

**Capsaicinoide in frischem und verarbeitetem  
Gewürzpaprika**

Vom Fachbereich Chemie der Bergischen Universität-Gesamthochschule  
Wuppertal zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften

-Dr. rer. nat.-

genehmigte Dissertation

von

**Petra Kirschbaum**

2002

*Für Mark Julian und Michael*

*Meinen Eltern in Dankbarkeit*

## Abstract

Capsaicinoids are the pungent principles in paprika fruits. They are only found in *Capsicum* plants. While the biosynthesis of capsaicin is largely understood, the metabolism and degradation is still not completely known. A few authors are of the opinion that hot pepper peroxidases are responsible for the degradation. According to this work different chromatographic methods for the analysis of capsaicinoids (HPLC with fluorescence and ELCD and GC with NPD and MS) are compared with each other. From all these methods HPLC with fluorescence detection is the best method because of its high robustness. Furthermore a simple and fast method to determine the capsaicinoid contents in paprika powder and oleoresins were developed.

Fresh pepper fruits purchased as one batch showed a wide spread of pungency level when analysed as individual fruits. The capsaicinoid content of individual fruits from one single plant harvested at the same time after flowering exhibited a wide range of values (217 to 632 mg/kg) and ratios for the three main components capsaicin (48-59 %), dihydrocapsaicin (31-37 %) and nordihydrocapsaicin (9-17 %). There was no correlation with colour as an indication for a different stage in maturity. This observation was confirmed by the analysis of fruits from a second and third plant grown under identical conditions and for several harvest times at different stages of maturity.

Due to the above analysis of this heterogeneity of individual fresh fruits the storage of whole fruits was not appropriate. The capsaicinoid levels were in good agreement when fruits were minced before analysis or stored as halves. There was a difference in minced and intact fruits (paprika halves). The capsaicinoid content in fruits of *Capsicum annuum* decreased within several days to a level of only 5 % of the starting value, when cells were disrupted by homogenisation. This decrease was not observed in fruits which were carefully cut into halves. The reduction of capsaicinoids was depending on temperature and activity of water, so an enzymatic metabolism is suggested.

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Juni 1997 bis April 2000 an der Bergischen Universität - Gesamthochschule Wuppertal im Fachbereich 9/Lebensmittelchemie.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Michael Petz für die mir gebotene Möglichkeit in seinem Arbeitskreis zu promovieren sowie für die Betreuung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Besonders danken möchte ich Frau Dr. Erika Müller-Seitz für die fachliche Beratung und wertvollen Diskussionen.

Mein Dank gilt auch Herrn Dieter Riegel (BUGH Wuppertal, Fachbereich 9/Textilchemie) für die Bestimmungen der Farbcharakteristika und Herrn Dr. Volker Böhm (Friedrich-Schiller-Universität Jena) für die Analyse der Carotinoide.

Frau Claudia Mohr und Herrn Ralf Kreuer danke ich für ihre im Rahmen des studentischen Praktikums an der BUGH Wuppertal geleistete Mitarbeit. Herrn Kreuer danke ich ebenfalls sehr für die im Gewächshaus angebauten Früchte. Frau Constanze Hiepler möchte ich für die Unterstützung bei den Untersuchungen zur Lagerstabilität danken.

Darüber hinaus danke ich dem DIN-Arbeitsausschuß „Gewürze und würzende Zutaten“ für die Möglichkeit, bei der Erarbeitung einer DIN-Methode mitzuwirken, Herrn Prof. Dr. Peter Schieberle (TU München) und der Firma Henry Lamotte (Bremen) für die Bereitstellung der Paprikaprogen aus Ungarn und Marokko und der Capsicum-Oleoresine.

Meinen Kolleginnen und Kollegen danke ich für die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre und für die gute Zusammenarbeit, in der diese Arbeit entstanden ist.

An dieser Stelle möchte ich auch der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung danken.

Ein besonderes Dankeschön möchte ich meinen Eltern widmen, die mir meine akademische Ausbildung ermöglicht haben. Schließlich danke ich ganz besonders herzlich meinem Mann, der immer Zeit für mich hatte und mir mit unendlicher Geduld viele hilfreiche Ratschläge gegeben hat.

## **Theoretischer Teil**

<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2 Herkunft und Verbreitung der Paprikafrucht</b>	<b>2</b>
<b>3 Scharfstoffe</b>	<b>3</b>
3.1 Struktur und Verteilung	3
3.2 Sensorische und sonstige Eigenschaften	6
3.3 Lokalisation	7
3.4 Biosynthese	9
3.5 Veränderungen während der Reifung	9
3.6 Bedeutung von Peroxidasen für den Capsaicinoidabbau	12
3.7 Einfluß der äußeren Bedingungen auf den Capsaicinoidgehalt	14
3.8 Verarbeitung	15
<b>4 Aromastoffe</b>	<b>16</b>
<b>5 Farbe</b>	<b>17</b>
<b>6 Analytik der Scharfstoffe</b>	<b>18</b>
6.1 Probenvorbereitung	18
6.2 Bestimmungsmethoden	19
6.2.1 Summenbestimmungen	20
6.2.1.1 Sensorik	20
6.2.1.2 Spektrometrische Verfahren	20
6.2.2 Selektive Bestimmungen	21
6.2.2.1 Chromatographie	21
6.2.2.1.1 Gaschromatographie	22
6.2.2.1.2 Hochleistungsflüssigchromatographie	23
<b>7 Zielsetzung</b>	<b>27</b>

## Experimenteller Teil

<b>8 Meßmethoden</b>	<b>29</b>
8.1 Hochleistungsflüssigchromatographie	29
8.1.1 Aufnahme hydrodynamischer Voltammogramme	30
8.1.2 Quantifizierung	31
8.1.3 Analyse von Pulvern	35
8.1.4 Fazit	35
8.2 Gaschromatographie	36
8.2.1 Methodenentwicklung für die Detektion mittels stickstoffselektivem Detektor	37
8.2.2 Quantifizierung	38
8.2.3 Bestimmung der Nachweisgrenze (NWG)	40
8.2.4 Wahl eines geeigneten internen Standards	40
8.2.5 Derivatisierung	42
8.2.6 Massenselektive Detektion	45
8.2.7 Fazit	47
<b>9 Probenvorbereitung</b>	<b>48</b>
9.1 Methoden für die HPLC	48
9.1.1 Pulver	48
9.1.1.1 Vereinfachte Aufarbeitung (nur Extraktion)	48
9.1.1.1.1 Nachextraktion	51
9.1.1.1.2 Aufarbeitung mit innerem Standard	51
9.1.1.2 Flüssig-Flüssig-Verteilung nach Ethylacetatextraktion (Optimierung)	52
9.1.2 Oleoresine	55
9.1.2.1 Flüssig-Flüssig-Verteilung	55
9.1.2.2 Vereinfachte Aufarbeitung	57
9.2 Methoden für die Gaschromatographie	59
9.2.1 Flüssig-Flüssig-Verteilung mit Ausschütteln	59
9.2.2 Vereinfachte Aufarbeitung (nur Extraktion)	62
<b>10 Untersuchung an frischen Früchten</b>	<b>64</b>
10.1 Früchte aus dem Handel	64
10.1.1 Heterogenität	65
10.1.2 Fruchtfarbe und Capsaicinoidgehalt	67

10.1.3 Verteilung der Capsaicinoide auf einzelne Fruchtsegmente	68
10.1.4 Fruchthälften	71
10.1.5 Fazit	73
10.2 Lagerstudien an frischem Fruchtmaterial	73
10.2.1 Schnitzel: Ermittlung der optimalen Aufarbeitungsmenge	73
10.2.2 Lagerung zerkleinerter Früchte (Schnitzel)	75
10.2.3 Lagerung von Hälften	82
10.2.4 Vergleich der Capsaicinoidstabilität in halbierten und geschnitzelten Früchten	84
10.3 Früchte aus Gewächshausanbau	88
10.3.1 Capsaicinoidgehalte während Fruchtentwicklung und -reife	91
<b>11 Sorten- und Herkunftszuordnung bei Paprikapulvern</b>	<b>93</b>
11.1 Ungarische und marokkanische Paprikapulver	93
11.2 Amerikanische Paprikapulver	96
<b>Diskussion und Arbeitsvorschriften</b>	
<b>12 Diskussion</b>	<b>98</b>
12.1 Meßmethoden	98
12.2 Probenvorbereitung	101
12.2.1 HPLC	101
12.2.2 Gaschromatographie	102
12.3 Frische Früchte	103
12.3.1 Heterogenität	103
12.3.1.1 Handelsware	103
12.3.1.2 Früchte aus Gewächshausanbau	104
12.3.2 Lagerstudien	106
12.4 Sorten- und Herkunftszuordnung bei Paprikapulvern	110
<b>13 Zusammenfassung</b>	<b>113</b>

<b>14 Arbeitsvorschriften</b>	<b>116</b>
14.1 Reagenzien und Lösungsmittel	116
14.2 Glasgeräte und Laborbedarf	117
14.3 Technische Laborgeräte	117
14.4 HPLC	118
14.4.1 Chromatographische Ausrüstung	118
14.4.2 Probenvorbereitung	118
14.4.2.1 Flüssig-Flüssig-Verteilung nach Ethylacetatextraktion	118
14.4.2.1.1 Paprikapulver	118
14.4.2.1.2 Oleoresine	119
14.4.2.2 Vereinfachte Probenvorbereitung (nur Extraktion)	119
14.4.2.2.1 Paprikapulver	119
14.4.2.2.2 Oleoresine	120
14.4.2.3 Frische Früchte	120
14.4.2.3.1 Schnitzel	120
14.4.2.3.2 Hälften	121
14.4.2.3.3 Hälften und ihre zugehörigen Schnitzel	122
14.4.2.3.4 Einzelne Früchte (Anbaustudie)	122
14.4.3 Quantifizierung	122
14.4.3.1 Stammlösung und Standardlösungen	122
14.4.3.2 Berechnung des Capsaicinoidgehaltes	123
14.5 Gaschromatographie	124
14.5.1 Chromatographische Ausrüstung	124
14.5.1.1 Stickstoffselektive Detektion	124
14.5.1.2 Massenspektrometrie	125
14.5.1.2.1 Massenfragmente der derivatisierten Capsaicinoide	125
14.5.1.2.2 Proben (underivatisiert)	126
14.5.2 Probenvorbereitung	127
14.5.2.1 Flüssig-Flüssig-Verteilung (mit Ausschütteln)	127
14.5.2.2 Vereinfachte Aufarbeitung (nur Extraktion)	127
14.5.3 Quantifizierung	127
14.5.3.1 Standardlösungen	127
14.5.3.2 Berechnung des Capsaicinoidgehaltes	128
14.6 Synthese von Laurinsäurebenzylamid	129
14.7 Bestimmung der ASTA-Farbwerte	129



## **Literatur**

**15 Literaturverzeichnis** **131**

**Anhang** **136**

**16 Capsaicinoidgehalte und -muster frischer Paprikafrüchte** **136**

**17 Abkürzungsverzeichnis** **140**

## Theoretischer Teil

### 1 Einleitung

Unter dem Sammelbegriff „Capsicum“ versteht man eine Vielzahl verschiedenartiger Gewächse der gleichen Pflanzengattung. Botanisch gehören sie zu den Nachtschattengewächsen (Solanaceae). Als wertgebende Bestandteile besitzen sie die scharf schmeckenden Capsaicinoide, die roten Farbstoffe, z.B. Capsanthin und Carotin, und erhebliche Mengen Ascorbinsäure. In Süd- und Mittelamerika waren sie ursprünglich heimisch, heute wachsen sie aber in vielen warmen Ländern. Die Form und Größe der Stauden und der Frucht, die Blüten- und Fruchtfarbe, der Gehalt an Aroma- und Scharfstoffen, die Ertragshöhe und die Verwendungsmöglichkeiten sind sehr unterschiedlich. Es gibt wildwachsende und angebaute Capsicumarten mit milden und scharfen, großen und kleinen Früchten. Verwendung finden die Früchte der Capsicum-Pflanzen in frischem, eingelegtem wie auch getrocknetem und gemahlenem Zustand.<sup>1-6</sup>

So wie es eine Vielzahl an Sorten der Gattung „Capsicum“ gibt, existieren auch die vielfältigsten Bezeichnungen für diese Früchte. *Brücher*<sup>7</sup> berichtet, daß die Franzosen beispielsweise einige Kultivare „Cayenne“ nennen, vor allem diejenigen, die auf der Zunge einen sehr scharfen Geschmack hinterlassen. In England wiederum wird die Kollektivbezeichnung „pepper“ verwendet, was zu einer Verwechslung mit dem echten Pfeffer der Gattung *Piper nigrum* führt. Dafür wird in Mexiko und Nordamerika mehr der Name „Chili“ gebraucht, da die Spanier diese Frucht für chilenischen Ursprungs hielten. In Mitteleuropa schließlich hat sich die Bezeichnung Paprika und für die sehr scharfen Sorten Chili oder Pepperoni durchgesetzt. Aber nicht nur die landläufigen Bezeichnungen sind sehr vielfältig, sondern auch die wissenschaftliche, lateinische Nomenklatur ist es. Das Genus *Capsicum* wurde von Linné (1753) geschaffen. Er stellte damals drei Arten auf: *Capsicum annum*, *Capsicum frutescens* und *Capsicum baccatum*. Inzwischen sind weitere 30 Taxa beschrieben worden, einige Autoren zählen sogar bis zu 100 Namen auf.<sup>7</sup> Die Zuordnung zu den einzelnen Arten gestaltet sich aufgrund der Kultivierung und Kreuzung und damit verbundenen Formenvielfalt jedoch als fast unmöglich.<sup>4</sup>

Im deutschen Handel ist vorwiegend *Capsicum annum* erhältlich. Er wird als Gemüse- bzw. Speisepaprika oder Gewürzpaprika angeboten. Der Gemüsepaprika ist mild bis süß im Geschmack. Es handelt sich hierbei um eine Capsaicinoid-freie Mutante<sup>7</sup>, die dickwandig und saftig ist und ihre Wildformen in der Fruchtgröße um das 500fache übertrifft. Gewürzpaprika dagegen schmecken je nach Capsaicinoidgehalt scharf bis sehr scharf. Sie bilden meist schmale, spitz auslaufende Früchte von 3 bis 15 cm Länge. Aber auch runde oder vierkantige Formen in verschiedenen Farben (rot, grün, gelb, orange) sind erhältlich, wobei grüne und rote Früchte überwiegen. Das Fruchtfleisch ist fester und dickhäutiger als das des Gemüsepaprikas.

Das Fruchttinnere ist hohl und mit Scheidewänden unterteilt, an denen sich die flachen, weißlichen Samen befinden.<sup>8</sup>

## 2 Herkunft und Verbreitung der Paprikafrucht

*Stella*<sup>9</sup> berichtet, daß man Chili in Mexiko seit neuntausend Jahren ißt, wie Ausgrabungen gezeigt haben. Es gibt dort mehr als hundert Arten in allen Farben und Formen, die mehr oder weniger scharf sind. Auf den Antillen findet man die interessantesten Chilisorten, „wie zum Beispiel den dünnen und sehr harten *zózio* (auch „Vogelchili“ oder „Vogelzunge“ genannt), den langen *zíndien*, den runden, prallen, und höllisch scharfen *bonda a Man Jacques* (der „Hintern von Madame Jacques“), den Kirschen-Chili, den Lampion-Chili und viele andere mehr. Guayana und die Antillen sind auch Ursprungsort des Cayennepfeffers, der in Wirklichkeit aus verschiedenen extrem scharfen Chilisorten besteht und heute meist gemahlen im Handel ist.“

Christoph Columbus entdeckte um 1493 die Capsicumfrüchte in Amerika. Im 16. Jahrhundert brachte dann ein Spanier aus der Neuen Welt einige Samenkörner oder Setzlinge mit ins Baskenland. Dann gelangte der Paprika nach Griechenland und in die Türkei. Während der türkischen Besatzungszeit wurde er zu einer der großen Spezialitäten Ungarns, wo die Heimat des milden Paprikas ist, einer ganz besonderen Sorte des Capsicum annum. Wesentlich schärfere Sorten wurden in Afrika von Portugiesen und Araber eingeführt. Der schärfste und bekannteste afrikanische Chili ist der *pili-pili*. Bereits im 16. Jahrhundert wurden Capsicumpflanzen in Asien von europäischen und arabischen Siedlern und Reisenden eingeführt. In Indien wird der äußerst scharfe Capsicum frutescens angebaut, wobei seine Produktion die aller übrigen Gewürze bei weitem übertrifft. Sowohl milder wie auch scharfer Paprika ist gemischt mit Kümmel, Nelken, Majoran und Knoblauch das Hauptgewürz in vielen Gerichten und Chilipulvern.<sup>9</sup> Der Curry bzw. das Currypulver, die bekannteste Gewürzmischung aus dem ostasiatischen Raum mit sehr scharfem Geschmack, stammt auch aus Indien. Sie kann neben Gewürzpaprika aus bis zu 65 verschiedenen Gewürzen bestehen.<sup>10</sup> In der Provinz Szechuan in China sind die Chilifrüchte sogar ein Synonym für „langes Leben“.<sup>9</sup>

### 3 Scharfstoffe

#### 3.1 Struktur und Verteilung

Die Schärfe von Gewürzpaprika und Chilis wird durch die Gruppe der Capsaicinoide verursacht, die ausschließlich in den Früchten von Capsicum-Pflanzen gefunden werden. Daher auch der Name Capsaicin bzw. Capsaicinoide. Chemisch gesehen handelt es sich hierbei um N-(4-Hydroxy-3-methoxybenzyl)-alkylamide, die aus Vanillylamin und gesättigten und ungesättigten (trans-) Fettsäuren abgeleitet werden können. Die isolierten Verbindungen kristallisieren in feinen Nadeln und sind farblos.

Ursprünglich hatte man angenommen, daß es sich hierbei um nur eine Verbindung handelte. Wie sich später jedoch herausstellte, stammt die Schärfe von einem Gemisch mehrerer, jedoch sehr ähnlicher Substanzen. Die Hauptkomponenten stellen das Capsaicin (C) und Dihydrocapsaicin (DC), die zusammen 77 - 90 % des Gemisches ausmachen<sup>11</sup>, sowie das Nordihydrocapsaicin (NDC) dar (Abb. 1).

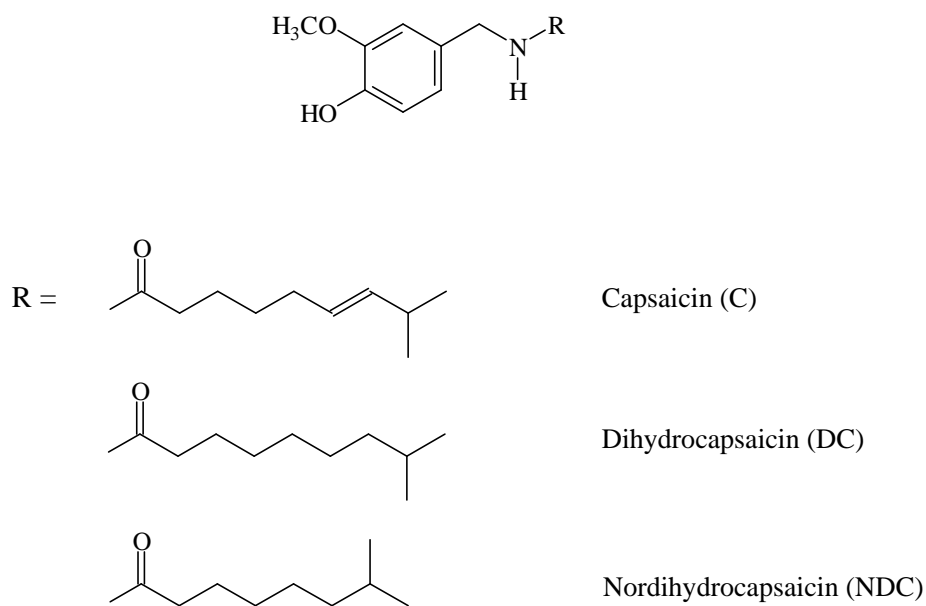


Abb. 1: Strukturformeln der Hauptkomponenten eines Capsicumgemisches

Insgesamt schwanken die prozentualen Gehalte der einzelnen Capsaicinoide jedoch sehr stark, wie die Ergebnisse einer breit angelegten Studie zeigen.<sup>12</sup> (Tab. 1)

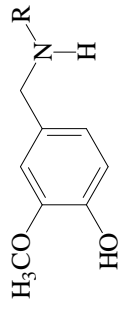
	<b>Anteil am Gesamtcapsaicinoidgemisch (in %)</b>
Capsaicin	33 - 59
Dihydrocapsaicin	30 - 51
Nordihydrocapsaicin	7 - 15

Tab. 1: Prozentuale Anteile der Capsaicinoide C, DC und NDC in Capsicummischungen

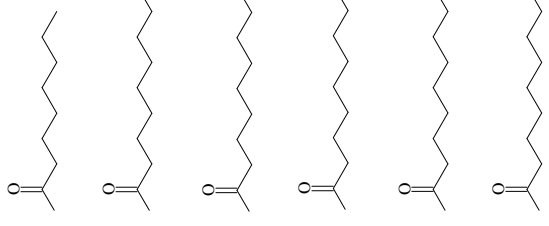
Neben diesen drei Hauptkomponenten werden in der Literatur noch eine Reihe weiterer Capsaicinoide genannt (Abb. 2). Da diese im allgemeinen nur in sehr geringen Mengen (meist < 5 %) in einem Capsaicinoidgemisch vorkommen, werden sie als Minorcapsaicinoide bezeichnet.<sup>13-15</sup> Sogar das Vorhandensein von cis-Capsaicin neben trans-Capsaicin wurde diskutiert. Cis-Capsaicin konnte bislang jedoch nicht nachgewiesen werden, so daß angenommen werden muß, daß dieses Isomer nicht natürlich in Paprika vorkommt.<sup>13, 16, 17</sup>

In der Regel werden neben Capsaicin, Dihydrocapsaicin und Nordihydrocapsaicin, gelegentlich Pelargonsäurevanillylamid (Nonansäurevanillylamid), Homodihydrocapsaicin und Homocapsaicin bestimmt.

Als leicht synthetisch herzustellendes Capsaicinoid ist Pelargonsäurevanillylamid (PSVA) zu nennen, das Capsicum-Extrakten zugesetzt werden kann, um künstlich und billig den Schärfegehalt zu erhöhen.<sup>18</sup>

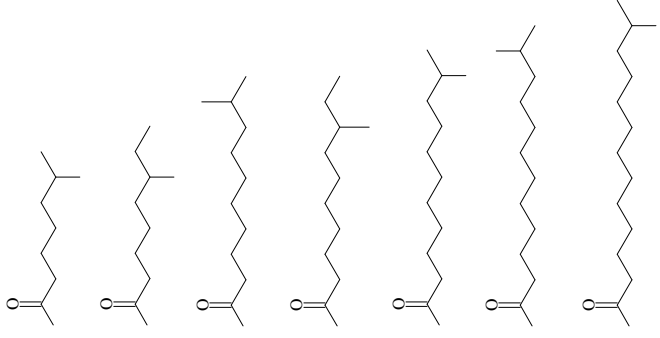


gesättigt, unverzweigt:



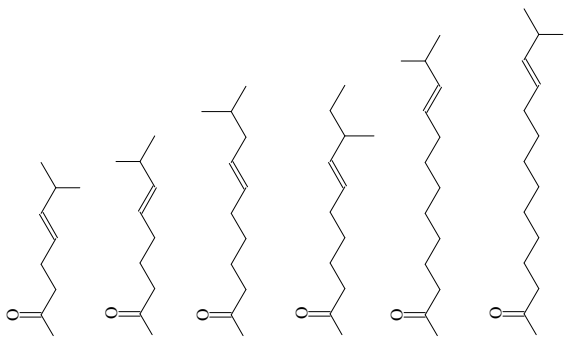
Octansäurevanillylamid  
 Pelargonsäurevanillylamid (PSVA) /  
 Nonansäurevanillylamid  
 Decansäurevanillylamid  
 Undecansäurevanillylamid  
 Dodecansäurevanillylamid  
 Tridecansäurevanillylamid

gesättigt, verzweigt:



Normordhydrocapsaicin  
 Nordhydrocapsaicin II  
 Homodihydrocapsaicin I  
 Homodihydrocapsaicin II  
 Homomodihydrocapsaicin  
 Trihomodihydrocapsaicin  
 Tetrahomodihydrocapsaicin

ungesättigt, verzweigt:



Normoncapsaicin  
 Noncapsaicin  
 Homoncapsaicin I  
 Homoncapsaicin II  
 Trihomoncapsaicin  
 Tetrahomoncapsaicin

Abb. 2: Strukturformeln der bisher in der Literatur genannten Minorbestandteile eines Capsicumgemisches <sup>13-15</sup>

### 3.2 Sensorische und sonstige Eigenschaften

Capsaicin ist 150-300 mal schärfer als das Piperin des Pfeffers und kann noch in Lösungen von 0,05 mg/l sensorisch wahrgenommen werden. Die anderen natürlich vorkommenden Capsaicinoide haben eine Schärfe, die bei etwa 50-100 % des Capsaicins liegen<sup>19</sup> und unterschiedlich empfunden werden. Capsaicin und Dihydrocapsaicin besitzen eine schneidende und stechende Schärfe, im Gegensatz zu Nordihydrocapsaicin, dessen Schärfe am angenehmsten beurteilt wird.<sup>20</sup>

Die Capsaicinoide werden nicht über die Geschmacksknospen wahrgenommen. Die Schärfe resultiert vielmehr aus einer Irritation der Schmerzrezeptoren, die sich im Mund, in der Nase und im Magen befinden. Dabei wird eine chemische Botschaft, ein Neurotransmitter, freigesetzt, der dem Gehirn die Botschaft eines Schmerzes zuschickt. Wiederholte Capsaicinoidaufnahme desensibilisiert diese Rezeptoren. Dies ist auch der Grund, warum wiederholter Konsum von scharf gewürzten Speisen zu einem Gewöhnungseffekt führen.

Die Freisetzung des Neurotransmitters durch die Capsaicinoide bewirkt die Überflutung der Nervenenden mit Endorphinen. Diese Endorphine, die als natürliche Schmerzkiller und „sichere“ Morphine betrachtet werden, gefallen sozusagen dem Körper<sup>21, 22</sup>, da sie Schmerzen stillen und ein psychisches Hochgefühl erzeugen.

Ein weiterer positiver Effekt von scharfem Paprika ist, daß die Capsaicinoide die Herzfunktion und den Kreislauf anregen. Außerdem wird durch den Verzehr von scharfen Speisen das Blut flüssiger, wodurch die Gefahr von Thrombosen, Herzinfarkt und Schlaganfall reduziert wird. Das Freisetzen des Neurotransmitters verursacht eine kardiovaskuläre Reaktion, wodurch die Schweißbildung angeregt und so der Körper nicht überhitzt wird. Dies ist auch der Grund, warum in heißen Ländern gerne scharf gegessen wird.<sup>23, 24</sup> Äußerlich angewandt, bewirken die Capsaicinoide Hautreizungen, verbunden mit Erwärmung des darunterliegenden Gewebes, was bei Rheumapflastern ausgenutzt wird.<sup>24</sup>

Hohe Dosen an Capsaicin (1 mg/kg) wirkten sich allerdings bei Ratten negativ aus, wie *Lindner* berichtete. Auch bei kurzer Kontaktzeit im Duodenum oder Magen führte dies zu Schäden der Schleimhäute, wobei die Darmzotten geschwollen, die Kapillaren erweitert und gestaut waren.<sup>25</sup> Auch können sich bei Verzehr von capsaicinoidhaltigen Speisen Symptome einer allergischen Reaktion wie einer laufenden Nase und tränenden Augen zeigen.<sup>24</sup>

Paprika bzw. Paprikapulver schmeckt aber nicht nur scharf, sondern es besitzt auch bakteriostatische Wirkung, was ebenfalls auf das Capsaicin zurückzuführen ist. In einer Verdünnung von 1:10 000 zeigte Capsaicin eine bakteriostatische Wirkung auf mehrere Bakterienstämme, besonders gegenüber *Bacillus cereus* und *Bacillus subtilis*.<sup>26</sup> Aber auch von

gegenteiligen Effekten wird berichtet. Keine bakteriostatische Wirkung zeigte Capsaicin bei den Stämmen *St. aureus* und *E. coli*.<sup>15</sup> Daneben liegt mit dem Capsicidin, einem Gemisch aus drei Steroidsaponinen mit drei Zuckerkomponenten (Glucose, Galactose, Xylose) und zwei Agluconen, eine weitere bakteriostatisch wirksame Komponente vor. Capsicidin ist im Gegensatz zu den Capsaicinoiden im Fruchtfleisch und in den Samen angereichert.<sup>27</sup>

### 3.3 Lokalisation

Die Scharfstoffe befinden sich vornehmlich in den Scheidewänden der Paprikafrüchte, die bei uns als Schoten bezeichnet werden. Botanisch betrachtet, handelt es sich aber hierbei um Beeren, da sie den fleischigen Zustand des Perikarps bis zur Reife bewahren.

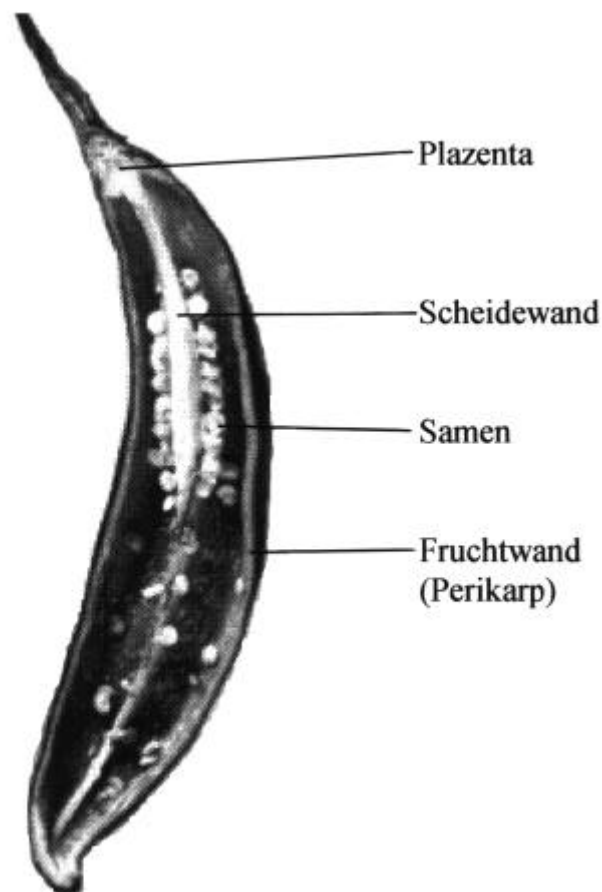


Abb. 3: Längsschnitt durch eine Paprikafrucht



Die Scheidewände haben in der Epidermis schmale, radial gestreckte, dünnwandige Drüsenzellen, an denen zwischen Zellwand und Kutikula ein gelbes, oft kristallinisch erstarrtes Öl mit den scharf schmeckenden Capsaicinoiden abgeschieden wird.<sup>5</sup>

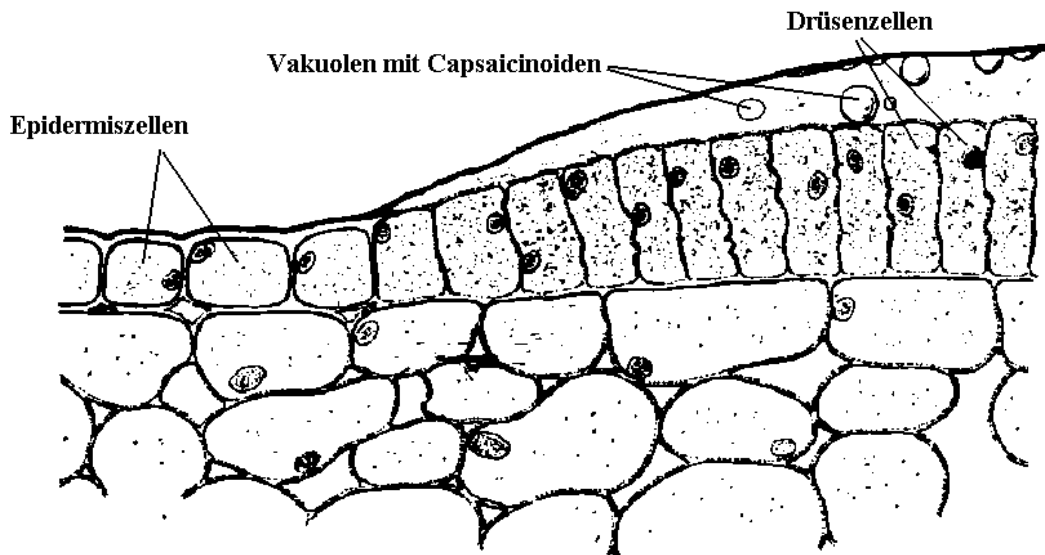


Abb. 4: Querschnitt durch den Randteil der Paprika-Fruchtscheidewand mit epidermalen Capsaicin-Drüsen<sup>5</sup>

Von den Scheidewänden aus verbreiten sich die Scharfstoffe während der Reife über alle Teile der Fruchtwand und in die Samen.<sup>1, 15, 28</sup>

Die Summenbestimmung<sup>29</sup> einzelner Bestandteile einer scharfen Capsicum-Sorte (Capsicum annum var. annum cv. Jalapeno) zeigen dies:

Fruchtteil	Capsaicinoidgehalt (mg/kg)
Fruchtwand	1,2
Scheidewand	183,7
Plazenta	82,7
Samen	4,5

Tab. 2: Capsaicinoidgehalte (mg/kg) einzelner Fruchtbestandteile auf die einzelnen Segmente

Diese Beobachtungen konnten durch chemische Analysen mit radioaktiv markiertem Phenylalanin bestätigt werden.<sup>30</sup>

### 3.4 Biosynthese

Die Biosynthese der Capsaicinoide in Capsicumfrüchten wurde ebenfalls mit Hilfe radioaktiv markierter Substanzen untersucht und konnte weitgehend geklärt werden.<sup>1, 15, 31-36</sup>

Die Säurekomponente wird aus L-Valin, L-Leucin oder L-Isoleucin gebildet, das Kohlenstoffgerüst des Benzylaminteiles stammt aus L-Phenylalanin. Der Einbau des Stickstoffs in das Vanillylamin erfolgt über eine Aminierung des Vanillins, dessen Vorstufen Ferulasäure, Kaffesäure, p-Cumarsäure und Zimtsäure sind (*Abb. 5*).

Festzuhalten ist auch, daß, wenn einmal ein bestimmter Scharfstoff gebildet worden ist, kein Wechsel in einen anderen mehr stattfindet, d.h. Capsaicin wird z. B. nicht in Dihydrocapsaicin umgewandelt.<sup>30</sup>

### 3.5 Veränderungen während der Reifung

Verschiedene Autoren haben sich mit der Veränderung des Capsaicinoidgehaltes in Früchten während Wachstum und Reifung befaßt.

*Schratz und Rangoonwala* fanden die höchste Capsaicinoidkonzentration in reifenden Früchten. Sie beobachteten, daß sich dieser Gehalt mit fortschreitender Reife vermindert, was sie damit begründeten, daß kein weiteres Capsaicin gebildet wird, obwohl die Früchte weiter wachsen.<sup>zitiert in: 15</sup> *Kosugue und Inagaki* stellten für Capsaicin und Dihydrocapsaicin während der Reifung ein konstantes Verhältnis fest, d. h. Capsaicin und Dihydrocapsaicin werden von Anfang an in einem bestimmten Verhältnis gebildet und stellen immer die Hauptcapsaicinoide dar. Die höchsten Konzentrationen wurden bei ihnen 30-40 Tage nach der Blüte erreicht mit einer leichten Abnahme nach dem 40. Tag.<sup>zitiert in: 15</sup>

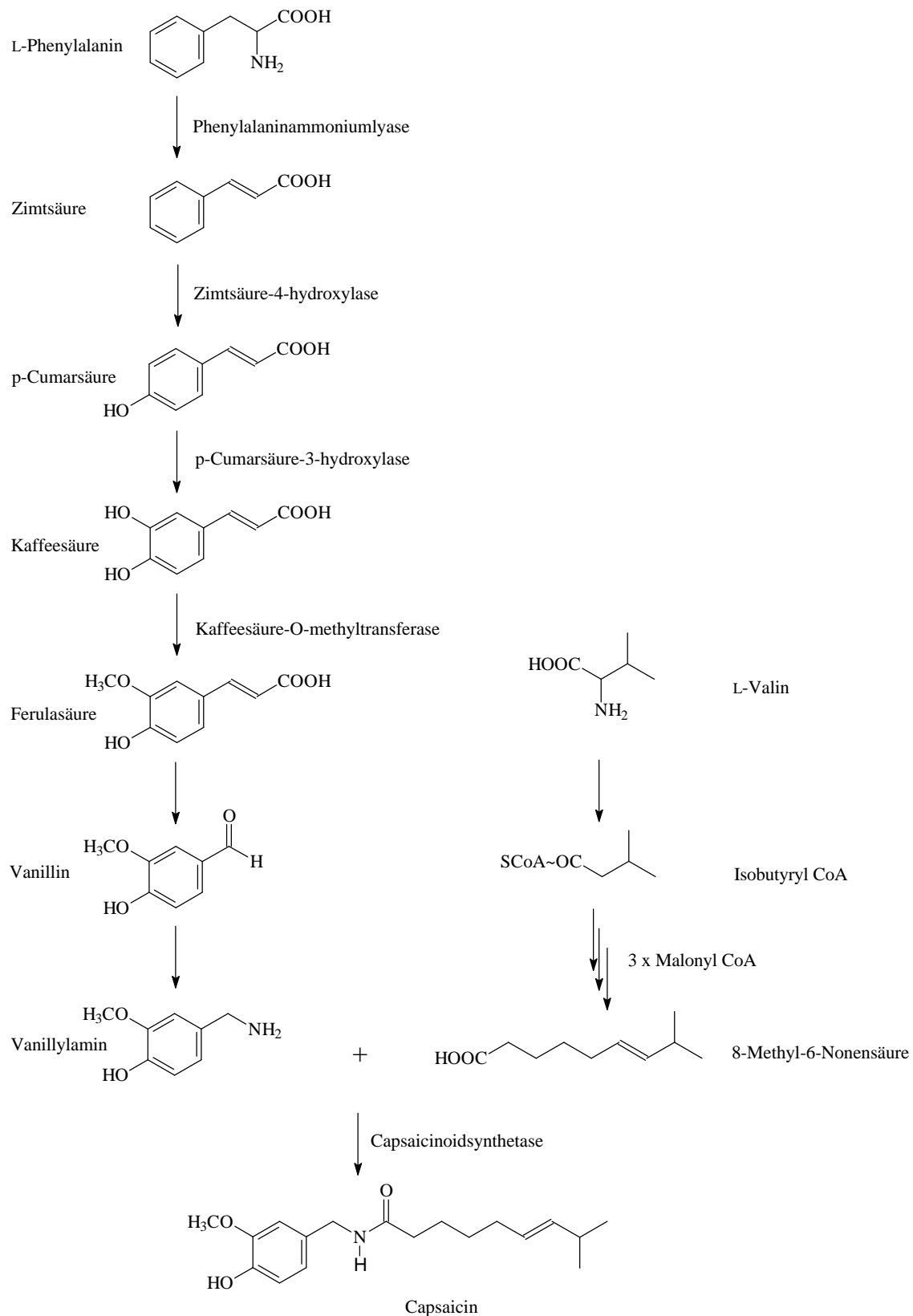


Abb. 5: Biosyntheseweg des Capsaicins <sup>36</sup>

*Iwai et al.* erhielten vergleichbare Ergebnisse. Sie bauten auf institutseigenen Feldern Früchte der Varietät *C. annuum* var. *annuum* cv. *Karayatsubusa*, einer sehr scharfen Paprikavarietät, an. Dabei stellten sie fest, daß die Capsaicinoidproduktion erst nach etwa 20 Tagen nach der Blüte einsetzt, dann ein Maximum um den 40. Tag nach der Blüte erreicht und nach etwa 50 Tagen nach der Blüte abnimmt, wenn eine starke Carotinoidproduktion beginnt.<sup>37</sup> Ein Jahr später angebaut, konnten die Capsaicinoide bereits nach 15 Tagen nach der Blüte nachgewiesen werden. Die maximalen Capsaicinoidgehalte wurden hierbei 25 Tage nach der Blüte gefunden.<sup>38</sup> In früheren Studien untersuchten *Iwai et al.* den Einfluß von Licht auf den Capsaicinoidgehalt.<sup>39</sup> Dabei wurden gekaufte Früchte unter zwei verschiedenen Bedingungen nachgereift: ein Teil wurde mit Licht bestrahlt, der andere Teil im Dunkeln nachgereift. Die Früchte dieser Varietät (*C. annuum* var. *grossum*) entwickeln normalerweise kaum Schärfe. Unter Lichtbestrahlung jedoch konnten bereits um den 4. Tag der Nachreife Capsaicinoide nachgewiesen werden. Interessant war, daß es bei Nordihydro- und Dihydrocapsaicin prozentual zu einer Zunahme bis zum 10. Tag kam, während Capsaicin abnahm, so daß Capsaicin in den am längsten gereiften Früchten am wenigsten vorhanden war (*Tab. 3*).

Capsaicinoide	Nachreifung (Tage)							
	0		4		7		10	
	mg/kg	%	mg/kg	%	mg/kg	%	mg/kg	%
DC	nd		0,009	35	0,064	46	0,084	44
NDC	nd		0,004	15	0,024	17	0,059	31
C	nd		0,013	50	0,052	37	0,047	25

*Tab. 3: Capsaicinoidgehalte (mg/kg getrockneter Plazenta mit Scheidewänden) und -muster unter Lichtbestrahlung nachgereifter Früchte; nd: nicht nachweisbar*<sup>39</sup>

Nordihydrocapsaicin machte nach 10 Tagen 31 % der Gesamtcapsaicinoide aus, während es in natürlich gereiften Früchten nur zu etwa 7-15 % vertreten ist. Wurde im Dunkeln nachgereift, konnten keine Capsaicinoide detektiert werden. Damit konnte gezeigt werden, daß in einer Nachreifung Licht anscheinend einen Einfluß auf die Scharfstoffkonzentration und das -muster hat.

Auch *Estrada et al.* haben sich intensiv mit der Capsaicinoidproduktion während Wachstum und Reifung befaßt.<sup>40-44</sup> Sie fanden ebenfalls eine Abhängigkeit des Capsaicinoidgehaltes vom Alter der Früchte, wobei sie in den verschiedenen Anbaustudien jeweils dieselbe Varietät (*C. annuum* var. *annuum* cv. *Padrón*) verwendeten. Sie ernteten alle 7 Tage Früchte, beginnend vom 14. Tag nach der Blüte bis zum 35. bzw. 42. Tag nach der Blüte,

und untersuchten sie auf ihren Capsaicinidgehalt. Sie maßen wenig Capsaicinoide zu Beginn. Danach nahmen die Scharfstoffgehalte zu. Die maximalen Gehalte wurden überwiegend am 42. Tag nach der Blüte gefunden.

Einen zeitlichen Zusammenhang zwischen Scharfstoffgehalt und Alter der Früchte wurde ebenfalls von *El-Saeid*<sup>45</sup> und *Contreras-Padilla*<sup>46</sup> beobachtet. Sie stellten die höchsten Scharfstoffgehalte um den 45.-50. Tag nach der Fruchtbildung fest.

Auch in Früchten der Varietät *Capsicum frutescens* kam es zu einer deutlichen Zunahme der Capsaicinoidkonzentration vom 20. bis 40. Tag nach der Blüte. Er blieb aber dann bis zum 70. Tag nach der Blüte annähernd konstant.<sup>28</sup>

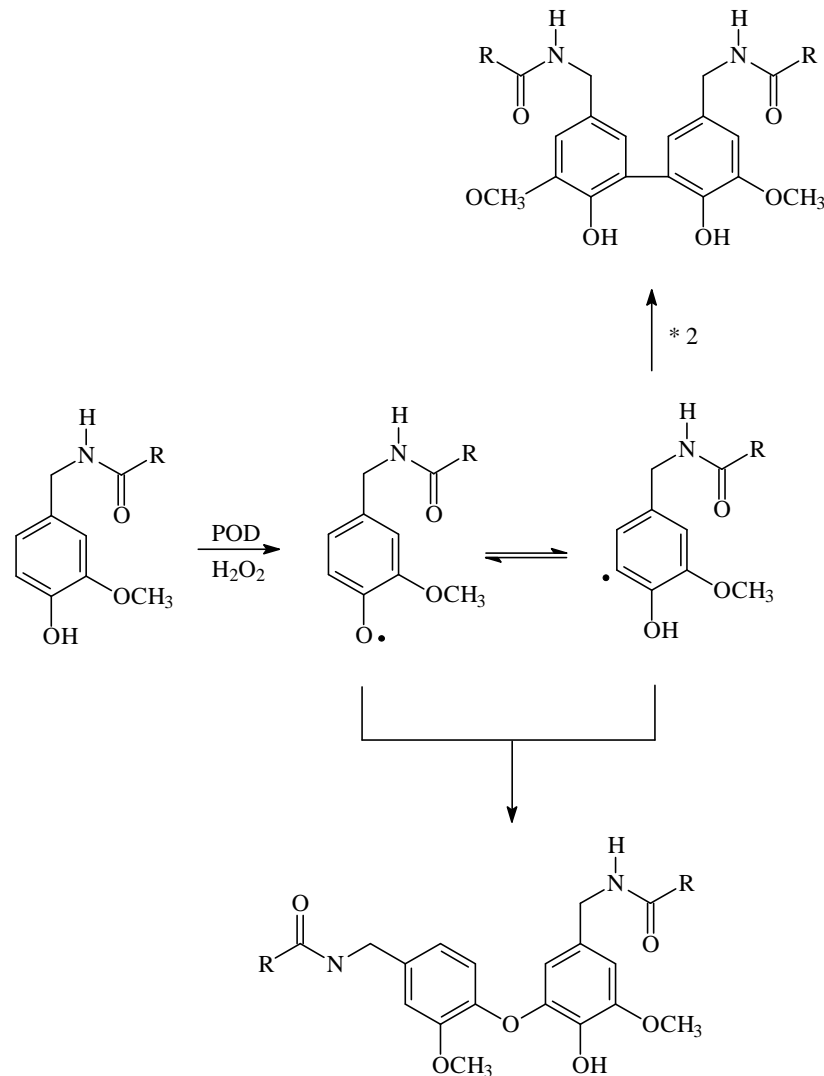
### 3.6 Bedeutung von Peroxidasen für den Capsaicinoidabbau

Über den Abbau der Capsaicinoide und vor allem über die Reaktionsprodukte herrscht noch Unklarheit. Vielfach werden Peroxidasen für den Capsaicinoidabbau verantwortlich gemacht.

