geschmack von z.B. Kohlenhydraten (Nelson et al. 2001). Bittere Substanzen wie beispielsweise Chininhydrochlorid werden über einen von 30 G-Protein gekoppelte Rezeptoren aus der Rezeptorgruppe T2R wahrgenommen (Adler et al. 2000). Durch Interaktion von Protonen saurer Verbindungen mit dem Ionenkanal PKD1L3+PKD2L1 werden diese als sauer empfunden (Ishimaru et al. 2006). Als Rezeptoren zur Erfassung von Natrium-Ionen und damit der Geschmacksrichtung salzig werden zwei mögliche Ionenkanalrezeptoren diskutiert, der epitheliale Natriumkanal (ENaC) und der Vanilloid Rezeptor 1 (VR-1) (Kellenberger und Schild 2002; Lyall et al. 2004). In der Literatur wird auch die Wahrnehmung von Fetten und Fettsäuren diskutiert (Mattes 2005; Chalé-Rush et al. 2007). Neuere Studien von Galindo et al. (2012) zeigten, dass der G-Protein gekoppelte Rezeptor GPR120 an der Wahrnehmung von langkettigen Fettsäuren beteiligt ist.

Geschmackszellen sind mit afferenten Nervenzellen durch die Neurotransmitter Serotonin, Noradrenalin und Adenosintriphosphat verbunden (Chaudhari und Roper 2010), die Reize werden über den VII.-, IX.- und X.-Hirnnerv in den *Nucleus tractus solitarii* des Gehirns transportieren, wobei zwei mögliche Übertragungsarten diskutiert werden (Scott und Giza 1990). Die *labeled-line* Theorie proklamiert, dass jedes Neuron nach seiner Aktivierung nur für eine Geschmacksqualität codiert (Hellekant et al. 1998). Im Gegensatz dazu sollen die Geschmacksstimuli bei der *across-neuron-pattern* Theorie in Form eines Signalmusters an die übergeordneten Zentren weitergegeben werden (Pfaffmann 1959). Durch Interpretation der Signale werden dann die Geschmacksqualitäten wahrgenommen (Chen et al. 2011).

Evolutionsbiologisch betrachtet übernehmen Rezeptoren der Gruppe T2R, die bittere Stoffe erfassen, eine Warn- und Schutzfunktion, da giftige Stoffe häufig bitter schmecken. Die Rezeptoren T1R2+T1R3 und T1R1+T1R3 (umami und süß) erzeugen eine Information über den Energiegehalt (Kohlenhydrate und Aminosäuren) der Nahrung, während die Erfassung von Natrium in Regulierung der Wasserhomöostase des Körpers eingreift (Lindemann 1996).

## Die Geruchswahrnehmung

Geruchsaktive Verbindungen sind meist lipophile, organische und leicht flüchtige Moleküle mit einer Molekularmasse von weniger als 300 Da. Sie gelangen über den Atemstrom in die Nase und interagieren mit der im kranialen Bereich der Nasenhöhle gelegenen *Regio olfactoria*, dem Riechepithel, was sich aus olfaktorischen Sinneszellen, Stützzellen und Basalzellen zusammensetzt. Es ist ein von Bowman'schen Drüsen durchsetztes einschichtiges Sinnesepithel, dessen funktionelle Untereinheit das olfaktorische Sinnesneuron ist (Brunn



1892). Der Kern des Sinnesneuron liegt zentral im olfaktorischen Epithel und bildet distal einen Dendriten sowie proximal ein Axon aus. Der Dendrit endet an der Epitheloberfläche in einem Riechkolben, der 10 bis 30 Zilien ausstülpt (Moran et al. 1982). Das proximal austretende Axon führt zu einem *Glomerulum* im *Bulbus olfactorius* des Gehirnes. Eine Besonderheit olfaktorischer Sinneszellen ist zum einen, dass sie als primäre Neuronen einen direkten Kontakt zwischen Gehirn und Außenwelt herstellen und zum anderen, dass sie im Gegensatz zu anderen Neuronen fortlaufend durch Basalzellen erneuert werden (Graziadei 1973; Moran et al. 1982).

Im menschlichen Genom befinden sich ca. tausend Gene für Geruchsrezeptoren, von denen nur 347 beim Menschen aktiv sind und nur eines in jeder Sinneszelle exprimiert wird (Zozulya et al. 2001; Buck und Axel 1991). Geruchsrezeptoren sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren der Klasse A, die in der Zellmembran der vom Riechkolben gebildeten Zilien exprimiert werden. Sie interagieren mit den Geruchsmolekülen und sind somit für den ersten Schritt der Geruchswahrnehmung verantwortlich (Buck und Axel 1991).

Jeder Rezeptor zeigt eine überlappende Selektivität für mehrere flüchtige Verbindungen, sodass mehrere tausend Geruchsmoleküle mit einer begrenzten Anzahl an Rezeptoren erfasst werden können (Krautwurst et al. 1998; Kajiya et al. 2001). Reize von Sinneszellen, die den gleichen Rezeptor ausbilden, werden in einem *Glomerulum* gebündelt und zum übergeordneten *Tractus olfactorius* weitergeleitet (Frisch 1967). Es ergibt sich so ein charakteristisches Aktivierungsprofil für jeden Geruchsstoff, welches im Gehirn einem Sinneseindruck zugeordnet wird (Araneda et al. 2000).

Der Geruchssinn erfasst allerdings nicht nur die Außenwelt orthonasal über die Nasenöffnung, sondern auch retronasal Vorgänge in Mund und Rachen über den Nasenrachenraum (Rozin 1982). Auf diese Weise kann sich der Geschmack einer Nahrung aus Geschmackswahrnehmung auf der Zunge und retronasaler Geruchswahrnehmung bilden (Hornung und Enns 1987). Für die Bewertung des Aromas einer Substanz, die flüchtige Verbindungen enthält oder während des Kauvorgangs im Mundraum freisetzt, ergibt sich somit eine physiologisch bedingte Vermischung beider Sinne (Bojanowski und Hummel 2012).

## 1.2 Die analytische Erfassung von Geschmack und Geruch

### 1.2.1 *In vivo* Bestimmung

Die Bestimmung des Geschmacks und Geruchs eines Stoffes ist von der Spezies des Probandenkollektivs abhängig. Aufgrund der Sprache kann der Mensch im Gegensatz zum Tier eine qualitative und quantitative Information über den empfundenen Sinneseindruck wiedergeben. Daher können mithilfe von menschlichen Probanden komplexe Fragestellungen, wie die separate Bewertung von Geruch und Geschmack, beantwortet werden. Die Qualität und Aussagekraft einer menschlichen sensorischen Analyse ist von der Auswahl der Probanden abhängig. Es wird zwischen normalen Probanden, getesteten Probanden sowie getesteten und trainierte Probanden unterschieden (ISO-8586 2012). Erstere sind freiwillige Personen „von der Straße“, zweite haben vorab beispielsweise ihre Geschmacksunterscheidung oder Geruchsempfindlichkeit unter Beweis gestellt und letztere haben zusätzlich ein Training für z.B. Prüftechniken oder standardisierter Vorgehensweisen erfahren. Die Wahl der Probanden richtet sich dabei nach der Komplexität der Fragestellung (DIN-10959 2012). Generell sollte eine Selektion der Probanden anhand ihrer erfolgen, um solche ausschließen zu können, die nicht den notwendigen Anforderungen, wie beispielsweise Wahrnehmungsgrenzen oder Geruchsdiskriminierung, entsprechen (ISO-8586 2012).

Die Bestimmung von Geruchs- bzw. Geschmacksgrenzen sowie von Unterschieden zwischen Proben werden mit dem forcierten Mehrfachauswahl-Test durchgeführt (ISO-5495 2005; Schiffman et al. 1994). Dieser Test erzeugt eine qualitative Information, da er nach einem Unterschied (z.B. „In welcher Probe nehmen sie einen Geruch nach Erdbeere wahr?“) zwischen Proben fragt. Anhand von aufeinanderfolgenden Versuchen mit unterschiedlichen Proben kann die qualitative in eine quantitative Information umgewandelt werden und so z.B. die Geschmacksgrenze bestimmt werden. Eine direkte quantitative Information über den Geschmack oder Geruch kann anhand eines direkten Vergleiches mehrerer Proben erfolgen. Es kann dabei ein paarweiser Vergleich („Welche Probe ist bitterer?“), eine Einordnung der Proben gemäß einem Attribut („Ordnen sie die vier Proben gemäß ihrer Geruchsintensität.“) oder einer Einordnung der Empfindung anhand einer Skalierung z.B. visuellen Analogskalen oder Piktogrammen („Wie stark bitter schmeckt die Probe?“) erfolgen (Kemp et al. 2009; Green et al. 1996; Borg 1990).

Für das Tier können zwei unterschiedliche Testmethoden angewendet werden, der Akzeptanz-Test und der Präferenz-Test (Smith et al. 1984). Eine separate Bewertung des Geruchs und des Geschmacks ist ohne Behandlung des Tieres, z.B. durch eine

herbeigeführte Anosmie mit Zinksulfat, nicht möglich (Haupt et al. 1978; ISO-5492 2008). Beim Präferenz-Test kann das Tier zwischen zwei oder mehr Proben auswählen. Für den Akzeptanz-Test werden die Proben nacheinander zur Verfügung gestellt (Smith et al. 1984) und die quantitative Aufnahme bestimmt. Die Ergebnisse werden durch die Haltung (Labortier oder Heimtier), die Neuheit der Probe sowie dem Charakter und der Art des ausgewählten Tieres beeinflusst (Carpenter 1956; Griffin et al. 1984).

Die Auswahl einer Methode richtet sich nach der Fragestellung, dem Probandenkollektiv und dem Probenmaterial. Generell gilt, dass die Fragestellung eindeutig sein sollte und der Schulungs- bzw. Trainingsgrad der Probanden der Komplexität der Fragestellung angepasst sein sollte (Kemp et al. 2009).

### 1.2.2 *In vitro* Bestimmung

Unter den Begriffen „elektronische Zunge“ bzw. „elektronische Nase“ wurden in den letzten Jahren Systeme entwickelt, die versuchen, den Vorgang der natürlichen Sinneswahrnehmung von Säugetieren zu imitieren (Röck et al. 2008). Mit einer Sensormatrix partiell selektiver Sensoren sollen sie Flüssigkeiten oder Gasen chemometrische Informationen entnehmen (Gardner und Bartlett 1994). Obwohl es mit analytischen Systemen nicht möglich ist, den Geschmack bzw. den Geruch einer Probe direkt zu messen, wird versucht, mit unterschiedlichen Auswerteverfahren, z.B. einer Hauptkomponentenanalyse, Strukturgleichungsmodellen oder der Fuzzylogik, die Messsignale mit einem Sinneseindruck zu korrelieren. Die erhaltenen Korrelationsmodelle können dann auf andere Proben übertragen werden und sollen deren Sinneseindruck abzuschätzen (Baldwin et al. 2011; Röck et al. 2008). Es ist prinzipiell möglich, mit allen Systemen, die einer Flüssigkeit bzw. einer Gasphase eine chemometrische Information zu entnehmen, eine solche Korrelation aufzustellen. Daher sind die Begriffe „elektronische Zunge“ bzw. „elektronische Nase“ irreführend und sollten in Analogie zu Röck et al. (2008) als „Anwendungsbezogene Sensorsysteme“ definiert werden. In der vorliegenden Arbeit werden daher alle Systeme als „Sensorsysteme zur Erfassung gelöster bzw. flüchtiger Verbindungen“ bezeichnet, es sei denn, ihnen ist ein expliziter Verwendungszweck zuzuschreiben, wie z.B. ein Sensorsystem zur Erfassung von Oxoniumionen als pH-Meter.

### Sensorsysteme zur Erfassung gelöster Verbindungen

Es sind in der Literatur unterschiedliche Sensorsysteme zur Erfassung gelöster Verbindungen mit verschiedenen Funktionsprinzipien beschrieben. Am weitesten verbreitet sind potentiometrische Sensorsysteme, die Unterschiede von Lösungen anhand der Potentialänderung von Elektroden nach Interaktion mit gelösten Verbindungen erfassen (Ciosek und Wróblewski 2007). Diese Sensoren sind empfindlich gegenüber der Adsorption von gelösten Verbindungen und Temperaturänderungen, können jedoch kostengünstig und einfach produziert werden. Darüber hinaus ähneln sie in ihrem Funktionsprinzip dem natürlichen Vorbild und sind hinsichtlich ihrer Funktionsweise detailliert untersucht (Ciosek und Wróblewski 2007). So sind für artifizielle Lipidmembran-Sensoren drei Prinzipien zur Bildung und Änderung des Membranpotentials in Abhängigkeit der molekularen Beschaffenheit der gelösten Moleküle beschrieben: Kationen oder Anionen, Säuren oder Basen sowie Verbindungen mit lipophilen Teilstrukturen (Iiyama et al. 1986; Oohira et al. 1995; Oohira und Toko 1996). Gegenüber ungeladenen Verbindungen, z.B. Glucose und Saccharose, weisen diese Systeme nur eine ungenügende Empfindlichkeit auf (Uchida et al. 2000; Takagi et al. 2001). Eine Variation der Elektrode, der Elektrodenmembran oder der Elektrodenbeschichtung erlaubt eine Anpassung des Systems an die jeweilige Probe (Iiyama et al. 1986; Vlasov et al. 1997).

Ebenfalls potentiometrisch ist das Messprinzip der chemisch sensitiven Feldeffekttransistoren (chemFET). Die Basis der verwendeten Transistoren ist mit einer Membran beschichtet, an der sich in Lösungen ein Membranpotential ausbildet. Änderungen des Membranpotentials durch gelöste Stoffe verändern den Stromfluss im Transistor und werden als Signal erfasst (Lundström et al. 1975).

Eine weitere elektrochemische Methode ist die Voltammetrie. Reduktions- und oxidationsempfindliche Verbindungen werden mithilfe von Arbeits-, Bezugs- und Hilfselektroden erfasst. Bei konstanter oder variierender Spannung kann anhand der aufgezeichneten Stromstärke für Proben ein charakteristisches Muster abgeleitet werden (Simons et al. 1995; Winquist et al. 1997). Durch Wahl unterschiedlicher Elektrodenmaterialien, z.B. leitende Polymere oder durch Verwendung von Enzymen kann die Querselektivität der Sensoren erhöht und die Eignung des Systems für das jeweilige Probenmaterial optimiert werden (Arrieta et al. 2004; Lange und Wittmann 2002).

Riul et al. (2003) beschreiben ein Sensorsystem mit dem Impedanzunterschiede von Lösungen gemessen werden können und leiten daraus eine Information über die Lösung ab. Goodey et al. (2001) stellt die „Geschmacks-Chips“ vor, eine Methode zur optischen Erfassung von Unterschieden in Lösungen. Stationär gebundene Reaktanden reagieren

mit gelösten Molekülen und ändern ihre optischen Eigenschaften. Die Absorptions- bzw. Fluoreszenzänderung wird erfasst und spezifische Informationen abgeleitet (Christodoulides et al. 2002). Von Malmendal et al. (2011) wurde eine „magnetische Zunge“ entwickelt, welche mithilfe von  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie die Zusammensetzung einer Probe, z.B. Tomatensoße, erfasst und die gewonnenen Information mit menschlichen Geschmackseindrücken korreliert.

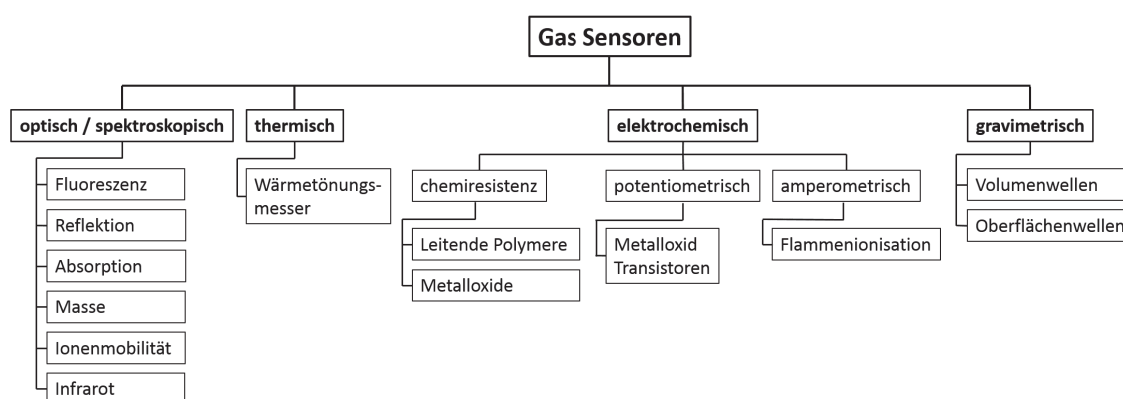
Das Prinzip der Erfassung mittels Schwingkristallen (Quarzkristall-Mikrowaagen) wird sowohl von Sensorsystemen zur Erfassung gelöster Verbindungen als auch von Sensorsystemen zur Erfassung flüchtiger Verbindungen genutzt (Wohltjen und Dessy 1979; Yuwono et al. 2003). Nach Anlegen eines Potentials an piezoelektrischen Materialien, z.B. Quarz- oder  $\text{LiNbO}_3$ -Kristallen, schwingen diese mit einer charakteristischen Frequenz, wobei die Schwingung entweder durch das gesamte Material hindurchgeht (akustische Volumenwellen) oder nur an der Oberfläche (akustische Oberflächenwellen) entlangläuft (Venema et al. 1986; Bing-Sheng et al. 1997). Die Massenänderung nach Anlagerung von Verbindungen erzeugt eine Frequenzänderung, die als Signal erfasst wird und im linearen Zusammenhang mit der Massenänderung steht (Sauerbrey 1959). Werden unterschiedliche Beschichtungsmaterialien genutzt, ergibt sich für ein Gemisch flüchtiger bzw. gelöster Verbindungen ein charakteristisches Signalmuster (Haas et al. 2008).

Sensorsysteme zur Erfassung gelöster Verbindungen werden unter anderem in der Qualitätskontrolle von Lebensmitteln, in der Umweltanalytik und zur Geschmacksmaskierung von z.B. pharmazeutischer Darreichungsformen eingesetzt (Vlasov et al. 1997; Eckert et al. 2011; Woertz et al. 2011). Die Einsatzgebiete sind vielschichtig und vom Funktionsprinzip unabhängig (Legin et al. 2004). In der vorliegenden Arbeit wird ein System verwendet, welches mit sieben artifiziellen Lipidmembranen Lösungen vermisst.

### **Sensorsysteme zur Erfassung flüchtiger Verbindungen**

Systeme zur Erfassung flüchtiger Verbindungen nutzen einen Teil der Gasphase über der Probe und geben diesen entweder direkt auf die Sensoren des Systems oder trennen ihn mit unterschiedlichen Methoden, z.B. Gaschromatographie oder Thermodesorption, bevor sie das Eluat mit einem oder mehreren Sensoren erfassen (Williams et al. 2005). Eine Unterteilung der Sensoren anhand ihrer Funktionsprinzipien ist möglich (Abbildung 1.1).

Wie auch bei den Sensorsystemen zur Erfassung gelöster Verbindungen können optisch aktive Verbindungen (z.B. Metalloporphyrine) auf Oberflächen aufgebracht werden. Diese interagieren mit dem vorbeiströmenden Gas und erfahren in Abhängigkeit der gasförmigen Probe eine Absorptions- bzw. Fluoreszenzänderung. Durch Verwendung unterschiedlicher optisch aktiver Verbindungen an unterschiedlichen Positionen einer Trägerplatte wird ein charakteristisches Farbmuster für das jeweilige Gas in Abhängigkeit von seiner Konzentration



**Abbildung 1.1:** Funktionsprinzip der Sensoren von Systemen zur Erfassung flüchtiger Verbindungen. Abgeändert nach James et al. (2005).

erzeugt (Suslick 2004). Die Verwendung anderer spektroskopischer Sensoren, wie der Massenspektrometrie, Infrarotspektroskopie oder der Ionenmobilitätsspektroskopie (siehe Abschnitt 3.2.4), erzeugen allein und in Kombination mit einer Trennmethode eine strukturelle Information über die Probe (van Kempen et al. 2002; Creaser et al. 2004). In den meisten Fällen werden diese Systeme, wie auch der Flammenionisationsdetektor, mit gaschromatographischen Systemen kombiniert. Das direkte Einbringen der Probe in das jeweilige System erzeugt, z.B. bei der Massenspektrometrie, ein charakteristisches Masse-Ladungs-Muster, welches multivariat ausgewertet werden kann (Röck et al. 2008).

Wärmestrommessung finden ihren Einsatz weniger in der Messung von Gerüchen als vielmehr bei der Detektion von explosiven und brennbaren Gasen. Sie nehmen daher im Gebiet der Sensorsysteme zur Erfassung flüchtiger Verbindungen nur eine Randposition ein. Bei diesem Messprinzip wird die Temperaturdifferenz einer reaktiven Zersetzung an zwei Heizelementen mit unterschiedlicher Beschichtung ermittelt. Als Maß für die Menge der frei werdenden Energie erzeugt die Temperaturdifferenz eine spezifische Information über das jeweilige Gas bzw. Gasgemisch (Krebs und Grisel 1993). Der hohe Energieverbrauch dieser Systeme ist als ihr größter Nachteil anzusehen (James et al. 2005).

Zu den am häufigsten verwendeten Sensoren in Sensorsystemen zur Erfassung flüchtiger Verbindungen gehören Metalloxid-Sensoren (engl. *Metal Oxid Semiconductors*; MOS) und Sensoren mit leitenden synthetischen Polymeren (engl. *Conducting Polymers*; CP). Bei diesen System wird die Leitfähigkeitsänderung der Sensoren vor und nach Kontakt mit einer Probe gemessen (Seiyama et al. 1962). Der Mechanismus der Leitfähigkeitsänderung von leitenden synthetischen Polymeren ist noch nicht vollständig aufgeklärt, es werden aber unterschiedliche Theorien diskutiert (Blackwood und Josowicz 1991; Slater et al. 1992). Diese Polymere können bei Raumtemperatur relativ sensitiv (0.1 ppm - 100 ppm) viele flüchtige Verbindungen erfassen, zeigen jedoch eine starke Abhängigkeit von der

Luftfeuchtigkeit sowie eine Signalveränderung aufgrund von oxidativen Vorgängen im Polymer über die Verwendungsdauer (James et al. 2005). Die Leitfähigkeitsänderung von Metalloxidhalbleitern beruht auf charakteristischen oxidativen und reduktiven Vorgängen an der Oberfläche des auf 300 °C - 500 °C erhitzten Metalloxids (Maekawa et al. 2001). Der hohe Energieverbrauch zum Temperieren dieser Sensoren führt derzeit zur Entwicklung kleiner und temperaturunabhängiger Sensoren (James et al. 2005).

Die Kombination von Feldeffekttransistoren mit Metalloxiden (engl. *Metal Oxide Semiconductor Field Effect Transistor*, MOSFET) oder leitenden Polymeren (engl. *Polymeric Field Effect Transistor*, PolFET) schuf eine neue Gruppe von Sensoren (Lundström et al. 1975). Der Kontakt von Gasen mit dem Metalloxid oder dem leitenden Polymer verändert aufgrund einer Leitfähigkeitsänderung den Stromfluss im Transistor, der als Signal erfasst wird.

Die Wahl des jeweiligen Sensorsystems und dem zugrundeliegenden Funktionsprinzip richten sich nach Verwendungszweck und den zu generierenden Informationen. Fünf ausgewählte Systeme werden in Abschnitt 3.2 hinsichtlich einer gezielten Fragestellung untersucht.

### 1.3 Qualitätskriterien pharmazeutischer Hilfsstoffe

In Arzneizubereitungen sind neben dem Wirkstoff auch pharmazeutische Hilfsstoffe enthalten. Diese werden zur Erfüllung pharmazeutisch-technologischer und biopharmazeutischer Anforderungen zugesetzt und haben den pharmazeutisch-regulatorischen Vorgaben zu entsprechen (EMA 2007, 1998; Ph.Eur. 2014). Einige Hilfsstoffe bewahren den Zustand des Arzneimittels, z.B. Antioxidantien und Konservierungsmittel, während andere das Verhalten der Arzneiform im und am Körper verändern, beispielsweise Überzüge oder Salbengrundlagen. Ebenso können Hilfsstoffe für den Herstellungsprozess notwendig sein, z.B. Füllstoffe oder Lösungsmittel, oder die Akzeptanz der Arzneiform gegenüber dem Patienten steigern wie beispielsweise Geruchsstoffe, Geschmacksstoffe oder Farbstoffe (Kalász und Antal 2006). Außerdem werden einige Hilfsstoffe, wie Glucose, auch als Wirkstoffe eingesetzt (Robertson 1999).

#### **Regulatorische Anforderungen an orale Darreichungsformen**

Generell muss für das Arzneimittel und damit auch für eingesetzte Hilfsstoffe die Unbedenklichkeit und Qualität gegeben sein (AMG 2014). Die Qualität beschreibt, in welchem Maß die Eigenschaften und Charakteristiken eines Produktes den gestellten Anforderungen entsprechen (ISO-9000 2008). Daher sind für die eingesetzten Hilfsstoffe und

Wirkstoffe generelle, z.B. Dichte und Gutfeuchte, und funktionsbezogene Qualitätsattribute, z.B. Farbe, Geruch und Sprengkraft, zu definieren (ICH-Q8 2009). Für das entwickelte Arzneimittel ergeben sich in Abhängigkeit der verwendeten Hilfsstoffe und Wirkstoffe kritische qualitätsbestimmende Attribute. Dies sind physikalische, chemische, biologische oder mikrobiologische Größen, die zur Sicherstellung der Qualität der Arzneiform innerhalb definierter Grenzen, beispielsweise Zerfallszeit, Gehalt oder Wirkstofffreisetzung, eingehalten werden müssen (ICH-Q8 2009). Sie werden für jedes Arzneimittel unter Berücksichtigung des Einsatzgebietes und des Patientenkollektivs festgelegt.

Für eine hohe Compliance und dem damit verbundenen Erfolg der Arzneimitteltherapie ist die Akzeptanz des Arzneimittels wichtig. Dies gilt besonders für Tiere und spezielle Patientengruppen wie Kinder und alte Menschen, die hinsichtlich der Arzneimittelaufnahme Limitationen unterworfen sind (Breitkreutz und Boos 2007). Damit sind die akzeptanzbestimmenden Eigenschaften, z.B. Farbe, Form, Textur, Geschmack oder Geruch, des Arzneimittels, welche die Palatabilität bestimmen, als kritische Qualitätsattribute anzusehen (EMA 2013). Palatabilität beschreibt die Qualität eines Produktes, welche dessen Aufnahme als angenehm gestaltet (ISO-5492 2008).

Für Hilfsstoffe bzw. Aromastoffe, die den Geschmack bzw. Geruch eines Arzneimittels beeinflussen, wird in aktuellen Richtlinien gefordert, die „generelle Zusammensetzung der Aromen qualitativ“ zu beschreiben (EMA 1998, 2007). In neueren regulatorischen Richtlinien finden sich jedoch Hinweise, dass neben der qualitativen auch eine quantitative Erfassung der organoleptisch prägnanten Stoffe erfolgen soll (EMA 2013). Während für objektiv messbare Größen, wie Farbe, Gehalt und Zerfallszeit, monographierte analytische Verfahren vorhanden sind, ist die Erfassung subjektiver Größen, wie beispielsweise Geschmack, Geruch und Mundgefühl, nicht oder nur eingeschränkt regulatorisch geregelt (Ph.Eur. 2014; Grosch 2001; Pein et al. 2014). Um den zunehmenden Anforderungen der Behörden nachzukommen, ist es wichtig, validierte analytische Verfahren zu entwickeln, um auch diese subjektiven Größen charakterisieren zu können.

### **Aromastoffe in oralen Darreichungsformen für den Hund**

Noch stärker als der Mensch, akzeptiert das Tier nur solche Arzneimittel, deren Sinneseindruck dem der gewohnten Nahrung entspricht oder mit einer positiven Erfahrung bzw. Empfindung verbunden ist. Unter Berücksichtigung der Tierart (in dieser Arbeit dem Haushund) können Geschmacksstoffe in Analogie zu natürlichen Nahrungsquellen identifiziert werden (Ahmed und Kasraian 2002). Der Haushund (lat. *Canis lupus familiaris*) entwickelte sich zwischen 15.000 und 100.000 v. Chr. durch Domestizierung des Wolfes (lat. *Canis lupus*). Als Säugetier (lat. *Mammalia*) ist er der Ordnung der Raubtiere (lat. *Carnivora*) zuzuordnen.



Unabhängig von dem allgemeinen Drang des Haushundes zur Nahrungsaufnahme, favorisiert der Haushund Fleisch und fleischartige Produkte. Aromastoffe, für die eine hohe Palatabilität des Hundes gezeigt werden konnte, sind Fleisch, Leber, Knoblauch, Gebäck und Hefe. (Bradshaw 1991).

Die orale Applikation von Arzneimitteln stellt beim Hund aufgrund seiner häufigen Verweigerung eine Herausforderung dar. Eine erfolgreiche Aufnahme kann mittels Zwang, z.B. Platzieren der Arzneiform im hinteren Mundbereich und Verschluss des Maules, oder Täuschung, z.B. Umhüllen der Arzneiform mit Lockstoffen (z.B. Wurst, Käse oder Butter), erfolgen (Tiwari et al. 2014). Da dies jedoch mit einem erhöhten Aufwand seitens des Tierhalters bzw. Tierarztes verbunden ist und häufig nicht zum gewünschten Ziel führt, werden bei der Herstellung oraler Arzneimittel Aromastoffe als Hilfsstoffe hinzugefügt (Thombre 2004). Courbet et al. (2008) konnten zeigen, dass die Palatabilität von Praziquantel-haltigen Tabletten nach Zusatz eines Fleischaromas aus sprühgetrockneter Schweineleber gesteigert werden konnte.

Die Auswahl der Aromastoffe ist dabei neben ihrer Akzeptanz auch von den rechtlichen Bestimmungen der Marktländer, der Stabilität, den Kosten und der Verfügbarkeit abhängig. Darüber hinaus erhöht die Verwendung von Aromastoffen die Anforderungen im Rahmen des Zulassungsprozesses und der anschließenden Herstellung (Ahmed und Kasraian 2002; EMA 1998; Robertson 1999). Qualitätsrelevante Informationen über den Sinneseindruck von Aromastoffen bzw. Arzneimitteln können am zuverlässigsten anhand von Probandenstudien gewonnen werden (Pein et al. 2014). Diese sind jedoch zeit- und kostenintensiv sowie aufgrund von z.B. toxikologischen Bedenken nicht immer durchführbar. Im Gegensatz zu Humanstudien ist der Wissensgewinn von Tierstudien deutlich eingeschränkter, da konkrete sensorische Unterschiede von Proben qualitativ nicht vom Tier zum Ausdruck gebracht werden können (Smith et al. 1984). Dies begrenzt auch den Einsatz analytischer Verfahren, wie z.B. die von Song et al. (2013) und Byrne et al. (2002) beschriebenen Verfahren zur Erfassung des Fleischgeruches, da diese olfaktorische Informationen zur Bewertung von gemessenen Unterschieden berücksichtigen müssen. Da allerdings die meisten für Menschen konzipierten analytischen Verfahren, wie z.B. die von Grosch (2001) beschriebene Verdünnungstechnik, für Tiere nicht anwendbar sind, müssen andere entwickelt werden. Darüber hinaus ist bei jeder Studie mit Einbeziehung von Tieren das Tierschutzgesetz einzuhalten und unter anderem die ethische Vertretbarkeit des Versuches nachzuweisen. Ob diese in einer routinemäßigen Qualitätskontrolle von hergestellten Arzneimitteln genehmigungsfähig sind, ist aufgrund des hohen Bedarfes an Tieren fraglich. Es besteht daher ein dringender Bedarf an analytischen Verfahren, mit denen veterinärmedizinische Aromastoffe hinsichtlich ihrer Qualität beschrieben und so zur

Erfüllung pharmazeutisch-regulatorischer Anforderungen genutzt werden können.

## 2 Ziele der Arbeit

Geruch und Geschmack akzeptanzsteigernder pharmazeutischer Aromastoffe sind aus regulatorischer Sicht als kritische Qualitätsattribute einzustufen und müssen in der Qualitätskontrolle überprüft werden. Da es sich bei diesen Attributen um subjektive Empfindungen handelt, stellt die Entwicklung valider analytischer Verfahren zur Charakterisierung von sensorisch aktiven Hilfsstoffen eine Herausforderung dar.

In der vorliegenden Arbeit sollte ein analytisches Verfahren zur Erfassung und Bewertung von gustatorisch und olfaktorisch aktiven pharmazeutischen Hilfsstoffen entwickelt werden. Dieses sollte in der Qualitätskontrolle, gemäß den regulatorischen Vorgaben, Geruch und Geschmack pharmazeutischer Aromastoffe erfassen.

Als Modell wurden Fleischaromen ausgewählt, welche in oralen Darreichungsformen für Hunde eingesetzt werden. Es handelt sich dabei um Vielstoffgemische über deren Zusammensetzung unzureichende Informationen vorhanden sind, weshalb sich die Qualitätskontrolle schwierig gestaltet.

Kommerziell verfügbare Systeme zur Erfassung gelöster oder flüchtiger Verbindungen basieren auf verschiedenen Funktionsprinzipien und stellen Messwerte unterschiedlich dar. In einem ersten Schritt sollten diese Systeme hinsichtlich ihrer Anwendbarkeit und ihrer Limitationen systematisch untersucht und beurteilt werden. Anhand der Ergebnisse sollte ein System zur detaillierten Untersuchung eines Modellaromas ausgewählt werden.

Für den Einsatz in der Qualitätskontrolle muss das Fleischaroma valide erfasst werden können, weshalb im folgenden Schritt eine umfassend verwendbare Methode entwickelt und validiert werden sollte. Mit dieser sollten qualitätsrelevante Größen des Fleischaromas für eine Bewertung identifiziert und abgeleitet werden, sodass dieses als Ausgangsmaterial, während der Verarbeitung sowie in der finalen Arzneiform bewertet werden kann.

Für eine Qualitätsbewertung und zur Festlegung von Spezifikationen war eine Korrelation von *in vitro* Daten der analytischen Verfahren mit *in vivo* Daten von Tierstudien notwendig. Dazu sollten sensorische Tierstudien durchgeführt werden. Anhand der Ergebnisse war eine Bewertung des entwickelten Verfahrens für den Einsatz in der Qualitätskontrolle zu treffen.

Neben der Anwendung am Tier sollte auch die Anwendbarkeit des Verfahrens auf Aromastoffe in humanen Arzneimitteln geprüft werden. Dazu sollte das entwickelte Verfahren in einem abschließendem Schritt auf einen solches übertragen werden.



## 3 Ergebnisse und Diskussion

### 3.1 Sensorsystem zur Erfassung gelöster Verbindungen

#### 3.1.1 Einleitung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Eignung von Sensorsystemen als Werkzeug der Qualitätskontrolle von Fleischaromen, die in oralen pharmazeutischen Darreichungsformen für Hunde verwendet werden, geprüft. Es wurden fünf Fleischaromen unterschiedlicher Herkunft verwendet: *Spray dried Pork Liver Powder EHT* (Aromastoff aus Schweineleber) (PLP) und *Artificial Beef Flavor* (Aromastoff aus Schweineleber) (ABF), gewonnen aus Schweinelebern, sowie *Provesta 356* (Aromastoff aus Hefen) (P356), *Provesta 400* (Aromastoff aus Hefen) (P400) und *Red Star Basic Yeast* (Aromastoff aus Hefen) (RSBY), die aus Hefen gewonnen werden.

In diesem Kapitel wird zunächst ein System zur Erfassung gelöster Verbindungen behandelt. Anhand mathematischer Modelle sollte die Qualität verwendeter Sensoren bewertet und im Anschluss die Eignung des Sensorsystems zur Qualitätskontrolle von Fleischaromen untersucht werden.

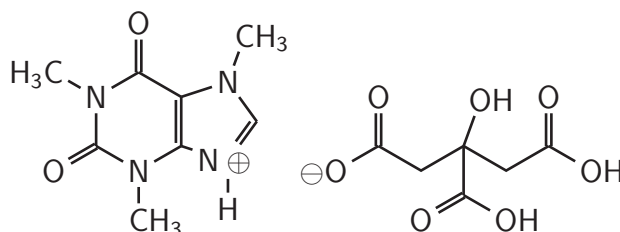
Zu Beginn der Arbeit waren zwei Sensorsysteme für diese Zielsetzung kommerziell verfügbar. Zum einen die mit chemFET Sensoren ausgestattete  $\alpha$ Astree von AlphaM.O.S. und zum anderen die mit artifiziellen Lipidmembransensoren bestückten Systeme TS-5000Z und SA402B von Insent. Im Gegensatz zur  $\alpha$ Astree wurde in vorausgehenden Arbeiten das System von Insent bereits qualifiziert (*Performance Qualification*) und validiert (Woertz et al. 2010), weshalb es für die vorliegende Arbeit verwendet.

#### 3.1.2 Qualitätsattribute von Sensoren mit artifiziellen Lipidmembranen

##### 3.1.2.1 Überlegungen und elektrochemische Grundlagen

Sensoren mit artifiziellen Lipidmembranen verändern sich über den Verwendungszeitraum und Sensoren verschiedener Chargen zeigen zudem unterschiedliche Signale für Lösungen identischer Zusammensetzung. Molekulare Veränderungen durch Einlagerung oder Austausch

von Verbindungen während der Verwendungsdauer sowie herstellungsbedingte Schwankungen wurden als Ursachen für beobachtete Signalunterschiede vom Hersteller benannt. Es ist davon auszugehen, dass diese Veränderungen der artifiziellen Lipidmembran die Empfindlichkeit, den Signalbereich und den Erfassungsbereich der Sensoren gegenüber gelösten Verbindungen beeinflussen und somit die Empfindlichkeit der Sensoren mindern. Für eine valide Qualitätskontrolle ist es jedoch unabdingbar, die Varianz zwischen Messungen zu kennen und Sensoren konstanter Qualität zu verwenden. Zur Bewertung der Qualität der Sensoren definierte der Hersteller einen Akzeptanzbereich (Tabelle 6.6 in Kapitel 6.2 Methoden), für den keine wissenschaftliche Rechtfertigung gefunden werden konnte (Insent 2008). Von Oohira und Toko (1996) wurde ein Versuch unternommen, die Potentialänderung an der artifiziellen Lipidmembran der Sensoren auf Basis der Änderung der freien Gibb'schen Energie der Membranmoleküle zu beschreiben und so Änderungen über die Verwendungsdauer zu erfassen. Obwohl der Ansatz vielversprechend war, konnte daraus kein allgemeingültiges Modell abgeleitet werden.

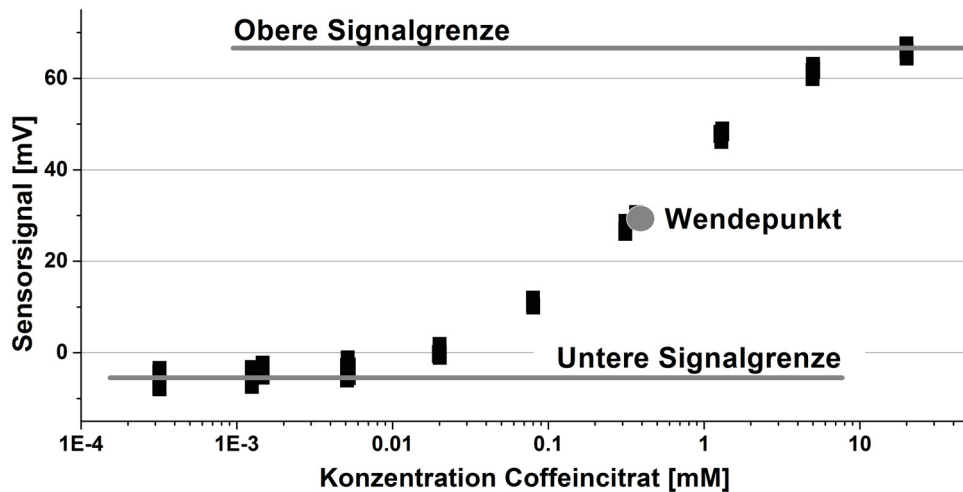


**Strukturformel 3.1:** Coffeincitrat.

Für eine objektive und einfache Qualitätsbewertung sollten die konzentrationsabhängigen Sensorsignale mit mathematischen Modellen beschrieben werden. Als Qualitätsparameter wurden die Empfindlichkeit und der Erfassungsbereich aus den entwickelten Modellen abgeleitet. Coffeincitrat (Strukturformel 3.1) wurde als Modellsubstanz ausgewählt, da es aufgrund seiner Molekülstruktur auf unterschiedliche Weise als Kation bzw. Anion, Säure bzw. Base und mit lipophilen Teilstrukturen von der artifiziellen Lipidmembran erfasst werden kann (Iiyama et al. 1986; Oohira et al. 1995; Oohira und Toko 1996).

Für die Entwicklung der Modelle wurde angenommen, dass:

1. die Sensorsignale konzentrationsabhängig sind,
2. die Sensorsignale in halblogarithmischer Auftragung einen sigmoidalen Verlauf zeigen,
3. nur eine Stoff zusätzlich zu Wasser in der wässrigen Messlösung enthalten ist.



**Abbildung 3.1:** Signale des Sensors SB2AAE für unterschiedliche Konzentrationen Coffeincitrat ( $n = 3$ ), sowie die angenommenen Signalgrenzen und ein exemplarisch aufgezeigter Wendepunkt.

Gemäß dieser Annahmen ergab sich der in Abbildung 3.1 gezeigte sigmoidaler Signalverlauf, welcher eine obere und eine untere Signalgrenze sowie ein Wendepunkt zeigt.

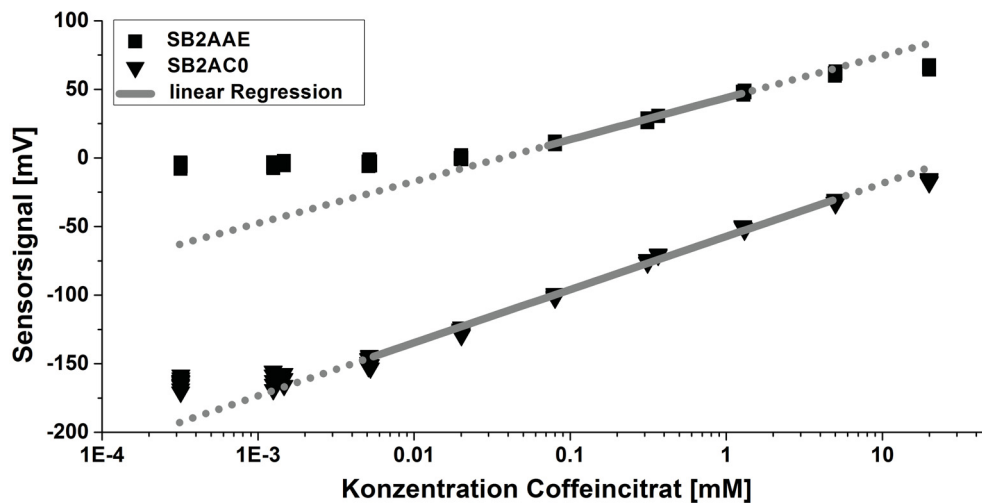
Abschließend sollten die entwickelten mathematischen Modelle zur Beurteilung von Qualitätsattributen zweier Sensorsets genutzt werden. Das Sensorset 1 war über 17 Monate in 38 Messungen genutzt worden, während das Sensorset 2 unbenutzt war.