Peroxidasen sind Glykoproteine, die je nach ihrem isoelektrischen Punkt in saure und basische Peroxidasen eingeteilt werden können. Eine Frucht kann verschiedene Isoenzyme mit sehr unterschiedlichen isoelektrischen Punkten besitzen, deren Zusammensetzung sich während der Reifung ändern kann.<sup>44</sup> Bei Paprika kann das basische Isoenzym B6 der Peroxidase direkt in Verbindung mit dem Capsaicinoidmetabolismus gebracht werden, da der Vanillylrest des Capsaicins leicht durch dieses Enzym oxidiert wird. Die Oxidation des Capsaicins und Dihydrocapsaicins ist dabei sowohl von der Wasserstoffperoxidkonzentration wie auch vom pH-Wert abhängig. In Abwesenheit von Wasserstoffperoxid und Peroxidase findet kein Capsaicinoidabbau statt. Als optimaler pH-Wert für diese Enzymreaktion wird ein Wert in der Nähe von pH 6,0 genannt. Ein Wert, der auch meist in den Vakuolen gefunden wird, wo auch das Capsaicin in den Paprikafrüchten angesammelt wird.<sup>47, 48</sup> Die Zugabe von Antikörpern gegen Meerrettich-Peroxidase führt zu einer Hemmung der Capsaicinoxidation.<sup>49</sup> Alle diese Untersuchungen wurden mit käuflichen Capsaicinoidstandards und Peroxidasen, die aus *Capsicum annuum* var. *annuum*-Früchten isoliert wurden, durchgeführt.

*Pomar et al.* zeigte, daß auch die saure Peroxidase, die im Perikarp lokalisiert ist, Capsaicin oxidieren kann.<sup>50</sup>

Als mögliche Reaktionsprodukte werden Dimere des Capsaicins mit den Hauptprodukten 5,5'-Dicapsaicin und 4'-O-5-Dicapsaicinether und polymere Produkte von ligninartiger Struktur diskutiert, wobei deren Bildung auf radikalischem Weg vermutet wird. In *Abb. 6* ist der mögliche Reaktionsweg dargestellt.<sup>51</sup>



*Abb. 6: Mögliche Reaktionen der Capsaicinoide mittels Peroxidasen (POD) auf radikalischem Weg*<sup>51</sup>

*Contreras-Padilla und Yahia*<sup>46</sup> haben sich ebenfalls mit dem Zusammenhang zwischen dem Capsaicinoidabbau und der Peroxidasenaktivität beschäftigt. Sie pflanzten Paprikafrüchte an, ernteten zu unterschiedlichen Zeitpunkten (10 - 60 Tage nach der Blüte) und halbierten die Früchte. In der einen Hälfte wurde die Peroxidasenaktivität, in der anderen Hälfte die Capsaicinoidkonzentration gemessen. Sie stellten fest, daß die Capsaicinoidkonzentration kontinuierlich zunahm, bis sie nach 40 - 50 Tagen ihr Maximum erreichte und dann wieder

abnahm. Zu der Zeit, als die Capsaicinoidkonzentration begann abzunehmen, nahm die Peroxidasenaktivität zu, was für eine umgekehrte Beziehung spricht.

Weitergehende Untersuchungen sowohl zur Bedeutung der Peroxidasen beim Capsaicinoidabbau wie auch zur näheren Charakterisierung der Abbauprodukte liegen jedoch nicht vor.

Peroxidasen werden auch dafür verantwortlich gemacht, daß bereits die Vorstufen der Capsaicinoide zu Substanzen oxidiert werden können, die dann nicht mehr der Capsaicinoidbiosynthese zur Verfügung stehen und die Früchte somit weniger Schärfe besitzen.<sup>52</sup>

*Tateba et al.* haben zudem festgestellt, daß Riboflavin als Photokatalysator ebenfalls in der Lage ist, eine Capsaicinstandardlösung zu dem dimeren Produkt 5,5'-Dicapsaicin zu oxidieren.<sup>53</sup>

Über sonstige Abbauprodukte und -mechanismen ist bislang nichts bekannt.

### **3.7 Einfluß der äußeren Bedingungen auf den Capsaicinoidgehalt**

Neben der genetischen Ausstattung haben auch die äußeren Bedingungen einen Einfluß auf den Schärfegrad. Als äußere Faktoren sind Temperatur, Licht und Düngung zu nennen. Viele Autoren haben diesen Einfluß auf den Capsaicinoidgehalt untersucht.

Die Arbeitsgruppe von *Bosland et al.* nimmt an, daß die äußeren Faktoren einen größeren Einfluß auf den Schärfegrad besitzen wie die genetische Ausstattung.<sup>54-56</sup> Sie pflanzten auf einem Testfeld (20 x 183 m) Paprikapflanzen an. In diesem Testfeld wurden 5 gleich große Reihen (je 1 x 9 m) abgesteckt, in die je 24 genetisch identische Sträucher gepflanzt wurden. Auf den dazwischenliegenden restlichen Flächen des Testfeldes wurden Paprikasträucher anderer Varietät gepflanzt. Von jeder der 5 Reihen wurden rote Früchte von je drei verschiedenen, willkürlich ausgewählten Sträuchern auf ihren Capsaicinoidgehalt hin untersucht. Sie stellten stark variierende Gehalte zwischen den fünf verschiedenen Reihen und zwischen den drei verschiedenen Sträuchern ein und derselben Reihe fest. Einzelne Früchte ein- und desselben Strauches wurden jedoch nicht untersucht.<sup>55</sup> *Jurenitsch et al.*<sup>12</sup> haben erhebliche Unterschiede zwischen Kultivaren gefunden, die in Gewächshäusern, auf einem Laborfeld und auf normalen Anbau Feldern angebaut wurden. Die Früchte der Pflanzen vom Freiland enthielten stets mehr Capsaicinoide als die, die im Gewächshaus gewachsen waren.

Stressvolle Bedingungen, wie einige Tage sehr heißes Wetter, stellen laut *Quagliotti* die einfachste Form dar, den Scharfstoffgehalt zu beeinflussen.<sup>57</sup> *Estrada et al.* können dies bestätigen.<sup>43</sup> Sie zogen aus Paprikasamen der Varietät *C. annuum* var. *annuum* cv. *Padron*, jeweils um einen Monat zeitlich versetzt (von Juni bis Oktober), Sträucher, entnahmen alle 7 Tage Früchte (Beginn 14 Tage nach der Blüte bis 42 Tage nach der Blüte) und untersuchten sie auf ihren Capsaicinoidgehalt. Die niedrigsten Gehalte fand man in Früchten der Sträucher, die im Juni (Übergang Frühling/Sommer) angepflanzt wurden, die höchsten Gehalte in Früchten der Sträucher, die in den sehr heißen Sommermonaten August und September angepflanzt wurden. Auch eine intensive Bewässerung führt zu einer Zunahme der Schärfe in den Früchten, ebenfalls von *Estrada et al.*<sup>42</sup> und *Bosland*<sup>58</sup> beobachtet. Ebenso wurde ein positiver Effekt auf den Scharfstoffgehalt durch Mineralienzugabe festgestellt.<sup>41</sup>

### 3.8 Verarbeitung

Die Qualität von rotem Chili und Paprikapulver wird von der extrahierbaren Farbe, der Schärfe und dem Aroma bestimmt. Zur optimalen Nutzung dieser Eigenschaften müssen die Früchte richtig behandelt und gelagert werden. Traditionell werden die Früchte an der Sonne getrocknet. Dazu wurden sie früher auf den Dächern von Häusern oder auf dem Boden ausgebreitet. Da dies allerdings häufig zu Verunreinigungen durch Vögel und Nagetieren führte, ging man dazu über, die Früchte an einer Schnur aufzureihen und an den Mauern zu trocknen. Diese Art der Trocknung wird vielfach heute noch in Ungarn angewendet. In den Vereinigten Staaten jedoch ist dies durch industrielle Verfahren abgelöst worden, bei denen man Einfluß auf den Trocknungsvorgang nehmen kann, denn unerwünschte oxidative Prozesse können zu einem Verlust an roter Farbe und somit zu Qualitätsverlusten führen.<sup>58</sup> Wenn beispielsweise der Feuchtigkeitsgehalt zu schnell reduziert wird, kann dies zu faden Farben führen. Andererseits kann es bei einem zu hohen Feuchtigkeitsgehalt zur Schimmelbildung kommen, was natürlich ebenfalls vermieden werden soll.<sup>59</sup>

Zur Herstellung der Paprikapulver werden die Früchte je nach gewünschtem Schärfegrad von Scheidewänden und Samen befreit. Die weißen bis hellgelben Samen werden teilweise gewaschen, um die dort anhaftenden Capsaicinoide zur Verminderung der Schärfe zu entfernen und, je nach Handelssorte (s.u.), in unterschiedlichen Mengen wieder zugesetzt, da sie aufgrund ihres hohen Lipidgehaltes (bis zu 30 % Fett) für eine gleichmäßige Verteilung der farbgebenden Carotinoide sorgen und so die Farbe des Pulvers vertiefen. Die Fruchtbestandteile werden vorzerkleinert und bis zu einem Wassergehalt von 4-6 % auf Bandtrocknern bei 35 bis 40 °C getrocknet. Dann werden diese Stücke gemahlen. Für die Lagerung sollte Paprikapulver einen Wassergehalt von 10-12 % nicht übersteigen<sup>60, 61</sup>, damit



eine bestmögliche Qualitätserhaltung hinsichtlich der Farbe gegeben ist und kein mikrobieller Verderb einsetzen kann.

Die gebräuchlichsten Handelssorten, die lebensmittelrechtlich aber nicht geregelt sind, sind: Delikateß-, Edelsüß- und Rosenpaprika.<sup>1</sup>

Delikateßpaprika wird aus erstklassigen, fehlerlosen und vollreifen Früchten hergestellt, deren Scheidewände und Stiele entfernt werden. Die Samen werden gewaschen und vor dem Mahlen zu einem geringen Teil wieder zugesetzt. Das Endprodukt ist sehr mild, aromatisch (mehr süß) und hellrot.

Edelsüßpaprika wird ebenso hergestellt, nur enthält er einen höheren Anteil an ungewaschenen Paprikasamen und schmeckt deshalb etwas schärfer. Außerdem ist Edelsüßpaprika durch den größeren Samengehalt und somit höheren Lipidgehalt auch dunkler.

Rosenpaprika ist der schärfste unter den gängigen Handelssorten. Die Scheidewände werden nicht entfernt, die Samen nicht gewaschen. Sein Geschmack ist deshalb aromatisch mit charakteristischer, starker Schärfe. Seine Farbe ist dunkel- oder gelblich rot.

Genauso unterschiedlich wie die Herstellungsbedingungen sind, variieren auch die Erntezeiten in den verschiedenen Ländern. Paprikafrüchte reifen nicht gleichzeitig, so daß eine selektive Ernte von Hand in zwei oder drei Erntephasen notwendig ist.<sup>24</sup> In Ungarn und Spanien wird von August bis September geerntet, während in den Vereinigten Staaten die Ernte von Oktober bis Dezember geht. In Indien gibt es sogar zwei verschiedene Wachstumsperioden.<sup>61</sup>

## 4 Aromastoffe

Die meisten Früchte werden nicht wegen ihrer Schärfe, sondern wegen ihres Aromas verzehrt. Beim Würzen mit Paprika sollte man beispielsweise darauf achten, das Pulver nicht ins siedende Fett zu geben, da der im Paprika enthaltene Zucker sonst karamelisiert und dies die Farbe und den Geschmack (bitter) beeinträchtigt.<sup>4</sup>

Bis heute sind mehr als 180 Verbindungen in der flüchtigen Fraktion von sowohl frischem wie auch verarbeitetem Paprika identifiziert worden.

Die Verbindung 3-Isobutyl-2-methoxypyrazin trägt bedeutend zum Aroma von frischen Paprikafrüchten bei, da sie den für Paprika charakteristischen Geruch aufweist und einen extrem niedrigen Geruchsschwellenwert von 2 ng/l in Wasser besitzt.

Mit Hilfe der HRGC/Olfaktometrie analysierten *van Ruth et al.* einen frischen Paprikaextrakt und identifizierten die Verbindungen 1-Penten-3-on, Hexanal, (Z)-3-Hexenal, Octanal, 2-sec. Butyl-3-methoxypyrazin und 2-Isobutyl-3-methoxypyrazin als geruchsaktivste Komponenten.<sup>62</sup> Beim Trocknen von Paprika findet eine signifikante Änderung des Aromas statt, da die karamel-, kakaoähnlichen, ranzigen oder heuähnlichen Aromanoten stark zunehmen. Erklärt wird dies mit einer Zunahme der Verbindungen 2-Methylpropanal, 2-Methylbutanal und 3-Methylbutanal.

Bei einer vor kurzem durchgeführten Studie wurden mit Hilfe der Aromaextraktverdünnungsanalyse die geruchsaktivsten Komponenten in einem süßen ungarischen Paprikapulver mit denen eines marokkanischen Pulvers verglichen. Identifiziert wurden  $\beta$ -Ionon (veilchenähnlich), 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon (nach Karamel), 3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanon (Würze-ähnlich), 2- und 3-Methylbutansäure (schweißig) und Phenylelessigsäure (honigähnlich) als Schlüsselaromastoffe. Mit Ausnahme von  $\beta$ -Ionon und den zwei iso-Pentansäuren waren diese Geruchsstoffe bisher unbekannt in Paprika.<sup>63, 64</sup>

## 5 Farbe

Die grüne Farbe der Paprikafrüchte stammt vom Chlorophyll, das während der Reifung abgebaut wird. Die rote Farbe des Paprikas beruht auf dem hohen Gehalt an lipophilen Carotinoiden (0,12 - 0,35 %), von denen die Xanthophylle zum Teil mit Fettsäuren verestert sind. Die Hauptanteile der roten Farbe liefern das Capsanthin und Capsorubin, die nur in Paprika vorkommen. Die gelb-orangen Farben stammen hauptsächlich vom  $\beta$ -Carotin und Violaxanthin. Der Carotinoidgehalt der Früchte nimmt mit zunehmender Reife zu und steigt nach der Vollreife weiter an. Capsanthin kann in reifen Früchten bis zu 60 % und  $\beta$ -Carotin bis zu 10 % der gesamten Carotinoide ausmachen.<sup>21, 26</sup> Die Analytik erfolgt meistens per HPLC.<sup>65-67</sup>

Die Farbintensität dient oft als Maß für die Qualitätsbeurteilung des Paprikas. Das Carotinoidspektrum wird durch Licht und Wärme unter Sauerstoffeinfluß signifikant verändert. Dabei ist die Kohlenwasserstoff-Fraktion erheblich empfindlicher als die Xanthophyll-Fraktion.<sup>1</sup> Je höher die Temperatur ist, desto schneller kommt es zu einem Farbverlust. Am günstigsten ist daher die Lagerung unter Kühlung.<sup>26</sup> Aber auch der Wassergehalt spielt eine Rolle, denn ein zu geringer Wassergehalt (optimal: 10-12 %) kann die Farbe zu fad machen.<sup>60, 61</sup>

Zur Färbung von Lebensmitteln (z.B. Wurstwaren, Tiefkühlkost) werden meistens keine Paprikapulver, sondern die sehr farbintensiven Paprikaoleoresine verwendet, da sie einige

Vorteile gegenüber dem Pulver bieten. Dies ist beispielsweise die leichte Dosierbarkeit und vor allem gibt es keine Farbverluste, da die Carotinoidfarbstoffe vor Oxidation geschützt sind. Bei einem Paprikaoleoresin handelt es sich um einen flüssigen Extrakt der Paprikafrucht, der alle Stoffe enthält, die in der Fettphase löslich sind. Dieser Paprikaextrakt ist ein viskoses Öl mit einer intensiv roten Farbe und dem typischen Paprikaaroma.<sup>68</sup>

Mit Hilfe eines Verfahrens der American Spice Trade Association (ASTA) wird die extrahierbare Farbe in einem Acetonextrakt von Paprikapulver bei einer Wellenlänge von 460 nm bestimmt. Diese läßt aber nicht unbedingt auf die tatsächlich zu beobachtende Farbe schließen, da hier noch andere Einflüsse zu berücksichtigen sind, z.B. wirkt Wasser farbvertiefend. Die Farbintensität wird in ASTA-Farbeeinheiten angegeben.<sup>69</sup> Übliche ASTA-Farbeeinheiten für industriell genutzte Paprikapulver sind 85, 100, 120 und 150.

Zur Beschreibung der Farbcharakteristik eignet sich das CIE-LAB-System (CIE: Commission Internationale de l'Eclairage).  $L^*$  gibt dabei die Helligkeit der Probe auf einer Skala von 100 bis 0 an.  $a^*$  beschreibt die Lage des Farbortes auf der Rot-Grün-Achse, wobei positive Werte einem Rotanteil und negative Werte einem Grünanteil entsprechen.  $b^*$  gibt die Lage auf der Blau-Gelb-Achse an. Ebenso wie bei  $a^*$  stehen positive  $b^*$ -Werte für blaue Anteile, negative Werte für gelbe Anteile.<sup>70</sup>

## 6 Analytik der Scharfstoffe

### 6.1 Probenvorbereitung

Vor der Analyse müssen die Capsaicinoide aus der jeweiligen Probenmatrix extrahiert werden. Da die Capsaicinoide in verschiedenen Lösungsmitteln unterschiedlicher Polarität löslich sind, kommen verschiedene Lösungsmittel in Betracht. Häufig wird mit Aceton<sup>71-77</sup>, Methanol<sup>78-81</sup> oder Acetonitril<sup>82-84</sup> extrahiert. Meist erfolgt dies durch eine Soxhlet- oder Rückflußextraktion. Daneben sind auch die Extraktion mit Chloroform<sup>19, 85</sup>, Ethanol<sup>86, 87</sup>, Tetrahydrofuran<sup>88</sup> und Ethylacetat<sup>89-91</sup> beschrieben worden. Die Extraktion mit Ethanol ist besonders zu erwähnen, da dieses Lösungsmittel schon sehr früh bei der sensorischen Schärfestimmung der Scoville-Heat-Units (1912) eingesetzt wurde.<sup>92</sup>

Meistens wird nach der Extraktion filtriert oder die Lösung wird stehengelassen, bis sich Schwebstoffe abgesetzt haben und anschließend dekantiert.

Je nach Analysenmethode kann ein weiterer Aufreinigungsschritt notwendig sein, da bei der Extraktion störende Matrixkomponenten wie Lipide, Sterole und Pigmente mitextrahiert werden, wobei die Aufreinigung besonders wichtig bei Pulvern geringer Schärfe ist.<sup>90, 91, 93</sup>

Zwei wesentliche Verfahren sind zu nennen: das eine nutzt die unterschiedliche Löslichkeit der Capsaicinoide und der Verunreinigungen in einer flüssig-flüssig-Verteilung aus.<sup>72, 79, 90, 91, 94</sup> Die andere Aufreinigungsmöglichkeit ist die Festphasenextraktionen (Solid-Phase-Extraction, SPE).<sup>82, 90, 93</sup>

Ist bei gaschromatographischen Verfahren besonders auf einen wasserfreien Extrakt zu achten, so ist es bei HPLC-Methoden wichtig, den Extrakt möglichst im Eluenten zu lösen, um Störungen aufgrund unterschiedlicher Elutionsstärke, wie z.B. Tailing der Analysensubstanzen, zu vermeiden.

Die flüssig-flüssig-Verteilung nach Ethylacetatextraktion (Methode nach *Peusch*<sup>90, 91</sup>) wurde zur Bestimmung des Capsaicinoidgehaltes in scharfearmen Pulvern entwickelt. Hierbei werden 2 g Rosenpaprika bzw. 5-10 g edelsüßes Paprikapulver mit Ethylacetat (je 10 ml Ethylacetat pro g Pulver) für 2 h unter Rückfluß extrahiert. Nach dem Dekantieren des Lösungsmittels und Nachwaschen des Rückstandes wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Da es dadurch gleichzeitig auch zu einer Aufkonzentrierung unerwünschter Begleitstoffe kommt, wird der dabei zurückbleibende ölige Extrakt anschließend insgesamt dreimal zwischen einer Hexan und Acetonitril/Wasser-Phase verteilt. Nach Zentrifugation wird die wäßrige von der organischen Phase getrennt, die wäßrigen Phasen werden vereinigt, auf ein definiertes Volumen aufgefüllt (10 ml) und ein Aliquot in die HPLC injiziert.

## 6.2 Bestimmungsmethoden

Zur Bestimmung der Capsaicinoide stehen unterschiedliche Verfahren zur Verfügung. Wurden sie früher, aufgrund mangelnder Differenzierungsmöglichkeiten, in der Summe bestimmt, so erfolgt heute die Analyse in der Regel als Bestimmung der einzelnen Capsaicinoidkomponenten. Zu den Summenbestimmungen zählen sensorische und photometrische Verfahren. Einzeln werden die Scharfstoffe mittels chromatographischer Methoden bestimmt, dies sind die Dünnschicht- (DC) und vor allem Gas- (GC) und Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

## 6.2.1 Summenbestimmungen

### 6.2.1.1 Sensorik

Eine der ersten Möglichkeiten die Capsaicinoide zu bestimmen, stellte die Sensorik nach einem Test von Scoville (1912) dar.<sup>92</sup> Dieser Test standardisiert die sensorische Prüfung bei den Capsicumfrüchten bzw. ihren Extrakten. Die Methode basiert auf der Schwellenwertbestimmung der „Scharf“ Empfindung bei verschiedenen Konzentrationen ethanolischer Capsicumextrakte. Die Angabe erfolgt in „Scoville Heat Units“, wobei eine Lösung mit 6,38 % Capsaicin 1 Mio. Scoville Units entsprechen.<sup>1, 92</sup> Es handelt sich um ein sehr subjektives Verfahren, da das Schärfeempfinden sehr unpräzise und schlecht reproduzierbar ist. Außerdem kommt es zu einer schnellen Ermüdung des Testpersonals (sogenannter Gewöhnungseffekt), so daß geringe Schärfeunterschiede nicht mehr wahrgenommen werden.<sup>95</sup> Der Vorteil dieser Methode ist allerdings in einem sehr geringen Geräteaufwand zu sehen und eine vorherige Aufreinigung der Proben ist nicht notwendig. Aus diesem Grund wurde dieser Test 1968 in die offiziellen Methoden der American Spice Trade Association (ASTA) aufgenommen.<sup>96</sup>

### 6.2.1.2 Spektrometrische Verfahren

Die kolorimetrische Bestimmung der Capsaicinoidkonzentration ist die älteste Bestimmungsmethode mit Hilfe von instrumentellen Geräten. Die Capsaicinoide reagieren mit bestimmten Farbreagenzien (Vanadiumoxytrichlorid, Ammoniumvanadat, Phosphormolybdänsäure, Diazobenzolsulfonsäure) unter Ausbildung von Farbstoffen.<sup>15</sup> Hierbei handelt es sich allerdings um sehr unspezifische Reaktionen auf Capsaicinoide, da Matrixbestandteile ebenso mit den Farbreagentien umgesetzt und so höhere Gehalte vorgetäuscht werden. Aus diesem Grund war eine gute Aufreinigung zur Entfernung der Störsubstanzen besonders wichtig.

Spektrometrische Verfahren wurden zunächst seltener verwendet, bekamen dann aber in Kombination mit modernen instrumentellen Techniken, wie der HPLC, große Bedeutung. Dabei wird ausgenutzt, daß die Scharfstoffe eine charakteristische Absorption im UV-Bereich aufweisen. Sie zeigen charakteristische Absorptionsmaxima, die in unterschiedlichen Lösungsmitteln leicht differieren. In ethanolischer Lösung liegt das Maximum bei 229 nm und 280 nm, in methanolischen Extrakten bei 279 nm und in 0,1 N NaOH-Lösung verschiebt sich das Maximum auf 248 nm und 294 nm.<sup>15</sup>

Die Methode ISO/DIS 7543-1 der International Organization for Standardization hat eine spektrometrische Methode zur Bestimmung des Capsaicinoidgehaltes in Chilies und

Chiloleoresinen herausgegeben<sup>88</sup>. Dabei wird der mit Aktivkohle entfärbte methanolische Probenextrakt zum einen mit Natronlauge alkalisch gestellt und zum anderen mit Salzsäure angesäuert. Die Absorption wird dann bei zwei verschiedenen Wellenlängen (248 nm und 296 nm) gemessen. Durch dieses Vorgehen soll das Miterfassen von Coextraktiven möglichst gering gehalten werden. Die so erhaltenen Meßwerte dürfen nicht mehr als 10 % differieren. Diese Methode war vor der Einführung moderner Analysemethoden die genaueste, obwohl immer noch nicht sichergestellt sein konnte, daß keine Matrixbestandteile miterfaßt wurden. Deshalb war eine gründliche und aufwendige Aufreinigung durch Dünnschicht- oder Säulenchromatographie notwendig.

Als weitere spektrometrische Methoden sind die Fluorimetrie, die große Bedeutung in Kombination mit der HPLC erlangt hat, Infrarotspektrometrie und NMR-Spektrometrie, zur Identifizierung der Capsaicinoide und Massenspektrometrie zur Bestimmung der Molekulargewichte und chemischen Struktur zu nennen.

## 6.2.2 Selektive Bestimmungen

### 6.2.2.1 Chromatographie

Zu den chromatographischen Methoden gehören u. a. die Säulenchromatographie, die hauptsächlich zur Aufreinigung der Capsicumextrakte eingesetzt wird.

Weiterhin ist die Papierchromatographie zu nennen. Sie war eine der ersten chromatographischen Methoden, die es ermöglichte, die Capsaicinoide von Carotinoiden, anderen Phenolen, Aminosäuren und weiteren Störsubstanzen zu trennen und mit Hilfe von Farbreagentien sichtbar zu machen. Sie besitzt aber heute keine Bedeutung mehr, ebensowenig wie andere dünnenschichtchromatographische Trenntechniken an Silicagel, Kieselgur, Polyamid oder silberionenimprägniertem Kieselgel. Da diese chromatographischen Methoden aufgrund moderner Trenntechniken heute kaum noch angewandt werden, sei an dieser Stelle auf die entsprechende Literatur verwiesen. Eine gute Übersicht darüber geben *Suzuki und Iwai*.<sup>15</sup>

Mit Weiterentwicklung der instrumentellen Analytik gewann die Bestimmung per Gaschromatographie (GC) und Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) immer größere Bedeutung, da hierbei die Capsaicinoide nicht nur in ihrer Summe, sondern auch einzeln bestimmt werden können.

## 6.2.2.1.1 Gaschromatographie

Mit Hilfe der Gaschromatographie wurden die Capsaicinoide zunächst an gepackten Säulen nach saurer Hydrolyse und Methylierung über ihre Fettsäuremethylester bestimmt.<sup>16, 97</sup> Später ging man in der Regel dazu über, die freien Capsaicinoide ohne vorherige saure Hydrolyse zu derivatisieren. Daneben gibt es aber auch einige Arbeiten, bei denen die freien Capsaicinoide in underivatisierter Form bestimmt wurden. Hierbei mußte allerdings bei hohen Temperaturen (300°C) gearbeitet werden.<sup>72</sup> Außerdem wurde immer wieder ein Tailing der Analyten beobachtet, was zu einer schlechten Reproduzierbarkeit führte und die Auswertung der Peakflächen erschwerte. Weiterhin wurden aufgrund der Weiterentwicklung der GC die gepackten Säulen<sup>16, 73, 74, 78, 79, 94, 97-99</sup> mehr und mehr von den Kapillarsäulen<sup>19, 72, 75, 100, 101</sup> abgelöst.

Tab. 4 gibt eine Übersicht über die verschiedenen Bestimmungsmöglichkeiten.

	<b>Derivatisierungsreagenz</b>	<b>Detektion</b>	<b>Literatur</b>	<b>Jahr</b>
<b>Methylierung der Carbonsäuren</b> (nach Verseifung)	Methanol	FID	97	1961
	Diazomethan	FID	16	1970
		FID	19	1980
<b>Methylierung</b>	Trimethylaniliniumhydroxid (TMAH)	FID	94	1987
			99	1987
<b>Silylierung</b>	Hexamethyldisilazan	FID	79	1971
	Trimethylchlorsilan			
	N,O-bis(trimethylsilyl)	FID	78	1977
	trifluoracetamid (BSTFA)	MS	74	1984
	N,O,-bis(trimethylsilyl) acetamid (TMS-BA)	MS	73	1976
<b>Alkylierung</b>	Pentafluorbenzylbromid (PFB)	ECD	101	1988
<b>underivatisiert</b>		FID	98	1977
		FID	72	1994
		MS	100	1996
		NPD	75	1998

Tab. 4: Übersicht über die gaschromatographischen Bestimmungsmöglichkeiten der Capsaicinoide

Als Detektoren werden in der Regel Flammenionisationsdetektoren (FID) oder massenspektrometrische Detektoren (MS) verwendet. Jüngst zeigten *Thomas et al.*, daß eine empfindlichere Detektion mittels stickstoffspezifischem Detektor (NPD) möglich ist. Die Chromatogramme belegen aber durch sehr starke Matrixsignale eine nicht optimale Selektivität.<sup>75</sup> Die Analyse mittels GC-MS bietet gegenüber dem FID wiederum den großen Vorteil, über die Massenfragmente Informationen über die Struktur der Capsaicinoide zu erhalten. Darüber hinaus kann beim Arbeiten im Single Ion Monitoring- Modus (SIM) gezielt nach den für Capsaicinoiden charakteristischen Molekülfragmenten gesucht werden. Coextraktive mit derselben Retentionszeit wie die Capsaicinoide aber mit unterschiedlichen Massenfragmenten werden dabei nicht miterfaßt. Höhere Gehalte werden somit nicht vorgetäuscht.

#### 6.2.2.1.2 Hochleistungsflüssigchromatographie

Die HPLC erlaubt es ebenfalls, die Capsaicinoide einzeln zu bestimmen. Die Probenextrakte werden hierbei ohne vorherige Derivatisierung direkt analysiert. Das Trennprinzip bei der HPLC ist im wesentlichen dasselbe wie bei der konventionellen Säulenchromatographie. Durch den Einsatz von speziellem Trägermaterial, hohen Drücken, sensitiven Detektoren, der Trenneffizienz, kürzeren Analysenzeit und Automatisierbarkeit bietet sie jedoch große Vorteile gegenüber der konventionellen Säulenchromatographie. Als Trennsäulen werden reversed-phase Phasen wie RP-8-Säulen und RP-18-Säulen verwendet. Die Eluenten bestehen aus Methanol/Wasser- oder Acetonitril/Wasser-Mischungen, die teilweise mit Essigsäure oder Citronensäure angesäuert werden und die meist isokratisch, vereinzelt auch als Gradient gefahren werden. Die Detektion erfolgte zunächst sehr häufig mit UV-Detektion<sup>76, 80, 82, 83, 102-110</sup>, später auch mit Fluoreszenzdetektion. Bei der UV-Detektion wird bei einem Absorptionsmaximum von 280 nm gemessen. Bei der Fluoreszenzdetektion werden leicht differierende Anregungs- und Emissionswellenlängen genannt. *Tab. 5* gibt eine Übersicht darüber.



Anregungs- wellenlänge Ex[nm]	Emissions- wellenlänge Em [nm]	Eluent	Literatur
280	320	MeCN+H <sub>2</sub> O+Eisessig (50+50+0,5;v+v+v)	90, 91, 93
280	316	MeOH/ H <sub>2</sub> O (65:35)	111
280	338	A: 10 Vol-% MeOH in H <sub>2</sub> O B: 100 % MeOH Gradient 10 min A/B (43:57) 10 min A/B (32:68)	112
229	320	MeOH/ H <sub>2</sub> O (1 % HOAc) 50:50	113
270	300	H <sub>2</sub> O:MeCN:THF:Eisessig (55:40:5:1)	114
270	330	MeCN/ H <sub>2</sub> O (40:60)	110
288	320	Gradient von MeCN/Dioxan/HClO <sub>4</sub> / H <sub>2</sub> O (3+2+0,4+50) bis MeOH/Dioxan/MeCN (80+20+10)	86
		MeOH/ H <sub>2</sub> O/Dioxan/MeCN/ HClO <sub>4</sub> (48,4:30,2:13,3:7,9:0,2) bzw. A: MeCN/Dioxan/ HClO <sub>4</sub> / H <sub>2</sub> O (5,4:3,6:0,7:90,3) B: MeCN/Dioxan/MeOH (9:18:73) Gradient (genaueres s.108)	108
280	325	MeCN/ H <sub>2</sub> O (1% HOAc) 40:60	107

*Tab. 5: Übersicht über die in der Literatur genannten Anregungs- und Emissionswellenlängen bei der Fluoreszenzdetektion der Capsaicinoide*

Die American Spice Trade Association (ASTA) sieht für die Bestimmung der Capsaicinoide sowohl die Detektion per UV bei 280 nm als auch per Fluoreszenz bei Ex 288 nm und Em 320 nm vor. Da die Fluoreszenzdetektion wesentlich selektiver als die UV-Detektion ist,

sollte dadurch die Mitbestimmung von unerwünschten Coextraktiven möglichst gering gehalten werden. Je nach dem Schärfegrad der Proben wird ein isokratischer Eluent (für Capsaicinoidkonzentrationen größer als 700 mg/kg) oder ein Gradientensystem verwendet.<sup>108</sup>

Auch die International Organization for Standardization (ISO) hat neben der spektrometrischen Bestimmung der Capsaicinoidkonzentration eine HPLC-Methode (ISO/DIN 7543-2) mit UV-Detektion herausgegeben, bei der es durch Verwendung eines silberionenhaltigen Eluenten möglich ist, PSVA von C zu trennen.<sup>109</sup> Dies ist mit den o.g. Eluenten nicht möglich.

Bei der HPLC-Methode mit Fluoreszenzdetektion, die von *Peusch*<sup>90</sup> entwickelt wurde, erfolgt die Quantifizierung durch Erstellung einer Kalibriergerade mit PSVA und externer Eichung. PSVA und C sind die beiden einzigen Substanzen der Capsaicinoide, die käuflich und in ausreichender Reinheit (mindestens 98 %) zu erwerben sind, wobei PSVA gegenüber C um den Faktor 30 preiswerter und deswegen dem C vorzuziehen ist. *Peusch* stellte fest, daß sich die Responsefaktoren von C und PSVA, gemessen an den Steigungen der Kalibriergeraden, nur geringfügig voneinander unterschieden, so daß PSVA dem Vorzug gegeben wurde. Gleichzeitig ist der Arbeitsaufwand durch Einsatz nur eines Standards wesentlich geringer, da für die Quantifizierung der Capsaicinoide nur eine Kalibriergerade erstellt werden muß.

Neben der UV- und Fluoreszenzdetektion können die Capsaicinoide aufgrund ihrer phenolischen Struktur auch per elektrochemischer Detektion erfasst werden. Es kommt dabei zu folgender Reaktion:

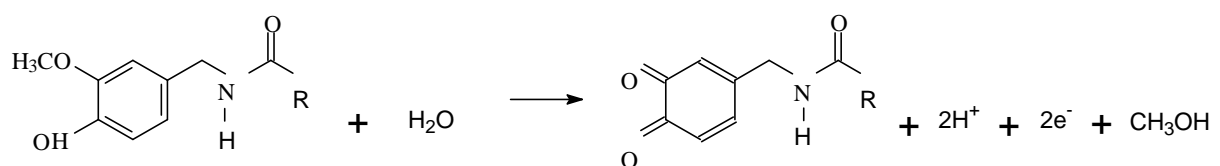
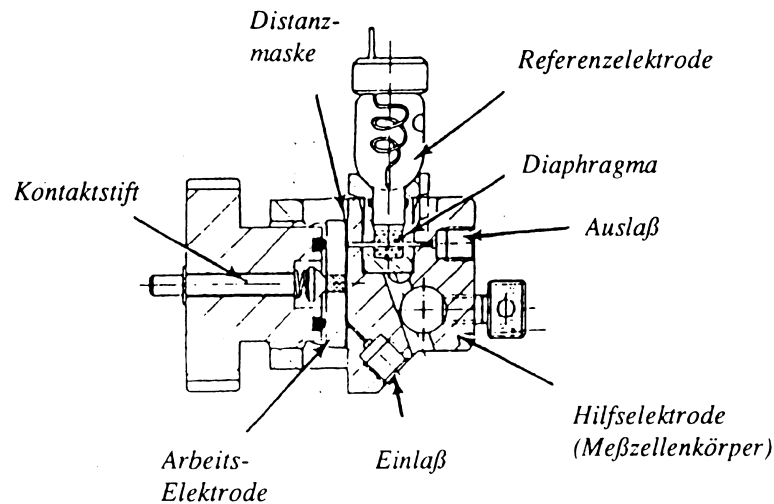


Abb. 7: Reaktion der Capsaicinoide bei der elektrochemischen Detektion

Da diese Detektionsmöglichkeit weniger als die beiden erstgenannten Detektionen gebräuchlich ist, wird im folgenden kurz darauf eingegangen.

Die elektrochemische Detektion unterscheidet sich von der UV- und Fluoreszenzdetektion dadurch, daß bei ihr die Proben in der Meßzelle chemisch verändert (oxidiert oder reduziert) werden. *Abb. 8* zeigt einen Querschnitt der Meßzelle beim ELCD.<sup>115</sup>



*Abb. 8: Meßzellen-Aufbau beim ELCD*<sup>115</sup>

Zwischen Arbeits- und Referenzelektrode besteht eine konstante Potentialdifferenz, die mit Hilfe eines Potentialwahlchalters eingestellt wird. Ab einem für die Substanz charakteristischen Potential findet eine elektrochemische Reaktion an der Arbeitselektrode statt, wobei es zu einer Elektronenübertragung kommt. Wird die Probe oxidiert, gibt das Probenmolekül ein oder mehrere Elektronen an die Arbeitselektrode ab. Erfolgt eine Reduktion, fügt die Elektrode dem Molekül Elektronen zu. Der Detektor mißt den durch diese Elektronenübertragung erzeugten Strom und wandelt ihn zwecks Registrierung in eine Spannung um.

Das Verhältnis zwischen dem angelegten Potential und dem daraus resultierenden Stromfluß wird in einer Strom-Spannungs-Kurve dargestellt, die auch als „hydrodynamisches Voltammogramm“ bezeichnet wird.

Aufgrund der unterschiedlichen Redoxpotentiale verschiedener Substanzen, kann man den ELCD als „Selektivitätsmittel“ nutzen, so daß nur Substanzen in der Probenlösung elektrolysiert werden, deren Redoxpotential niedriger oder gleich dem der Analyten ist. Alle Matrixbestandteile, die ein höheres Potential als die Analyten benötigen, werden nicht erfaßt und stören somit nicht im Chromatogramm.

Laut Literatur erhöht sich gegenüber den optischen Detektionsmethoden die Empfindlichkeit deutlich, so daß Capsaicin noch bis in den unteren pg-Bereich erfaßt werden kann.<sup>116</sup>

Tab. 6 vergleicht die beiden in der Literatur vorgestellten Methoden. Bei der Methode von Chiang<sup>117</sup> stand nicht die alleinige Bestimmung der Capsaicinoide im Vordergrund, sondern die Entwicklung einer einfachen, sensitiven und simultanen Analyse von Piperin und Capsaicin, die meist zusammen in Lebensmitteln anzutreffen und für die Schärfe verantwortlich sind.

Eluent	Spannung	Probenmaterial	Konzentrationen, Nachweisgrenze	Literatur
MeCN:H <sub>2</sub> O 45:55 (Phosphatpuffer pH 4,0)	+ 400 mV	Käse-, Salsa-, Tomatensoße	0,4-380 mg/kg der Einzelkomponenten	117
MeCN: H <sub>2</sub> O 45:55 (100 mmol/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	+ 750 mV	Rattenplasma	NWG 12 pg/Injektion	116

Tab. 6: Übersicht über elektrochemische Untersuchungsverfahren für Capsaicinoide

## 7 Zielsetzung

Jurenitsch *et al.* beobachteten bei verschiedenen, selbstangebauten Paprikakultivaren, daß die relativen Anteile der Capsaicinoide stark schwankten.<sup>12</sup> Sie führten dies auf die unterschiedlichen Varietäten, Herkunft, Reifegrad und Kultivierungsbedingungen zurück. Aus diesen Untersuchungen ließ sich ableiten, daß gegenüber den dominierenden Capsaicinoiden C und DC die Konzentrationsunterschiede bei den Minorcapsaicinoiden weit höher ausfallen. Diese könnten deshalb als Authentizitätsindikatoren für bestimmte Capsicumsorten und Herkunft geeigneter als C und DC sein. Da diese Minorcapsaicinoide aber nur in sehr geringen Mengen vorhanden sind, wird eine empfindliche Analytik benötigt, die bereits geringste Mengen reproduzierbar erfaßt und nicht durch Matrixeffekte gestört wird. Mit der gegenwärtig zur Verfügung stehenden HPLC mit Fluoreszenzdetektion zur Bestimmung der Capsaicinoide C, DC und NDC lag eine robuste und reproduzierbare Methode vor.<sup>90</sup>

Die Verwendung eines Elektrochemischen Detektors (ELCD) ließ bei der HPLC eine genügend empfindliche Bestimmungsmethodik für die Minorcapsaicinoide erwarten, da die Capsaicinoide mittels ELCD um den Faktor von ca. 100 empfindlicher als per Fluoreszenzdetektion bestimmt wurden, was die NWG für die absolute Menge bis in den unteren pg Bereich senkte.<sup>116</sup> Dies wurde allerdings nur in einer einzigen Arbeit beschrieben und sollte deshalb nachvollzogen werden.

Es sollte zunächst an Capsaicinoidstandards und nachfolgend an Paprikapulvern aus dem Handel ermittelt werden, ob die elektrochemische Detektion im Hinblick auf Basislinienstabilität, Nachweisstärke, Linearität, Selektivität, Reproduzierbarkeit und allgemeiner Robustheit die Erwartungen erfüllt. Durch einen in Serie geschalteten Fluoreszenzdetektor sollte on-line geprüft werden, ob die Daten aus beiden Detektoren übereinstimmen oder ob bei der einen oder anderen Detektion Störungen durch andere Matrixbestandteile auftreten.

Mittels stickstoffspezifischem Alkaliflammenionisationsdetektor (GC/NPD) und GC/MS sollte die Nachweisempfindlichkeit bei gaschromatographischen Arbeiten überprüft werden. Mit Hilfe der GC sollte weiterhin eine Möglichkeit zur Verfügung stehen, um ein Screening auf bisher unbekannte Capsaicinoide durchzuführen sowie ein Trennverfahren für einzelne in der HPLC nur mit hohem Aufwand zu trennenden Capsaicinoide zur Verfügung stehen.

An Paprikapulvern gesicherter Herkunft sollte neben dem Capsaicinoidgehalt und -muster die Farbe analysiert werden, um festzustellen, ob diese Parameter als Authentizitätsnachweise für Sorte, Herkunft, Erntejahr etc. nutzbar sind.

Zur Untersuchung der Farbe bei den Paprikaproben sollte der Gesamtfarbstoffgehalt nach der ASTA-Methode photometrisch und die Farbcharakteristik über CIE-Lab<sup>\*</sup>-Werte ermittelt werden.

Im Laufe der Arbeit verschob sich aufgrund der erzielten Ergebnisse der Schwerpunkt der Arbeit von Paprikapulver auf frische Gewürzpaprika. Die Studien konzentrierten sich dabei auf die Stabilität der Capsaicinoide in intakten und zerkleinerten Früchten bei verschiedenen Lagerbedingungen. Weiterhin wurde die Entwicklung der Capsaicinoidgehalte während der Reifung (eigene Anbaustudie) untersucht.

## Experimenteller Teil

### 8 Meßmethoden

#### 8.1 Hochleistungsflüssigchromatographie

Die von *Peusch*<sup>90</sup> entwickelte reversed-phase HPLC-Methode mit Fluoreszenzdetektion sollte an eine elektrochemische Detektion angepaßt werden.

Bestimmt wurden bei *Peusch* die drei Capsaicinoide Capsaicin (C), Dihydrocapsaicin (DC) und Nordihydrocapsaicin (NDC). Die Trennung erfolgte auf einer reversed-phase Trennsäule (LiChrospher®RP-18 e, 5 µm, 250 x 4 mm) bei Raumtemperatur mit einem angesäuerten Acetonitril/Wasser-Eluenten (MeCN+H<sub>2</sub>O+Eisessig; 50+50+0,5; v+v+v).

Zu beachten ist, daß bei den so gewählten Bedingungen keine Trennung von Pelargonsäurevanillylamid (PSVA) von Capsaicin möglich ist. Das Signal von C setzt sich also immer aus C und PSVA zusammen und wird deshalb im folgenden, wenn nicht besonders erwähnt, nur als C bezeichnet. PSVA spielt aufgrund seines geringen Anteils, der in der Literatur mit Konzentrationen zwischen 1,5 - 4,6 % beschrieben wird<sup>79</sup>, nur eine untergeordnete Rolle beim Gesamtcapsaicinoidgehalt. Detektiert wurde mit einem Fluoreszenzdetektor bei  $\lambda_{\text{Ex}} = 280 \text{ nm}$  und  $\lambda_{\text{Em}} = 320 \text{ nm}$ .

Die Quantifizierung erfolgte durch externe Eichung an PSVA.<sup>90</sup>

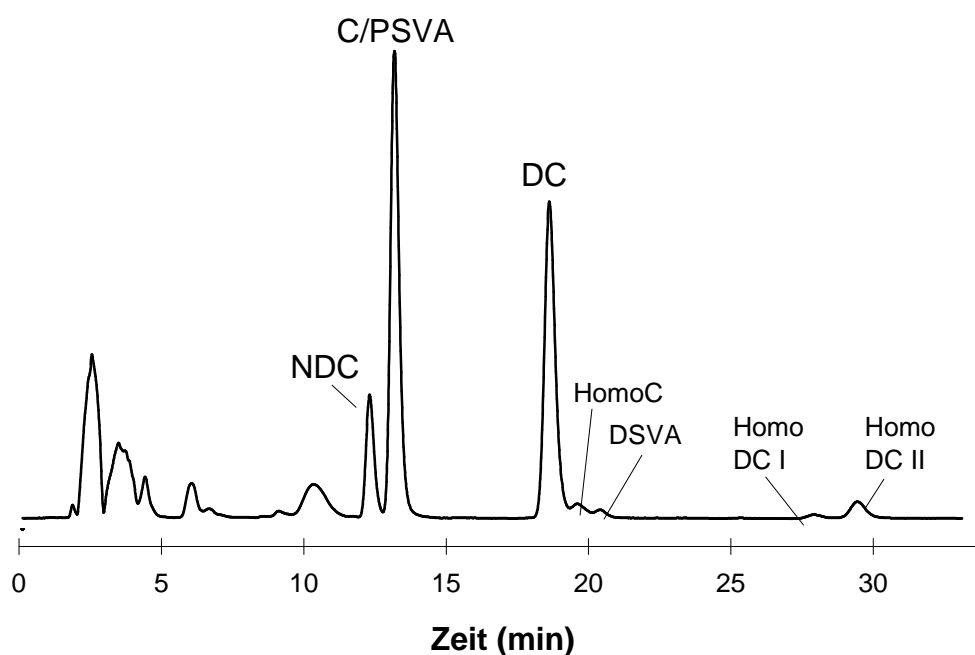


Abb. 9: Chromatogramm eines Paprikaextraktes aus frischen Früchten (RP-18 e, 5 µm, 250 x 4 mm ID, mobile Phase: MeCN+H<sub>2</sub>O+Eisessig (50+50+0,5; v+v+v), Flußrate 1 ml/min

### 8.1.1 Aufnahme hydrodynamischer Voltammogramme

Die in der Literatur angegebenen Potentiale für die Capsaicinoidbestimmung mittels ELCD weichen stark voneinander ab. *Chiang*<sup>117</sup> arbeitete bei 0,4 V, während *Kawada et al.*<sup>116</sup> 0,75 V nutzte (Tab. 6, S. 27). Daher waren zunächst eigene Untersuchungen notwendig, um durch die Aufnahme von hydrodynamischen Voltammogrammen, das optimale Potential (maximales Signal/Rauschverhältnis) für die Capsaicinoidbestimmung festzustellen. Bestimmt wurde dabei der resultierende Strom in Abhängigkeit vom angelegten Potential direkt im Eluat der Trennsäule. Variiert wurde das Potential im Bereich von 0,5 V bis 1,05 V (Ag/AgCl). Als Standardlösungen für die HPLC wurden Capsaicin (C) und ein Gemisch von Pelargonsäurevanillylamid (PSVA) und Dihydrocapsaicin (DC) mit einer Konzentration von ca. 7 ng/10 µl verwendet. Diese drei Capsaicinoide wurden gewählt, um festzustellen, ob deren Responsefaktoren identisch sind, so daß wie bei der Fluoreszenzdetektion nur eine Substanz für die externe Eichung benötigt wird. Capsaicin konnte nicht zum Gemisch aus PSVA und DC dazugegeben werden, da es nicht von PSVA getrennt wird.

Da in der Literatur Potentiale von 0,4 V und 0,75 V genannt waren, wurde, als Kompromiß, mit einem Potential von 0,5 V begonnen. Erst ab einem Potential von 0,6 V konnte jedoch ein Signal beobachtet werden. Aus diesem Grund wurde auf das Einstellen noch niedrigerer Potentiale verzichtet. Die Messungen der Capsaicinoide zeigten eine sehr schwach ausgeprägte Plateau-Region bei 0,85 bis 0,95 V. Zwischen 0,95 V und 1,05 V nahm der Basislinienstrom stark zu, so daß auf Untersuchungen bei noch höheren Potentialen verzichtet wurde.

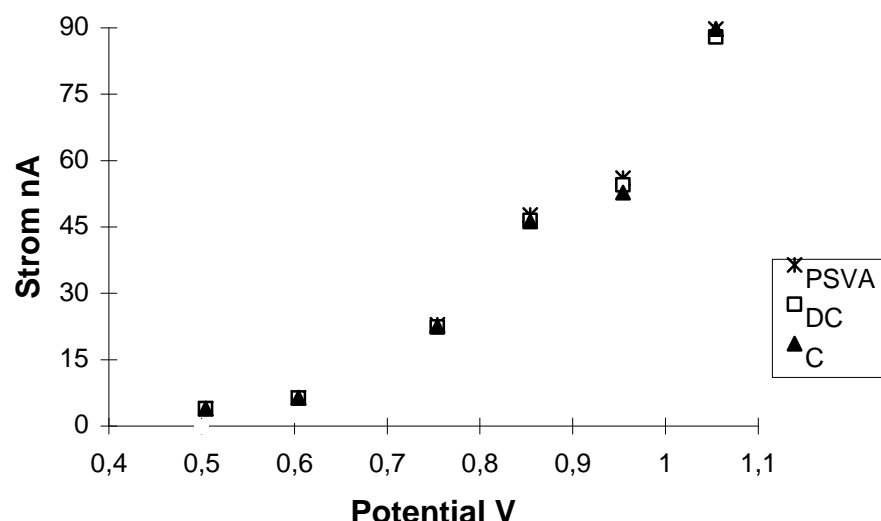


Abb. 10: Hydrodynamische Voltammogramme der Capsaicinoide über den Bereich von 0,6 bis 1,05 V

Abb. 10 läßt erkennen, daß mit zunehmendem Potential der Analytstrom anstieg. In derselben Richtung nahmen jedoch auch der Grundstrom sowie das Grundrauschen zu, während die Stabilität der Basislinie stark abnahm. Um diesen Effekt zu berücksichtigen, wurde der Quotient zwischen Analytstrom zu Grundstrom gebildet und als Response dargestellt. Dabei ist ein Maximum bei 0,9 V festzustellen (Abb. 11). Bei diesem Potential wurden alle weiteren Messungen durchgeführt.

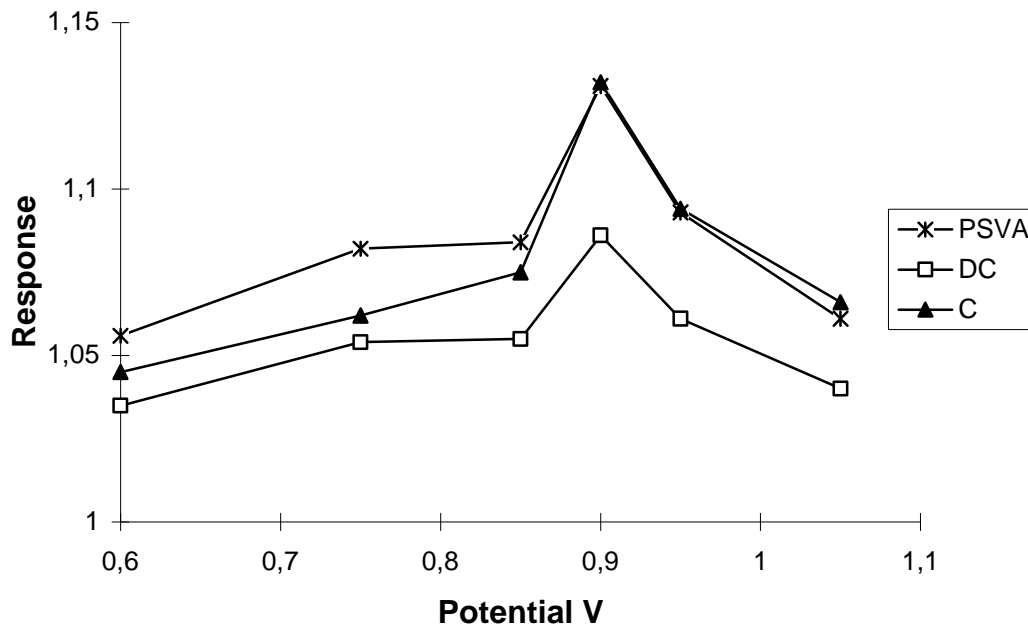


Abb. 11: Darstellung des mit dem elektrochemischen Detektors erhaltenen Responses als Quotient von resultierendem Strom (Analytstrom) zu Grundstrom im Bereich von 0,6 bis 1,05 V

### 8.1.2 Quantifizierung

Zur Bestimmung der im Vergleich zur Fluoreszenzdetektion laut Literatur<sup>116</sup> erhöhten Empfindlichkeit der elektrochemischen Detektion wurden Kalibriergeraden von PSVA, DC und C im Bereich von 0,4 bis 23 ng pro Injektion (Dreifachinjektionen) durch sequentielle Anordnung von Fluoreszenz- und elektrochemischem Detektor aufgenommen.

In den Abb. 12 und Abb. 13 sind die jeweiligen Regressionsgeraden dargestellt.



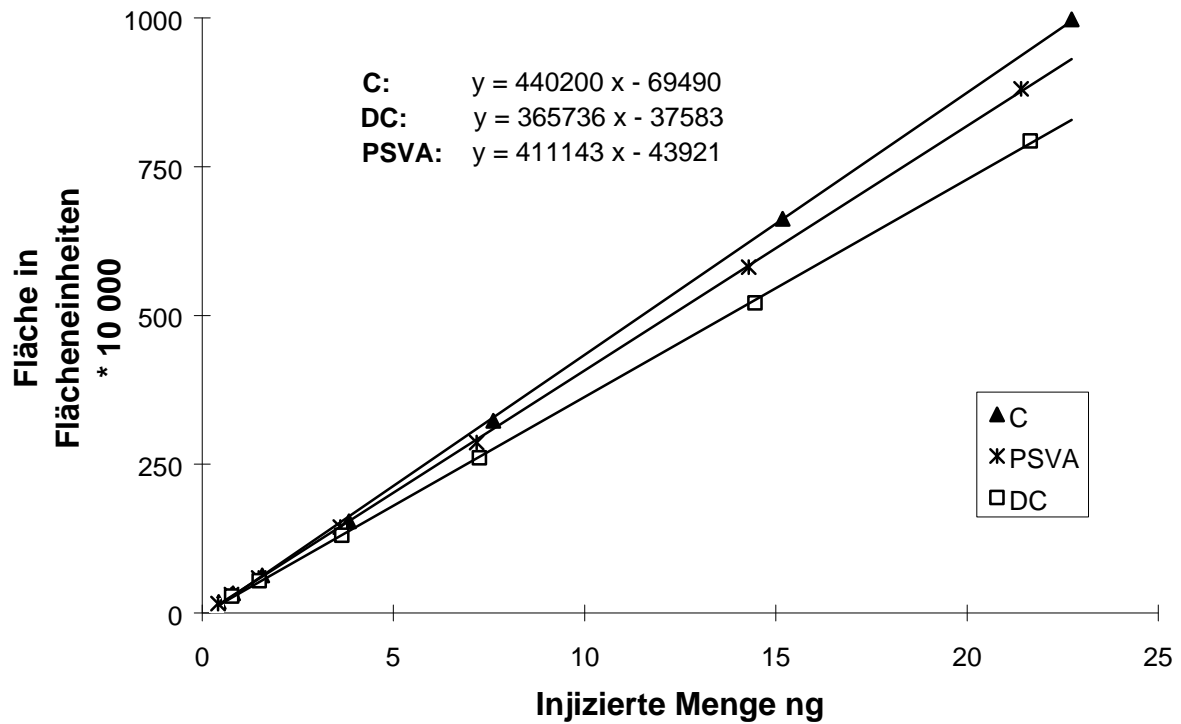


Abb. 12: HPLC/Fluoreszenz-Detektion: Regressionsgeraden der Capsaicinoide Capsaicin (C), Pelargonsäurevanillylamid (PSVA) und Dihydrocapsaicin (DC); Mittelwerte aus Dreifachinjektionen

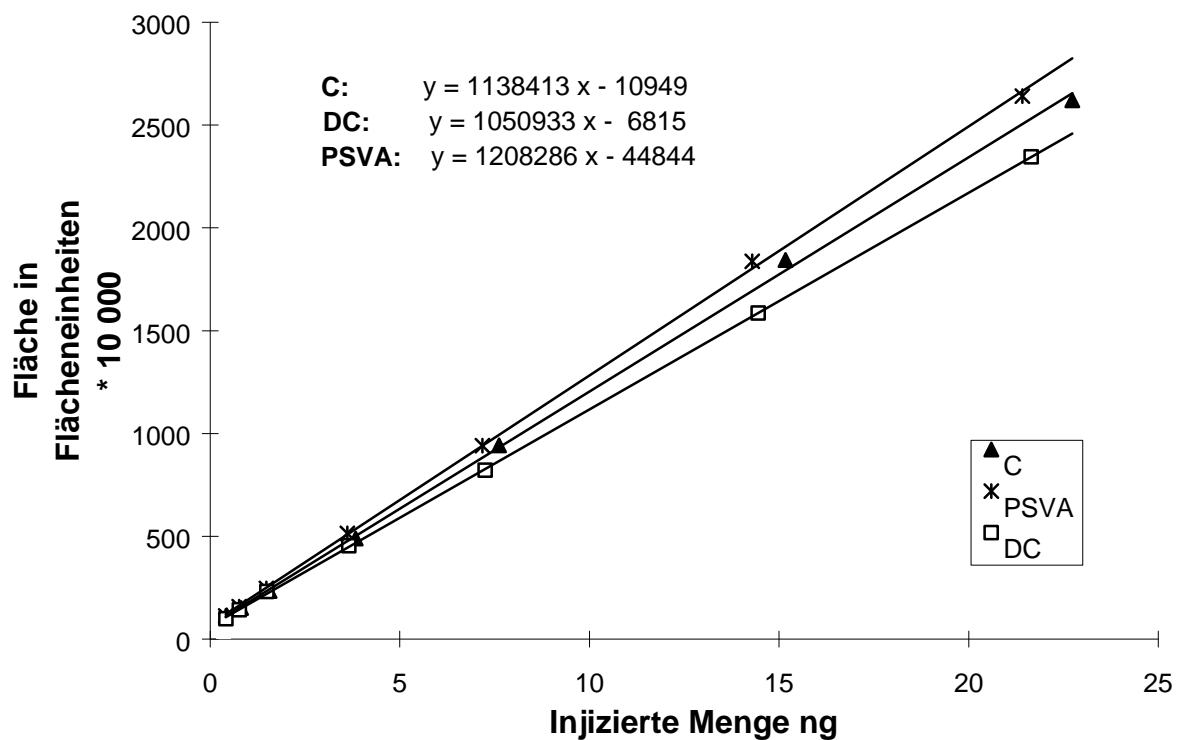


Abb. 13: HPLC/ELCD-Detektion: Regressionsgeraden der Capsaicinoide Capsaicin (C), Pelargonsäurevanillylamid (PSVA) und Dihydrocapsaicin (DC); Mittelwerte aus Dreifachinjektionen

Bei der Fluoreszenzdetektion besitzt Capsaicin die größte Geradensteigung, während es beim ELCD Pelargonsäurevanillylamid ist. Die niedrigste Geradensteigung weist bei beiden Detektionsarten Dihydrocapsaicin auf. Die Geradensteigungen von PSVA und C unterscheiden sich nur geringfügig voneinander, so daß bei beiden Detektionsmethoden eine externe Eichung nur mit PSVA möglich ist.

Schon bei der Darstellung des Responses bei der elektrochemischen Detektion (*Abb. 11*) fällt das etwas schlechtere Ansprechverhalten des Dihydrocapsaicins gegenüber den anderen beiden Capsaicinoiden auf. Der Grund dafür ist darin zu sehen, daß nur die Standards PSVA und C in sehr hoher Reinheit (mindestens 98 %) käuflich zu erwerben sind. DC liegt in einer Reinheit von mindestens 90 % vor. Dies wurde aber bei der Berechnung der einzelnen Konzentrationen nicht berücksichtigt, müßte jedoch für quantitative Bestimmungen entsprechend korrigiert werden. Da aber im Verlauf der weiteren Arbeit nicht mit DC sondern nur mit PSVA als Kalibrierstandard gearbeitet wurde, wurde diese Korrektur hier unterlassen.

Über die Statistiksoftware KALIBO<sup>©</sup> <sup>118</sup> wurde die Nachweisgrenze als Dreifaches der Verfahrensstandardabweichung berechnet (*Tab. 7*).

<b>Detektionsprinzip</b>	<b>PSVA</b>	<b>DC</b>	<b>C</b>
Fluoreszenz	0,42 ng	0,51 ng	0,40 ng
ELCD	0,49 ng	0,55 ng	0,72 ng

*Tab. 7: Nachweisgrenzen für die Capsaicinoidstandards PSVA, DC, C bei Fluoreszenzdetektion und elektrochemischer Detektion*

Wie aus den Resultaten erkennbar ist, stimmen die Nachweisgrenzen (NWG) bei beiden Detektionsmethoden trotz größerer Flächen beim ELCD (Faktor 3) fast überein. Mittels elektrochemischer Detektion ließ sich, zumindest mit dem eingesetzten Gerät, nicht empfindlicher als per Fluoreszenz messen.

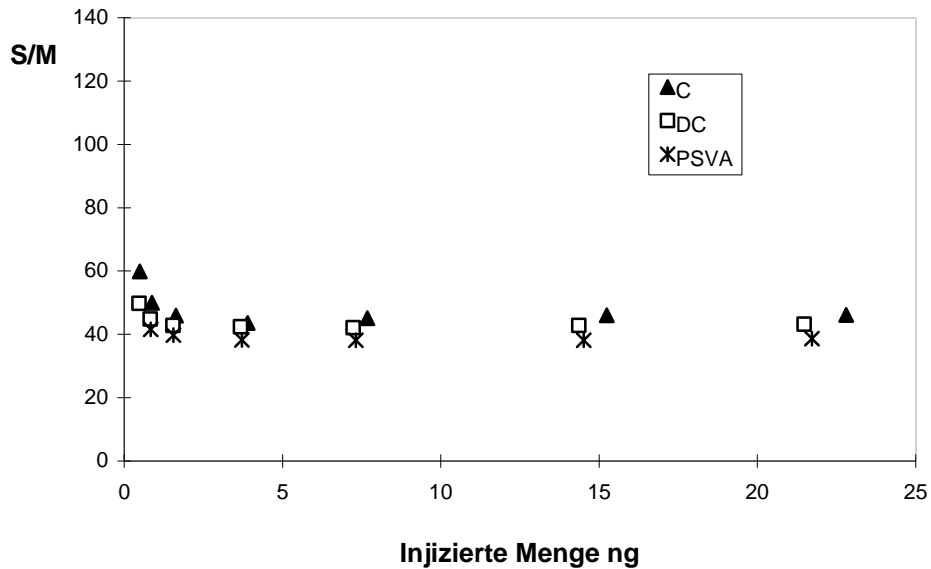
Die Nachweisgrenzen, die in der Literatur<sup>116</sup> für den ELCD genannt werden, konnten nicht bestätigt werden (*Tab. 6, S. 27*).

Zur Feststellung des linearen Meßbereiches wurde der Quotient aus den Peakflächen zum absoluten Gehalt der jeweils injizierten Standardsubstanz gebildet und dies zur Veranschaulichung graphisch dargestellt (*Abb. 14*). Im Idealfall sollte sich eine Parallele zur x-Achse ergeben bzw. der y-Wert über den gesamten Meßbereich konstant sein, da mit zunehmender injizierter Menge proportional die Peakfläche ansteigen sollte.

$$y \text{ (injizierte Menge ng)} = \frac{\text{Peakfläche} - \text{Achsenabschnitt}}{\text{injizierte Menge ng} * 10000} = \frac{S}{M}$$

Zur besseren Übersicht wurde durch 10 000 geteilt.

a) Fluoreszenz



b) ELCD

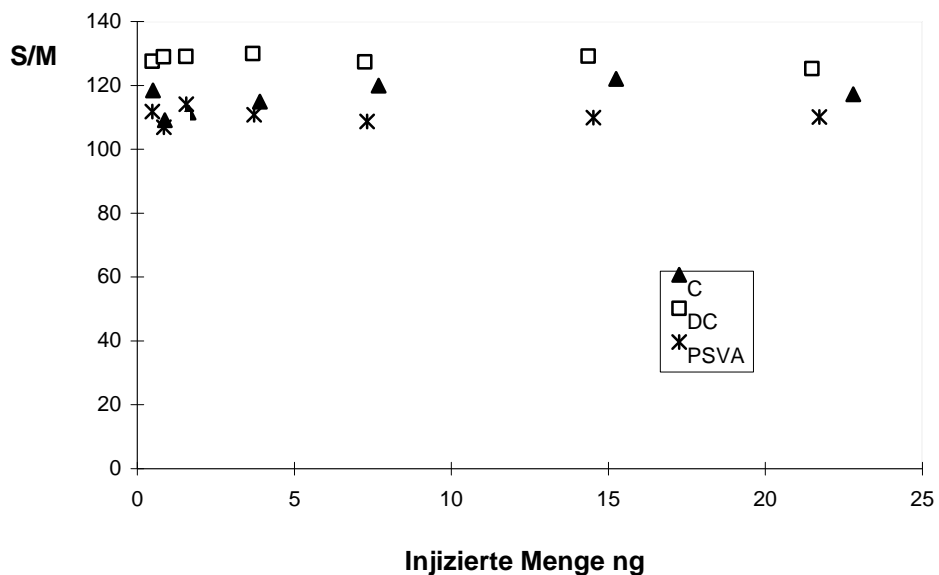


Abb. 14: Überprüfung der Linearität des Meßbereiches durch Auftragung des Quotienten aus Signalfläche und injizierter Menge (S/M) gegen die absolut injizierte Menge für eine C, DC und PSVA-Standardsubstanz, a) Fluoreszenzdetektion b) Elektrochemische Detektion; Mittelwerte aus Dreifachinjektionen

Wie man sieht, ist der lineare Bereich bei beiden Detektionsmethoden über den gewählten Konzentrationsbereich gegeben. Lediglich bei sehr geringen Konzentrationen ( $< 0,7$  ng) ist bei der Fluoreszenzdetektion die Linearität nicht mehr befriedigend.

### 8.1.3 Analyse von Pulvern

Die Selektivität beider Detektionsarten wird aus den Resultaten der Aufarbeitungen von capsaicinoidreichem Rosenpaprikapulver (95 mg/kg) und capsaicinoidarmem Edelsüß-Pulver (3,3 mg/kg) erkennbar. In den Vergleichschromatogrammen, die durch sequentielle Anordnung von Fluoreszenz- und elektrochemischem Detektor erhalten wurden, stellt man fest, daß der „Matrixpeak“ am Anfang der Chromatogramme bei der elektrochemischen Detektion wesentlich größer ist als bei der Fluoreszenzdetektion. Dies zeigte sich besonders bei milden Pulvern und führte somit zu einer Beeinträchtigung der Auswertung, da die interessierenden Analyten sich auf der auslaufenden Flanke des „Matrixpeaks“ befanden und somit nicht reproduzierbar integriert werden konnten (*Abb. 15*).

### 8.1.4 Fazit

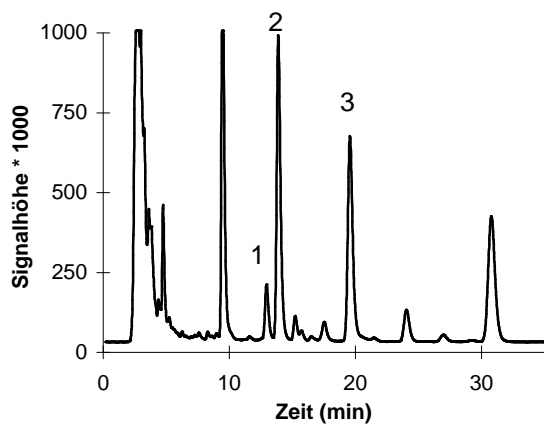
Die Detektion mittels elektrochemischen Detektors erfüllte hinsichtlich der Nachweisstärke nicht die an sie gesetzte Erwartung. Eine um den Faktor 100 verbesserte Nachweisempfindlichkeit gegenüber der Fluoreszenzdetektion konnte nicht erreicht werden. Bei beiden Detektionsarten waren die Nachweisgrenzen, die im oberen pg-Bereich lagen, und der lineare Meßbereich vergleichbar.

Beim ELCD wurden zudem mit fortschreitender Messung der Grundstrom und die Peakflächen geringer. Diese Probleme konnten durch Reinigung der Arbeitselektrode und Distanzmaske und ggf. Erneuerung des Eluenten gelöst werden. Zusätzlich wurde während der Untersuchungen eine leichte Verschiebung des Responsemaximums von 0,90 V auf 0,87 V festgestellt.

Da die elektrochemische Detektion gegenüber der Fluoreszenzdetektion keine Vorteile hinsichtlich Nachweisstärke, Reproduzierbarkeit und vor allem Robustheit lieferte, wurde im Laufe der weiteren Arbeit per Fluoreszenz gemessen.

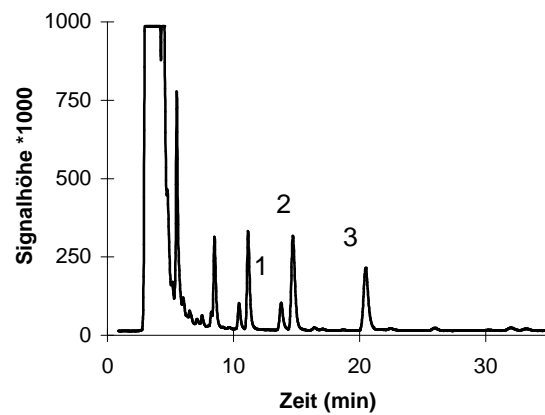
a)

Fluoreszenz

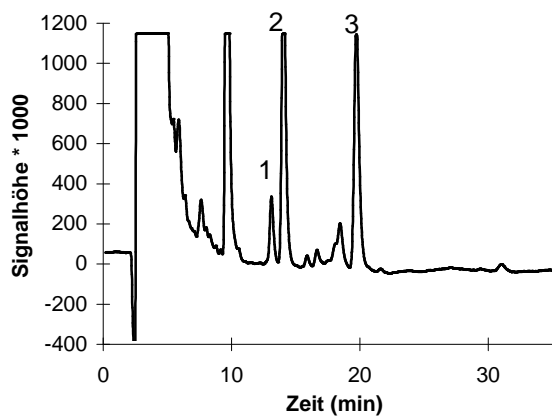


b)

Fluoreszenz



ELCD



ELCD

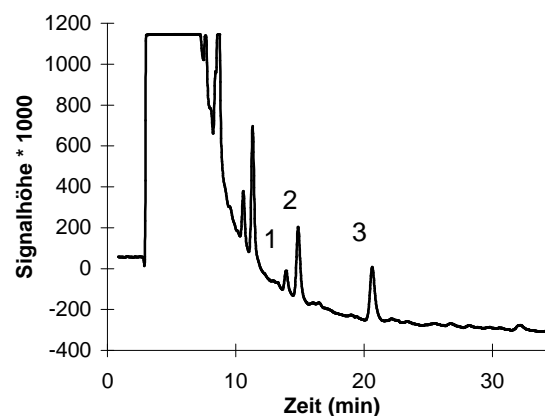


Abb. 15: Chromatogramme von Rosenpaprikapulver; 95 mg/kg (a) und Edelsüß-Paprikapulver; 3,3 mg/kg (b)

Peak Nr. 1: Nordihydrocapsaicin, 2: Capsaicin, 3: Dihydrocapsaicin

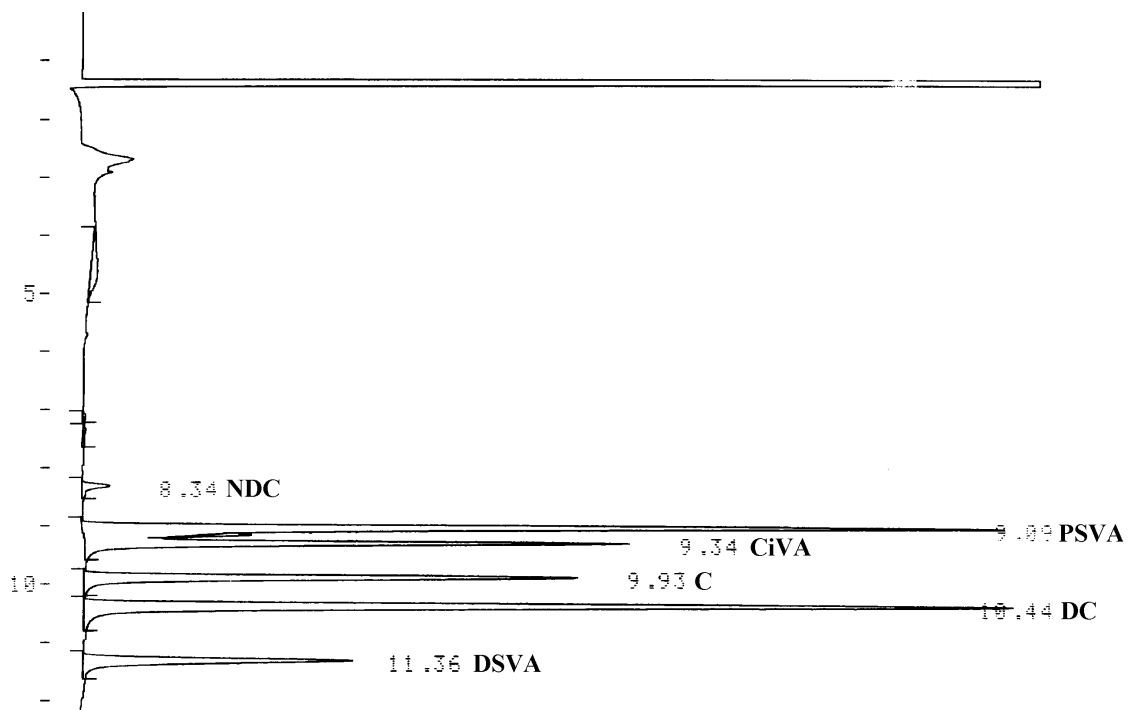
## 8.2 Gaschromatographie

Es sollte eine GC-Methode für Capsaicinoide entwickelt werden, die zum einen als Screeningmethode auf bisher unbekannte Capsaicinoide dienen sollte. Zum anderen sollte mit nur geringem Aufwand eine Alternative zur HPLC-Methode bezüglich Robustheit und NWG etabliert werden.

### 8.2.1 Methodenentwicklung für die Detektion mittels stickstoffselektivem Detektor

Anstelle des sehr häufig eingesetzten Flammenionisationsdetektors (FID; *Tab. 4, S. 22*) wurde ein Stickstoff/Phosphor-spezifischer Detektor (NPD) gewählt, da dessen Empfindlichkeit für Stickstoff gegenüber Kohlenstoff (FID) ca. um den Faktor 10 000 höher ist<sup>119</sup> und so auch Bestandteile, die nur in sehr geringen Konzentrationen vorhanden sind (Minorcapsaicinoide), erfaßt werden könnten.

An einer unpolaren Säule (100 % Dimethylpolysiloxan; Ultra-1, 25 m, 0,2 mm I.D., 0,11 µm Schichtdicke) ließen sich die Capsaicinoide nicht trennen. Mit einer schwach polareren Säule (95 % Dimethyl-5 % diphenyl-polysiloxan; HP 5, 25 m, 0,32 mm I.D., 0,17 µm Schichtdicke) gelang dagegen die Trennung. Allerdings waren die Peaks für die GC relativ breit (*Abb. 16*) und im Laufe der weiteren Messungen trat vor allem bei niedrigen Konzentrationen ein Tailing auf (genaueres s. 8.2.5, *S. 42*).



*Abb. 16: Kapillarchromatographische Trennung der Capsaicinoide NDC, PSVA, CiVA, C, DC, DSVA, Detektion per NPD*

## 8.2.2 Quantifizierung

Die Quantifizierung der Capsaicinoide erfolgt über eine externe Eichung. Bei der HPLC wird dafür PSVA verwendet.

Da bei der gaschromatographischen Bestimmung mittels NPD nicht bekannt war, ob das Responseverhalten von PSVA und C gleich ist und somit nicht sichergestellt war, ob eine externe Eichung nur mit PSVA erfolgen konnte, wurde der Response für beide Substanzen bestimmt. Dazu wurde eine Kalibriergerade mit sieben unterschiedlich konzentrierten Standardlösungen hergestellt. Jede Lösung wurde dreimal injiziert (bzw. eine Konzentration nur zwei Mal). Aus diesen je 20 Datenpunkten wurde je eine Kalibriergerade erstellt. Dabei wurden die Peakflächen aus den Quotienten von PSVA bzw. C und 2,4,6-Triphenoxy-1,3,5-triazin (TRI, s. 8.2.4, S. 40) als interner Standard (= Peakflächenverhältnis) gegen die injizierte Menge [ng] aufgetragen (Abb. 17).

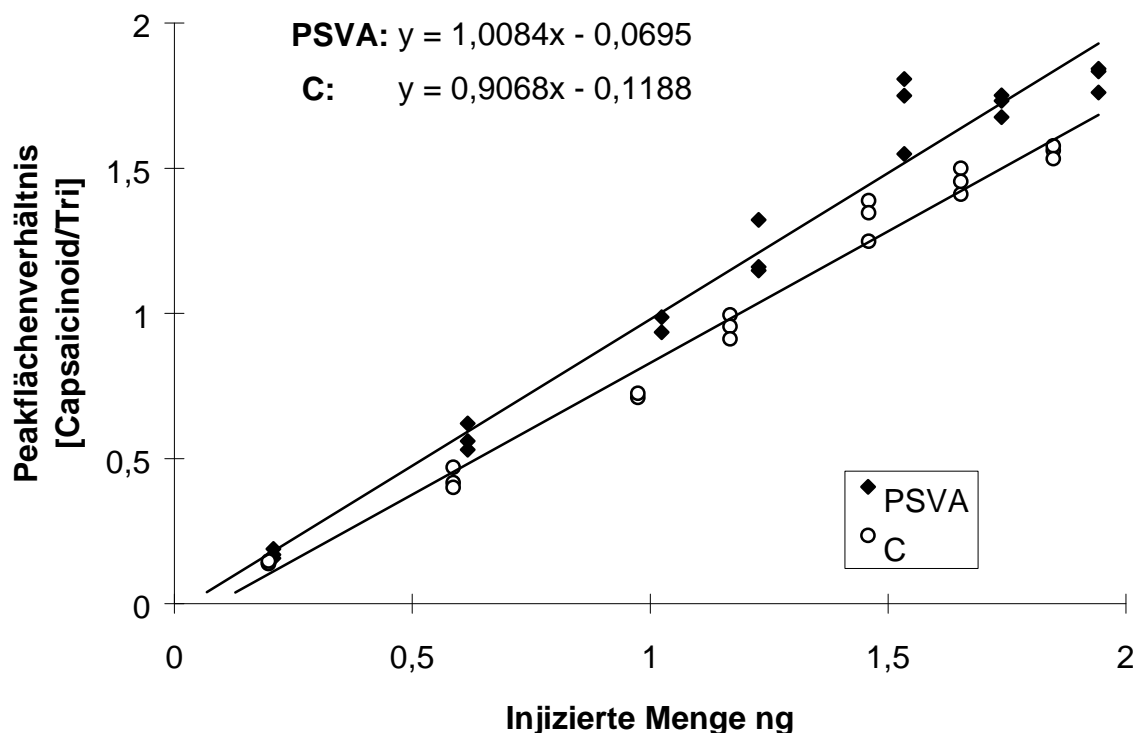


Abb. 17: PSVA und C-Regressionsgeraden nach GC/NPD-Detektion

Wie aus der Grafik ersichtlich, weichen die Regressionsgeraden von PSVA und C etwas voneinander ab. Dies läßt darauf schließen, daß verschiedene Capsaicinoide leicht unterschiedliches Responseverhalten aufweisen. Um dieses leicht unterschiedliche

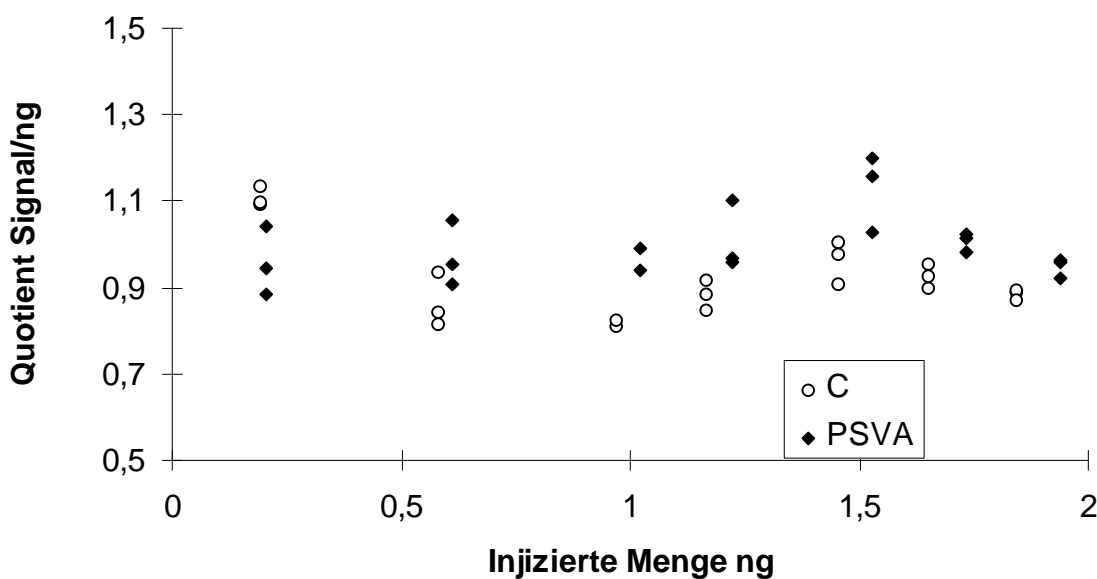
Responseverhalten zu berücksichtigen, müßte demnach für jedes zu bestimmende Capsaicinoid einzeln eine Kalibrierung vorgenommen werden. Wie bereits erwähnt, sind nur PSVA und C in ausreichender Reinheit käuflich zu erwerben. Die Erstellung einzelner Kalibriergeraden wäre also mit einem erheblichen Arbeitsaufwand verbunden, da einige Capsaicinoide synthetisiert werden müßten. Um Aussagen darüber zu treffen, ob sich die Bestimmung der Capsaicinoide grundsätzlich per Gaschromatographie eignet, ist jedoch eine alleinige Kalibrierung mit PSVA zunächst durchaus geeignet.

Zur Überprüfung der Linearität wurde der Quotient aus dem Signal/ng als

$$\text{Quotient Signal / ng} = \frac{\left( \frac{\text{Peakfläche Capsaicinoid}}{\text{Peakfläche TRI}} \right) - \text{Achsenabschnitt}}{\text{injizierte Menge ng}}$$

gegen die injizierte Menge in ng aufgetragen.

Wie *Abb. 18* zu entnehmen ist, war für den gesamten Meßbereich keine befriedigende Linearität zu erzielen.



*Abb. 18: Überprüfung des linearen Meßbereiches bei der GC/NPD-Detektion*



### 8.2.3 Bestimmung der Nachweisgrenze (NWG)

Die Bestimmung der NWG als Dreifaches der Verfahrensstandardabweichung erfolgte über das Auswerteprogramm KALIBO<sup>® 118</sup> (Tab. 8).

PSVA	C
0,20 ng	0,30 ng

Tab. 8: NWG für die Capsaicinoidstandards PSVA und C bei der GC/NPD-Detektion

Diese NWG liegen geringfügig unter den NWG, die per HPLC/Fluoreszenzdetektion erhalten wurden (Tab. 7, S. 33).

### 8.2.4 Wahl eines geeigneten internen Standards

Bei den vorausgegangenen Versuchen wurde 2,4,6-Triphenoxy-1,3,5-triazin (TRI) als interner Standard verwendet (Abb. 19). Diese Substanz war jedoch nicht optimal, da es eine späte Retentionszeit (3 min hinter den Capsaicinoiden) aufwies. Zudem war es notwendig, die Ofentemperatur von 230 °C auf 290 °C zu erhöhen (die Capsaicinoide wurden bei 230 °C eluiert). Dies führte zu einem Anstieg der Basislinie und erschwerte die Auswertung. Außerdem ist TRI nur in wenigen Lösungsmitteln löslich, so daß man bei der weiteren Probenaufarbeitung stark eingeschränkt ist. Gut ist es in Cyclohexan/Aceton (1+1; v/v) löslich, schlecht dagegen in Methanol.

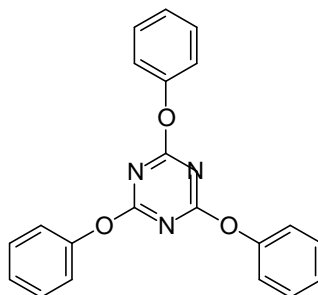


Abb. 19: Strukturformel des 2,4,6-Triphenoxy-1,3,5-triazin (TRI)

Aus diesen Gründen wurde nach einer anderen Substanz gesucht. Ein geeigneter Standard sollte möglichst käuflich zu erwerben sein. Die Substanz mußte ein Stickstoffatom enthalten und sollte idealerweise eine ähnliche Struktur wie die Capsaicinoide, jedoch keine phenolische Hydroxylgruppe aufweisen, da anzunehmen war, daß diese für das Tailing der Analyten verantwortlich ist (genauer s. 8.2.5, S. 42). Weiterhin durften keine Halogenatome vorhanden sein, da diese die Detektion mit dem NPD sehr empfindlich stören. Es kann dabei zu „negativen“ Signalen und Empfindlichkeitsverlusten kommen. Die Retentionszeit des Standards sollte weiterhin nahe genug an den zu trennenden Capsaicinoiden liegen, um die Dauer eines Chromatogramms nicht unnötig zu verlängern. Dabei darf es allerdings nicht zu Überschneidungen kommen.

Verschiedene verfügbare Substanzen wurden getestet, die aber alle weitaus ungeeigneter als TRI waren (Tab. 9).

Substanz	Retentionszeit (min)	Bemerkung
Piperin	15,20	späte Retentionszeit
2,4,6-Triphenoxy-1,3,5-triazin	14,16	
Coffein	3,52	bei realen Proben liegt der Peak im Bereich der Matrixpeaks
Nonylamin	3,48	
1-Methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-on	3,11	
Triazol	3,02	
Phthalimid	3,04	
Methylrot		es waren mehrere Peaks vorhanden

Tab. 9: Als interne Standards geprüfte Substanzen; die Capsaicinoide wiesen Retentionszeiten von 9 bis 11 min auf

Daher wurde nach einer Verbindung gesucht, die einfach zu synthetisieren war. In Frage kam Laurinsäurebenzylamid (LsBA). Dies kann durch Reaktion von Dodecylsäurechlorid (Laurinsäurechlorid) mit Benzylamin dargestellt werden (Abb. 20). Die Identitäts- und Reinheitsprüfung erfolgte durch Gaschromatographie (Abb. 21), Schmelzpunkt und NMR (s. Kapitel 14.6, S. 129).

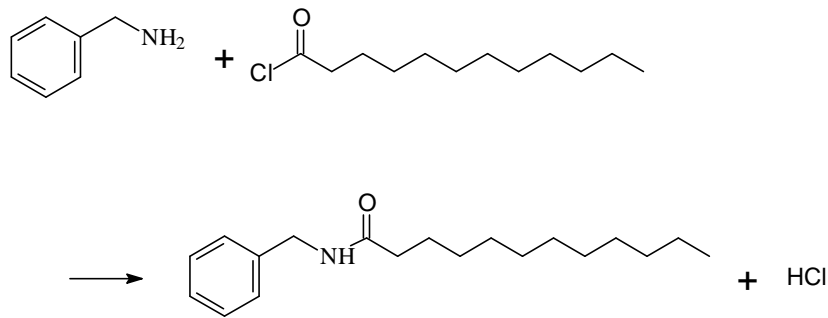


Abb. 20: Syntheseweg zur Darstellung von Laurinsäurebenzylamid

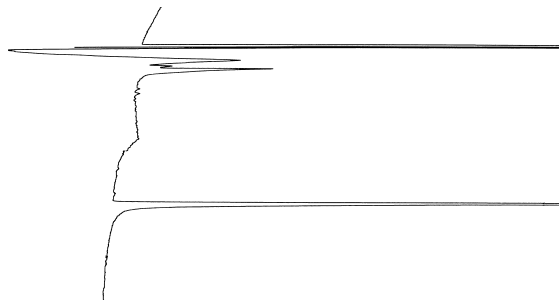


Abb. 21: GC-Chromatogramm des Laurinsäurebenzylamids, Detektion per NPD

Wie aus dem Chromatogramm ersichtlich, zeigt LsBA ein nur sehr schwaches Tailing. Außerdem eluiert es vor den Capsaicinoiden. Damit ist LsBA gut als interner Standard zur quantitativen Bestimmung per GC/NPD geeignet.

### 8.2.5 Derivatisierung

Die Capsaicinoide zeigten besonders bei niedrigen Konzentrationen ein starkes Tailing, wodurch Integrationsschwierigkeiten bei der Auswertung entstanden. Durch Änderung des Temperaturprogrammes, Start etwa 10 °C unter der Siedetemperatur des Lösungsmittels vor dem Aufheizen des Säule, wurde keine Verbesserung erzielt.

In der Literatur<sup>94, 99</sup> wird die Hydroxylgruppe der Capsaicinoide für das Peak tailing verantwortlich gemacht, da dadurch eine Tendenz zur Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen gegeben ist. Die Analyten sind somit weniger flüchtig, neigen zur Adsorption, was zu Peak tailing führt. Die Überführung in flüchtigere Derivate kann durch eine Silylierung zu Trimethylderivaten, saure Hydrolyse der Capsaicinoide mit anschließender

Veresterung der Fettsäuren oder durch eine Methylierung mit Trimethylaniliniumhydroxid vorgenommen werden (Tab. 4, S. 22).

Silylierungsreagentien sind für den NPD nicht geeignet, da sich schnell  $\text{SiO}_2$ -Ablagerungen auf der Oberfläche der Alkalisalzperle bilden, wodurch diese inaktiviert wird. Als Derivatisierungsreagenz wurde deshalb Trimethylsulfoniumhydroxid (TMSH) gewählt, da es leicht zu handhaben ist. Die bei der Reaktion entstehende Nebenprodukte wie Dimethylsulfid und Methanol verdampfen bereits bei niedrigen Temperaturen, eluieren somit mit dem Lösungsmittelpeak und stören nicht im Chromatogramm.<sup>120</sup>

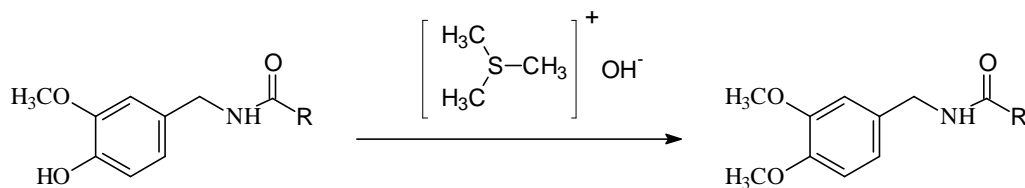


Abb. 22: Reaktion der Capsaicinoide mit TMSH

Wie erwartet, kam es durch die Derivatisierung zu einer Erhöhung der Retentionszeit um ca. 30 sec. Die derivatisierte Verbindung zeigte außerdem ein geringeres Tailing als die underivatisierte (Abb. 23).

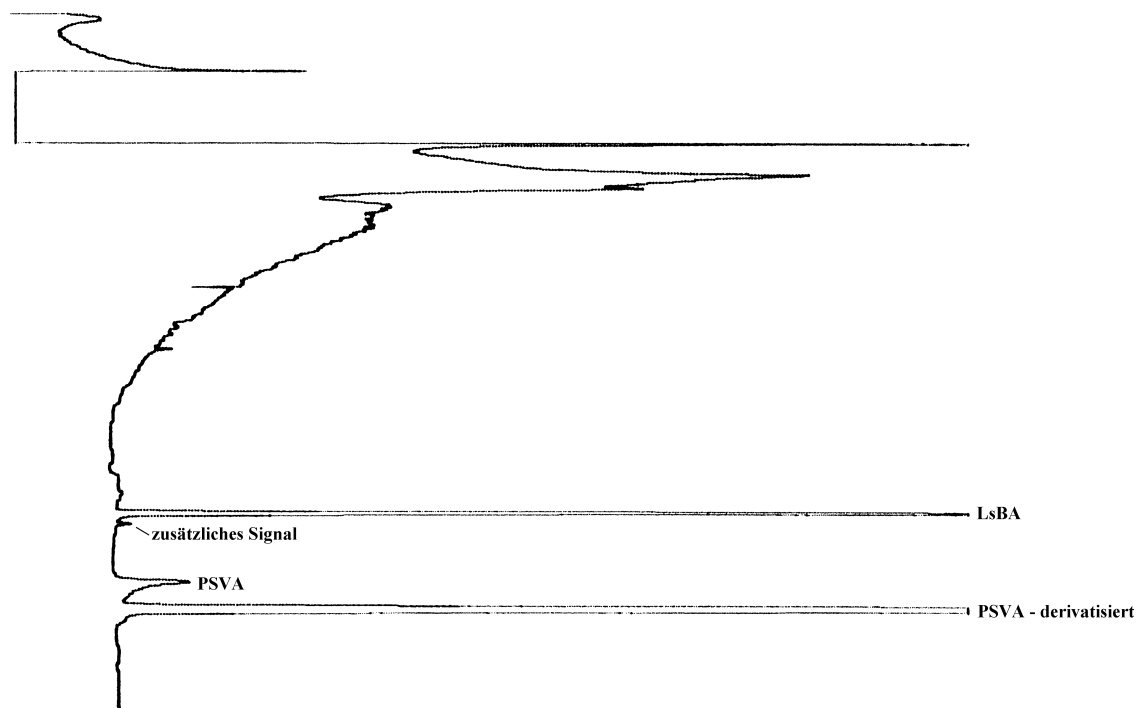


Abb. 23: Chromatogramm des unvollständig derivatisierten PSVA-Standards mit Laurinsäurebenzylamid als interner Standard; molarer TMSH-Überschuß bei 39

Es war nicht bekannt, welcher TMSH-Überschuß für eine quantitative Umsetzung erforderlich war. Deshalb wurden verschieden große molare Überschüsse an TMSH zu einem Standard (natürliches Capsicumgemisch) gegeben. Ab einem molarem Verhältnis von 1:39 (Capsaicinoid: TMSH) war allerdings ein 2. Peak (= zusätzliches Signal) unmittelbar hinter dem internen Standard sichtbar (*Abb. 23*), der um so größer wurde, je höher der TMSH-Überschuß war. Um festzustellen, ab welchem TMSH-Überschuß eine vollständige Derivatisierung stattgefunden hat, wurde der Response als Quotient der Peakflächen von Capsaicinoid zu internem Standard (plus zusätzliches Signal) ermittelt.