### 3.1.2.2 Beschreibung der Sensorsignale - Lineare Regression

Die am weitesten verbreitete Methode zur Beschreibung und Auswertung konzentrationsabhängiger Signale von Sensorsystem zur Erfassung gelöster Verbindungen ist die lineare Regression (Woertz et al. 2010; Pein et al. 2013). Auf Basis der Nernst-Gleichung (Gleichung 3.1) wird ein log-linearer Zusammenhang zwischen der Konzentration des Analyten und dem Signal des Sensors angenommen (Nernst 1908). Je breiter der lineare Konzentrationsbereich und je höher der Betrag der Steigung, desto besser ist der Sensor in der täglichen Routine einsetzbar.

$$U_{Membran} = U_{Membran}^0 + \frac{RT}{z_e F} \ln \left( \frac{a_{LH}}{a_{L-}} \right) \quad (3.1)$$

$U_{Membran}$	= Potential der Membran [V]
$U_{Membran}^0$	= Normalpotential der Membran [V]
$R$	= Gaskonstante [ $8,314 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ ]
$T$	= absolute Temperatur [K]
$F$	= Faraday-Konstante [ $96487 \text{ C} \cdot \text{K}^{-1}$ ]
$z_e$	= Anzahl Elektronen pro Umsetzung
$a_X$	= Aktivität der Reaktionspartner



**Abbildung 3.2:** Signale der Sensoren SB2AAE und SB2AC0 des Sensorset 1 für unterschiedliche Konzentrationen Coffeincitrat sowie der Bereich in dem die errechnete lineare Regression gültig ist ( $n = 3$ ).

Die Signale aller Sensoren, mit Ausnahme des Sensors SB2CT0 des Sensorsets 1, konnten mit der linearen Regression beschrieben werden, jedoch konnte nur ein Ausschnitt des gesamten Konzentrationsbereiches erfasst werden. Der nicht verwendbare Sensor detektierte bei niedrigen Konzentrationen einen Anstieg, jedoch bei hohen Konzentrationen einen Abfall. Damit entsprach er nicht den vorangestellten Annahmen.

Der anwendbare Konzentrationsbereich und die errechnete Steigung der linearen Regression waren zwischen den Sensoren verschieden (Abbildung 3.2), wie auch zwischen gleichen Sensoren unterschiedlicher Sensorsets (Tabelle 3.1). So war die Steigung der Sensoren SB2AAE, SB2CA0, SB2AE1 und SB2AC0 signifikant ( $p < 0,05$ ) unterschiedlich zwischen den Sensorsets.

In der logarithmischen Skalierung beschrieben die Sensoren SB2AC0 und SB2AN0 den größten und die Sensoren SB2AAE und SB2CT0 den kleinsten Konzentrationsbereich. Der Vergleich der beiden Sensorsets zeigte, dass drei Sensoren (SB2AAE, SB2CA0 und SB2AN0) des Sensorset 2 einen größeren Konzentrationsbereich erfassen als die gleichen Sensoren von Sensorset 1.

Die Empfindlichkeit der Sensoren gegenüber Coffeincitrat konnte anhand der Steigung beurteilt werden. Die Sensoren SB2AC0 und SB2AN0 wiesen den höchsten Betrag für die Steigung auf und waren somit am empfindlichsten für Coffeincitrat. Der Betrag der errechneten Steigungen war, mit Ausnahme des Sensors SB2CA0, für Sensoren des Sensorset 2 höher als für gleiche Sensoren des Sensorset 1 (Tabelle 3.1).

Die lineare Regression ist eine einfache und gut nachvollziehbare Methode, die konzentrationsabhängigen Signale dieses Sensorsystems zu beschreiben. Nachteilig zu



**Tabelle 3.1:** Konzentrationsbereiche der untersuchten Sensoren für die eine log-lineare Korrelation von dem Sensorsignal und Coffeincitrat Konzentration mittels linearer Regression gezeigt werden konnte ( $n = 3$ , Mittelwert, Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung).

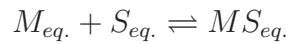
Sensor	Sensorset 1			Sensorset 2		
	untere Grenze [mM]	obere Grenze [mM]	Steigung [mV/mM]	untere Grenze [mM]	obere Grenze [mM]	Steigung [mV/mM]
SB2AAE	0,08	1,31	$30,5 \pm 0,3$	0,08	5,03	$32,5 \pm 0,4$
SB2CT0	—	—	—	0,31	20,00	$-28,1 \pm 2,0$
SB2CA0	0,08	5,03	$37,1 \pm 0,1$	0,08	20,00	$36,3 \pm 0,3$
SB2AE1	0,31	20,00	$-29,5 \pm 0,6$	0,31	20,00	$-31,8 \pm 0,3$
SB2AC0	0,01	5,03	$40,0 \pm 1,0$	0,01	5,03	$43,3 \pm 1,4$
SB2AN0	0,02	5,03	$39,4 \pm 0,1$	0,01	20,00	$40,0 \pm 0,6$

bewerten ist, dass sie nicht über den gesamten Konzentrationsbereich anwendbar war und so vor allem niedrige Konzentrationen nicht erfasst wurden. Für das weniger benutzte Sensorset 2 war die lineare Regression auf einen breiteren Konzentrationsbereich anwendbar und die Steigung der meisten Sensoren größer. Dies deutete auf eine bessere Empfindlichkeit der Sensoren gegenüber der verwendeten Substanz hin. Beide Größen konnten somit zur Beurteilung der Qualität und zur Bewertung von Veränderungen über die Nutzung herangezogen werden. Mit vermehrtem Gebrauch der Sensoren verschlechterte sich die Empfindlichkeit dieser gegenüber einer Substanz und der Betrag der Steigung wurde geringer. Gleichzeitig wurde auch der anwendbare Konzentrationsbereich eingengt und der Erfassungsbereich verkleinert.

### 3.1.2.3 Beschreibung der Sensorsignale - Massenwirkungsgesetz

Da die lineare Regression nicht auf den gesamten Konzentrationsbereich anwendbar war, sollte ein mathematisches Modell entwickelt werden, mit dem dies möglich ist. Es wurde daher versucht, die Sensorsignale, basierend auf den vorherrschenden elektrochemischen Vorgängen an der artifiziellen Lipidmembran der Sensoren, zu beschreiben. Für die Erstellung des Modells wurde basierend auf den Arbeiten der Arbeitsgruppe von Toko (Iiyama et al. 1986; Oohira et al. 1995; Oohira und Toko 1996) eine stöchiometrische Interaktion von Molekülen der Lösung (z.B. Coffein oder Citrat) mit Molekülen der Membran angenommen. Basierend auf der Gleichgewichtsreaktion (Reaktionsgleichung 3.1) von Molekülen in Lösung ( $S_{eq.}$ ) mit Reaktionspartnern an der Membran ( $M_{eq.}$ ) zu einem Komplex ( $MS_{eq.}$ ), wurde die dazugehörige Gleichung des Massenwirkungsgesetzes (Gleichung 3.2) gebildet.

Durch iterative Anpassung der Gleichgewichtskonstanten ( $k$ ) konnte die Konzentration des Membran-Substanz-Komplexes ( $[MS_{eq.}]$ ) in Abhängigkeit der Konzentration gelöster



**Reaktionsgleichung 3.1:** Gleichgewichtsreaktion eines gelösten Moleküles ( $S_{eq.}$ ) mit Reaktionspartnern ( $M_{eq.}$ ) an der Lipidmembran zu einem Membran-Substanz-Komplex ( $MS_{eq.}$ ).

Verbindungen ( $[S_{eq.}]$ ) errechnet werden. Dies war möglich, da die Konzentration der gelösten Verbindung ( $[S_{st.}]$ ) vor Interaktion mit der Membran bekannt war und die Anzahl der für die Interaktion zur Verfügung stehenden Interaktionspartner an der Membran ( $[M_{st.}]$ ) als konstant angenommen wurde (Gleichung 3.3/ 3.4).

$$k = \frac{[MS_{eq.}]}{[M_{eq.}] \cdot [S_{eq.}]} \quad (3.2)$$

$$k = \frac{[MS_{eq.}]}{([M_{st.}] - [MS_{eq.}]) \cdot ([S_{st.}] - [MS_{eq.}])} \quad (3.3)$$

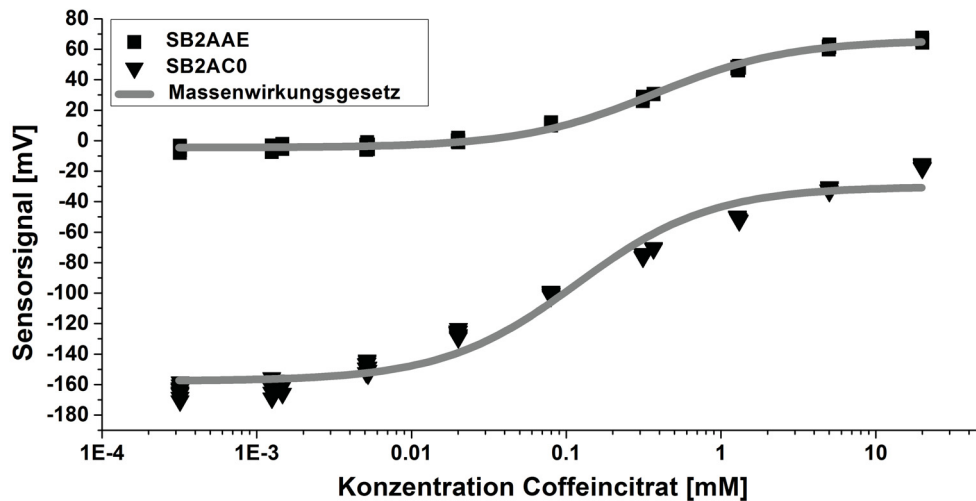
$$[MS_{eq.}] = \frac{k \cdot [S_{st.}] + k \cdot [M_{st.}] + 1 \pm \sqrt{(k \cdot [S_{st.}] + k \cdot [M_{st.}] + 1)^2 - 4k^2 \cdot [S_{st.}][M_{st.}]}}{2k} \quad (3.4)$$

Über das Verhältnis von belegten zu freien Bindungsstellen konnte das Membranpotential errechnet werden (Gleichung 3.5). Dazu wurden zwei theoretische Potentiale, je eine Signalgrenze bei niedriger und hoher Konzentration (siehe Abbildung 3.1), angenommen. Diese wurden entweder von der freien ( $U_M$ ) oder der vollständig belegten Membran ( $U_S$ ) gebildet.

$$U_{Sensor} = U_M - (U_M - U_S) \cdot \frac{[MS_{eq.}]}{[M_{st.}]} \quad (3.5)$$

Bei der Auswertung der ersten Ergebnisse zeigte sich, dass diese Methode nicht für alle Sensoren anwendbar war. Während der Signalverlauf einiger Sensoren, z.B. SB2AAE vollständig beschrieben werden konnte, war der Signalverlauf von anderen Sensoren, z.B. SB2AC0, nicht über den gesamten Konzentrationsverlauf möglich (Abbildung 3.3). Dieses Phänomen war zu beobachten, wenn der Potentialsprung zwischen oberer und unterer Signalgrenze über einen Konzentrationsbereich von vier oder mehr Zehnerpotenzen erfolgte.

Mathematisch beruht die beobachtete Limitation auf dem Massenwirkungsgesetz (Gleichung 3.2), da Nenner und Zähler nicht unabhängig voneinander sind. Die Gleichgewichtskonstante  $k$  gibt das Verhältnis an, bei dem die Umsetzung im Gleichgewicht (50 % Edukte und 50 % Produkte) ist und markiert damit den Wendepunkt des Signalverlaufes (Abbildung 3.1). Wie es auch von Puffersystemen, die durch die Henderson-Hasselbalch-Gleichung beschrieben werden, bekannt ist, kann eine Umsetzung als vollständig bzw. unvollständig betrachtet werden, wenn mehr als 99 % bzw. weniger



**Abbildung 3.3:** Signale der Sensoren SB2AAE und SB2AC0 für unterschiedliche Konzentrationen Coffeincitrat sowie die Beschreibung der Signale basierend auf dem Massenwirkungsgesetz ( $n = 3$ ).

als 1 % der Edukte umgesetzt worden sind (Henderson 1908). Daraus ergibt sich, dass der Signalverlauf, welcher als eine stöchiometrische Umsetzung angesehen wird, nur über einen Konzentrationsbereich von vier Zehnerpotenzen erfolgen kann. Eine Erweiterung des zugrundeliegenden Modells auf variierende Reaktionsverhältnisse, z.B. 2:1, wurde nicht unternommen, da in dem Fall keine allgemeingültige Formel entwickelt worden wäre.

Obwohl dieses Modell versucht, die elektrochemischen Vorgänge bei der Potentialbildung zu beschreiben, kann es nicht den konzentrationsabhängigen Signalverlauf aller Sensoren erfassen. Es ist somit für den angestrebten Verwendungszweck nicht geeignet.

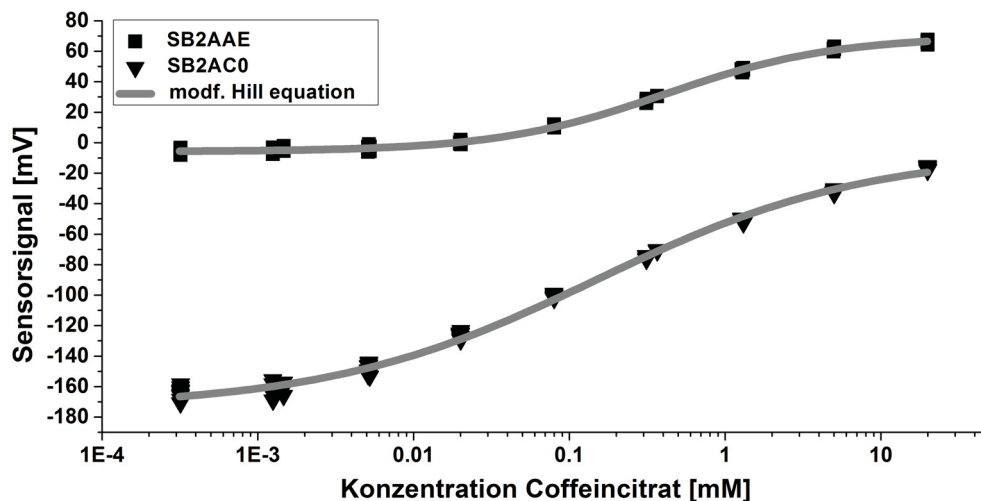
#### 3.1.2.4 Beschreibung der Sensorsignale - Modifizierte Hill-Gleichung

Nachdem das mathematische Modell, basierend auf dem Massenwirkungsgesetz, nicht auf alle Sensoren angewendet werden konnte, wurde ein mathematisches Modell durch Modifizierung (Gleichung 3.6) der von Hill beschriebenen Kooperativität entwickelt (Hill 1910).

Es handelt sich dabei um einen semi-empirischen Ansatz, bei dem das Signal des Sensors in Abhängigkeit der Konzentration des Analyten ( $c$ ) zwischen der oberen und unteren Signalgrenze ( $U_M$  und  $U_S$ ) variiert.

$$U_{Sensor} = \frac{U_M - U_S}{1 + \left(\frac{c}{c_0}\right)^s} + U_S \quad (3.6)$$

Durch Einführung eines Wendepunkts ( $c_0$ ) und des Hill-Koeffizienten ( $s$ ) als Maß für die Steigung, konnte der Signalverlauf der Sensoren über den gesamten Konzentrationsbereich beschrieben werden.



**Abbildung 3.4:** Signale der Sensoren SB2AAE und SB2AC0 für unterschiedliche Konzentrationen Coffeincitrat sowie die Beschreibung der Signale mit der modifizierten Hill-Gleichung ( $n = 3$ ).

Die Anpassung der Signale konnte für alle Sensoren außer den Sensor SB2CT0 des Sensorsets 1 durchgeführt werden (Abbildung 3.4), da dieser nicht den vorangestellten Annahmen entsprach (siehe auch Abschnitt 3.1.2.1).

Die Signalbeschreibung wurde anhand der Wurzel des mittleren Quadratfehlers der Vorhersage (*Root Mean Square Error of Prediction*, RMSEP), der auf den Signalbereich ( $\Delta U = |U_M - U_S|$ ) des Sensors bezogen wurde, bewertet (Tabelle 3.2). Mit einer maximalen Streuung von 3,30 % des Sensors SB2AE1 von Sensorset 2 konnten die Signale sehr gut beschrieben werden. Ein Vergleich der beiden Sensorsets war anhand der ermittelten Parameter möglich. Für das ältere Sensorset 1 war der Signalbereich der Sensoren kleiner. Da Steigung und Konzentration des Wendepunkts gleicher Sensoren beider Sensorsets annähernd gleich waren, kann aus einem kleineren Signalbereich ein geringerer Erfassungsbereich gegenüber der untersuchten Substanz abgeleitet werden.

**Tabelle 3.2:** Ermittelte Modellparameter für die Beschreibung der Sensorsignale anhand der modifizierten Hill-Gleichung ( $n = 3$ , Mittelwert).

Sensor	Sensorset 1				Sensorset 2			
	RMSEP [mV]	$ U_M - U_S $ [mV]	$s$ [ ]	$c_0$ [mM]	RMSEP [mV]	$ U_M - U_S $ [mV]	$s$ [ ]	$c_0$ [mM]
SB2AAE	0,96	75,5	0,80	0,41	0,87	96,9	0,69	0,95
SB2CT0	—	—	—	—	1,99	71,5	0,81	2,73
SB2CA0	1,47	125,4	0,60	0,56	2,21	125,0	0,61	0,85
SB2AE1	2,27	80,4	0,79	1,92	3,10	94,1	0,76	1,04
SB2AC0	2,61	179,9	0,50	0,15	4,91	183,5	0,52	0,14
SB2AN0	1,55	152,6	0,52	0,37	3,94	154,4	0,55	0,24

Obwohl die Beschreibung der Sensorsignale mit dieser Methode sehr gut durchführbar war und zufriedenstellende Ergebnisse erzeugte, muss der in Abschnitt 3.1.2.1 postulierte Signalverlauf der Sensoren in Frage gestellt werden.

Trotz Verwendung unterschiedlicher Modellsubstanzen (Coffeincitrat, Chinin HCl, Mononatriumglutamat und Natriumchlorid) konnte vermutlich aufgrund von Viskositäts- und Löslichkeitseffekten die postulierte Signalgrenze bei hohen Konzentrationen für keinen Sensor zuverlässig erfasst werden, da das Plateau bei hohen Konzentrationen nicht vollständig ausgebildet bzw. erreicht wurde. Darüber hinaus konnte durch Verwendung von vier Modellparametern die Gefahr einer Überanpassung nicht ausgeschlossen werden.

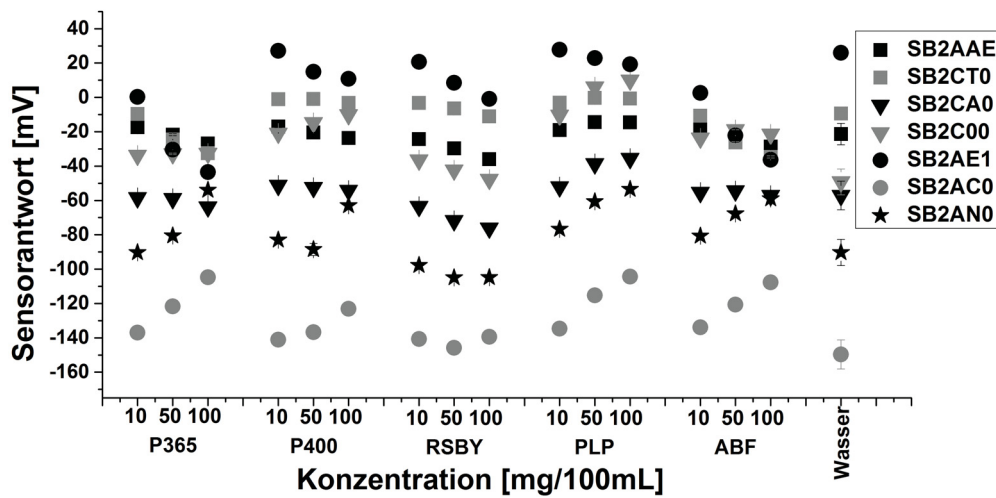
Es war möglich, mit den Parametern des Modelles Qualitätsattribute Erfassungsbereich und Empfindlichkeit für die Sensoren zu definieren. Der Signalebereich ( $\Delta U = |U_M - U_S|$ ) macht dabei sowohl eine Aussage über die Nutzungsdauer wie auch über den Erfassungsbereich der Sensoren gegenüber dem Analyten. Die Empfindlichkeit repräsentiert durch die Steigung zeigten nur geringe Schwankungen und sollten daher für die Sensoren konstant sein. Schließlich konnte eine Methode aufgezeigt werden, die eine Beurteilung der Sensoren über den gesamten Konzentrationsbereich zuließ und Veränderung über die Nutzungsdauer anhand von zwei unterschiedlichen Sensorsets erfassen konnte.

### 3.1.3 Untersuchung von Fleischaromen

Die Signale des verwendeten Sensorsystems waren für die fünf Fleischaromen unterschiedlich und für jedes Aroma konnten charakteristische konzentrationsabhängige Signalmuster identifiziert werden (Abbildung 3.5). Allgemein ähnliche Signalmuster unterschieden sich in mindestens einer Sensorantwort. Eine Unterscheidung der Aromen ABF und P356 war so mit dem Sensor SB2C00 möglich. Daher konnte zwischen den Konzentrationen eines Fleischaromas wie auch zwischen unterschiedlichen Fleischaromen unterschieden werden.

Weiterhin wurde geprüft, ob das Sensorsystem zwischen unterschiedlichen Chargen eines Aromastoffes differenzieren konnte. Dazu wurden zwei Chargen PLP (61A30199-I und 61A90552-I) in einer Konzentration von 100 mg/100 mL analysiert. Aufgrund einer eingeschränkten Verfügbarkeit der Charge 61A30199-I erfolgten diese Messung mit einem zeitlichen Versatz zur vergleichenden Messung der Fleischaromen (Abbildung 3.5), sodass abweichende Signalmuster zu erwarten waren (siehe dazu Abschnitt 3.1.2.1).

Das konzentrationsabhängige Signalmuster der beiden Chargen PLP unterschied sich in den Signalen aller Sensoren (Abbildung 3.6). Die Sensorsignale der Charge 61A30199-I waren zu negativen Werten verschoben, dabei zeigten die Signale der Sensoren SB2AAE, SB2C00 und SB2AC0 die stärkste Verschiebung. Es konnte damit demonstriert werden, dass

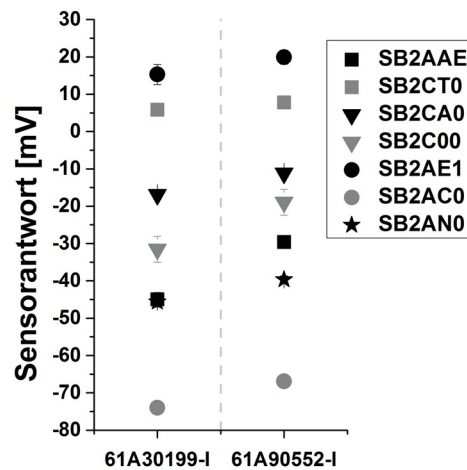


**Abbildung 3.5:** Signale des Sensorsystems für die fünf ausgewählten Geschmacksstoffe (PLP der Charge 61A90552-I) in unterschiedlichen Konzentrationen ( $n = 3$ , Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung).

dieses Sensorsystem sowohl zwischen unterschiedlichen Fleischaromen wie auch zwischen zwei Chargen des Fleischaromas PLP differenzieren kann.

Für die weitere Bewertung der Ergebnisse wurde versucht, eine Korrelation zwischen einer messbaren qualitätsbezogenen Größe und den Signalen des Sensorsystems herzustellen. Da die Sensoren die Zusammensetzung der Probenlösungen anhand weniger Signale beschreiben, kann dem aufgezeichneten Signalmuster weder eine Information über die genaue molekulare Zusammensetzung noch über Attribute wie z.B. den Geschmack entnommen werden. Die Signale des Sensorsystems allein waren daher nicht zur Bewertung der Qualität dieser Aromen geeignet. Da die verwendeten Fleischaromen als Hilfsstoffe zur Steigerung der Palatabilität verwendet werden, wurde diese als qualitätsbestimmende Messgröße ausgewählt (Thombre 2004). Im nächsten Schritt hätte die Palatabilität der Fleischaromen anhand von Akzeptanz- oder Präferenzstudien mit Hunden bestimmt werden sollen (Smith et al. 1984). Allerdings bestehen Zweifel, dass mit einer solchen Studie valide Ergebnisse hätten erzeugt werden können (Griffin et al. 1984). Mit den vorhandenen Fleischaromen hätte die Bestimmung der Palatabilität das am besten geeignete Fleischaroma und dessen notwendige Menge in einer Arzneiform bestimmen können; eine Aussage über dessen Qualität wäre aber nicht möglich gewesen.

Für diesen Zweck hätten unterschiedliche Qualitäten eines Fleischaromas verfügbar sein müssen. Da allerdings die molekulare Zusammensetzung und die Identität geschmacksgebender Inhaltsstoffe der Fleischaromen unbekannt waren, konnte im Voraus keine Abschätzung der Qualität eines Fleischaromas erfolgen. Zusätzlich wurde während der Messungen beobachtet, dass keines der ausgewählten Fleischaromen in den untersuchten



**Abbildung 3.6:** Vergleichende Messungen von zwei Chargen PLP ( $n = 3$ , Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung).

Konzentrationen einen klare wässrige Lösung bildete (Anteil wasserlöslicher Bestandteile: PLP  $30,4 \% \pm 0,31 \%$ , P356  $80,9 \% \pm 0,48 \%$ ). Da die Sensoren jedoch nur gelöste Verbindungen erfassen können, wurde ein Teil der Fleischaromen von dem Sensorsystem nicht erfasst. Ob der wasserunlösliche Anteil entscheidend für den gustatorischen Sinneseindruck ist, konnte nicht geklärt werden. Allerdings konnte die Forschung der letzten Jahre zeigen, dass Fett und Fettsäuren, vermutete wasserunlösliche Bestandteile der Fleischaromen, bei Nager und Menschen eine gustatorische Sinneswahrnehmung erzeugen (Mattes 2005; Chalé-Rush et al. 2007; Galindo et al. 2012). Hat ein Teil der wasserunlöslichen Bestandteile einen Einfluss auf den Geschmack, so konnte dieser von dem Sensorsystem nicht erfasst werden. Auch könnte die Kombination der gustatorischen und der retronasalen Wahrnehmung, die den Sinneseindruck „Geschmack“ bildet, von diesem System nicht erfasst werden (Hornung und Enns 1987). Darüber hinaus wurde von Houpt et al. (1978) gezeigt, dass der Hund die Wahl von fleischiger Nahrung vornehmlich über den olfaktorischen Sinneseindruck trifft. Somit war es fraglich, ob der Geschmack der Fleischaromen überhaupt qualitätsbestimmend ist.

Auf Basis dieser Erkenntnisse und Überlegungen ist die Geschmacksbestimmung von Fleischaromen mit diesem Sensorsystem nicht mehr als eine geeignete Methode zur Qualitätsbestimmung anzusehen. Das System wurde daher im Hinblick auf die Qualitätskontrolle von Fleischaromen nicht weiter untersucht.

### 3.1.4 Zusammenfassung

Es konnte gezeigt werden, dass das verwendete Sensorsystem geeignet ist, die ausgewählten Fleischaromen konzentrationsabhängig zu detektieren. Die wasserlöslichen Anteile der Aromen konnten unterschieden werden, stellten allerdings nur einen variablen Anteil (30 % bis 80 %) der Gesamtmasse dar. Somit musste sich kritisch mit der Frage auseinandergesetzt werden, ob der Geschmack dieser Stoffe allein über die wasserlöslichen oder auch über die nicht wasserlöslichen Anteile vermittelt wird. Da diese Frage aufgrund fehlender Daten aus Fütterungsstudien unbeantwortet bleiben musste, konnte dieses System für die weitere Bewertung dieser Stoffe hinsichtlich Akzeptanz und Qualität nicht genutzt werden.

Parallel zur Untersuchung der Fleischaromen wurden verwendete Sensoren hinsichtlich ihrer Verwendungsdauer und Empfindlichkeit gegenüber einer ausgewählten Verbindung geprüft. Anhand von zwei mathematischen Modellen (Lineare Regression und modifizierte Hill-Gleichung) konnten Parameter zur Bewertung der Sensorqualität abgeleitet werden. Die Modifikation der Hill-Gleichung zeigte sich dabei der Linearen Regression überlegen, da sie den vollständigen Signalverlauf der Sensoren beschreiben konnte und so auch Veränderungen des Signales bei geringen Konzentrationen messen konnte. Im Gegensatz dazu ist die lineare Regression eine einfache und schnell umsetzbare Methode. Schlussendlich sind beide Methoden verwendbar, sollten aber unter Berücksichtigung der kleinen Probenzahl in zukünftigen Untersuchungen mit einer größeren Zahl unterschiedlicher Sensoren detaillierter überprüft werden.



## 3.2 Vergleich von Systemen zur Erfassung flüchtiger Verbindungen in Fleischaromen

### 3.2.1 Einleitung

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Systemen zur Erfassung gelöster Verbindungen für die Qualitätsbewertung von Fleischaromen wenig geeignet waren, wurde der Fokus auf andere Systeme zur Qualitätsbewertung gelegt. Dabei war berücksichtigt, dass der olfaktorische Eindruck von Fleisch und fleischartigen Produkten für die Bewertung der Palatabilität bei Hunden wichtiger als die gustatorische Wahrnehmung ist (Haupt et al. 1978). Da Hunde ihren Geruchssinn zur präventiven Erkennung von Gefahren einsetzen, werden Futter und andere Gegenstände mit deren Geruch negative Erfahrungen verbunden werden, gemieden (Algom und Cain 1991)

Es wurde daher ein System benötigt, mit dem flüchtige Verbindungen einer Probe erfasst werden können. Die kommerziell verfügbaren Systeme basieren auf unterschiedlichen Funktionsprinzipien (Röck et al. 2008) und sind in Abschnitt 1.2.2 detaillierter beschrieben. Fünf Systeme wurden auf ihre Eignung zur Bewertung von Fleischaromen untersucht (Tabelle 3.3).

**Tabelle 3.3:** Getestete Sensorsysteme zur Bewertung der Qualität von Fleischaromen.

System	Prinzip	Hersteller
FOX4000	Metall-Oxid-Halbleiter-Feldeffekttransistor	AlphaM.O.S.
OdorVector	Quarzkristall-Mikrowaage	AltraSens
FlavorSpec	Gaschromatographie + Ionen-Mobilität-Spektrometrie	G.A.S. Dortmund
Heracles 2	Duale Gaschromatographie + Flammenionisation	AlphaM.O.S.
klassische GC	Gaschromatographie + Flammenionisation	Agilent

Für den Eignungstest sollte eine Probe, bestehend aus Tabletten, in denen ein Fleischaroma als Hilfsstoff enthalten war, mit fünf Fleischaromen verglichen sowie das in der Tablette verwendete Fleischaroma identifiziert werden. Die Tabletten wurden als wirkstofffreies Muster von Bayer Animal Health GmbH zur Verfügung gestellt und enthielten das Fleischaroma *Spray dried Pork Liver Powder EHT* (Aromastoff aus Schweineleber) (PLP). Als Blindprobe wurde Laborluft verwendet. Für diese Untersuchung wurden die Systeme mit den vom Hersteller empfohlenen Einstellungen betrieben. Um eine neutrale Bewertung der Systeme zu gewährleisten, wurde daher keine Methodenoptimierung durchgeführt. Das Ziel dieser Vergleichsstudie war, ein System zur Erfassung flüchtiger Verbindungen zu finden, welches für die Bewertung von Fleischaromen genutzt werden kann.

### 3.2.2 Metall-Oxid-Halbleiter-Feldeffekttransistor - FOX 4000

Zuerst wurde der FOX4000 der Firma AlphaM.O.S. (Toulouse, Frankreich) getestet. Bei diesem System werden flüchtige Verbindungen aufgrund ihrer Interaktion mit Metalloxid-Halbleiter-Feldeffekttransistoren (MOSFET) erfasst. Trägergas und Probe durchströmen drei Sensorkammern, in welchen die Substanzen mit den einzelnen Sensoren interagieren können. Die Änderungen der Sensorsignale über die Zeit des vorbei strömenden Gases werden erfasst. Das Signal wird aus der Differenz des Trägergassignales und des maximalen Probensignales gebildet. Sich ergebende charakteristische Muster können als Fingerabdruck interpretiert und multivariat ausgewertet werden.

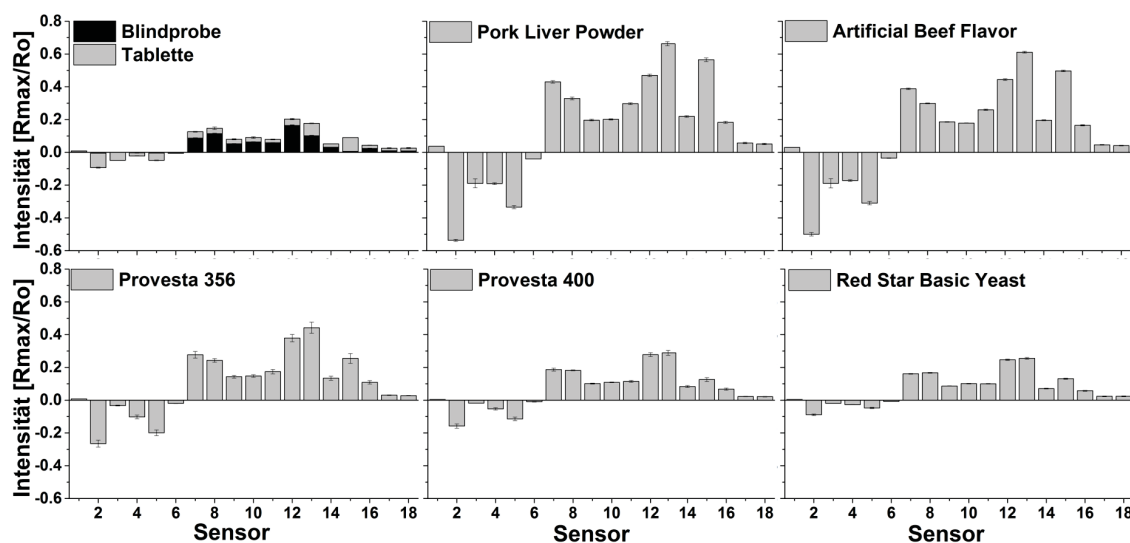


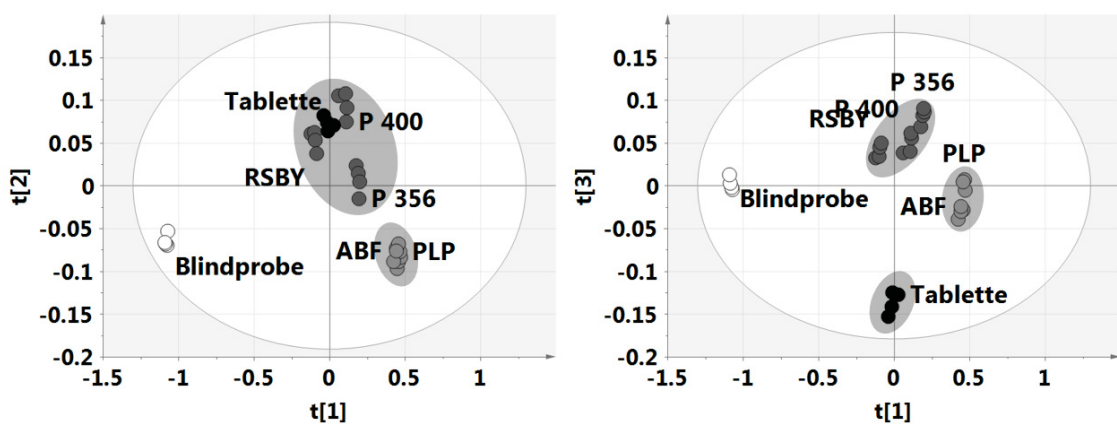
Abbildung 3.7: Signale des FOX-4000 für die fünf untersuchten Aromen und die Tablette ( $n = 3$ , Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung).

Die Signale der untersuchten Fleischaromen und der Tablette zeigten unterschiedliche Signalintensitäten bei ähnlichen, relativen Signalmustern (Abbildung 3.7). So hatten die Sensoren zwei bis sechs immer ein negatives Signal, die übrigen Sensoren ein Positives. Für einige Sensoren (2, 5, 7, 13 und 15) war eine starke Signalantwort zu beobachten und für andere (1, 3, 6, 17 und 18) eine sehr geringe.

Die Fleischaromen PLP und *Artificial Beef Flavor* (Aromastoff aus Schweineleber) (ABF) wiesen ein ähnliches Signalmuster bei vergleichbarer Signalintensitäten auf. Eine analoge Beobachtung konnte auch für *Provesta 400* (Aromastoff aus Hefen) (P400) und *Red Star Basic Yeast* (Aromastoff aus Hefen) (RSBY) gemacht werden. *Provesta 356* (Aromastoff aus Hefen) (P356) befand sich hinsichtlich der Signalintensität zwischen beiden Gruppen, wurde aber in Bezug auf das relative Signalmuster den Hefen zugeordnet. Ob die unterschiedlichen Signalintensitäten eine Information über die Geruchsstärke enthalten, konnte nicht geklärt werden. Es war jedoch zu vermuten, dass die Signalintensität mit der Anzahl flüchtiger

Verbindungen in der Gasphase in direktem Zusammenhang steht. Daher ist zu erwarten, dass die Fleischaromen PLP und ABF mehr flüchtige Verbindungen als die Fleischaromen aus Hefen aufwiesen.

Die Signale der Tablette zeigten die geringste Signalintensität und waren hinsichtlich des relativen Signalmusters mit keiner Probe direkt vergleichbar. Dies war vornehmlich der geringeren Oberfläche der Tabletten zuzuschreiben. Eine höhere Signalintensität und damit eine bessere Bewertung der Probe hätte durch Erhöhung der Ausgleichszeit im Ofen des Probengebers, eine anteilige Erhöhung der Probenmenge im Probengefäß als auch durch eine Vergrößerung der Probenoberfläche nach stärkerer Zerkleinerung erreicht werden können.



**Abbildung 3.8:** Hauptkomponentenanalyse der Signale des FOX-4000 für die fünf Fleischaromen, die Tablette und die Blindprobe ( $n = 4$ , Hauptkomponenten 1.  $R^2 = 95,5 \%$ , 2.  $R^2 = 2,05 \%$ , 3.  $R^2 = 0,18 \%$  und 4.  $R^2 = 0,01 \%$ , Skalierung: Ctr).

Gemäß der vom Hersteller für dieses System empfohlenen Auswertung wurde eine multivariate Datenauswertung (Hauptkomponentenanalyse) durchgeführt. Diese beschrieb 99,9 % der Varianz der Messergebnisse in vier Hauptkomponenten, wobei 95,5 % auf der ersten Hauptkomponente dargestellt werden (Abbildung 3.8).

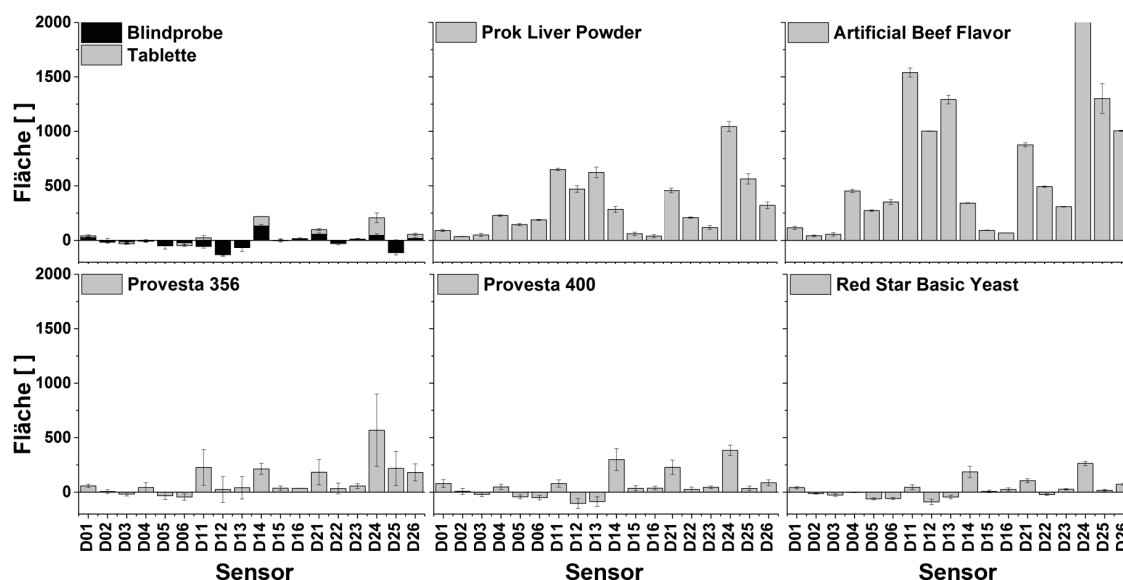
Obwohl die Rohdaten für die Hauptkomponentenanalyse normiert wurden, scheint die erste Hauptkomponente die Proben anhand ihrer Signalintensität zu unterteilen. In Kombination mit der zweiten Hauptkomponente erfolgte eine Gruppierung der Proben und die Signale der Tablette werden den Signalen von RSBY und P400 zugeordnet. Die dritte Hauptkomponente wiederum enthält nur 0,18 % der Varianz und wird daher für die Bewertung nicht berücksichtigt; ist aber aus Gründen der Vollständigkeit aufgeführt.

Das Sensorsystem konnte die Fleischaromen gemäß ihres Ursprungsmaterials gruppieren, ordnet aber fälschlicherweise das in der Tablette verwendete Aroma den Fleischaromen aus Hefen zu. Der FOX4000 lässt keine Aussage über die molekulare Zusammensetzung der Gasphase zu, ob eine quantitative Aussage über die Menge des verwendeten Fleischaromas möglich wäre, wurde nicht geprüft. Es ist festzuhalten, dass dieses System für die Vermessung

dieser Fleischaromen mit der getesteten Methode nicht geeignet war. Ob eine bessere Unterscheidung bzw. Zuordnung durch Optimierung der Methode möglich gewesen wäre, wurde nicht getestet.

### 3.2.3 Quarzkristall-Mikrowaage - OdourVector

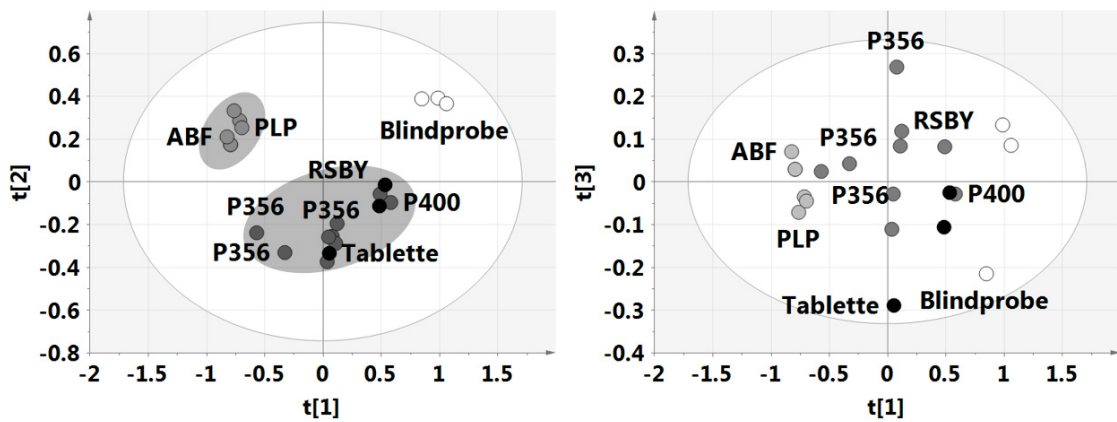
Das zweite untersuchte System war der OdourVector der Firma AltraSens (Bonn, Deutschland), welcher sechs Quarzkristall-Mikrowaagen (Prinzip der akustischen Volumenwelle) zur Erfassung flüchtiger Verbindungen nutzte. Das System beinhaltete sechs Sensoren und zeichnete bei drei Temperaturstufen mit jedem Sensor ein Signal auf, sodass sich 18 Signalspuren ergaben (D01 bis D06 bei 50°C, D11 bis D16 bei 90°C und D21 bis D26 bei 200°C). Diese konnten in Bezug auf ihre relative Höhe oder Fläche ausgewertet werden.