Capsaicinoid	Molares Verhältnis Capsaicinoid: TMSH						
	1:5	1:10	1:19	1:39	1:77	1:115	1:481
	Response	Response	Response	Response	Response	Response	Response
NDC	0,08	0,11	0,14	0,15	0,15	0,15	0,17
C	1,76	2,76	2,81	2,89	2,97	2,86	3,17
DC	1,01	1,08	1,36	1,37	1,47	1,50	1,56

*Tab. 10: Response (Quotient der Peakflächen von Capsaicinoid zu internem Standard) bei verschiedenen Derivatisierungsüberschüssen an TMSH*

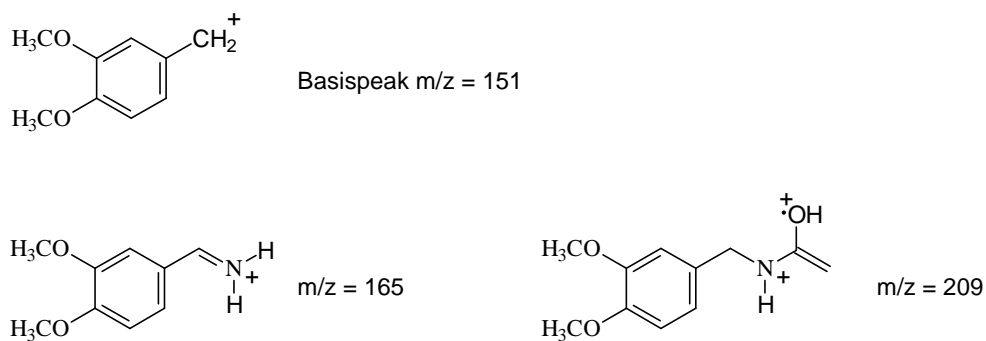
Anhand der *Tab. 10* wird ersichtlich, daß bei einem TMSH-Überschuß von 39 beim Capsicum-Standard noch keine quantitative Umsetzung stattgefunden hat, da der Response mit zunehmendem Überschuß weiter anstieg. Bei diesem Überschuß war jedoch schon ein zusätzliches Signal hinter dem internen Standard sichtbar.

TMSH reagiert nicht spezifisch nur mit Capsaicinoiden sondern auch mit Substanzen, die in Paprikapulverproben vorhanden sind. Extrakte aus Paprikapulvern würden somit wegen Begleitstoffen einen noch größeren Überschuß an Derivatisierungsreagenz als ein Capsicum-Standard benötigen. Da aber bereits ein TMSH-Überschuß von 39 zum Capsicum-Standard zu Störungen bei noch unvollständiger Derivatisierung führte, macht es keinen Sinn, für Proben noch höhere Überschüsse zu verwenden.

Wie im nachfolgenden Kapitel erläutert, konnte das zusätzliche Signal hinter dem LsBa über die MS-Detektion als das am Amidstickstoff methylierte LsBA identifiziert werden.

## 8.2.6 Massenselektive Detektion

Mit Hilfe der massenselektiven Detektion ist es möglich, über ausgewählte Massen direkt auf Capsaicinoide als Gruppe bzw. auf einzelne Capsaicinoide Screening-Untersuchungen durchzuführen und Strukturinformationen zu den Capsaicinoiden zu erhalten. Die typischen Fragmente der an der Hydroxylgruppe derivatisierten Capsaicinoide sind in *Abb. 24* dargestellt. Sie enthalten alle den methylierten Vanillylrest.



*Abb. 24: Charakteristische Massenfragmente der an der Hydroxylgruppe methylierten Capsaicinoide nach Elektronenstoßionisation (70 eV)*

Wie aus den nachfolgend genannten Massenfragmenten ersichtlich (*Tab. 11*), konnte die Umsetzung der Capsaicinoide mit TMSH bestätigt werden (Methylierung an der Hydroxylgruppe).

Der 2. Peak unmittelbar hinter dem internen Standard konnte ebenfalls aufgeklärt werden. Es handelte sich hierbei um die am Stickstoffatom der Amidgruppe derivatisierte Verbindung des LsBA's.

Bei der massenselektiven Detektion war jedoch unmittelbar vor dem Hauptpeak eines jeden Capsaicinoids ein kleinerer Peak zu erkennen. Wie die Ergebnisse aus *Tab. 11* (*zusätzlich am N-Atom methyliert*) belegen, handelt es sich hier um zusätzlich am Stickstoff-Atom derivatisierte Capsaicinoide (*Abb. 25*).

Massenfragmente

m/z (relative Intensitäten)

**Laurinsäurebenzylamid** (Eigensynthese)

289 ( $M^+$ , 27), 149 (100), 106 (25), 105 (5), 91 (50)

am N-Atom methyliert:

303 ( $M^+$ , 18), 163 (100), 120 (18), 91 (75)

**Pelargonsäurevanillylamid**

methyliert an der Hydroxylgruppe:

307 ( $M^+$ , 54), 223 (1), 209 (16), 166 (14), 165 (24), 151 (100)

zusätzlich am N-Atom methyliert:

321 ( $M^+$ , 45), 223 (38), 180 (8), 151 (100)

**Nordihydrocapsaicin**

methyliert an der Hydroxylgruppe:

307 ( $M^+$ , 14), 209 (8), 166 (9), 165 (11), 151 (100)

**Capsaicin**

methyliert an der Hydroxylgruppe:

319 ( $M^+$ , 12), 276 (2), 209 (4), 166 (8), 165 (6), 151 (100)

zusätzlich am N-Atom methyliert:

333 ( $M^+$ , 20), 290 (2), 223 (11), 180 (5), 151 (100)

**Dihydrocapsaicin**

methyliert an der Hydroxylgruppe:

321 ( $M^+$ , 54), 278 (0,6), 209 (15), 166 (13), 165 (22), 151 (100)

zusätzlich am N-Atom methyliert:

335 ( $M^+$ , 36), 292 (0,6), 223 (37), 180 (8), 151 (100)

**Decansäurevanillylamid** (Eigensynthese)

methyliert an der Hydroxylgruppe:

321 ( $M^+$ , 56), 209 (18), 166 (15), 165 (26), 151 (100)

zusätzlich am N-Atom methyliert:

335 ( $M^+$ , 45), 223 (43), 180 (8), 151 (100)

Tab. 11: Massenfragmente (70 eV) der Capsaicinoide nach Derivatisierung mit TMSH

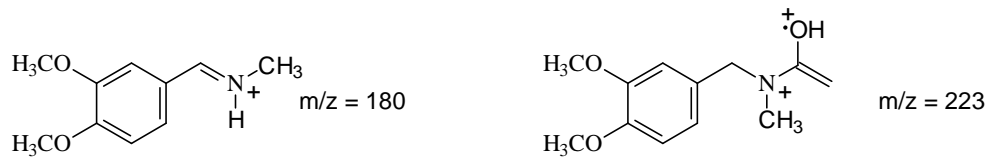


Abb. 25: Charakteristische Massenfragmente der zusätzlich am N-Atom methylierten Capsaicinoide

Diese Reaktion ist nicht ungewöhnlich. Von Reaktionen der Amidgruppe mittels Trimethylaniliniumhydroxid zu N-methylierten Derivaten neben der Methylierung an der Hydroxylgruppe zu O-methylierten Derivaten wurde bereits in der Literatur berichtet.<sup>121,122</sup> Auffällig war nur, daß mit Ausnahme des LsBA's diese N-methylierten Verbindungen bei der Detektion mit dem NPD nicht sichtbar waren, ohne das dafür ein plausibler Grund angegeben werden kann.

### 8.2.7 Fazit

Die NWG sind bei der GC mit stickstoffspezifischer Detektion geringfügig niedriger als bei der HPLC/Fluoreszenzdetektion (etwa Faktor 1,5). Bei der GC konnte über den gesamten Meßbereich keine befriedigende Linearität erzielt werden. Vorteilhaft war bei der GC die Trennung von PSVA und Capsaicin, was bei der HPLC nicht der Fall ist. Für die Auswertung nachteilig wirkte sich das Tailing der Analyten aus, was auch durch Derivatisierung nicht befriedigend gelöst werden konnte.

Da nur die Nachweisgrenzen bei der GC vergleichbar mit denen der HPLC, die Linearität, Robustheit und Reproduzierbarkeit bei der GC mit den zur Verfügung stehenden Geräten jedoch wesentlich schlechter als bei der HPLC waren, wurde auf die Verwendung weiterer Derivatisierungsreagentien und auf den routinemäßigen Einsatz der GC für die Paprikaanalytik verzichtet.



## 9 Probenvorbereitung

### 9.1 Methoden für die HPLC

#### 9.1.1 Pulver

##### 9.1.1.1 Vereinfachte Aufarbeitung (nur Extraktion)

Für die Bestimmung des Gesamtcapsaicinoidgehaltes von Paprikapulvern mittlerer Schärfe (ab ca. 8 mg/kg Gesamtcapsaicinoidgehalt) wurde nach einer einfachen, effektiven und gleichzeitig schnellen Probenaufarbeitung gesucht.

Bei Pulvern diesen Schärfegrades sollte eine alleinige Extraktion mit einem geeigneten Lösungsmittel ohne weitere aufwendige Aufreinigungsschritte wie z.B. die flüssig-flüssig-Verteilung (Methode nach *Peusch*<sup>90</sup>) ausreichend sein. Der Anteil der Capsaicinoide verglichen mit unerwünschten Begleitstoffen sollte so groß sein, daß sich die Capsaicinoide deutlich von Matrixpeaks abzeichnen.

Um Probleme im chromatographischen System zu vermeiden, sollte die Elutionsstärke der Probelösungen der des Eluenten entsprechen (MeCN + H<sub>2</sub>O + HAc; 50+50+0,5; v+v+v). Sinnvoll ist deshalb die Extraktion mit einer Acetonitril-Wasser-Mischung (1+1; v+v) bzw. Methanol-Wasser-Mischung (7+3;v+v).

Die Capsaicinoide sind aufgrund ihres phenolischen wie auch unpolaren Acyl-Restes in relativ vielen Lösungsmitteln unterschiedlicher Polarität, wie z. B. Methanol, Benzol, Aceton, gut löslich. Schlecht löslich sind sie in heißem und praktisch unlöslich in kaltem Wasser. Bei Extraktion mit den o. g. Mischungen mußte daher wegen des relativ hohen Wasseranteils mit einer unvollständigen Extraktion der Capsaicinoide gerechnet werden. Aus diesem Grund wurden verschiedene Mischungen mit unterschiedlich hohen Anteilen des jeweiligen organischen Lösungsmittels zur Untersuchung eines ausgewählten Pulvers eingesetzt (*Tab. 12*).

Um die Eignung zur Capsaicinoidextraktion festzustellen, wurde das Pulver mit MeOH, MeCN oder den Gemischen mit Wasser extrahiert. Zur Feststellung der Reproduzierbarkeit wurden jeweils zwei Extraktionen durchgeführt. Dazu wurden 4 g Pulver mit 40 ml Lösungsmittel für 2 Stunden unter Rückfluß extrahiert. Nach dem Abkühlen wurde in einen 50 ml Meßkolben dekantiert. Der Extraktionsrückstand wurde mit 5 ml des jeweiligen Lösungsmittels nachgewaschen und durch einen vorher mit dem Lösungsmittel befeuchteten Faltenfilter filtriert. Anschließend wurde mit dem Lösungsmittel bis zur Marke aufgefüllt.

Von jeder Extraktlösung wurden 50 und 100  $\mu\text{l}$  in die HPLC injiziert.

Extraktions- mittel	Capsaicinoidgehalt mg/kg bei Injektion von	
	50 $\mu\text{l}$	100 $\mu\text{l}$
MeOH (Injektion des rein methanolischen Extraktes)	8,2 8,2	nicht auswertbar
MeOH (nach der Extraktion 1:1 mit Wasser verdünnt)	9,1 9,0	8,6 8,9
MeCN (nach der Extraktion 1:1 mit Wasser verdünnt)	9,7 9,4	8,9 9,9
MeCN : H <sub>2</sub> O 1+1; v+v	8,5 8,9	8,5 8,6
MeOH : H <sub>2</sub> O 7+3; v+v	--- 8,6	8,7 8,8

Tab. 12: Ergebnisse der Capsaicinoidbestimmung (mg/kg) desselben Pulvers mit verschiedenen Lösungsmitteln extrahiert

Die Chromatogramme der Acetonitril-Extrakte (direkt injiziert), MeCN : H<sub>2</sub>O (9+1, v+v und 7+3, v+v) waren aufgrund nicht getrennter und verzerrter Peaks nicht auswertbar und sind deshalb nicht tabellarisch aufgeführt.

Die Chromatogramme der reinen Methanol-Extrakte waren nur bei den 50  $\mu\text{l}$ -Injektionen auswertbar.

Die Acetonitril und Methanol-Lösungen, die nach der Extraktion 1:1 mit Wasser verdünnt wurden, waren aufgrund von sehr feinen Öltröpfchen trüb. Daher führte die Injektion eines definierten Volumens zu stark schwankenden Capsaicinoidgehalten.

Bei einer Extraktion mit den Lösungsmitteln MeCN : H<sub>2</sub>O (1+1; v+v) und MeOH : H<sub>2</sub>O (7+3; v+v) traten keine Probleme auf. Die Ergebnisse und Chromatogramme waren reproduzierbar und vergleichbar.

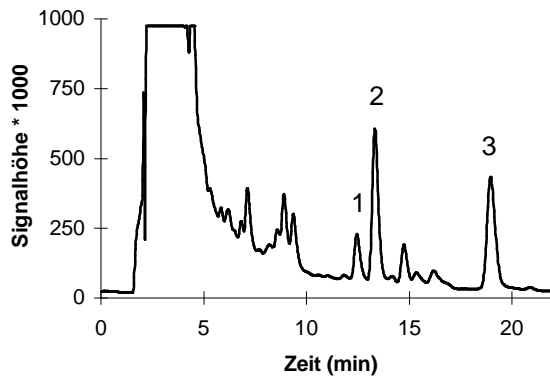
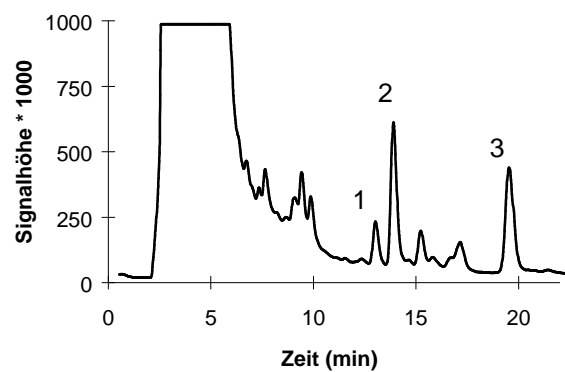
a) MeCN : H<sub>2</sub>O (1+1; v+v)b) MeOH : H<sub>2</sub>O (7+3; v+v)

Abb. 26: Chromatogramme des nach der vereinfachten Aufarbeitung extrahierten Paprikapulvers

Peak Nr. 1: Nordihydrocapsaicin, 2: Capsaicin, 3: Dihydrocapsaicin

Verschiedene Pulver wurden nach dieser Methode aufgearbeitet, wobei die Extraktion mit MeCN : H<sub>2</sub>O (1+1; v+v) gewählt wurde (Tab. 13).

Die Methode liefert bei Pulvern verschiedenen Schärfegrades gut reproduzierbare Ergebnisse.

Mittelwert (mg/kg)	Standardabweichung (mg/kg)	Variationskoeffizient %	n
71,2	1,3	1,8	8
64,8	1,4	2,2	5
27,4	1,1	4,0	5
115,1	3,5	3,0	8
9,8	0,2	2,0	3

Tab. 13: Capsaicinoidgehalte (mg/kg) verschiedener Paprikapulver nach der vereinfachten Methode aufgearbeitet; n: Anzahl der Aufarbeitungen

## 9.1.1.1.1 Nachextraktion

Um die Vollständigkeit der Extraktion zu überprüfen, wurde der Rückstand eines mit MeCN/Wasser-Gemisches extrahierten Pulvers nochmals mit 40 ml des Lösungsmittels MeCN : H<sub>2</sub>O (1+1; v+v) für 2 Stunden unter Rückfluß extrahiert. Nach dem Abkühlen wurde in einen Spitzkolben dekantiert und der Rückstand nachgewaschen. Das Lösungsmittel wurde bis auf ca. 4 ml unter Vakuum eingengt, in einen 10 ml Meßkolben überführt, mit dem Lösungsmittel bis zur Marke aufgefüllt und ein Aliquot in die HPLC injiziert.

Capsaicinoidkonzentration (mg/kg)	
Erstextrakt	Zweitextrakt
8,8	0,8
8,6	1,1

Tab. 14: Capsaicinoidgehalte(mg/kg) im Erst- und Zweitextrakt eines Paprikapulvers

Die Nachextraktion zeigte, daß im ersten Extraktionsschritt ca. 90 % der Capsaicinoide erfaßt wurden.

## 9.1.1.1.2 Aufarbeitung mit innerem Standard

Zur Überprüfung der Aufarbeitung wurde ein innerer Standard (Citronellsäurevanillylamid<sup>90</sup>) definierter Konzentration, der nicht natürlich im Capsaicinoidgemisch vorkommt, zu einem Paprikapulver zugegeben und dessen Wiederfindung bestimmt.

Aufgearbeitet wurde wie unter 9.1.1.1, S. 48 beschrieben.

Über 95 % des inneren Standards wurden wiedergefunden, was dafür spricht, daß das im Vergleich zu den Capsaicinoiden C, DC, NDC polarere Citronellsäurevanillylamid leichter als die anderen Capsaicinoide extrahiert wird (Tab. 15).

Zwischen den beiden Lösungsmitteln ist kein Unterschied bezüglich der Wiederfindung des inneren Standards festzustellen.

<b>Extraktionsmittel</b>	<b>Capsaicinoidkonz. mg/kg</b>	<b>Wiederfindung des inneren Standards %</b>
MeCN : H <sub>2</sub> O	9,8	96
1+1; v+v	9,6	96
MeOH : H <sub>2</sub> O	9,4	96
7+3; v+v	9,4	94

Tab. 15: Bestimmung der Wiederfindung des inneren Standards (Citronellsäurevanillylamid) bei der vereinfachten Aufarbeitung

#### 9.1.1.2 Flüssig-Flüssig-Verteilung nach Ethylacetatextraktion (Optimierung)

Bei den Untersuchungen zur flüssig-flüssig-Verteilung nach Peusch<sup>90</sup> (S. 19) zeigte sich eine Abhängigkeit der ermittelten Capsaicinoidkonzentration von der Höhe der Einwaage an Paprikapulver (Tab. 16).

Die Ursache für diese Ergebnisse wurden in einer ungenügenden Anzahl an Verteilungsschritten bzw. zu hohen Probeneinwaagen und damit unvollständiger Verteilung gesehen.

Mögliche Lösungsansätze wären zum einen ein weiterer (4.) Verteilungsschritt, der aber eine Erhöhung des Endvolumens und unnötigen Verbrauch an Lösungsmittel und Probe zur Folge hätte. Zum anderen könnte weniger Probenmaterial eingesetzt werden.

<b>Pulver</b>	<b>Einwaage (g)</b>	<b>Capsaicinoidgehalt (mg/kg)</b>		
1	10	15,2		
	4	27,0		
	2	35,1	33,5	33,7
2	10	33,3		
	2	45,6	45,5	

Tab. 16: Capsaicinoidgehalte (mg/kg) zweier Pulver bei Aufarbeitung verschieden hoher Einwaagen an Probe

Zur Überprüfung der Vollständigkeit der flüssig-flüssig-Verteilung wurden deshalb unterschiedlich hohe Mengen an Proben (je 10, 5 und 2 g) aufgearbeitet. Die Capsaicinoidgehalte wurden nach drei Verteilungsschritten bestimmt. Anschließend wurde ein vierter Verteilungsschritt gegen 1 ml Acetonitril/Wasser (1:1; v+v) durchgeführt, um festzustellen, inwieweit sich noch Capsaicinoide in der Hexanphase befinden. Die Ergebnisse sind in *Tab. 17* dargestellt.

Proben- menge g	1.-3. Verteilung mg/kg	4. Verteilung mg/kg	Mittelwerte	
			1.-4. Verteilung mg/kg	% <sup>1</sup>
2	30,9	0,9	32,4	100
	32,2	0,9		
5	28,3	2,5	29,7	92
	26,6	2,0		
10	20,2	1,8	22,0	68
	20,2	1,8		

*Tab. 17: Capsaicinoidgehalte (mg/kg) desselben Pulvers nach Aufarbeitung unterschiedlicher Mengen an Probenmaterial mit der flüssig-flüssig-Verteilung*

<sup>1</sup> Prozentangaben relativ zum Capsaicinoidgehalt der 2-g-Einwaagen

Mit zunehmender Menge an Probe nimmt der ermittelte Capsaicinoidgehalt ab. Bei den 10 g-Einwaagen werden weniger als 70 % der Capsaicinoide verglichen mit den 2 g-Einwaagen erfaßt.

In *Tab. 18* ist neben dem Capsaicinoidgehalt die prozentuale Verteilung der Capsaicinoide dargestellt. Zur Veranschaulichung und der Übersichtlichkeit halber sind nur die 2 g- und 10 g-Probeneinwaagen aufgeführt.

Überwiegt bei den 2-g-Einwaagen bei der Nachextraktion DC gegenüber C, so ist dies bei den 10-g-Einwaagen genau umgekehrt. Dies spricht ebenfalls für eine unvollständige Extraktion. Da DC unpolarer als C ist, geht es weniger leicht von der unpolaren Hexanphase in die polare MeCN/Wasser-Phase über als C. Daher steigt die Konzentration von DC in der organischen Phase mit jedem Extraktionsschritt im Vergleich zu C an.

Durch diesen Versuch wird deutlich, daß bei der flüssig-flüssig-Verteilung von Pulvern die Probeneinwaage zu variieren ist, auch wenn die Gehalte in einer Doppelbestimmung gut übereinstimmen, da mit einem reproduzierbaren systematischen Fehler gerechnet werden muß.

Proben- menge: <b>2g</b>	Capsaicinoidgehalt (mg/kg)					Muster (%)		
		Gesamt	C	DC	NDC	C	DC	NDC
1. Ansatz	1.-3. Verteilung	30,9	14,6	12,7	3,5	47,4	41,2	11,4
	4. Verteilung	0,9 (2,8 %)	0,28 (0,91 %)	0,52 <b>(1,7 %)</b>	0,08 (0,26 %)	32,2	58,7	9,0
2. Ansatz	1.-3. Verteilung	32,2	15,1	13,4	3,7	46,9	41,5	11,6
	4. Verteilung	0,9 (2,7 %)	0,29 (0,90 %)	0,50 <b>(1,6 %)</b>	0,08 (0,25 %)	33,1	58,0	8,9

Proben- menge: <b>10g</b>	Capsaicinoidgehalt (mg/kg)					Muster (%)		
		Gesamt	C	DC	NDC	C	DC	NDC
1. Ansatz	1.-3. Verteilung	20,2	9,9	7,4	2,9	49,2	36,5	14,3
	4. Verteilung	1,8 (9,0 %)	0,82 <b>(4,1 %)</b>	0,72 (3,6 %)	0,27 (1,3 %)	45,2	40,1	14,7
2. Ansatz	1.-3. Verteilung	20,2	10,1	7,3	2,8	50,0	36,3	13,8
	4. Verteilung	1,8 (9,0 %)	0,82 <b>(4,1 %)</b>	0,73 (3,6 %)	0,27 (1,3 %)	45,2	40,2	14,7

Tab. 18: Einzelcapsaicinoidgehalte (mg/kg) und -muster bei der flüssig-flüssig-Verteilung eines Paprikapulvers zwischen 2 ml n-Hexan und 3 ml Acetonitril/Wasser (1+1, v+v); Prozentangaben relativ zur Summe aus 1.-3. Verteilungsschritt (die höchsten Werte jeweils fett gedruckt)

## 9.1.2 Oleoresine

Zur Bestimmung der Capsaicinoidgehalte in Oleoresinen wurden zwei Probenaufbereitungsverfahren angewandt. Dies waren zum einen die modifizierte flüssig-flüssig-Verteilung nach *Peusch*<sup>90</sup> und zum anderen die vereinfachte Aufarbeitung.

### 9.1.2.1 Flüssig-Flüssig-Verteilung

Da die Oleoresine bereits durch Extraktion mit unpolaren Lösungsmitteln oder überkritischem CO<sub>2</sub> aus getrockneten und zerkleinerten Paprikafrüchte gewonnen worden sind, wurden 0,5 g eines Paprika- und Chili-Oleoresins ohne Rückflußextraktion direkt zwischen 2 ml n-Hexan und 3 ml Acetonitril/Wasser (1+1; v+v) verteilt. Zur besseren Phasentrennung wurde zentrifugiert. Die wäßrige Phase wurde entnommen und der Vorgang noch insgesamt dreimal wiederholt. Die vereinigten wäßrigen Phasen wurden in einen 100 ml Meßkolben gesammelt und bis zur Marke mit MeCN/Wasser aufgefüllt. Nach Verdünnung (Chili-Oleoresin 1:40 und Paprika-Oleoresin 1:10) wurde ein Aliquot (Chili-Oleoresin 10 µl und Paprika-Oleoresin 20 µl) per HPLC analysiert.

Zur Überprüfung der Vollständigkeit der flüssig-flüssig-Verteilung wurde ein 5. Verteilungsschritt durchgeführt.

Wie aus *Tab. 19* ersichtlich, sind vier Verteilungsschritte sowohl beim milderen Paprika-Oleoresin wie auch beim sehr scharfen Chili-Oleoresin ausreichend. Durch einen 5. Verteilungsschritt können nur wenig mehr Capsaicinoide (1 bis 5 %) erfaßt werden. Wie bei den Pulvern (*9.1.1.2, S. 52*) ist dies wieder sehr gut an der C-DC-Verteilung sichtbar. Dihydrocapsaicin ist bei beiden Oleoresinen beim 5. Verteilungsschritt prozentual mehr vorhanden.



*Chili-Oleoresin*

	Capsaicinoidgehalt (mg/kg)				Muster (%)		
	Gesamt	C	DC	NDC	C	DC	NDC
1.-4. Verteilung	42816	22396	16227	4194	52,3	37,9	9,8
5. Verteilung	1523 (3,6 %)	546 (1,3 %)	876 <b>(2,1 %)</b>	102 (0,23 %)	35,8	57,5	6,7

*Paprika-Oleoresin*

	Capsaicinoidgehalt (mg/kg)				Muster (%)		
	Gesamt	C	DC	NDC	C	DC	NDC
1.-4. Verteilung	3837	2068	1501	267	53,9	39,1	7,0
5. Verteilung	26,4 (0,7 %)	7,7 (0,20 %)	17,6 <b>(0,46 %)</b>	1,1 (0,03 %)	29,3	66,6	4,1

Tab. 19: Capsaicinoidgehalte und -muster bei der flüssig-flüssig-Verteilung eines Chili- und Paprika-Oleoresins (0,5 g) zwischen 2 ml n-Hexan und 3 ml Acetonitril/Wasser (1+1, v+v); Prozentangaben in Klammern relativ zur Summe aus 1.-4. Verteilungsschritt (die höchsten Werte jeweils fett gedruckt)

An einigen industriell hergestellten Oleoresinen wurden mit dieser Methode Gehaltsbestimmungen vorgenommen (Tab. 20).

*Chili-Oleoresine*

Mittelwert (mg/kg)	Standardabweichung (mg/kg)	Variationskoeffizient %	n
8530	70	0,8	3
35767	1041	2,9	3
25533	945	3,7	3
45300	781	1,7	3

*Paprika-Oleoresine*

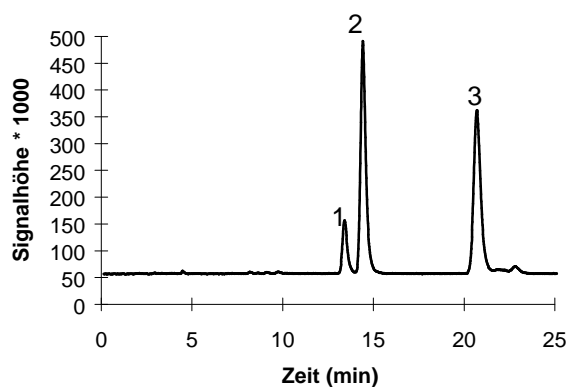
Mittelwert (mg/kg)	Standardabweichung (mg/kg)	Variationskoeffizient %	n
3750	70,7	1,9	2
160	2,1	1,3	2
116	0,6	0,5	3

Tab. 20: Capsaicinoidgehalte (mg/kg) industriell hergestellter Chili- und Paprika-Oleoresine nach der flüssig-flüssig-Verteilung aufgearbeitet

Die Methode liefert sowohl bei den sehr scharfen Chili-Oleoresinen wie bei den milderen Paprika-Oleoresinen gut reproduzierbare Ergebnisse.

Die Auswertung wird nicht durch Matrixeffekte gestört, wie den Chromatogrammen aus Abb. 27 zu entnehmen ist.

a) Chili-Oleoresin (35 767 mg/kg)



b) Paprika-Oleoresin (116 mg/kg)

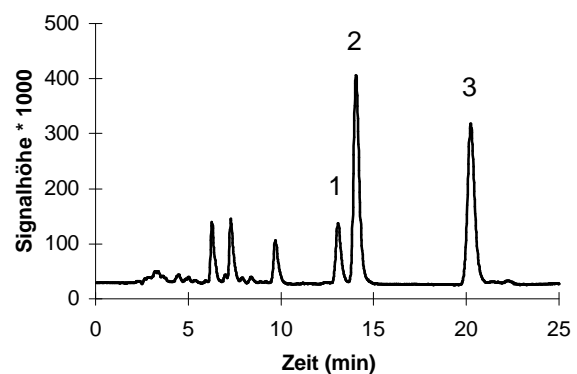


Abb. 27: Chromatogramme eines Chili-Oleoresins; 1:20 20  $\mu$ l (a) und eines Paprika-Oleoresins; 70  $\mu$ l (b); flüssig-flüssig-Verteilung

Peak Nr. 1: Nordihydrocapsaicin, 2: Capsaicin, 3: Dihydrocapsaicin

### 9.1.2.2 Vereinfachte Aufarbeitung

Bei der vereinfachten Aufarbeitung wurde 0,5 g Oleoresin mit 80 ml MeCN+H<sub>2</sub>O (1+1; v+v) für 2 Stunden unter Rückfluß extrahiert. Da es sich hierbei um ein 2-Phasen-Gemisch handelte, wurde nach dem Abkühlen in einen 100 ml Meßkolben filtriert. Der Filter wurde nachgewaschen und das Filtrat bis zur Marke mit dem Lösungsmittel aufgefüllt. Diese Lösung wurde vor der Injektion (20  $\mu$ l) in die HPLC 1: 10 verdünnt (Tab. 21).

Dasselbe Oleoresin wurde auch nach der flüssig-flüssig-Verteilung aufgearbeitet. Das Analyseergebnis ist zum Vergleich mit in *Tab. 21* aufgeführt.

<b>Methode</b>	<b>Mittelwert (mg/kg)</b>	<b>Standardabweichung (mg/kg)</b>	<b>Variationskoeffizient %</b>	<b>n</b>
Vereinfachte Aufarbeitung	8504	148	1,7	2
Flüssig-flüssig- Verteilung	8530	70	0,8	3

*Tab. 21: Vergleich der Capsaicinoidgehalte (mg/kg) eines Chili-Oleoresins erhalten durch die vereinfachte Aufarbeitung und durch die flüssig-flüssig-Verteilung*

Die Capsaicinoidgehalte beider Aufarbeitungen stimmen gut überein. Die Auswertung wird in beiden Fällen nicht durch Matrixbestandteile erschwert, so daß beide Methoden für die Scharfstoffbestimmungen in Oleoresinen geeignet sind.

Auf Basis der vereinfachten Aufarbeitung wurde vom DIN-Arbeitsausschuß „Gewürze und würzende Zutaten“ ein Ringversuch durchgeführt. Dazu wurde die Aufarbeitung geringfügig verändert. Beim Ringversuch wurden 5 g Oleoresin mit 40 ml MeCN+H<sub>2</sub>O (1+1; v+v) extrahiert. Nach dem Abkühlen und der vollständigen Phasentrennung wurde die Acetonitril/Wasser-Phase mit Hilfe einer Pipette abgesaugt und dadurch von aufschwimmenden und absitzenden Oleoresinbestandteilen abgetrennt und in einen 50 ml Meßkolben überführt. Mit MeCN+H<sub>2</sub>O (1+1; v+v) wurde bis zur Marke aufgefüllt, ggf. verdünnt und ein Aliquot in die HPLC injiziert.

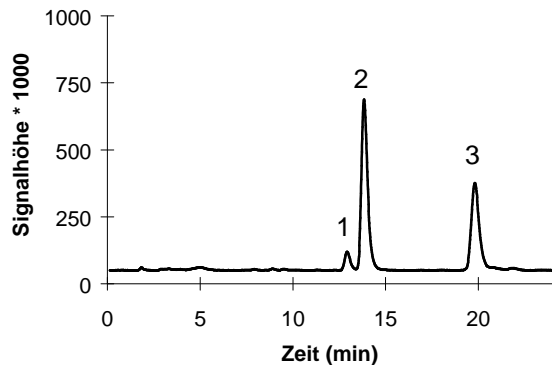
Die Ergebnisse von den an der Universität Wuppertal untersuchten Oleoresinen sind in *Tab. 22* aufgeführt.

<b>Mittelwert (mg/kg)</b>	<b>Standardabweichung (mg/kg)</b>	<b>Variationskoeffizient %</b>	<b>n</b>
27,6	1,5	5,4	6
33977	1499	4,4	5

*Tab. 22: Capsaicinoidgehalte (mg/kg) zweier Oleoresine nach der vereinfachten Aufarbeitung aufgearbeitet (Ringversuch)*

Die Ergebnisse sind ebenfalls gut reproduzierbar. Die Chromatogramme sind unabhängig vom Schärfegrad gut auswertbar (Abb. 28).

a) Chili-Oleoresin (33 977 mg/kg)



b) Paprika-Oleoresin (27,6 mg/kg)

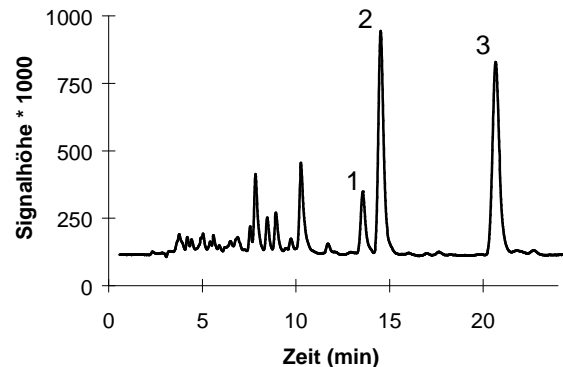


Abb. 28: Chromatogramme eines Chili-Oleoresins; 1:1000 70  $\mu$ l a) und eines Paprika-Oleoresins; 30 $\mu$ l b); vereinfachte Aufarbeitung (Ringversuch)

Peak Nr. 1: Nordihydrocapsaicin, 2: Capsaicin, 3: Dihydrocapsaicin

## 9.2 Methoden für die Gaschromatographie

### 9.2.1 Flüssig-Flüssig-Verteilung mit Ausschütteln

Ausgangspunkt war die von *Peusch* entwickelte Probenaufarbeitung von Pulvern für die HPLC.<sup>90</sup> Diese Probenaufarbeitung sollte möglichst beibehalten werden, so daß aus demselben Extrakt eine Capsaicinoidbestimmung sowohl per HPLC wie auch per GC möglich ist. Vorteilhaft wäre dabei einerseits die Bestimmung mit zwei völlig unterschiedlichen Trenn- und Detektionsmethoden und zum anderen der durch nur eine Aufarbeitung wesentlich geringere Arbeitsaufwand.

Bei der obigen Aufarbeitung liegen die Capsaicinoide in einem MeCN/Wasser-Extrakt vor. Der so erhaltene Probenextrakt ist für eine GC-Analyse nicht geeignet, da wasserhaltige Lösungen für die Trennsäule des GC nicht verwendet werden können. Außerdem kann Acetonitril als stickstoffhaltiges Lösungsmittel zu Problemen bei der Detektion mit dem NPD führen. Acetonitril kann jedoch für die HPLC-Bestimmung durch Methanol ersetzt werden. Um eine vergleichbare Elutionskraft wie die bisher verwendeten Acetonitril/Wasser-Mischungen zu erhalten, mußte der Wasseranteil abgesenkt und der Lösungsmittelanteil erhöht werden, so daß die flüssig-flüssig-Verteilung zwischen Hexan und einer

Methanol/Wasser-Mischung von (7+3; v+v) erfolgte. Der so erhaltene Extrakt konnte nun für die HPLC-Bestimmung und durch Weiterverarbeitung auch für die GC-Bestimmung verwendet werden, wobei 6 ml gesättigte Natriumchloridlösung zur besseren Phasentrennung zugesetzt und anschließend mit Cyclohexan (bzw. Diethylether) extrahiert wurde. Die gesammelten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und nach Zugabe von internem Standard (TRI) mit Cyclohexan (bzw. Diethylether) auf ein definiertes Volumen aufgefüllt.

Aufgearbeitet wurden Pulver verschiedener Schärfegrade (ein Rosenpaprikapulver, Einwaage: 2 g und zwei Edelsüß-Pulver, Einwaagen: je 7 g), um vor allem bei Pulvern mit geringen Capsaicinoidgehalten festzustellen, inwieweit mitextrahierte Substanzen die Auswertung erschweren.

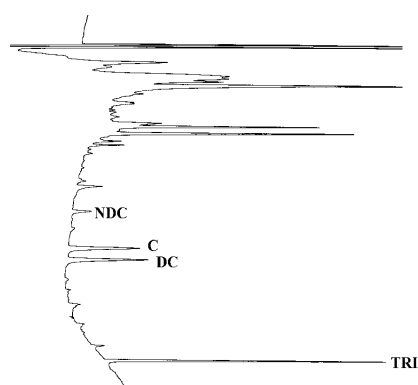
Wie erwartet, waren die Störungen bei einem Pulver geringerer Schärfe (Edelsüß-Pulver Nr. 1 und Nr. 2) größer als bei dem schärferem Pulver (Rosenpaprika), da in Relation zu den Capsaicinoiden mehr unerwünschte Substanzen mitextrahiert und coeluiert wurden.

Beim Ausschütteln mit Diethylether wurden außerdem wesentlich mehr unerwünschte Substanzen miterfaßt als mit Cyclohexan (*Abb. 29 bis Abb. 31*).

### Edelsüß-Paprikapulver Nr. 1

#### a) Cyclohexan

zur Verteilungschromatographie



#### b) Diethylether

zur Verteilungschromatographie

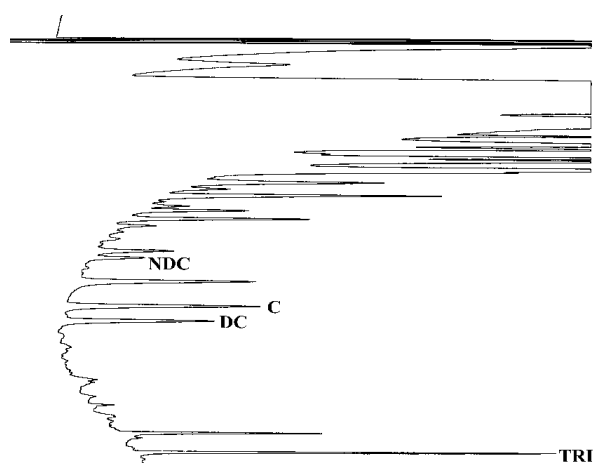


Abb. 29: Chromatogramme des per GC/NPD untersuchten Edelsüß-Paprikapulvers Nr. 1 ausgeschüttelt mit a) Cyclohexan b) Diethylether

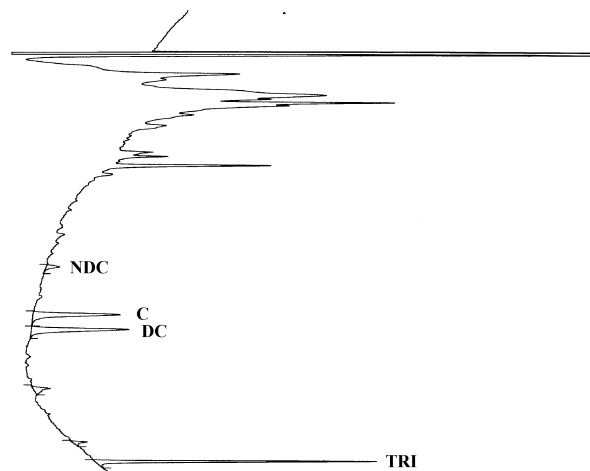
**Edelsüß-Paprikapulver Nr. 2***Cyclohexan zur Verteilungschromatographie*

Abb. 30: Chromatogramm des per GC/NPD untersuchten Edelsüß-Paprikapulvers Nr. 2 ausgeschüttelt mit Cyclohexan

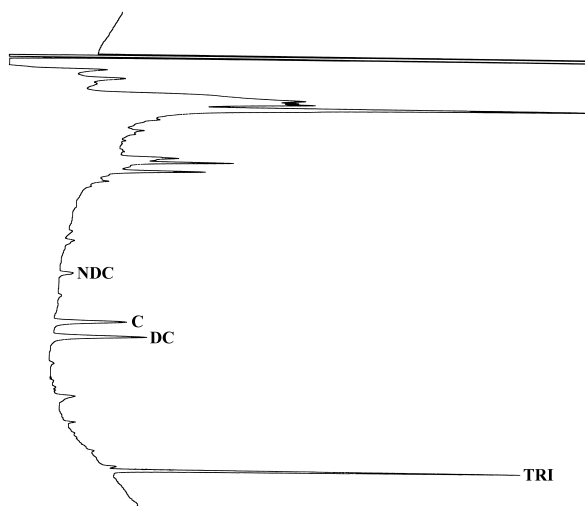
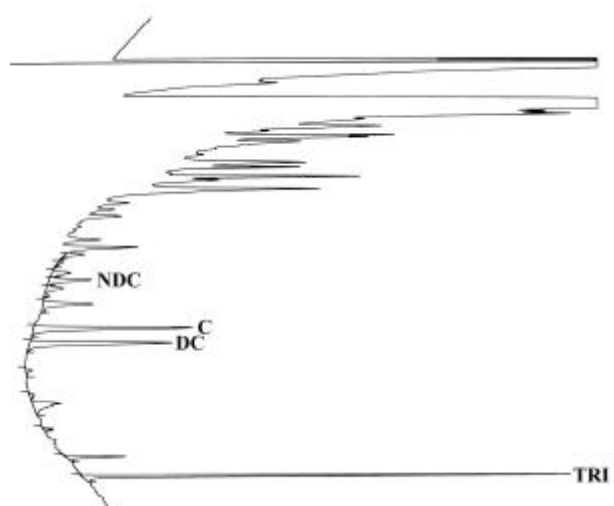
**Rosenpaprikapulver****a) Cyclohexan***zur Verteilungschromatographie***b) Diethylether***zur Verteilungschromatographie*

Abb. 31: Chromatogramme des per GC/NPD untersuchten Rosenpaprikapulvers ausgeschüttelt mit a) Cyclohexan b) Diethylether

In Tab. 23 sind die analysierten Capsaicinoidgehalte aufgeführt.

Probe	Lösungsmittel	Capsaicinoidgehalt (mg/kg)	C %	DC %	NDC %
Rosenpaprika	Cyclohexan	34,12	32	<b>45</b>	22
		28,16	39	<b>43</b>	18
	Diethylether	42,30	<b>43</b>	41	16
Edelsüß Nr. 1	Cyclohexan	11,79	41	<b>42</b>	17
		11,17	<b>42</b>	40	19
	Diethylether	15,79	<b>45</b>	27	18
Edelsüß Nr. 2	Cyclohexan	13,67	42	<b>45</b>	13
		10,03	41	<b>44</b>	16

Tab. 23: Vergleich der Capsaicinoidgehalte (mg/kg) der mit GC/NPD untersuchten Pulver nach Ethylacetatextraktion, flüssig-flüssig-Verteilung und anschließendem Ausschütteln mit Cyclohexan bzw. Diethylether mit prozentualer Verteilung der Hauptcapsaicinoide (höchster Wert fettgedruckt)

Der Capsaicinoidgehalt in den Proben, die mit Cyclohexan ausgeschüttelt wurden, ist niedriger als beim Ausschütteln mit Diethylether. Mit Cyclohexan werden im Vergleich zu Diethylether nur rund 73 % der Capsaicinoide erfaßt. Dies spricht für eine unvollständige Extraktion bei Verwendung von Cyclohexan, was ebenfalls anhand der prozentualen Verteilung der Capsaicinoide deutlich wird. Je nach Lösungsmittel ist einmal Capsaicin und zum anderen Mal Dihydrocapsaicin prozentual mehr vorhanden. Wird mit einem polareren Lösungsmittel (Diethylether) ausgeschüttelt, geht anteilig mehr Capsaicin in die organische Phase über und ist somit auch, im Vergleich zu DC, mehr vorhanden. Bei einem unpolaren Lösungsmittel, wie Cyclohexan, ist das Verhältnis umgekehrt, da Capsaicin als polare Komponente weniger leicht in die organische Phase übertritt. Hierbei müßte ggf. ein weiterer Verteilungsschritt eingeführt werden, wie es bei der Probenaufarbeitung für die HPLC von sehr scharfen Pulvern diskutiert wurde (9.1.1.2, S. 52).

Wegen der bei der Methodenentwicklung näher erläuterten Probleme, wurden keine weiteren Versuche zur Verbesserung der Probenaufarbeitung unternommen.

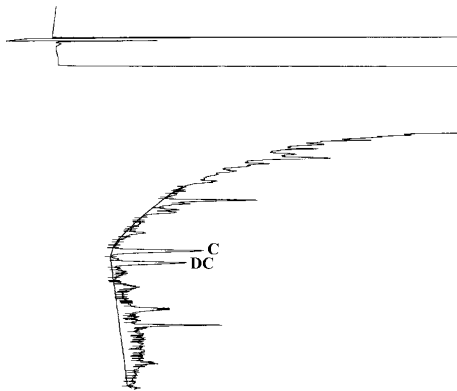
### 9.2.2 Vereinfachte Aufarbeitung (nur Extraktion)

Auch für die gaschromatographische Untersuchung wurde nach einer vereinfachten Probenaufarbeitung gesucht, um für scharfe Proben schnell den Capsaicinoidgehalt zu bestimmen. Um beide Aufarbeitungen besser miteinander vergleichen zu können,

d. h. um festzustellen, inwieweit Matrixeffekte eine Rolle spielen, wurde das bereits vorher nach der flüssig-flüssig-Verteilung mit Ausschütteln aufgearbeitete Rosenpaprikapulver verwendet (Abb. 31).

2 g Pulver wurden mit der 10fachen Menge Ethylacetat bzw. Methanol 2 Stunden unter Rückfluß gekocht. Nach dem Abkühlen wurde dekantiert und der Rückstand nachgewaschen. Der Extrakt wurde einrotiert, in einen 10 ml Meßkolben überführt und mit dem entsprechenden Lösungsmittel auf ein definiertes Volumen aufgefüllt.

**a) Methanol**  
zur Extraktion



**b) Ethylacetat**  
zur Extraktion

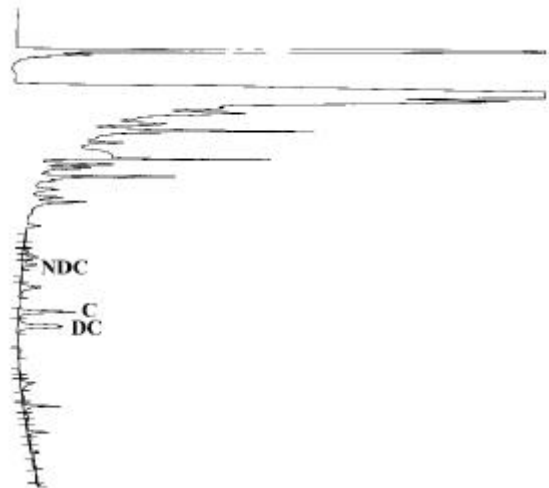


Abb. 32: Chromatogramme des per GC/NPD untersuchten Rosenpaprikapulvers, Extraktion mit a) Methanol b) Ethylacetat

Anhand der Chromatogramme ist zu erkennen, daß sehr viele Matrixbestandteile miterfaßt werden, so daß eine quantitative Auswertung dieser Probe wenig sinnvoll ist (Abb. 32).

Eine alleinige Extraktion ohne weitere Aufarbeitung wie sie bei der flüssig-flüssig-Verteilung mit anschließender Extraktion stattfindet, ist somit bei der gaschromatographischen Untersuchung, vor allem für milde Pulver, nicht ausreichend.



## 10 Untersuchung an frischen Früchten

### 10.1 Früchte aus dem Handel

Die Capsaicinoidstabilität sollte durch Lagerstudien an frischem Gewürzpaprika untersucht werden.

Bisher waren hauptsächlich Paprikapulver, also technologisch bearbeitetes Material, untersucht worden. Deshalb war es zunächst notwendig, eine geeignete Aufarbeitung für frische Früchte zu finden.

Nach Literaturangaben werden die frischen Früchte bis zur Aufarbeitung bzw. Analyse tiefgefroren (bei  $-20\text{ °C}$ )<sup>30</sup> oder auf wassergetränkten Baumwollwattebällchen gelagert und dabei gelegentlich umgedreht.<sup>39</sup> Dann werden sie in ihre Bestandteile zerlegt und anschließend mit Aceton extrahiert. Meistens wurden die Früchte allerdings vor der Analyse getrocknet, gemahlen und der Capsaicinoidgehalt in dem Pulver bestimmt.<sup>29, 30, 46</sup>

Da nicht bekannt war, welchen Einfluß bereits der Trocknungsvorgang auf den Capsaicinoidgehalt hat, mußten die frischen Früchte direkt aufgearbeitet werden. Dabei konnte nicht wie bei der Aufarbeitung von Pulvern vorgegangen werden, da frische Früchte einen wesentlich höheren Wassergehalt (ca. 90 %) als Pulver (Wassergehalt: ca. 10 %) aufweisen. Extrahiert wurden die frischen Früchte mit Methanol. Die zugesetzte Menge an Methanol wurde jeweils dem Wasseranteil der Früchte so angepaßt, daß das Methanol/Wasser-Verhältnis des fertigen Extraktes etwa 7:3 betrug (s. S. 66). Mit einer Methanol/Wasser-Mischung (7+3, v+v) wurde auf ein definiertes Volumen aufgefüllt. Das Verhältnis von Methanol zu Wasser von 7:3 wurde gewählt, damit die Probelösung möglichst hinsichtlich der Elutionskraft vergleichbar zusammengesetzt war wie der HPLC-Eluent (MeCN+H<sub>2</sub>O+Eisessig; 50+50+0,5; v+v+v). Wegen der höheren Toxizität und Kosten des Acetonitrils wurde sich gegen eine ebenfalls mögliche Acetonitril/Wasser-Extraktion entschieden.

Weiterhin war zu berücksichtigen, daß es sich bei Pulvern um sehr homogenes Probenmaterial handelt, bei dem leicht ein Aliquot entnommen und untersucht werden kann. Bei frischen Früchten sieht dies anders aus und muß dementsprechend berücksichtigt werden. Sie sind unterschiedlich groß, wiegen unterschiedlich viel und können verschiedene Capsaicinoidgehalte haben.

### 10.1.1 Heterogenität

Hinweise auf unterschiedliche Capsaicinoidgehalte in einzelnen Früchten derselben Einkaufscharge wurden bereits während der ersten Versuchsreihen erhalten. In weiteren Studien konnte die Heterogenität (s. dazu auch Anhang, *Tab. 48, S. 136* und *Tab. 49, S. 137*) bestätigt werden.

In ersten Experimenten wurden 300 g Paprikafrüchte (Einzelgewicht ca. 10 g) im Einzelhandel gekauft. Ein Teil dieser Früchte (104 g) wurde zu Schnitzeln zerkleinert. Von dieser Menge zerkleinerter Früchte wurden 8 Aliquote zu je 10 g aufgearbeitet. Die restlichen Früchte wurden in einer Plastiktüte im Kühlschrank (bei ca. 8 °C) gelagert. Am 6. Tag der Lagerung wurde wiederum aus einem Teil der noch verbliebenen Früchte (62 g) Schnitzel hergestellt. Hiervon wurden 9 Aliquote zu je 5 g auf ihren Capsaicinoidgehalt hin untersucht.

Dabei wurde einerseits festgestellt, daß die Capsaicinoidkonzentrationen zwischen den Aliquoten derselben Aufarbeitungstage gut beieinander lagen, wie die Standardabweichungen und Variationskoeffizienten belegen (*Tab. 24*). Andererseits waren die Scharfstoffkonzentrationen der Früchte vom Tag 0 wesentlich höher als am 6. Tag der Lagerung.

Tag	Capsaicinoidkonzentration (mg/kg)	Aliquote	Aufarbeitungs- menge je Probe (g)	Standard- abweichung (mg/kg)	VK %
0	265	8	10	8,1	3
6	147	9	5	18,8	13

*Tab. 24: Capsaicinoidgehalte (mg/kg Frischgewicht) frischer Früchte (Spanien) desselben Kaufs an unterschiedlichen Tagen aufgearbeitet, VK = Variationskoeffizient*

Aufgrund dieser Ergebnisse stellte sich nun die Frage, warum ein so großer Unterschied der Capsaicinoidkonzentrationen zwischen den beiden Aufarbeitungstagen gefunden wurde. Da die Gehalte am Tag 0 höher als am Tag 6 waren, konnte es sein, daß die Capsaicinoide bei der Lagerung abgebaut wurden. Weiterhin konnten dies allerdings auch „zufällige“ Ergebnisse sein, und zwar dann, wenn die Capsaicinoidgehalte innerhalb der ausgewählten Früchte stark variierten.

Um diesen Fragen nachzugehen, wurde eine größere Menge frischer Früchte (5 kg) gekauft. Um zu ermitteln, wieviele Früchte aufgearbeitet werden müssen, um ein für die Gesamtheit

repräsentatives Ergebnis der Scharfstoffkonzentration zu erhalten, wurden jeweils in einer Dreifachbestimmung je 5 und je 20 Früchte als Pool aufgearbeitet. Die Auswahl der Früchte erfolgte nach dem Zufallsprinzip, indem die Früchte in sechs Gruppen aufgeteilt und von diesen jeweils Früchte entnommen wurden. Obwohl die Einzelgewichte der Früchte von 9 g bis 21 g variierten, glichen sich diese Gewichtsunterschiede beim Gesamtgewicht der 5 bzw. 20 Früchte wieder aus (*Tab. 25*).

Zur Bestimmung der Scharfstoffkonzentration wurden die Früchte in 2-3 cm breite Stücke mit einem Skalpell geschnitten. Diese Stücke mit einem fruchteigenen Wassergehalt von ca. 70 ml bzw. 270 ml wurden mit einem Haushaltszerkleinerer (Moulinette) vorzerkleinert. Die Schnitzel wurden in einen Becher überführt, es wurde Methanol (70 ml bzw. 270 ml) zugegeben und weiter mit einem Ultraturaxstab zu einem Brei zerkleinert. Diese Mischung wurde 30 min stehengelassen, bevor das Lösungsmittel in einem Büchnertrichter unter Anlegen eines leichten Vakuums abgesaugt wurde. Der Filtrationsrückstand wurde mit 90 ml bzw. 350 ml Methanol nachgewaschen. Filtrat und Waschwasser wurden anschließend in einen Meßkolben überführt und auf ein definiertes Volumen (250 ml bzw. 1000 ml) mit Methanol/Wasser (7+3; v+v) aufgefüllt. Nach Verdünnung (1:100 bzw. 1:20) wurde ein Aliquot (50 µl bzw. 20 µl) per HPLC analysiert.

<b>5 Früchte, ca. 75 g</b> <b>Capsaicinoidkonz.</b> (mg/kg)	<b>20 Früchte, ca. 300 g</b> <b>Capsacinoidkonz.</b> (mg/kg)
168,9	196,1
155,0	248,8
252,3	227,3

*Tab. 25: Capsaicinoidgehalte (mg/kg Frischgewicht) von je 5 und 20 Früchten desselben Kaufs (Spanien)*

Betrachtet man die Capsaicinoidgehalte, so stellt man fest, daß diese auch bei vergleichbarem Gesamtgewicht der Aufarbeitung stark differieren. Dabei ist es unerheblich, ob 75 g aus fünf oder 300 g aus 20 Früchten aufgearbeitet wurden (*Tab. 25*). Erwartet worden war, daß Capsaicinoidgehalte ermittelt aus der Aufarbeitung von 20 Früchten weniger stark streuen und zuverlässig die Gesamtheit der Früchte charakterisieren.

Um festzustellen, ob die starken Streuungen daher resultieren, daß Anteile der Capsaicinoide nicht miterfasst wurden, wurde bei zwei Experimenten der Filtrerrückstand mit Ethylacetat 2 Stunden unter Rückfluß extrahiert. Nach Abdekantieren, Abziehen des Lösungsmittels und

dreimaliger flüssig-flüssig-Verteilung zwischen n-Hexan und Acetonitril-Wasser, wurde ein Aliquot per HPLC analysiert.

Capsaicinoidgehalte (mg/kg)		
Erstextrakt	Zweitextrakt	Gesamt
155,0	12,7	167,7
252,3	28,5	280,8

Tab. 26: Capsaicinoidgehalte (mg/kg Frischgewicht) aus Erst- und Zweitextrakt von je 5 Früchten

Rund 90 % der Capsaicinoide wurden im ersten Extraktionsschritt erfaßt (Tab. 26). Da durch die Zweitextraktion in beiden Fällen prozentual etwa gleich viel Capsaicinoid zusätzlich erfaßt wird, führt dies nicht zu einer geringeren Streuung der Capsaicinoidgehalte.

### 10.1.2 Fruchtfarbe und Capsaicinoidgehalt

Bei Untersuchungen einzelner, farblich besonders ausgewählter Früchte wurde keine Korrelation zwischen Fruchtfarbe und deren Capsaicinoidgehalt festgestellt.

Paprikafrüchte werden in der Regel grün gepflückt und reifen nach, wobei sich die rote Farbe bildet. Den zeitlichen Verlauf von Carotinoidgehalt und damit der roten Farbe und dem Capsaicinoidgehalt haben *Iwai et al.* beschrieben.<sup>30</sup> Sie stellten fest, daß der Chlorophyllgehalt, also die grüne Farbe, bis zu 30 Tagen nach der Blüte steigt und dann allmählich abnimmt. Der Carotinoidgehalt ist bis zu 40 Tagen nach der Blüte gering und steigt dann (etwa 50 Tage nach der Blüte) stark an. Die Capsaicinoide werden erst 20 Tage nach der Blüte detektiert, erreichen etwa 40 Tage nach der Blüte ihren maximalen Gehalt und nehmen dann zu dem Zeitpunkt, wenn der Carotinoidgehalt und damit die rote Farbe stark zunimmt, deutlich ab.

Die bisher untersuchten Früchte waren überwiegend rot, einige wiesen eine orange, orange-grüne oder grüne Farbe auf. Es stellte sich die Frage, ob es einen Zusammenhang zwischen der Farbe der Früchte und ihren Capsaicinoidgehalten gibt.

Dazu wurden acht einzelne, farblich charakterisierte Früchte aufgearbeitet (Tab. 27).

Fruchtfarbe	Capsaicinoidkonz. mg/kg	Muster %		
		C	DC	NDC
grün	205,5	47,2	42,6	10,2
	246,5	46,5	41,5	<b>12,0</b>
orange-grün	192,2	51,4	38,0	10,6
	<b>373,1</b>	49,6	41,9	8,4
orange	258,8	<b>45,5</b>	<b>42,7</b>	11,7
	<b>189,6</b>	58,7	32,8	8,5
rot	263,8	<b>62,8</b>	<b>31,3</b>	5,9
	287,3	61,7	33,0	<b>5,3</b>

Tab. 27: Capsaicinoidgehalte (mg/kg Frischgewicht) und -muster acht einzelner Früchte (Spanien) aus einer einzigen Handelspartie Gewürzpaprika (höchster und niedrigster Wert fettgedruckt)

Der höchste Gehalt wurde in einer orange-grünen, der niedrigste in einer orangenen Frucht festgestellt. Die grünen und roten Früchte lagen innerhalb diesen Bereiches von 190 bis 373 mg/kg. Diese Ergebnisse zeigen somit keine Korrelation zwischen der Farbe der Früchte und ihrem Capsaicinoidgehalt. Ein Zusammenhang zwischen Farbe und Capsaicinoidmuster oder zwischen Capsaicinoidgehalt und -muster ist ebenfalls nicht festzustellen.

### 10.1.3 Verteilung der Capsaicinoide auf einzelne Fruchtsegmente

Die große Variabilität der Capsaicinoidgehalte zeigt sich auch in einer Untersuchungsreihe, in der einzelne Früchte und Gemische von drei und fünf Früchten auf die Capsaicinoidkonzentrationen in den einzelnen Fruchtsegmenten (Samen, Fruchtwände, Scheidewände/Plazenta) untersucht wurden (Tab. 28).

Es wurden Früchte aus drei verschiedenen Handelspartien (A,B,C) aufgearbeitet. Die Früchte der Handelspartien A und B waren innerhalb derselben Handelspartie etwa gleich groß und schwer (A: je ca. 14 g bzw. B: je ca. 10 g). Die Früchte der Handelspartie C waren sehr unterschiedlich groß (Länge: 8-16 cm) und schwer. Hiervon wurden zwei einzelne besonders große Früchte (je ca. 52 g) und sechs kleinere, etwa gleich große Früchte (je ca. 24 g) ausgewählt.

Die Früchte wurden mit einem Skalpell in ihre Bestandteile zerlegt. Eine Trennung in Plazenta und Scheidewände war nicht möglich, da die Plazenta anders als bei der Gemüsepaprika direkt in die Scheidewände übergang, an der sich die Samen befanden.

Die Fruchtwände wurden in ca. 3 cm breite Stücke mit dem Skalpell geschnitten, mit dem Haushaltszerkleinerer zu Schnitzeln zerkleinert, mit 70 ml Methanol versetzt und mit dem Ultraturaxstab zu einer „Pülpe“ homogenisiert. Unter Anlegen eines leichten Vakuums wurde der unlösliche Rückstand mit Hilfe eines Büchner-Trichters abgenutscht. Der Filtrationsrückstand wurde mit 70 ml Methanol nachgewaschen. Filtrat und Waschwasser wurden in einen Meßkolben überführt und auf 200 ml mit Methanol/Wasser (7+3; v+v) aufgefüllt. Vor der Injektion in die HPLC wurde ggf. mit Methanol/Wasser (7+3; v+v) verdünnt (Handelspartie A, B: 1:50).

Die Samen wurden mit 20 ml Methanol versetzt und mit dem Ultraturaxstab homogenisiert. Anschließend wurde wie bei den Fruchtwänden beschrieben verfahren. Die Nachspülmenge des Filtrationsrückstandes betrug 15 ml und das Endvolumen 50 ml. Ggf. wurde vor der Injektion in die HPLC mit Methanol/Wasser (7+3; v+v) verdünnt (Handelspartie A,B: 1:10).

Die Scheidewände/Plazenten wurden zunächst nach Zugabe von 20 ml Methanol (Handelspartie A,B) bzw. 50 ml Methanol (Handelspartie C) mit einem Pürierstab vorzerkleinert, dann mit dem Ultraturaxstab homogenisiert. Anschließend wurde wie oben beschrieben verfahren. Die Nachspülmenge des Filtrationsrückstandes betrug 50 ml, das Endvolumen 100 ml bzw. 200 ml und die Verdünnung 1:100 bzw. 1:20.

Der Capsaicinoidgehalt in Samen lag zwischen 13 und 529 mg/kg, der von Fruchtwänden zwischen 0,7 und 66 mg/kg und der von Scheidewänden mit Plazenta zwischen 126 und 3489 mg/kg. Unter Berücksichtigung der Gewichtsanteile bedeutete dies folgende Verteilung des Gesamtcapsaicinoidgehaltes auf die einzelnen Segmente: Samen 6 %, Fruchtwände 6 % und Scheidewände/Plazenta 88 % (*Tab. 28*).

Die gepoolten Proben wurden vor der Erkenntnis der breiten Heterogenität des Capsaicinoidgehaltes in einzelnen Früchten aufgearbeitet. Die Ergebnisse belegen die naheliegenderweise Heterogenität auch bei den Segmenten von Früchten aus einer identischen Handelspartie (Handelspartie C), aus der zweimal je 3 Früchte bzw. zweimal je 1 Frucht aufgearbeitet wurden.

Anzahl der Früchte	Handelspartie	Gewicht g	Samen		Fruchtwände		Scheidewände/Plazenta										
			g	% <sup>2</sup>	mg/kg	mg/Probe	g	% <sup>2</sup>	mg/kg	mg/Probe							
5	A	72,0	7,1	9,9	140,6	1,0	6,2	56,8	78,9	29,8	1,7	10,5	6,4	8,9	2105,7	13,5	83,4
5	B	51,5	5,1	9,9	209,1	1,1	7,6	39,0	75,7	14,2	0,6	4,0	4,8	9,3	2577,4	12,4	88,4
5		50,2	4,3	8,6	305,4	1,3	5,6	37,6	74,9	40,5	1,5	6,5	5,9	11,8	<b>3488,6</b>	20,6	87,9
5		44,0	4,7	10,7	202,8	0,95	5,7	31,3	71,1	<b>66,4</b>	2,1	12,4	6,0	13,6	2285,2	13,7	81,9
3	C	73,1	2,3	3,1	96,4	0,2	2,0	60,1	82,2	4,6	0,3	2,4	6,5	8,9	1646,3	10,7	95,6
3		67,8	1,7	2,5	<b>529,3</b>	0,9	5,4	56,4	83,2	12,6	0,7	4,3	5,9	8,7	2560,3	15,1	90,4
1		51,8	2,3	4,4	122,4	0,3	8,5	41,1	79,3	2,1	0,09	2,6	5,5	10,6	536,6	3,0	88,9
1		52,5	3,1	5,9	<b>12,6</b>	0,04	4,7	40,4	77,0	<b>0,67</b>	0,03	3,3	6,1	11,6	<b>125,7</b>	0,8	92,1

Tab. 28: Verteilung der Capsaicinoide auf einzelne Fruchtsegmente (höchster und niedrigster Wert fettgedruckt) von Früchten aus drei Handelspartien (A, B, C) von frischem Gewürzpaprika (Herkunft Spanien)

<sup>1</sup> Anteil in % des Capsaicinoidgehaltes im betreffenden Fruchtsegment

<sup>2</sup> Gewichtsanteil in % des betreffenden Fruchtsegmentes am Gesamtgewicht der Frucht bzw. Früchte

### 10.1.4 Fruchthälften

Auch bei der Aufarbeitung von Fruchthälften zeigte sich die große Heterogenität des Scharfstoffgehaltes, wobei die Capsaicinoidkonzentrationen zugehöriger Hälften übereinstimmten.

Überprüft wurde, ob sich die Capsaicinoidgehalte und das -muster innerhalb einer Frucht, also in zwei zueinandergehörenden Fruchthälften stark unterscheiden. Zur Absicherung dieses Befundes wurden 30 Früchte aus demselben Kauf halbiert und in drei Gruppen von jeweils 10 Hälften (dies entspricht mengenmäßig etwa 5 ganzen Früchten) wie oben beschrieben (S. 66) aufgearbeitet.

Die Scharfstoffe werden in den Scheidewänden gebildet. Da pro Frucht jeweils zwei Scheidewände vorhanden waren, wurden die Früchte so halbiert, daß jede Hälfte eine Scheidewand (also eine „Produktionsstätte“) aufwies.

<i>Fruchthälften A</i>				<i>Fruchthälften B</i>			
<b>Capsaicinoid- gehalt mg/kg</b>	<b>Muster %</b>			<b>Capsaicinoid- gehalt mg/kg</b>	<b>Muster %</b>		
	<b>C</b>	<b>DC</b>	<b>NDC</b>		<b>C</b>	<b>DC</b>	<b>NDC</b>
159,0	60,3	33,9	5,8	165,9	59,5	34,7	5,7
212,5 (Zweitextrakt: 19,4)	57,2	37,0	5,8	219,5 (Zweitextrakt: 27,9)	57,0	37,0	6,0
234,6 (Zweitextrakt: 20,4)	56,5	37,1	6,4	240,4 (Zweitextrakt: 20,3)	55,5	38,1	6,4

*Tab. 29: Vergleich der Capsaicinoidgehalte (mg/kg Frischgewicht) und -muster zusammengehöriger Fruchthälften (A = Gemisch der einen 10 Hälften, B = Gemisch der anderen 10 Hälften), je 3 Experimente mit je 10 Früchten (Spanien)*

Auch hier variieren die Capsaicinoidkonzentrationen der drei separaten Aufarbeitungen stark (Tab. 29). Man kann jedoch feststellen, daß sich die Capsaicinoidkonzentrationen der zugehörigen Hälften (Gemisch A zu B) nur geringfügig unterscheiden. Ebenso verhält es sich mit dem Capsaicinoidmuster.



Durch eine Zweitextraktion werden prozentual etwa gleich viele Capsaicinoide zusätzlich erfaßt.

Die Methode Früchte „botanisch korrekt“ zu halbieren, führt zu reproduzierbaren Analyseergebnissen.

Da die Früchte per Hand mit Hilfe eines Skalpells halbiert werden, ist eine exakte Halbierung und entsprechend eine identische Verteilung des Capsaicinoidgehaltes auf beide Hälften nicht immer gegeben. Deshalb wurde die Mindestanzahl an Früchten festgestellt, die notwendig ist, damit die Scharfstoffgehalte beider Gruppen mit zufriedenstellender Präzision miteinander verglichen werden können.

Dazu wurden unterschiedlich viele Früchte halbiert, die Hälften in zwei Gruppen gepoolt untersucht und deren Capsaicinoidgehalt ermittelt (Tab. 30).

Anzahl Früchte	Frucht- Hälften <b>A</b>	Frucht- Hälften <b>B</b>	Standard- abweichung	Variations- koeffizient %	Proben- herkunft
2	223,6	285,8	44,0	17,3	Ägypten
	328,6	283,8	31,7	10,3	Ägypten
	179,7	176,4	2,3	1,3	Ägypten
5	268,8	256,9	8,4	3,2	Ägypten
	322,9	297,5	18,0	5,8	Ägypten
	222,8	252,8	21,2	8,9	Israel
8	93,4	88,5	3,5	3,8	Spanien
	116,8	129,6	9,1	7,8	Italien
	190,3	177,9	8,8	4,6	Italien
10	234,6	240,4	4,1	1,7	Spanien
	212,5	219,5	4,9	2,3	Spanien
	159,0	165,9	4,9	3,0	Spanien

Tab. 30: Capsaicinoidgehalte (mg/kg Frischgewicht) von jeweils zusammengehörigen Mischungen von Fruchthälften (A= Gemisch der einen Hälften, B= Gemisch der anderen Hälften), je 3 Experimente mit 2-10 Früchten

Korrespondierende Hälften von 10 Früchten wiesen eine sehr gute Übereinstimmung auf.

### 10.1.5 Fazit

Die Capsaicinoidkonzentrationen der Früchte eines einzigen Einkaufes, also einer Kiste Gewürzpaprika definierter Länderherkunft (Spanien) aus dem Einzelhandel, variieren unabhängig von der Fruchtfarbe in einem weiten Bereich von 154 bis 373 mg/kg Frischgewicht.

Bei der Untersuchung von Fruchtsegmenten ist die Spanne sogar noch größer.

Eine sorgfältig durchgeführte Zerteilung der Frucht in zwei korrespondierende Hälften ergibt vergleichbare Capsaicinoidgehalte.

Eine Lagerstudie mit ganzen Früchten für einen Vergleich über Abbauvorgänge ist wegen stark streuenden Anfangskonzentrationen der Capsaicinoide nicht sinnvoll, da wegen des Fehlens einer zuverlässigen Bezugsgröße keine Aussagen über eine Zu- oder Abnahme getroffen werden können. Bei einer Halbierung der Früchte stimmen die Capsaicinoidkonzentrationen der Hälften gut überein. Man kann dann aber nur zwei Werte miteinander vergleichen, braucht also für jedes Experiment in der Lagerstudie eine individuelle Aufarbeitung zum Zeitpunkt 0, für  $n$  Experimente  $2n$  Aufarbeitungen.

Es wurde nun nach einer Lösung gesucht, um mit weniger Arbeitsaufwand Lagerstudien durchführen zu können.

## 10.2 Lagerstudien an frischem Fruchtmaterial

Anhand von frischen Früchten in unzerkleinert und zerkleinert Form wurde die Stabilität der Capsaicinoide bei der Lagerung untersucht. Bei zerkleinerten Früchten (Schnitzel) wird ein Capsaicinoidabbau festgestellt. Bei unzerkleinerten Früchten (Hälften) kommt es dagegen nicht zu einem Abbau.

### 10.2.1 Schnitzel: Ermittlung der optimalen Aufarbeitungsmenge

Bei den Untersuchungen zur Probenvorbereitung von frischem Fruchtmaterial (10.1, S. 64) war festgestellt worden (Tab. 25, S. 66), daß eine Aufarbeitung von 300 g (20 Früchten) nicht zu einem zuverlässigen, repräsentativen Wert für eine Gesamtheit von 5 kg (ca. 300 Früchten) führt. Also muß man alle Früchte zerkleinern, die Schnitzel mischen und dann die Homogenität prüfen.

Um festzustellen, wieviel Material für einen repräsentativen Wert aufgearbeitet werden muß, wurden ca. 300 g Paprikaschnitzel hergestellt. Von diesen Schnitzeln wurden viermal je 2, 5, 8, 10 und 20 g eingewogen, mit 30 ml Methanol versetzt und mit einem Ultraturaxstab homogenisiert. Nach 30 min stehenlassen wurde das Lösungsmittel mit Hilfe eines Büchner-Trichters abgesaugt. Der Filtrationsrückstand wurde mit 30 ml Methanol nachgewaschen. Filtrat und Waschwasser wurden in einen 100 ml Meßkolben überführt und mit Methanol bis zur Marke aufgefüllt. Nach Verdünnung von 1:10 mit MeOH/H<sub>2</sub>O (7:3;v+v) wurde ein Aliquot per HPLC analysiert.

Hinsichtlich der Pflanzenbestandteile war das Probenmaterial aufgrund der durch den Haushaltszerkleinerer nur groben Vorzerkleinerung schlecht verteilt. Es kam also vor, daß bei einer Einwaage mehr Scheidewände, in der die Capsaicinoide gebildet werden, vorhanden waren als bei der nächsten. Dies sollte sich besonders gravierend bei den geringeren Einwaagen auswirken. Daher ist neben der Bestimmung der Capsaicinoidgehalte besonders die Standardabweichung bzw. der Variationskoeffizient als Maß für die Reproduzierbarkeit interessant.

Einwaage g	Capsaicinoidgehalt mg/kg	Standardabweichung mg/kg	Variationskoeffizient %
2	203,4	36,4	17,9
5	220,2	26,9	12,2
8	216,1	14,2	6,6
10	210,9	10,0	4,7
20	204,0	9,6	4,7

Tab. 31: Capsaicinoidgehalte (mg/kg Frischgewicht) verschieden großer Probeneinwaagen (Mittelwerte aus **Vierfach**-Bestimmungen) aus demselben Probenmaterial (Paprikaschnitzel)

Die Capsaicinoidgehalte streuen um den Mittelwert von 211 mg/kg unabhängig von der Größe der Einwaage. Es ist keine Tendenz festzustellen, daß die Extraktion bei der Aufarbeitung größerer Probenmengen unvollständig ist. Der Variationskoeffizient ist, wie erwartet, größer, je weniger Probenmaterial aufgearbeitet wird.

Die Aufarbeitung von weniger als 8 g ist nicht sinnvoll. Die Aufarbeitung von Mengen größer als 10 g ist aus Praktikabilitätsgründen ebenfalls nicht empfehlenswert. Somit sind Probeneinwaagen von 10 g-Aliquoten hinsichtlich Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und Handhabung am günstigsten.

Um festzustellen, welcher Anteil Capsaicinoide nicht miterfasst werden, wurden nochmals 10 g-Aliquote einer neuen Charge Schnitzel aufgearbeitet und die Filterrückstände erneut extrahiert. Dazu wurden die Rückstände für zwei Stunden mit Ethylacetat unter Rückfluß gekocht und weiter wie bei der flüssig-flüssig-Verteilung von Pulvern (9.1.1.2, S. 52) beschrieben aufgearbeitet.

Ansatz Nr.	Capsaicinoidgehalt		
	Erstextrakt mg/kg	Zweitextrakt mg/kg	%
1	241,4	7,1	2,9
2	243,2	11,5	4,7
3	245,0	6,4	2,6
4	243,3	9,3	3,8
<b>Mittelwert</b>	243,2		<b>3,4</b>

Tab. 32: Capsaicinoidgehalte (mg/kg Frischgewicht) der Extrakte von je 10 g-Paprikaschnitzel und ihrer nachextrahierten Filterrückstände

Durch Zweitextraktion können noch etwa 3,4 % Capsaicinoide zusätzlich erfaßt werden. Die Aufarbeitung von 10 g-Aliquoten aus einer größeren Probenmenge ist somit gut für Lagerstudien geeignet.

### 10.2.2 Lagerung zerkleinerter Früchte (Schnitzel)

Für die Lagerstudien wurden aus ca. 1 kg Früchten Paprikaschnitzel hergestellt, wovon insgesamt 78 Aliquote à 10 g eingewogen wurden. Pro Lagertag und Bedingung wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

Diese Aliquote wurden im Kühlschrank bei 1 °C, bei Raumtemperatur offen auf der Laborbank und im Laborschrank und in Wärmeschränken bei 37 °C und 80 °C gelagert. Diese Temperaturen wurden gewählt, weil der Einfluß der zur Pulverherstellung üblichen Trocknungsbedingungen auf den Capsaicinoidgehalt überprüft werden sollte. Die Früchte werden bei der Herstellung von Pulvern in der Sonne oder bei 60 - 80 °C getrocknet. Ein möglicher Einfluß von Licht auf die Scharfstoffstabilität sollte durch die Bedingungen Laborbank (Lagerung im Hellen) und Labor- bzw. Trockenschrank (Lagerung im Dunkeln) überprüft werden.

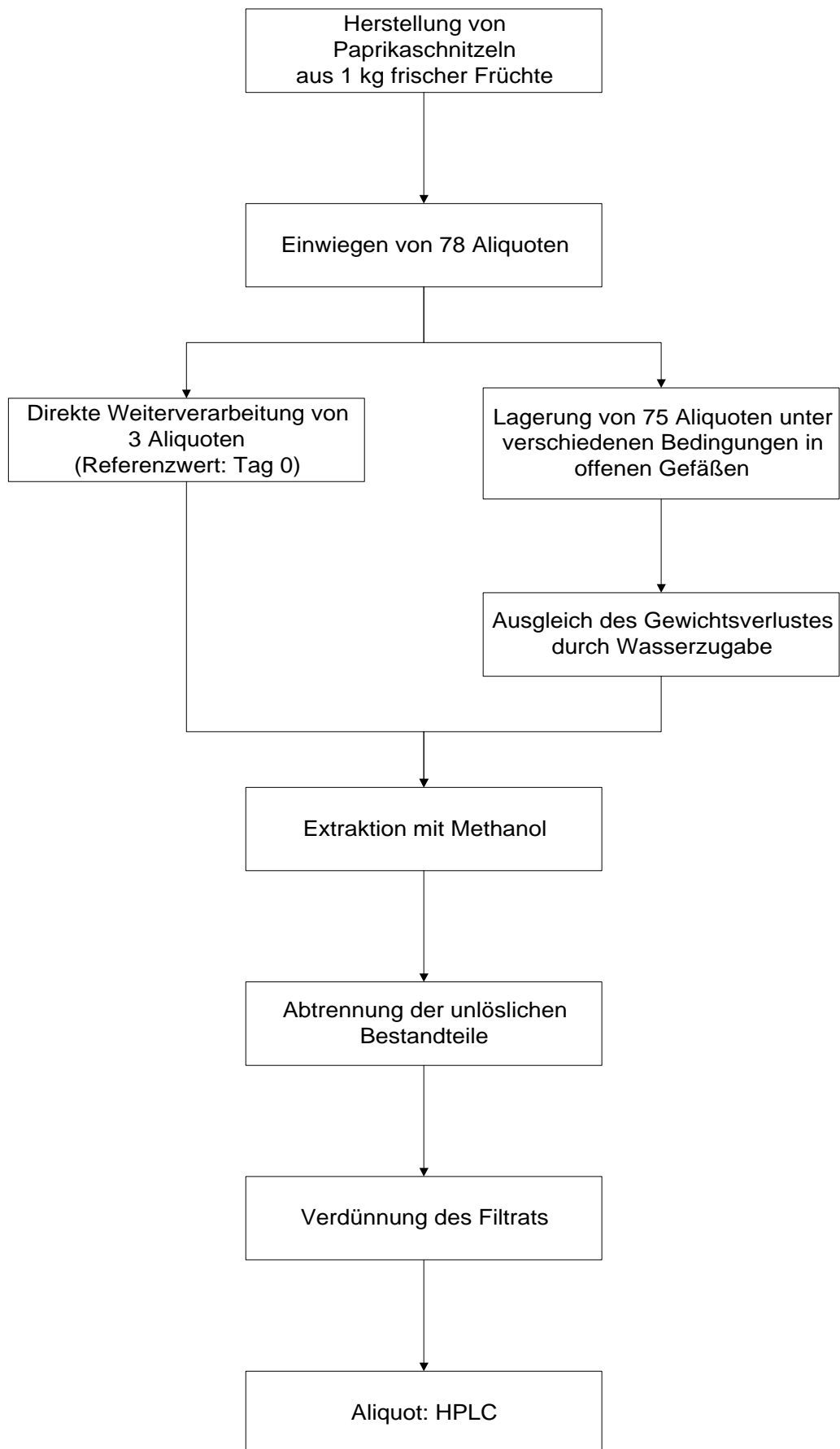


Abb. 33: Ablaufschema zur Lagerung von Schnitzeln

Aufgearbeitet wurde jeweils am Tag des Kaufes (Tag 0) sowie am 5., 8., 14., 21. und 28. Folgetag. Der Capsaicinoidgehalt wurde immer auf das am Tag 0 eingewogene Frischgewicht bezogen. Die Lagerung selbst erfolgte in einem offenen Probengefäß. Die Lagerung in geschlossenen Gefäßen war nicht möglich, da die Schnitzel dabei bereits nach einem Tag verschimmelten. Wegen der offenen Gefäße kam es auch gleichzeitig zur Trocknung, deshalb wurde der Gewichtsverlust vor der anschließenden Methanol-Extraktion durch entsprechende Zugabe von Wasser ausgeglichen, um immer gleiche Extraktionsbedingungen herzustellen. Nach der Methanol-Wasser-Extraktion wurde abgenutscht und das Filtrat vor der Injektion in die HPLC mit Methanol/Wasser (7+3; v+v) verdünnt (Abb. 33).

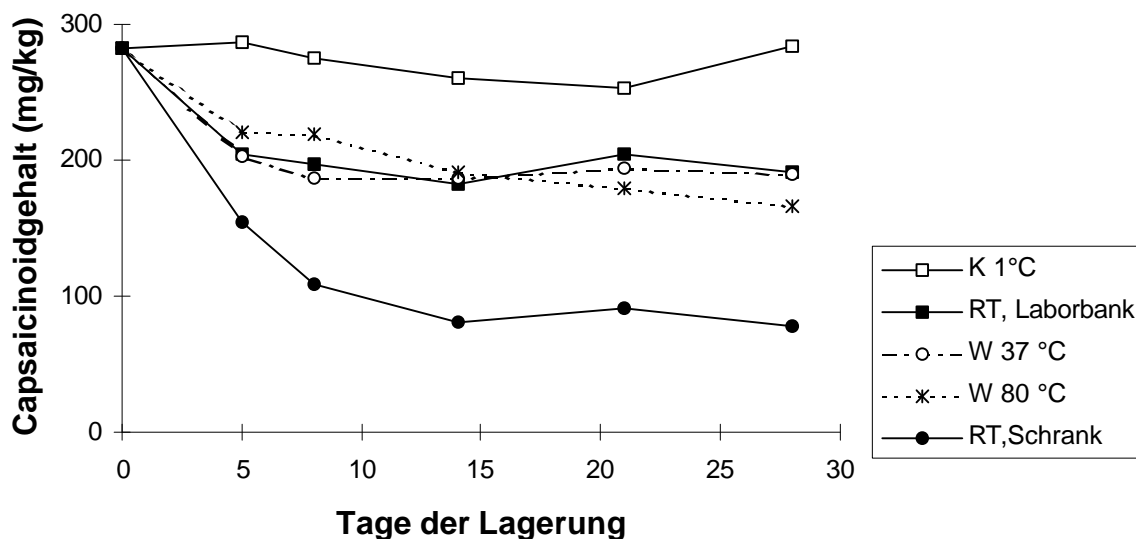


Abb. 34: Lagerung von Schnitzeln, Capsaicinoidgehalte in mg/kg Frischgewicht; Mittelwerte aus 3-fach Bestimmung (Jordanien); 1. Lagerstudie

K: Kühlschranks, RT: Raumtemperatur, W: Wärmeschranks

In Abb. 34 ist der Verlauf der Capsaicinoidgehalte bei der Lagerung dargestellt. Von fünf Kurven sind drei sehr ähnlich, so daß man nur von drei verschiedenen Kurvenverläufen sprechen kann. Und zwar von einem Kurvenverlauf, bei dem kaum ein Abbau festzustellen ist (Kühlschranks), von einer Kurve mit einer starken Abnahme der Capsaicinoidgehalte (Schrank, RT) und von einer Kurve, die eine „mittlere“ Capsaicinoidabnahme darstellt und bei drei unterschiedlichen Lagerbedingungen beobachtet wird: Laborbank (RT) und Wärmeschranks (37 °C und 80 °C).

Einen Zusammenhang zwischen dem Lichteinfluß und dem Capsaicinoidgehalt konnte nicht festgestellt werden, da für die drei Bedingungen: Laborbank, also Lagerung im Hellen, und Wärmeschränke, Lagerung im Dunkeln, fast identische Kurvenverläufe gemessen wurden. Die Kurvenverläufe bei Lagerungen im Laborschrank, RT und Kühlschrank, 1°C, beide Male im Dunkeln, weichen ab. Die Capsaicinoidgehalte nehmen in den ersten acht Tagen der Lagerung ab. Danach bleiben die Gehalte annähernd konstant. Der Abbau der Capsaicinoide ist am stärksten bei Raumtemperatur im Laborschrank.

Die Abnahme des Capsaicinoidgehaltes könnte mit der Geschwindigkeit des Wasserverlustes zusammenhängen.

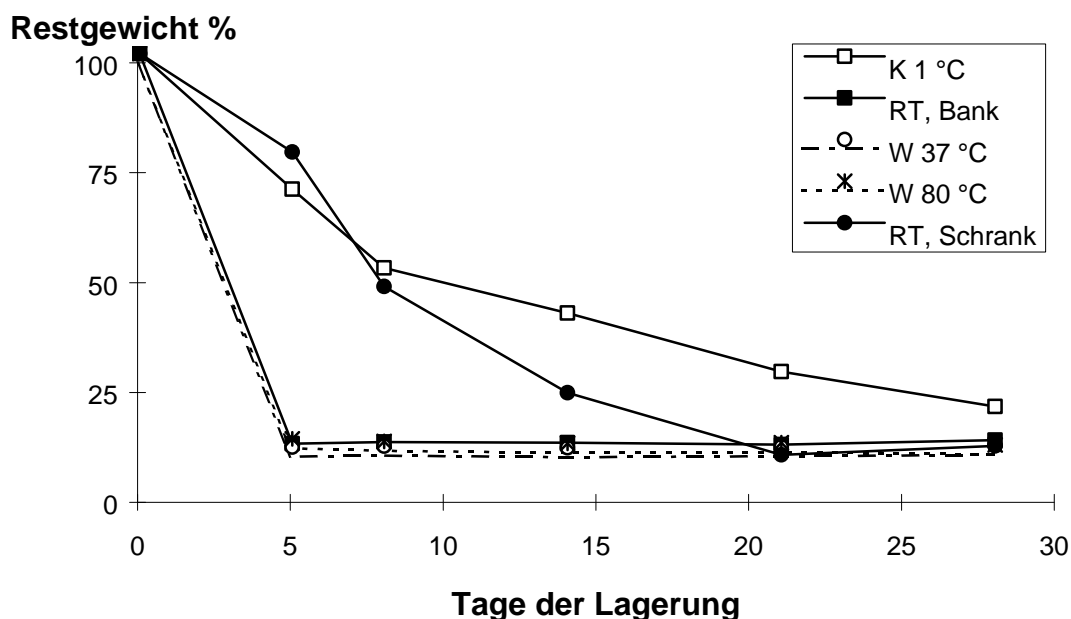


Abb. 35: Abnahme des Gewichts durch Wasserverlust (Mittelwert aus 3-fach Bestimmung) bei der Lagerung von Paprikaschnitzeln; 1. Lagerstudie

K: Kühlschrank, RT: Raumtemperatur, W: Wärmeschrank

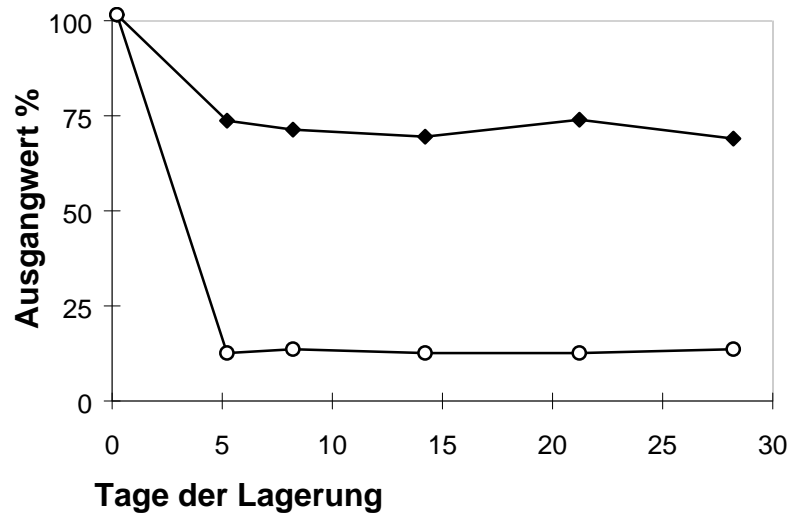
In Abb. 35 ist der zeitliche Verlauf des Wasserverlusts unter den fünf Lagerbedingungen dargestellt. Es sind wieder drei verschiedene Kurvenverläufe, wie bei den Capsaicinoidgehalten, zu erkennen. Die Wasserverluste bei den Bedingungen Laborbank (RT) und in den Wärmeschränken (37 °C und 80 °C) sind vergleichbar. In den ersten 5 Tagen kam es zu einem starken Wasserverlust, danach sind kaum Verluste zu verzeichnen.

Bei der Lagerung im Schrank, RT ist ein wesentlich langsamerer Gewichtsverlust zu beobachten. Hier ist erst nach etwa 20 Tagen soviel Wasser verloren gegangen wie bei den anderen drei Bedingungen.

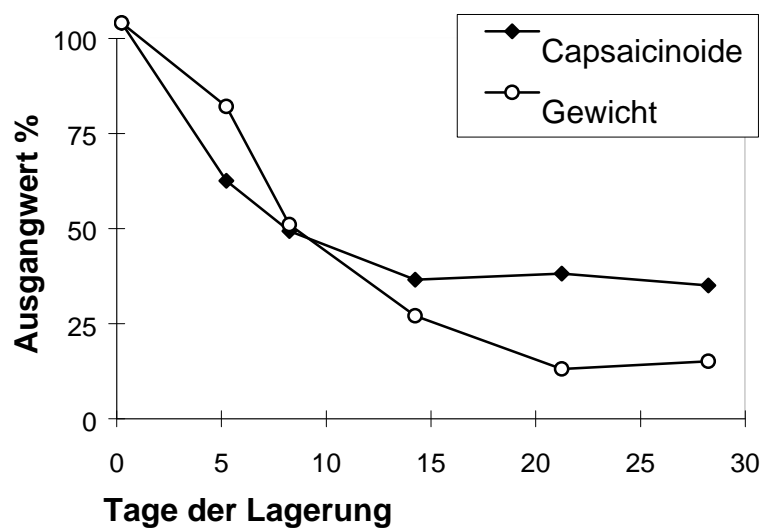
Bei der Kühlschranklagerung wird ein noch langsamerer Wasserverlust festgestellt.

Der Zusammenhang zwischen dem Capsaicinoidgehalt und der Abnahme des Gewichts durch Wasserverlust wird am deutlichsten bei der Lagerung bei Raumtemperatur, weswegen er in *Abb. 36* hervorgehoben wird.