**Abbildung 3.9:** Signalflächen der sechs untersuchten Proben sowie der Tablette und der Blindprobe, die mit dem OdourVector aufgezeichnet wurden ( $n = 3$ , Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung).

Die Signalflächen der Proben unterschieden sich von den Signalen der Blindprobe (Abbildung 3.9). Die geringste Signalintensität und den kleinsten Unterschied zur Blindprobe zeigten die Fleischaromen RSBY und P400 sowie die Tablette und auch das relative Signalmuster der 18 Sensoren ähnelte für diese Proben dem der Blindprobe. Die stärksten Signale waren für die Fleischaromen tierischen Ursprungs (PLP und ABF) zu beobachten, das Fleischaroma P356 findet sich in Bezug auf die Intensität der Signale zwischen beiden Gruppen wieder. Dies entsprach auch dem beobachteten relativen Signalmuster dieser Aromen, welches für PLP und ABF sehr ähnlich war. Für P356 war das Signalmuster für

einige Sensoren (Sensoren D23 - D26) vergleichbar mit den Signalen tierischer Fleischaromen und für andere Sensoren (D01 - F06) mit der Blindprobe.



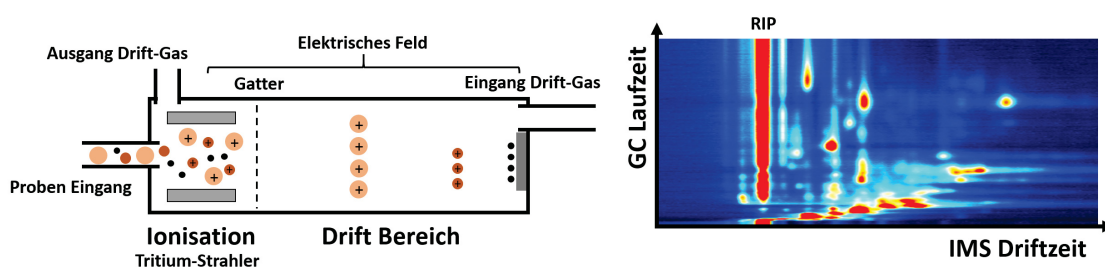
**Abbildung 3.10:** Multivariate Auswertung der normierten Signalflächen des Odour Vectors ( $n = 3$ , Hauptkomponenten 1.  $R^2 = 78 \%$ , 2.  $R^2 = 14,8 \%$ , 3.  $R^2 = 2,94 \%$ , 4.  $R^2 = 2,03 \%$ , 5.  $R^2 = 1,18 \%$  und 6.  $R^2 = 0,44 \%$ , Skalierung: Ctr).

Mithilfe einer Hauptkomponentenanalyse sollte der Unterschied zwischen den Proben deutlicher aufgezeigt werden. Die errechneten sechs Hauptkomponenten beschrieben 99,4 % der Varianz des Systems, wobei die erste Hauptkomponente 78 % der Varianz wiedergab (Abbildung 3.10). Die ersten beiden Hauptkomponenten trennten die Fleischaromen hinsichtlich ihres Ausgangsmaterials, die weiteren Hauptkomponenten gaben die Streuung der Messung wieder und enthielten keine weiterführenden Informationen. Das Fleischaroma P356 zeigte eine Tendenz in Richtung der Proben tierischen Ursprungs, konnte jedoch von den anderen Fleischaromen aus Hefen und der Tablette nicht eindeutig getrennt werden. Diese waren eindeutig von der Blindprobe getrennt, ließen jedoch keine Unterscheidung untereinander zu. Damit konnte der Odour Vector Aromen anhand ihres Ursprungs unterscheiden, aber keine eindeutige Zuordnung des in der Tablette verwendeten Aromas machen - sortierte es sogar fälschlicherweise den Hefen zu.

Trotz einer Adsorptionszeit von 20 Minuten wurden die flüchtigen Verbindungen der Aromen nur schlecht erfasst, sodass eine ausreichende Signalstärke nicht gegeben war. Zusätzlich zeigte sich auch dieses Mal, wie es auch schon bei der Auswertung der Ergebnisse des FOX-4000 diskutiert wurde, dass das Signal der Tablette eine unzureichende Intensität aufwies. Eine Anpassung der Methode wäre auch in diesem Fall ratsam gewesen. Es muss somit festgehalten werden, dass der Odour Vector mit dieser Methode das verwendete Aroma falsch zuordnete und daher für die Bewertung dieser Fleischaromen nicht geeignet ist.

### 3.2.4 Ionen-Mobilität-Spektrometrie - FlavourSpec

Der FlavourSpec der Gesellschaft für analytische Sensorsysteme mbH (Dortmund, Deutschland) kombiniert Gaschromatographie mit Ionenmobilitätsspektroskopie (IMS). Die Gasphase über der Probe wird gaschromatographisch getrennt und im Ionenmobilitätsspektroskopie (IMS) durch Protonen aus einem Tritium-Strahler positiv aufgeladen (Abbildung 3.11 links). Die positiv geladenen Moleküle werden stoßweise aus der Ionisationskammer entlassen und wandern in einem elektrischen Feld in Richtung eines Detektors. Die masse- und ladungsabhängige Trennung erfolgt im Gegenstrom eines inerten Driftgases (Flugdauer ca. 12 Millisekunden). Liegen keine Reaktionspartner vor, so



**Abbildung 3.11:** Links: Schematischer Aufbau eines IMS. Die Moleküle der Probe werden von einem Tritium-Strahler positiv aufgeladen und wandern in einem elektrischen Feld entgegen einem Driftgas-Strom. Rechts: Beispielhaftes Chromatogramm des FlavourSpec mit Reaktions-Initiations-Signal (RIP) (Farbcodierung: Rot = hohe Intensität, Blau = geringe Intensität).

wandern erzeugte Protonen im elektrischen Feld und werden als Reaktions-Initiations-Signal (RIP) erfasst. Chromatogramme (Abbildung 3.11) bilden sich aus Laufzeit (Abszisse) und IMS-Driftzeit (Ordinate). Die Farben des jeweiligen Signales repräsentieren dessen Intensität.

In Abbildung 3.12 sind Chromatogramme der Fleischaromen, der Tablette und der Blindprobe nebeneinander dargestellt. Für PLP und ABF wurden in den ersten fünf Minuten eines Laufes viele einzelne und überlappende Signale gefunden. Aufgrund einer unzureichenden Trennung der Verbindungen auf der Trennsäule war bei späteren Retentionszeiten (RT) z.B. bei der 11. Minute PLP und der 6.-10. Minute ABF eine Signalverbreiterung zu beobachten. Die Fleischaromen aus Hefen P400 und RSBY zeigten deutlich weniger Signale als Aromen tierischen Ursprungs, sodass die Chromatogramme nur in der ersten Minute unterschiedlich zur Blindprobe waren. Für P356 fanden sich deutlichere Unterschiede zur Blindprobe (z.B. 2. Minute bei 9 ms und 2.-10 Minute bei 7 ms). Eine Unterteilung der Aromen anhand ihrer Herkunft (Tier / Hefen) schien daher möglich. Das Chromatogramm der Tablette ähnelt in seinem Muster den tierischen Fleischaromen, allerdings war die Signalintensität deutlich geringer ausgeprägt.

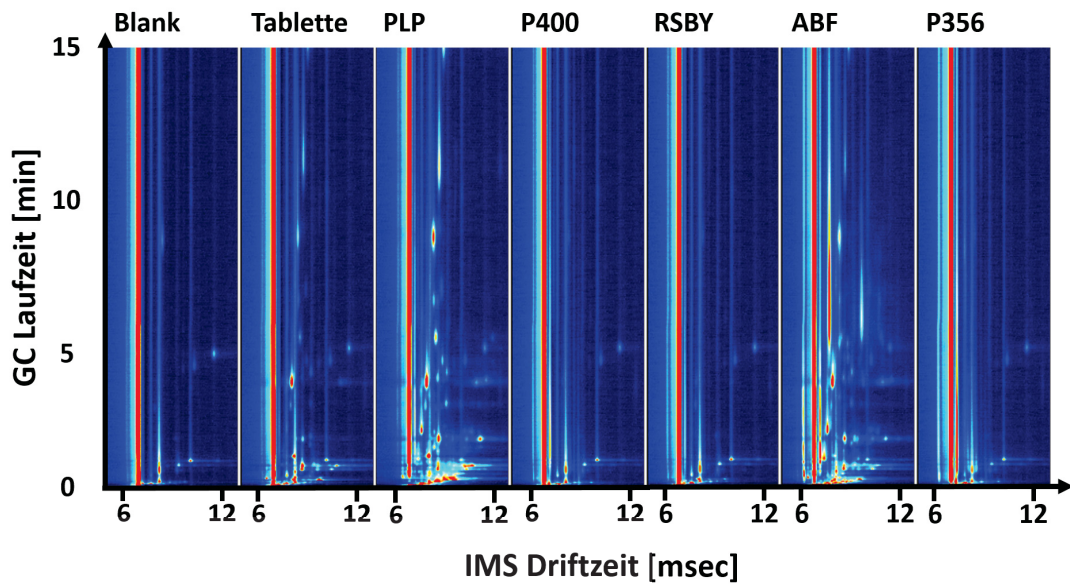


Abbildung 3.12: Chromatogramme der fünf untersuchten Aromen sowie der Tablette und der Blindprobe, die mit den FlavourSpec aufgezeichnet wurden.

Mit aus den Chromatogrammen gewonnenen Informationen wurde eine Hauptkomponentenanalyse durchgeführt, die mit drei Hauptkomponenten 87,7 % der Varianz beschrieb. Die erste und zweite Hauptkomponente unterschieden die tierischen Aromen (PLP und ABF), die Tablette und gruppieren zusätzlich die Hefen zueinander (Abbildung 3.13). Der Datenpunkt der Tablette befand sich zwischen der Blindprobe und dem Fleischaroma PLP. Die dritte Hauptkomponente ordnete die Datenpunkte der Tablette zwischen Blindprobe und einer Gruppe aus PLP, P400 und P356 ein. Damit war keine eindeutige Zuordnung des in der Tablette verwendeten Fleischaromas möglich, jedoch deutete die univariate Auswertung auf tierische Fleischaromen und die multivariate

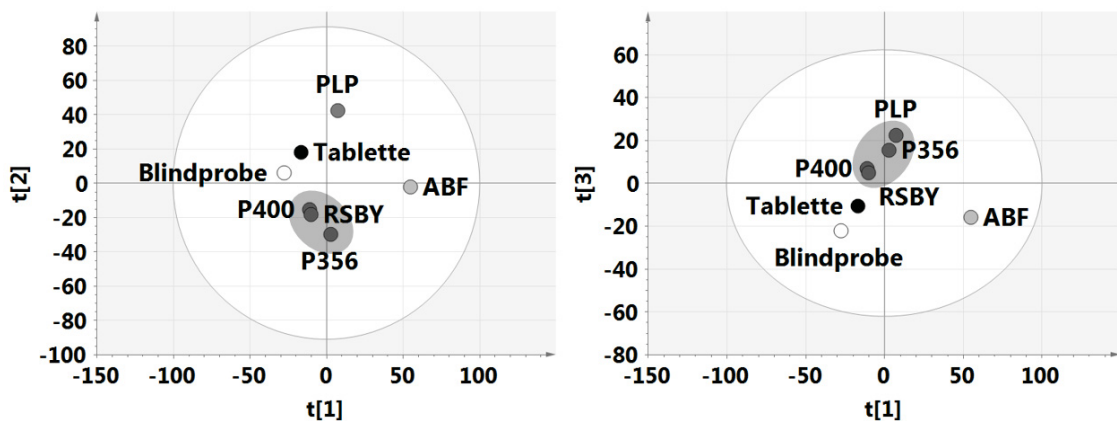


Abbildung 3.13: Multivariate Auswertung der binärisierten Chromatogramme des FlavourSpec ( $n = 1$ , Hauptkomponenten 1.  $R^2 = 39,6 \%$ , 2.  $R^2 = 32,8 \%$  und 3.  $R^2 = 15,3 \%$ , Skalierung: Ctr).

Auswertung auf PLP hin.

Abschließend kann somit festgehalten werden, dass der FlavourSpec in der Lage war, die Aromen hinsichtlich ihres Ausgangsmaterials in Gruppen zu fassen und das in der untersuchten Tablette verwendete Aroma einer Gruppe zuzuordnen. Das System konnte diese Zuordnung weiter spezifizieren und einen möglichen Geschmacksstoff (PLP) identifizieren. Die Verwendung eines gaschromatographischen Systems zur Trennung der flüchtigen Verbindungen erwies sich als vorteilhaft und erzeugte in Kombination mit dem IMS eine vielschichtige Signalantwort. Somit kann dieses System für die Charakterisierung dieser Fleischaromen eingesetzt werden, auch wenn eine Anpassung und Optimierung der Methode für eine zukünftige Verwendung notwendig wäre.

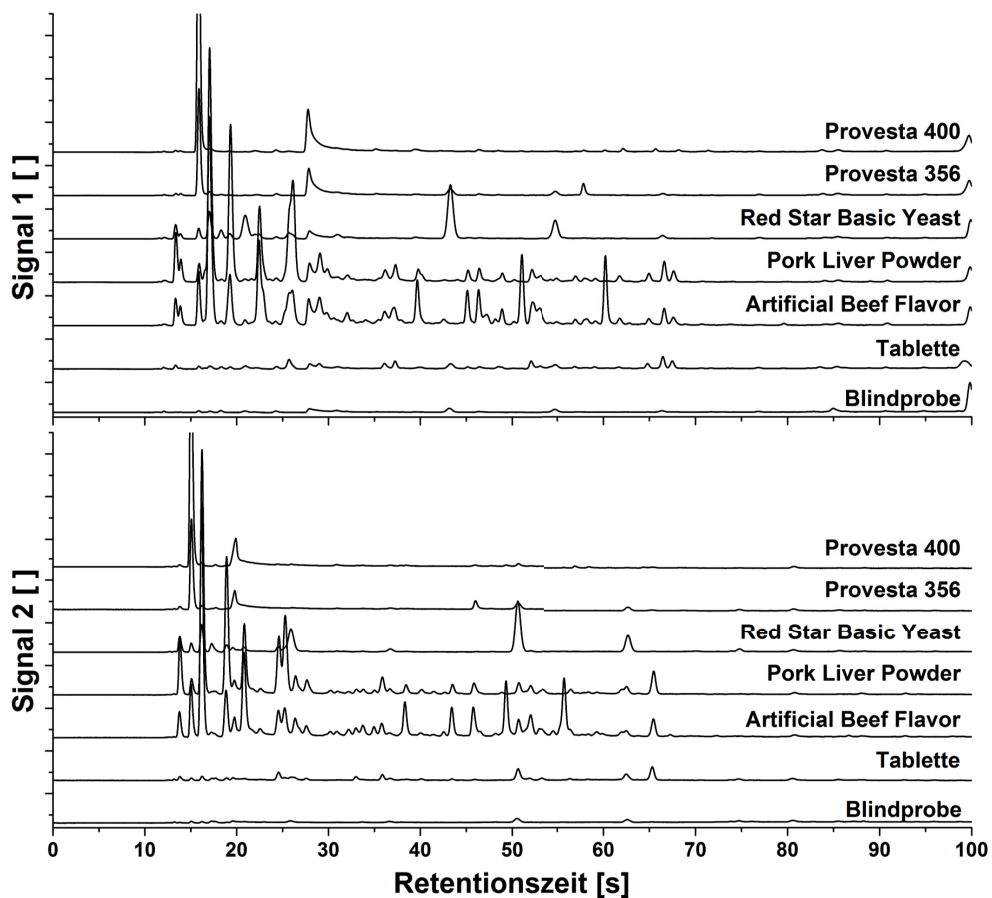
### 3.2.5 Flash Gaschromatographie - Heracles 2

Die Vermessung der Proben erfolgt beim Heracles 2 (AlphaM.O.S., Toulouse, Frankreich) mit einem dualen gaschromatographischen System. Die Gasphase über der Probe wird im System konzentriert (Mechanismus nicht offengelegt), auf zwei gaschromatographische GC-Säulen unterschiedlicher Polarität gegeben und auf diesen getrennt. Die Erfassung erfolgt für jede Trennsäule mit einem separaten Flammenionisationsdetektor.

In Abbildung 3.14 sind die Chromatogramme beider Trennsäulen für die untersuchten Fleischaromen, die Tablette und die Blindprobe dargestellt. Die Chromatogramme der Aromen P356 und P400 wie auch der Aromen PLP und ABF zeigten ein ähnliches Signalmuster, waren jedoch in ihrer Signalstärke unterschiedlich. Die beiden Chromatogramme des Aromas RSBY unterschieden sich von den Chromatogrammen der anderen Proben deutlich. Die Signale der Tablette waren die Schwächsten, allerdings waren einige Übereinstimmungen mit den Fleischaromen ABF und PLP für z.B. Signal 1 bei 25 Sekunden, 36 Sekunden, 37 Sekunden, 45 Sekunden und 46 Sekunden vorhanden. Auffällig für die Chromatogramme war, dass es aufgrund der Anzahl zu überlappenden Signalen kam. Eine Integration der Signale war daher nicht möglich und für die weitere multivariate Auswertung wurden die Signalhöhen verwendet.

Die berechnete Hauptkomponentenanalyse umfasst vier Hauptkomponenten und beschreibt 93,6 % der Varianz im System (Abbildung 3.15). Es wurde deutlich, dass die Datenpunkte der Tablette von den Datenpunkten der Fleischaromen und der Blindprobe getrennt waren, wobei diese Trennung durch die erste Hauptkomponente erfolgte. Die zweite Hauptkomponente trennte die Fleischaromen P400 und P356 von den übrigen Aromen, was vermutlich von Signalen mit einer Retentionszeit von 16 Sekunden und 30 Sekunden in Signal 1 und 15 Sekunden in Signal 2 verursacht wurde (siehe Abbildung 3.14). In dieser

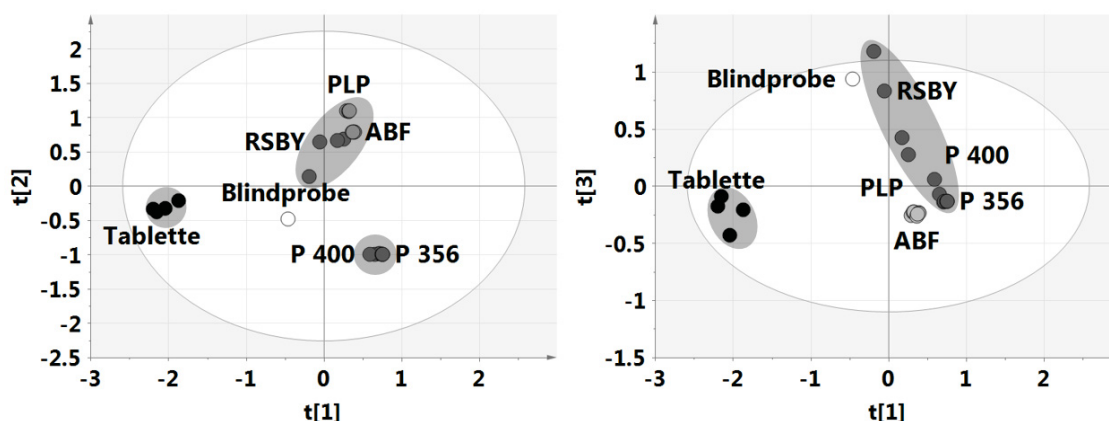




**Abbildung 3.14:** Chromatogramme der Fleischaromen, die mit dem Heracles 2 aufgezeichnet wurden. Oben (Signal 1) die Auftrennung für die Säule MXT-1701, Unten (Signal 2) für die Säule MXT-5.

Hauptkomponente lagen die Datenpunkte der Tablette in der relativen Nähe der Blindprobe und in der dritten Hauptkomponente in der relativen Nähe von PLP, ABF und P356. Auch hier ist anzumerken, dass die geringe Signalintensität der Tablette eine bessere Zuordnung verhinderte.

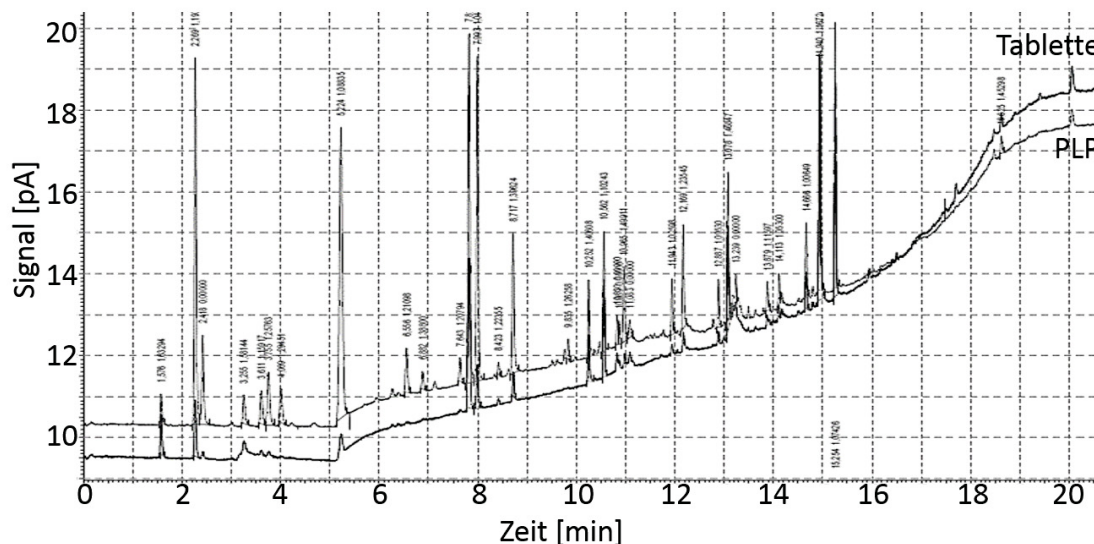
Es bestätigte sich, dass ein chromatographisches System für die Identifizierung und Bewertung der flüchtigen Verbindungen dieser Aromastoffe gut geeignet war. Das System Heracles 2 war in der Lage, eine Unterscheidung zwischen den Geschmacksstoffen zu machen und sie gemäß ihrer Herkunft einzuteilen. Dabei waren die Fleischaromen in der univariaten Auswertung deutlicher zu unterscheiden als bei der multivariaten. Für eine erfolgreiche Zuordnung des verwendeten Aromas wäre eine Optimierung der Methode notwendig gewesen. Ein hervorzuhebender Vorteil dieses Systems ist die sehr kurze Analysezeit einzelner Proben von unter 8 Minuten Messzeit. Dem gegenüber steht allerdings eine geringe Anpassungsfähigkeit des Systems an unterschiedliche Probenmaterialien, da unter anderem ein Wechsel der Trennsäulen nicht möglich ist. Mit einer optimierten Methode eignet sich dieses System für die Charakterisierung der verwendeten Fleischaromen.



**Abbildung 3.15:** Multivariate Auswertung der mit dem Heracles 2 aufgezeichneten Signalfächen für die fünf untersuchten Aromen sowie die Tablette und die Blindprobe ( $n = 4$ , Hauptkomponenten 1.  $R^2 = 46,4 \%$ , 2.  $R^2 = 35,4 \%$ , 3.  $R^2 = 8,4 \%$  und 4.  $R^2 = 3,43 \%$ , Skalierung: Ctr).

### 3.2.6 Gaschromatographie - HP 6890

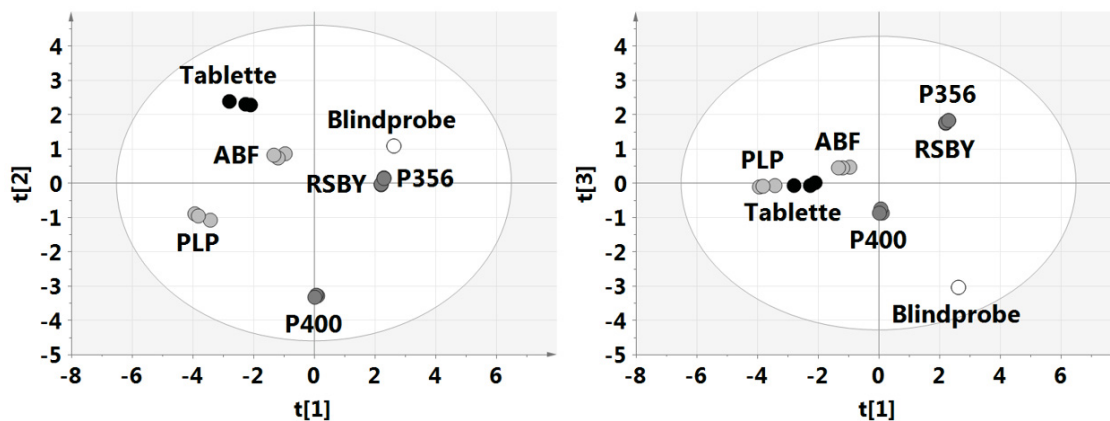
Nachdem die Systeme FlavourSpec und Heracles 2 gezeigt hatten, dass chromatographische Systeme für die Bewertung der flüchtigen Verbindungen dieser Fleischaromen von Vorteil war, wurde ein klassischer Gaschromatograph getestet. Verwendet wurde ein Hewlett Packard 6890 (Agilent, Böblingen, Deutschland) mit einem Flammenionisationsdetektor in Kombination mit einem Gasphasen Probengeber Agilent 7694 (Agilent, Böblingen, Deutschland).



**Abbildung 3.16:** Chromatogramme des Fleischaromas PLP und der Tablette.

Wie in Abbildung 3.16 dargestellt, zeigten die Chromatogramme des Fleischaromas PLP und der Tablette übereinstimmende Signale. Dies deutete darauf hin, dass PLP als Hilfsstoff in der Tablette verwendet worden war.

Wie es auch für den Heracles 2 durchgeführt wurde, konnten Signalmuster aus den Chromatogrammen abgeleitet und multivariat ausgewertet werden. Dazu wurden Gruppen aus RT und Signalfäche im Chromatogramm gebildet und diese mit einer Hauptkomponentenanalyse bestehend aus drei Hauptkomponenten verglichen.



**Abbildung 3.17:** Multivariate Auswertung der mit dem Gaschromatograph (GC)-FID aufgezeichneten Signalfächen für die fünf untersuchten Aromen sowie die Tablette und die Blindprobe ( $n = 4$ , Hauptkomponenten 1.  $R^2 = 42,4 \%$ , 2.  $R^2 = 21,3 \%$  und 3.  $R^2 = 18,4 \%$ , Skalierung: Ctr).

Mit Ausnahme der Fleischaromen RSBY und P356 trennte die Hauptkomponentenanalyse die Datenpunkte der Fleischaromen und der Tablette voneinander. Die Datenpunkte der Tablette lagen dabei in der Nähe der Fleischaromen tierischen Ursprungs und waren deutlich von der Blindprobe getrennt. Besonders deutlich wurde dies in der dritten Hauptkomponente, bei der die Datenpunkte der Tablette zwischen den Datenpunkten von PLP und ABF lagen. Eine weitere Differenzierung des in der Tablette verwendeten Aromas war anhand der multivariaten Datenauswertung nicht möglich.

Dieses System ermöglicht sowohl univariat als auch multivariat eine Unterscheidung der Aromen, dabei war die univariate Auswertung eindeutiger. Eine Zuordnung der Tablette zu einem Aroma konnte multivariat nicht durchgeführt werden, jedoch wurde es den Fleischaromen tierischen Ursprungs zugeteilt. Univariat waren Übereinstimmungen zwischen dem Signal des Geschmacksstoffs PLP und der Tablette zu beobachten. Eine Anpassung der Methode sowie des Systems ist für zukünftige Messungen sinnvoll. Aufgrund des modularen Aufbaus sowie des einfachen Wechsels einer GC-Trennsäule bietet dieses System einen hohen Grad an Anpassungsfähigkeit an unterschiedliche Probenmaterialien. Diese Flexibilität bedingt allerdings eine verlängerte Laufzeit und damit einen geringen Probendurchsatz bezogen auf die Zeit. Gleichzeitig ermöglicht das chromatographische System eine Beurteilung von Veränderungen auf molekularer Ebene, da flüchtige Verbindungen während eines Laufes aufgetrennt und separat erfasst werden. Die Nutzung eines anderen Detektors, z.B. eines

Massenspektrometers, würde einen weiteren großen Vorteil darstellen. Dies bietet die Möglichkeit, die flüchtigen Verbindungen unmittelbar nach der Analyse hinsichtlich ihrer strukturellen Beschaffenheit zu analysieren und Signale trotz Überschneidungen quantitativ auszuwerten.

### 3.2.7 Zusammenfassung

Es wurden fünf Systeme mit unterschiedlichen Detektions- und Trennungsvorfahren getestet. Die Systeme FOX 4000 und OdorVector konnten Fleischaromen hinsichtlich der flüchtigen Komponenten partiell unterscheiden, waren jedoch nicht in der Lage, einen Aromastoff der Tablette zuzuordnen und gruppierten diesen fälschlicherweise den Hefen zu. Im Gegensatz dazu erzeugten die chromatographischen Systeme (FlavourSpec, Heracles 2 und HP 6890) neben der qualitativen auch eine quantitative Information über die Zusammensetzung der Gasphase und konnten das Fleischaroma PLP der Tablette zuordnen. Aufgrund der chromatographischen Trennung einer Probe wird die von Boeker (2014) beschriebene Gefahr des Informationsverlust durch Reduktion auf wenige Signale verringert. Diese Systeme unterscheiden sich zum einen hinsichtlich der Detektion (Flammenionisation und IMS) sowie in der Auftrennung aufgrund unterschiedlicher GC-Trennsäulen (Länge, Durchmesser und stationäre Phase) und deren Anzahl (Heracles 2 nutzte zwei Säulen). Die Trennleistung der Systeme ist als unterschiedlich zu bewerten, dabei zeigte der FlavorSpec eine schlechte, der Heracles 2 und der HP 6890 eine geeignete Auftrennung. Ein Vergleich der beiden zuletzt genannten Systeme zeigt, dass der Heracles 2 mit Hinblick auf die Geschwindigkeit der Analytik dem HP 6890 überlegen ist, der wiederum durch seinen modularen Aufbau individueller an die zu analysierende Probe angepasst werden kann. Letztlich sind beide Systeme geeignet und können für diese oder ähnliche Fragestellungen verwendet werden.

Für folgende Messungen soll die GC HP 6890 verwendet werden. Die Auswahl dieses Systems gegenüber dem Heracles 2 ist weniger in den zuvor dargestellten Leistungen, die vergleichbar waren, begründet, als vielmehr in der Verbreitung und der Flexibilität. Als Bestandteil in der Routineanalytik können entwickelte Methoden auf andere Systeme übertragen werden, sodass diese ubiquitärer eingesetzt werden können. Durch Wechsel der GC-Trennsäule oder Nutzung eines anderen Detektors (z.B. Massenspektrometer) lässt sich die jeweilige Methode an die Probe anpassen und der Informationsgewinn kann gesteigert werden. Die Identifikation einzelner geruchsaktiver, flüchtiger Verbindungen ist mit diesem System möglich und Veränderungen über die Zeit können molekular erfasst werden. Somit ist die Nutzung eines klassischen Gaschromatographen für die Bewertung eines Fleischaromas zu empfehlen.

## 3.3 Erfassung flüchtiger Verbindungen eines Fleischaromas

### 3.3.1 Einleitung

Eine gesteigerte Akzeptanz von Arzneiformen kann durch Zusatz von Aromastoffen erreicht werden (Courbet et al. 2008). Der Einsatz dieser Aromastoffe bedingt, dass der Geruch oder Geschmack gemäß der Richtlinie ICH Q8(R2) als kritisches Qualitätsattribut für die Akzeptanz angesehen wird (ICH-Q8 2009). Sie unterliegen damit vorgegeben regulatorischen Anforderungen, sodass qualitätsbestimmende organoleptische Verbindungen in der Qualitätskontrolle erfasst werden sollten (EMA 2013). Mithilfe von Geschmacks- oder Geruchsstudien sind diese zu identifizieren und anhand geeigneter analytischer Verfahren zu quantifizieren. Eine besondere Berücksichtigung erfahren dabei flüchtige Verbindungen, da sie durch Verdampfen dem System entzogen werden und so eine thermodynamisch instabile Formulierung bewirken. Sind die qualitätsbestimmenden Verbindungen im Aroma identifiziert, so kann die quantitative Veränderung während der Lagerung mit Studien verglichen und eine Wahrnehmungsschwelle für diese Verbindungen definiert werden. Anhand der Ergebnisse könnten Spezifikationen für das Aroma definiert und die Qualität beurteilt werden.

Bezogen auf die Fleischaromen waren Fütterungsstudien, wie auch schon in Abschnitt 3.1.3 dargelegt, nicht sinnvoll. Damit diese Aromen dennoch qualitätsbezogen beschrieben werden können, war ein analytisches Verfahren für die Qualitätskontrolle geruchsaktiver Fleischaromen zu entwickeln. Dieses sollte in der Lage sein, Veränderungen der Modellsubstanz PLP anhand ausgewählter Verbindungen zu erfassen. Basierend auf den gewonnen Erkenntnissen über Sensorsysteme zur Erfassung flüchtiger Verbindungen (Abschnitt 3.2) wurde dafür der GC HP-6890 genutzt.

### 3.3.2 Methodenentwicklung

#### 3.3.2.1 Identifikation von Leitverbindungen und einem internen Standard

Es konnte eine Methode entwickelt werden, mit der eine chromatographische Auftrennung der flüchtigen Verbindungen des Aromas PLP möglich ist (siehe Anhang 7.1.1). Für eine quantitative Aussage über Änderungen in der Zusammensetzung der Gasphase mussten die enthaltenen Verbindungen bekannt sein. Zu quantifizierende Verbindungen sollten olfaktorisch aktiv und in der Literatur als Geruchsstoffe für Fleisch und Fleischprodukte beschrieben sein. Bei dieser Methode wurde die Anzahl zu quantifizierender Verbindungen auf

sechs begrenzt. Für die Identifikation der Verbindungen wurde die Methode in der bisherigen Entwicklungsstufe auf einen Gaschromatographen, der mit einem Massenspektrometer gekoppelt war, transferiert. Die aufgezeichnete Massenspur wurde mit einer Datenbank (NIST 5.0) abgeglichen, um mögliche Kandidaten zu identifizieren.

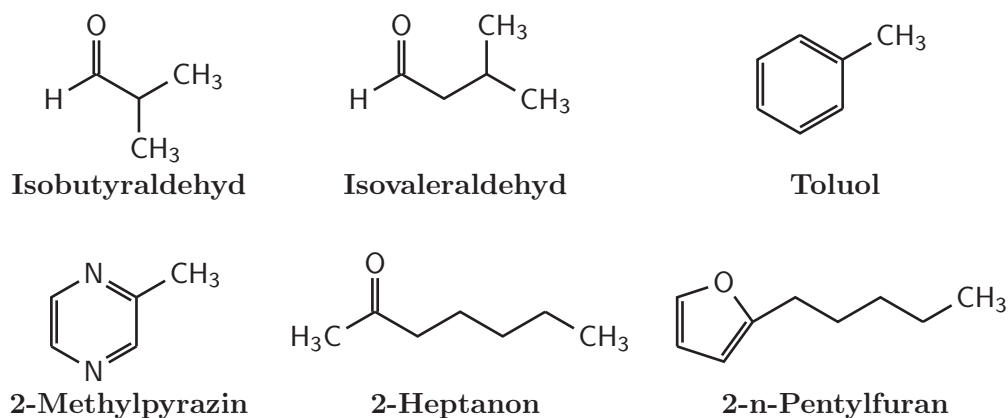
**Tabelle 3.4:** Auflistung der Moleküle, die mittels Massenspektrometer erfasst und mit der Datenbank (NIST 5.0) identifiziert wurden.

Molekül	Retentionszeit [min]	Bestimmtheit [%]
<b>2-Methylpropanal</b>	10,23	91
<b>3-Methylbutanal</b>	16,40	91
2-Methylbutanal	16,84	90
2-Ethylfuran	17,81	91
Dimethyldisulfid	20,88	97
<b>Toluen</b>	21,67	94
Oktan	22,08	95
1-Pentanol	23,08	86
2-Hexanon	23,75	90
Hexanal	24,04	90
<b>2-Methylpyrazin</b>	25,05	91
<b>2-Heptanon</b>	28,28	83
2,5-Dimethylpyrazin	28,81	94
<b>2-Pentylfuran</b>	31,32	87
Dimethyltrisulfid	31,62	90
1-Okten-3-ol	31,89	83
Benzaldehyd	31,99	96
2-Ethyl-6-methylpyrazin	32,26	95
2-Octanon	32,24	81

Die Wahrscheinlichkeit der korrekten Bestimmung (NIST-Wahrscheinlichkeit) war für 19 Verbindungen größer als 80 % (Tabelle 3.4). Von diesen Verbindungen wurden sechs Verbindungen ausgewählt und mittels Vergleichssubstanzen bei unterschiedlichen Methodenparametern (Heizrate und Trägergasfluss) bestätigt (Tabelle 3.4 fett gedruckt/ Strukturformel 3.2). Die Verbindungen wurden zwischen der 10. und 32. Minute eluiert, waren mit unterschiedlichen Signalflächen (mögliche Konzentration) in der Probe enthalten und in der Literatur als geruchsaktiv beschrieben.

Die Aldehyde Isobutyraldehyd (2-Methylpropanal) und Isovaleraldehyd (3-Methylbutanal) weisen einen malzartigen Geruch auf und sind bekannte Fermentationsprodukte von Fleisch und Fleischprodukten (Mottram 1985; Hinrichsen und Andersen 1994; Holm et al. 2012). Beide Aldehyde können über die hitzeinduzierte Strecker-Reaktion von Aminosäuren mit reduzierenden Zuckern, aus Fetten und Lipiden sowie über eine bakterielle Fermentation

gebildet werden (Strecker 1862; Mottram 1985; Smit et al. 2009). Bei letzterer wird aus Leucin und Threonin zuerst  $\alpha$ -Ketoisocaproensäure gebildet, welche durch enzymatische Decarboxylierung zu Isovaleraldehyd oder in Anwesenheit von Mangan zu Isobutyraldehyd umgewandelt werden kann (Tucker und Morgan 1967; Smit et al. 2004).



**Strukturformel 3.2:** Strukturformeln der ausgewählten Verbindungen.

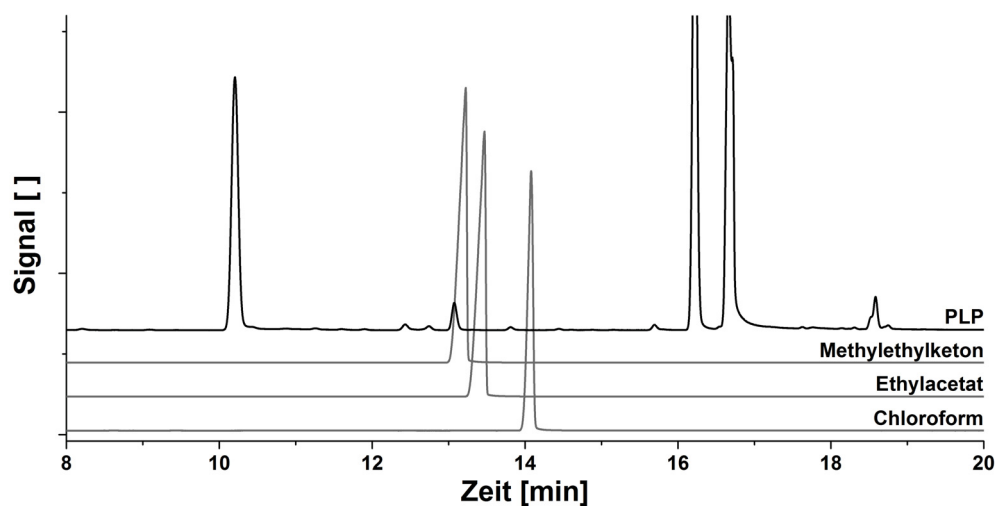
Toluol wurde ausgewählt, da es als Umweltgift ein geeigneter Indikator für eine mögliche Kontamination der Ausgangsmaterialien (Schweineleber) darstellt sowie als Lösungsmittel der Klasse 2 in einer maximalen Konzentration von 890-ppm in einem Arzneimittel enthalten sein darf und nur in einer Menge von 8,9 mg/Tag aufgenommen werden darf (ICH-Q3C R5).

Alkylpyrazine sind geruchsaktive Verbindungen, die aus Aminosäuren und anderen oxidierbaren Verbindungen, wie z.B. Ascorbinsäuren gebildet werden können (Vázquez-Araújo et al. 2009; Adams und Kimpe 2009). Als Röstaromen weisen sie einen charakteristischen Geruch auf und werden beim Erhitzen von Fleisch und der Röstung von z.B. Mandeln gebildet (Mottram 1985; Vázquez-Araújo et al. 2009). Exemplarisch für diese Gruppe geruchsaktiver Verbindungen wurde 2-Methylpyrazin gewählt.

2-Heptanon wird in der Literatur ebenfalls im Zusammenhang mit geruchsaktiven Verbindungen (Geruch nach Blauschimmelkäse) aufgeführt (van Ruth 2001). Es kann sowohl im Rahmen der Zersetzung von Fetten und Fettsäuren als auch von Aminosäuren gebildet werden (Larick et al. 1992; Sunesen et al. 2001; Machiels et al. 2003). Die Verbindung 2-n-Pentylfuran weist einen lakritzartigen Geruch auf und ist unter anderem ein Oxidationsprodukt der Linolensäure (Smouse und Chang 1967; Min et al. 2003). Sie entsteht während der Zersetzung öligere Anteile von Fleisch und Fleischprodukten (Krishnamurthy et al. 1967; Machiels et al. 2003; Larick et al. 1992).

Der bei diesen Untersuchungen verwendete Gaschromatograph verwendet einen Teiler im Einlass des Gaschromatographen. Da das Teilungsverhältnis dabei geringfügigen Schwankungen unterliegt ist die quantitative Erfassung der Analyten nur in Anwesenheit

eines internen Standards möglich (Rücker et al. 2008). Der interne Standard wird dazu als Bezugsgröße der Probenlösung und der Standardlösung zugesetzt. Er sollte nicht in der Probe enthalten sein und das Signal sollte keine Überlagerungen mit Signalen der Probe zeigen. Außerdem sollte er reaktionsträge sein und keine Wechselwirkungen mit der Probe eingehen. In der Regel wird darauf geachtet, dass die Signalfäche des internen Standards mit der Signalfäche der zu bestimmenden Verbindung übereinstimmt. Da allerdings alle sechs ausgewählten Leitverbindungen in einem unterschiedlichen Maße im PLP vertreten waren, konnte diese Vorgabe nicht eingehalten werden. Die Signalfäche des internen Standards sollte daher zukünftig dem Mittelwert der Signalfächen der Proben entsprechen (Rücker et al. 2008).



**Abbildung 3.18:** Chromatogramme von PLP sowie drei möglichen Verbindungen Chloroform, Ethylacetat und Methylethylketon, die als interner Standard getestet wurden (Methodenparameter siehe Anhang 7.1.3.2).