### Raumtemperatur, Laborbank



### Raumtemperatur, Schrank



*Abb. 36: Zusammenhang zwischen Capsaicinoidgehalt und Geschwindigkeit des Wasserverlustes bei den Lagerbedingungen Bank und Schrank (jeweils bei Raumtemperatur); 1. Lagerstudie*

Die Lagerung auf der Laborbank, d. h. in einem großen offenen Raum, bedingt einen raschen Wasserverlust, dessen Auswirkung folgendermaßen diskutiert werden kann. Der  $a_w$ -Wert war



innerhalb von 5 Tagen so weit abgesunken, daß ein möglicher enzymatischer Abbau, z. B. durch Peroxidasen (3.6, S. 12), nicht mehr stattfinden konnte. Anders die Lagerung in einem kleinen geschlossenen Schrank, bei der eine langsamere Absenkung des  $a_w$ -Wertes erfolgte. Daher ist anzunehmen, daß das Enzym über einen längeren Zeitraum aktiv bleibt und deshalb ein größerer Anteil der Capsaicinoide abgebaut wird. Entsprechend niedriger sind die Capsaicinoidgehalte am Ende der Lagerstudie. Ca. 30 % des ursprünglichen Wertes sind hier nur noch vorhanden, im Gegensatz zur Lagerung im offenem Raum, bei dem noch ca. 70 % der Capsaicinoide nachgewiesen wurden.

Auf einen enzymatischen Abbau weist auch die wesentlich geringere Abnahme der Gehalte bei 1 °C Lagerung hin. Wegen der niedrigen Temperaturen sind enzymatische Reaktionen gehemmt.

Das Muster der Capsaicinoide veränderte sich bei dieser Lagerstudie nicht nennenswert. Es konnte kein Trend festgestellt werden, beispielhaft anhand der Lagerungen im Kühlschrank und Laborschrank dargestellt (Tab. 33).

#### a) Kühlschrank

Tag	% C	D %	% DC	D %	% NDC	D %
0	54,4		35,5		10,1	
5	54,4	0	35,5	0	10,1	0
8	54,8	0,4	35,5	0	9,7	-0,4
14	53,9	-0,5	36,2	0,7	9,9	-0,2
21	54,0	-0,4	36,0	0,5	10,0	-0,1
28	53,7	-0,7	36,2	0,7	10,1	0

#### b) Laborschrank

Tag	% C	D %	% DC	D %	% NDC	D %
0	54,4		35,5		10,1	
5	53,5	-0,9	37,7	2,2	8,8	-1,3
8	53,3	-1,1	38,3	2,8	8,4	-1,7
14	55,8	1,4	34,0	1,5	10,2	0,1
21	56,4	2,0	34,2	-1,3	9,4	-0,7
28	59,0	4,6	29,5	-6,0	11,5	1,4

Tab. 33: Capsaicinoidmuster in Prozent (Mittelwert aus 3fach Bestimmung) der gelagerten Schnitzel bei den Bedingungen: a) Kühlschrank b) Laborschrank; **D %** = %tualer Gehalt des Capsaicinoids am Lagertag - %tualer Gehalt des Capsaicinoids am Tag 0; 1. Lagerstudie

Bei einer 2. Lagerstudie von Schnitzeln konnte der oben beschriebene Abbau bestätigt werden (Abb. 37). Die Capsaicinoide wurden im Kühlschrank kaum abgebaut. Der Abbau auf der Laborbank betrug 70 % und die stärkste Abnahme bis zu 95 % war bei der Lagerung im Laborschrank zu beobachten.

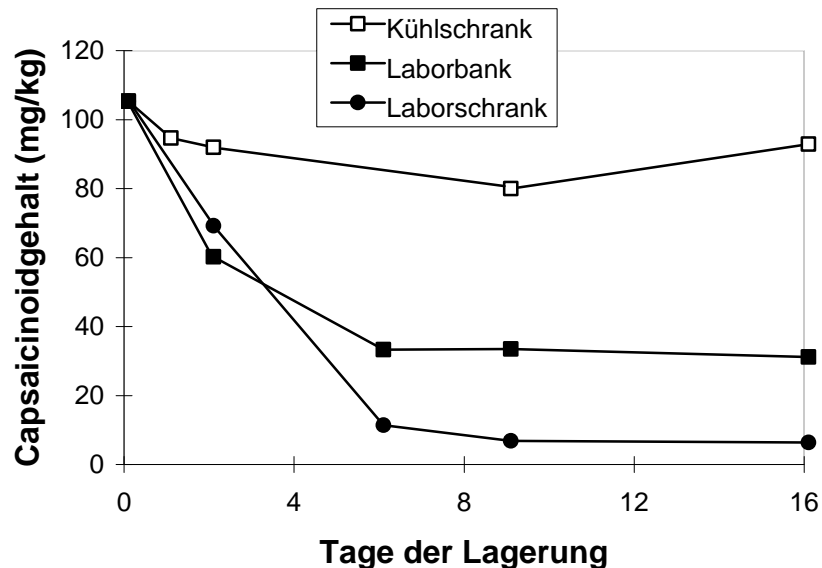


Abb. 37: Lagerung von Schnitzeln, Capsaicinoidgehalte in mg/kg Frischgewicht (Mittelwert aus 2fach Bestimmung); 2. Lagerstudie (Italien)

Bei Betrachtung des Capsaicinoidmusters wurde im Gegensatz zur 1. Studie bei der Lagerbedingung „Laborschrank“ eine Änderung festgestellt. Die prozentualen Anteile an Capsaicin nahmen während der Lagerdauer ab, während die prozentualen Anteile an Dihydrocapsaicin zunahmen (Tab. 34).

Tag	%C	D %	% DC	D %	% NDC	D %
0	68,4		24,5		7,2	
2	63,0	- 5,4	28,3	3,8	8,7	1,5
6	61,3	- 7,1	30,7	6,2	8,0	0,8
9	64,2	- 4,2	30,8	6,3	5,1	- 2,1
16	62,0	- 6,4	32,0	7,5	6,0	- 1,2

Tab. 34: Capsaicinoidmuster in Prozent (Mittelwert aus 3fach Bestimmung) der gelagerten Schnitzel bei der Bedingung: Laborschrank; **D %** = %tualer Gehalt des Capsaicinoids am Lagertag - %tualer Gehalt des Capsaicinoids am Tag 0; 2. Lagerstudie

### 10.2.3 Lagerung von Hälften

Für vergleichende Studien macht es keinen Sinn wegen der stark schwankenden Capsaicinoidgehalte, einzelne Früchte zu lagern. Durch Zerkleinerung kann zwar eine ausreichend homogene Mischung an Schnitzeln hergestellt werden, die eine repräsentative Probenahme von Aliquoten erlaubt. Bei der Zerkleinerung können allerdings enzymatische Prozesse ausgelöst werden, die in ganzen Früchten nicht vergleichbar ablaufen. Fruchthälften, die nur entlang des Schnittes und somit nur einem kleinen Teil der Frucht beschädigt werden, sollten für Vergleichsuntersuchungen prinzipiell geeignet sein. In Kapitel 10.1.4, S. 71 wurde gezeigt, daß für einen Pool von 10 Fruchthälften zuverlässig Capsaicinoidkonzentrationen bestimmt werden können. Dies führt jedoch bei einer größeren Studie schnell zu einer kaum mehr handhabbaren Gesamtprobenzahl, wenn Messreihen für mehrere Probenahmezeitpunkte und zudem in Parallelansätzen durchgeführt werden sollen. Als Kompromiß wurde deshalb die Halbierung und Aufarbeitung von fünf Früchten für die nachfolgend beschriebene Lagerstudie zur Feststellung der Capsaicinoidstabilität in Fruchthälften gewählt.

Da sich das Abbauverhalten der Capsaicinoide bei den Bedingungen: Wärmeschrank (37 °C und 80 °C) und Laborbank (RT) sehr ähnlich war, wurde bei der Lagerstudie mit Fruchthälften nur die Lagerung auf der Laborbank, offen bei RT gewählt. Daneben wurde im Kühlschrank, 1°C und im abgeschlossenen Laborschrank (RT) gelagert. Unter diesen drei Bedingungen verlief der Capsaicinoidabbau in zerkleinerten Früchten sehr unterschiedlich.

Die Lagerstudie wurde dann folgendermaßen durchgeführt:

Pro vorgesehenen Aufarbeitungstag (Lagertag) wurden je fünf Früchte halbiert. Zur Ermittlung des Referenzwertes wurden die ersten fünf Hälften direkt (d. h. am Tag 0) gepoolt als ein Batch A aufgearbeitet, die korrespondierenden fünf Hälften wurden ohne weitere Zerkleinerung unter den gewählten Bedingungen (Kühlschrank, Raumtemperatur: offener und geschlossener Raum) gelagert und dann wie unter der Schnitzzellagerung beschrieben gepoolt als Batch B aufgearbeitet. Es wurden zwei Lagerstudien durchgeführt (Probenserie a und b), so daß insgesamt 245 Früchte aufgearbeitet wurden.

Alle Capsaicinoidkonzentrationen wurden auf das ursprüngliche Frischgewicht der Gruppe aus fünf Hälften bezogen.

Aufgrund der stark variierenden Anfangscapsaicinoidkonzentration der Früchte und somit auch der Referenzwerte am Tag 0 war es sinnvoller, die Ergebnisse der gelagerten Proben nicht in absoluten Werten sondern über die prozentuale Abweichung gegenüber dem Bezugsgemisch anzugeben. Der Capsaicinoidgehalt der zu Beginn des Experiments aufgearbeiteten Referenzhälften (Batch A) wurde deshalb gleich 100 Prozent gesetzt und der Gehalt der später aufgearbeiteten, dazugehörenden Hälften (Batch B) dazu ins Verhältnis gesetzt (*Abb. 38*).

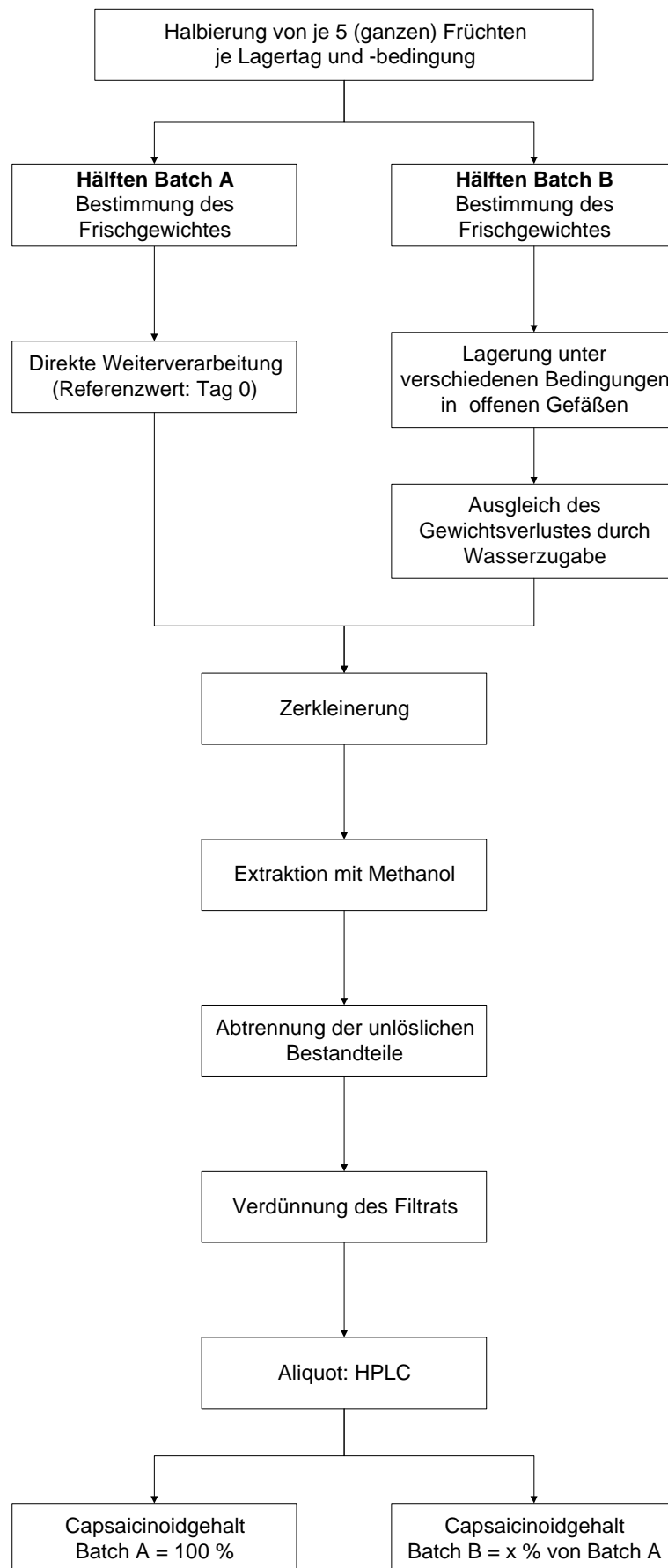


Abb. 38: Ablaufschema für die Lagerung von Hälften

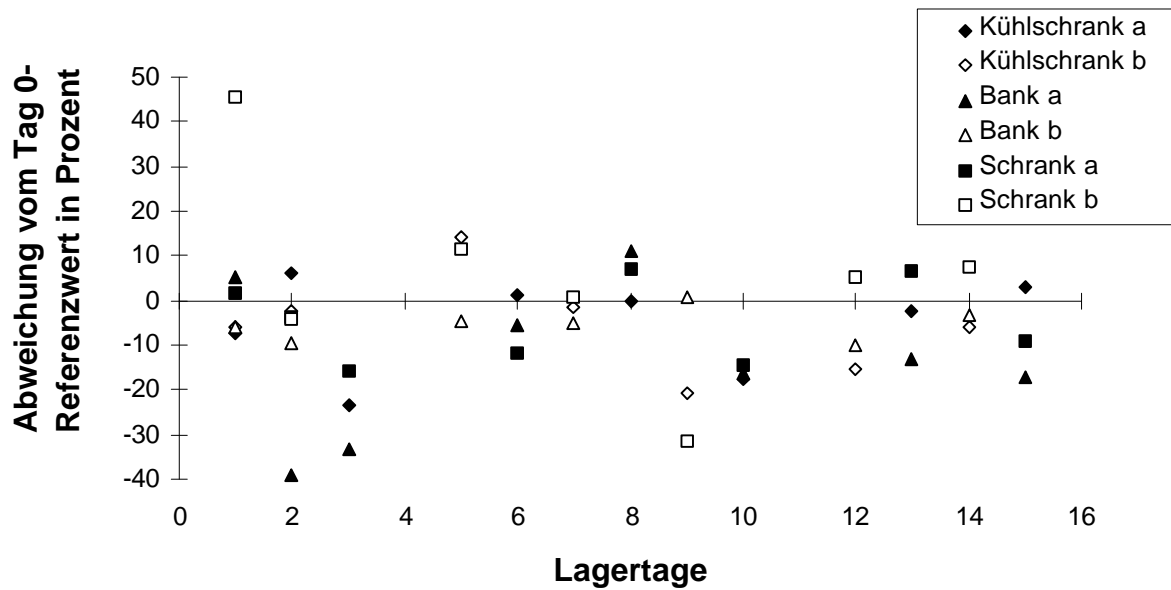


Abb. 39: Lagerung von Hälften, Abweichung im Capsaicinoidgehalt vom Tag 0-Referenzwert in Prozent (Holland)

Man erkennt aus der Darstellung in Abb. 39, daß bei keiner der Lagerbedingungen ein Trend der Capsaicinoidgehalte festzustellen ist. Die dreifache Standardabweichung beträgt 32,1 mg/kg und der dreifache Variationskoeffizient 14,5 %. Von 45 Analyseergebnissen befinden sich 34 innerhalb diesen Bereiches, was einem prozentualen Anteil von über 75 % entspricht. Bei den restlichen 11 starken Abweichungen handelt es sich um zufällige Ergebnisse.

In Fruchthälften findet kein Abbau von Capsaicinoiden statt.

#### 10.2.4 Vergleich der Capsaicinoidstabilität in halbierten und geschnitzelten Früchten

In der folgenden Lagerstudie wurden nicht weiter zerkleinerte Fruchthälften (Batch A) mit zerkleinertem Material (Schnitzel aus Batch B) verglichen, um zu überprüfen, ob es durch die Zerkleinerung der Früchte zu einem Abbau der Scharfstoffe kommt.

In der vorhergehenden Studie (10.2.3) war gezeigt worden, daß es bei den Fruchthälften nicht zu einem Abbau kommt. Deren Capsaicinoidgehalt wurde jeweils als stabil bleibender Referenzwert gleich 100 % gesetzt.

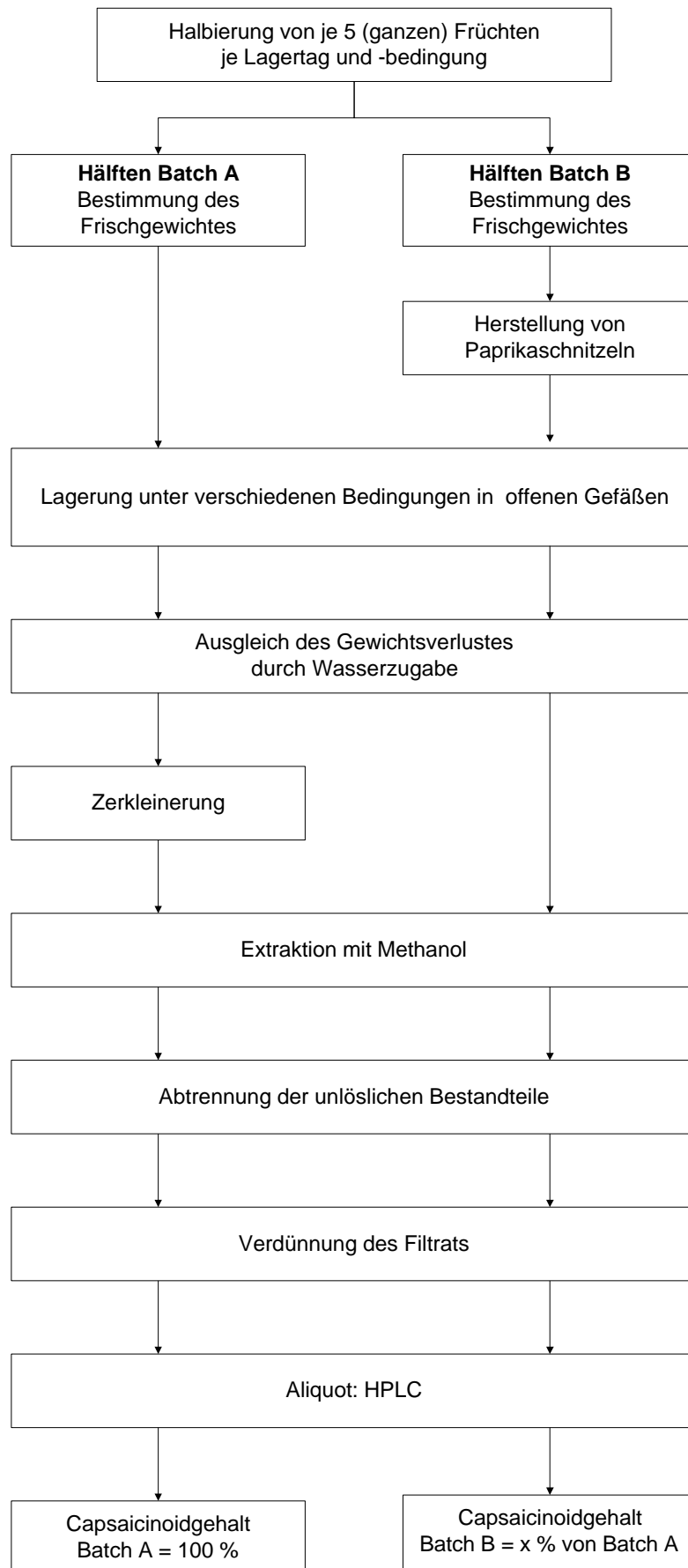


Abb. 40: Ablaufschema für die Lagerung von halbierten und geschnitzelten Früchten

Es wurden für zwei in Doppelbestimmung angesetzte Untersuchungsreihen für jeden der 7 Meßzeitpunkte je fünf Früchte halbiert (Gesamtzahl  $n = 140$ ). Die einen Mischungen von jeweils 5 Hälften (Batch A) wurden ohne weitere Behandlung gelagert (im Kühlschrank bzw. Laborschrank, RT, jeweils in offenen Probengefäßen). Die anderen, jeweils zugehörigen Hälftenmischungen (Batch B) wurden zu Schnitzeln verarbeitet und unter denselben Bedingungen wie die Hälften (Batch A) gelagert (Abb. 40).

Berechnet wurde die prozentuale Abnahme des Capsaicinoidgehaltes der Schnitzel (Batch B) bezogen auf den Capsaicinoidgehalt der jeweils zugehörigen Hälften (Batch A), deren Abbau gleich Null gesetzt wurde. Die in Abb. 41 gezeigten Meßpunkte geben somit die in Relation zu den halbierten Früchten erhaltenen relativen Werte für den Capsaicinoidgehalt in den Schnitzeln wieder.

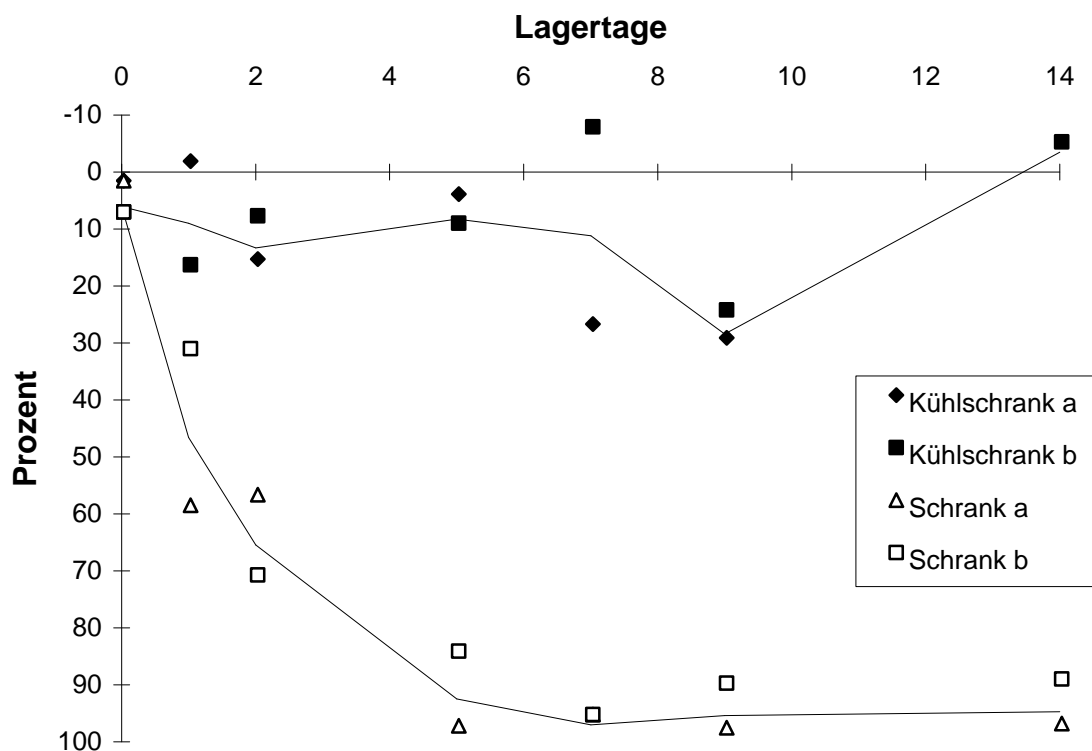


Abb. 41: Gleichzeitige Lagerung halbiert und geschnittener Früchte, Abnahme des Capsaicinoidgehalts der Schnitzel bezogen auf den Gehalt der zugehörigen Hälften (Kurvenverlauf: Mittelwerte aus den beiden parallel angesetzten Untersuchungsreihen a und b)

Erst durch die Zerkleinerung der Früchte kommt es bei der Lagerung im Laborschrank zu einem Abbau, während bei der Lagerung im Kühlschrank kaum ein Abbau festzustellen ist (*Abb. 41*). Diese Studie bestätigt die Ergebnisse der Lagerstudie mit Aliquoten aus einem großen Batch von Schnitzeln (*10.2.2, S. 75*).

Vergleicht man das Capsaicinoidmuster der gelagerten Schnitzel mit denen der zugehörigen, ebenfalls gelagerten Hälften bei der Lagerbedingung „Kühlschrank“, so stellt man fest, daß sich dieses ebenso wie der Gesamtcapsaicinoidgehalt nicht geändert hat (*Tab. 35*). Es findet somit keine nennenswerte Änderung des Musters statt.

Tag	% C	% DC	% NDC		Probenserie
0	66,0	25,0	9,0	Hälften	a
	66,7	24,2	9,1	Schnitzel	
	67,4	24,7	7,9	Hälften	b
	66,2	25,7	8,1	Schnitzel	
1	68,2	24,1	7,7	Hälften	a
	68,6	24,0	7,4	Schnitzel	
	65,0	27,1	7,9	Hälften	b
	65,5	26,8	7,8	Schnitzel	
2	64,6	26,7	8,8	Hälften	a
	65,7	27,0	7,3	Schnitzel	
	67,5	26,1	6,4	Hälften	b
	65,4	27,9	6,8	Schnitzel	
5	69,8	23,8	6,4	Hälften	a
	68,5	24,8	6,7	Schnitzel	
	69,4	24,0	6,6	Hälften	b
	70,2	23,6	6,2	Schnitzel	
7	68,6	24,4	7,0	Hälften	a
	71,0	22,9	6,0	Schnitzel	
	66,1	27,2	6,6	Hälften	b
	66,4	27,7	6,0	Schnitzel	

*Tab. 35: Capsaicinoidmuster der im Kühlschrank gelagerten Schnitzel und ihrer zugehörigen Hälftenmischungen*



Anders sieht es aus bei der Lagerung im Laborschrank, RT. Hierbei verändern sich die prozentualen Anteile der Hauptcapsaicinoide untereinander. Der Anteil an Capsaicin nimmt bei den Schnitzeln im Vergleich zu den Hälften ab, während die Anteile an Dihydrocapsaicin zunehmen (Tab. 36).

Tag	% C	D %	% DC	D %	% NDC	D %	Probenserie
0	66,0		25,0		9,0		Hälften a
	66,7		24,2		9,1		Schnitzel
	67,4		24,7		7,9		Hälften b
	66,2		25,7		8,1		Schnitzel
1	66,8		24,5		8,8		Hälften a
	57,0	- 9,8	31,1	+ 6,6	11,9	+ 3,1	Schnitzel
	67,5		25,2		7,4		Hälften b
	64,3	- 3,2	28,2	+ 3,0	7,5	+ 0,1	Schnitzel
2	71,0		23,0		5,9		Hälften a
	68,6	- 2,4	26,6	+ 3,6	4,8	- 1,1	Schnitzel
	69,9		22,7		7,4		Hälften b
	67,1	- 2,8	27,0	+ 4,3	5,9	- 1,5	Schnitzel
5	65,7		26,7		7,6		Hälften a
	60,8	- 4,9	34,3	+ 7,6	4,9	- 2,7	Schnitzel
7	68,2		24,0		7,9		Hälften a
	62,1	- 6,1	28,9	+ 4,9	9,0	+ 1,1	Schnitzel
	72,4		20,9		6,8		Hälften b
	60,7	-11,7	28,4	+ 7,5	10,9	+ 4,1	Schnitzel

Tab. 36: Capsaicinoidmuster der bei RT im Laborschrank gelagerten Schnitzel und ihrer zugehörigen Hälften

### 10.3 Früchte aus Gewächshausanbau

Die folgenden Ergebnisse bestätigen die Untersuchungen an im Handel gekauftem Material. Sie zeigen deutlich, daß sich die Capsacinoidgehalte einzelner Früchte stark voneinander unterscheiden, auch wenn sie unter denselben Bedingungen angebaut und unter identischen Bedingungen bis zur Aufarbeitung aufbewahrt werden.

In den zuvor beschriebenen Studien wurde bereits festgestellt, daß die Capsaicinoidkonzentrationen einzelner Früchte desselben Kaufes stark variierten. Hierbei war jedoch die genaue Herkunft und Geschichte der Früchte unbekannt: von wieviel Feldern, Sträuchern stammten die Früchte? Welche Zeit verging zwischen Ernte und Vermarktung und wie sahen die Transport- und Lagerbedingungen aus? Um hier detaillierte Angaben zu haben, wurde im Gewächshaus von April bis September 1999 Gewürzpaprika (*Capsicum annuum*; Pfeffer de Cayenne G974, Partiennummer 18G85St, Egesa Gießen) angebaut. Von drei Sträuchern wurden in unterschiedlichen Zeitabständen nach der Blüte Früchte geerntet, kühl gelagert und innerhalb weniger Tage einzeln aufgearbeitet.

Die Frucht wurde zur Analyse mit einem Skalpell in kleine Stücke geschnitten, in einen Plastikzentrifugenbecher mit 30 ml Methanol gegeben und mit dem Ultraturax zu einer „Pülpe“ zerkleinert. Nach Abspülen des Ultraturaxstabes, wurde diese Mischung 30 min stehengelassen, bevor sie mit Hilfe eines Büchner-Trichters unter Anlegen eines leichten Vakuums abgenutscht wurde. Der Filtrationsrückstand wurde mit 30 ml Methanol nachgewaschen. Filtrat und Waschwasser wurden anschließend in einen 100 ml Meßkolben überführt und mit Methanol bis zur Marke aufgefüllt. Vor der Injektion in die HPLC wurde mit einer Methanol-Wasser-Mischung (7+3; v+v) 1:10 verdünnt.

In *Tab. 37* sind die Capsaicinoidgehalte der Paprika des Strauches Nr. 1 aufgelistet. Alle Früchte waren von ähnlicher Größe (Länge: ca. 12 cm, Durchmesser: ca. 1 cm) und Gewicht (3-5,5 g), sind 14 Tage nach der Blüte in grünem Zustand geerntet worden, lagen bis zur Aufarbeitung zwei Tage im Kühlschrank (in ein feuchtes Tuch eingewickelt) und stammten alle vom äußeren Teil des Strauches. Es wurden insgesamt 16 grüne Früchte geerntet. Interessant war, daß bei 5 Früchten im Kühlschrank eine Nachreifung stattgefunden hatte, so daß ein Teil der ursprünglich grünen Früchte rot wurde.

6 Früchte dieser Ernte (je 3 grüne und 3 rote) wurden willkürlich ausgewählt und einzeln auf ihren Capsaicinoidgehalt hin untersucht.

Es zeigte sich, daß die Capsaicinoidkonzentrationen der einzelnen Früchte über einen großen Bereich (von 217 bis 632 mg/kg) trotz enger Verwandtschaft (gemeinsamer Herkunft von nur einem Strauch, nur äußere Früchte, dasselbe Alter) variierten.

Betrachtet man das Capsaicinoidmuster, so stellt man fest, daß auch dieses variiert. Zwischen Capsaicinoidmuster und Gesamtcapsaicinoidgehalt läßt sich keine Korrelation feststellen (*Tab. 37*).

Es zeigte sich auch kein Zusammenhang zwischen der Farbe der Früchte und deren Scharfstoffgehalt. Sortiert man die Früchte nach Farben und betrachtet dann das

Capsaicinoidmuster, so ist auch hier keine Übereinstimmung festzustellen. Die Farbe der Früchte lassen somit auch keinen Rückschluß auf das Muster zu.

Frucht	Farbe	Capsaicinoid- gehalt mg/kg	C %	DC %	NDC %	Konzentrationsverhältnisse		
						C/DC	DC/NDC	C/NDC
1	grün	<b>631,8</b>	54,3	33,8	11,9	1,60	2,84	4,56
2	grün	<b>217,3</b>	58,9	<b>31,4</b>	9,8	1,88	3,20	6,01
3	grün	564,1	<b>59,2</b>	<b>31,4</b>	<b>9,4</b>	1,89	3,34	6,30
4	rot	583,4	48,4	35,2	<b>16,5</b>	1,34	2,31	2,93
5	rot	562,4	54,9	33,0	12,2	1,66	2,70	4,50
6	rot	449,9	<b>47,8</b>	<b>37,0</b>	15,2	1,29	2,43	3,14

Tab. 37: Capsaicinoidgehalte (mg/kg Frischgewicht) und -muster einzelner Früchte des Strauches Nr. 1, 14 Tage nach der Blüte; niedrigster und höchster Wert fettgedruckt

Diese Ergebnisse wurden an Früchten von zwei weiteren Sträuchern (*Capsicum annuum*) bestätigt (Tab. 38).

Strauch	Fruchtfarbe	Capsaicinoidgehalt mg/kg	C %	DC %	NDC %
1	grün	285,2	48,0	36,8	15,2
	rot	302,0	52,6	<b>32,9</b>	14,5
	rot	383,2	51,5	35,8	12,7
	grün	426,7	52,7	35,9	<b>11,4</b>
2	rot	371,7	48,8	36,1	15,0
	grün	389,2	50,6	36,8	12,5
	rot	402,4	52,8	34,5	12,8
	grün	<b>606,5</b>	<b>53,9</b>	34,2	11,9
3	grün	<b>269,2</b>	<b>37,2</b>	<b>40,6</b>	<b>22,2</b>
	rot	336,8	42,9	38,3	18,8
	grün	365,4	46,8	37,8	15,4
	rot	435,1	47,7	34,8	17,5

Tab. 38: Capsaicinoidgehalte und -muster von 12 einzelnen Früchten dreier verschiedener Sträucher, 20-25 Tage nach der Blüte geerntet, sortiert nach Strauch und aufsteigendem Capsaicinoidgehalt, niedrigster und höchster Wert fettgedruckt

### 10.3.1 Capsaicinoidgehalte während Fruchtentwicklung und -reife

Der in der Literatur (3.5, S. 9) beschriebene Verlauf der Capsaicinoidkonzentration mit maximalem Wert und Abnahme abhängig von der Fruchtreife konnte nicht bestätigt werden.

Abb. 42 zeigt die Resultate für den Gesamtcapsaicinoidgehalt von 38 Einzelfrüchten, die zwischen Tag 14 und 66 nach der Blüte von drei unter gleichen Bedingungen gehaltenen *Capsicum annuum*-Sträuchern geerntet wurden. Die Büsche blühten ein zweites Mal im September. Auch von dieser sogenannten „Nachblüte“ wurden Früchte entnommen und auf ihren Capsaicinoidgehalt hin untersucht. Mit Konzentrationen zwischen etwa 200 mg/kg und 800 mg/kg zeigte sich eine von der Farbe der Früchte unabhängige, recht große Spannbreite.

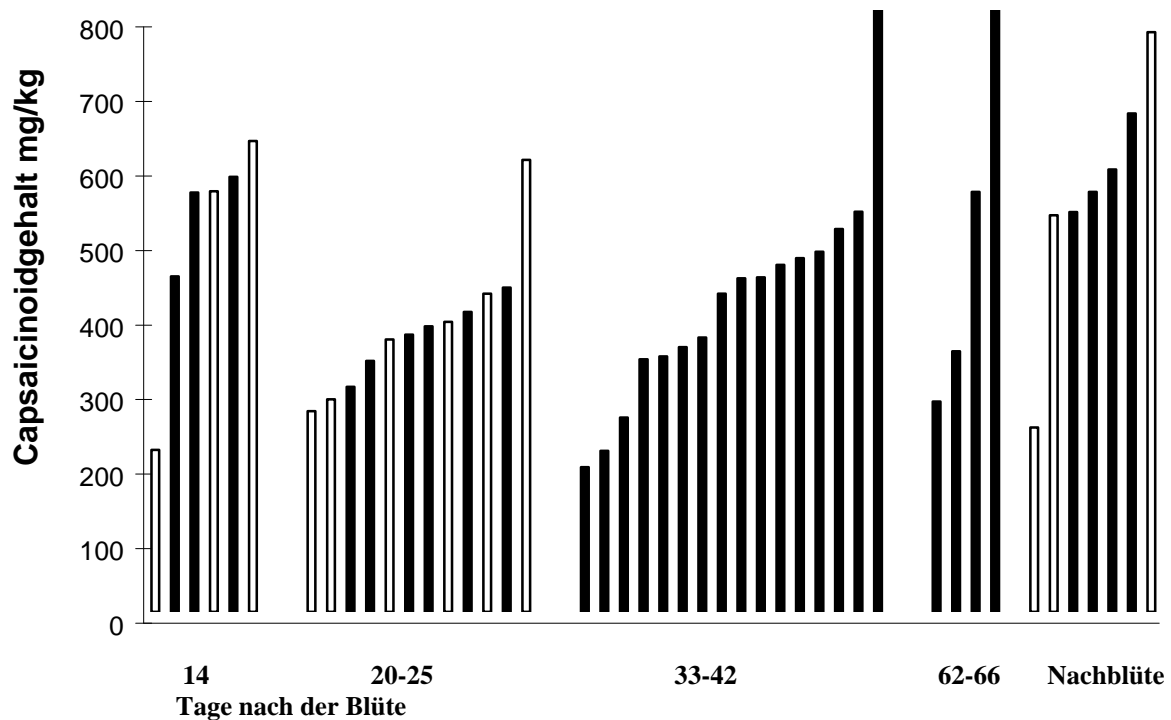


Abb. 42: Capsaicinoidgehalte (mg/kg Frischgewicht) einzelner Früchte, 3 Sträucher, sortiert nach aufsteigendem Gehalt

weiße Balken: grüne Früchte, schwarze Balken: rote Früchte

Der Chlorophyllgehalt, also die grüne Farbe der Früchte nimmt mit zunehmender Reife der Früchte ab. Gleichzeitig steigt mit zunehmendem Alter der Früchte der Carotinoidgehalt, also die rote Farbe.<sup>30</sup> Aus diesem Grund sind die Früchte von 33 bis 66 Tagen nach der Blüte alle rot.

Die prozentualen Anteile der Capsaicinoide variierten für C von 37 - 59 %, für DC von 30 - 42 % und für NDC von 9 - 22 % (Einzelwerte: *Tab. 37, Tab. 38 und Tab. 50, S. 138*).

Von diesen insgesamt 45 Extrakten wurden von 25 Extrakten (willkürlich ausgewählt) neben den Hauptcapsaicinoiden C, DC und NDC auch Minorcapsaicinoide bestimmt (Einzelwerte: *Tab. 51, S. 139*). Die Schwankungsbreiten für die dabei analysierten Capsaicinoide sind in *Tab. 39* aufgeführt.

Capsaicinoid	%
C	36 - 50
DC	30 - 37
NDC	11 - 18
HomoC	1,7 - 3,2
DSVA	1,0 - 2,5
HomoDC I	0,5 - 1,6
HomoDC II	2,9 - 4,6

*Tab. 39: Muster (in Prozent) der Haupt- und Minorcapsaicinoide einzelner, willkürlich ausgewählter Früchte*

## 11 Sorten- und Herkunftszuordnung bei Paprikapulvern

### 11.1 Ungarische und marokkanische Paprikapulver

Am Beispiel ungarischer und marokkanischer Paprikapulver jeweils der Handelssorten Rosen- und Edelsüßpaprika aus den Erntejahrgängen 1996, 1998 und 1999 sollte geprüft werden, ob sich einzelne Inhaltsstoffe als Authentizitätsparameter für Länderherkunft oder Sortenzugehörigkeit eignen.

Tab. 40 gibt eine Übersicht über die analysierten Paprikapulverproben, die von der TU München (Prof. Dr. Schieberle) bezogen wurden.

#### Ernte 1996

Land	Handelsbezeichnung	Farbqualität	Aussehen
Marokko, Meknes	Edelsüß	rot	klumpiges Pulver
Marokko, Beni Mellal	Edelsüß	rot	klumpiges Pulver

#### Ernte 1998

Land	Handelsbezeichnung	Farbqualität	Aussehen
Ungarn, Sifok	Rosen	hellrot	sehr fein gemahlene Pulver
Ungarn, Sifok	Edelsüß	hellrot	sehr fein gemahlene Pulver
Ungarn, Sifok Frische Früchte 6 Monate bei RT in München getrocknet und gemahlen	(keine Handelsbezeichnung)	hellrot	fein gemahlene Pulver
Marokko, Beni Mellal	Edelsüß	rot	klumpiges Pulver
Marokko, Meknes	Edelsüß	rot	klumpiges Pulver
Marokko, Meknes	Rosen	rot	grobes Pulver (Paprika-Chips)

**Ernte 1999**

<b>Land</b>	<b>Handelsbezeichnung</b>	<b>Farbqualität</b>	<b>Aussehen</b>
<i>Ungarn, Sifok</i>	Rosen	hellrot	sehr fein gemahlene Pulver
<i>Ungarn, Sifok</i>	Edelsüß	hellrot	sehr fein gemahlene Pulver
<i>Marokko, Meknes</i>	Rosen	rot	klumpiges Pulver

*Tab. 40: Übersicht über die von der TU München (Prof. Dr. Schieberle) bezogenen Paprikapulverproben der Erntejahrgänge 1996, 1998 und 1999*

Zur Bestimmung der Capsaicinoidkonzentration wurden die Proben nach der flüssig-flüssig-Verteilung nach Ethylacetatextraktion aufgearbeitet und ein Aliquot, ggf. nach entsprechender Verdünnung, in die HPLC injiziert.

Zur Ermittlung der ASTA-Farbwerte wurden 100 mg Pulver in einen 100 ml Meßkolben eingewogen und mit Aceton bis zur Marke aufgefüllt und umgeschüttelt. Nach Stehenlassen von 16 Stunden im Dunkeln wurden die Extinktionen der Lösungen bei 460 nm photometrisch bestimmt.<sup>69</sup>

In *Tab. 41* sind die Ergebnisse über die an der BUGH Wuppertal auf Capsaicinoide und Farbcharakteristika (Herr Riegel, FB 9, Textilchemie) sowie in Kooperation mit der Universität Jena (Dr. Böhm) auf Carotinoide untersuchten Proben des Jahrgangs 1998 zusammengestellt.

Die Untersuchungsergebnisse der Pulver der Jahrgänge 1996 und 1999 sind in *Tab. 42* aufgeführt.

Die Ergebnisse werden in *Kapitel 12.4, S. 110* diskutiert.

**Ernte 1998**

Pulver	Capsaicinoide				Farbwerte				Carotinoide (mg/100 g)			
	Gehalt mg/kg	C %	DC %	NDC %	ASTA	L*	a*	b*	Cap	Zea	β- Caro	β- Cryp
<i>Ungarn</i> Sifok Rosen	807,3	46,1	42,6	11,4	63	47,77	37,47	48,11	26,9	7,0	8,9	3,5
<i>Ungarn</i> Sifok Edelsüß	4,7	50,2	39,2	10,7	160	41,17	36,97	38,15	68,7	32,1	25,6	11,2
<i>Ungarn</i> Sifok in München getrocknet und gemahlen	< 0,3				187	nicht bestimmt			nicht bestimmt			
<i>Marokko</i> Beni Mellal Edelsüß	32,5	46,8	42,9	10,3	49	42,56 <sup>1</sup>	31,66 <sup>1</sup>	40,90 <sup>1</sup>	19,0	8,2	5,1	3,3
<i>Marokko</i> Meknes Edelsüß	43,0	46,0	42,9	11,0	94	31,52 42,45 <sup>1</sup>	32,41 34,47 <sup>1</sup>	28,26 42,29 <sup>1</sup>	41,6	14,6	14,9	8,5
<i>Marokko</i> Meknes Rosen	250,3	48,2	39,8	11,9	36	30,94	22,77	24,29	13,1	5,1	1,7	1,7

<sup>1)</sup> nach Entfernung von äußerlichem Fett (Meknes-Proben dreifach höherer Fettgehalt als Sifok-Proben)

Tab. 41: Zusammenstellung der Ergebnisse (Mittelwerte) der Paprikapulver des Jahrgangs 1998; Cap: Capsanthin, Zea: Zeaxanthin, **b-Caro**: **b-Carotin**, **b-Cryp**: **b-Cryptoxanthin**

**Ernte 1996**

Pulver	Capsaicinoide				Farbwert
	Gesamtgehalt mg/kg	C %	DC %	NDC %	ASTA
<i>Marokko</i> Beni Mellal Edelsüß	17,2	52,0	37,6	10,5	n. b.
<i>Marokko</i> Meknes Edelsüß	38,7	49,2	40,7	10,2	n. b.

**Ernte 1999**

Pulver	Capsaicinoide				Farbwert
	Gesamtgehalt mg/kg	C %	DC %	NDC %	ASTA
<i>Ungarn</i> Sifok Rosen	702,7	39,9	45,5	14,5	48
<i>Ungarn</i> Sifok Edelsüß	1,1	48,9	39,5	11,7	87
<i>Marokko</i> Meknes Rosen	122,0	46,7	41,3	12,0	49

Tab. 42: Zusammenstellung der Ergebnisse (Mittelwerte) der Paprikapulver der Jahrgänge 1996 und 1999; n.b.: nicht bestimmt, da vor der Analyse längere Zeit tiefgefroren



## 11.2 Amerikanische Paprikapulver

Laut *Peusch*<sup>90</sup> liegen die in den verschiedenen Paprikapulvern (n = 27) analysierten C/DC-Verhältnisse zwischen 0,99 bis 1,89 und die NDC/C-Verhältnisse zwischen 0,120 und 0,286, was C/NDC-Verhältnissen von 8,3 bis 3,5 entspricht. Diese Aussage kann bei den bisher untersuchten Pulvern bestätigt werden. Sollte bei der Untersuchung von Paprikapulvern, die aus Früchten der Varietät *C. annuum* var. *annuum* L. hergestellt wurden, eines dieser Verhältnisse deutlich andere Werte annehmen, ist eine kritische Überprüfung des Analysenergebnisses angebracht.

Das Capsaicinoid Pelargonsäurevanillylamid PSVA ist anders als Capsaicin, Dihydrocapsaicin und Nordihydrocapsaicin leicht synthetisch herzustellen und um den Faktor 5 billiger als das natürliche Capsaicinstandardgemisch. PSVA kommt zwar auch natürlich vor, besitzt mit Konzentrationen von 1,5 bis max. 4,6 % jedoch nur eine untergeordnete Rolle.<sup>79</sup> Durch Zumischung von synthetischem PSVA zu einem Pulver könnte somit die Schärfe preiswert und einfach erhöht werden. Bei den gängigen Reversed Phase HPLC-Verfahren würde eine solche Zumischung nicht auffallen, da es dort nur durch Verwendung silberionenhaltiger mobiler Phasen möglich ist, das kritische Paar PSVA/C zu trennen. Wegen der Lichtempfindlichkeit von Silberchlorid und weiterer Nachteile hat sich diese Vorgehensweise zur Capsaicinoidanalytik nicht durchgesetzt.

Eine Auftrennung in PSVA und C ist jedoch ohne großen Aufwand per Gaschromatographie möglich, die sich zwar nicht für eine Routineanalytik eignet, allerdings bei auffälligen Proben eine rasche Aussage zur Verfälschung von Proben mit PSVA erlaubt.

Bei der Untersuchung von Pulvern verschiedener definierter Länderherkunft fiel ein Pulver auf, das folgende Zusammensetzung zeigte (*Tab. 43*).

% C *	% DC	% NDC	C/DC	NDC/C
66,9	29,8	3,3	2,24	0,111

*Tab. 43: Prozentuale Verteilung und Verhältnisse der Capsaicinoide C, DC, NDC eines scharfen Paprikapulvers (USA) erhalten per HPLC \*) Summe C und PSVA*

Ein weiteres Pulver vom selben Hersteller zeigte nicht dieses untypische Muster (*Tab. 44*).

% C*	% DC	% NDC	C/DC	NDC/C
55,6	36,6	7,9	1,52	0,142

Tab. 44: Prozentuale Verteilung und Verhältnisse der Capsaicinoide C, DC, NDC eines milden Paprikapulvers (USA) erhalten per HPLC \*) Summe C und PSVA

Aufgrund des untypisch hohen relativen Gehaltes an Capsaicin und des damit sehr hohen C/DC-Verhältnisses des scharfen Pulvers wurde vermutet, daß eine Verfälschung mit PSVA vorgenommen worden war, um eine Erhöhung der Schärfe zu erhalten.

Um dies zu überprüfen, wurde deshalb das scharfe Pulver per GC/MS untersucht. Der für PSVA ermittelte Gehalt von 2 % liegt innerhalb der natürlichen Schwankungsbreite. Bei dieser Probe liegt ein für Capsicum annuum untypisches Capsaicinoidmuster vor.

## Diskussion und Arbeitsvorschriften

### 12 Diskussion

Die vorliegende Arbeit hatte zunächst eine Optimierung und Weiterentwicklung der Analytik der Capsaicinoide in Gewürzpaprika zum Ziel. Aus diesem Grund wurden verschiedene chromatographische Meßmethoden miteinander verglichen.

Bei Untersuchungen von Einzelfrüchte aus Handelspartien von frischem Gewürzpaprika fielen die weit voneinander abweichenden Capsaicinoidkonzentrationen auf. Nach Ausarbeitung einer geeigneten Methode, um vergleichende Studien durchführen zu können, wurde die Stabilität der Capsaicinoide in intakten und zerkleinerten Früchten bei der Lagerung untersucht. In eigens angebauten Früchten wurden die Scharfstoffgehalte während Entwicklung und Reifung analysiert.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der im experimentellen Teil vorgestellten Versuche mit den bisher in der Literatur genannten Daten verglichen.

#### 12.1 Meßmethoden

Es sollte eine Meßmethode entwickelt werden, mit der zuverlässig die nur in sehr geringen Konzentrationen vorkommenden Minorcapsaicinoide bestimmt werden können. Erwartet wurde, daß die Konzentrationsunterschiede dieser Minorcapsaicinoide größer als die der Hauptcapsaicinoide C und DC ausfallen würden und somit als Authentizitätskriterium geeignet wären. Aus diesem Grund sollten verschiedene Methoden (HPLC mit Fluoreszenzdetektion und elektrochemischer Detektion, GC mit NPD und MS) miteinander verglichen werden, um festzustellen, welche dieser Methoden die geeignetste im Hinblick auf eine hohe Empfindlichkeit, niedrige Störanfälligkeit und gute Reproduzierbarkeit ist.

Mit der HPLC-Trennung an einer RP-18-Säule und Fluoreszenzdetektion lag eine robuste und reproduzierbare Methode vor. Hierbei stand allerdings nicht die Bestimmung der Minorcapsaicinoide im Vordergrund, sondern die Trennung und Analyse der Hauptcapsaicinoide C, DC und NDC.<sup>90</sup> Durch Verwendung eines elektrochemischen Detektors (ELCD) versprach man sich eine Erhöhung der Nachweisempfindlichkeit. Weiterhin stände neben der Fluoreszenz eine zweite auf einem völlig anderen Detektionsprinzip beruhende Methode zur Verfügung, wodurch Störungen durch Matrixkomponenten einfacher zuzuordnen wären.

Durch Aufnahme „hydrodynamischer Voltammogramme“ wurde das optimale Redoxpotential (maximales Signal/Rauschverhältnis) der Capsaicinoide beim ELCD bestimmt. Hierbei wurde neben dem Analytstrom auch der Grundstrom und das Grundrauschen berücksichtigt. Als optimales Potential wurde 0,9 V ermittelt, was im Vergleich zu den in der Literatur genannten Potentialen höher liegt. *Chiang*<sup>117</sup> wählte das zur Reaktion niedrigst benötigte Potential, um den ELCD als „Selektivitätsmittel“ zu nutzen. Dies erklärt das niedrige Potential von 0,4 V. *Kawada et al.*<sup>116</sup> arbeitete bei 0,75 V, das er als Kompromiß zwischen maximalem Response und minimalen Hintergrundrauschen ansah. Der Unterschied von 0,75 V zu 0,9 V könnte vor allem durch unterschiedliche Geräte, aber auch durch Verwendung verschiedener Eluenten (unterschiedliche Leitfähigkeit) bedingt sein.

Mit dem ELCD wurde eine mit der Fluoreszenzdetektion vergleichbare Nachweisempfindlichkeit (im oberen pg-Bereich) erzielt. Beide Methoden zeigten eine vergleichbare Linearität. Die Erhöhung der Empfindlichkeit beim ELCD im Vergleich zur Fluoreszenz, wie sie bisher in nur einer einzigen Arbeit<sup>116</sup> genannt wurde, konnte nicht bestätigt werden. Im Vergleich zu der 1981 in der Literatur<sup>110</sup> beschriebenen NWG erreicht man hier eine um den Faktor 10 erhöhte Empfindlichkeit bei der Fluoreszenzdetektion. Dieses könnte mit der Weiterentwicklung der Fluoreszenzdetektoren in den letzten 15 Jahren erklärt werden.

Es konnte zudem gezeigt werden, daß die Responsefaktoren von C und PSVA gleich sind. PSVA kann deshalb sowohl bei der Fluoreszenzdetektion wie auch bei der elektrochemischen Detektion als externer Kalibrierstandard für die Quantifizierung aller Capsaicinoide verwendet werden. Die Erstellung nur einer Kalibriergerade führt zu einer großen Zeitersparnis. Zudem ist PSVA der billigste käuflich zu erwerbende Standard.

Beim Vergleich der Chromatogramme von Pulvern unterschiedlicher Schärfegrade, die durch sequentielle Anordnung von Fluoreszenzdetektor und ELCD erhalten wurden, zeigt sich beim ELCD, besonders bei milden Paprikapulvern, ein größerer „Matrixpeak“, an dessen auslaufender Flanke sich die Capsaicinoide befinden, was die Auswertung der Chromatogramme erschwerte.

Mit dem elektrochemischen Detektor konnte nicht empfindlicher als mit Fluoreszenzdetektion gemessen werden. Außerdem war der Arbeitsaufwand bei den Messungen mit dem ELCD erheblich höher als beim Fluoreszenzdetektor, da die Arbeitselektrode häufig gereinigt und der Eluent in kurzen Zeitabständen ausgetauscht werden mußte. Zudem nahm im Laufe der Messungen der Grund- und Meßstrom ab und es kam zu einer Verschiebung des Responsemaximums. Die elektrochemische Detektion erfüllte somit nicht die in sie gesetzten Erwartungen und erbrachte gegenüber der Fluoreszenz keine Vorteile.

Mittels Gaschromatographie sollte ein zur HPLC alternatives Trennverfahren bezüglich Robustheit und NWG entwickelt werden, damit auch die Capsaicinoide, die bei der HPLC nur mit hohem Aufwand getrennt werden können, was besonders auf das Paar PSVA/C zutrifft, einzeln analysiert werden können. Die GC mit stickstoffspezifischer Detektion (NPD) schien hier besonders aussichtsreich.

Es wurde festgestellt, daß die GC prinzipiell zur Scharfstoffanalytik geeignet ist. Für Serienuntersuchungen ist sie jedoch wegen der unten beschriebenen Nachteile der HPLC-Analytik mit Fluoreszenzdetektion unterlegen.

Die Analytik per GC/NPD ergab NWG, die geringfügig (Faktor 1,5) unter denen der HPLC/Fluoreszenzdetektion lagen. *Thomas et al.* ermittelten ein Instrumental Detection Limit (IDL) von 0,2 ng.<sup>75</sup> Das in dieser Arbeit ermittelte IDL, berechnet über die dreifache durchschnittliche Höhe des Basislinienrauschens, ergab Werte von 0,1 ng und liegt damit unter dem von *Thomas et al.* angegebenen Wert.

Beim GC/NPD konnte im Gegensatz zur HPLC über den gesamten Meßbereich keine befriedigende Linearität erzielt werden.

Eine externe Kalibrierung nur mit PSVA ist nicht ohne weiteres möglich, wie anhand der Kalibriergeraden von PSVA und C gezeigt werden konnte, da sich die Geraden zu sehr voneinander unterscheiden. Das bedeutet, daß für jedes Capsaicinoid eine eigene Kalibriergerade aufgenommen werden müßte. Da nur drei Capsaicinoide (C, DC und PSVA) käuflich zu erwerben sind, müßten die anderen Capsaicinoide selbst synthetisiert werden, was einen erheblichen Arbeitsaufwand darstellt.

Als interner Standard kam zunächst 2,4,6-Triphenoxy-1,3,5-triazin zum Einsatz. Da dies wegen seiner späten Retentionszeit nicht optimal war, wurde Laurinsäurebenzylamid synthetisiert. Es erfüllte alle an den internen Standard gestellten Anforderungen (kein Tailing, Retentionszeit nahe bei den Capsaicinoiden).

Bei den Capsaicinoiden in underivatisierter Form wurde ein starkes Tailing beobachtet. In der Literatur ist häufig darüber berichtet worden<sup>15</sup>, obwohl *Hawer et al.* zeigen konnten, daß die underivatisierten Capsaicinoide bei Verwendung von Kapillarsäulen ohne Peak tailing bestimmt werden können.<sup>72</sup> Aber auch eine jüngst erschienene Arbeit zeigte ein Tailing der Analyten.<sup>75</sup> Für dieses Tailing wurde die Hydroxylgruppe der Capsaicinoide verantwortlich gemacht, da dadurch eine Tendenz zur Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen gegeben ist. Aus diesem Grund wurden die Capsaicinoide mit Trimethylsulfoniumhydroxid (TMSH) derivatisiert. Dadurch konnte das Tailing (Ausnahme: niedrige Konzentrationen) weitgehend beseitigt werden. Gleichzeitig wurde aber auch neben der gewünschten Umsetzung an der Hydroxylgruppe eine zusätzliche Methylierung am Stickstoffatom beobachtet. Diese doppelte

Methylierung konnte bereits festgestellt werden, bevor die Capsaicinoide eines Capsicum-Standards quantitativ an der Hydroxylgruppe umgesetzt worden waren, wie die Kontrolle per GC/MS zeigte.

Hinsichtlich der Selektivität der Capsaicinoidbestimmung in Anwesenheit von Coextraktivstoffen aus Paprika sowie bezüglich der Robustheit und Langzeitstabilität erwies sich somit die HPLC mit Fluoreszenzdetektion als Methode der Wahl, wenn es um die quantitative Bestimmung bekannter Capsaicinoide aus Capsicum-Proben (Paprika, Chilies) ging.

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit wurde nicht auf die analytische Methodenentwicklung gelegt, sondern auf Untersuchungen zum Vorkommen und zur Stabilität der Capsaicinoide während Fruchtreifung, Lagerung und Bearbeitung. Deshalb wurde auf eine Optimierung der analytischen Methoden verzichtet. Der hiermit verbundene Nachteil etwaige Minorcapsaicinoide nur unzureichend zu erfassen, wurde hierbei in Kauf genommen.

## 12.2 Probenvorbereitung

### 12.2.1 HPLC

Werden Gewürzpaprikapulver (Capsaicinoidgehalte > 35 mg/kg) mit Ethylacetatextraktion und flüssig-flüssig-Verteilung aufgearbeitet, muß die Probeneinwaage der Schärfe angepaßt werden. Die flüssig-flüssig-Verteilung ist sonst bei zu hohen Einwaagen unvollständig, so daß zu geringe Capsaicinoidkonzentrationen bestimmt werden.

Für die Aufarbeitung von Pulvern mit deutlich wahrnehmbarer Schärfe (Capsaicinoidgehalte > 8 mg/kg) ist eine einmalige Extraktion mit einem Lösungsmittel ohne weitere Aufreinigungsschritte ausreichend. Damit steht eine neben der flüssig-flüssig-Verteilung nach Ethylacetatextraktion zuverlässige und einfache Methode zur Bestimmung des Scharfstoffgehaltes in Paprikapulvern zur Verfügung, die zudem wegen ihrer geringeren Aufarbeitungsschritte zu einer Verringerung des Zeit- und Arbeitsaufwandes führt. Außerdem muß bei dieser Methode die Probeneinwaage nicht variiert werden, sondern bleibt immer gleich.

Zur Zeit wird auf Basis dieser Methode ein DIN-Normentwurf zur Bestimmung des Capsaicinoidgehaltes in Gewürzpaprikapulver vom DIN-Arbeitsausschuß „Gewürze und würzende Zutaten“ geprüft.

Für die Extraktion stehen zwei verschiedene Lösungsmittel zur Verfügung. Es kann zwischen MeCN:H<sub>2</sub>O (1+1; v+v) oder dem weniger toxischen und preiswerteren MeOH:H<sub>2</sub>O (7+3; v+v)-Gemisch gewählt werden.

Bei der Aufarbeitung von Oleoresinen kann sowohl die flüssig-flüssig-Verteilung wie auch die vereinfachte Aufarbeitung (Extraktion mit MeCN: H<sub>2</sub>O (1+1; v+v)) gewählt werden. Beide Methoden liefern für milde (z.B. 116 mg/kg) ebenso wie für sehr scharfe (z.B. 45300 mg/kg) Oleoresine vergleichbare Ergebnisse und unterscheiden sich in ihrem Zeit- und Arbeitsaufwand kaum voneinander. Die Auswertungen werden nicht durch Matrixeffekte erschwert.

Auch hierbei wird vom DIN-Arbeitsausschuß „Gewürze und würzende Zutaten“ ein DIN-Normentwurf über die vereinfachte Aufarbeitung (geringfügig modifiziert) zur Analyse der Capsaicinoidgehalte in Paprika- und Chilioloresinen geprüft. Für den Farbstoff „E 160 Paprikaextrakt, Capsanthin, Capsorubin“ werden in der EG-Richtlinie 95/45/EG spezifische Reinheitskriterien hinsichtlich des Capsaicinoidgehaltes angegeben.<sup>123-125</sup> Dieser darf maximal 250 mg/kg Capsaicin enthalten. Vor diesem Hintergrund ist eine zuverlässige Methode zur Bestimmung des Scharfstoffgehaltes in Paprikaoleoresinen besonders wichtig.

### 12.2.2 Gaschromatographie

Bei der Probenaufarbeitung für GC-Analysen ist eine gründliche Aufreinigung, unabhängig vom Schärfegrad des Pulvers, absolut notwendig. Eine alleinige Lösungsmittel-Extraktion, wie sie für die HPLC möglich ist, reicht auch bei scharfen Pulvern nicht aus, da zu viele Begleitstoffe miterfaßt werden. Prinzipiell möglich ist dabei eine Ethylacetatextraktion, Aufarbeitung nach der flüssig-flüssig-Verteilung und anschließend ein Ausschütteln mit Cyclohexan bzw. Diethylether. Der Vorteil beim Ausschütteln mit Cyclohexan ist darin zu sehen, daß weniger Matrixbestandteile als beim Ausschütteln mit Diethylether miterfaßt werden, so daß auch die Chromatogramme edelsüßer Pulver gut ausgewertet werden können. Zurückzuführen ist dies auf die unterschiedliche Polarität der beiden Lösungsmittel. Diethylether ist polarer als Cyclohexan. Polare Matrixbestandteile, die sich in der wäßrigen Phase befinden, gehen somit leichter in die Diethylether- als in die unpolare Cyclohexanphase über. Die Abtrennung dieser Begleitstoffe mittels Diethylether anstelle von Cyclohexan ist somit weniger effektiv.

Nachteilig ist allerdings die Diskriminierung von Capsaicin, so daß Dihydrocapsaicin in den Cyclohexan-Extrakten (fälschlicherweise) das Hauptcapsaicinoid darstellt. Die Ursache ist ebenfalls in der unterschiedlichen Polarität der beiden Lösungsmittel wie auch der beiden

Capsaicinoide zu sehen. Das polarere C geht bei dem polareren Diethylether leichter als DC in die organische Phase über, ebenso wie das unpolare DC leichter in die unpolare Cyclohexanphase als C übertritt.

*Thomas et al.*, die ebenfalls als Detektor einen NPD verwendeten, schlugen vor, die Paprikapflanzen nur mit Aceton zu extrahieren.<sup>75</sup> Die Chromatogramme belegen aber durch sehr starke Matrixsignale eine fehlende Selektivität und bestätigen die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse.

## 12.3 Frische Früchte

### 12.3.1 Heterogenität

Es wurde eine breite Heterogenität des Capsaicinoidgehaltes sowohl für einzelne Früchte aus dem Handel wie auch für selbstangebaute Früchte festgestellt.

#### 12.3.1.1 Handelsware

Bei Handelsware gab es innerhalb derselben Handelspartie keine Zusammenhänge zwischen Reifungsgrad, indiziert durch den Farbwechsel von grün über grün-orange nach rot, Capsaicinoidkonzentration und -muster. Acht gleich große Früchte aus einer Handelspartie zeigten beispielsweise eine Spanne des Gesamtcapsaicinoidgehaltes von 154 bis 373 mg/kg ohne jegliche Korrelation des Schärfegrades zur Fruchtfarbe.

Die breite Heterogenität der Scharfstoffkonzentration einzelner, gekaufter Früchte wurde in zahlreichen Studien bestätigt (*Tab. 48, S. 136* und *Tab. 49, S. 137*).

Eine noch größere Spanne der Capsaicinoidkonzentrationen wurde bei der Untersuchung von Fruchtsegmenten frischer Gewürzpaprika festgestellt (*10.1.3, S. 68*).

Fast 90 % der Capsaicinoide wurden in den Scheidewänden und Plazenta gefunden. Diese Ergebnisse stimmen gut mit den in der Literatur genannten Daten überein, nach dem diese Organe diejenigen sind, in der die Capsaicinoide gebildet werden.<sup>13, 15, 29</sup> In Samen und Fruchtwänden konnten kaum Scharfstoffe nachgewiesen werden. Literatur<sup>10</sup>, die die Samen als Ort mit hohen Capsaicinoidkonzentrationen nennen, sind deshalb kritisch zu betrachten.



### 12.3.1.2 Früchte aus Gewächshausanbau

Die Untersuchung von Früchten bekannter Herkunft (eigener Gewächshausanbau) ergab bereits bei Früchten ein- und desselben Strauches und identischem Zeitpunkt der Ernte, gemessen an den Tagen nach der Blüte, erhebliche Unterschiede im Gehalt und Muster der Capsaicinoide. Dies widerlegt die Erwartung, daß das Capsaicinoidmuster eine Möglichkeit zur Sortendifferenzierung oder Herkunftsermittlung bieten könnte. Dies wird auch aus neueren Ergebnissen von *Zewdie und Bosland* so festgestellt: das Capsaicinoidmuster eignet sich nicht zur Sortendifferenzierung.<sup>126</sup> In diesem Artikel wird nur auf die prozentuale Verteilung der Capsaicinoide und nicht auf deren Scharfstoffgehalt eingegangen. Es ist nicht ersichtlich, ob und ggf. wieviele Einzelfrüchte untersucht wurden.

Bestätigt werden konnte das aus Untersuchungen an Handelsware erhaltene Resultat, daß die Fruchtfarbe nicht mit dem Schärfegrad (Capsaicinoidgehalt) korreliert.

Zwischen Capsaicinoidmuster und Capsaicinoidgehalt ist ebenfalls keine Korrelation festzustellen.

Im Zeitraum zwischen 14-66 Tagen nach der Blüte ließ sich ein Anstieg des Capsaicinoidgehalts während der Fruchtreifung nicht feststellen, wenn die Einzelresultate für einzelne Früchte gemittelt und die Standardabweichungen berücksichtigt werden (*Abb. 43*). Anhand der Standardabweichung wird zudem nochmals die starke Streuung der Capsaicinoidgehalte deutlich.

Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu in der Literatur genannten Arbeiten (3.5, S. 9). Alle Autoren stellen eine Zunahme der Capsaicinoidkonzentration mit zunehmender Reife, einem Maximum der Gehalte und anschließendem Abbau fest. Die maximalen Gehalte werden meist um 30 - 50 Tagen nach der Blüte gefunden. Der Zeitpunkt der maximalen Gehalte differiert jedoch teilweise schon bei ein und derselben Varietät (*C. annuum var. annuum cv. Padrón*), angebaut in unterschiedlichen Jahren.<sup>40-44</sup>

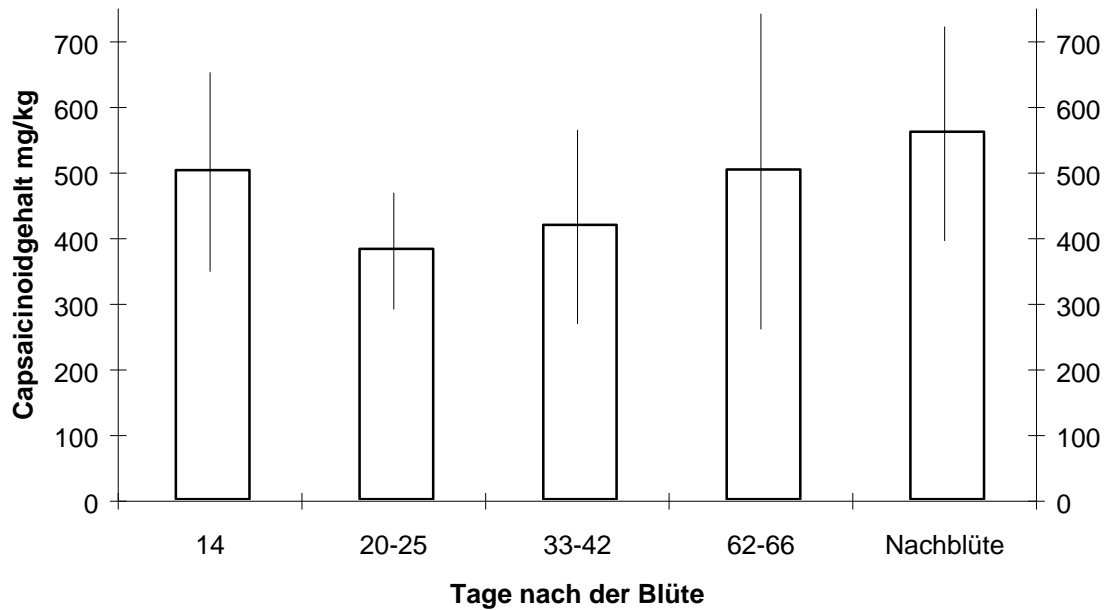


Abb. 43: Capsaicinoidgehalte (Mittelwerte) inklusive der Standardabweichungen aus den Werten für einzelne Früchte (mg/kg Frischgewicht) von drei Sträuchern

Die Ergebnisse sind schwer untereinander zu vergleichen, da die Konzentrationsangaben unterschiedlich sind und die „Vorbereitung“ der Früchte uneinheitlich vorgenommen wurde. Die Angaben werden auf frische oder getrocknete Früchte bezogen, die im ganzen, vor der Analyse von ihren Samen befreit oder in ihre Fruchtbestandteile (Perikarp, Plazenta) zerlegt, analysiert werden. Bei der Beschreibung der Probenvorbereitung ist nicht klar, ob einzelne Früchte und wenn ja wieviele oder ob pro Erntetag/Aufarbeitungstag mehrere Früchte aufgearbeitet und Mittelwerte gebildet und verwendet wurden.

In einer einzigen Arbeit wird an einer Stelle kurz auf die Heterogenität der Capsaicinoidgehalte einzelner Früchte eingegangen.<sup>127</sup> *Rymal et al.* untersuchten 10 Früchte und stellten fest, daß der Capsaicinoidgehalt zwischen 630 und 1230 mg/kg schwankte. Sie gingen auf diese Variabilität jedoch nicht weiter ein. Bei der Untersuchung weitere Früchte von zwei verschiedenen Varietäten bildeten sie wieder nur die Mittelwerte.

Die Arbeitsgruppe von *Bosland et al.* hat zwar variierende Capsaicinoidgehalte von Früchten verschiedener Sträucher eines Anbaufeldes gefunden. Sie führen diese Variabilität aber auf die Umweltbedingungen zurück, die sie für einen größeren Einfluß als die genetische Ausstattung halten. Aber auch sie haben nicht einzelne Früchte ein und desselben Strauches untersucht.<sup>54-56</sup>

Der in der Literatur beschriebene deutliche Capsaicinoidabbau ab ca. 50 Tagen nach der Blüte, scheint nach den o.g. Erkenntnissen möglicherweise ein Zufallsresultat aufgrund der

Probennahme zu sein, da in keiner dieser Publikationen auf die breite Variabilität der Capsaicinoidgehalte in den einzelnen Früchten eingegangen wird.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß trotz einheitlicher Herkunft (ein einzelner Strauch) und Wachstumsbedingungen der Capsaicinoidgehalt und das Muster bei individuellen Früchten in einem weiten Bereich variiert. Eine gesicherte Aussage zum Verlauf der Produktion von Capsaicinoiden bzw. deren Abbau ist daher nicht möglich.

### 12.3.2 Lagerstudien

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal an Früchten, also *in vivo*, gezeigt werden, daß es nur zu einem Abbau der Capsaicinoide kommt, nachdem die Zellstrukturen zerstört worden sind. Bisher wurden lediglich *in vitro*-Studien zum Abbau an Capsaicinoid-Standards durchgeführt.<sup>47, 48</sup>

Wegen der beachtlichen Variabilität der Capsaicinoidkonzentrationen bei Einzelfrüchten, waren diese ungeeignet, um Veränderungen im Capsaicinoidgehalt in Abhängigkeit von der Lagerzeit, -temperatur oder dem Lichteinfluß zu untersuchen, da es keine zuverlässige Bezugsgröße für den Zeitpunkt des Versuchsbeginns gibt. Durch die Zerkleinerung der Früchte zu Schnitzeln ließen sich dagegen Mischungen von hinreichender Homogenität herstellen, was die Voraussetzung darstellte, um durch Analyse von Aliquoten Veränderungen im Capsaicinoidgehalt und -muster während der Lagerung feststellen zu können.

Bei der Lagerung dieser Schnitzel wurde bei zwei voneinander unabhängig durchgeführten Studien eine Abnahme des Capsaicinoidgehalts abhängig von den Lagerbedingungen festgestellt.

Bei der 1. Studie wurde die stärkste Abnahme des Capsaicinoidgehaltes bis auf 30 % des Ausgangswertes innerhalb von einer Woche bei der bei Raumtemperatur im Schrank gelagerten Probe festgestellt. Danach blieb der Gehalt stabil. Bei der im Kühlschrank gelagerten Probe blieb der Anfangsgehalt über 4 Wochen konstant. Bei allen anderen Bedingungen ( $RT_{\text{Laborbank}}$ , Wärmeschränke bei 37 °C und 80 °C) war nach 1 Woche noch 70 % der Ausgangskonzentration erhalten und dieser Wert dann auch bis zum Ende der vierten Woche stabil.

Bei einer Wiederholung dieses Experimentes (2. Lagerstudie, *Abb. 37, S. 81*) wurden die Capsaicinoide bei offener Lagerung, Laborbank bis zu 30 % und im Schrank sogar bis auf 5 % des ursprünglichen Gehaltes abgebaut.

Ein Zusammenhang zwischen Licht und Abbauverhalten konnte nicht festgestellt werden, da die Schnitzel, die auf der Laborbank, also im Hellen, und die, die in den Wärmeschränken, somit im Dunkeln, gelagert wurden, gleich stark abgebaut wurden. Dagegen gab es eine Korrelation zwischen dem Capsaicinoidgehalt und der Geschwindigkeit des Wasserverlustes beim Trocknen in den Proben, weswegen ein enzymatischer Abbau, z.B. durch Peroxidasen, vermutet wird. Um eine Schimmelbildung zu vermeiden, wurde in offenen Probengefäßen gelagert. Daher kam es gleichzeitig zur Trocknung der Schnitzel. Je langsamer der Wassergehalt der Schnitzel abnahm, desto niedriger waren die Capsaicinoidgehalte am Ende der Lagerung. Es ist anzunehmen, daß das capsaicinoidabbauende Enzym bei einer langsameren Trocknung später inaktiviert wird und deshalb über einen längeren Zeitraum wirken konnte. Dies wird besonders deutlich beim Vergleich der Lagerungen im großen, offenen Raum (Laborbank) im Gegensatz zum kleinvolumigen, verschlossenen Laborschrank. War der Trocknungsvorgang beendet, konnte das Enzym nicht mehr wirken und ab diesem Zeitpunkt fand kein weiterer Abbau mehr statt.

Für einen enzymatischen Abbau spricht auch die Tatsache, daß bei tiefen Temperaturen (Kühlschrank) kein Abbau stattfand, da hier die enzymatischen Reaktionen wegen der niedrigen Temperaturen gehemmt sind.

Eine enzymatische Reaktion würde ebenfalls den unterschiedlichen großen prozentualen Abbau bei vergleichbaren Lagerbedingungen erklären (s.o.). Die Aktivität des capsaicinoidabbauenden Enzyms könnte unterschiedlich sein, bedingt z.B. durch das verschiedene Alter der Früchte. *Contreras-Padilla und Yahia*<sup>46</sup> stellten fest, daß mit zunehmendem Alter der Früchte die Peroxidasenaktivität zunimmt.

Zur Klärung, ob dieser als „enzymatisch“ interpretierte Capsaicinoidabbau nur bei Verletzung der Zellstruktur durch das Herstellen der Paprikaschnitzel zustande kommt, oder auch in unzerkleinerten Früchten stattfindet, wurde eine Strategie ausgearbeitet, die von möglichst intakten Früchten ausging. Dazu bot sich die Halbierung von Früchten an. Die Längshalbierung der Früchte wurde dabei so vorgenommen, daß beide Hälften möglichst symmetrisch hinsichtlich der Scheidewände und des Samenbesatzes vorlagen. Gemessen als Schwankungsbreite der analytischen Resultate waren trotz größter Sorgfalt beim Halbieren der Früchte die Unterschiede zwischen den einzelnen Hälften bzw. Hälftemischungen A und B noch zu groß, wenn man nur von 1 oder 2 Früchten ausging. Wenn Fruchthälften dagegen aus 5 bis 10 Früchten gepoolt wurden, wiesen sie eine hinreichend gute Übereinstimmung im Capsaicinoidgehalt zwischen den korrespondierenden Hälftenpartien A und B auf. So konnte bei den Untersuchungsreihen die erste Gruppe der Hälften als Bezugswert dienen und die zweite Gruppe lieferte dann den Wert für einen bestimmten Zeitpunkt der Lagerung. Für jede gewählte Kombination aus Lagerungsbedingung und -zeit (N) wurden jeweils beide Gruppen A und B (2N) benötigt. Wegen der Unterschiede im Absolutgehalt an

Capsaicinoiden zwischen den einzelnen Pools aus 5-10 Früchten wurde für die Auswertung der Untersuchungsreihe Veränderungen im Capsaicinoidgehalt nicht absolut, sondern relativ zur Referenzmischung A berechnet.

Der Capsaicinoidgehalt blieb in dieser Studie, in der Hälften unzerkleinert gelagert wurden, im Gegensatz zur vorher durchgeführten Schnitzzellagerung, bei den Lagerbedingungen Laborbank und Laborschrank im Rahmen der Analysengenauigkeit stabil.

Die größere Streuung der Resultate dieses Lagerungsexperimentes (*Abb. 39, S. 84*) verglichen mit den Variationskoeffizienten in *Tab. 30, S. 72* läßt sich damit erklären, daß für die Lagerung insgesamt 245 Früchte geteilt wurden. Eine so große Zahl zu halbierender Früchte führt bei manueller Bearbeitung zwangsläufig zu einer niedrigeren Präzision, da die exakte Halbierung bezüglich Scheidewänden und Samenbesatz schwierig ist.

Zusätzlich wurde eine Untersuchungsreihe durchgeführt, in der parallel Paprikaschnitzel und -hälften im Kühlschrank und bei Raumtemperatur im Laborschrank gelagert wurden. Dabei sollte mit identischem Probenmaterial festgestellt werden, wie sich das zerkleinerte Material hinsichtlich des Capsaicinoidabbaus, im Vergleich zum Unzerkleinerten verhält. Wie erwartet, konnte unter der Bedingung (geschlossen) Laborschrank der starke Capsaicinoidabbau wie bei dem als Pool geschnitzelten Gewürzpaprika bestätigt werden.

Dieses unterschiedliche Verhalten von lediglich halbierten Früchten und stark zerkleinertem Material belegt, daß der Capsaicinoidabbau erst durch den Zerkleinerungsprozess ausgelöst wird.

Viele Autoren berichten von einer Abnahme der Capsaicinoidgehalte mit fortschreitender Reife (*3.5, S. 9*). Da aber bereits einzelne Früchte eine starke Variabilität der Capsaicinoidgehalte zeigen und es zu einem Abbau der Capsaicinoide erst nach Zerstörung der Zellstrukturen kommt, wobei eine Halbierung nicht ausreicht, sind diese in der Literatur genannten Ergebnisse kritisch zu betrachten.

Bei Betrachtung des Capsaicinoidmusters konnten bei zwei von drei Studien Veränderungen beobachtet werden. Festgestellt wurde dies bei der 2. Lagerstudie der Schnitzel (*Tab. 34, S. 81*) und bei der Lagerstudie von Hälften und korrespondierenden Schnitzeln (*Tab. 36, S. 88*). Die prozentualen Anteile von Capsaicin nahmen während der Lagerung ab, während die prozentualen Anteile von Dihydrocapsaicin zunahm. Um abschließende Aussagen zu treffen, liegen jedoch noch zu wenig Daten vor. Ein möglicher Grund für dieses Ergebnis könnte in der unterschiedlichen Selektivität der Enzyme, die je nach Fruchtart unterschiedlich sein könnten, zu sehen sein. Ob ein solcher Trend generell (z.B. in Abhängigkeit zur Sorte) zu beobachten ist, sollte deshalb in weiteren Studien überprüft werden.

Da in halbierten Früchten oder bei schneller Trocknung von Schnitzeln die Schärfe weitgehend erhalten bleibt, bei langsamer Trocknung von Schnitzeln dagegen weitgehend abgebaut wird, bietet sich hiermit ein zu überprüfender Weg für eine Nacherntebehandlung zur Steuerung des Schärfegrades für das resultierende Paprikapulver.

Paprikafrüchte werden bei der Herstellung von Pulvern zunächst nach der Nachreifung und nach dem Waschen vorzerkleinert und auf verschiedene Arten (Sonnentrocknung, Bandtrocknung) auf einen Wassergehalt von 5-8 % getrocknet. Erst bei Bedarf wird diese „Halbware“ in den Paprikamühlen zu Paprikapulver weiterverarbeitet.

Durch die Art der Trocknung (schnell, langsam) und durch die Wahl der Zerkleinerungsgröße der Früchte (halbe Früchte, sehr kleine Fruchtstücke) kann der Schärfegrad eines Paprikapulvers in die gewünschte Richtung beeinflusst werden. Der Hersteller kann also durch eine gezielte Vorbehandlung der Paprika unterschiedliche Schärfegradqualitäten erzeugen. Läßt er die fein zerkleinerten Früchte langsam trocknen, sollte es zu einem langsamen Gewichtsverlust kommen, so daß das capsaicinoidabbauende Enzym später inaktiviert wird und damit der Abbau der Scharfstoffe über einen längeren Zeitraum stattfinden kann. Die Folge sollte ein milderer Pulver sein. Anders beim raschen Trocknen, bei dem es zu einem raschen Gewichtsverlust, also zu einer schnellen Abnahme der Wassergehalte kommt. Das Enzym wird somit bereits nach kurzer Zeit inaktiviert, so daß schärfere Qualitäten erhalten werden können. Schärfere Pulver können auch bei der Trocknung intakter Früchte unabhängig von der Trocknungsgeschwindigkeit erhalten werden.

Einen maximalen Capsaicinoidgehalt ermöglicht die Gefriertrocknung, bei der trotz Zerkleinerung der Früchte durch die schnelle Trocknung und das Arbeiten bei niedrigen Temperaturen die Scharfstoffkonzentration weitgehend erhalten bleibt (*Tab. 45*).

<b>Anfangsgehalt</b> <b>mg/kg</b>	<b>Gehalt nach Gefriertrocknung</b> <b>mg/kg</b>
282,5	280,0

*Tab. 45: Capsaicinoidgehalte (mg/kg Frischgewicht) von Schnitzeln der 1. Studie vor und nach Gefriertrocknung (Doppelbestimmung)*

Als nächster Schritt wäre zu prüfen, ob der beobachtete Capsaicinoidabbau auf die Wirkung von Peroxidasen zurückzuführen ist, die in Modellstudien mit Capsaicin reagieren. Dazu sollten Versuche der Lagerung von Gewürzpaprikaprobe bei verschiedenen  $a_w$ -Werten, unter Stickstoffatmosphäre sowie unter Einfluß von Wasserstoffperoxid bzw. Ascorbinsäure vorgenommen werden. Ein besonderer Schwerpunkt sollte auf Untersuchungen gelegt werden, die auf die Beeinflussung des Schärfegrades durch technologische Maßnahmen gerichtet sind.

## 12.4 Sorten- und Herkunftszuordnung bei Paprikapulvern

Mit elf Proben unterschiedlicher Herkunft, unterschiedlichen Jahrgangs und unterschiedlichen Sorten ist die Anzahl zu klein, um eine diskriminanzanalytische Auswertung vorzunehmen. Dennoch lassen sich aus den Daten erste Schlüsse ziehen, die in einem größeren Probenkollektiv einer Verifizierung bedürfen.

Der Gesamtcapsaicinoidgehalt ist ein geeignetes Kriterium, um Paprikapulver in die Handelssorten „Edelsüß“ oder „Rosen“ einzustufen. Hierbei fällt auf, daß der Unterschied zwischen dem milden „Edelsüß“ und dem scharfen „Rosen“-Typ bei ungarischem Paprikapulver viel deutlicher ausgeprägt ist, als bei den marokkanischen Pulvern. Für die ungarischen Proben ergaben sich für Edelsüß Werte von 1,1 und 4,7 mg/kg und für Rosenpaprika von 702,7 und 807,3 mg/kg. Die marokkanischen Edelsüßproben hatten dagegen bereits einen Capsaicinoidgehalt von 17,2; 32,5; 38,7 und 43,0 mg/kg, während die Rosenpaprikaprobe bei 122,0 und 250,3 mg/kg lagen.

Die internationale Norm ISO 7540-1984 (E), „Ground (powdered) paprika (*Capsicum annuum* Linnaeus)-Specification“, teilt sämtliche Paprikapulver in drei Qualitätsstufen ein, für die bestimmte Mindestanforderungen gelten.<sup>128</sup>

Für den Capsaicinoidgehalt sind nur vorläufige Werte vorgeschlagen (Tab. 46), wonach scharfe Pulver maximal 300 mg/kg Capsaicinoide enthalten dürfen. Dies hieße, daß die ungarischen Rosenpaprikapulver wegen ihres 2-2,5 fach höheren Capsaicinoidgehaltes weit außerhalb der oben genannten Norm liegen.

	Qualitätsstufe		
	I	II	III
<b>Schärfegrad</b>	frei von Schärfe oder kaum scharf	mild bis leicht scharf	scharf
<b>Capsaicinoidgehalt mg/kg i. Tr.</b>	0 bis 100	max. 200	max. 300

Tab. 46: Vorläufig vorgeschlagene Werte für die Capsaicinoidgehalte in Paprikapulver gemäß ISO 7540-1984 (E)

Bei Betrachtung des Musters der drei Hauptcapsaicinoide C, DC und NDC stellt man fest, daß es keine Korrelation des Musters zum Capsaicinoidgehalt gibt, wie bereits bei frischen Früchten festgestellt worden ist. Besonders deutlich wird dies beim Vergleich des ungarischen Rosenpaprikas mit einem der beiden marokkanischen Edelsüßpaprika, alle Ernte 1998. Trotz des etwa 20fach höheren Scharfstoffgehalts des ungarischen Pulvers ist das Muster fast identisch mit den Proben aus Marokko (Tab. 41, S. 95).

Ein Zusammenhang zwischen dem Muster und der Länderherkunft ist auch nicht vorhanden, wie zum einen an den oben genannten Proben und zum anderen an den marokkanischen Edelsüß-Paprikaprobe der Jahrgänge 1996 und 1998 deutlich wird. Ist das Scharfstoffmuster im Jahr 1998 bei beiden Proben untereinander fast gleich, so weicht es bei der Ernte 1996 sehr voneinander ab. Die Muster beider Jahrgänge sind auch nicht miteinander vergleichbar. Eine Beziehung zwischen Erntejahr und Muster ist somit auch nicht festzustellen.

Beim Vergleich der marokkanischen Edelsüßpaprika der Erntejahrgänge 1996 und 1998 stellt man weiterhin fest, daß die Proben Beni Mellal jeweils milder als die Proben Meknes sind. Dennoch kann man nicht vom Capsaicinoidgehalt auf die Sorte schließen (Beni Mellal: 17,2 und 32,5 mg/kg; Meknes: 38,7 und 43,0 mg/kg).

Anders als erhofft, war somit die Streuung der relativen Anteile der einzelnen Capsaicinoide innerhalb des Capsaicinoidspektrums bereits für gleiche Sorten und gleiche Herkunft zu groß, als daß sich nach den bisher vorliegenden Werten die Capsaicinoidverhältnisse aus Capsaicin, Dihydrocapsaicin und Nordihydrocapsaicin für Aussagen zur Länderherkunft, zum Erntejahr oder Sortenzuordnung heranziehen lassen könnten.

Aufgrund der technologischen Herstellung von Paprikapulver (3.8, S. 15) sollten edelsüße Pulver einen höheren Farbwert als Rosenpaprika besitzen, da hierbei ein größerer Anteil an



(farbgebenden) Fruchtwänden und nur ein geringer Anteil an weißen bis hellgelben Samen mitverarbeitet werden. Dies konnte bestätigt werden (Tab. 47).

<b>Handelsbezeichnung</b>	<b>Ungarn</b>	<b>Marokko (Meknes)</b>
Rosen	63	36
Edelsüß	160	94

Tab. 47: ASTA-Farbwerte der ungarischen und marokkanischen Proben

Über das Carotinoidspektrum scheint sich eine mögliche (weitere) Qualitätsdifferenzierung zwischen Rosen- und Edelsüßpaprika zu ergeben. Sowohl bei den ungarischen wie marokkanischen (Meknes) lagen die Gehalte an Capsanthin, Zeaxanthin,  $\beta$ -Carotin und  $\beta$ -Cryptoxanthin bei den Edelsüß-Pulvern um den Faktor 3-4 höher als bei den Rosenpaprikapulvern.

Beim Vergleich der Absolutwerte zwischen den beiden Ländern gab es sowohl für die Gesamtfarbe (ASTA-Farbwert) als auch für die CIE-L<sup>\*</sup>a<sup>\*</sup>b<sup>\*</sup>-Farbwerte deutliche Vorteile für die ungarischen Proben. Die ungarischen Proben hatten (sortiert nach Schärfegrad) jeweils einen um den Faktor 1,7 höheren Farbwert als die marokkanischen Pulver. Im internationalen Gewürzhandel bemißt sich der Preis der Gewürzpaprika nach der extrahierbaren roten Farbe, so daß die ungarischen Pulver höhere Preise als die marokkanischen erzielen würden.

Gesamtfarbwert, Farbtonmessung und Carotinoide bieten deshalb über die Absolutwerte neben ihrer Funktion als wichtige Qualitätsparameter hinaus möglicherweise einen Ansatzpunkt für den Herkunftsnachweis.

### 13 Zusammenfassung

Die Schärfe von Paprika wird durch die Capsaicinoide, einer Verbindungsklasse verschiedener, strukturell sehr ähnlicher Substanzen verursacht, die in unterschiedlichen Verhältnissen vorkommen. Über 77-90 % des Capsaicinoidgemisches machen in der Regel zusammen die beiden Hauptcapsaicinoide Capsaicin und Dihydrocapsaicin aus. Daneben gibt es noch eine Vielzahl weiterer Verbindungen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zunächst eine genügend empfindliche Bestimmungsmethode für die Capsaicinoide auszuarbeiten, so daß auch die Bestandteile, die nur in sehr geringen Mengen vorkommen (Minorcapsaicinoide), zuverlässig bestimmt werden können. Zur Feststellung der geeignetsten Methode sollten verschiedene chromatographische Verfahren miteinander verglichen werden. Es sollte dann überprüft werden, ob das Capsaicinoidmuster ein geeignetes Kriterium darstellen würde, um auf die Herkunft, Jahrgang der Paprika schließen zu können. Während der Untersuchungen fiel auf, daß bereits Einzelfrüchte stark abweichende Capsaicinoidkonzentrationen aufwiesen, so daß der Schwerpunkt im Laufe der weiteren Arbeit von Paprikapulver auf frische Gewürzpaprika verlegt wurde.

Mit der HPLC mit Fluoreszenzdetektion lag eine robuste und reproduzierbare Methode zur Bestimmung der Capsaicinoide C, DC und NDC vor.<sup>90</sup> In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß auch eine Analytik sowohl per HPLC mit ELCD als auch mittels GC möglich ist.

Die Empfindlichkeiten der HPLC mittels ELCD und Fluoreszenzdetektion waren gleich, wobei die NWG im oberen pg-Bereich (ca. 500 pg) lagen. Beide Methoden zeigten eine gute Linearität. Die Literaturangaben für die NWG, die für den ELCD genannt waren (12 pg),<sup>116</sup> konnten nicht bestätigt werden. Nachteilig wirkte sich beim ELCD der höhere Arbeitsaufwand bei den Messungen im Gegensatz zur Fluoreszenz aus, da die Arbeitselektrode durch schnelle Verschmutzung in kurzen Zeitintervallen gereinigt und der Eluent häufig erneuert werden mußte, damit es nicht zu einem Empfindlichkeitsverlust kam.

Bei der GC konnten geringfügig niedrigere NWG als per HPLC erreicht werden (ca. Faktor 1,5). Dagegen war die Linearität über den gesamten Meßbereich nicht befriedigend. Es wurde ein starkes Tailing, bedingt durch die Hydroxylgruppe der Capsaicinoide, beobachtet. Durch Derivatisierung mit Trimethylsulfoniumhydroxid konnte dies weitgehend beseitigt werden. Bevor jedoch eine quantitative Umsetzung der Capsaicinoide erfolgt war, kam es neben der gewünschten Methylierung am O-Atom beim Capsicum-Standard auch zu einer Reaktion am N-Atom, wie GC/MS-Messungen bestätigten.

Da die HPLC mit ELCD wie GC keine nennenswerten Vorteile gegenüber der HPLC mit Fluoreszenzdetektion erbrachten, war die Bestimmung per HPLC/Fluoreszenz die geeignetste Methode, wenn es um die Bestimmung der Scharfstoffe in Paprika ging.

Minorcapsaicinoide, insbesondere in milden Paprikapulvern und Früchten, konnten hiermit nur unzureichend bestimmt werden, weshalb sich auf die Hauptcapsaicinoide C, DC, NDC konzentriert wurde.

Intensive Studien an einzelnen, frischen Früchten sowohl von Handelsware wie auch von selbstangebauten Früchten ergaben eine breite Variabilität der Capsaicinoidgehalte. Sogar Früchte vergleichbarer Größe und Gewicht ein und desselben Strauches und identischem Zeitpunkt der Ernte wiesen stark variierende Scharfstoffgehalte (217 bis 632 mg/kg) mit variierendem Muster (C: 48-59 %, DC: 31-37 % und NDC: 9-17 %) auf. Hierbei konnte kein Zusammenhang zwischen Capsaicinoidgehalt und -muster hergestellt werden. Ebenfalls korrelieren die Capsaicinoidgehalte und das Muster nicht mit der Fruchtfarbe. Diese Beobachtungen wurden mit Früchten von mehreren Sträuchern, unter identischen Anbaubedingungen und zu verschiedenen Erntezeitpunkten geerntet, bestätigt.