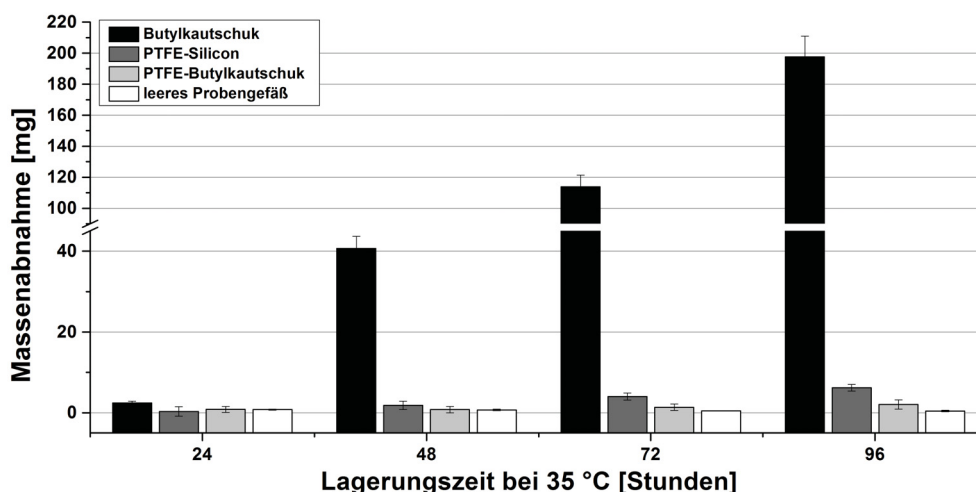
Die Chromatogramme von PLP zeigten zwischen der 11. und 16. Minute wenige Signale, sodass der interne Standard idealerweise innerhalb dieses Zeitraumes eluiert werden sollte. Die drei Verbindungen Ethylacetat, Methylethylketon und Chloroform werden innerhalb dieses Zeitraumes eluiert (Abbildung 3.18). Im Gegensatz zu Methylethylketon zeigten Chloroform und Ethylacetat keine Überlagerungen mit Signalen von PLP und waren somit als interner Standard gut geeignet. Da Chloroform jedoch mit einer deutlicheren Trennung von den Signalen des PLP eluiert wurde und es mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht während der Lagerung in der Probe gebildet wird, war es gegenüber Ethylacetat zu bevorzugen und wurde als interner Standard gewählt.



### 3.3.2.2 Die Probearbeitung und die Parameter des Probengebers

Bevor ein Probenmaterial mittels GC vermessen werden kann, muss die Probe in geeigneter Art und Weise aufgearbeitet werden. Damit die Probe möglichst wenig von außen beeinflusst wird, sollte sie in ihrem festen Aggregatzustand verbleiben. Jedoch liegen die Referenzsubstanzen in einem flüssigen Aggregatzustand vor.

In der Gaschromatographie gibt es zwei prinzipielle Möglichkeiten, die Probe bzw. einen Teil der Probe in den GC einzubringen: als Flüssigkeit oder als Gas. Für die Nutzung der Flüssiginjektion hätte die Probe in einem Lösungsmittel löslich und vollständig verdampfbar sein müssen. Da diese Bedingungen nicht erfüllt werden konnten, sollte die Probe als Gas in das System eingebracht werden. Dazu konnte entweder ein Teil der Gasphase über der Probe dem Probengefäß entnommen werden (z.B. Gasphasen-Probennahme) oder ein Adsorber in das Probengefäß eingebracht werden, welcher flüchtige Verbindungen der Probe aufnimmt und anschließend im GC wieder abgibt (z.B. Festphasenmikroextraktion) (Arthur und Pawliszyn 1990; Rucker et al. 2008). Um die physiologischen Vorgänge der Nase besser wieder zu spiegeln sowie um die Gefahr des Verbleibens bzw. der Nichtaufnahme von Verbindungen am Adsorber zu vermeiden, wurde sich für den Gasphase-Probengeber entschieden. Die Probe konnte dafür ohne weitere Vorbehandlungen in ein Probengefäß eingebracht werden. Dies wurde im Ofen des Probengebers erhitzt und ein definiertes Volumen der Gasphase über der Probe in den Injektor des GC eingebracht.

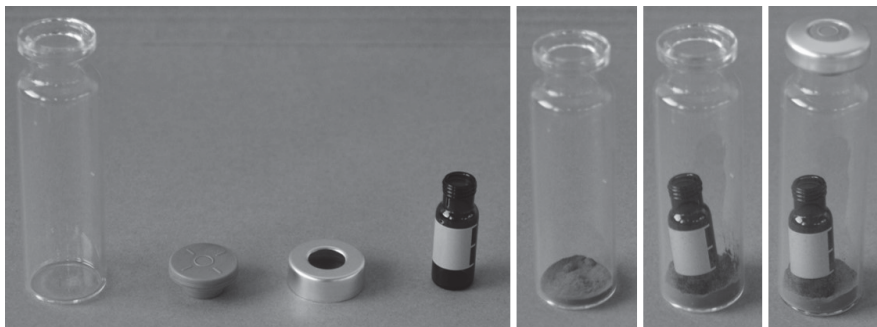


**Abbildung 3.19:** Massenabnahme von Probengefäßen, die mit 1,35 g Chloroform gefüllt und mit unterschiedlichen Stopfenmaterialien verschlossen worden waren ( $n = 3$ , Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung).

Die Probengefäße bestehen bei diesen Verfahren in der Regel aus Glas und können mit Stopfen aus unterschiedlichen Kunststoffen verschlossen werden. Zur Beurteilung der Durchlässigkeit dreier unterschiedlicher Stopfenmaterialien gegenüber dem internen

Standard Chloroform wurde die Massenänderung über die Zeit gravimetrisch bestimmt. Für Probengefäße, die mit Stopfen aus Butylkautschuk verschlossen waren, wurde der höchste Massenverlust über die Lagerungszeit festgestellt (Abbildung 3.19). Stopfen, die eine Polytetrafluorethylen-Schicht (PTFE, Teflon) enthielten, zeigten eine deutlich geringere Massenabnahme. Stopfen bestehend aus einer Schicht Teflon und dem Kunststoff Butylkautschuk (PTFE-Butylkautschuk) zeigten den geringsten Massenverlust über die Zeit und wurden für die weiteren Versuche verwendet. Polytetrafluorethylen ist aufgrund seiner Molekülstruktur sehr reaktionsträge und beständig gegenüber einer Vielzahl unterschiedlichster Verbindungen (Hanford und Joyce 1946). Es eignete sich somit zum Abdichten der Probengefäße.

Da der feste Aggregatzustand des Fleischaromas auch in den Probengefäßen erhalten bleiben sollte, aber die ausgewählten Leitsubstanzen und der interne Standard als Reinstoffe flüssig waren, musste eine räumliche Trennung zwischen beiden erfolgen. Ein vielversprechender Ansatz konnte durch Einbringen eines kleineren Gefäßes in das Probengefäß erreicht werden. Dabei befand sich die flüssige Phase im inneren Gefäß und die feste Probe am Boden des Probengefäß (Abbildung 3.20). Als Lösungsmittel wurde Wasser gewählt, da es im Flammenionisationsdetektor kein Signal zeigte und daher kein Signal der Probe überlagerte. Die Sorption von Wasser am Probenmaterial konnte durch Reduktion des Partialdampfdruckes von Wasser nach Zusatz von 20 % (m/m) Lithiumchlorid zur flüssigen Phase erzielt werden.



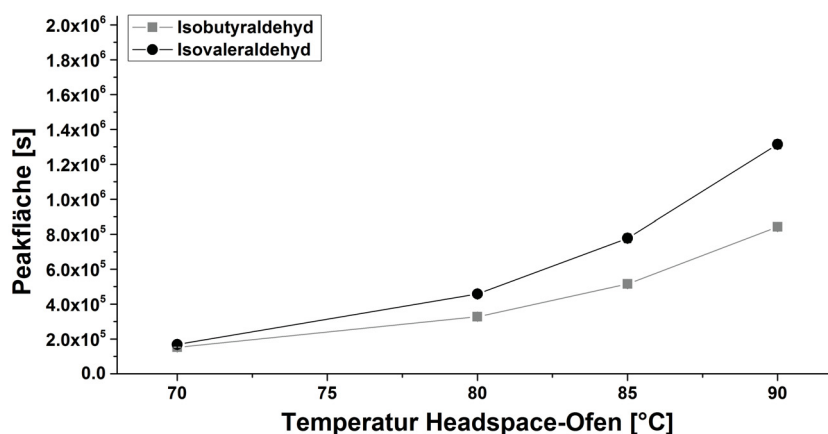
**Abbildung 3.20:** Probenpräparation für eine Probe PLP und eine flüssige Komponente.

Eine homogene Probenaufgabe mehrerer Proben kann bei einem Gasphasen-Probengeber nur erfolgen, wenn sich ein Gleichgewicht zwischen Probe und Gasphase im Probengefäß eingestellt hat. Basierend auf der Gleichung von Clausius und Clapeyron (Gleichung 3.7), steigt mit zunehmender Temperatur der Dampfdruck einer Verbindung. Folglich stellt sich ein temperaturabhängiges Gleichgewicht zwischen gasförmiger und kondensierter Form einer flüchtigen Verbindung in einem abgeschlossenen Raum ein. Dabei nimmt mit zunehmender Temperatur die Stoffmenge der flüchtigen Verbindung in der Gasphase

$$\frac{1}{p} dp = \frac{\Delta H_{m,v}}{R \cdot T} dT \quad (3.7)$$

- $p$  = Druck [N/m<sup>2</sup>]  
 $R$  = allgemeine Gaskonstante [J/K mol]  
 $T$  = Temperatur [K]  
 $\Delta H_{m,v}$  = molare Verdampfungsenthalpie [J/mol]

zu. Die Signalintensität einer Probe konnte daher über die Temperatur im Ofen des Probengebers gesteuert werden. Da die Signalstärke (Signalfläche) einen direkten Einfluss auf die Bestimmungs- und Nachweisgrenze hat, sollte die angestrebte Temperatur in einer möglichst hohen Signalstärke resultieren. Eingeschränkt wird die Temperatur durch den Siedepunkt der Grundlage (Wasser 100 °C) sowie einer möglichen Zersetzung der Probe. Daher wurden Proben bei unterschiedlichen Temperaturen im Ofen des Probengebers erhitzt und anschließend vermessen.



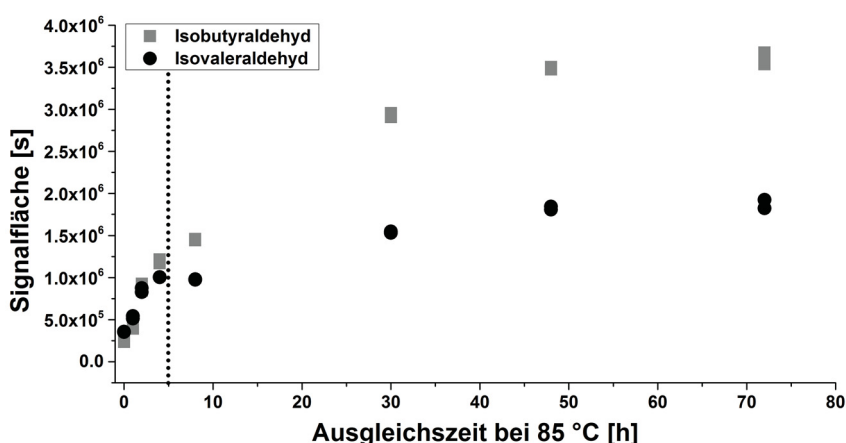
**Abbildung 3.21:** Einfluss der Ofentemperatur des Gasphasen-Probengebers auf die Signale von Isobutyraldehyd und Isovaleraldehyd einer Probe von 200 mg PLP (n = 3, Mittelwert ± Standardabweichung).

Beispielhaft für Isobutyraldehyd und Isovaleraldehyd in Abbildung 3.21 gezeigt, stieg die Anzahl flüchtiger Moleküle in der Gasphase, detektiert über die gemessene Signalfläche, mit zunehmender Temperatur im Ofen des Probengebers. Für beide Verbindungen war ein exponentieller Flächenzuwachs festzustellen, wobei die temperaturabhängige Zunahme von Isovaleraldehyd stärker als die von Isobutyraldehyd war. Unter Berücksichtigung der molaren Verdampfungsenthalpien, welche von Isovaleraldehyd mit  $\Delta H_{m,v} = 33,33 \pm 3,0$  kJ/mol größer ist als die von Isobutyraldehyd mit  $\Delta H_{m,v} = 30,90 \pm 3,0$  kJ/mol, war eine konträre Beobachtung zu erwarten (GESTIS 2014). Möglicherweise führten die Matrix oder die Anwesenheit anderer Verbindungen zu einer Siedepunkterhöhung von Isobutyraldehyd,

sodass die molare Verdampfungsenthalpie in diesem System von Isovaleraldehyd kleiner war als die von Isobutyraldehyd.

Obwohl die Sensitivität der Methode mit steigender Temperatur im Ofen zunahm, bestand gleichzeitig die Gefahr, dass Zersetzungen im Probenmaterial auftraten. Es war bekannt, dass die Temperatur einen Einfluss auf die Bildung der Verbindungen hatte, allerdings wurde dies bisher nur in Lösungen untersucht (Hofmann et al. 2000). Der Einfluss der Temperatur auf die Bildung bzw. Umsetzung dieser Verbindungen in Pulvern war daher unbekannt. Für eine ausreichende Empfindlichkeit der Methode wurde eine Temperatur von 85 °C gewählt.

Die Einstellung des Gleichgewichtes im Probengefäß ist nicht nur von der Temperatur, sondern auch von der Zeit, welche die Probe im Ofen des Probengebers verbringt (Equilibrierzeit), abhängig. Nachdem eine geeignete Temperatur im Ofen des Probengebers gefunden wurde, war es notwendig, die Zeitspanne zu bestimmen, die bis zur Einstellung des Gleichgewichtes im Probengefäß benötigt wurde. Über einen Zeitraum von 72 Stunden wurden Proben bei 85 °C in einem Heizschrank gelagert und zu unterschiedlichen Zeiten vermessen. Die aufgezeichneten Signalfächen (Abbildung 3.22) zeigten, dass sich für die



**Abbildung 3.22:** Einfluss der Zeit im Ofen des Gasphasen-Probengebers auf die Signale von Isobutyraldehyd und Isovaleraldehyd einer Probe von 200 mg PLP (n = 2).

exemplarisch aufgeführten Verbindungen Isobutyraldehyd und Isovaleraldehyd frühestens nach 50 Stunden (> 2 Tage) ein Gleichgewicht im Probengefäß eingestellt hatte. Dies impliziert, dass jede Probe mindestens 50 Stunden im Ofen des Probengebers verbleiben müsste, bevor sich in Bezug auf die hier untersuchten Verbindungen ein Gleichgewicht im Probengefäß eingestellt hätte. Dieser Zustand war nicht praktikabel, da er die Analysezeiten zu sehr verlängern würde. Aus der Anzahl an Proben, die gleichzeitig im Ofen des Probengebers gelagert werden konnten (5 Stück), und der GC-Laufzeit (50 Minuten plus 15 Minuten Kühlphase) ergab sich, dass fünf Stunden die maximal tolerable Equilibrierzeit einer Probe im Ofen des Probengebers waren. Obwohl sich nach fünf Stunden Ausgleichszeit

(Abbildung 3.22 gestrichelte Linie) noch kein Gleichgewicht im Probengefäß eingestellt hatte, musste aus Gründen der Praktikabilität diese Limitation hingenommen werden. Deshalb ist es umso wichtiger, dass für vergleichende Messungen die Equilibrierzeit genauestens eingehalten werden. Andernfalls könnte bei zukünftigen Messungen ein nicht vorhandener Konzentrationsunterschied fälschlicherweise gemessen werden.

Für das Einbringen der flüchtigen Verbindungen in den GC wurde der Gasphasen-Probengeber ausgewählt und Methodenparameter bestimmt. Als problematisch zeigte sich dabei die Verwendung eines Pulvers, da sich aufgrund möglicher Sorptions-Desorptions-Vorgänge ein Gleichgewicht im Probengefäß erst über einen sehr langen Zeitraum (>72 Stunden) einstellte, was eine sinnvolle Probenpräparation erschwerte. Ob die absolute quantitative Erfassung möglich war, galt zu prüfen. Eine relative Beurteilung der Signale sollte jedoch mit diesem System möglich sein.

### 3.3.3 Methodenvalidierung

Die Eignung der Methode zur qualitativen und quantitativen Erfassung der zu untersuchenden Verbindungen wird bei der Validierung geprüft. Dazu wurde die entwickelte Methode gemäß der Leitlinie ICH-Q2 (2005) hinsichtlich vorgegeben Kenngrößen untersucht.

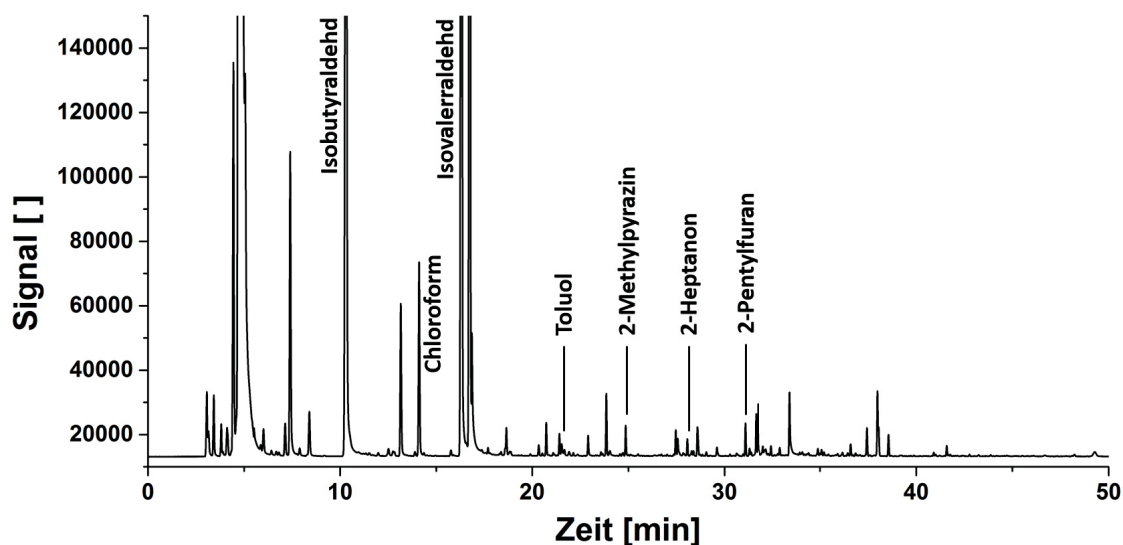


Abbildung 3.23: Beispielhaftes Chromatogramm einer Probe PLP mit Internem Standard.

Ausgewählte Leitverbindungen (Abschnitt 3.3.2.1) mussten in Anwesenheit der übrigen Signale (Abbildung 3.23) eindeutig unterschieden werden können. Anhand der Signalauflösung ( $r$ ) der Signale erfolgte eine Bewertung der Abgrenzung der Leitverbindungen von den umgebenden Signalen (USP-621 2010). Mit Ausnahme von Toluol und

2-Methylpyrazin konnte für die Leitverbindungen eine Basislinientrennung zu den umgebend Signalen ( $r \geq 1,5$ ) nachgewiesen werden (Tabelle 3.5). Für 2-Methylpyrazin und Toluol war von einer Koelution der Signale auszugehen und Teilflächen der umgebenden Signale wurden bei der Integration fälschlicherweise mit erfasst. Auf eine erneute Änderung der Methode wurde verzichtet, da dies möglicherweise zu einer schlechteren Auflösung anderer Signale geführt hätte.

**Tabelle 3.5:** Parameter zur Beurteilung der Spezifität der Methode, abgeleitet von einer Probe PLP (Bezeichnung PLP-005) vermessen am 25. Juni 2013.

Verbindung	Parameter		
	Retentionszeit [min]	Auflösung (r) zu	
		vorherigem Signal	zurückliegendem Signal
Isobutyraldehyd	10,30	5,47	1,78
Chloroform	14,11	2,04	2,05
Isovaleraldehyd	16,32	3,43	4,08
Toluol	21,53	0,96	1,46
2-Methylpyrazin	24,86	1,44	1,50
2-Heptanon	28,07	2,29	2,39
2-n-Pentylfuran	31,09	1,50	2,40

Für eine quantitative Erfassung der Leitverbindungen war ein linearer Zusammenhang zwischen Signalfäche (berechnet als Umrechnungsfaktor aus Signalfäche der Leitverbindung und der Signalfäche des internen Standards) und Konzentration des Analyten in der Probe notwendig. Mit einem Bestimmtheitsmaß von  $R^2 \geq 0,992$  konnte dieser lineare Zusammenhang für alle Leitverbindungen nachgewiesen werden. Der geringe Wert von  $R^2 = 0,992$  für 2-n-Pentylfuran war der geringen Konzentration in der Probe (0,07 ppm bis 5 ppm) sowie dem zeitlichen Abstand zwischen dem Signal der Substanz und dem Signal des internen Standards geschuldet.

Die Präzision des Systems (Wiederholpräzision) bzw. die Präzision der Methode macht eine Aussage über die Streuung der Ergebnisse, die durch das System bzw. die Methode verursacht werden. Akzeptable Werte für die Präzision der Methode und des Systems waren von der Konzentration des Analyten in der Probe abhängig; Methodenpräzision: Horwitz  $\sigma_{\%} = 2 \cdot c_{\%}^{-0,1505}$  und Systempräzision:  $\frac{1}{2} \cdot$  Methodenpräzision (CAC 2001; Taverniers et al. 2004). Für alle Verbindungen wurden entsprechende Werte nachgewiesen. Eine hoher Wert für die Methoden- bzw. Systempräzision von 2-Methylpyrazin war auf eine geringe Steigung der Regression zurückzuführen.

Mithilfe der Richtigkeit der Methode konnte bestimmt werden, um welchen Faktor (Prozentwert) die bestimmte Konzentration des Analyten von der wahren Konzentration

**Tabelle 3.6:** Parameter zur Beurteilung der Linearität der Methode für die ausgewählten Leitverbindungen.

Verbindung	Parameter		
	Steigung [ppm <sup>-1</sup> ]	Linearität Achsenabschnitt [ ]	R <sup>2</sup>
Isobutyraldehyd	0,098	-0,032	0,999
Isovaleraldehyd	0,113	0,049	0,999
Toluol	0,177	0,001	0,998
2-Methylpyrazin	0,007	-0,001	0,998
2-Heptanon	0,133	0,001	0,998
2-n-Pentylfuran	0,173	-0,026	0,992

abwich (Tabelle 3.7). Unter der Berücksichtigung der Konzentration der Leitverbindungen lagen die gefundenen Werte, von z.B. 2-n-Pentylfuran 80 % - 110 %, innerhalb des vorgegeben Bereiches (Taverniers et al. 2004; Gustavo González und Ángeles Herrador 2007).

Die Richtigkeit einer Methode wird durch Zusatz einer bekannten Konzentration der zu analysierenden Verbindung zu der umgebenden Matrix geprüft. Da in diesem Fall nur einzelne Verbindungen des Aromastoffes PLP bekannt waren, nicht jedoch dessen vollständige Zusammensetzung, konnte die Matrix des Aromastoffes nicht nachgebildet werden, sodass dieses Verfahren nicht genutzt werden konnte. Ein weiteres Verfahren, welches angewendet werden kann, ist das Standardadditionsverfahren. Dabei wird eine bekannte Konzentration einer Leitverbindung der Probe zugesetzt und die vorhandene Konzentration durch Extrapolation ermittelt. Da dieses Verfahren jedoch im PLP vermutete Sorptions-Desorptions-Vorgängen (Abbildung 3.22) ausschließt, war es ebenfalls nicht anwendbar.

**Tabelle 3.7:** Parameter zur Beurteilung der Präzision von Methode und System, der Richtigkeit und des Arbeitsbereiches (NG = Nachweisgrenze, BG = Bestimmungsgrenze, OG = Obere Grenze des Arbeitsbereiches) der Methode.

Verbindung	Parameter					
	Präzision [%]		Richtigkeit	Arbeitsbereich [ppm]		
	System	Methode	[%]	NG	BG	OG
Isobutyraldehyd	1,44	1,93	103,0	6,6	20,0	160,7
Isovaleraldehyd	1,50	2,23	103,2	10,6	32,3	262,0
Toluol	2,33	5,67	98,7	0,045	0,137	0,794
2-Methylpyrazin	3,97	6,41	104,2	1,15	3,48	20,27
2-Heptanon	1,41	1,23	102,8	0,083	0,251	1,75
2-n-Pentylfuran	0,92	2,40	109,6	0,518	1,57	4,60

Der Konzentrationsbereich, in dem die Methode die Leitverbindungen erfassen kann, wurde zu niedrigen Konzentrationen durch die Bestimmungsgrenze BG sowie die Nachweisgrenze NG und zu hohen Konzentrationen durch die höchste Konzentration des nachgewiesenen linearen Bereiches OG begrenzt. Bestimmungsgrenze BG und Nachweisgrenze NG wurden aus der Residuenstandardabweichung und der Steigung der Regressionsgerade berechnet (ICH-Q2 2005). Dieser Arbeitsbereich (Tabelle 3.7) war für die Erfassung der Leitverbindungen notwendig, da nicht bekannt war ob die Konzentration einzelner Verbindungen zwischen unterschiedlichen Chargen oder im Laufe der Lagerung eine Zunahme oder Abnahme zeigen.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass mit dem entwickelten analytischen Verfahren eine qualitative und quantitative Erfassung der ausgewählten Leitverbindungen valide möglich ist.

### 3.3.4 Zusammenfassung

Es konnte ein analytisches Verfahren zur quantitativen Erfassung ausgewählter flüchtiger Verbindungen des Fleischaromas *Spray dried Pork Liver Powder EHT* (Aromastoff aus Schweineleber) entwickelt und validiert werden. Basierend auf den Erkenntnissen über elektronischen Nasen aus Abschnitt 3.2 wurde dazu ein Gaschromatograph genutzt, der mit einem Gasphasen Probengeber kombiniert wurde. Durch Auswahl einer geeigneten Trennsäule konnten flüchtigen Verbindungen des Fleischaromas in einem Messlauf aufgetrennt und molekular identifiziert werden. Von diesen wurden olfaktorisch aktive Verbindungen, die für Fleisch und fleischartige Produkte charakteristisch sind, für die quantitative Erfassung ausgewählt. Nach Optimierung der Parameter des Probengebers konnte erfolgreich eine Validierung der Methode durchgeführt werden. Das entwickelte Verfahren war damit in der Lage, die ausgewählten Leitverbindungen Isobutyraldehyd, Isovaleraldehyd, Toluol, 2-Methylpyrazin, 2-Heptanon und 2-n-Pentylfuran valide zu bestimmen und eignete sich daher zur Erfassung und Bewertung von Veränderungen des Fleischaromas *Spray dried Pork Liver Powder EHT* (Aromastoff aus Schweineleber). Im Folgenden bleibt zu prüfen, ob mit diesem Verfahren qualitätsrelevante Unterschiede gefasst werden können.



## 3.4 Qualitätsbezogene Veränderungen des Fleischaromas Pork Liver Powder

### 3.4.1 Einleitung

Um herauszufinden, ob die zuvor entwickelte Methode qualitätsbezogene Veränderungen des Fleischaromas PLP erfassen kann, sollten unterschiedliche Untersuchungen durchgeführt werden. So sollte geprüft werden, ob die entwickelte Methode anhand der ausgewählten Leitverbindungen Veränderungen von PLP während der Lagerungen unter Stressbedingungen erfassen kann. Die Erkenntnisse sollten für die Bewertung der Chargenhomogenität und der Chargenkonformität des Fleischaromas genutzt werden. Abschließend sollte untersucht werden, wie sich die ausgewählten Verbindungen während der für flüchtige Verbindungen kritischen Trocknung eines Feuchtgranulates verhalten. Anhand der Ergebnisse sollte schlussendlich geprüft werden, ob diese Methode für die Bewertung des kritischen Qualitätsattributes „Geruch“ genutzt werden konnte.

### 3.4.2 Veränderungen des Fleischaromas Pork Liver Powder während der Lagerung

Zur Bewertung von Veränderungen der Leitsubstanzen im PLP während der Lagerung wurden Tabletten aus PLP ohne Zusatz von Hilfsstoffen gepresst und bei unterschiedlichen klimatische Bedingungen, Temperatur und relative Luftfeuchte (r.F.), über sechs Monate gelagert. Die Lagerung erfolgte dabei unter Stressbedingungen in offenen Gefäßen in einer Hygrostatenkammer, um innerhalb eines relativ kurzen Zeitraumes Veränderungen über einen längeren Lagerungszeitraum abschätzen zu können. Die Lagerungsbedingungen (25 °C / 65 % r.F., 30 °C / 75 % r.F. und 40 °C / 75 % r.F.) wurden gemäß der ICH Richtlinie Q1A ausgewählt (ICH-Q1A 2003). Zur Beurteilung des Einflusses der relativen Luftfeuchtigkeit (r.F.) wurde zusätzlich eine Lagerungsbedingung von 25 °C und 11 % r.F. gewählt. Im Anschluss an die Lagerung wurde der Gehalt der Leitverbindungen in den Tabletten mit der in Abschnitt 3.3 entwickelten Methode analysiert. In den Abbildungen 3.24 und 3.25 sind die Ergebnisse als relative Gehaltsänderung bezogen auf den Startwert dargestellt.

Bei einer Temperatur von 25 °C und einer r.F. von 11 % waren die beobachteten Veränderungen am geringsten. Mit höherer Temperatur und Luftfeuchtigkeit änderte sich die Zusammensetzung deutlich. 2-Heptanon und 2-n-Pentylfuran verhielten sich dabei konträr zu den übrigen Verbindungen und zeigten eine Gehaltszunahme über die Lagerungszeit.

Ein Vergleich der beiden Aldehyde zeigte, dass sie sich bei den schonendsten Bedingungen

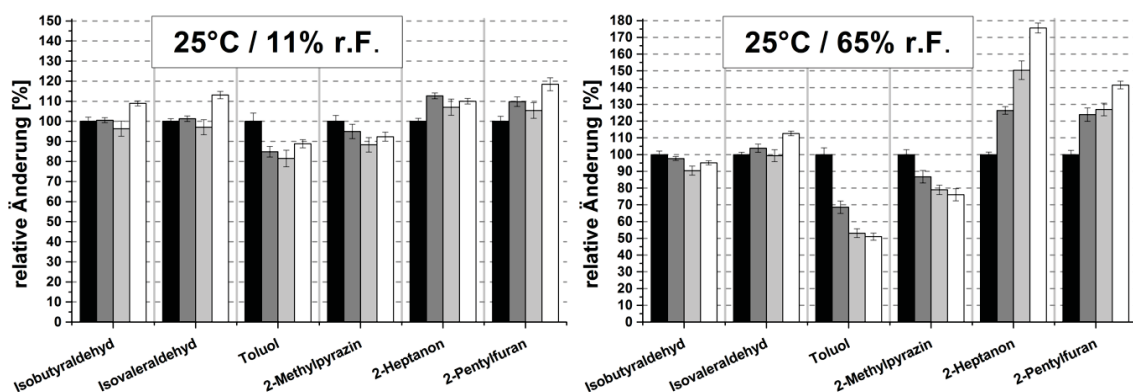


Abbildung 3.24: Relative Gehaltsänderung bezogen auf den Startwert bei einer Lagerung von 25 °C und einer r.F. von 11 % bzw. 65 % über einen Zeitraum bis sechs Monate (Schwarz = Start, Dunkelgrau = 1. Monat, Hellgrau = 3. Monat, Weiß = 6. Monat, n = 12, Mittelwert  $\pm$  KI 95 %).

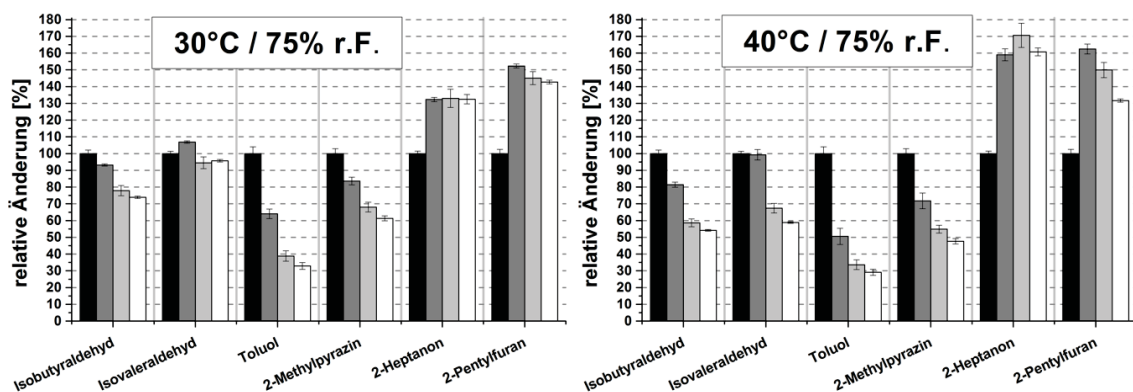
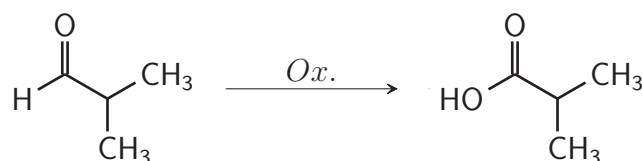


Abbildung 3.25: Relative Gehaltsänderung bezogen auf den Startwert bei einer Lagerung von 30 °C bzw. 40 °C und einer r.F. von 75 % über einen Zeitraum bis sechs Monate (Schwarz = Start, Dunkelgrau = 1. Monat, Hellgrau = 3. Monat, Weiß = 6. Monat, n = 12, Mittelwert  $\pm$  KI 95 %).

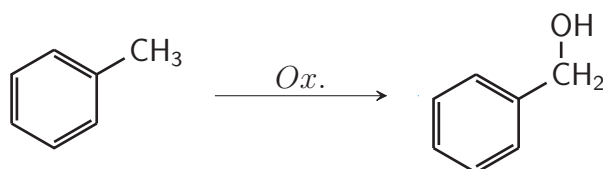
(25 °C / 11 % r.F.) ähnlich verhielten und keine Abnahme zeigten. Die Ursache für einen Anstieg des Gehaltes nach sechs Monaten Lagerung von ca. 10 % konnte nicht erklärt werden. Während die Konzentration von Isovaleraldehyd bei einem Anstieg der Luftfeuchtigkeit (25 °C / 65 % r.F.) und einem Anstieg der Temperatur (30 °C / 75 % r.F.) relativ konstant blieb, nahm die Konzentration von Isobutyraldehyd über einen Zeitraum von sechs Monaten leicht ( $\sim$  5 %) bzw. stark ( $\sim$  25 %) ab. Bei Bedingungen von 40 °C und 75 % r.F. nahm die Konzentration beider Verbindungen um mehr als 40 % ab. Im Gegensatz zu Isobutyraldehyd setzte die Abnahme von Isovaleraldehyd jedoch erst zwischen dem ersten und dritten Monat ein. Das unterschiedliche Verhalten beider Verbindungen war durch unterschiedliche Siedepunkt von 63 °C für Isobutyraldehyd und 92 °C für Isovaleraldehyd zu erklären. Isobutyraldehyd hat den niedrigeren Siedepunkt und einen höheren Dampfdruck. Deshalb wurde es dem System schneller entzogen als Isovaleraldehyd, welches einen höheren Siedepunkt und damit einen niedrigeren Dampfdruck hat. Zusätzlich muss davon ausgegangen werden, dass beide Aldehyde durch Temperatur und Luftsauerstoff zu der korrespondierenden



**Reaktionsgleichung 3.2:** Oxidative Umwandlung eines Aldehydes zu der korrespondierenden Carbonsäure am Beispiel von Isobutyraldehyd.

Carbonsäure (Reaktionsgleichung 3.2) oxidiert werden. Dies ist auch ein möglicher Grund, weshalb die Veränderung beider Verbindungen vornehmlich durch die Temperatur und weniger durch die Luftfeuchtigkeit beeinflusst wurde.

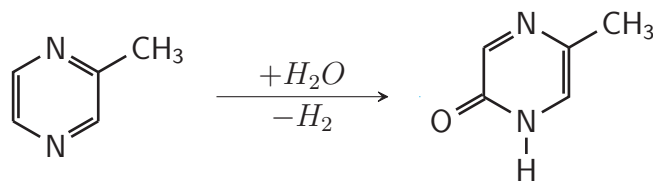
Für Toluol und 2-Methylpyrazin war eine konstante Abnahme auf < 30 % bzw. < 50 % des Startwertes (40 °C & 75 % r.F.) über die Lagerungszeit von sechs Monaten zu beobachten. Dabei war die Abnahme von Toluol deutlich stärker als die von 2-Methylpyrazin. Es zeigte sich, dass die Luftfeuchtigkeit den bedeutenderen Einfluss auf die Konzentration von Toluol in den Proben hatte als die Temperatur. So war die Abnahme bei Erhöhung der Luftfeuchtigkeit von 11 % r.F. auf 65 % r.F. ausgeprägter als bei Erhöhung der Temperatur. Für 2-Methylpyrazin war der Einfluss der Temperatur (30 °C auf 40 °C) und der Luftfeuchtigkeit (11 % r.F. auf 65 % r.F.) auf die Konzentrationsabnahme ähnlich stark ausgeprägt.



**Reaktionsgleichung 3.3:** Beispiel einer radikalischen Substitution von Toluol mit Sauerstoffradikalen zu Benzylalkohol unter Lichteinstrahlung in der Atmosphäre.

Toluol zeigt an der Luft Oxidationsreaktionen (Reaktionsgleichung 3.3) mit Hydroxyl-Radikalen und wird im Boden durch Bakterien, vorwiegend Pseudomonaden, abgebaut (EPA-Toluene 1994; Shaw und Harayama 1992; Shields et al. 1995). Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass Toluol verdunstet und so der gepressten Tablette entzogen wurde. Welcher dieser Wege dominierend ist, konnte schwer abgeschätzt werden. Es ist allerdings zu vermuten, dass bakterielle Zersetzungsreaktionen in dem Gut von untergeordneter Bedeutung waren.

Die Reduktion der Konzentration von 2-Methylpyrazin in der Tablette während der Lagerung könnte unterschiedliche Ursachen haben. Aufgrund der verminderten Elektronendichte im Ringsystem könnte die nukleophile Substitution (Reaktionsgleichung 3.4) vermehrt ablaufen, sodass 2-Methylpyrazin in der Tablette umgewandelt wurde.



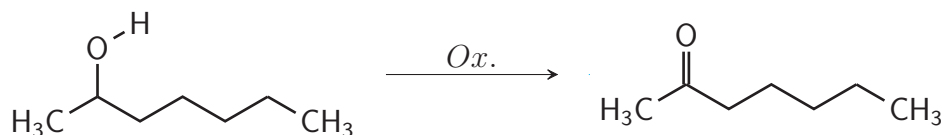
**Reaktionsgleichung 3.4:** Beispiel einer nukleophilen Substitution eines Protons von 2-Methylpyrazin mit Sauerstoff.

Außerdem konnte 2-Methylpyrazin ähnlich wie 2,3-Diethyl-5-Methylpyrazin einer bakteriellen Zersetzung unterliegen (Rappert et al. 2006). Auch hier muss davon ausgegangen werden, dass 2-Methylpyrazin (Siedepunkt (Sdp.) 135 °C) über den Lagerungszeitraum verdampfte. Welche der aufgeführten Wege dominierend war, kann nicht bestimmt werden. Es muss davon ausgegangen werden, dass mehrere Faktoren die Änderungen während der Lagerung hervorrufen.

Anders als bei den bisher aufgeführten Verbindungen wurde für 2-Heptanon und 2-n-Pentylfuran ein Anstieg der Konzentrationen über die Zeit beobachtet. Bei Bedingungen von 25 °C / 11 % r.F. ist ein geringer Anstieg von 10 % bzw. 18 % bezogen auf den Ausgangswert über den untersuchten Zeitraum festzustellen. Ein Anstieg der Luftfeuchtigkeit auf 65 % r.F. führt zu einem Anstieg der Konzentration beider Verbindungen in der Tablette auf 75 % bzw. 42 % bezogen auf den Ausgangswert nach sechs Monaten Lagerung (Abbildung 3.24). Wurden Temperatur und Luftfeuchtigkeit auf 30 °C und 75 % angehoben, so war nach einem Monat ein Konzentrationsanstieg zu beobachten, der jedoch zum dritten und sechsten Monat bei 30 % bzw. 40 % bezogen auf den Ausgangswert stagnierte. Ähnliche Beobachtungen wurden bei Bedingungen von 40 °C / 75 % r.F. gemacht, jedoch wurde für 2-n-Pentylfuran nach dem dritten Monat eine Abnahme der Konzentrationen gefunden.

In beiden Fällen muss davon ausgegangen werden, dass es sich um Produkte einer Zersetzungsreaktion handelt. Eine Möglichkeit ist die von Min et al. (2003) beschriebene oxidative Umwandlung von Linolensäure zu 2-n-Pentylfuran. Es lässt sich daher weiter vermuten, dass 2-n-Pentylfuran eines von mehreren oxidativen Zersetzungsprodukten von Fetten und Fettsäuren ist und während der Lagerung gebildet wird. Anders verhält es sich für 2-Heptanon, da für diese Verbindung kein Reaktionsschema in der Literatur gefunden werden konnte, welches dessen Bildung während der Lagerung von Fleisch und Fleischprodukten erklären könnte. Die oxidative Bildung von 2-Heptanon aus dem korrespondierendem Alkohol 2-Heptanol scheint daher am wahrscheinlichsten (Reaktionsgleichung 3.5).

Offensichtlich ist für beide Verbindungen, dass sie wiederum eine Umsetzung / Veränderung erfahren. Deshalb nimmt ihre Konzentration bei einer Temperatur von 30 °C oder mehr nicht weiter zu. So besteht die Möglichkeit, dass sie entweder eine chemische Umsetzung erfahren oder aufgrund ihres Dampfdruckes (Sdp. 2-Heptanon = 151 °C / Sdp.



**Reaktionsgleichung 3.5:** Oxidative Bildung eines Ketons aus dem korrespondierenden Alkohol am Beispiel der Umsetzung von 2-Heptanol zu 2-Heptanon.

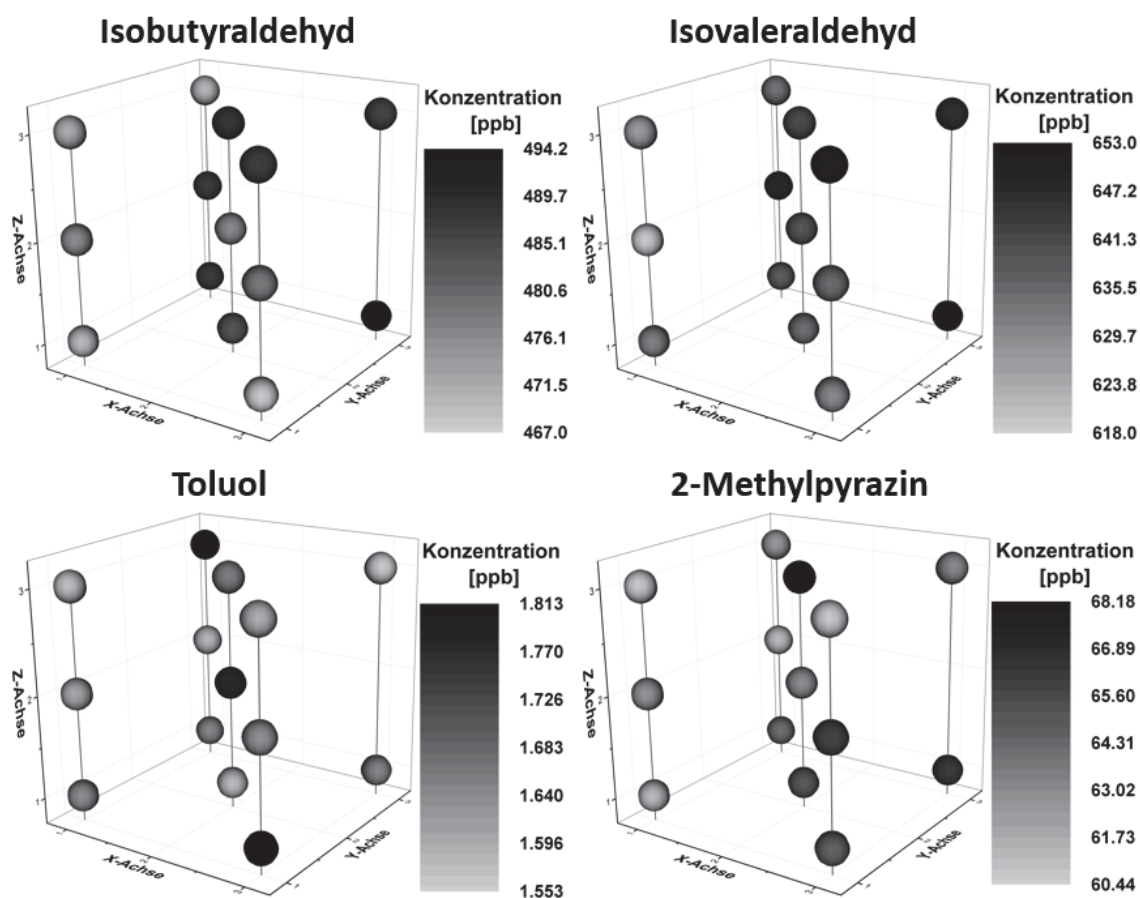
2-n-Pentylfuran = 167 °C) durch Verdampfung dem System entzogen werden. Festzuhalten bleibt, dass die Reaktion, welche zur Bildung beider Verbindungen führt, vornehmlich durch die Luftfeuchtigkeit gesteuert wird (Abbildung 3.24). Die Reduktion der beiden Verbindungen wird zum größten Teil über die Temperatur gesteuert (Abbildung 3.25).

Es wurden für die ausgewählten Leitverbindungen Zersetzungsreaktionen und Zersetzungsketten aufgezeigt, allerdings wurden auf die Anwesenheit der jeweiligen Ausgangsverbindungen für die Bildung von 2-n-Pentylfuran und 2-Heptanon sowie der Zersetzungsprodukte von Isobutyraldehyd, Isovaleraldehyd, Toluol und 2-Methylpyrazin nicht weiter untersucht.

Anhand der ausgewählten Verbindungen und der Erkenntnisse dieser Lagerungsstudie unter Stressbedingungen können Veränderungen von PLP in Abhängigkeit der Lagerungsbedingungen und der Lagerungszeit identifiziert werden. Es konnte ein Zusammenhang zwischen Zu- bzw. Abnahme der Verbindungen und den klimatischen Bedingungen aufgezeigt werden. In zukünftigen Untersuchungen gilt es zu prüfen, ab welcher Konzentrationsänderung eine Änderung des olfaktorischen Sinnesindrucks auftritt. Dadurch könnten eindeutige Grenzen zur Festlegung der Spezifikation von PLP definiert werden.

### 3.4.3 Chargenhomogenität des Fleischaromas Pork Liver Powder

Im folgenden Versuch sollte untersucht werden, ob die ausgewählten Verbindungen eine Aussage über die Zusammensetzung eines Gebindes PLP ermöglichen. Das Gebinde sollte dafür hinsichtlich seiner Homogenität in Bezug auf die Leitverbindungen untersucht werden und Unterschiede unter Berücksichtigung der Vorkenntnisse aus der Lagerungsstudie unter Stressbedingungen (Abschnitt 3.4.2) interpretiert werden. In einem Gebinde von PLP der Charge 61A30199-I wurden an fünf Positionen in drei Ebenen 15 Proben (siehe Abschnitt 6.2.4 - Homogenitätsuntersuchung) entnommen und diese hinsichtlich des Gehaltes der sechs ausgewählten Verbindungen analysiert. Es wurde die validierte Probengröße von 150 mg pro Probengefäß genutzt, da diese der üblichen Menge des Hilfsstoffes in einer Arzneiform entsprach. Dieser wird in zugelassenen Darreichungsformen zu 500 mg Gesamtgewicht mit einem Anteil von 30 %  $\approx$  166 mg eingesetzt. Aufgrund eines Präparationsfehlers musste die Probe „2-Mitte“ von der Auswertung ausgeschlossen werden.



**Abbildung 3.26:** Bestimmte Konzentrationen der untersuchten Verbindungen (A = Isobutyraldehyd, B = Isovaleraldehyd, C = Toluol, D = 2-Methylpyrazin) in einem 20 kg Gebinde des Gemisches Pork Liver Powder der Charge 61A30199-I (X-Y-Ebene = Aufsicht, X-Z-Ebene = Frontansicht, Y-Z-Ebene = Seitenansicht rechts,  $n = 6$ , Mittelwert).

Bei der Auswertung der erfassten Konzentrationen zeigte sich, dass in einer Einwaage von 150 mg PLP der Gehalt an 2-n-Pentylfuran kleiner als 1,57 ppm und der an 2-Heptanon kleiner als 0,251 ppm war. In beiden Fällen war somit die Bestimmungsgrenze nicht überschritten und eine Quantifizierung nicht möglich. Die Auswertung umfasste daher nur Isobutyraldehyd, Isovaleraldehyd, Toluol und 2-Methylpyrazin.

Für die verbleibenden Verbindungen ist die Konzentrationen am jeweiligen Probenort in Abbildung 3.26 farblich codiert dargestellt. Für Isobutyraldehyd ist eine relative Streuung von 6,1 %, für Isovaleraldehyd von 12,5 %, für Toluol von 17,5 % und für 2-Methylpyrazin von 16,6 % zu finden. Die beiden Aldehyde fanden sich in ähnlicher konzentrationsabhängiger Verteilung in diesem Gebinde wieder. Toluol und 2-Methylpyrazin wiesen eine abweichende Verteilung auf. Ob die gefundenen Unterschiede zwischen den Probenorten durch das Analysenverfahren oder durch tatsächliche Unterschiede zwischen den Probenorten zu erklären waren, sollte mit einer Varianzanalyse (einfaktorielle ANOVA) geprüft werden. Wie in Tabelle 3.8 gezeigt, konnte für Isovaleraldehyd ein nicht signifikanter Unterschied ( $p \geq$

0,05) festgestellt werden. Dies bedeutet, dass Isovaleraldehyd mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % homogen in diesem Gebinde verteilt war. Dies entsprach den Erkenntnissen der Lagerungsstudie (Abschnitt 3.4.2), in denen Isovaleraldehyd am unempfindlichsten für äußere klimatische Einflüssen war. Für die übrigen Verbindungen wurde ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ) errechnet. Dabei war die Varianz am Probenort kleiner als die Varianz zwischen den einzelnen Probenorten. Es muss folglich davon ausgegangen werden, dass Isobutyraldehyd, Toluol und 2-Methylpyrazin nicht homogen in dem Gebinde verteilt waren.

**Tabelle 3.8:** Ergebnis der Varianzanalyse für die untersuchten Substanzen hinsichtlich der Homogenität eines Gebinde PLP der Charge 61A30199-I.

Substanz	ANOVA	
	F-Wert	p-Wert
Isobutyraldehyd	1,886	0,047
Isovaleraldehyd	0,926	0,531
Toluol	5,066	0,000
2-Methylpyrazin	2,629	0,005
2-Heptanon	—	—
2-n-Pentylfuran	—	—

Für nicht einheitlich verteilte Verbindungen wurde erwartet, dass sie in Abhängigkeit der klimatischen Bedingungen am jeweiligen Ort im Gebinde eine Veränderung erfuhren. Sollte dies zutreffen, so wären charakteristische Muster in der Verteilung der Verbindungen im Gebinde zu erwarten gewesen. Da für diese drei Verbindungen (Isobutyraldehyd, Toluol und 2-Methylpyrazin) in der Lagerungsstudie eine Konzentrationsabnahme über die Lagerungszeit nachgewiesen worden war, hätten Probenorte mit verringerter Konzentration eine stärkere klimatische Beeinflussung erfahren. Umso fragwürdiger war es, als die statistische Auswertung eine inhomogene Verteilung der Verbindungen bestätigte, allerdings keine Verteilungsmuster gefunden werden konnten. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung war, dass die aus dem Gebinde gezogene Menge der Probe von ca. 5 g PLP zu gering war, um ein homogene Menge zu erhalten und daher die gefundene Inhomogenität auf die Probengröße zurückzuführen war. Alternativ hätte es während des Transports zu einer Durchmischung des Gebindes durch Perkolation kommen können.

Mit der entwickelten Methode konnten Unterschiede in einem Gebinde PLP erfasst werden. Entgegen der Erwartung konnten gefundene Unterschiede nicht verschiedenen klimatischen Bedingungen im Container des Gebindes zugeordnet werden, weil kein einheitliches Verteilungsmuster der Verbindungen vorhanden war. Da keine Bestimmung des olfaktorischen Sinneseindrucks dieses Fleischaromas durchgeführt wurde, konnte nicht beurteilt werden, ob

die gefundenen Unterschiede einen Einfluss auf die Geruchswahrnehmung hatten.

### 3.4.4 Chargenkonformität des Fleischaromas Pork Liver Powder

Zur Beurteilung der Qualität von PLP wurde der Gehalt der Leitverbindungen in zwei Chargen (61A90552-I und 61A30199-I) bestimmt. Die Aufbewahrungsgefäße hatten eine Größe von 1 kg und wurden bei Raumtemperatur gelagert.

**Tabelle 3.9:** Vergleich zweier Chargen PLP (Charge 61A30199-I und Charge 61A90552-I) hinsichtlich der Konzentration der Leitverbindungen ( $n = 6$ , Mittelwert  $\pm$  KI 95 %, Verhältnis von Charge 61A90552-I bezogen auf Charge 61A30199-I).

Substanz	Gehalt [ppb]		Verhältnis [%]
	61A90552-I	61A30199-I	
Isobutyraldehyd	456,9 $\pm$ 7,58	474,3 $\pm$ 9,19	96,33
Isovaleraldehyd	619,1 $\pm$ 14,1	641,2 $\pm$ 14,86	96,55
Toluol	1,628 $\pm$ 0,092	2,053 $\pm$ 0,082	79,32
2-Methylpyrazin	59,97 $\pm$ 1,85	58,58 $\pm$ 2,14	102,88
2-Heptanon	3,549 $\pm$ 0,131	2,116 $\pm$ 0,075	167,73
2-n-Pentylfuran	8,817 $\pm$ 0,136	8,486 $\pm$ 0,141	103,90

Für beide Aldehyde, 2-Methylpyrazin und 2-n-Pentylfuran war das gefundene Verhältnis zwischen beiden Chargen in einem Bereich zwischen 96,33 % und 103,90 % (Tabelle 3.9). Im Gegensatz dazu, war das Verhältnis von Toluol und 2-Heptanon mit Werten von 79,32 % und 167,77 % deutlich unterschiedlich. Die statistische Auswertung (studentischer t-Test) ergab, dass für alle Verbindungen außer 2-Methylpyrazin ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ) zwischen beiden Chargen vorhanden war. Dabei war in Charge 61A90552-I der Gehalt von Isobutyraldehyd, Isovaleraldehyd und Toluol geringer und der Gehalt von 2-Heptanon und 2-n-Pentylfuran höher als in Charge 61A30199-I. Es ist fraglich, ob gefundene statistische Unterschied für Isobutyraldehyd, Isovaleraldehyd und 2-n-Pentylfuran Konzentrationsunterschieden zwischen den Chargen oder der in Abschnitt 3.4.3 gefundenen Konzentrationsstreuung innerhalb einer Charge zuzuschreiben ist. Auch scheint die Bildung der Verbindungen 2 Heptanon und 2 n Pentylfuran während der Lagerung in kleinen Gebinden im Gegensatz zu größeren Gebinden begünstigt zu sein (siehe Abschnitt 3.4.3).

Dennoch wäre eine mögliche Erklärung für die gefundenen Unterschiede das Alter der Chargen. Die Charge 61A90552-I wurde in 2008 hergestellt und die Charge 61A30199-I in 2013. Wird dieser Unterschied auf die gefundenen Konzentrationen bezogen und die Erkenntnisse der Lagerungsstudie (Abschnitt 3.4.2) berücksichtigt, so entsprechen die gefundenen Konzentrationen mit Ausnahme von 2-Methylpyrazin dem Verhalten der



Verbindungen über die Lagerung. Isobutyraldehyd, Isovaleraldehyd und Toluol erfuhren während der Lagerung eine Reduktion und waren daher in der älteren Charge in geringere Konzentration vorhanden. Umgekehrt verhielt es sich für 2-Heptanon und 2-n-Pentylfuran, die in der älteren Charge in höherer Konzentration vorhanden sind, als in der Jüngerer. Da über die Lagerungsbedingungen keine ausreichenden Informationen vorhanden waren, konnte keine zeitliche Abschätzung des Herstellungsdatums aus dem relativen Muster der Leitverbindungen erfolgen. Es konnte aber mit dieser Untersuchung bestätigt werden, dass die ausgewählten Leitverbindungen für die Beurteilung des Alters einer Charge PLP genutzt werden könnten.

Als grundlegende Erkenntnis dieses Abschnittes bleibt festzuhalten, dass anhand der ausgewählten Leitverbindungen das Alter der jeweiligen Charge abgeschätzt werden kann. Es ist daher möglich, die Qualität des Fleischaromas PLP in Bezug auf das Alter mit dieser Methode zu beurteilen.

### 3.4.5 Veränderungen des Fleischaromas Pork Liver Powder durch Feuchtgranulation und Trocknung

Das entwickelte analytische Verfahren war in der Lage, anhand der ausgewählten Leitverbindungen Veränderungen während der Lagerung zu erfassen und damit das Alter des Fleischaromas PLP zu bewerten. Im Folgenden sollte untersucht werden, wie sich die Leitsubstanzen während unterschiedlicher Trocknungsverfahren verhalten und ein für das Fleischaroma PLP schonendes Verfahren identifiziert werden. Dazu wurde das Fleischaroma zunächst in einem Schnellmischer mit Wasser granuliert und dieses anschließend mit einem Wirbelschicht-, Horden- und Vakuumtrockner wieder entzogen.

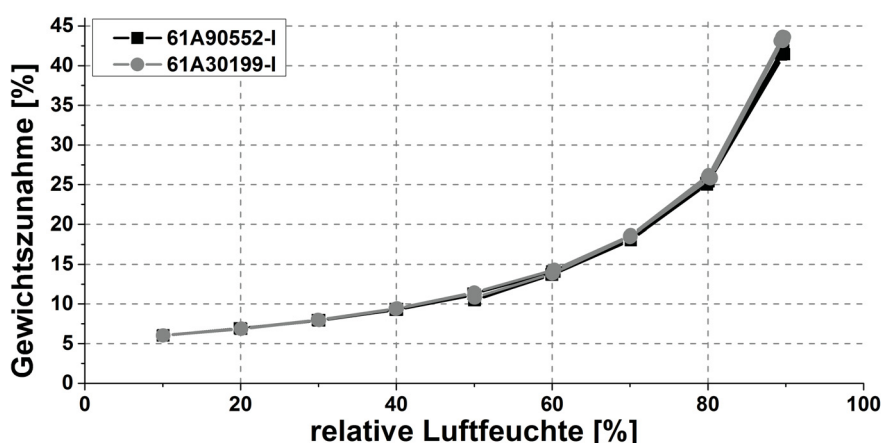
Auffällig war, dass der Wassergehalt der Proben von 34 % auf weniger als 1,9 % durch die Hordentrocknung und Vakuumtrocknung gesenkt werden konnte (Tabelle 3.10). Das Wasser wird vom PLP gut aufgenommen und auch gut wieder abgegeben. Diese Beobachtung konnte durch die in Abbildung 3.27 dargestellte Wasserdampf-Sorptionsisotherme von PLP bestätigt werden.

Bei geringer r.F. war auch die aufgenommene Menge Wasser relativ gering (ca. 7 % bei 20 % r.F.) und mit steigender Luftfeuchtigkeit stieg die aufgenommene Menge Wasser exponentiell an - auf mehr als 40 % bei 90 % r.F..

**Tabelle 3.10:** Wassergehalt der unterschiedlich prozessierter Proben Pork Liver Powder (n=3, Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung).

Probe	Wassergehalt [%]
Ausgangsmaterial	5,7 $\pm$ 0,23
Wirbelschichttrockner (95 Nm <sup>3</sup> /min)	5,2 $\pm$ 0,12
Vakuumentrockner	1,6 $\pm$ 0,03
Hordentrockner	1,9 $\pm$ 0,03
Granulat (vor Trocknung)	34,0 $\pm$ 0,56

Die Unterschiede in der Konzentration der Leitverbindungen zwischen den Granulaten der untersuchten Trocknungsverfahren waren gering (Abbildung 3.28). Für Isovaleraldehyd und 2-Methylpyrazin wurden zwischen prozessiertem Material und Ursprungsmaterial keine Unterschiede gefunden. Die hohe Standardabweichung von 2-Methylpyrazin ließ sich durch eine Methodenpräzision von 6,41 % (Tabelle 3.7) erklären.



**Abbildung 3.27:** Wasserdampf-Sorptionsisotherme für zwei Chargen PLP (n = 5).

Der Gehalt an 2-Heptanon und 2-n-Pentylfuran in den Proben wurde um  $\geq 6,9$  % bzw.  $\geq 3,1$  % im Vergleich zur Ausgangssubstanz reduziert. Für Toluol wurde eine deutliche Reduktion von  $\geq 11,3$  % gefunden, wobei die Trocknung in der Wirbelschicht die geringste Reduktion hervorrief. Toluol reagierte damit am empfindlichsten auf den äußeren Einfluss. Im Gegensatz dazu wurde für Isobutyraldehyd in den getrockneten Proben ein leichter Anstieg von  $\geq 3,0$  % gemessen, der nicht erklärbar war.

Obwohl Trocknungsverfahren mit unterschiedlichen Funktionsprinzipien (Konvektion bzw. Kontakttrocknung), unterschiedlichem Lufteintrag bzw. Luftdruck und unterschiedlichem Zeitbedarf ausgewählt wurden, die das Gut zusätzlich in einem unterschiedlichen Maß bewegen, wurden nur geringe Konzentrationsunterschiede zwischen den Verfahren gefunden. Den Erwartungen entsprechend hätte die Wirbelschichttrocknung, ein schonendes

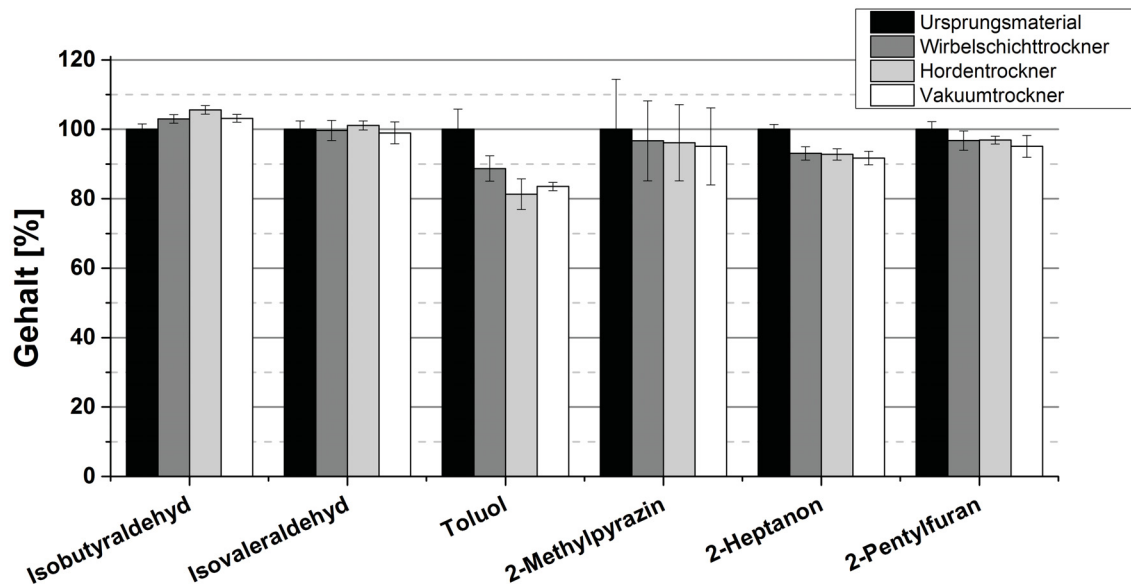


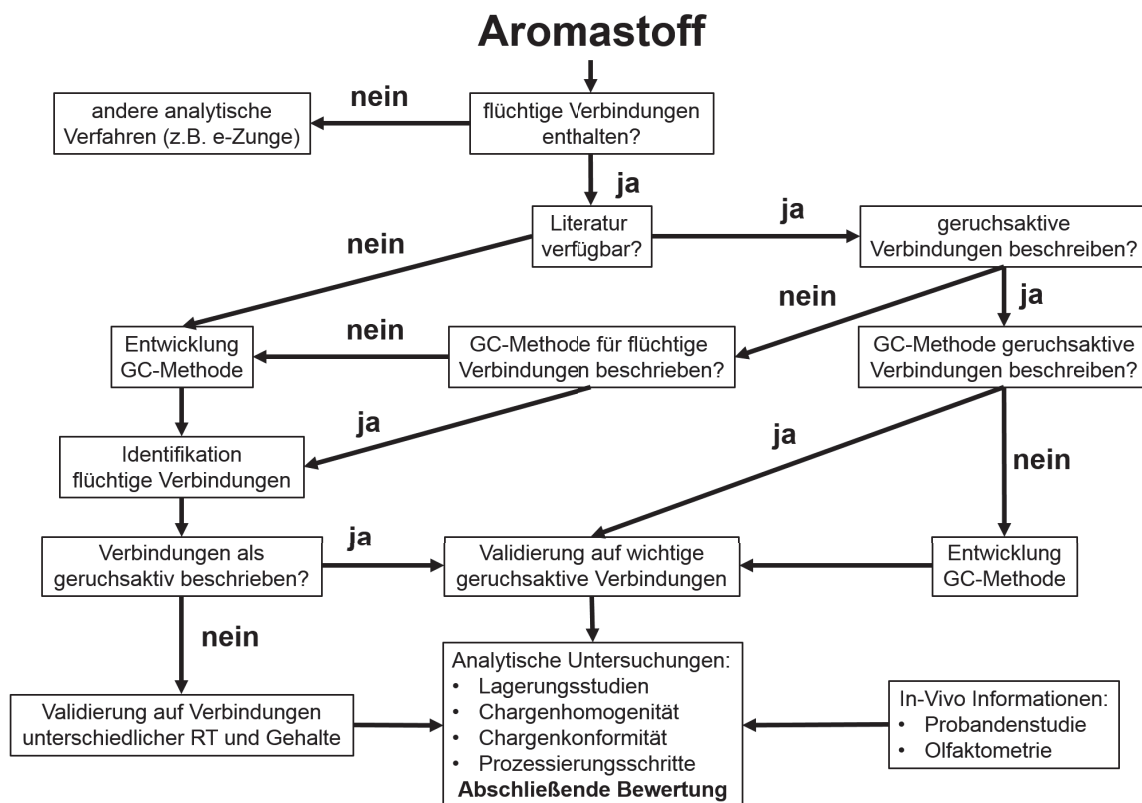
Abbildung 3.28: Einfluss verschiedener Trockungsverfahren auf den Gehalt der einzelnen Substanzen im Pork Liver Powder (n = 6, Mittelwert  $\pm$  KI 95 %).

Trocknungsverfahren, eine geringere Konzentrationsveränderung verursachen sollen als die Vakuumtrocknung. Dies entzieht dem Granulat durch Kontaktwärme im Vakuum das Wasser, sodass auch flüchtige Verbindungen bei diesen Bedingungen deutlich schneller dem Granulat hätten entzogen werden können. Es galt jedoch zu beachten, dass sowohl die Hordentrocknung, als auch die Vakuumtrocknung übertrockene Granulate erzeugt hatten. Für den Fall, dass die Trocknungszeit kürzer gewählt worden wäre, hätte das Granulat eine geringere Beeinflussung von außen erfahren und möglicherweise wäre die Konzentrationsänderung der Leitverbindungen in diesen Granulaten geringer ausgefallen.

Es lässt sich zusammenfassen, dass die entwickelte Methode den Einfluss der Trocknungsverfahren auf die Zusammensetzung der flüchtigen Verbindungen im PLP aufzeigen kann. Es konnte gezeigt werden, dass die drei ausgewählten Trocknungsverfahren bei den gewählten Bedingungen annähernd den gleichen Einfluss auf das Fleischaroma haben. Jedoch sollte für die Auswahl eines Trocknungsprozesses beachtet werden, dass PLP üblicherweise mit einem Anteil von 30 % in einer Arzneiform enthalten ist. Daher könnte für die Trocknungsdauer auch andere Stoffe, Hilfsstoffe oder Arzneistoffe, entscheidend sein, sodass unter Umständen mit den hier gewählten Rahmenbedingungen keine ausreichende Trocknung erzielt worden wäre. Daher kann dieser Versuch nur Hinweise auf ein verwendbares Verfahren angesehen werden und müsste mit der tatsächlichen Arzneiformulierung wiederholt werden.

### 3.4.6 Leitfaden

Basierend auf den Erkenntnissen, die im Rahmen dieser Studie gewonnen wurden, konnte ein Leitfaden (Abbildung 3.29) erstellt werden. Dieser soll die Findung von Qualitätsattributen flüchtiger Aromastoffe standardisieren und dem Anwender eine Entscheidungshilfe zur Hand geben. Da mit diesem Verfahren nicht der Geruch eines Aromas gemessen werden kann, orientiert er sich an der molekularen Zusammensetzung. Ist eine geeignete Methode entwickelt worden, so kann anhand diverser Untersuchungen



**Abbildung 3.29:** Entwickelter Leitfaden zur Bestimmung von Qualitätsattributen ausgewählter flüchtiger Verbindungen in Aromastoffen.

(z.B. Lagerungsstudien, Chargenhomogenität/ -konformität und anderen) eine Beurteilung des jeweiligen Aromastoffes individuell vorgenommen werden. Werden zum Beispiel keine Änderungen in der Zusammensetzung der flüchtigen Verbindungen des Aromas während der Lagerung beobachtet, so kann man annehmen, dass sich auch der Geruch nicht verändert.

In einem ersten Schritt gilt es daher zu klären, ob in dem Aromastoff flüchtige Verbindungen enthalten sind. Sind keine flüchtigen Verbindungen enthalten, so kann der erstellte Leitfaden nicht angewendet werden. Wenn für den Aromastoff flüchtige und geruchsaktive Verbindungen sowie analytische Methoden in der Literatur beschrieben sind, so sollten diese verwendet und gegebenenfalls optimiert werden. Andernfalls gilt es eine Methode

zu entwickeln, welche möglichst ubiquitär die enthaltenen flüchtigen Verbindungen erfasst. Ist eine Methode identifiziert bzw. entwickelt worden, so sollte diese nach den pharmazeutischen Regeln der ICH validiert werden (ICH-Q2 2005). Abschließend kann diese validierte Methode genutzt und der Aromastoff detailliert untersucht werden. Sind Daten olfaktorischer bzw. olfaktometrischer Messungen vorhanden, so können diese mit den gewonnen Erkenntnissen abgeglichen und so qualitätsrelevante Verbindungen identifiziert werden. Dieses Wissen kann abschließend für die Bewertung des Aromas bzw. von Veränderungen des Aromas genutzt und möglicherweise Grenzwerte festgelegt werden. Es gilt jedoch zu beachten, dass flüchtige Verbindungen in sehr geringer Konzentration vorhanden sein können, sodass sie nicht mit der analytischen Methode gefasst werden können, dennoch einen olfaktorischen Eindruck erzeugen (Brattoli et al. 2011).

### 3.4.7 Zusammenfassung

Es wurde ein Verfahren vorgestellt, mit dem es möglich ist, die qualitative und quantitative Veränderung eines Gemisches flüchtiger Komponenten zu bestimmen. Dieses wurde genutzt, um anhand ausgewählter Leitverbindungen Veränderungen in einem Fleischaroma zu erfassen. Mithilfe von Lagerungsstudien konnte ein Muster in der Zusammensetzung aufgezeigt werden, mit welchem das Alter zweier Chargen beurteilt werden konnte. Ebenfalls konnten Veränderungen durch unterschiedliche Trocknungsverfahren erfasst und bewertet werden.

Abschließend bleibt festzustellen, dass die gewonnen Informationen zur Beurteilung der Qualität des PLP hilfreich sind, wenn auch eine Beurteilung der organoleptischen Qualität nicht möglich war. Anhand der gesammelten Erkenntnisse konnte ein Leitfaden zur Erfassung flüchtiger Verbindungen in Aromastoffen erstellt werden.

Mit dem entwickelten analytischen Verfahren konnte ein erster Schritt zur Erfüllung regulatorischer Anforderungen gemacht werden. Es bleibt im Folgenden zu prüfen, ob dieses Verfahren auch die olfaktorische Qualität eines Aromas bestimmen kann.

## 3.5 Einfluss der Zusammensetzung auf die sensorische Wahrnehmung eines Orangenöls

### 3.5.1 Einleitung

Wie bereits in den vorausgehenden Kapitel 3.3 und 3.4 gezeigt werden konnte, lassen sich flüchtige Verbindungen zur Bewertung von Aromen hinsichtlich ihres Alters und der während der Lagerung vorherrschenden Bedingungen nutzen. Es war jedoch nicht möglich, anhand der ausgewählten flüchtigen Verbindungen einen Qualitätsbezug herzustellen. Zum einen waren neben den Ausgewählten noch weitere flüchtige Verbindungen vorhanden und zum anderen konnte aufgrund fehlender Informationen aus tierischen Geruchsstudien der olfaktorische Einfluss der ausgewählten Verbindungen auf den Gesamteindruck des Aromas nicht bewertet werden.

Um dennoch zu prüfen, ob sich das entwickelte Konzept zur Qualitätsbewertung von Aromen eignete, wurde für einen Vergleich mit *in vivo*-Daten ein anderer geruchsaktiver Hilfsstoff genutzt. Orangenaromen sind in der Literatur vielfach beschrieben und den charakteristischen Geruch prägende flüchtige Verbindungen sind bekannt (Ahmed et al. 1978a; Hinterholzer und Schieberle 1998; Plotto et al. 2004; Perez-Cacho und Rouseff 2008). Als Hilfsstoffe in pharmazeutischen Arzneimitteln sind Orangenaromen weit verbreitet und finden sich beispielsweise in *Nurofen Junior Fieber-/ Schmerzsaft*, *Magnesium Verla 300 uno Granulat* und *Lopedium akut Brausetabletten* (MMI 2014).

In Anlehnung an den in Kapitel 3.4 entwickelten Leitfaden, wurde zunächst aus der Literatur eine Methode zur quantitativen Erfassung der geruchsaktiven Verbindungen übernommen und optimiert. Dies wurde genutzt um ein ausgewähltes kaltgepresstes Orangenöl aus Kalifornien quantitativ zu bestimmen und mit den Reinstoffen artifizielle Aromen herzustellen. Diese artifiziellen Aromen unterschiedlicher Zusammensetzung wurden anschließend mit natürlichen Aromen olfaktorisch verglichen. Ziel war es, relevante olfaktorisch aktive Verbindungen für die Qualitätskontrolle zu identifizieren und zusätzlich einen künstlichen Aromahilfsstoff als Ersatz für das natürliche Produkt zu schaffen mit dem die Anwendbarkeit des analytischen Verfahrens geprüft werden kann.

## 3.5.2 Gaschromatographie

### 3.5.2.1 Methodenentwicklung

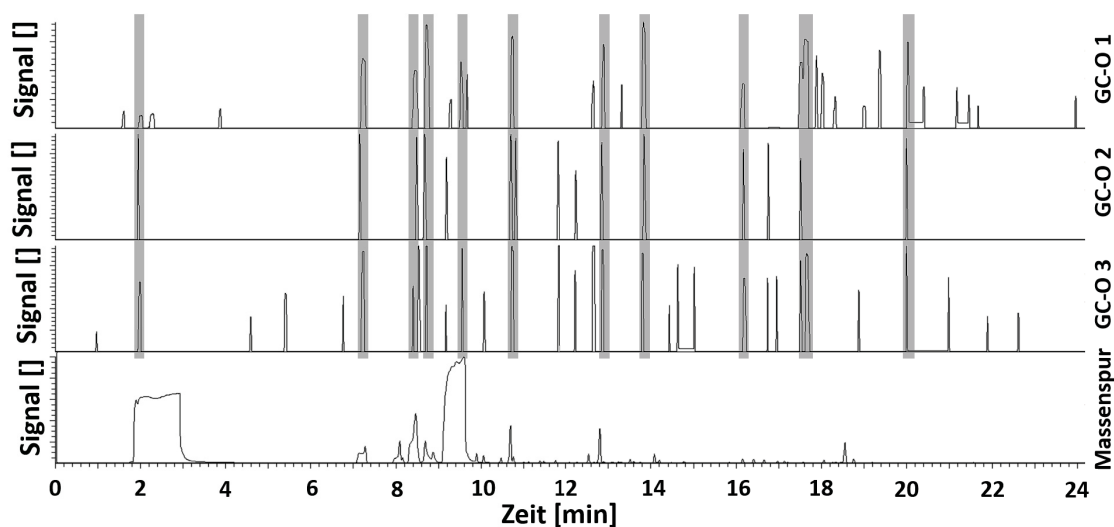
Analog zu der in Kapitel 3.3 entwickelten Methode und basierend auf den in Kapitel 3.2 erhaltenen Erkenntnissen zu elektronischen Nasen wurde für die zu entwickelnde Methode eine Kombination aus Gasphasen-Probengeber, Gaschromatograph (GC) und Flammenionisationsdetektor gewählt. Für diese Kombination sind unterschiedliche gaschromatographische Methoden zur Trennung der in Orangenaromen enthaltenen flüchtigen Verbindungen beschrieben (Moshonas und Shaw 1987; Bylaite und Meyer 2006; Qiao et al. 2008; Perez-Cacho und Rouseff 2008).

Hinterholzer und Schieberle (1998) konnten zeigen, dass von mehreren hundert flüchtigen Verbindungen, die sich in der Gasphase über einem Orangensaft finden, nur 42 Verbindungen einen olfaktorischen Sinneseindruck erzeugen. Högnadóttir und Rouseff (2003) demonstrierten, dass von 95 flüchtigen Verbindungen in der Gasphase über einer Probe Orangenöl 55 geruchsaktiv waren und nur 4 % aller in der Gasphase enthaltenen flüchtigen Verbindungen zum Geruchseindruck des Orangenaromas beitrugen. Da zu Beginn der Methodenentwicklung nicht bekannt war, welche geruchsaktiven Verbindungen in dem ausgewählten kalifornischen Orangenöl enthalten waren, wurde zunächst eine gaschromatographische olfaktometrische Vermessung des verwendeten Orangenöls vorgenommen.

### Gaschromatographische olfaktometrische Messungen

Die gaschromatographisch olfaktometrische Identifikation geruchsaktiver Verbindungen des ausgewählten Orangenöls erfolgte mit vier Probanden. Das vorhandene System wurde gemäß der von Bylaite und Meyer (2006) beschriebenen Methode angepasst und olfaktometrische Signale aus drei Wiederholungen auf Übereinstimmungen verglichen. Wie beispielhaft für einen Probanden in Abbildung 3.30 gezeigt, wurden elf Signale (grau unterlegt) gefunden, die der Proband in allen drei Messläufen zum gleichen Zeitpunkt wahrgenommen hat. Anhand simultan aufgezeichneter Massenspektren konnte dem olfaktorischen Signal eine molekulare Verbindung zugeordnet werden.

Von zwei oder mehr Probanden wurden zehn olfaktorische Signale zur selben Retentionszeit aufgezeichnet (Tabelle 3.11). Übereinstimmende Signale bei Minute 2 waren auf das Lösungsmittel Ethanol zurückzuführen und die Signale bei Minute 15, 16,2 und 20,0 ließen keine strukturelle Zuordnung des Massensignales zu. Es wurden die Aldehyde Octanal und Decanal sowie die Monoterpene  $\alpha$ -Pinen, Linalool, Limonen, Limonenoxid und Myrcen olfaktorisch wahrgenommen. Diese Verbindungen sind in der Literatur als Bestandteile von



**Abbildung 3.30:** Signale von drei olfaktometrischen Untersuchungen des Probanden 3 sowie die dazugehörige Massenspur; übereinstimmende Signale der gaschromatographischen-olfaktometrischen Messläufen sind grau unterlegt.

Orangenölen / Orangensaft beschrieben und tragen zu dem olfaktorischen Gesamteindruck des Aromas Orange bei (Kirchner und Miller 1957; Wolford et al. 1962; Wolford und Attaway 1967). Neben dem Zeitpunkt jedes olfaktometrischen Signals wurde auch der qualitative Sinneseindruck bestimmt (Tabelle 3.11). Da keines der gefundenen Signale das Attribut „orange“ trug, bestätigte sich, dass der für Orangen charakteristische Sinneseindruck nicht von einer einzelnen Verbindung sondern von einer Mischung mehrerer Verbindungen hervorgerufen wird.

**Tabelle 3.11:** Gemessene olfaktometrische Retentionszeiten, deren Sinneseindruck sowie mögliche dazugehörige Verbindungen, die bei der olfaktometrischen Untersuchung mit vier Probanden aufgezeichnet wurden.

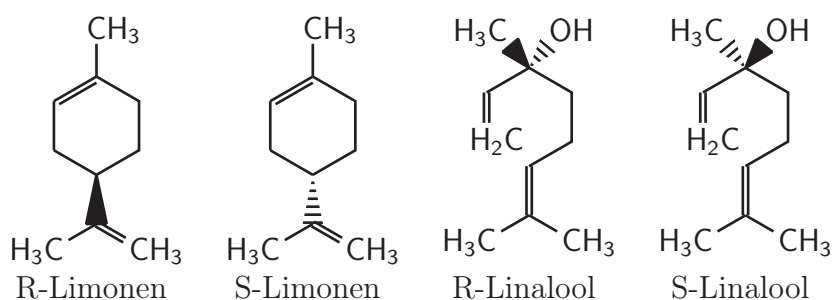
Verbindung	Retentionszeit [min]				Sinneseindruck
	Proband 1	Proband 2	Proband 3	Proband 4	
$\alpha$ -Pinen	7,23	7,22	7,17	7,19	harzig
Myrcen		8,43		8,39	tannig
Octanal	8,76	8,70	8,67	8,67	zitronig
Limonen	9,51	9,55		9,46	zitronig
Linalool	10,80	10,74	10,71	10,76	seifig
Limonenoxid	12,65	12,65		12,66	harzig
Decanal		12,87	12,87	12,89	harzig / zitronig
Unbekannt	15,07			15,04	fruchtig
Unbekannt		16,17	16,17		erdig
Unbekannt		20,00	19,98		seifig



Wie in Abbildung 3.30 zu sehen, zeigten die aufgezeichneten Massenspektren eine ungenügende Signaltrennung, weshalb eine Optimierung der verwendeten Methode notwendig war. Dabei war zu beachten, dass die Methode alle flüchtigen Verbindungen erfasst, da bis zu diesem Zeitpunkt nicht eindeutig geklärt werden konnte, welche Verbindungen den Sinneseindruck „Orange“ erzeugten.

### Trennsäule und Temperaturprogramm

Die Auswahl der GC-Trennsäule und der damit verbundenen stationären Phase orientiert sich an der strukturellen Zusammensetzung der Probe. Vora et al. (1983) beschreiben vornehmlich Aldehyde und Monoterpene in kaltgepressten Orangenölen, was sich mit den bisher identifizierten olfaktorisch aktiven Verbindungen deckt (Tabelle 3.11). Im Gegensatz zu den gefundenen Aldehyden Octanal und Decanal zeigen die gefundenen Monoterpene Chiralität und können, wie beispielhaft für Limonen und Linalool gezeigt, als Racemat oder einzelnes Enantiomer vorliegen (Strukturformel 3.3). Häufig enthalten natürliche Produkte jedoch nur ein Enantiomer, so sind beispielsweise in Orangen nur R-Limonen und R- $\alpha$ -Pinen vorhanden (Hinterholzer und Schieberle 1998).

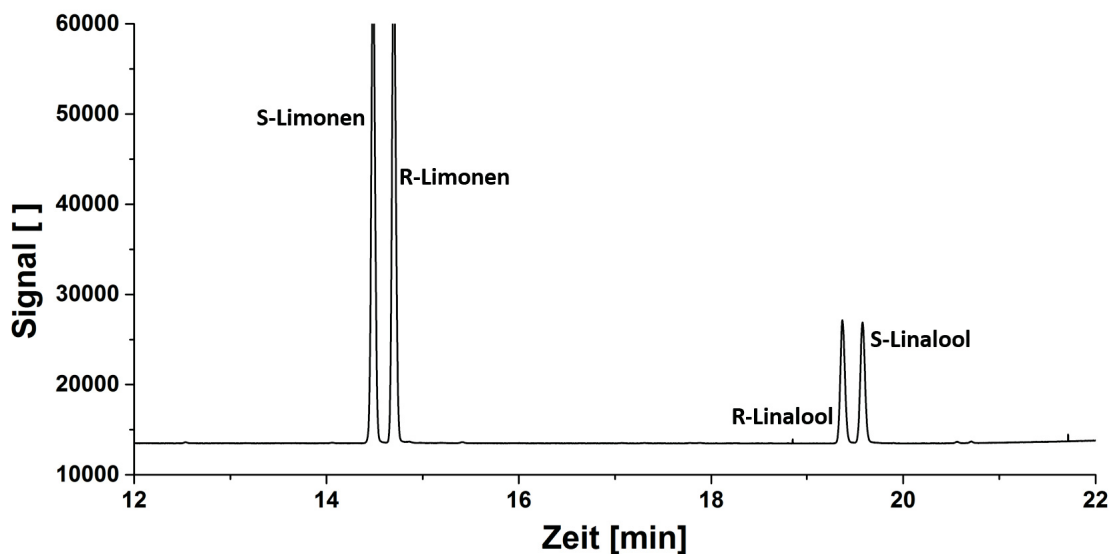


**Strukturformel 3.3:** Strukturformeln der Verbindungen R-(+)-Limonen, S-(-)-Limonen, R-(-)-Linalool und S-(+)-Linalool.

Die einzelnen Enantiomere vieler Enantiomerenpaare zeigen unterschiedliche Effekte im menschlichen Körper und vermitteln daher auch einen unterschiedlichen Geruch, weshalb R-Limonen nach Zitrusfrüchten und S-Limonen nach Terpentin riechen (Krautwurst et al. 1998). Da jedoch nicht bekannt war, welche Enantiomere in dem ausgewählten Orangenöl vorhanden waren und zum charakteristischen Geruch beitrugen, war es wichtig, dass die zu entwickelnde Methode eine Auftrennung chiraler Verbindungen ermöglichte.

Es ergaben sich somit zwei entscheidende Anforderungen an die Wahl der GC-Trennsäule. Zum einen war eine apolare Trennsäule zur Auftrennung der flüchtigen, lipophilen Verbindungen notwendig, da viele Monoterpene lipophil sind. Zum anderen wurde eine chirale GC-Trennsäule zur Enantiomerentrennung benötigt. Es wurde eine Reihenschaltung zweier Trennsäulen gewählt, wobei je eine Trennsäule anhand der chiralen Zentren und der

Polarität trennen sollte. Erfolgreiche Ergebnisse konnten durch Kombination einer apolaren Optima 1-Trennsäule mit einer chiralen Hydrodex  $\beta$ -6-TBDM-Trennsäule erzielt werden. Die Trennsäule Optima 1 wurde der chiralen Säule vorgeschaltet, so dass zuerst eine Auftrennung der Verbindungen anhand ihrer Polarität und im Anschluss anhand ihrer Chiralität erfolgte. Wie in Abbildung 3.31 beispielhaft für die Enantiomerenpaare von Limonen und Linalool gezeigt, konnten enthaltene Enantiomerenpaare deutlich getrennt werden.



**Abbildung 3.31:** Auftrennung der Racemate von Limonen und Linalool in die jeweiligen Enantiomere.

Verbindungen, die eine schlechte Auftrennung bei einer Heizrate von 10 °C/min zeigten, wurden in einem Temperaturbereich zwischen 90 °C und 120 °C eluiert. Durch Kombination hoher Heizraten zu Beginn und am Ende des Messlaufes sowie geringer Heizraten im Temperaturbereich zwischen 90 °C und 120 °C, konnte die gewünschte Auftrennung bei kürzerer Laufzeit erreicht werden. Im optimierten Temperaturprogramm wurde initial eine Temperatur von 40 °C für eine Minute gehalten und danach mit einer Heizrate von 12 °C/min auf 90 °C aufgeheizt. Im Bereich zwischen 90 °C und 120 °C wurde mit 2 °C/min die Temperatur angehoben und im Anschluss mit 20 °C/min auf eine Temperatur von 200 °C, welche für 2 Minuten gehalten wurde, aufgeheizt. Ein Messlauf dauert mit diesem Temperaturprogramm 26 Minuten.

Mit Hilfe von zwei unterschiedlichen Trennsäulen und einem optimierten Temperaturprogramm konnte sowohl eine Auftrennung der Verbindungen wie auch von Enantiomerenpaaren erreicht werden. Dies wird anhand der Tatsache deutlich, dass Verbindungen wie Myrcen und  $\beta$ -Pinen mit Siedepunkten von 167 °C bzw. 165-166 °C aufgetrennt werden konnten (siehe Abschnitt 3.5.2.2).

### Identifizierung und Auswahl von Leitverbindungen

Im Rahmen der olfaktometrischen Untersuchung konnten bereits molekulare Informationen über einige flüchtige geruchsaktive Verbindungen gesammelt werden. Mögliche Kandidaten wurden durch Abgleich der Massenspektren des Orangenöls mit einer Datenbank (NIST 2.0) identifiziert und anhand der Reinstoffe verifiziert. R-Limonen stellte mit einem Flächenanteil von 91,66 % den größten Anteil flüchtiger Moleküle in der Gasphase (Tabelle 3.12). Es

**Tabelle 3.12:** Identifizierte Verbindungen in einer 1,6 %igen Probe Orangenöl Kalifornien (Bezeichnung OC-2-003) vermessen am 04. Juni 2014.

Verbindung	Retentionszeit [min]	Flächenanteil [%]
<i>unbekannt</i>	10,72	0,02
R- $\alpha$ -Pinen	11,34	1,07
<i>unbekannt</i>	12,42	0,49
Myrcen	12,55	2,80
<i>unbekannt</i>	12,78	0,06
S- $\beta$ -Pinen	12,88	0,06
<i>unbekannt</i>	13,57	0,05
<i>unbekannt</i>	13,78	0,27
Octanal	13,95	0,26
$\alpha$ -Terpinen	14,08	0,02
<i>unbekannt</i>	14,54	0,64
R-Limonen	14,62	91,66
$\gamma$ -Terpinen	16,01	0,05
Terpinolen	16,76	0,03
Nonanal	18,27	0,02
R-Linalool	19,39	0,01
S-Linalool	19,60	0,15
cis-Limonenoxid	19,74	0,01
trans-Limonenoxid	20,23	0,01
Citronellal	20,49	0,01
Decanal	22,02	0,07

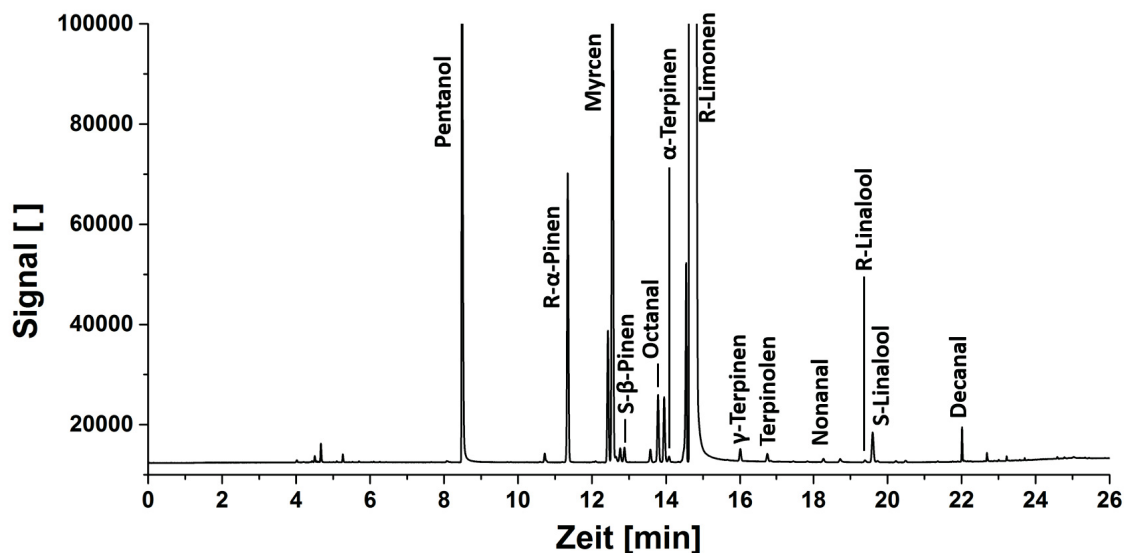
folgten Myrcen und R- $\alpha$ -Pinen mit einem Flächenanteil von 2,80 % bzw. 1,07 %. Die übrigen Verbindungen stellten einen Flächenanteil von 4,47 %, wobei sechs Verbindungen mit einer Retentionszeit (RT) von 12,49 min, 13,78 min und 14,54 min sowie einem Flächenanteil von insgesamt 1,46 % nicht identifiziert werden konnten. Wie weit deren Abwesenheit den olfaktorischen Sinneseindruck eines artifiziellen Orangenaromas beeinflusst, wurde in einem der nachfolgenden Versuchsteile geklärt. Neben den Monoterpenen konnten drei Aldehyde, Octanal, Nonanal und Decanal, identifiziert werden. Die gefundenen Verbindungen entsprachen den in der Literatur beschriebenen Verbindungen (Kirchner und Miller 1957;

Wolford et al. 1962; Wolford und Attaway 1967).

Um den Aufwand der Probenpräparation zu reduzieren, wurden für die weitere Bearbeitung nur Verbindungen mit einem Flächenanteil von größer als 0,01 % verwendet. Cis-Limonenoxid, trans-Limonenoxid und Citronellal wurden daher von der weiteren Bearbeitung ausgeschlossen. R-Linalool, das ebenfalls nur eine anteilige Signalfäche von 0,01 % hatte, wurde dennoch für die weitere Bearbeitung verwendet, da S-Linalool als Reinsubstanz nicht verfügbar war und das Racemat genutzt werden musste. Für die weiteren Untersuchungen wurden neben dem internen Standard n-Pentanol die Verbindungen R- $\alpha$ -Pinen, Myrcen, S- $\beta$ -Pinen, Octanal,  $\alpha$ -Terpinen, R-Limonen, Terpinolen,  $\gamma$ -Terpinen, Nonanal, R-Linalool, S-Linalool und Decanal berücksichtigt.

### 3.5.2.2 Methodvalidierung

Nach der Methodenentwicklung und Identifikation der Leitverbindungen erfolgte, entsprechend dem Leitfaden aus Abschnitt 3.4.6, die Validierung der Methode. Diese sollte sicherstellen, dass die Methode in der Lage ist, die ausgewählten Verbindungen in Anwesenheit der Matrix bestehend aus Miglyol 812 qualitativ und quantitativ zu erfassen. In Abbildung 3.32 ist ein Chromatogramm einer 1,6 %igen Probe Orangenöl für die zu validierende Methode dargestellt.



**Abbildung 3.32:** Beispielhaftes Chromatogramm einer 1,6 %igen Lösung von Orangenöl in Miglyol mit internem Standard (Bezeichnung OC-2-003 vermessen am 04. Juni 2014).

Die identifizierten Verbindungen werden zwischen der 11. und 22. Minute eluiert. Octanal und  $\alpha$ -Terpinen haben mit acht Sekunden den geringsten zeitlichen Abstand bei einer Auflösung  $r = 1,72$  (USP-621 2010). Die Auflösung der Signale war in den meisten Fällen

mit  $r \geq 1,5$  zufriedenstellend (Tabelle 3.13). Die visuelle Inspektion der integrierten Signale von Myrcen, R-Limonen, Terpinolen, Nonanal und S-Linalool, deren Auflösung  $r < 1,5$  war, konnte eine Tal zu Tal Integration bestätigen, sodass eine ausreichende Signaltrennung für eine reproduzierbare Integration gegeben ist.

**Tabelle 3.13:** Parameter zur Beurteilung der Spezifität der Methode, abgeleitet von einer Probe Orangenöl (Bezeichnung *OC-2-003* vermessen am 04. Juni 2014).

Verbindung	Retentionzeit [min]	Auflösung zu	
		vorherigem Signal	zurückliegendem Signal
1-Pentanol	8,48	58,64	38,64
R- $\alpha$ -Pinen	11,34	9,95	11,51
Myrcen	12,55	1,74	1,11
S- $\beta$ -Pinen	12,88	1,52	9,28
Octanal	13,95	2,21	1,72
$\alpha$ -Terpinen	14,08	1,72	7,03
R-Limonen	14,62	0,61	9,78
$\gamma$ -Terpinen	16,01	9,78	9,46
Terpinolen	16,76	9,46	1,25
Nonanal	18,27	0,00	5,18
R-Linalool	19,39	7,79	2,39
S-Linalool	19,60	2,39	1,43
Decanal	22,02	24,61	0,00

Mit Werten von  $R^2 \geq 0,992$  konnte eine lineare Korrelation zwischen Signal und Konzentration der Substanzen nachgewiesen werden (Tabelle 3.14).

Die Präzision des Systems war mit Ausnahme von S-Linalool,  $\gamma$ -Terpinen, Nonanal, Terpinolen und  $\alpha$ -Terpinen geringer als 2 % und mit Ausnahme von Terpinolen geringer als 3 %. Hinsichtlich der Präzision der Methode konnte für alle Verbindungen ein Wert von  $< 3$  % bestimmt werden. Damit erfüllen alle Verbindungen die in Abschnitt 3.3.3 beschriebenen Anforderungen. Für die Bestimmung der Richtigkeit dieser Methode wurde die Wiederfindung der Verbindungen ermittelt. Die Verbindungen Terpinolen und  $\alpha$ -Terpinen konnten in einer Probe bekannter Konzentration nur zu 93,7 % bzw. 80,7 % wiedergefunden werden, Nonanal wurde zu 106,2 % wiedergefunden. Die gefundene Abweichung war in Bezug auf die Konzentration der Verbindungen in der Probe von weniger als 10 ppm ausreichend (Taverniers et al. 2004; Gustavo González und Ángeles Herrador 2007). Es wurde allerdings deutlich, dass die Wiederfindung mit kleiner werdender Probenkonzentration abnahm.

**Tabelle 3.14:** Ergebnisse der Validierung, dargestellt für die untersuchten Verbindungen in absteigender konzentrationsabhängiger Reihung.

Verbindung	Linearität		$R^2$	Präzision		Richtigkeit
	Steigung [ppm <sup>-1</sup> ]	Achsen- abschnitt [ ]		System [%]	Methode [%]	Wiederfindung [%]
R-Limonen	0,000420	-0,131256	0,998	0,97	0,82	100,36
Myrcen	0,000536	-0,001839	0,999	0,78	0,64	98,17
R- $\alpha$ -Pinen	0,000855	-0,000044	0,999	0,39	0,34	97,50
S-Linalool	0,000148	-0,000158	0,998	2,12	1,62	98,39
Decanal	0,000090	-0,000218	0,997	1,24	1,70	99,06
Octanal	0,000503	-0,000231	0,998	1,02	0,74	100,61
$\gamma$ -Terpinen	0,000444	-0,000157	0,996	2,02	1,16	97,91
Nonanal	0,000148	-0,000067	0,996	2,08	1,92	106,21
R-Linalool	0,000132	-0,000137	0,998	1,96	2,77	97,81
S- $\beta$ -Pinen	0,000161	0,000006	0,992	0,97	0,85	103,15
Terpinolen	0,000493	-0,000186	0,995	4,73	1,99	93,72
$\alpha$ -Terpinen	0,000479	-0,000022	0,998	2,52	2,68	80,68

Die Ergebnisse zeigen, dass die untersuchten Verbindungen, in einem für die jeweilige Konzentration abhängigen Maß, ausreichend präzise und richtig bestimmt werden konnten. Die entwickelte Methode ist somit als valide in Bezug auf die quantitative Bestimmung der ausgewählten Verbindungen anzusehen.

### 3.5.3 Zusammensetzung natürlicher Orangenöle

Ziel dieser Studie war es neben der Herstellung eines artifiziellen Orangenaromas auch die relevanten olfaktorisch aktiven Verbindungen zu identifizieren. Für beides war es notwendig, die Konzentration der flüchtigen Verbindungen in der natürlichen Referenzsubstanz (Orangenöl aus Kalifornien) zu kennen. Zur Abschätzung der Variabilität zwischen unterschiedlichen Orangenölen wurden auch die Konzentrationen in einem Vergleichsöl aus Florida bestimmt. Beide Öle werden durch Kaltpressung von Orangenschalen der *Citrus sinensis* (L.) Osbeck gewonnen.

Die ausgewählten Verbindungen waren, mit Ausnahme von R-Linalool und R- $\alpha$ -Pinen, im kalifornischen Orangenöl in größerer Menge vertreten als im Öl aus Florida (Tabelle 3.15). R-Linalool und R- $\alpha$ -Pinen war in beiden Ölen in äquivalenter Menge enthalten. Die größten Unterschiede ( $\geq 50$  %) ergaben sich für S- $\beta$ -Pinen und Decanal.

Der Vergleich mit der Literatur zeigte, dass die Konzentration flüchtiger Verbindungen in unterschiedlichen Orangenölen einer hohen Variabilität unterliegt. Dabei hat nicht nur

**Tabelle 3.15:** Konzentration der identifizierter und ausgewählten Verbindungen in zwei Orangenölen sowie die Differenz beider bezogen auf das Orangenöl aus Kalifornien ( $n = 3$ , Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung, Unterschied bezogen auf kalifornisches Orangenöl).

Verbindung	Konzentration im Öl [ppm]		Abweichung [%] des Öl aus Florida
	Kalifornien	Florida	
R- $\alpha$ -Pinen	85.9 $\pm$ 2.2	85.9 $\pm$ 3.2	0.1
Myrcen	305.6 $\pm$ 7.1	221.9 $\pm$ 8.1	-27.4
S- $\beta$ -Pinen	6.70 $\pm$ 0.14	0.77 $\pm$ 0.00	-88.5
Octanal	37.7 $\pm$ 0.5	23.8 $\pm$ 0.9	-36.9
$\alpha$ -Terpinen	2.14 $\pm$ 0.13	1.91 $\pm$ 0.11	-10.6
R-Limonen	14413 $\pm$ 324	13246 $\pm$ 477	-8.1
$\gamma$ -Terpinen	10.1 $\pm$ 0.3	2.00 $\pm$ 0.15	-80.3
Terpinolen	4.17 $\pm$ 0.16	3.81 $\pm$ 0.36	-8.5
Nonanal	9.01 $\pm$ 0.28	7.57 $\pm$ 0.23	-16.0
R-Linalool	5.43 $\pm$ 0.09	5.64 $\pm$ 0.42	3.9
S-Linalool	67.5 $\pm$ 1.3	37.2 $\pm$ 1.1	-44.9
Decanal	68.1 $\pm$ 0.4	33.5 $\pm$ 0.7	-50.9

der Herstellungsprozess, sondern auch das Ursprungsland und die Sorte einen Einfluss auf die qualitative und quantitative Zusammensetzung (Vora et al. 1983; Mitiku et al. 2000; Njoroge et al. 2005; Qiao et al. 2008). Ahmed et al. (1978b) konnten zeigen, dass nicht alle flüchtigen Verbindungen zu dem Geruchseindruck „Orange“ beitragen, sondern dass nur bestimmte Verbindungen qualitätsbestimmend sind. Obwohl die Konzentration der flüchtigen Verbindungen starken Schwankungen zwischen den Ölen unterliegt, werden sowohl die in der Literatur beschriebenen wie auch die in diesen Versuchen charakterisierten Öle mit dem Geruch „Orange“ wahrgenommen. Es ist daher zu vermuten, dass weniger die absolute Konzentration der flüchtigen Verbindungen als vielmehr das relative Verhältnis dieser zueinander für den spezifischen Geruch des jeweiligen Orangenaromas entscheidend ist. Unterstützt wird diese Hypothese durch den Sinneseindruck der einzelnen Verbindungen. Weder in der Literatur noch in der durchgeführten olfaktometrischen Untersuchung des kalifornischen Orangenöles wurde eine Verbindung mit dem Geruch „Orange“ gefunden. Daher muss der charakteristische Geruch durch eine Mischung von zwei oder mehr Verbindungen hervorgerufen werden.

Auf Basis der bekannten Konzentrationen einiger flüchtiger Verbindungen im kalifornischen Orangenöl wurden unterschiedliche synthetische Orangenöle erstellt. Im Folgenden sollen diese in einer Probandenstudie anhand ihres Geruches unterschieden werden.

### 3.5.4 Menschliche Geruchsmessungen

Damit sichergestellt werden kann, dass künstliche Aromen sich in ihrem Geruch nicht von den natürlichen unterscheiden, sind zur Herstellung künstlicher Aromen unterschiedliche Verfahren in der Literatur beschrieben. Anders als es z.B. von Grosch (2001) sowie Gygax und Koch (2001) empfohlen wird, ließ sich die Geruchsaktivität der flüchtigen Verbindungen in diesem Orangenöl nicht bestimmen. Allerdings sind die geruchsaktiven Verbindungen von Orangen in der Literatur beschrieben und es konnte auf diese Daten zurückgegriffen werden. Darüber hinaus wurden Daten der GC-olfaktometrischen Untersuchung aus Abschnitt 3.5.2.1 verwendet.

Von den identifizierten Verbindungen sind R-Limonen, Octanal,  $\alpha$ -Pinen, Linalool und Myrcen als geruchsbestimmend beschrieben (Hinterholzer und Schieberle 1998). Zusätzlich führen die Autoren die Verbindungen Ethylhexanoat, Ethylbutanoat, trans-Hex-3-enal und andere auf, die im kalifornischen Orangenöl anhand von Referenzsubstanzen nicht nachgewiesen werden konnten. Somit sollte nach Reduktion der flüchtigen Verbindungen auf R-Limonen, Octanal,  $\alpha$ -Pinen, Linalool und Myrcen immer noch der gleiche Sinneseindruck wie bei dem natürlichen Orangenöl erzielt werden. Auf Basis dieser Überlegungen wurden drei Mischungen der einzelnen Verbindungen hergestellt, wobei die Konzentration der flüchtigen Verbindungen einer 1,6 %igen Lösung des kalifornischen Orangenöls entsprachen. Als Grundlage wurde das olfaktorisch inerte Miglyol verwendet.

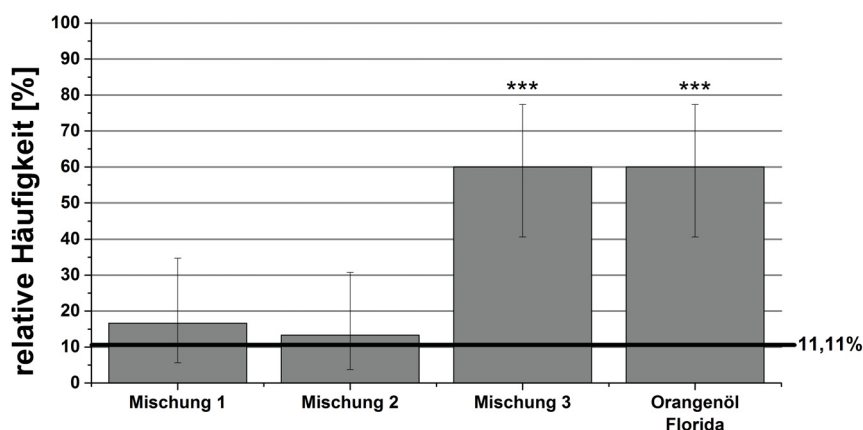
- Mischung 1: R- $\alpha$ -Pinen, Myrcen, S- $\beta$ -Pinen, Octanal,  $\alpha$ -Terpinen, R-Limonen, Terpinolen,  $\gamma$ -Terpinen, Nonanal, R-Linalool, S-Linalool und Decanal
- Mischung 2: R- $\alpha$ -Pinen, Myrcen, Octanal, R-Limonen, R-Linalool, S-Linalool und Decanal
- Mischung 3: R-Limonen

In Mischung 1 waren alle im kalifornischen Orangenöl identifizierte und ausgewählten flüchtige Verbindungen enthalten. Sie sollte den gleichen olfaktorischen Eindruck wie das natürliche Original erzeugen. Die Mischung 2 enthielt, auf Basis der zuvor durchgeführten Literaturrecherche und den Ergebnissen der olfaktometrischen Untersuchung, für den olfaktorischen Eindruck charakteristische flüchtiger Verbindungen. Sollten nicht alle flüchtigen Verbindungen, lediglich die in Mischung 2 enthaltenen, für den olfaktorischen Eindruck des verwendeten natürlichen Orangenöls verantwortlich sein, so dürfte diese Mischung olfaktorisch vom Original nicht zu unterscheiden sein. In Mischung 3 war nur R-Limonen enthalten, welches mit einer Signalfläche von 91,66 %, die größte Menge flüchtiger Verbindungen in der Gasphase über dem verwendeten Orangenöl stellte. Mit dieser Mischung sollte geprüft werden, ob R-Limonen alleine für den olfaktorischen Eindruck des verwendeten



Orangenöls verantwortlich ist. Dadurch, dass S-Linalool als Reinstoff nicht verfügbar war, waren in allen Mischungen - entgegen dem natürlichen Original - äquivalente Mengen R-Linalool und S-Linalool enthalten. Die Konzentration des Racemates entsprach der Gesamtkonzentration der Enantiomere.

In der Literatur sind unterschiedliche Methoden zur Bestimmung des olfaktorischen Eindrucks von Aromen beschrieben. In diesem Versuch wurde das von Kobal et al. (2000) beschriebene Verfahren zur Unterscheidung von Gerüchen auf die in dieser Arbeit verwendeten natürlichen und artifiziellen Orangenaromen angewendet. Dafür wurden den Probanden drei Proben präsentiert, von denen zwei identisch und eine abweichend war. Ein Unterschied zwischen zwei Proben A und B wurde für einen Probanden als vorhanden angesehen, wenn das vorhandene Probenpaar der Kombination AAB und BBA richtig unterschieden wurde.



**Abbildung 3.33:** Relative Häufigkeit und Clopper-Pearson-Konfidenzintervall (Clopper und Pearson 1934) der korrekt erkannten Proben von natürlichen und synthetischen Orangenölen ( $n = 2 \times 30$ , relative Häufigkeit  $\pm$  Clopper-Pearson-Intervall, \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Die hergestellten artifiziellen Aromen waren als kostengünstige Alternative für das natürliche Produkt gedacht. Es wurde daher für die Herstellung auf Ausgangsstoffe zurückgegriffen, die in großen Mengen preisgünstig verfügbar und so für eine Großproduktion unter realen Gegebenheiten nutzbar wären. Die Folge war, dass die verwendeten Substanzen geringe Verunreinigungen aufwiesen. Diese waren besonders bei der quantitativ am größten vertretenen Verbindung R-Limonen von Bedeutung, welche 0,19 % Myrcen, 0,02 % Octanal, 0,01 %  $\alpha$ -Terpinen, 0,02 % Terpinolen, 0,02 %  $\gamma$ -Terpinen, 0,05 % S-Linalool und 0,02 % Decanal enthielt. Da dies bei der Herstellung nicht berücksichtigt worden war, wurden folglich leichte quantitative Unterschiede zwischen den drei Mischungen und dem kalifornischen Orangenöl gefunden (siehe Tabelle 6.12 in Abschnitt 6.2.10).

18 von 30 ( $\approx 60\%$ ) Probanden konnten das Orangenöl aus Florida wie auch die Mischung 3

von dem kalifornischen Orangenöl unterscheiden. Im Gegensatz dazu hatten nur 5 von 30 ( $\approx 16,67\%$ ) bzw. 4 von 30 ( $\approx 13,33\%$ ) Probanden den Geruch der Mischung 1 und Mischung 2 als abweichend zum kalifornischen Orangenöl empfunden (Abbildung 3.33). Mit einem Binominaltest wurde geprüft, ob die gefundenen Ergebnisse zufällig waren oder ein tatsächlicher olfaktorischer Unterschied vorhanden war. Dazu wurde angenommen, dass die Wahrscheinlichkeit, zwei zusammengehörige Proben richtig zu erkennen  $\frac{1}{3} \cdot \frac{1}{3} = \frac{1}{9} \approx 11,11\%$  beträgt. Unter dieser Annahmen wurde ein höchst signifikanter Unterschied ( $p \leq 0.001$ ) für den olfaktorischen Vergleich des kalifornischen Orangenöls mit dem Orangenöl aus Florida und der Mischung 3 gefunden. Im Gegensatz dazu zeigte der Vergleich der Mischungen 1 und 2 keinen sensorischen Unterschied zum Orangenöl aus Kalifornien.

Ungeschulte Probanden konnten somit das natürliche floridianische Orangenöl sowie die nur R-Limonen enthaltene Mischung 3 von dem kalifornischen Orangenöl unterscheiden. Durch Zusatz der Verbindungen R- $\alpha$ -Pinen, Myrcen, Octanal, R-Linalool, S-Linalool und Decanal, konnte mit Mischung 2 ein artifizielles Aroma hergestellt werden, welches olfaktorisch nicht von dem Original zu unterscheiden war. Die Mischung 1, welche zusätzlich zu Mischung 2 noch S- $\beta$ -Pinen,  $\alpha$ -Terpinen, Terpinolen,  $\gamma$ -Terpinen und Nonanal enthielt, war ebenfalls vom kalifornischen Orangenöl nicht zu unterscheiden. Somit konnte bestätigt werden, dass die Verbindungen R- $\alpha$ -Pinen, Myrcen, Octanal, R-Limonen, R-Linalool, S-Linalool und Decanal notwendig sind, um den olfaktorischen Eindruck des kalifornischen Orangenöls zu erzeugen. Ob eine weitere Reduktion der Verbindungsanzahl möglich gewesen wäre, wurde nicht geprüft.

**Tabelle 3.16:** Anteiliges Verhältnis der ausgewählten Verbindungen im Orangenöl aus Kalifornien, aus Florida und der Mischung 2, welche nur die entscheidenden Verbindungen enthielt.

Verbindung	Anteil der Verbindungen im Öl [%]		
	Orangenöl Kalifornien	Orangenöl Florida	Mischung 2
R- $\alpha$ -Pinen	0,57	0,62	0,57
Myrcen	2,04	1,62	2,05
Octanal	0,25	0,18	0,26
R-Limonen	96,19	97,01	95,95
R-/S-Linalool	0,49	0,31	0,63
Decanal	0,45	0,25	0,54

In Anlehnung an ein natürliches Produkt, dem kalifornischen Orangenöl, konnte mit Hilfe von sechs charakteristischen Verbindungen, R- $\alpha$ -Pinen, Myrcen, Octanal, R-Linalool, S-Linalool und Decanal, ein artifizielles Orangenaroma hergestellt werden. Dabei scheint der Anteil der Verbindungen in einer Probe von Bedeutung zu sein (Tabelle 3.16). So konnten die beiden natürlichen Öle aus Florida und Kalifornien, die unterschiedlichen Anteile der Verbindungen enthielten, voneinander differenziert werden. Im Gegensatz dazu war eine olfaktorische Unterscheidung von dem natürlichen kalifornischen Orangenöl und dem artifiziiellen Aroma Mischung 2, welches die essentiellen Verbindungen enthielt, nicht möglich, obwohl die Herstellung der artifiziiellen Aromen zu leichten anteiligen Verschiebungen geführt hatte (siehe Oben/ Tabelle 3.16). Eine detailliertere Untersuchung zur Festlegung von Grenzwerten für die einzelnen Verbindungen war mit dem vorhandenen ungeschulten Probandenkollektiv nicht möglich.

Somit kann das gemessene Verhältnis der flüchtigen Verbindungen zueinander als Anhaltspunkt gesehen werden, um Veränderungen des natürlichen kalifornischen Orangenöls oder des artifiziiellen Orangenöls während der Lagerung zu beurteilen. Unter Berücksichtigung der leicht schwankenden quantitativen Zusammensetzung der artifiziiellen Aromen und der subjektiven menschlichen Wahrnehmung von Sinneseindrücken (Shepard et al. 1975), werden jedoch geringe Abweichungen des gefundenen Verhältnisses weiterhin den gleichen Sinneseindruck erzeugen.

### 3.5.5 Zusammenfassung

Anhand des in Abschnitt 3.4 erstellten Leitfadens konnte eine Methode entwickelt werden, welche die Zusammensetzung flüchtiger Verbindungen in einem Orangenöl charakterisiert. Flüchtige olfaktorisch aktive Verbindungen eines natürlichen Orangenöls wurden identifiziert und quantitativ bestimmt. Es wurden unterschiedliche artifiziielle Aromen hergestellt und in einer Probandenstudie mit zwei natürlichen Orangenölen verglichen. Sechs der elf identifizierten Verbindungen (R- $\alpha$ -Pinen, Myrcen, Octanal, R-Limonen, R-Linalool, S-Linalool und Decanal) waren dabei für die olfaktorische Wahrnehmung entscheidend. Es konnte somit gezeigt werden, dass das entwickelte analytische Verfahren in der Lage ist, wie am Beispiel der beiden natürlichen Orangenöle gezeigt werden konnte, Geruchsunterschiede anhand der molekularen Zusammensetzung zu erfassen.

Diese Erkenntnisse bieten zum einen die Möglichkeit ein künstliches Orangenaroma herzustellen, zum anderen lassen sich Veränderungen während der Lagerung hinsichtlich ihres Geruches beurteilen. Mit Hilfe des entwickelten analytischen Verfahrens konnte das Verhältnis der sechs relevanten Verbindungen zueinander als entscheidend für den Gesamteindruck

identifiziert werden. Obwohl dieses Verfahren spezifisch an die vorliegende Probe angepasst worden war, konnte demonstriert werden, dass anhand eines entwickelten Leitfadens eine einfachere und schnelle Anpassung an andere Probenmaterialien möglich ist. Es wurde somit ein anpassungsfähiges analytisches Verfahren entwickelt, welches die olfaktorische Qualität des beispielhaft ausgewählten Orangenöls erfassen kann und somit in der Qualitätskontrolle einsetzbar ist. Die an geruchsaktive Hilfsstoffe gestellten regulatorischen Anforderungen können somit erfolgreich bedient werden.

## 4 Zusammenfassung der Arbeit

Aromastoffe werden als Hilfsstoffe in Arzneimitteln eingesetzt, um die Akzeptanz zu steigern und damit den Erfolg der Arzneimitteltherapie zu sichern. Wird ein Aromastoff verwendet, so ist aus regulatorischer Sicht der gustatorische und olfaktorische Sinneseindruck der Arzneiform gemäß der ICH Richtlinie Q8 als kritisches Qualitätsattribut anzusehen und seine Qualität zu bestimmen. Folglich besteht ein erhöhter Bedarf an analytischen Methoden, mit denen die Qualitätsattribute Geschmack und Geruch charakterisiert werden können.

In der vorliegenden Arbeit wurden unterschiedliche Sensorsysteme zur Erfassung gelöster bzw. flüchtiger Verbindungen auf ihre Eignung für die Qualitätskontrolle pharmazeutischer Aromastoffe geprüft. Mit dem Hund als Zielgruppe lag der Fokus auf Fleischaromen, die in Arzneimitteln für Hunde verwendet werden.

Initial wurde das qualifizierte, potentiometrische Sensorsystem SA402B, welches chemometrische Informationen von Lösungen mit artifiziellen Lipidmembranen erfasst, auf seine Eignung hin überprüft. Zur Beurteilung der Qualität der verwendeten Sensoren konnten zwei verschiedene mathematische Modelle entwickelt werden.

Aufgrund einer unvollständigen Löslichkeit der verwendeten Fleischaromen im wässrigen Milieu war eine vollständige Erfassung nicht möglich. Außerdem war eine Übertragbarkeit der erhobenen Daten auf den Geschmackssinn des Hundes fraglich, da wie eine Literaturrecherche zeigte, der Hund die Wahl von fleischiger Nahrung vornehmlich über den Geruchssinn steuert. Somit stellte sich dieses System als ungeeignet zur Analyse der verwendeten Fleischaromen dar, sodass im Weiteren der Fokus auf der Analyse flüchtiger Verbindungen lag.

Fünf Sensorsysteme zur Erfassung flüchtiger Verbindungen wurden hinsichtlich ihrer Eignung für den Einsatz in der pharmazeutischen Qualitätskontrolle von Aromastoffen untersucht und bewertet. Es konnte gezeigt werden, dass der klassische Gaschromatograph gegenüber den übrigen Systemen Vorteile aufwies. Einer davon ist der modularer Aufbau und die damit verbundene hohe Anpassungsfähigkeit an das jeweilige Probenmaterial. Zusätzlich ist eine Beurteilung molekularer Veränderungen möglich, sodass der Informationsgehalt im Gegensatz zu nicht chromatographischen Systemen höher ist.

Mit der Kombination aus Gaschromatograph, Gasphasenprobengeber und Flammenionisationsdetektor konnte erfolgreich ein System zur Erfassung flüchtiger Verbindungen eines Fleischaromas entwickelt werden. Olfaktorisch aktive flüchtige

Verbindungen, die in Fleisch und Fleischprodukten enthalten sind, konnten identifiziert und quantitativ valide bestimmt werden. Anhand von Lagerungsuntersuchungen wurden Veränderungen in Abhängigkeit der Lagerungszeit sowie den vorherrschenden Bedingungen identifiziert und Veränderungen untersuchter Chargen valide beurteilt. Damit konnte erstmalig ein System entwickelt werden, mit dem aus pharmazeutischer Sicht die Stabilität eines Aromastoffs bewertet werden kann.

Ob die mit dem Gaschromatographen erhobenen Daten mit der subjektiven olfaktorischen Empfindung des Hund korrelieren, kann nur mit tierexperimentellen Studien abschließend geklärt werden. Diese Studien konnten aus Gründen der Praktikabilität nicht durchgeführt werden. Um dennoch überprüfen zu können, ob das entwickelte Verfahren auch olfaktorische Unterschiede erfassen kann, wurde als Surrogat die Analyse eines Orangenaromas mit menschlichen Probanden durchgeführt. Mithilfe einer olfaktometrischen Untersuchung konnten charakteristische, geruchsaktive Verbindungen eines natürlichen Orangenaromas identifiziert werden. In Analogie zu dessen quantitativer Zusammensetzung wurden artifizielle Aromen unterschiedlicher Zusammensetzung hergestellt und in Probandenstudien mit dem Original verglichen. So wurde die Hypothese formuliert, dass sechs Verbindungen und ihr anteiliges Verhältnis in dem jeweiligen Aroma für den olfaktorischen Eindruck des Orangenaromas entscheidend sind. Der olfaktorische Sinneseindruck dieses Aromas konnte damit anhand der sechs ausgewählten Verbindungen qualitätsbezogen beschrieben werden. Daher ist anzunehmen, dass das entwickelte analytische Verfahren für die Qualitätskontrolle dieses Aromas geeignet ist.

Mit dem entwickelten System konnte ein anpassungsfähiges analytisches Verfahren entwickelt werden, welches die molekulare flüchtige Zusammensetzung von Aromastoffen erfasst. Anhand ausgewählter Verbindungen konnte der Einfluss der Lagerung und der dabei vorherrschenden Bedingungen auf ein Fleischaroma bestimmt und bewertet werden. Durch Einbeziehung von Informationen aus olfaktorischen Probandenstudien war es möglich, in Bezug auf die olfaktorische Beschaffenheit ein artifizielles Aroma herzustellen, das äquivalent zum natürlichen Produkt war. Damit konnte erstmalig ein analytisches Verfahren vorgestellt werden, welches gemäß den pharmazeutischen regulatorischen Anforderungen olfaktorisch aktive Aromastoffe erfassen kann und welches prinzipiell für deren Qualitätskontrolle einsetzbar ist.

## 5 Summary

Flavoring substances are used in oral medical products to improve compliance and to ensure a successful pharmacotherapy. The current ICH guideline Q8 requires monitoring of the gustatory and olfactory sensations elicited by the oral dosage form, since the sensory impression may be a critical quality attribute. Thus, analytical methods are needed to assess both, taste and odor.

This study is the first to investigate different analytical sensor systems for the determination of both dissolved and volatile molecules with respect to their application for quality control of flavoring substances in medicinal products. Meat flavors used in oral pharmaceutical products for dogs were chosen for detailed analysis. First investigations were performed on the qualified sensor system SA402B, a systems for the determination of molecules in solution. This potentiometric system utilizes artificial lipid membranes to analyze dissolved molecules, in particular ions. To monitor the quality of these sensor membranes, two different mathematical models were developed.

Since an incomplete solubility in water inhibits their quantitative acquisition, this system appeared to be unsuitable to determine meat flavors. Furthermore, literature indicates, that dogs choose meat and meat products mainly by their sense of smell. Thus, systems for the determination of solutes were not investigated further and attention was focused on the assessment of volatile molecules instead.

Five systems for the detection of volatile molecules were tested with respect to their usage in pharmaceutical quality control. It was shown that standard gas chromatography was superior to other systems. This system is modular and accordingly highly adaptable to the sample material, ensuring an overall acquisition. Furthermore, unlike to non-chromatographic approaches, classical gas chromatography provides detailed molecular information. Thus, information yield is higher and olfactory changes can be correlated with molecular differences.

Using the combination of headspace sampler, gas chromatograph and flame ionization detector, a successful analytical method could be developed. This approach allowed volatile olfactory molecules to be identified and the content of these in a meat flavor to be quantified. By storing the meat flavor at different climatic conditions, characteristic patterns of content alterations were identified. The knowledge gained was used to understand molecular differences between batches caused by aging. For the first time, an analytical

method is presented, by which the stability of a flavoring substance for pharmaceutical use can be determined. To correlate the obtained chromatographic data with the actual olfactory impressions of dogs, animal studies would be necessary. Since these were not feasible within the scope of these studies, the analytical method was adapted to the analysis of an orange flavor, to confirm that olfactory differences can be captured by this system. Characteristic olfactory molecules were identified by an olfactometric measurement and artificial orange flavors were prepared according to the quantitative composition of the natural flavor. The comparison of natural and artificial flavors by a human sniffing panel raised the hypothesis that only six molecules are necessary to provoke the same olfactory impression. As a result it was concluded, that the analytical system is suitable for the quality control of this flavor.

With the presented combination a flexible analytical system was developed, which was able to assess volatile olfactory molecules of different flavors. It was successfully used to investigate the climatic influence on the molecular composition of a meat flavor. Additionally, it was possible to determine key molecules for the olfactory impression of an orange flavor by using information of human perception panels. For the first time, an analytical procedure could be presented which assesses pharmaceutical used flavors according to a regulatory guideline and which might be suitable for standard pharmaceutical quality control.



## 6 Experimenteller Teil

### 6.1 Materialien

Die im Rahmen der Arbeit verwendeten Materialien sind in den folgenden Tabellen thematisch gruppiert aufgeführt. In Kapitel 3.2 verwendete Tabletten wurden als wirkstofffreie Muster von Bayer Animal Health GmbH bezogen und enthielten das Fleischaroma *Spray dried Pork Liver Powder EHT* (Aromastoff aus Schweineleber) (PLP).

**Tabelle 6.1:** Verwendete Fleischaromen.

Aroma	Abkürzung	Bezugsquelle	Charge
Spray dried Pork Liver Powder EHT	PLP	American Laboratories, Omaha, USA	61A30199-I 61A90552-I
Artificial Beef Flavour	ABF	Pharma Chemie, Syracuse, USA	54018PJ
Provesta 356	P356	Nealanders Int., Mississauga, USA	24400
Provesta 400	P400	Nealanders Int., Mississauga, USA	109703-04H
Red Star Basic Yeast	RSBY	Leasaffre Yeast Corporation, Milwaukee, USA	Muster

**Tabelle 6.2:** Verbrauchssubstanzen und Analysesubstanzen für Messungen mit einem Sensorsystem zur Erfassung gelöster Verbindungen.

Substanz	Bezugsquelle	Charge
Chinin Hydrochlorid Dihydrat	Caesar & Lorentz, Hilden, Deutschland	10218313
Kaliumchlorid	Grüssing, Filsum, Deutschland	0238
Kaliumhydroxid 0.1 mol/l	Grüssing, Filsum, Deutschland	8302
L-Weinsäure	AppliChem, Darmstadt, Deutschland	50610
Silberchlorid	Honeywell, Seelze, Deutschland	50770
Salzsäure 1 mol/l	Merck, Darmstadt, Deutschland	1.09057.9010
Ethanol 99,8 % (V/V)	VWR Internat., Darmstadt, Deutschland	13D150523
gereinigtes Wasser	Hausnetz (Gegenosmose)	keine
Coffeincitrat	Fagron, Barsbüttel, Deutschland	11/12-N13

**Tabelle 6.3:** Betriebsgase des Gaschromatographen.

Gas	Bezugsquelle
Helium 5.0	Air Liquid Deutschland, Düsseldorf, Deutschland
Laborluft	zentrales Versorgungsnetz
Stickstoff 5.0	Air Liquid Deutschland, Düsseldorf, Deutschland
Wasserstoff 5.0	Air Liquid Deutschland, Düsseldorf, Deutschland

**Tabelle 6.4:** Substanzen zur Untersuchung des Fleischaromas PLP.

Substanz	Bezugsquelle	Charge
2-Heptanon	Alfa Aesar, Karlsruhe, Deutschland	10170451
2-Methylpyrazin	Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland	MKBF6167V
2-Pentylfuran	Alfa Aesar, Karlsruhe, Deutschland	1014402
Chloroform	VWR Internat., Darmstadt, Deutschland	07-130521
Isobutyraldehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland	S6329556
Isovaleraldehyd	Alfa Aesar, Karlsruhe, Deutschland	10156686
Toluol	Merck, Darmstadt, Deutschland	K29778358-143
Methanol	VWR Internat., Darmstadt, Deutschland	10Z1016
destilliertes Wasser	Labordestillation	keine
Lithiumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	093192922
Natriumchlorid	VWR Internat., Darmstadt, Deutschland	12K2600092
Natriumbromid	AppliChem, Darmstadt, Deutschland	1K004301

**Tabelle 6.5:** Substanzen zur Untersuchung von Orangenöl.

Substanz	Bezugsquelle	Charge
(R)-Limonen	Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland	MKBH7774V
Terpinolen	Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland	MKBH3144V
(R)- $\alpha$ -Pinen	Alfa Aesar, Karlsruhe, Deutschland	10175835
(S)- $\beta$ -Pinen	Alfa Aesar, Karlsruhe, Deutschland	10173522
Myrcen	Sigma-Aldrich, Seelze Deutschland	MKBN3582/ BCBG5524V
$\alpha$ -Terpinen	Alfa Aesar, Karlsruhe, Deutschland	K13Y037
$\gamma$ -Terpinen	Acros Organics, Geel, Belgien	A0339638
R-/S-Linalool	Alfa Aesar, Karlsruhe, Deutschland	10158737
Octanal	Alfa Aesar, Karlsruhe, Deutschland	10113645
Nonanal	Sigma-Aldrich, Seelze Deutschland	MKBL4339V
Decanal	Alfa Aesar, Karlsruhe, Deutschland	10179990
Miglyol	Caesar & Lorentz, Hilden, Deutschland	12078606
n-Pentanol	Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland	STBC5184V
Orangenöl Kalifornien	Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland	MKBN5546V
Orangenöl Florida	Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland	W282529-SAMPLE-K
Sudanrot	Merck, Darmstadt, Deutschland	8522462

## 6.2 Methoden

### 6.2.1 Sensorsystem zur Erfassung gelöster Verbindungen

#### 6.2.1.1 Probenvorbereitung

Proben für die Vermessung mit dem Sensorsystem zur Erfassung gelöster Verbindungen wurden in gereinigtem Wasser gelöst. Die Partikelfreiheit wurde bei Proben aus Fleischaromen durch Filtration mit einem  $0.45\ \mu\text{m}$  Polypropylen-Filter (VWR International, Darmstadt, Deutschland) und einer 10 mL Einmalspritze (Terumo Deutschland, Eschborn, Deutschland) erzielt.

#### 6.2.1.2 Messmethode

Das Sensorsystem SA-402B (Insent, Atsugi-chi, Japan) wurde mit sieben Lipidsensoren (TecLabS Europe, Essen, Deutschland) und zwei Sensorsets (S1204037 sowie S1108015, S1211063 und S0912016) sowie drei unterschiedlichen Referenzsensoren verwendet (Tabelle 6.6). Das System bietet Platz für zehn Proben, wobei die Position Eins von einer  $0,5\ \text{mmol/L}$  Chinin-HCl Lösung besetzt war (siehe unten).

**Tabelle 6.6:** Verwendete Sensoren für das Sensorsystem der Firma Insent sowie eine Aufführung der ethanolischen Waschlösung und des Akzeptanzbereiches der Eignungsprüfung „Sensor-Check“ (Insent 2008).

Sensor	Bezeichnung	ethanolische Waschlösung	Akzeptanzbereich [mV]
SB2AAE	Umami-Sensor	negativ	$-80 \leftrightarrow +60$
SB2CT0	Salzig-Sensor	negativ	$+90 \leftrightarrow +130$
SB2CA0	Sauer-Sensor	negativ	$-80 \leftrightarrow +60$
SB2C00	Bitter-Sensor 3	positiv	$+80 \leftrightarrow +160$
SB2AE1	Adstringierend-Sensor	positiv	$+80 \leftrightarrow +160$
SB2AC0	Bitter-Sensor 1	negativ	$-80 \leftrightarrow -30$
SB2AN0	Bitter-Sensor 2	negativ	$-80 \leftrightarrow -30$

Die Sensoren waren mit einer wässrigen gesättigten Silberchlorid Lösung mit  $3,3\ \text{mol/L}$  Kaliumchlorid gefüllt (ca.  $0,2\ \text{mL}$ ). Als Referenz-, Wasch- und Lagerungslösung diente eine wässrige Lösung aus  $30\ \text{mmol/L}$  Kaliumchlorid und  $0,3\ \text{mmol/L}$  L-Weinsäure. Die Referenzsensoren wurden in einer  $3,3\ \text{mol/L}$  Kaliumchlorid Lösung gelagert. Weiterhin wurde eine positive ( $100\ \text{mmol/L}$  Kaliumchlorid und  $10\ \text{mmol/L}$  Kaliumhydroxid in  $30\ \%$  (m/m) Ethanol) und eine negative ( $100\ \text{mmol/L}$  Salzsäure in  $30\ \%$  (m/m) Ethanol) ethanolische Waschlösung zur Reinigung der Sensoren während der Messung genutzt.

Da die Gefahr eines Substanz austausches zwischen einzelnen Sensormembranen besteht, wurden die Sensoren in festen Gruppen (SB2AAE, SB2CT0 & SB2CA0/ SB2C00 & SB2AE1/ SB2AC0 & SB2AN0) verwendet.

Vor Beginn eines Messlaufes wurden die Sensoren einem Eignungstest unterzogen, wobei das gemessene Potential innerhalb vom Hersteller vorgegebener Grenzen (Tabelle 6.6) liegen musste. Mit Hilfe einer Wasserkühlung (Thermo Haake K10 / DC10, Thermo Haake, Karlsruhe, Deutschland) wurde die Temperatur der Proben während der Messung konstant bei einer Temperatur von 20 °C gehalten.

Die Messung einer Probe erfolgte über mehrere Einzelschritte. Zuerst wurden die Sensoren gewaschen (90 Sekunden ethanolische Waschlösung, zweimal 120 Sekunden wässrige Waschlösung), danach erfolgten sich wiederholende Referenzmessungen bis die Streuung dreier aufeinanderfolgender Messsignale nicht größer als 0,5 mV pro Sensor war. Die Sensoren wurden für 30 Sekunden in die Probenlösung getaucht und das Sensorpotential zum Ende der Messzeit als Sensorsignal verwendet. Im Anschluss wurden sie für zweimal drei Sekunden gewaschen und abschließend in eine Referenzlösung getaucht, um ein weiteres Sensorsignal, den Nachgeschmack, zu messen. Jede Probe wurde viermal vermessen und der erste Messwert verworfen.

Die Verwendung eines externen Standards (0.5 mmol/L Chininhydrochlorid) ermöglichte es, systembedingte Schwankungen über mehrere Tage auszugleichen. Es wurde dazu ein standardisiertes Potential ( $R_{Std}$ ) aus dem Messsignal der Probe ( $R_P$ ) und dem Signal des Standards ( $R_{QH}$ ) gebildet (Gleichung 6.1). Dieses Signal wurde für die weitere Auswertung genutzt.

$$R_{Std} = R_{QH} - R_P \quad (6.1)$$

### 6.2.1.3 Auswertung

Die Auswertung der Messwerte erfolgte sowohl univariat als auch multivariat. In beiden Fällen wurden die Daten zunächst mit Excel 2013 (Microsoft, Redmond, USA) verarbeitet. Für die univariate Darstellung der Ergebnisse wurde Origin 9.0 Pro (OriginLab Corporation, Northampton, Großbritannien) genutzt. Die Datenverarbeitung für die multivariate Auswertung erfolgte mit SIMCA-P+ v13.0 (Umetrics AB, Umea, Schweden).

### 6.2.1.4 Beschreibung der Signalverläufe

Die Beschreibung der Sensorsignale erfolgte mit drei Methoden. Im Fall der linearen Regression wurde eine Regressionsanalyse der Sensorsignale durchgeführt. Dabei wurde der

verwendete Konzentrationsbereich so lange eingengt, bis der Regressionskoeffizient ( $R^2$ ) einen Wert von  $R^2 > 0,99$  annahm.

Die Beschreibung der Signale auf Basis des Massenwirkungsgesetzes erfolgte durch iterative Anpassung der Variablen in den entwickelten Gleichungen 3.5 und 3.4 (Abschnitt 3.1). Die Güte der Anpassung wurde anhand des Quadratfehlers der Residuen beurteilt.

Mit Python 2.7.2 (Python Software Foundation, Beaverton, USA) und den Zusatzpaketen Scipy 0.12.0 und Numpy 1.6.1 wurde ein Anpassungsalgorithmus (Quellcode 6.1) zur Beschreibung der Signale mit der modifizierten Hill-Gleichung erstellt. Der Code verwendete die Gleichung 3.6 aus Abschnitt 3.1 (Quellcode 6.1 Zeile 15/16) und schätzte mit der *leastsq-Funktion* (Quellcode 6.1 Zeile 17/18) anhand von vorgegeben Größen (Konzentration und Signal) die Variablen der Gleichung ab. Die Güte der Anpassung wurde dabei über die Wurzel des mittleren Quadratfehlers der Vorhersage bewertet (Quellcode 6.1 Zeile 16+20).

**Quellcode 6.1:** Anpassungsalgorithmus zu Berechnung der Parameter für die Beschreibung der Sensorsignale auf Basis der modifizierten Hill-Gleichung.

```

1 def SensorSimulation(Konzentration, SensorSignal):
2     liste = []
3     c_max = numpy.where(Konzentration == max(Konzentration))
4     c_min = numpy.where(Konzentration == min(Konzentration))
5     if (Signal[c_max[0][0]] > Signal[c_min[0][0]]):
6         Um = min(SensorSignal)
7         Us = max(SensorSignal)
8     else:
9         Us = min(SensorSignal)
10        Um = max(SensorSignal)
11
12    for i in (10 - numpy.random.random_sample((10,))*20):
13        c0 = 1.
14        v0 = [Um, Us, numpy.sqrt((0.5 * i) **2)]
15        fp = lambda v, c: (v[0] - v[1])/(1 + (c / c0) **v[2]) + v[1]
16        err = lambda v, c, y: (fp(v,c) - y) **2
17        v, success = scipy.optimize.leastsq(err, v0,
18            args=(Konzentration, SensorSignal), maxfev=100000)
19
20        Rmsep = sum(numpy.sqrt(err(v, Konzentration, SensorSignal)
21            )) / len(Konz)
22        liste.append([Rmsep, v])
23
24    liste.sort()
25    Rmsep = liste[0][0]
26    v = liste[0][1]
27    return [v[0], v[1], c0, v[2], Rmsep]

```

## 6.2.2 Vergleich von Sensorsystem zur Erfassung flüchtiger Verbindungen

Die Tablette wurde als wirkstofffreies Muster von Bayer Animal Health GmbH bezogen und enthielt das Fleischaroma PLP. Die Fleischaromen (Tabelle 6.1) wurden gepulvert und die Tablette gemörsert verwendet. Als Blindprobe wurde immer Laborluft im jeweiligen Probengefäß verwendet.

Für die Messungen mit dem FOX-4000 (AlphaM.O.S., Toulouse, Frankreich) wurden Proben zu  $500 \pm 5$  mg in 20 mL Gasphasen-Probengefäße gefüllt und für 20 Minuten im Probenofen bei 40 °C erwärmt, wobei die Probengefäße mit 500 Umdrehungen pro Minute bewegt wurden. Es wurde 1 mL der Gasphase mit einer Geschwindigkeit von 1 mL/min in das System injiziert und der Messlauf nach 18 Minuten beendet. Als Trägergas wurde synthetische Luft verwendet, die Flussrate wurde vom Hersteller nicht offengelegt.

Es wurde der OdourVector der Firma AltraSens (Bonn, Deutschland) verwendet. Über einen Zeitraum von 1200 Sekunden wird die Gasphase über 200 mg der auf 30 °C erwärmten Probe, die sich in einem Probengefäß befindet, mit einem Fluss von 80 mL/min auf eine gekühlte (25 °C) Adsorberkartusche gespült. Im Anschluss wird die Kartusche für je 30 Sekunden auf 50 °C, 90 °C und 200 °C aufgeheizt. In Abhängigkeit von der Temperatur verlassen flüchtige Moleküle den Adsorber und passieren die sechs Sensoren. Die Frequenzänderung der Sensoren wurde für jede Heizphase aufgezeichnet und so für jede Probe  $3 \times 6 = 18$  Datenpunkte erfasst. Für die Auswertung wurden die Flächen unter der Signalkurve berechnet und als Differenz zwischen einer Referenz (Laborluft) und der Probe dargestellt.

Für die Messung mit dem FlavourSpec (Firma G.A.S Gesellschaft für analytische Sensorsysteme mbH Dortmund, Deutschland) wurden 100 µL der Gasphase über eine Probe (200 mg) nach Temperierung über 10-Minuten bei 40 °C in das System injiziert. Die Trennung auf der Gaschromatograph (GC)-Trennsäule OV5 (MCC - 20 cm) erfolgte mit Stickstoff bei einer Flussrate von 10 mL/min. Die Ionenmobilitätsspektroskopie (IMS) wurde bei einer Temperatur von 45 °C mit einem Driftgasstrom (Stickstoff) von 250 mL/min betrieben. Die quantitative Auswertung erfolgte durch Binärisierung der Chromatogramme mit Origin 9.0G Pro (OriginLab Corporation, Northampton, UK).

Die Messung mit dem Heracles 2 (Firma AlphaM.O.S., Toulouse, Frankreich) erfolgte, indem  $500 \text{ mg} \pm 5 \text{ mg}$  der Probe in einem 20 mL Probengefäß für 20 Minuten bei 40 °C erhitzt wurden, 2,5 mL der Gasphase über der Probe entnommen, über 15 sek im Gerät aufkonzentriert und auf die Säulen (MXT-1701 / MXT-5 Restek GmbH, Bad Homburg, Deutschland) gegeben wurde. Die Temperatur der Säulen betrug initial 40 °C und wurde

nach 2 sek mit einer Heizrate von 3 °C/sek auf 280 °C angehoben.

Als klassischer Gaschromatograph wurde ein Hewlett Packard 6890 (Agilent, Böblingen, Deutschland) mit einem Flammenionisationsdetektor in Kombination mit einem Gasphasen Probengeber Agilent 7694 (Agilent, Böblingen, Deutschland) verwendet. Die Trennung erfolgte auf einer Zebron ZB 624 (Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland) mit einer Länge von 30 m, einem Innendurchmesser von 0,32 mm und einer Filmdicke von 1,80 µm. Als Trägergas wurde Helium mit einer Flussrate von 2,5 mL/min verwendet. Die initiale Temperatur im Ofen betrug 40 °C und wurde nach 5 min mit einer Heizrate von 15 °C/min auf 240 °C angehoben. Es wurden 1 mL der Gasphase über der Probe (300 mg) nach 10 min Ausgleichszeit im Ofen des Probengebers bei 60 °C entnommen und auf die Säule gegeben.

$$x_{norm} = \frac{x_{Messwert} - x_{min}}{x_{max} - x_{min}} \quad (6.2)$$

Für die Hauptkomponentenanalyse wurden die Rohdaten jeder Probe gemäß Gleichung 6.2 zwischen Maximum und Minimum normiert. Die normierten Werte wurden für die Hauptkomponentenanalyse mittenzentriert und auf der ersten bis dritten Hauptkomponente dargestellt. Die Chromatogramme des Systems FalvourSpec wurde anhand des Farbverlaufes binärisiert, gemäß der Gleichung 6.2 normiert und ebenfalls multivariat ausgewertet.

### 6.2.3 Stabilitätsuntersuchung

Für die Untersuchung der molekularen Veränderung von PLP während der Lagerung wurden Tabletten mit einem Gewicht von 205 mg ± 5 mg mit der hydraulischen Tablettenpresse FelxiTab (Roeltgen GmbH & Co. KG, Solingen, Deutschland) aus der Charge 61A90552-I ohne Zusatz von Hilfsstoffen gepresst. Es wurden 8 mm biplane, runde Tablettenstempel genutzt und die Presskraft betrug 40 kN.

**Tabelle 6.7:** Für Hygrostatenkammern verwendete gesättigte Salzlösungen zur Einstellung der relativen Luftfeuchte.

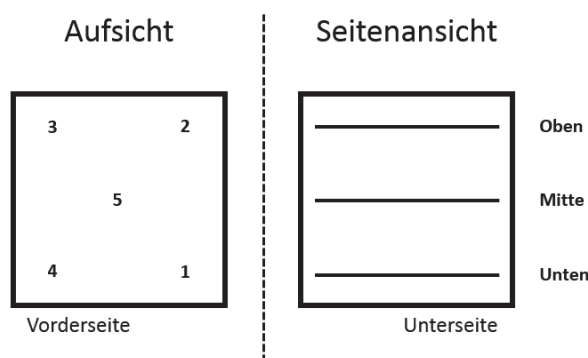
Salz	Temperatur [°C]	relative Luftfeuchte [%]
Lithiumchlorid	25	11,3
Natriumbromid	25	57,5
Natriumchlorid	30	75,3
Natriumchlorid	40	74,7

Die Proben wurden für die Stabilitätsuntersuchung in Hygrostatenkammern gemäß den Vorgaben der ICH-Richtlinie Q1A bei Temperaturen von 25 °C, 30 °C und 40 °C sowie einer

relativen Luftfeuchte r.F. von 11%, 60% und 75% in offenen Gefäßen gelagert (ICH-Q1A 2003). Die relative Luftfeuchte (r.F.) wurde mit Hilfe von gesättigten Salzlösungen eingestellt (Tabelle 6.7). Die Lagerung erfolgte in drei Trockenschränken (ET-6130, Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland) über einen Zeitraum von einem, drei und sechs Monaten. Im Anschluss an die Lagerung wurde der Gehalt von je zwölf Proben bestimmt (Abschnitt 6.2.9.1).

### 6.2.4 Homogenitätsuntersuchung

Für die Überprüfung der Homogenität eines Gebindes PLP der Charge 61A30199-I wurden 15 Proben an fünf unterschiedlichen Position (1-5) und je drei Ebenen (Oben, Mitte, Unten) gezogen (siehe Abbildung 6.1). Dazu wurde mit einer Probenzuglanze in das Gebinde an der jeweiligen Position eingestochen und mittels der Lanze in drei Ebenen eine Probe von je 5 g entnommen. Jede Probe wurde sechsmal analysiert (Abschnitt 6.2.9.1) und die gemessenen Ergebnisse mit einer Varianzanalyse (Einfaktorielle ANOVA) verglichen.



**Abbildung 6.1:** Probenzug für die Überprüfung der Chargenhomogenität. Es wurden Proben an fünf Positionen (Aufsicht) in drei Ebenen (Seitenansicht) gezogen.

### 6.2.5 Konformitätsuntersuchung

Die Konformität zweier Chargen PLP (Charge 61A30199-I und Charge 61A90552-I) wurde anhand von sechs Proben pro Charge, die an einer beliebigen Stelle eines 1 kg Gebinde entnommen wurden, bestimmt. Der Gehalt der Proben wurde analysiert (Abschnitt 6.2.9.1). Der Mittelwert der ermittelten Konzentrationen wurde statistisch verglichen (zweiseitiger studentischen t-Test).



### 6.2.6 Granulation und Trocknung von Pork Liver Powder

Zur Untersuchung der Veränderung von PLP während unterschiedlicher Trocknungsprozesse wurde PLP (Charge 61A90552-I) in einem 2 L Schnellmischer P-VAC 10 (Diosna, Osnabrück, Deutschland) mit Wasser granuliert. Es wurde eine Masse von 100 g verwendet und Agglomerate mit einem 700  $\mu\text{m}$  Sieb gebrochen. Bei einer Drehzahl von 400 U/min wurden mit einer Dosierate von 3,3 g/min Wasser über 15 Minuten granuliert. Im Anschluss wurden Agglomerate mit einem 1,41 mm Zwangssieb zerkleinert und das Granulat für 30 Minuten ruhen gelassen.

Für die Trocknung von je 40 g des Granulates wurde ein Wirbelschichttrockner GPCG1 (Glatt, Binzen, Deutschland), ein Hordentrockner ET6130 (Heraeus, Hanau, Deutschland) und ein Vakuumtrockner VT6025 (Heraeus, Hanau, Deutschland) verwendet. In der Wirbelschicht erfolgte die Trocknung bei 60 °C Eingangstemperatur und einem Volumenstrom von 95 Norm- $\text{m}^3/\text{min}$  für 3 Minuten. In der Horde wurde bei 60 °C über 90 Minuten getrocknet und im Vakuum über 75 Minuten bei 60 °C sowie einem Unterdruck von 100 mbar. Abschließend wurden Proben und Ausgangsmaterial sechsfach mit der in Abschnitt 6.2.9.1 beschriebenen Methode analysiert. Der Wassergehalt wurde mittels Karl-Fischer Titration (Abschnitt 6.2.7) bestimmt.

### 6.2.7 Bestimmung des Wassergehaltes eines Pulvers - Karl Fischer Titration

Der Wassergehalt von Proben wurde mit dem V20 Compact KF Volumeter (Mettler-Toledo, Gießen, Deutschland) als Karl-Fischer Titration bestimmt. Als Arbeitsmedium diente Hydranal-Methanol (Charge SZBC0250V, Honeywell, Seelze, Deutschland) indem ca. 40 mg der Probe suspendiert wurden. Die Titration wurde mit HydranalComposite (Charge SZBC0440V, Honeywell, Seelze, Deutschland) durchgeführt und die Kalibrierung erfolgte mit Hydranal-Water Standard (Charge SZBB0670V, Honeywell, Seelze, Deutschland). Die Proben PLP lösten sich im Arbeitsmedium nicht auf.

## 6.2.8 Dynamische Wasserdampfsorption /-desorption

Die Wasserdampfsorption und -desorption wurde mit einem Sorptionsprüfsystem (SPS 11, Projekt Messtechnik, Ulm, Deutschland) bei 25 °C untersucht. Die r.F. wurde in vier Schritten die r.F. von 50% auf 90% erhöht, dann in acht Schritten 90% auf 10% reduziert und anschließend in vier Schritten auf 50% r.F. angehoben. Eine Änderung der Feuchteinstellung wurde vorgenommen, wenn über 40 Minuten keine Massenänderung von mehr als 0,05 % verzeichnet wurde. Es wurden pro Messzyklus fünf gleiche Proben analysiert.

## 6.2.9 Gaschromatographie

### 6.2.9.1 Gehaltsbestimmung von Pork Liver Powder

#### 6.2.9.1.1 Handhabung von Proben und Standardlösungen

Für die Gehaltsbestimmung von PLP wurden vorgegebene Mengen von 2-Heptanon und Toluol in ca. 77 g Methanol eingewogen (Bezeichnung: Stammlösung 1) und 1,0 g dieser Lösung mit vorgegebene Mengen Isobutyraldehyd, Isovaleraldehyde, 2-Methylpyrazin und 2-Pentylfuran in ca. 76 g Methanol gemischt (Bezeichnung: Stammlösung II). Die Standardlösung wurde durch Zugabe von 200 mg Stammlösung 2 zu ca. 11 g einer 20 %igen Lithiumchlorid Lösung erstellt. Für die Routine-Analytik wurden die in Tabelle 6.8 aufgeführten Standardlösungen verwendet.

**Tabelle 6.8:** Einwaage und Verdünnung der verwendeten Standardlösungen.

Lösung	Einwaage [mg]					
	2-Heptanon	2-Methylpyrazin	2-n-Pentylfuran	Isobutyraldehyd	Isovaleraldehyd	Toluol
Std A1	650	105	25	780	1250	300
Std B1	600	95	20	720	1200	280
Std A2	20 g Std A1 in 57 g Methanol					
Std B2	10 g Std B1 in 67 g Methanol					

Als interner Standard wurde Chloroform zu 100 mg in ca. 77 g Methanol gelöst und die methanolische Lösung im Verhältnis 1:50 in 20 %iger Lithiumchlorid Lösung überführt (Bezeichnung: Interne Standardlösung). Flüssige Proben (z.B. Std) wurden zu 1,0 mL und feste Proben (z.B. Fleischaromen) zu 150 mg in Probengefäße (VWR International, Darmstadt, Deutschland) überführt. Es wurden 1,0 mL des Internen Standards in ein HPLC-Probengefäße (VWR International, Darmstadt, Deutschland) gefüllt und ein solches in jedem Probengefäß platziert. Anschließend wurden selbige mit einem Butyl-PTFE-Stopfen (VWR International, Darmstadt, Deutschland) verschlossen.

### 6.2.9.1.2 GC-System

Für die gaschromatographische Untersuchung wurde ein Agilent 7694 Gasphasen Probengeber (Agilent, Böblingen, Deutschland), ein Hewlett Packard 6890 Gaschromatograph (Agilent, Böblingen, Deutschland) sowie ein Hewlett Packard 5890 Controller (Agilent, Böblingen, Deutschland) verwendet. Detektiert wurde mit einem Flammenionisationsdetektor.

**Tabelle 6.9:** Einstellungen des GC für die Analytik des Gemisches PLP.

Bauteil	Parameter	Einstellungen
Detektor	Temperatur	250 °C
	Wasserstoff	40 ml/min
	Synthetische Luft	450 ml/min
	Stickstoff Make-Up	40 ml/min
Inlet	Mode	Split
	Temperatur	210 °C
	Teilungsverhältnis	1:1
Gasphasen Probengeber	Temperatur Ofen	85 °C
	Temperatur Probenschleife	170 °C
	Temperatur Transferkapillare	185 °C
	Druckbeaufschlagung HS-Vial	110 kPa
	Zeit GC-Zyklus	65 min
	Zeit Temperatursgleich Vial	300 min
	Zeit Druckbeaufschlagung	0,10 min
	Zeit Füllung Probenschleife	0,10 min
	Zeit Probenschleifen Equilibrium	0,05 min
	Zeit Injektion	1,0 min
Schüttelfrequenz	hoch	

Als GC-Trennsäule wurde eine DB-624 (Agilent, Böblingen, Deutschland) mit einer Länge von 60 m, einem Innendurchmesser von 0,25 mm und einer Filmschichtdicke von 1,4  $\mu\text{m}$  verwendet.

Die initiale Temperatur im GC-Ofen betrug 35 °C mit einer Stabilisierungszeit von einer Minute. Zu Beginn der Messung wurde mit 0,5 °C/min für zehn Minuten auf 40 °C aufgeheizt und im Anschluss mit 5 °C/min auf 200 °C. Diese Temperatur wurde für acht Minuten gehalten. Als Trägergas wurde Helium mit einem initialen Gasfluss von 3 ml/min verwendet. Nach 18 Minuten Laufzeit wurde der Gasfluss mit einer Änderung von 0,04 ml/min pro Minute auf 2 ml/min reduziert. Weitere Systemparameter sind in Tabelle 6.9 aufgeführt.

### 6.2.9.1.3 GC-MS-Messungen

Die Identifikation flüchtiger Verbindungen in der Gasphase über einer Probe PLP wurde mit einem GC Agilent 7890A und einem Massenspektrometer Agilent 5975C (Agilent, Böblingen, Deutschland) durchgeführt. Es wurden die in Abschnitt 6.2.9.1.2 beschriebenen GC Parameter verwendet und das Massenspektrometer bei einer Quadrupole-Temperatur und Quellen-Temperatur von 250 °C betrieben.

200 mg einer Probe PLP wurden in einem Probengefäß für 60 Minuten bei 85 °C mit einem CTC-PAL Probengeber (CTC Analytics, Zwingen, Schweiz) erwärmt und 1 mL der Gasphase im Probengefäß in das System injiziert. Die Auswertung der Massenspur erfolgte mit der NIST 5.0 Datenbank (NIST, Vereinigte Staaten von Amerika).

### 6.2.9.2 Gehaltsbestimmung von Orangenölen

#### 6.2.9.2.1 Gaschromatographische olfaktometrische Messungen

Die Erfassung geruchsaktiver Verbindungen eines Orangenöls wurden mit einem GC Trace-Ultra (Fischer Scientific, Schwerte, Deutschland) in Kombination mit einem Bench-TOF-dx (Markes International, Neu-Isenburg, Deutschland) und einem Sniffer-9000 (Brechtbühler, Schlieren, Schweiz) durchgeführt. Es wurde eine FS-Supreme-5 GC-Trennsäule (Fischer Scientific, Schwerte, Deutschland) mit einer Länge von 30 m, Innendurchmesser von 0,25 mm und 0,25  $\mu\text{m}$  Filmdicke verwendet. Die Temperatur im GC-Ofen betrug 40 °C und wurde nach Injektion mit 9 °C/min auf 200 °C angehoben und für 2 Minuten gehalten. Der Injektor wurde bei 280 °C mit einem Teilungsverhältnis von 1:5 betrieben und 1  $\mu\text{L}$  einer 1,6%igen Lösung von Orangenöl in Ethanol injiziert. Der Fluss des Trägergases war aufgrund der Verwendung eines Deans´ Teiler variabel und betrug in etwa 3 mL/min (Rechengrundlage siehe Boeker et al. (2013)). Dieser teilte das eluierte Trägergas im Verhältnis 1:1 zwischen Massenspektrometer und Geruchsport (Transferkapillare 1,5 m bei 200 °C) auf, so dass gleichzeitig die olfaktorische Information und die Massenspur aufgezeichnet werden konnten. Olfaktorische Ereignisse (Wahrnehmung des Probanden) von vier Probanden (je drei Wiederholungen) wurden quantitativ (Regeler des Sniffer 9000) sowie qualitativ (Geruchseindruck) erfasst und den aufgezeichneten Massenspuren (NIST 2.0, National Institute of Standards, Gaithersburg, Vereinigte Staaten von Amerika) zugeordnet.

#### 6.2.9.2.2 Handhabung von Proben und Standardlösungen

Standardlösungen wurden in zwei Schritten hergestellt. Im ersten Schritt wurde eine Vorverdünnung durch Einwaage der Verbindungen (R)- $\alpha$ -Pinen, (S)- $\beta$ -Pinen,  $\alpha$ -Terpinen,  $\gamma$ -Terpinen, Linalool, Octanal, Nonanal und Decanal in 95 g Miglyol hergestellt. Die Stammlösung wurde durch Zusammenführung von 5,0 g der Vorverdünnung mit (R)-Limonen und Myrcen in 42 g Miglyol erzeugt. Der interne Standard, 1-Pentanol, wurde zu 30 mg in

23 g Miglyol gelöst. Als Standardlösung wurden definierte Mengen der Stammlösung und der Lösung des internen Standards gemischt. Proben wurden hergestellt, indem die gewünschte Menge Orangenöl (in der Regel 1,6%) mit Miglyol und einer definierten Menge des internen Standards vermengt wurden. Die Lösungen von Probe oder Standard wurden zu 2 mL in Probengefäße (VWR International, Darmstadt, Deutschland) überführt und vermessen.

### 6.2.9.2.3 GC-System

Die Messungen im Rahmen der Untersuchung des Orangenöls erfolgten mit dem in Abschnitt 6.2.9.1.2 beschriebenen System. In Tabelle 6.10 sind die Einstellungen des Gaschromatographen und des Probengebers aufgeführt. Die GC-Trennsäule bestand aus der Kombination einer Optima-5-Trennsäule (30 m Länge; 0,32 mm Innendurchmesser; 0,25  $\mu$  m Filmdicke) und einer Hydrodex- $\beta$ -TBDM-Trennsäule (25 m Länge; 0,25 mm Innendurchmesser) des Herstellers Machery & Nagel (Düren, Deutschland). Die beiden Trennsäulen wurden mit einem Valco Kapillar-Säulen-Verbinder FSR.4-5 (Valco Instruments, Houston, USA) verbunden. Vom Injektor kommend durchströmte das Trägergas Helium zunächst die Optima-5 und gelangte anschließend über die Hydrodex- $\beta$ -TBDM in den Detektor.

**Tabelle 6.10:** Einstellungen der GC für die Analytik von Orangenöl.

Bauteil	Parameter	Einstellungen
Detektor	Temperatur	210 °C
	Wasserstoff	40 ml/min
	Synthetische Luft	450 ml/min
	Stickstoff Make-Up	40 ml/min
Inlet	Mode	Split
	Temperatur	230 °C
	Teilungsverhältnis	5:1
	Fluss	2,5 ml/min
Gasphasen Probengeber	Temperatur Ofen	100 °C
	Temperatur Probenschleife	140 °C
	Temperatur Transferkapillare	180 °C
	Druckbeaufschlagung HS-Vial	110 kPa
	Zeit GC-Zyklus	36 min
	Zeit Temperatenausgleich Vial	20 min
	Zeit Druckbeaufschlagung	0,10 min
	Zeit Füllung Probenschleife	0,10 min
	Zeit Probenschleifen Equilibrium	0,05 min
	Zeit Injektion	1,0 min
Schüttelfrequenz	hoch	

Die Temperatur im Ofen des GC betrug initial 40 °C und wurde nach Injektion für eine Minute gehalten. Im Anschluss wurde zuerst mit 12 °C/min auf 90 °C aufgeheizt, danach mit einer Heizrate von 2 °C/min die Temperatur auf 120 °C angehoben, mit 20 °C/min auf 200 °C erhöht und für 2 Minuten gehalten.

#### 6.2.9.2.4 GC-MS-Messungen

Flüchtige Verbindungen in dem ausgewählten Orangenöl wurden mit einem GC Trace-Ultra (Fischer Scientific, Schwerte, Deutschland) in Kombination mit einem Bench-TOF-dx (Markes International, Neu-Isenburg, Deutschland) erfasst. Es wurde 1  $\mu\text{L}$  einer 1,6%igen ethanolschen Lösung des Orangenöls in einen Injektor (Teiler 1:5, 280 °C) gegeben. Die Trennung erfolgte mit der soeben (Abschnitt 6.2.9.2.3) beschriebenen Methode (Säulenkombination, Temperaturprogramm, Trägergasfluss). Die Analyse der Massenspektren erfolgte mit Hilfe der Software XCalibur (Fischer Scientific, Schwerte, Deutschland) sowie NIST 5.0 (National Institute of Standards, Gaithersburg, USA).

#### 6.2.9.3 Auswertung

Die Signalfläche der Signale wurde mit der Software EZChrome Elite Version 3.3.2 (Agilent, Böblingen, Deutschland) aus den aufgezeichneten Chromatogrammen und den in Tabelle 6.11 aufgeführten Integrationsparametern errechnet. Diese wurden mit Excel 2013 (Microsoft, Remond, USA) und Origin 9.0G Pro (OriginLab Corporation, Northampton, UK) ausgewertet.

**Tabelle 6.11:** Integrationsparameter der GC-Methoden

Parameter	Vorgegebene Werte	
	Pork Liver Powder	Orangenöl
Signalbreite	0,1	0,1
Schwellenwert	100	500
Minimale Signalfläche	500	5000

### 6.2.10 Probandenstudie mit Orangenölen

Es wurde eine randomisierte, prospektive, einfach-verblindete, experimentelle Studie mit 30 freiwilligen, erwachsenen und ungeschulten Probanden (20 w und 10 m) im Alter von 23 bis 57 Jahren durchgeführt. In zwölf Teilversuchen wurden den Probanden je drei Proben zur olfaktorischen Untersuchung präsentiert. Diese befanden sich in einem 200 mL Glas, das mit einer Petrischale abgedeckt war. Von diesen Proben waren entweder zwei gleich und eine abweichend oder alle drei gleich. Die Probanden sollten, sofern es ihnen möglich war, die Probe mit abweichendem Geruch benennen. Die Nummer der vom Probanden als abweichend empfundenen Probe wurde für die weitere Auswertung notiert.

Als Proben wurden zwei natürliche Orangenöle, kalifornisches Orangenöl (Probe O) und floridianisches Orangenöl (Probe F) sowie drei synthetische Mischungen (Mischung 1/ Mischung 2/ Mischung 3) der im kalifornischen Orangenöl enthaltenen Einzelstoffe (Tabelle 6.12) und eine Blindprobe des Lösungsmittel Miglyol (Probe M) verwendet. Jede Probe zu 10 mL wurde mit drei Tropfen einer Sudanrot-Lösung eingefärbt. In 12 Teilversuchen wurden den Probanden drei Proben eines Teilversuches für 30 Sekunden präsentiert (Tabelle 6.13). Im Anschluss wurde eine Pause von einer Minute zur Erholung der Nase eingelegt.

**Tabelle 6.12:** Zusammensetzung der Mischung 1, 2 und 3 sowie der Orangenöle aus Florida (F) Kalifornien (O) und der Blindprobe (M) für die Untersuchung zur Geruchswahrnehmung von Orangenölen.

Substanz	Konzentration in Probe [ppm]					
	1	2	3	O	F	M
(R)-Limonen	14682	14589	14068			
Myrcen	312,7	311,7				
(R)- $\alpha$ -Pinen	86,71	86,86				
R-/S-Linalool	96,38	92,35				
Decanal	87,50	81,53				
Octanal	39,71	39,77				
$\gamma$ -Terpinen	10,80					
Nonanal	8,75					
(S)- $\beta$ -Pinen	6,94					
Terpinolen	5,89					
$\alpha$ -Terpinen	3,83					
Orangenöl Kalifornien				16000		
Orangenöl Florida					16000	

Es wurde eine binomialverteilte Testgröße angenommen, bei der die Probanden aus einer von drei Möglichkeiten für jeden Teilversuch (Mischung 1, Mischung 2 oder Mischung 3



riecht anders) wählen konnten. Für die Probanden bestand daher eine Wahrscheinlichkeit von 11,11% ( $\frac{1}{3} \cdot \frac{1}{3} = \frac{1}{9}$ ) die enthaltenen Probenpaare (AAB und BBA) durch raten korrekt zu bestimmen. Ob die Probanden die jeweilige Probe statistisch signifikant von der Vergleichsprobe (kalifornisches Orangenöl) unterscheiden konnten, wurde mit einem einseitigen Binomialtest geprüft.

**Tabelle 6.13:** Reihung und Kombination der einzelnen Teilversuche.

Reihung	Probenkombination		
1	O	1	O
2	2	O	O
3	O	O	M
4	O	O	O
5	F	O	O
6	2	2	O
7	O	F	F
8	O	O	M
9	3	O	O
10	O	M	M
11	3	O	3
12	1	O	1



## 7 Anhang

### 7.1 Anhang Methodenentwicklung Pork Liver Powder

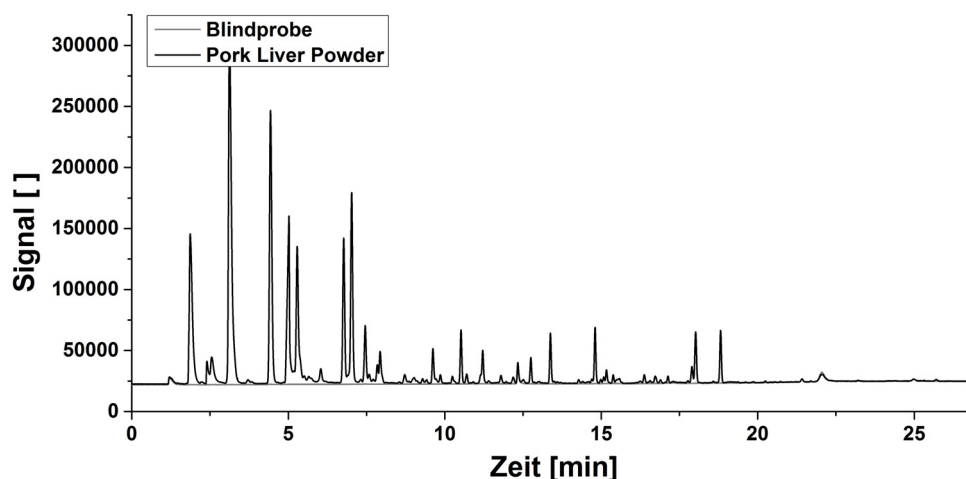
#### 7.1.1 Auswahl einer geeigneten Trennsäule

In der Gaschromatografie kann die Trennung von Verbindungen über die Auswahl der Trennsäule gesteuert werden. Da über die molekulare Struktur der flüchtigen Verbindungen im PLP zu Beginn der Methodenentwicklung wenig bekannt war, wurden zunächst drei GC-Trennsäulen mit unterschiedlichen stationären Phasen getestet. Länge, Filmdicke (FD) und Innendurchmesser (ID) der GC-Trennsäule konnten aufgrund einer geringen Verfügbarkeit unterschiedlicher Säulen nicht konstant gehalten werden. Folgende GC-Trennsäulen wurden verwendet, die Methodenparameter sind in Abschnitt 7.1.3 beschrieben:

1. Optima 5 (25 m Länge; 0,32 mm ID; 3  $\mu\text{m}$  FD) unpolarer Film
2. ZB-624 (30 m Länge; 0,32 mm ID; 1,8  $\mu\text{m}$  FD) mittel-polarer Film
3. DB-FFAP (30 m Länge; 0,53 mm ID; 1  $\mu\text{m}$  FD) polarer Film

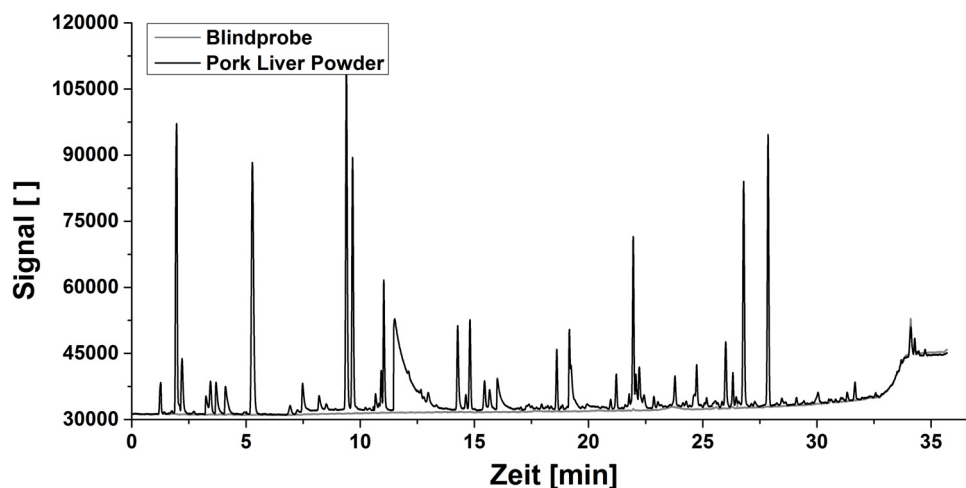
Die unpolare GC-Trennsäule Optima 5 ist mit einem Film aus 5 % Phenyl- und 95 % Methylpolysiloxan beschichtet. Dieser zeigt eine gute Trennleistung für stark lipophile Substanzen (z.B Kohlenwasserstoffe und Ether); allerdings erfahren Substanzen mit hydrophilen Teilstrukturen eine gering ausgeprägte Interaktion mit der stationären Phase und werden früh eluiert. Das mit der Trennsäule Optima 5 aufgezeichnete Chromatogramm von PLP zeigte eine Elution der meisten Verbindungen in den ersten zehn Minuten (Abbildung 7.1). Weiterhin deuteten Überlagerungen und Verbreiterung von Signalen, wie beispielsweise bei Minute 5, 7 und 8 auf eine gering ausgeprägte Interaktion zwischen flüchtigen Molekülen der Probe und den funktionellen Gruppen der stationären Phase hin. Aufgrund der ungenügenden Trennung war somit davon auszugehen, dass es sich um flüchtige Verbindungen mit hydrophilen Teilstrukturen handelt, für die diese Trennsäule nicht geeignet war.

Die mittel-polare stationäre Phase (6 % Cyanopropylphenyl- und 94 % Dimethylpolysiloxane) einer ZB-624 ist für die Auftrennung mittelpolarer Verbindungen wie Aldehyde, Ester und Ketone geeignet. Verbindungen mit partiell hydrophilen Teilstrukturen



**Abbildung 7.1:** Chromatogramme von einem Blank und 500 mg PLP, aufgezeichnet mit der Trennsäule Optima 5.

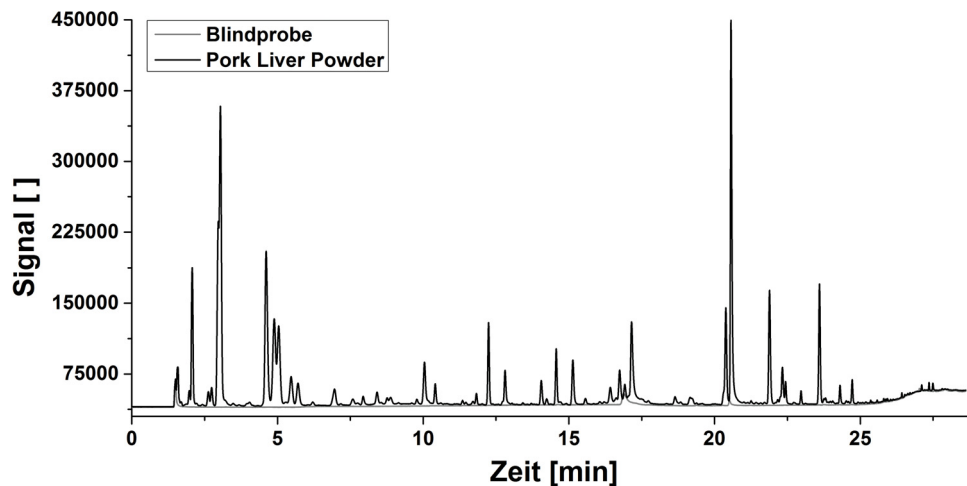
erfahren eine ausgeprägte Interaktion mit der stationären Phase und werden über den Messlauf voneinander getrennt eluiert. Stark lipophile und hydrophile Verbindungen interagieren in einem geringen Maß mit der stationären Phase und werden früh eluiert. Das Chromatogramm (Abbildung 7.2) zeigte eine homogene Verteilung großer und kleiner Signale über den Messlauf von 35 Minuten. Mit Ausnahme eines verbreiterten Signales zwischen der 11. und 13. Minute, waren geringe Signalbreiten zu beobachten. Eine gute Trennung der Verbindungen deutete an, dass diese stationäre Phase für weitere Untersuchung verwendet werden kann.



**Abbildung 7.2:** Chromatogramme von einem Blank und 300 mg PLP, aufgezeichnet mit der Trennsäule Zebron-624.

Polare Verbindungen wie z.B. Carbonsäuren und Alkohole erfahren auf der polaren GC-Trennsäule DB-FFAP, die aus mit Säure modifizierten Polyethylenglycol besteht, eine

gute Trennung. Im vorliegenden Messlauf (Abbildung 7.3) wurden gut getrennte Signale mit geringen Signalbreiten zu späten Retentionszeiten (RT) beobachtet. Gleichzeitig war eine mangelhafte Auftrennung mehrerer sehr früh eluierender Verbindungen (z.B. Signale bei Minute 2, 3 und 5) zu finden. Die Trennsäule konnte daher keine ausreichende Signaltrennung aller Verbindungen sicherstellen, sodass sie für die weitere Verwendung nicht geeignet war.

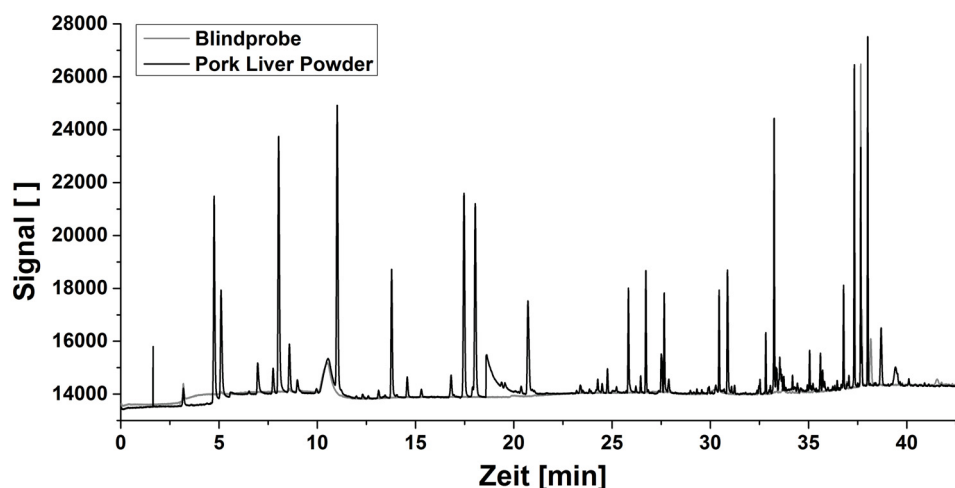


**Abbildung 7.3:** Chromatogramme von einem Blank und 300 mg PLP, aufgezeichnet mit der Trennsäule DB-FFAP.

Die stationäre Phase der ZB-624 (6 % Cyanopropylphenyl- und 94 % Dimethylpolysiloxane) zeigte somit die beste Trennleistung für die im PLP enthaltenen flüchtigen Verbindungen. Die Schärfe der einzelnen Peaks und die homogene Verteilung der Signale über den Messlauf waren am besten.

Um eine höhere Auflösung zu erzielen wurde für die nächsten Messungen eine längere GC-Trennsäule mit kleinerem ID verwendet. Allgemeingültig ist, dass eine Verlängerung der Säule bzw. eine Verringerung des ID die Anzahl theoretischer Trennböden erhöht. Eine Verdoppelung der theoretischen Bodenzahl führt zu einer Verbesserung der Auflösung um den Faktor  $\sqrt{2} \approx 1,41$ . Es wurde die Trennsäule DB-624 (Agilent, Böblingen, Deutschland) verwendet, welche die gleiche stationäre Phase wie die ZB-624 hatte, jedoch mit 60 m doppelt so lang war und mit 0,25 mm einen kleineren ID hatte. Mit dieser konnte eine bessere Auftrennung und höhere Trennschärfe im Vergleich zu den zuvor vorgestellten Säulen erzielt werden (Abbildung 7.4). So sind höhere Signale bei geringerer Einwaage ein Hinweis auf geringere Signalbreiten und damit auf eine bessere Trennung. Die Laufzeit war verlängert und die Signalbreite geringer, sodass die Auftrennung der Signale verbessert war.

Die GC-Trennsäule DB-624 zeigte für den gewünschten Verwendungszweck die besten Ergebnisse und wurde daher für zukünftig Messungen verwendet.



**Abbildung 7.4:** Chromatogramme von einem Blank und 200 mg PLP, aufgezeichnet mit der Trennsäule DB-624.

### 7.1.2 Temperaturprogramm und Trägergasfluss des Gaschromatographen

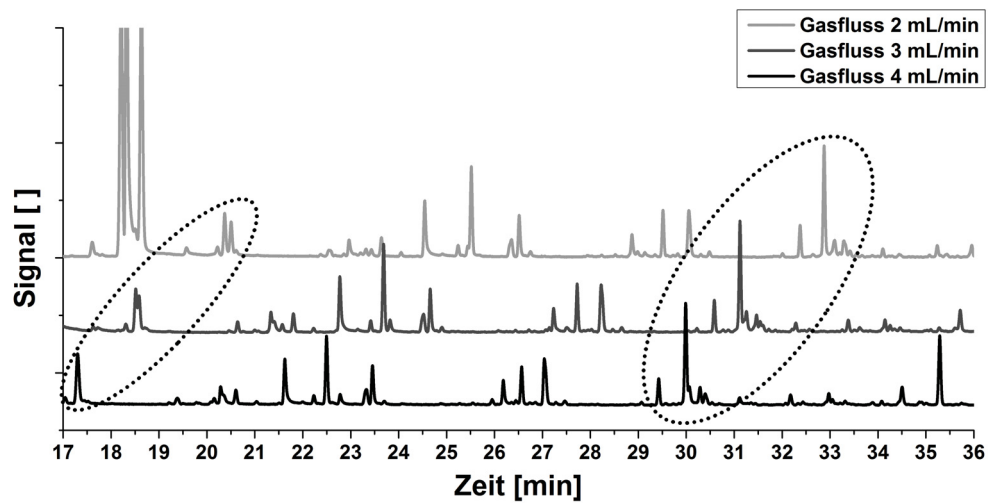
Im nächsten Schritt wurde eine Optimierung des Temperaturprogrammes sowie des Trägergasflusses vorgenommen. Dies sollte die Auftrennung der Substanzen verbessern, ohne jedoch den Messlauf weiter zu verlängern. Für einen systematischen Überblick wurden 300 mg PLP bei variierenden Trägergasflüssen (2 mL/min, 3 mL/min und 4 mL/min) und Heizraten (3 °C/min, 5 °C/min, 7 °C/min und 10 °C/min) vermessen. Die Beurteilung erfolgte anhand der mittleren Anzahl der Signale und deren mittleren Auflösung im Chromatogramm.

In Tabelle 7.1 sind die Ergebnisse der Untersuchung zusammengefasst. Mit höherer Heizrate des GC-Ofens wurde die Anzahl der Signale erhöht und die Auflösung verringert. Eine Verbesserung der Auflösung konnte bei jeder Heizrate durch eine Erhöhung des Trägergasflusses erreicht werden. Die Ergebnisse lassen sich durch den Umstand erklären, dass eine höhere Heizrate die Signalbreite verringert und die Signalthöhe steigert. Es werden daher mehr Signale in einem kürzeren Zeitraum erfasst, was zu einer geringeren Auflösung führt. Für die Auswahl geeigneter Parameter muss daher in Bezug auf die Heizrate des

**Tabelle 7.1:** Mittlere Anzahl und mittlere Auflösung der Signale eines Chromatogramms in Abhängigkeit der Flussrate des Trägergases und der Heizrate des GC-Ofens (n = 2).

		Heizrate [°C/min]			
		3	5	7	10
Gasfluss [mL/min]	2	75,0 / 6,83	100,5 / 3,25	106,0 / 2,99	109,5 / 2,41
	3	78,5 / 7,43	102,0 / 3,36	107,5 / 3,27	116,5 / 2,73
	4	81,0 / 6,93	100,5 / 3,70	106,0 / 3,67	105,0 / 3,09

GC-Ofens ein Kompromiss zwischen Auflösung und Signalzahl eingegangen werden. Eine Heizrate von 5 °C/min stellte einen geeigneten Kompromiss beider Parameter dar.



**Abbildung 7.5:** Chromatogramme von PLP, die mit einer Heizrate von 5 °C/min und unterschiedlichen Trägergasflüssen aufgezeichnet wurden.

Der Vergleich einzelner Chromatogramme führte zu konträren Beobachtungen im Vergleich zu den in Tabelle 7.1 dargestellten Ergebnissen. Wie in Abbildung 7.5 gezeigt, erfolgte die beste Trennung der Signale (Ellipsen Abbildung 7.5) bei einem Trägergasfluss von 2 mL/min. Die Kombination eines höheren Trägergasflusses zu Beginn der Messung und eine Reduktion des Flusses ab der 18. Minute war letztlich ein geeigneter Kompromiss beider Beobachtungen.

Durch Wahl einer Heizrate von 5 °C/min mit einem Trägergasfluss von 3 mL/min und anschließende Reduktion ab Minute 18 auf 2 mL/min, konnten möglichst viele Verbindungen in einem Messlauf erfasst werden. Dies war notwendig, da nicht bekannt war, welche Verbindungen im PLP olfaktorisch aktiv und damit qualitätsbestimmend waren.

### 7.1.3 Methoden zur Wahl einer Trennsäule

#### 7.1.3.1 Messungen mit der Trennsäule Optima-5

Die Messungen mit der Trennsäule Optima 5 (Machery & Nagel, Düren, Deutschland) erfolgten auf einem Gaschromatograph Agilent 7890A mit einem Massenspektrometer Agilent 5975C (Agilent, Böblingen, Deutschland). Die Trennsäule hatte eine Länge von 25 m, einen Innendurchmesser von 0,32 mm und eine Filmschichtdicke von 3 µm. Die Temperatur im Ofen betrug initial 40 °C und nach zwei Minuten mit einer Heizrate von 8 °C/min auf 200 °C angehoben. Der Injektor hatte eine Temperatur von 150 °C mit einem Trägergasdruck von 89,9 kPa und einem Teilungsverhältnis von 1,724 zu 1. Mit einem PAL-xt Gasphasen-Probengeber (CTC Analytics, Zwingen, Schweiz) wurden Proben

bei 60 °C für 5 Minuten erhitzt und 1 mL der Gasphase in den Injektor gegeben. Die Detektion erfolgte mit einem Flammenionisationsdetektor bei einer Temperatur von 300 °C, einem Wasserstofffluss von 30 mL/min, Stickstofffluss von 25 mL/min und Luftfluss von 300 mL/min.

### 7.1.3.2 Messungen mit den Trennsäulen ZB-624, DB-FFAP und DB624

Es wurde ein Agilent 7694 Gasphasen Probengeber, ein Hewlett Packard 6890 Gaschromatograph sowie ein Hewlett Packard 5890 Controller (Agilent, Böblingen, Deutschland) verwendet. Die Detektion erfolgte mit einem Flammenionisationsdetektor bei einer Temperatur von 250 °C, einem Wasserstofffluss von 40 mL/min, Stickstofffluss von 45 mL/min und Luftfluss von 450 mL/min. Die Temperatur im Injektor betrug 130 °C. Die Proben wurden für 20 min bei 60 °C im Gasphasen-Probengeber erhitzt und 1 mL der Gasphase in den GC eingebracht.

Die Trennsäule ZB-624 (Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland) hatte eine Länge von 30 m, einen Innendurchmesser von 0,32 mm und eine Filmschichtdicke von 1,80  $\mu\text{m}$ . Der Trägergasfluss betrug 3,37 mL/min und es wurde ein Teilungsverhältnis im Injektor von 1,5 zu 1 genutzt. Die initiale Temperatur von 30 °C wurde für 6 Minuten gehalten, mit 8 °C/min auf 74 °C angehoben und für 2 Minuten gehalten. Danach wurde die Temperatur mit 5 °C/min auf 170 °C angehoben und dann mit 30 °C/min auf 200 °C, welche für 2 Minuten gehalten wurde.

Die Trennsäule DB-FFAP (Agilent, Böblingen, Deutschland) hatte eine Länge von 30 m, einen Innendurchmesser von 0,53 mm und eine Filmschichtdicke von 1  $\mu\text{m}$ . Das Teilungsverhältnis des Injektors hatte ein Verhältnis von 1 zu 1, dazu wurde ein Trägergasfluss von 6 mL/min verwendet. Die Temperatur des Ofens von 30 °C wurde nach 5 Minuten mit einer Heizrate von 6 °C/min auf 80 °C, mit 3 °C/min auf 96 °C, mit 8 °C/min auf 145 °C und abschließend von dort mit einer Rate von 30 °C/min auf 200 °C angehoben.

Für die Messungen mit der Trennsäule DB-624 (Agilent, Böblingen, Deutschland), die eine Länge von 60 m, einen Innendurchmesser von 0,25 mm und eine Filmschichtdicke von 1,4  $\mu\text{m}$  hatte, wurde die Temperatur des Injektors auf 150 °C erhöht und ein Teilungsverhältnis von 1 zu 1 bei einem Trägergasfluss von 2,8 mL/min gewählt. Die Temperatur des Ofens von 30 °C wurde erst mit 1 °C/min auf 40 °C angehoben, dann mit 7 °C/min auf 50 °C, 2 °C/min auf 62 °C, 20 °C/min auf 100 °C, 6 °C/min auf 180 °C und abschließend mit 10 °C/min auf 200 °C angehoben.



## 8 Literaturverzeichnis

- A. Adams und N. D. Kimpe. *Formation of pyrazines from ascorbic acid and amino acids under dry-roasting conditions*. Food Chemistry, 115(4):1417–1423, 2009.
- E. Adler, M. A. Hoon, K. L. Mueller, J. Chandrashekar, N. J. P. Ryba und C. S. Zuker. *A novel family of mammalian taste receptors*. Cell, 100(6):693–702, 2000.
- E. M. Ahmed, R. A. Dennison, R. H. Dougherty und P. E. Shaw. *Flavor and odor thresholds in water of selected orange juice components*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 26(1):187–191, 1978a.
- E. M. Ahmed, R. A. Dennison und P. E. Shaw. *Effect of selected oil and essence volatile components on flavor quality of pumpout orange juice*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 26(2):368–372, 1978b.
- I. Ahmed und K. Kasraian. *Pharmaceutical challenges in veterinary product development*. Advanced Drug Delivery Reviews, 54(6):871–882, 2002.
- D. Algom und W. S. Cain. *Remembered odors and mental mixtures: Tapping reservoirs of olfactory knowledge*. Journal of Experimental Psychology: Human Perception and Performance, 17(4):1104–1119, 1991.
- AMG. *Arzneimittelgesetz*. Gesetz über den Verkehr mit Arzneimitteln in der Fassung vom 12. Dezember 2005, zuletzt geändert am 27. März 2014. Bundesministerium für Gesundheit, Berlin, Deutschland, 2014.
- R. C. Araneda, A. D. Kini und S. Firestein. *The molecular receptive range of an odorant receptor*. Nature Neuroscience, 3(12):1248–1255, 2000.
- A. A. Arrieta, C. Apetrei, M. L. Rodríguez-Méndez und J. A. De Saja. *Voltammetric sensor array based on conducting polymer-modified electrodes for the discrimination of liquids*. Electrochimica Acta, 49(26):4543–4551, 2004.
- C. L. Arthur und J. Pawliszyn. *Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers*. Analytical Chemistry, 62(19):2145–2148, 1990.

- E. A. Baldwin, J. Bai, A. Plotto und S. Dea. *Electronic noses and tongues: Applications for the food and pharmaceutical industries*. *Sensors*, 11(5):4744–4766, 2011.
- Y. Bing-Sheng, N. Li-Hua und T. Shou-Zhuo. *Ion chromatographic determination of salicylate in human serum with a bulk acoustic wave sensor as detector*. *Journal of High Resolution Chromatography*, 20(4):227–230, 1997.
- D. Blackwood und M. Josowicz. *Work function and spectroscopic studies of interactions between conducting polymers and organic vapors*. *Journal of Physical Chemistry*, 95(1):493–502, 1991.
- P. Boeker. *On 'electronic nose' methodology*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 204:2–17, 2014.
- P. Boeker, J. Leppert, B. Mysliwietz und P. S. Lammers. *Comprehensive theory of the deans' switch as a variable flow splitter: Fluid mechanics, mass balance, and system behavior*. *Analytical Chemistry*, 85(19):9021–9030, 2013.
- V. Bojanowski und T. Hummel. *Retronasal perception of odors*. *Physiology and Behavior*, 107(4):484–487, 2012.
- G. Borg. *Psychophysical scaling with applications in physical work and the perception of exertion*. *Scandinavian Journal of Work, Environment and Health*, 16(SUPPL. 1):55–58, 1990.
- J. W. Bradshaw. *Sensory and experiential factors in the design of foods for domestic dogs and cats*. *Proceedings of the Nutrition Society*, 50(1):99–106, 1991.
- M. Brattoli, G. de Gennaro, V. de Pinto, A. D. Loiotile, S. Lovascio und M. Penza. *Odour detection methods: Olfactometry and chemical sensors*. *Sensors*, 11(5):5290–5322, 2011.
- J. Breitzkreutz und J. Boos. *Paediatric and geriatric drug delivery*. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 4(1):37–45, 2007.
- A. Brunn. *Beiträge zur mikroskopischen anatomie der menschlichen nasenhöhle*. *Archiv für mikroskopische Anatomie*, 39(1):632–651, 1892.
- L. Buck und R. Axel. *A novel multigene family may encode odorant receptors: A molecular basis for odor recognition*. *Cell*, 65(1):175–187, 1991.
- E. Bylaite und A. S. Meyer. *Characterisation of volatile aroma compounds of orange juices by three dynamic and static headspace gas chromatography techniques*. *European Food Research and Technology*, 222(1-2):176–184, 2006.

- D. V. Byrne, W. L. P. Bredie, D. S. Mottram und M. Martens. *Sensory and chemical investigations on the effect of oven cooking on warmed-over flavour development in chicken meat*. Meat Science, 61(2):127–139, 2002.
- CAC. *Reoprt of the Twenty-Third Session of the Codex Committee on Methods of Analysis and Sampling*. Criteria for Evaluating Acceptable Methods of Analysis for Codex Purposes CX/MAS 01/4 (Internetseite: [www.codexalimentarius.org](http://www.codexalimentarius.org) abgerufen am 31. 07. 2014). Codex Alimentarius Commission, Budapest, Hungary, 2001.
- J. A. Carpenter. *Species differences in taste preferences*. Journal of Comparative and Physiological Psychology, 49(2):139–144, 1956.
- A. Chalé-Rush, J. R. Burgess und R. D. Mattes. *Evidence for human orosensory (taste?) sensitivity to free fatty acids*. Chemical Senses, 32(5):423–431, 2007.
- J. Chandrashekar, M. A. Hoon, N. J. P. Ryba und C. S. Zuker. *The receptors and cells for mammalian taste*. Nature, 444(7117):288–294, 2006.
- N. Chaudhari und S. D. Roper. *The cell biology of taste*. Journal of Cell Biology, 190(3):285–296, 2010.
- X. Chen, M. Gabitto, Y. Peng, N. J. P. Ryba und C. S. Zuker. *A gustotopic map of taste qualities in the mammalian brain*. Science, 333(6047):1262–1266, 2011.
- N. Christodoulides, M. Tran, P. N. Floriano, M. Rodriguez, A. Goodey, M. Ali, D. Neikirk und J. T. McDevitt. *A microchip-based multianalyte assay system for the assessment of cardiac risk*. Analytical Chemistry, 74(13):3030–3036, 2002.
- P. Ciosek und W. Wróblewski. *Sensor arrays for liquid sensing - electronic tongue systems*. The Analyst, 132(10):963–978, 2007.
- C. J. Clopper und E. S. Pearson. *The use of confidence or fiducial limits illustrated in the case of the binomial*. Biometrika, 26(4):404–413, 1934.
- T. Courbet, S. Bour, J. Rochet, A. Thibault-Fayard und C. Boda. *Comparison of the acceptance of 2 anthelmintic formulations, in the dog*. Revue de Medecine Veterinaire, 159(10):508–513, 2008.
- C. S. Creaser, J. M. R. Griffiths, C. J. Bramwell, S. Noreen, C. A. Hill und C. L. P. Thomas. *Ion mobility spectrometry: A review. part 1. structural analysis by mobility measurement*. The Analyst, 129(11):984–994, 2004.

- DIN-10959. *Sensorische Prüfverfahren - Bestimmung der Geschmacksempfindlichkeit*. DIN-Norm 10959:2005-07. Deutsches Institut für Normung, Berlin, Deutschland, 2012.
- C. Eckert, C. Lutz, J. Breitzkreutz und K. Woertz. *Quality control of oral herbal products by an electronic tongue - case study on sage lozenges*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 156(1):204–212, 2011.
- EMA. *Excipients in the Dossier for Application for Marketing Authorisation for Veterinary Medicinal Products*. Committee for Veterinary Medicinal Products. European Medicines Agency, London, UK, 1998.
- EMA. *Excipients in the Dossier for Application for Marketing Authorisation of a Medicinal Product*. Committee for Medicinal Products for Human Use. European Medicine Agency, London, UK, 2007.
- EMA. *Guideline on Pharmaceutical Development of Medicines for Paediatric Use*. Committee for Medicinal Products for Human Use - Paediatric Committee. European Medicines Agency, London, UK, 2013.
- EPA-Toluene. *Chemical Summary for Toluene*. Internetseite: [www.epa.gov/chemfact/stoluen.txt](http://www.epa.gov/chemfact/stoluen.txt), abgerufen am 26. 06. 2014. United States Environmental Protection Agency, Seattle, 1994.
- D. Frisch. *Ultrastructure of mouse olfactory mucosa*. *American Journal of Anatomy*, 121(1): 87–120, 1967.
- M. M. Galindo, N. Voigt, J. Stein, J. Van lengerich, J. Raguse, T. Hofmann, W. Meyerhof und M. Behrens. *G protein-coupled receptors in human fat taste perception*. *Chemical Senses*, 37(2):123–139, 2012.
- J. W. Gardner und P. N. Bartlett. *A brief history of electronic noses*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 18(1-3):210–220, 1994.
- GESTIS. *GESTIS-Stoffdatenbank*. Stoffinformation Isobutyraldehyd, Isovaleraldehyd. Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung, Internetseite: [www.dguv.de/ifa/stoffdatenbank](http://www.dguv.de/ifa/stoffdatenbank), abgerufen am 10.09.2014, 2014.
- A. Goodey, J. J. Lavigne, S. M. Savoy, M. D. Rodriguez, T. Curey, A. Tsao, G. Simmons, J. Wright, S. J. Yoo, Y. Sohn, E. V. Anslyn, J. B. Shear, D. P. Neikirk und J. T. McDevitt. *Development of multianalyte sensor arrays composed of chemically derivatized polymeric*

- microspheres localized in micromachined cavities.* Journal of the American Chemical Society, 123(11):2559–2570, 2001.
- P. P. Graziadei. *Cell dynamics in the olfactory mucosa.* Tissue and Cell, 5(1):113–131, 1973.
- B. G. Green, P. Dalton, B. Cowart, G. Shaffer, K. Rankin und J. Higgins. *Evaluating the 'labeled magnitude scale' for measuring sensations of taste and smell.* Chemical Senses, 21(3):323–334, 1996.
- R. W. Griffin, G. C. Scott und C. J. Cante. *Food preferences of dogs housed in testing-kennels and in consumers' homes: Some comparisons.* Neuroscience and Biobehavioral Reviews, 8(2):253–259, 1984.
- W. Grosch. *Evaluation of the key odorants of foods by dilution experiments, aroma models and omission.* Chemical Senses, 26(5):533–545, 2001.
- A. Gustavo González und M. Ángeles Herrador. *A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles.* Trends in Analytical Chemistry, 26(3):227–238, 2007.
- H. Gygax und H. Koch. *The measurement of odours.* Chimia, 55(5):401–405, 2001.
- T. Haas, P. S. Lammers, B. Diekmann, G. Horner und P. Boeker. *A method for online measurement of odour with a chemosensor system.* Sensors and Actuators B: Chemical, 132(2):545–550, 2008.
- W. E. Hanford und R. M. Joyce. *Polytetrafluoroethylene.* Journal of the American Chemical Society, 68(10):2082–2085, 1946.
- G. Hellekant, Y. Ninomiya und V. Danilova. *Taste in chimpanzees. iii: Labeled-line coding in sweet taste.* Physiology and Behavior, 65(2):191–200, 1998.
- L. J. Henderson. *Concerning the relationship between the strength of acids and their capacity to preserve neutrality.* American Journal of Physiology, 21(4):465–465, 1908.
- A. V. Hill. *The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves.* Journal of Physiology - Processings of the Physiological Society, 40 (Suppl.):i – vii, 1910.
- L. L. Hinrichsen und H. J. Andersen. *Volatile compounds and chemical changes in cured pork: Role of three halotolerant bacteria.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 42(7):1537–1542, 1994.

- A. Hinterholzer und P. Schieberle. *Identification of the most odour-active volatiles in fresh, hand-extracted juice of valencia late oranges by odour dilution techniques*. Flavour and Fragrance Journal, 13(1):49–55, 1998.
- T. Hofmann, P. Münch und P. Schieberle. *Quantitative model studies on the formation of aroma-active aldehydes and acids by strecker-type reactions*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48(2):434–440, 2000.
- E. S. Holm, A. Schäfer, T. Skov, A. G. Koch und M. A. Petersen. *Identification of chemical markers for the sensory shelf-life of saveloy*. Meat Science, 90(2):314–322, 2012.
- D. E. Hornung und M. P. Enns. *Odor-taste mixtures*. Annals of the New York Academy of Sciences, 510(1):86–90, 1987.
- K. A. Houpt, H. F. Hintz und P. Shepherd. *The role of olfaction in canine food preferences*. Chemical Senses and Flavor, 3(3):281–290, 1978.
- A. Högnadóttir und 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.
- ICH-Q1A. *Stability Testing of New Drug Substances and Products Q1A(R2)*. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Genf, Schweiz, 2003.
- ICH-Q2. *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)*. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Genf, Schweiz, 2005.
- ICH-Q3C(R5). *Impurities: Guideline for Residual Solvents*. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Genf, Schweiz, 2011.
- ICH-Q8. *Pharmaceutical Development Q8(R2)*. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Genf, Schweiz, 2009.
- S. Iiyama, K. Toko und K. Yamaguchi. *Effect of bitter substances on a model membrane system of taste reception (food / nutrition)*. Agricultural and Biological Chemistry, 50(11):2709–2714, 1986.

- Insent. *Instrument Application*. Operation Manual (Ver. 1.1.2). Intelligent Sensor Rechnology Inc., Japan, 2008.
- Y. Ishimaru, H. Inada, M. Kubota, H. Zhuang, M. Tominaga und H. Matsunami. *Transient receptor potential family members pkd1l3 and pkd2l1 form a candidate sour taste receptor*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103(33): 12569–12574, 2006.
- ISO-5492. *Sensorische Analyse – Vokabular*. DIN EN ISO 5495:2005. Deutsches Institut für Normung, Berlin, Deutschland, 2008.
- ISO-5495. *Sensorische Analyse – Prüfverfahren – Paarweise Vergleichsprüfung*. DIN EN ISO 5495:2005/Cor 1:2006. Deutsches Institut für Normung, Berlin, Deutschland, 2005.
- ISO-8586. *Sensorische Analyse – Allgemeiner Leitfaden für die Auswahl, Schulung und Überprüfung ausgewählter Prüfer und Sensoriker*. DIN EN ISO 8586:2012. Deutsches Institut für Normung, Berlin, Deutschland, 2012.
- ISO-9000. *Qualitätsmanagementsysteme – Grundlagen und Begriffe*. DIN EN ISO 9000:2014. Deutsches Institut für Normung, Berlin, Deutschland, 2008.
- D. James, S. M. Scott, Z. Ali und W. T. O’Hare. *Chemical sensors for electronic nose systems*. Microchimica Acta, 149(1-2):1–17, 2005.
- K. Kajiya, K. Inaki, M. Tanaka, T. Haga, H. Kataoka und K. Touhara. *Molecular bases of odor discrimination: Reconstitution of olfactory receptors that recognize overlapping sets of odorants*. Journal of Neuroscience, 21(16):6018–6025, 2001.
- H. Kalász und I. Antal. *Drug excipients*. Current Medicinal Chemistry, 13(21):2535–2563, 2006.
- S. Kellenberger und L. Schild. *Epithelial sodium channel/degenerin family of ion channels: A variety of functions for a shared structure*. Physiological Reviews, 82(3):735–767, 2002.
- S. Kemp, T. Hollowood und J. Hort. *Sensory Evaluation: A Practical Handbook*. Blackwell Publishing, Singapore, 2009.
- J. G. Kirchner und J. M. Miller. *Canning and storage effects, volatile water-soluble and oil constituents of valencia orange juice*. Agricultural and Food Chemistry, 5(4):283–291, 1957.

- G. Kobal, L. Klimek, M. Wolfensberger, H. Gudziol, A. Temmel, C. M. Owen, H. Seeber, E. Pauli und T. Hummel. *Multicenter investigation of 1,036 subjects using a standardized method for the assessment of olfactory function combining tests of odor identification, odor discrimination, and olfactory thresholds*. European Archives of Oto-Rhino-Laryngology, 257(4):205–211, 2000.
- D. Krautwurst, K. W. Yau und R. R. Reed. *Identification of ligands for olfactory receptors by functional expression of a receptor library*. Cell, 95(7):917–926, 1998.
- P. Krebs und A. Grisel. *A low power integrated catalytic gas sensor*. Sensors and Actuators B: Chemical, 13(1-3):155–158, 1993.
- R. G. Krishnamurthy, T. H. Smouse, B. D. Mookherjee, B. R. Reddy und S. S. Chang. *Identification of 2-pentyl furan in fats and oils and its relationship to the reversion flavor of soybean oil*. Journal of Food Science, 32(4):372–374, 1967.
- J. Lange und C. Wittmann. *Enzyme sensor array for the determination of biogenic amines in food samples*. Fresenius' Journal of Analytical Chemistry, 372(2):276–283, 2002.
- D. K. Larick, B. E. Turner, W. D. Schoenherr, M. T. Coffey und D. H. Pilkington. *Volatile compound content and fatty acid composition of pork as influenced by linoleic acid content of the diet*. Journal of Animal Science, 70(5):1397–1403, 1992.
- A. Legin, A. Rudnitskaya, D. Clapham, B. Seleznev, K. Lord und Y. Vlasov. *Electronic tongue for pharmaceutical analytics: Quantification of tastes and masking effects*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 380(1):36–45, 2004.
- B. Lindemann. *Taste reception*. Physiological Reviews, 76(3):719–766, 1996.
- I. Lundström, S. Shivaraman, C. Svensson und L. Lundkvist. *A hydrogen-sensitive mos field-effect transistor*. Applied Physics Letters, 26(2):55–57, 1975.
- V. Lyall, G. L. Heck, A. K. Vinnikova, S. Ghosh, T. H. T. Phan, R. I. Alam, O. F. Russell, S. A. Malik, J. W. Bigbee und J. A. DeSimone. *The mammalian amiloride-insensitive non-specific salt taste receptor is a vanilloid receptor-1 variant*. Journal of Physiology, 558(1):147–159, 2004.
- D. Machiels, S. M. Van Ruth, M. A. Posthumus und L. Istasse. *Gas chromatography-olfactometry analysis of the volatile compounds of two commercial irish beef meats*. Talanta, 60(4):755–764, 2003.



- T. Maekawa, K. Suzuki, T. Takada, T. Kobayashi und M. Egashira. *Odor identification using a sno2-based sensor array*. Sensors and Actuators B: Chemical, 80(1):51–58, 2001.
- A. Malmendal, C. Amoresano, R. Trotta, I. Lauri, S. De Tito, E. Novellino und A. Randazzo. *Nmr spectrometers as "magnetic tongues": Prediction of sensory descriptors in canned tomatoes*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59(20):10831–10838, 2011.
- R. D. Mattes. *Fat taste and lipid metabolism in humans*. Physiology and Behavior, 86(5): 691–697, 2005.
- M. M. Mesulam. *From sensation to cognition*. Brain, 121(6):1013–1052, 1998.
- D. B. Min, A. L. Callison und H. O. Lee. *Singlet oxygen oxidation for 2-pentylfuran and 2-pentenylfuran formation in soybean oil*. Journal of Food Science, 68(4):1175–1178, 2003.
- S. B. Mitiku, M. Sawamura, T. Itoh und H. Ukeda. *Volatile components of peel cold-pressed oils of two cultivars of sweet orange (citrus sinensis (l.) osbeck) from ethiopia*. Flavour and Fragrance Journal, 15(4):240–244, 2000.
- MMI. *Gelbe Liste Pharmaindex*. Internetseite: <http://www.gelbe-liste.de/>, abgerufen am 24. August 2014. Medizinische Medien Informations GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland, 2014.
- D. T. Moran, J. Carter Rowley III., B. W. Jafek und M. A. Lovell. *The fine structure of the olfactory mucosa in man*. Journal of Neurocytology, 11(5):721–746, 1982.
- M. G. Moshonas und P. E. Shaw. *Quantitative analysis of orange juice flavor volatiles by direct-injection gas chromatography*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 35(1): 161–165, 1987.
- D. S. Mottram. *The effect of cooking conditions on the formation of volatile heterocyclic compounds in pork*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 36(5):377–382, 1985.
- G. Nelson, M. A. Hoon, J. Chandrashekar, Y. Zhang, N. J. P. Ryba und C. S. Zuker. *Mammalian sweet taste receptors*. Cell, 106(3):381–390, 2001.
- G. Nelson, J. Chandrashekar, M. A. Hoon, L. Feng, G. Zhao, N. J. P. Ryba und C. S. Zuker. *An amino-acid taste receptor*. Nature, 416(6877):199–202, 2002.
- W. Nernst. *Zur theorie des elektrischen reizes*. Pflüger, Archiv für die Gesamte Physiologie des Menschen und der Thiere, 122(7-9):275–314, 1908.

- S. M. Njoroge, H. Koaze, P. N. Karanja und M. Sawamura. *Essential oil constituents of three varieties of kenyan sweet oranges (citrus sinensis)*. Flavour and Fragrance Journal, 20(1): 80–85, 2005.
- K. Oohira und K. Toko. *Theory of electric characteristics of the lipid/pvc/dopp membrane and pvc/dopp membrane in response to taste stimuli*. Biophysical Chemistry, 61(1):29–35, 1996.
- K. Oohira, K. Toko, H. Akiyama, H. Yoshihara und K. Yamafuji. *Electric characteristics of hybrid polymer membranes composed of two lipid species*. Journal of the Physical Society of Japan, 64(9):3554–3561, 1995.
- M. Pein, C. Eckert, M. Preis und J. Breitzkreutz. *New protocol for alphaastree electronic tongue enabling full performance qualification according to ich q2*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 83:157–163, 2013.
- M. Pein, M. Preis, C. Eckert und F. E. Kiene. *Taste-masking assessment of solid oral dosage forms - a critical review*. International Journal of Pharmaceutics, 465(1-2):239–254, 2014.
- P. R. Perez-Cacho und R. L. Rouseff. *Fresh squeezed orange juice odor: A review*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 48(7):681–695, 2008.
- C. Pfaffmann. *Gustatory nerve impulses in rat, cat and rabbit*. Journal of Neurophysiology, 18(5):429–440, 1955.
- C. Pfaffmann. *The afferent code for sensory quality*. American Psychologist, 14(5):226–232, 1959.
- Ph.Eur. *Verschiedene Monographien aus dem Europäischen Arzneibuch*. European Directorate for the Quality of Medicines and Health Care. European Pharmacopoeia Edition 8.2, Straßburg, Frankreich, 2014.
- A. Plotto, C. A. Margaría, K. L. Goodner, R. Goodrich und E. A. Baldwin. *Odour and flavour thresholds for key aroma components in an orange juice matrix: Terpenes and aldehydes*. Flavour and Fragrance Journal, 19(6):491–498, 2004.
- Y. Qiao, J. X. Bi, Y. Zhang, G. Fan, L. Y. Xiao und Y. P. Si. *Characterization of aroma active compounds in fruit juice and peel oil of jinchen sweet orange fruit (citrus sinensis (l.) osbeck) by gc-ms and gc-o*. Molecules, 13(6):1333–1344, 2008.

- S. Rappert, K. C. Botsch, S. Nagorny, W. Francke und R. Müller. *Degradation of 2,3-diethyl-5-methylpyrazine by a newly discovered bacterium, mycobacterium sp. strain dm-11*. Applied and Environmental Microbiology, 72(2):1437–1444, 2006.
- J. A. Riul, A. M. G. Soto, S. V. Mello, S. Bone, D. M. Taylor und L. H. C. Mattoso. *An electronic tongue using polypyrrole and polyaniline*. Synthetic Metals, 132(2):109–116, 2003.
- M. I. Robertson. *Regulatory issues with excipients*. International Journal of Pharmaceutics, 187(2):273–276, 1999.
- P. Rozin. *'taste-smell confusions' and the duality of the olfactory sense*. Perception and Psychophysics, 31(4):397–401, 1982.
- F. Röck, N. Barsan und U. Weimar. *Electronic nose: Current status and future trends*. Chemical Reviews, 108(2):705–725, 2008.
- G. Rücker, M. Neugebauer und G. G. Willems. *Instrumentelle pharmazeutische Analytik*. Lehrbuch zu spektroskopischen, chromatographischen, elektrochemischen und thermischen Analysenmethoden, 4. Auflage. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, Stuttgart Deutschland, 2008.
- G. Sauerbrey. *Verwendung von schwingquarzen zur wägung dünner schichten und zur mikrowägung*. Zeitschrift für Physik, 155(2):206–222, 1959.
- S. S. Schiffman, L. A. Gatlin, A. E. Frey, S. A. Heiman, W. C. Stagner und D. C. Cooper. *Taste perception of bitter compounds in young and elderly persons: Relation to lipophilicity of bitter compounds*. Neurobiology of Aging, 15(6):743–750, 1994.
- T. R. Scott und B. K. Giza. *Coding channels in the taste system of the rat*. Science, 249 (4976):1585–1587, 1990.
- T. Seiyama, A. Kato, K. Fujiishi und M. Nagatani. *A new detector for gaseous components using semiconductive thin films [1]*. Analytical Chemistry, 34(11):1502–1503, 1962.
- J. P. Shaw und S. Harayama. *Purification and characterisation of the nadh: Acceptor reductase component of xylene monooxygenase encoded by the tol plasmid pww0 of pseudomonas putida mt-2*. European Journal of Biochemistry, 209(1):51–61, 1992.
- R. N. Shepard, D. W. Kilpatrick und J. P. Cunningham. *The internal representation of numbers*. Cognitive Psychology, 7(1):82–138, 1975.

- M. S. Shields, M. J. Reagin, R. R. Gerger, R. Campbell und C. Somerville. *Tom, a new aromatic degradative plasmid from burkholderia (pseudomonas) cepacia g4*. Applied and Environmental Microbiology, 61(4):1352–6, 1995.
- J. Simons, M. Bos und W. E. Van Der Linden. *Data processing for amperometric signals*. The Analyst, 120(4):1009–1012, 1995.
- J. M. Slater, E. J. Watt, N. J. Freeman, L. P. May und D. J. Weir. *Gas and vapour detection with poly(pyrrole) gas sensors*. The Analyst, 117(8):1265–1270, 1992.
- D. M. Small und J. Prescott. *Odor/taste integration and the perception of flavor*. Experimental Brain Research, 166(3-4):345–357, 2005.
- B. A. Smit, W. J. M. Engels, M. Alewijn, G. T. C. A. Lommerse, E. A. H. Kippersluijs, J. T. M. Wouters und G. Smit. *Chemical conversion of alpha-keto acids in relation to flavor formation in fermented foods*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52(5):1263–1268, 2004.
- B. A. Smit, W. J. M. Engels und G. Smit. *Branched chain aldehydes: Production and breakdown pathways and relevance for flavour in foods*. Applied Microbiology and Biotechnology, 81(6):987–999, 2009.
- J. C. Smith, M. E. Rashotte, T. Austin und R. W. Griffin. *Fine-grained measures of dogs' eating behavior in single-pan and two-pan tests*. Neuroscience and Biobehavioral Reviews, 8(2):243–251, 1984.
- T. Smouse und S. Chang. *A systematic characterization of the reversion flavor of soybean oil*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 44(8):509–514, 1967.
- S. Song, L. Yuan, X. Zhang, K. Hayat, H. Chen, F. Liu, Z. Xiao und Y. Niu. *Rapid measuring and modelling flavour quality changes of oxidised chicken fat by electronic nose profiles through the partial least squares regression analysis*. Food Chemistry, 141(4):4278–4288, 2013.
- A. Strecker. *Notiz über eine eigenthümliche oxydation durch alloxan*. Justus Liebigs Annalen der Chemie, 123(3):363–365, 1862.
- L. O. Sunesen, V. Dorigoni, E. Zanardi und L. Stahnke. *Volatile compounds released during ripening in italian dried sausage*. Meat Science, 58(1):93–97, 2001.
- K. S. Suslick. *An optoelectronic nose: Seeing smells by means of colorimetric sensor arrays*. MRS Bulletin, 29(10):720–725+702, 2004.

- S. Takagi, K. Toko, K. Wada und T. Ohki. *Quantification of suppression of bitterness using an electronic tongue*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 90(12):2042–2048, 2001.
- I. Taverniers, M. De Loose und E. Van Bockstaele. *Trends in quality in the analytical laboratory. ii. analytical method validation and quality assurance*. Trends in Analytical Chemistry, 23(8):535–552, 2004.
- A. G. Thombre. *Oral delivery of medications to companion animals: Palatability considerations*. Advanced Drug Delivery Reviews, 56(10):1399–1413, 2004.
- S. Tiwari, S. Mitkare und P. Bhangale. *Veterinary dosage forms: Review*. International Journal of Applied Pharmaceutics, 6(1):20–29, 2014.
- J. S. Tucker und M. E. Morgan. *Decarboxylation of alpha-keto acids by streptococcus lactis var. maltigenes*. Applied Microbiology, 15(4):694–700, 1967.
- T. Uchida, Y. Miyanaga, H. Tanaka, K. Wada, S. Kurosaki, T. Ohki, M. Yoshida und K. Matsuyama. *Quantitative evaluation of the bitterness of commercial medicines using a taste sensor*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 48(11):1843–1845, 2000.
- USP-621. *Physical Tests - (621) Chromatography*. United States Pharmacopeia Volume 34. U.S. Pharmacopeil Convention, Rockville, USA, 2010.
- T. A. T. G. van Kempen, W. J. Powers und A. L. Sutton. *Technical note: Fourier transform infrared (ftir) spectroscopy as an optical nose for predicting odor sensation*. Journal of Animal Science, 80(6):1524–1527, 2002.
- S. M. van Ruth. *Methods for gas chromatography-olfactometry: A review*. Biomolecular Engineering, 17(4–5):121–128, 2001.
- A. Venema, E. Nieuwkoop, M. J. Vellekoop, M. S. Nieuwenhuizen und A. W. Barendsz. *Design aspects of saw gas sensors*. Sensors and Actuators, 10(1-2):47–64, 1986.
- Y. G. Vlasov, A. V. Legin und A. M. Rudnitskaya. *Cross-sensitivity evaluation of chemical sensors for electronic tongue: Determination of heavy metal ions*. Sensors and Actuators B: Chemical, 44(1-3):532–537, 1997.
- J. D. Vora, R. F. Matthews, P. G. Crandall und R. Cook. *Preparation and chemical composition of orange oil concentrates*. Journal of Food Science, 48(4):1197–1199, 1983.
- L. Vázquez-Araújo, A. Verdú, P. Navarro, F. Martínez-Sánchez und A. A. Carbonell-Barrachina. *Changes in volatile compounds and sensory quality during*

- toasting of spanish almonds*. International Journal of Food Science and Technology, 44 (11):2225–2233, 2009.
- A. Williams, D. Ryan, A. Olarte Guasca, P. Marriott und E. Pang. *Analysis of strawberry volatiles using comprehensive two-dimensional gas chromatography with headspace solid-phase microextraction*. Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 817(1):97–107, 2005.
- F. Winquist, P. Wide und I. Lundström. *An electronic tongue based on voltammetry*. Analytica Chimica Acta, 357(1-2):21–31, 1997.
- K. Woertz, C. Tissen, P. Kleinebudde und J. Breitzkreutz. *Performance qualification of an electronic tongue based on ich guideline q2*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 51(3):497–506, 2010.
- K. Woertz, C. Tissen, P. Kleinebudde und J. Breitzkreutz. *Development of a taste-masked generic ibuprofen suspension: Top-down approach guided by electronic tongue measurements*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 100(10):4460–4470, 2011.
- H. Wohltjen und R. Dessy. *Surface acoustic wave probe for chemical analysis. i. introduction and instrument description*. Analytical Chemistry, 51(9):1458–1464, 1979.
- R. W. Wolford und J. A. Attaway. *Analysis of recovered natural orange flavor enhancement materials using gas chromatography*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 15(3):369–377, 1967.
- R. W. Wolford, G. E. Alberding und J. A. Attaway. *Citrus juice flavor, analysis of recovered natural orange essence by gas chromatography*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 10(4):297–301, 1962.
- A. S. Yuwono, P. Boeker und P. Schulze Lammers. *Detection of odour emissions from a composting facility using a qcm sensor array*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 375 (8):1045–1048, 2003.
- S. Zozulya, F. Echeverri und T. Nguyen. *The human olfactory receptor repertoire*. Genome Biology, 2(6):RESEARCH0018, 2001.