Wegen der breiten Heterogenität der Capsaicinoidgehalte bereits innerhalb Früchten identischer Herkunft (aus einem einzigen Samenkorn) und Alter konnte die in der Literatur beschriebene Zunahme der Scharfstoffkonzentration bis zu einem Maximum und anschließendem Abbau mit zunehmendem Alter der Früchte nicht bestätigt werden.

Untersuchungen einzelner Fruchtbestandteile ergaben die höchsten Scharfstoffkonzentrationen in der Scheidewand/Plazenta, in der die Capsaicinoide gebildet werden. Geringe Gehalte wurden in den Samen und Fruchtwänden nachgewiesen.

Bei Untersuchungen zur Capsaicinoidstabilität in frischen Früchten konnte zum ersten mal an Früchten gezeigt werden, daß die Capsaicinoide erst nach Zerstörung der Zellstrukturen abgebaut werden. Bisherige Untersuchungen zur Capsaicinoidstabilität waren ausschließlich an Capsicum-Standards durchgeführt worden.

Wegen der beachtlichen Variabilität der Scharfstoffgehalte einzelner Früchte konnten keine ganzen Paprika gelagert werden. Um vergleichende Studien durchführen zu können, wurde eine Strategie ausgearbeitet, die von zerkleinerten bzw. halbierten Früchten ausging und gut reproduzierbare Ergebnisse lieferte. Der Abbau der Scharfstoffe konnte nur in zerkleinertem Material beobachtet werden. Die Capsaicinoidgehalte blieben bei gelagerten intakten Früchten (Hälften) im Rahmen der Analysengenauigkeit stabil.

Es konnte eine Abhängigkeit der Capsaicinoidgehalte von der Geschwindigkeit des Wasserverlustes beobachtet werden. Bei einem langsamen Wasserverlust der Früchte war der Abbau der Capsaicinoide größer (95 %) als bei einem schnellen Verlust (70 %). Vermutet wird ein enzymatischer Abbau, z.B. durch Peroxidasen, wie er in der Literatur an Standards beschrieben wird.

Es wurde festgestellt, daß in intakten Früchten oder bei schneller Trocknung von zerkleinertem Material die Schärfe weitgehend erhalten blieb. Über die Wahl der Zerkleinerungsgröße und Trocknungsbedingungen steht somit eine technologische Maßnahme zur Verfügung, die es gezielt ermöglicht, Einfluß auf den Scharfstoffgehalt für das resultierende Paprikapulvers zu nehmen.

Für die Bestimmung des Capsaicinoidgehaltes in Paprikapulvern ( $> 8 \text{ mg/kg}$ ) und Oleoresinen wurde eine einfache Methode ausgearbeitet, bei der die Proben nur extrahiert werden müssen. Zur Verfügung stehen ein MeCN/H<sub>2</sub>O (1+1; v+v) oder MeOH/H<sub>2</sub>O (7+3; v+v)-Gemisch. Diese Methode liegt zur Zeit als DIN-Normentwurf dem DIN-Arbeitsausschuß „Gewürze und würzende Zutaten“ vor.

Die Probenvorbereitung von Pulvern für gaschromatographische Bestimmungen erforderten einen erhöhten Arbeitsaufwand. Eine einfache Aufarbeitung, z.B. alleinige Extraktion mit einem Lösungsmittel war wegen vieler störender Matrixkomponenten nicht möglich. Es wurde eine Probenvorbereitung vorgestellt, mit der Pulver auf ihren Capsaicinoidgehalt untersucht werden konnten. Dazu mußte das Pulver zuerst mit Ethylacetat extrahiert werden, dann wurde die flüssig-flüssig-Verteilung und anschließend eine Verteilungschromatographie mit z.B. Cyclohexan oder Diethylether durchgeführt.

Die erst im Laufe dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse bezüglich der breiten Heterogenität der Scharfstoffgehalte und des -musters bereits einzelner Früchte identischer Herkunft und Alter widerlegen die Erwartung, anhand des Capsaicinoidmusters Rückschlüsse auf die Herkunft oder Varietät der Paprika schließen zu können. Paprikapulver verschiedener Erntejahrgänge und Qualitätsstufen aus Ungarn und Marokko sind untersucht worden. Die Konzentration der Scharfstoffe dient als Kriterium zur Unterscheidung zwischen Edelsüß- und Rosenpaprika. Es konnten keine Zusammenhänge zwischen Scharfstoffmuster und Gehalt, Länderherkunft oder Jahrgang festgestellt werden. Das Carotinoidspektrum wie auch die Farbe scheint dagegen einen Ansatzpunkt für den Herkunftsnachweis darzustellen, da die Farbwerte (ASTA-Farbwert, CIE-L\* a\* b\*) und der Gehalt an Carotinoiden zu höheren Werten bei den ungarischen Proben verschoben waren. Dies muß jedoch durch umfangreiche Studien überprüft werden.

## 14 Arbeitsvorschriften

### 14.1 Reagenzien und Lösungsmittel

Aceton (techn., destilliert über Phosphorpentoxid)

Acetonitril (techn., destilliert über  $K_2CO_3$ )

Benzylamin; Merck Art. Nr. 801812

Cyclohexan (techn., destilliert über Na)

Diethylether (techn., destilliert)

Dodecensäurechlorid (Laurinsäurechlorid) (98 %); Aldrich Art. Nr. 15,693-0

Essigsäure (99-100 %); Riedel-de Haen Art. Nr. 27221

Essigsäureethylester (techn., destilliert über  $CaCl_2$ )

Ethylendiamin-Tetraessigsäure (EDTA); Sigma Art. Nr. E-4884

Hexan (techn., destilliert)

Lithiumchlorid; Merck Art. Nr. 105679

Natriumacetat-Trihydrat; Fluka Art. Nr. 234807

Natriumchlorid-Lösung, gesättigt

Natriumsulfat, wasserfrei

Methanol (destilliert über KOH)

Methanol HPLC; sds Art. Nr. 0933721

Salzsäure, konz. (37 %)

Tetrahydrofuran (p. a.); Merck Art. Nr. 109731

2,4,6-Triphenoxy-1,3,5-triazin (TRI); Aldrich Art. Nr. 15,366-4

Wasser (entionisiert, bidestilliert und über  $KMnO_4$  destilliert)

#### Standards

Capsaicin 98 % (8-Methyl-N-vanillyl-6-nonenamid), Sigma, Art. Nr. M 2028

Dihydrocapsaicin 90 % (8-Methyl-N-vanillylnonanamid), Sigma, Art. Nr. M 1022

Natürliches Capsaicinmisch mit Capsaicin 60 %, Dihydrocapsaicin 30 %, Sigma, Art. Nr. M 3403

Pelargonsäurevanillylamid 98 % (N-Vanillylnonanamid), Serva, Art. Nr. A 15791

## 14.2 Glasgeräte und Laborbedarf

Faltenfilter (Durchmesser 150 mm) 595 ½; Schleicher & Schüll 311645  
Gastrichter, diverse Größen  
Meßkolben, diverse Größen  
Meßpipetten, diverse Größen  
Pasteurpipetten  
Reagenzgläser mit Schraubgewinde, 10 ml, 100 mm Länge, 16 mm Außendurchmesser (Pyrex)  
Schraubkappen mit PTFE-Einlage für Durchmesser 16 mm  
Scheidetrichter  
Spitzkolben 50 und 100 ml  
Rundkolben 100 und 250 ml  
Büchnertrichter (Durchmesser 65 mm), Größe 1  
Rundfilter (Durchmesser 55 mm) 589<sup>2</sup>; Schleicher & Schüll 300107  
Saugflaschen 250 und 500 ml  
Plastikzentrifugenbecher 250 ml  
Bechergläser, diverse Größen  
Petrischalen

## 14.3 Technische Laborgeräte

Extraktionseinheit Soxtec System HAT 2  
Homogenisierstab Ultra-Turrax Typ 18/10 (Janke & Kunkel, Staufen)  
Kolbenhub-Pipetten (Eppendorf)  
Membranpumpe Type N 726 FT: 18 (KNF, Neuberger)  
Pürierstab Braun MR 505  
Tischzentrifuge EBA II (Hettich)  
Universalzerkleinerer Moulinette (Moulinex, Köln)  
Universalzerkleinerer Krups Speedy Plus Type 708 A  
Vakuum-Rotationsverdampfer Rotavapor RE 111 mit Roti-Regler und Rotavapor EL 130 mit Büchi 165/S Vakuum Controller (Büchi, Eisingen/Fils)  
Vibrationsmischer für Reagenzgläser Ika-Vibro-Fix VF 2 (Janke & Junkel, Staufen)

## 14.4 HPLC

### 14.4.1 Chromatographische Ausrüstung

HPLC-System:	Solvent Delivery Module LC-6A, Sample Injector Module SIL-6A, System Controller SCL-6A (alle Shimadzu)
Detektoren:	Fluoreszenz-HPLC-Monitor RF 551 mit 12 µl Durchflußzelle (Shimadzu, Duisburg) $\lambda_{\text{Ex}} = 280 \text{ nm}$ , $\lambda_{\text{Em}} = 320 \text{ nm}$  Elektrochemischer Detektor Merck L-3500 A
Trennsäule:	250 x 4 mm LiChroCART® LiChrospher® RP-18 (5µm, endcapped), mit Vorsäule RP-18, 4 x 4 (Merck, 50995)
Datenaufnahme:	APEX Chromatography-Workstation, Model M625-15, Version 2.15 (Autochrom Inc.)
Eluent:	100 Volumenanteile Acetonitril, 100 Volumenanteile Wasser und 1 Volumenanteil Essigsäure werden vermischt und ca. 5 Minuten mit Helium entgast
Eluent für ELCD:	100 Volumentanteile Acetonitril, 100 Volumenanteile 0,1 M Natriumacetat mit 0,05 g EDTA/l (membranfiltriert) und 1 Volumenanteil Essigsäure werden vermischt und ca. 5 Minuten mit Helium entgast
Fließgeschwindigkeit:	1ml/min

### 14.4.2 Probenvorbereitung

#### 14.4.2.1 Flüssig-Flüssig-Verteilung nach Ethylacetatextraktion

##### 14.4.2.1.1 Paprikapulver<sup>90</sup>

Etwa 2 g Rosenpaprikapulver oder 5-10 g edelsüßes Paprikapulver mit Essigsäureethylester (je 10 ml pro g Pulver) 2 h unter Rückfluß extrahieren. Anschließend das Lösungsmittel in einen 100 ml Spitzkolben bzw. bei größeren Volumina in einen 250 ml Rundkolben dekantieren, den Extraktionsrückstand des Rosenpaprikapulvers zweimal mit je 5 ml bzw. des edelsüßen Pulvers zweimal mit je 10 ml Essigsäureethylester nachwaschen. Das

Lösungsmittel der vereinigten Fraktionen am Rotationsverdampfer abziehen (140 mbar, 50 °C). Den verbleibenden öligen Rückstand in 2 ml n-Hexan aufnehmen und in ein Reagenzglas mit Schraubverschluß überführen. Den Spitz- bzw. Rundkolben mit 3 ml Acetonitril/Wasser (1+1, v+v) ausspülen und diese Phase ebenfalls ins Reagenzglas überführen. Dann diese beiden Phasen intensiv durchmischen (15 s am Vibrations-Mischer) und anschließend zur Beschleunigung der Phasentrennung und des Absetzens eventuell beim Dekantieren mitübergegangener Schwebstoffe zentrifugieren (1-2 min, 2500 g). Die untere wäßrige Phase in einen 10 ml-Meßkolben pipettieren. Es ist darauf zu achten, daß keine Hexanphase durch die Kapillarkraft mitaufgenommen wird. Die Hexanphase wird anschließend noch zweimal mit je 3 ml Acetonitril/Wasser (1+1, v+v) extrahiert. Die vereinigten Acetonitril/Wasser-Phasen auf 10 ml auffüllen. Diese Lösung bei sehr scharfen Pulvern vor der Injektion in die HPLC verdünnen. In der Regel 10 µl Rosenpaprikapulverextrakt bzw. 20-100 µl Extrakt aus edelsüßem Pulver für die HPLC einsetzen.

#### *14.4.2.1.2 Oleoresine*

0,5 g Paprika-Oleoresin oder 0,2-0,5 g Capsicum-Oleoresin in ein Reagenzglas mit Schraubgewinde einwiegen. 2 ml n-Hexan und 3 ml Acetonitril/Wasser (1+1, v+v) zugeben und eine flüssig-flüssig-Verteilung wie unter *14.4.2.1.1* beschrieben mit 4 Verteilungsschritten durchführen, wobei die wäßrigen Phasen in einem 100 ml-Meßkolben gesammelt werden. Mit Acetonitril/Wasser (1+1, v+v) bis zur Marke auffüllen. Diese Lösung bei Capsicum-Oleoresinen noch 1:20 bis 1:40 verdünnen. Von Paprika-Oleoresinen in der Regel 50 - 100 µl, von Capsicum-Oleoresinen 10 - 20 µl injizieren.

### **14.4.2.2 Vereinfachte Probenvorbereitung (nur Extraktion)**

#### *14.4.2.2.1 Paprikapulver*

5 g Paprikapulver in einen 100 ml Rundkolben auf 0,01 g genau einwiegen, mit 40 ml Acetonitril/Wasser (1+1, v+v) oder Methanol/Wasser (7+3, v+v) und einigen Siedesteinchen versetzen und 2 Stunden unter Rückfluß extrahieren. Gelegentlich zwischendurch vorsichtig umschwenken.

Nach dem Abkühlen und Absitzen lassen (ca. 30 min) die überstehende Lösung vorsichtig durch einen vorher mit dem o. g. Lösungsmittel angefeuchteten Faltenfilter in einen 50 ml Meßkolben dekantieren. Den verbleibenden Extraktionsrückstand mit 5 ml Lösungsmittel nachwaschen, erneut absitzen lassen (ca. 5 min) und ebenfalls über den Filter in den



Meßkolben dekantieren. Den Filter mit dem Lösungsmittel nachspülen und den Kolben bis zur Marke mit dem Lösungsmittel auffüllen.

Injektionsvolumen: 10-20 µl

#### 14.4.2.2 *Oleoresine*

0,5 g Oleoresin in einen 250 ml Rundkolben auf 0,01 g genau einwiegen, mit 80 ml Lösungsmittel (Acetonitril/Wasser, 1:1, v/v) und einigen Siedesteinchen versetzen und 2 Stunden unter Rückfluß extrahieren. Gelegentlich vorsichtig umschwenken.

Nach dem Abkühlen (ca. 30 min) den Überstand in einen 100 ml Meßkolben filtrieren (Filter vorher mit dem Lösungsmittel anfeuchten), mit (Acetonitril/Wasser, 1+1, v+v) zur Marke auffüllen. Den Extraktionsrückstand mit dem Lösungsmittel nachwaschen, erneut filtrieren und den Kolben bis zur Marke mit dem Lösungsmittel auffüllen. Diese Lösung 1:10 verdünnen.

Injektionsvolumen: 20 µl

#### 14.4.2.3 **Frische Früchte**

Wegen der breiten Heterogenität der Capsaicinoidgehalte der Früchte müssen ggf. andere als die im folgenden genannten Verdünnungen bzw. Injektionsvolumina gewählt werden. Bei den u.g. Angaben handelt es sich um Werte, die in der Regel verwendet wurden und an den Capsaicinoidgehalt der jeweils untersuchten Früchte angepaßt waren.

##### 14.4.2.3.1 *Schnitzel*

Aus einer größeren Menge frischer Früchte die benötigte Anzahl entnehmen. Den Stiel bis kurz vor dem Ansatz abschneiden. Die Früchte nacheinander mit einem Küchenmesser oder Skalpelli in ca. 2 cm dicke Stücke direkt in die Schale eines Haushaltszerkleinerers (im Abzug, mit Handschuhen) schneiden; pro Portion etwa 50 bis 70 g. 10 x auf die Zerkleinerungstaste drücken. Den Deckel wegen des scharfen, beißenden Geruchs vorsichtig öffnen. Die Schnitzel in ein großes Becherglas überführen, gründlich durchmischen, je 10 g in kleinere Bechergläser (75 oder 100 ml) einwiegen und im offenen Gefäß unter den gewünschten Bedingungen lagern. Vor der weiteren Aufarbeitung (nach der Lagerung) den durch Wasserverlust bedingten Gewichtsverlust durch die entsprechende Menge an Wasser ausgleichen. Für die Nullwertbestimmung je 10 g direkt in Plastikzentrifugenbecher einwiegen und

30 ml Methanol zufügen. Dann die Schnitzel mit Hilfe eines Ultraturraxes zu einer „Pülpe“ zerkleinern: Stufe 4,5 - 5; je ca. 1,5 Minuten. Den Ultraturraxstab mit 5 Pasteurpipettenfüllungen Methanol abspülen und anschließend gründlich unter fließendem Wasser und Acetonnachspülung reinigen.

Die „Pülpe“ 30 min. stehen lassen. Dann Abnutschen mit Hilfe eines Büchnertrichters, in dem ein mit Methanol angefeuchtetes Filterpapier liegt. Die Pülpe in den Trichter geben. Den Becher mit 30 ml Methanol nachspülen. Durch Anlegen eines Wasserstrahlvakuum den letzten Rest Flüssigkeit entfernen. Den Auslauf des Trichters „von unten“ mit einer Pasteurpipettenfüllung Methanol abspülen.

Den Inhalt der Saugflasche mit Hilfe eines Glastrichters in einen 100 ml Meßkolben überführen. Die Saugflasche gründlich mit Methanol nachspülen und ebenfalls in den Meßkolben bis kurz unterhalb der Marke überführen. Den Kolben anschließend mit Methanol bis zur Marke auffüllen.

Diese Lösung mit Methanol/Wasser (7+3;v+v) 1:5 bzw. 1:10 vor der Injektion verdünnen.

Injektionsvolumen: 15 µl

#### *14.4.2.3.2 Hälften*

Pro Aufarbeitungstag und Aufarbeitung je 5 ganze Früchte aus einer größeren Probenmenge entnehmen. Die Stiele bis kurz vor dem Ansatz abschneiden. Anschließend die Früchte mit einem Skalpell so halbieren, daß jede Hälfte je eine Scheidewand aufweist und in zwei Gruppen aufteilen. Nur Früchte mit zwei Scheidewänden verwenden. Die erste Gruppe (Batch A) am selben Tag aufarbeiten, die andere zugehörige Gruppe (Batch B) in offenen Gefäßen (z. B. Petrischalen) lagern. Vor und nach der Lagerung das Gewicht bestimmen und vor der Aufarbeitung (Batch B) durch entsprechende Wasserzugabe ausgleichen.

Die halbierten Früchte mit einem Skalpell in ca. 2 cm dicke Stücke direkt in Plastikzentrifugenbecher schneiden. 90 ml Methanol zufügen und dieses Gemisch mit einem Pürierstab vorzerkleinern. Nach Abspülen des Stabes mit Methanol mit einem Ultraturraxstab vor allem zur Zerkleinerung der Samen fein zerkleinern.

Die weitere Aufarbeitung erfolgt wie bei den Schnitzeln beschrieben mit folgenden Änderungen:

- Nachspülmenge an Methanol 90 ml und
- Überführung der Extraktionslösung in 250 ml Meßkolben

Verdünnung: 1:10; Injektionsvolumen: 30 µl

#### 14.4.2.3.3 Hälften und ihre zugehörigen Schnitzel

Pro Aufarbeitungstag und Aufarbeitung je 5 ganze Früchte aus einer größeren Probenmenge entnehmen. Die Stiele bis kurz vor dem Ansatz abschneiden. Anschließend die Früchte mit einem Skalpell halbieren und in zwei Gruppen aufteilen und das Gewicht bestimmen. Nur Früchte mit zwei Scheidewänden verwenden. Die eine Gruppe als Hälften in offenen Probengefäßen (Batch A) lagern. Die Hälften der anderen zugehörigen Gruppe (Batch B) mit einem Skalpell in ca. 2 cm dicke Stücke schneiden, mit dem Haushaltszerkleinerer zu Schnitzeln zerkleinern, in Bechergläser überführen und unter denselben Bedingungen gleichzeitig mit Batch A lagern. Nach der Lagerung Batch A wie unter 14.4.2.3.2, Batch B wie unter 14.4.2.3.1 beschrieben aufarbeiten mit folgenden Änderungen:

- Nachspülmenge an Methanol 90 ml und
  - Überführung der Extraktionslösung in 250 ml Meßkolben
- Verdünnung: 1:5 bzw. 1:10; Injektionsvolumen: 10 - 50 µl

#### 14.4.2.3.4 Einzelne Früchte (Anbaustudie)

Pro Erntetag die gewünschte Anzahl Früchte auswählen. Das Gewicht und die Farbe notieren. Den Stiel jeder Frucht bis kurz vorm Ansatz abschneiden. Von jeder einzelnen Frucht Schnitzel herstellen und aufarbeiten wie unter 14.4.2.3.1 beschrieben. Vor der Injektion in die HPLC 1:5 mit Methanol/Wasser (7+3; v+v) verdünnen; Injektionsvolumen: 15 µl und 100 µl.

### 14.4.3 Quantifizierung

Die Quantifizierung der einzelnen Capsaicinoide erfolgt über die Kalibrierung mit der externen Standardsubstanz Pelargonsäurevanillylamid (PSVA).

#### 14.4.3.1 Stammlösung und Standardlösungen

Die Lösungen werden alle durch Lösen und Verdünnen mit Acetonitril/Wasser (1+1, v+v) hergestellt.

Herstellung der Stammlösung:

35 mg ( $\pm 0,1$  mg) PSVA werden in 100 ml des Lösungsmittels gelöst.

Herstellung der Standardlösung I:

5 ml der Stammlösung werden auf 250 ml verdünnt.

Herstellung einer Verdünnungsreihe:

Aus der Standardlösung I werden geeignete Verdünnungen hergestellt und zur Kalibrierung verwendet. Das nachfolgende Pipettierschema zeigt die in der Regel verwendeten Verdünnungsschritte, von denen meistens 20 µl injiziert wurden. Der lineare Kalibrierbereich sollte mindestens 5 Verdünnungsstufen umfassen.

	<b>Verdünnung</b>	<b>Konz. µg/ml</b>	<b>Konz. pmol/20 µl</b>
5 ml Standard- lösung I auf	20 ml	1,75	119,3
	25 ml	1,40	95,4
	50 ml	0,70	47,7
	100 ml	0,35	23,9
	250 ml	0,14	9,5

Die Konzentrationen der Standardlösungen können entsprechend der Empfindlichkeit des verwendeten Fluoreszenzdetektors anders gewählt werden. Meistens wurden während der Chromatographie einer Untersuchungsreihe abwechselnd je 1-2 Standardlösungen und nachfolgend 2-3 Probelösungen injiziert.

#### 14.4.3.2 Berechnung des Capsaicinoidgehaltes

Die Quantifizierung von Capsaicin, Dihydrocapsaicin und Nordihydrocapsaicin und ggf. der Minorcapsaicinoide erfolgt über die nach 14.4.3.1 aufgenommene Kalibriergerade. Die Konzentration an Capsaicin, Dihydrocapsaicin und Nordihydrocapsaicin wird zunächst als Konzentration PSVA ausgedrückt. Da sich bei allen Capsaicinoiden aufgrund des identischen fluoreszierenden Vanillylrestes dieselbe molare Fluoreszenzausbeute ergibt, kann unter Berücksichtigung der Molmassen durch Umrechnungsfaktoren die Konzentration der einzelnen Capsaicinoide berechnet werden.

Als molare Massen werden hierbei folgende Werte zu Grunde gelegt:

Capsaicin 305,4 g/mol, Dihydrocapsaicin 307,4 g/mol, Nordihydrocapsaicin 293,4 g/mol,  
Decansäurevanillylamid 307,4 g/mol, Homocapsaicin 319,4 g/mol,  
Homodihydrocapsaicin 321,4 g/mol

Die Gehalte der einzelnen Capsaicinoide, angegeben als Massenanteil in  $\mu\text{g/g}$  bzw.  $\text{mg/kg}$  Probe, werden nach folgender Formel berechnet:

$$w_n = \frac{(y_n - b) \cdot V_G \cdot MM_n}{v_i \cdot m \cdot E \cdot 1000}$$

mit

- $w_n$  = Konzentration der Einzelkomponente in  $\mu\text{g/g}$  Paprikapulver  
 $y_n$  = Peakfläche der Einzelkomponente in Integriereinheiten (Fläche)  
 $MM_n$  = Molmasse der Einzelkomponente (g/mol)  
 $m$  = Steigung der Kalibriergeraden (Integriereinheiten (Fläche) / pmol)  
 $b$  = Ordinatenabschnitt der Kalibriergeraden in Integriereinheiten (Fläche)  
 $E$  = Einwaage der Probe in g  
 $V_G$  = Gesamtvolumen der Probelösung in ml  
 $v_i$  = Injektionsvolumen in  $\mu\text{l}$

Der Gesamtgehalt  $w_G$  ( $\text{mg/kg}$ ) berechnet sich als Summe der Konzentrationen für Capsaicin, Dihydrocapsaicin und Nordihydrocapsaicin (plus ggf. der Minorcapsaicinoide):

$$w_G = \sum_n w_n$$

## 14.5 Gaschromatographie

### 14.5.1 Chromatographische Ausrüstung

#### 14.5.1.1 Stickstoffselektive Detektion

Gaschromatograph:	Varian 3700
Injektor:	Kaltaufgabesystem (KAS) mit Lösungsmittelausblendung und Split, ohne Kühlung
Detektor:	Varian TSD
Integratoren:	Merck-Hitachi D 2000 Chromato-Integrator und Hewlett-Packard HP 3396 A

Trennsäule:	HP 5 25 m, ID 0,32 mm, 0,17µm Filmdicke; Hewlett-Packard
Detektortemperatur:	290 °C
Temperaturprogramm:	230 °C/10 min - 20 °C/min - 290 °C/1min
Trenngas:	He 5.0, 0,6 bar Vordruck
Brenngas:	H <sub>2</sub> : 4,5 ml/min Luft: 175 ml/min
Make-up-Gas:	He 5.0, 25 ml/min

#### Einstellungen am KAS:

Aufgabetemperatur:	70 °C
1. Aufheizrate:	2 °C/s
1. Haltetemperatur:	75 °C
1. Haltezeit:	10 s
2. Aufheizrate:	10 °C/s
2. Haltetemperatur:	300 °C
2. Haltezeit:	150 s
Betriebsart:	110 mit Lösungsmittelausblendung und Split (1:5), ohne Kühlung

### **14.5.1.2 Massenspektrometrie**

#### *14.5.1.2.1 Massenfragmente der derivatisierten Capsaicinoide*

Gaschromatograph:	Hewlett Packard 5890
Splitverhältnis:	1:1
Detektor:	Hewlett Packard HP 5970 ; EI, 70 eV
Trennsäule:	DB 5 30 m, ID 0,32 mm, 0,25µm Filmdicke; J&W Scientific mit Restriktionssäule (methyldesaktiviert, ID 0,25 mm)
Säulenvordruck:	60 - 70 kPascal

Temperaturprogramm: 50 °C/2 min - 25 °C/min - 200 °C/10 min  
5 °C/min - 230 °C/15 min  
15 °C/min - 270 °C/ 5 min

Scanbereich: 40 - 350 m/z

Trenngas: He 5.0

#### 14.5.1.2.2 Proben (underivatisiert)

Gaschromatograph: Hewlett Packard 5890 Serie II

Injektor: on-column, Stahlnadelaufsatz, oven-track-Modus

Detektor: Hewlett Packard HP 5971 A; EI, 70 eV

Trennsäule: DB 5 30 m, ID 0,25 mm, 0,25µm Filmdicke; J&W Scientific

Vorsäule: 3 m, ID 0,53 mm, methyldesaktiviert

Säulenvordruck: 41,3 kPa=1,0 ml/min=39,8 cm/s bei 55 °C, flußreguliert

Temperaturprogramm: 55 °C/1 min - 50 °C/min - 220 °C/0 min  
5 °C/min - 280 °C/3 min

Solvent Delay: 7 min

Trenngas: He 5.0

SIM-Mode: 137 m/z, 152 m/z, 195 m/z

## 14.5.2 Probenvorbereitung

### 14.5.2.1 Flüssig-Flüssig-Verteilung (mit Ausschütteln)

Die Proben zunächst wie unter *14.4.2.1.1* beschrieben aufarbeiten, wobei die flüssig-flüssig-Verteilung zwischen n-Hexan und Methanol/Wasser (7+3, v+v) erfolgt. Die vereinigten Methanol/Wasser-Phasen allerdings nicht in einem 10 ml-Meßkolben sammeln, sondern in einem Scheidetrichter und mit 6 ml gesättigter Natriumchloridlösung zur besseren Phasentrennung versetzen. Anschließend dreimal mit je 15 ml Cyclohexan (bzw. Diethylether) ausschütteln.

Die gesammelten organischen Phasen über Natriumsulfat trocknen, filtrieren und nach Zugabe von 2,5 ml internem Standard (10 mg TRI/100 ml Cyclohexan/Aceton; 1+1, v+v) mit Cyclohexan (bzw. Diethylether) auf 50 ml auffüllen.

Von dieser Lösung 1 µl in den GC injizieren.

### 14.5.2.2 Vereinfachte Aufarbeitung (nur Extraktion)

2 g Rosenpaprikapulver in einen 100 ml Rundkolben einwiegen und mit 20 ml Ethylacetat (bzw. Methanol) 2 h unter Rückfluß extrahieren. Nach dem Abkühlen den Überstand in einen Spitzkolben dekantieren und den Rückstand zweimal mit je 5 ml Ethylacetat (bzw. Methanol) nachwaschen. Den Extrakt anschließend auf ca. 1-2 ml einrotieren, in einen 10 ml Meßkolben überführen und bis zur Marke mit dem entsprechenden Lösungsmittel auffüllen.

## 14.5.3 Quantifizierung

Die Quantifizierung der einzelnen Capsaicinoide erfolgt über die Kalibrierung mit der externen Standardsubstanz Pelargonsäurevanillylamid (PSVA).

### 14.5.3.1 Standardlösungen

Kalibrierstandard:

10 mg PSVA in 100 ml Cyclohexan/Aceton (1+1, v/v) lösen und 1:10 verdünnen.

Interner Standard (IS):

10 mg 2,4,6-Triphenoxy-1,3,5-triazin in 100 ml Cyclohexan/Aceton (1+1, v/v) lösen und 1:10 verdünnen.



Herstellung einer Verdünnungsreihe:

Aus dem Kalibrierstandard und IS die nachfolgenden Verdünnungen herstellen.

<b>Kalibrierstandard</b>	<b>IS</b>	<b>Cyclohexan/Aceton (1+1, v/v)</b>	<b>Konz. PSVA</b>
<b>µl</b>	<b>µl</b>	<b>µl</b>	<b>µg/ml</b>
950	50	---	1,9
750	50	200	1,5
600	50	350	1,2
300	50	650	0,6
100	50	850	0,2

Die Peakflächen des Kalibrierstandards werden mit den Peakflächen des IS ins Verhältnis gesetzt. Die Konzentrationen der Lösungen werden gegen diese Verhältnisse aufgetragen und es wird eine lineare Regressionsgerade berechnet.

#### 14.5.3.2 Berechnung des Capsaicinoidgehaltes

Die Quantifizierung von C, DC und NDC erfolgt über die nach 14.5.3.1 aufgenommenen Kalibriergerade.

Die Peakfläche jedes Capsaicinoids wird mit der Peakfläche des IS ins Verhältnis gesetzt. Mit dem so erhaltenen Verhältnis wird mit Hilfe der Regressionsgerade die Konzentration in µg/ml ( $w_n$ ) berechnet.

Der Gesamtgehalt  $w_G$  (mg/kg) berechnet sich als Summe der Konzentration von C, DC und NDC unter Berücksichtigung der Probeneinwaage und des Gesamtvolumens (50 ml).

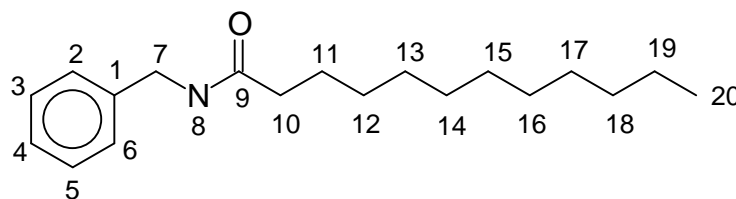
$$w_G = \sum_n \frac{w_n \cdot 50}{\text{Einwaage}(g)}$$

## 14.6 Synthese von Laurinsäurebenzylamid <sup>129</sup>

0,5 g Dodecylsäurechlorid in 10 ml wasserfreiem Tetrahydrofuran (THF) lösen. Tropfenweise mit einer Lösung von 2 g Benzylamin in 10 ml THF versetzen und kräftig durchschütteln. Nach 10 min diese Reaktionsmischung in Eiswasser gießen, mit verdünnter Salzsäure schwach ansäuern, absaugen und mit Wasser neutral waschen. Das Reaktionsprodukt aus Ethanol umkristallisieren und im Hochvakuum trocknen.

Der Schmelzpunkt wurde überprüft. Er betrug 88°C (laut Literatur<sup>129</sup> : 89 °C).

<sup>1</sup>H-NMR (400,1 MHz, CD<sub>2</sub>CL<sub>2</sub>): δ = 7.25-7.35 (m, 5 H, CH-arom.); 5.79 (s, 1H, NH breit); 4.40 (d, 2H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5.8 Hz, CH<sub>2</sub>-7); 2.18 (t, 2H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.3 Hz, CH<sub>2</sub>-10); 1.61 (tt, 2H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.3 Hz, CH<sub>2</sub>-11); 1.2-1.4 (m, 16H, CH<sub>2</sub>-12/13/14/15/16/17/18/19); 0.88 (t, 3H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.7 Hz, CH<sub>2</sub>-20).



<sup>13</sup>C-NMR (100,6 MHz, CD<sub>2</sub>CL<sub>2</sub>): δ = 172.98 (s, C-9.); 139.36 (s, C-1); 127.90 (d, C-2/6); 128.89 (d, C-3/5); 127.58 (d, C-4); 43.62 (t, C-7); 37.00 (t, C-10); 32.26 (t, C-11), 29.95, 29.85, 29.71, 29.67, 29.65, 26.09, 23.01 (8 \* t. C-12/13/14/15/16/17/18/19; 14.19 (q, C-20).

## 14.7 Bestimmung der ASTA-Farbwerte <sup>69</sup>

Photometer: Zweistrahl Photometer DM 4  
Carl Zeiss Industrielle Meßtechnik GmbH, Oberkochen

70 - 100 mg Pulver in einen 100 ml Meßkolben einwiegen. Mit Aceton bis zur Marke auffüllen, schütteln und 16 h bei Raumtemperatur im Dunkeln stehen lassen. Ein Aliquot in eine Küvette füllen. Mit einem Photometer gegen eine mit Aceton gefüllte Küvette bei 460 nm messen. Die gemessene Extinktion muß zwischen 0,30 und 0,70 liegen. Liegt sie darüber, die Probelösung verdünnen, liegt sie darunter mehr Pulver einwiegen.

Der ASTA-Farbwert wird folgendermaßen berechnet:

$$ASTA = \frac{E_x \cdot 16,4}{Einwaage(g)}$$

mit

$E_x$  = Extinktion bei 460 nm

## 15 Literaturverzeichnis

- 1 Oberdieck R (1988) *Fleischwirtsch* 68:1086-1096
- 2 Täufel A, Ternes W, Tunger L, Zobel M (1993) *Lebensmittellexikon* (Band 2).  
3. Auflage. Behr's Verlag Hamburg, S. 282-283
- 3 Steer G (1995) *Chili-Küche*. Könenmann Verlagsgesellschaft mbH Köln, S 12-17
- 4 Gööck R (1965) *Das Buch der Gewürze*. Mosaik Verlag Hamburg, S 147-152
- 5 Gassner G (1989) *Mikroskopische Untersuchung pflanzlicher Lebensmittel*,  
5. Auflage. Gustav Fischer Verlag Stuttgart New York, S 262-266
- 6 Bosland PW (1992) *Hort Technology* 2:6-10
- 7 Brücher H (1977) *Tropische Nutzpflanzen*. Springer Verlag Berlin Heidelberg,  
S 433-444
- 8 Daßler E, Heitmann G (1991) *Obst und Gemüse - eine Warenkunde Paprika*  
(Gemüse-, Gewürz- und Tomatenpaprika) 4.Aufl. Paul Parey Berlin/Hamburg,  
S 231-236
- 9 Stella A (1999) *Das Buch der Gewürze*. Heyne Verlag München
- 10 Täufel A, Ternes W, Tunger L, Zobel M (1993) *Lebensmittellexikon* (Band 1).  
3. Auflage. Behr's Verlag Hamburg, S. 318 und S. 575
- 11 Govindarajan VS, Rajalakshmi D, Chand N (1987) *CRC Crit Rev Food Sci Nutr*  
25:185-283
- 12 Jurenitsch J, Kubelka W, Jentsch K (1979) *Planta Med* 35:174-183
- 13 Govindarajan VS, Rajalakshmi D, Chand N (1987) *CRC Crit Rev Food Sci Nutr*  
24:313-355
- 14 Collins M, Bosland P (1994) *Capsicum and Eggplant Newsletter* 13:48-51
- 15 Suzuki T, Iwai K (1984) *Constituents of Red Pepper Species: Chemistry,*  
*Biochemistry, Pharmacology and Food Science of the Pungent Principle of Capsicum*  
*Species*. In: Brossi A (Hrsg) *The Alkaloids* (Band 23), 4. Kapitel, Academic Press  
New York
- 16 Kosugue S, Furuta M (1970) *Agric Biol Chem* 34:248-256
- 17 Kirby GW, Walker GT (1994) *Phytochemistry* 36:185-187
- 18 Jurenitsch J (1979) *Sci Pharm* 46:31-36
- 19 Jurenitsch J, Leinmüller R (1980) *J Chromatogr* 189:389-397
- 20 Krajewska AM, Powers J (1988) *J Food Sci* 53:313-333
- 21 Bosland PW (1993) *Capsicum and Eggplant Newsletter* 12:25-31
- 22 Attuquayefio VK (1986) *Dissertation Abstracts International* 47:1808
- 23 Hermes P (1995) *Ökotest* (11/95):36-49
- 24 Siewek F (1990) *Exotische Gewürze*. Birkhäuser Verlag Basel
- 25 Lindner E (1986) *Toxikologie der Nahrungsmittel* 3. Auflage. Thieme Verlag Stuttgart  
New York, S 47

- 26 Gal IE (1968) *Z Lebensm Unters Forsch* 138:86-92
- 27 Schormüller J (1979) *Handbuch der Lebensmittelchemie (Band 6) Alkaloidhaltige*  
28 *Genußmittel, Gewürze, Kochsalz, Springer Berlin Heidelberg, S 531-538*
- 29 Sukrasno N, Yeoman MM (1993) *Phytochemistry* 32(4):839-844
- 30 Huffmann VL, Schadle ER, Villalon B, Burns EE (1978) *J Food Sci* 43:1809-1811
- 31 Iwai K, Suzuki T, Fujiwake H (1979) *Agric Biol Chem* 43:2493-2498
- 32 Fujiwake H, Suzuki T, Iwai K (1982) *Agric Biol Chem* 46:2591-2592
- 33 Leete E, Loudon CL (1968) *J Am Chem Soc* 90:6837-6841
- 34 Rangoonwala R (1969) *Pharmazie* 24:177
- 35 Benett DJ, Kirby GW (1968) *J Chem Soc (C)*: 442-446
- 36 Kopp B, Jurenitsch J (1981) *Planta Med* 43:272-279
- 37 Ochoa-Alejo N, Gomez-Peralta JE (1993) *J Plant Physiol* 141:147-152
- 38 Iwai K, Suzuki T, Fujiwake H (1979) *Agric Biol Chem* 43:2493-2498
- 39 Suzuki T, Kawada T, Iwai K (1981) *Agric Biol Chem* 45 (2): 535-537
- 40 Iwai K, Lee KR, Kobatashi M, Suzuki T (1977) *Agric Biol Chem* 41:1873-1876
- 41 Estrada B, Pomar F, Diaz J, Merino F, Bernal A (1997) *Capsicum and Eggplant*  
42 *Newsletter* 16:60-63
- 43 Estrada B, Pomar F, Diaz J, Merino F, Bernal MA (1998) *J Hortic Sci Biotechnology*  
44 *73 (4): 493-497*
- 45 Estrada B, Pomar F, Diaz J, Merino, Bernal MA (1999) *Sci Hortic* 81:385-396
- 46 Estrada B, Diaz J, Merino F, Bernal MA (1999) *Capsicum and Eggplant Newsletter*  
47 *18:28-31*
- 48 Estrada, B, Mernal MA, Diaz J, Pomar F, Merino F (2000) *J Agric Food Chem*  
49 *48:6234-6239*
- 50 El-Saeid HM (1995) *Egypt J Hort* 22 (1):11-18
- 51 Contreras-Padilla M, Yahia EM (1998) *J Agric Food Chem* 46:2075-2079
- 52 Bernal MA, Calderon AA, Pedreno MA, Munoz R, Barcelo AR, de Caceres FM  
53 (1993) *J Food Sci* 58:611-613 + 679
- 54 Bernal MA, Calderon AA, Pedreno MA, Munoz R, Barcelo AR, de Caceres FM  
55 (1993) *J Agric Food Chem* 41:1041-1044
- 56 Bernal MA, Calderon AA, Pedreno MA, Ferrer MA, de Caceres FM, Barcelo AR  
57 (1994) *Z Lebensm Unters Forsch* 199:240-242
- 58 Pomar F, Bernal MA, Merino F (1997) *Phytochemistry* 46:1313-1317
- 59 Bernal MA, Barcelo AR (1996) *J Agric Food Chem* 44:3085-3089
- 60 Bernal MA, Calderon AA, Ferrer MA, de Caceres FM, Barcelo AR (1995) *J Agric*  
61 *Food Chem* 43:352-355
- 62 Tateba H, Mihara S (1991) *Agric Biol Chem* 55(3):873-874
- 63 Lindsey K, Bosland PW (1995) *Capsicum and Eggplant Newsletter* 14:36-38
- 64 Harvell KP, Bosland PW (1997) *Hort Science* 32:1292

- 56 Zewdie Y, Bosland PW (2000) *Euphytica* 111:185-190
- 57 Quagliotti L (1971) *Hort Res* 11:93-97
- 58 Bosland PW (1994) Chiles: history, cultivation and uses. In: Charalambous G (Hrsg) *The Developments in Food Science; Spices, Herbs and Edible Fungi* (Band 34). Elsevier Science B.V., S 347-366
- 59 Lease JG, Lease EJ (1962) *Food Techn* 11:104-106
- 60 Wilkins CK (1992) *Lebensm-Wiss u Technol* 25:219-223
- 61 Tainter DR, Grenis AT (1993) *Spices and Seasonings*. 4. Kapitel, VCH-Verlagsgesellschaft Weinheim
- 62 van Ruth SM, Roozen JP (1994) *Food Chem* 51:165-170
- 63 Zimmermann M, Schieberle P (1999) *Eur Food Res Technol* 211:175-180
- 64 Zimmermann M, Schieberle P (2000) *Lebensmittelchemie* 54:101-120
- 65 Markus F, Daood HG, Kapitany J, Biacs (1999) *J Agric Food Chem* 47:100-107
- 66 Rodrigues P, Morais H, Mota T, Olivera S, Forgacs E, Cserhati T (1998) *Anal Chim Acta* 372:411-416
- 67 Deli J, Toth G (1997) *Z Lebensm Unters Frosch A* 205:388-391
- 68 Geister H (1989) *Fleischwirtsch* 69:1380-1382
- 69 American Spice Trade Association (1985) *Extractable Color in Capsicums and Their Oleoresins, Method 20.1. Official analytical methods of the American Spice Trade Association*. 3. Aufl. ASTA Ind. Englewood Cliffs, N. J.
- 70 Berger-Schunn A (1991) *Praktische Farbmessung* Muster-Schmidt Verlag, Göttingen Zürich
- 71 DiCecco JJ (1976) *J Assoc Off Anal Chem* 59:1-4
- 72 Hawer WS, Ha J, Hwang J, Nam Y (1994) *Food Chem* 49:99-103
- 73 Lee KR, Suzuki T, Kobaski M, Hasegawa K, Iwai K (1976) *J Chrom* 123:119.128
- 74 Wahab ABA (1984) *MARDI Res Bull* 12:290-297
- 75 Thomas BV, Schreiber AA, Weisskopf CP (1998) *J Agric Food Chem* 46:2655-2615
- 76 Lopez-Hernandez J, Oruna-Concha J, Simal-Lozano J, Gonzalez-Castro MJ, Vazquez-Blanco ME (1996) *Dtsch Lebensm Rdsch* 12:393-395
- 77 Weaver KM, Awde DB (1986) *J Chromatogr* 367:438-442
- 78 Todd jr. PH, Bensinger MG, Biftu T (1977) *J Food Sci* 53:902-905
- 79 Müller-Stock A, Joshi RK, Büchi J (1971) *J Chromatogr* 63:281-287
- 80 Sticher O, Soldati F, Joshi RK (1978) *J Chromatogr* 166:221-231
- 81 Jurenitsch J, Leinmüller R (1980) *J Chromatogr* 189:389-397
- 82 Attuquayefio VK, Buckle KA (1987) *J Agric Food Chem* 35:777-779
- 83 Law MW (1983) *J Assoc Off Anal Chem* 66:1304-1306
- 84 Collins MD, Wasmund LM, Bosland PW (1995) *Hort Science* 30:137-139
- 85 Jurenitsch J, Kubelka W, Jentzsch K (1978) *Sci Pharm* 46:307-318
- 86 Woodbury JE (1980) *J Assoc Off Anal Chem* 63:556-558

- 87 Hoffmann PG, Lego MC, Galetto WG (1983) *J Agric Food Chem* 31:1326-1330
- 88 Organisation for Standardization (1993) Draft International Standard ISO/DIS 7543-1
- 89 Iwai K, Suzuki T, Fujiwake H (1979) *J Chromatogr* 172:303-311
- 90 Peusch M (1997) Dissertation Bergische Universität GH Wuppertal
- 91 Peusch M, Müller-Seitz E, Petz M (1996) *Lebensmittelchemie* 50:112-115
- 92 Scoville WL (1912) *J Am Pharm Assoc* 1:453
- 93 Peusch M, Müller-Seitz E, Petz M (1996) *Z Lebensm Unters Forsch* 202:334-336
- 94 Krajewska AM, Powers JJ (1987) *J Chromatogr* 409:223-233
- 95 Suzuki JI, Tausig F, Morse RE (1957) *Food Technol* 11:100-104
- 96 American Spice Trade Association (1985) Pungency of Capsicums and Their Oleoresins (Scoville Heat Test), Method 21.0. Official analytical methods of the American Spice Trade Association. 3. Aufl. ASTA Ind. Englewood Cliffs, N. J.
- 97 Todd jr. PH, Perun C (1961) *Food Technol* 15:270
- 98 Grushka E, Kapral P (1977) *Separ Sci Technol* 12 (4):415-423
- 99 Krajewska AM, Powers JJ (1987) *J Assoc Off Anal Chem* 70:926-928
- 100 Wang EC, Huang KC, Leou SP, Tsai YC (1996) *J Chin Chem Soc* 43:277-279
- 101 Krajewska AM, Powers JJ (1988) *J Chromatogr* 457:279-286
- 102 Krajewska AM, Powers JJ (1986) *J Chromatogr* 367:267-270
- 103 Wood AB (1987) *Flavour Fragrance J* 2:1-12
- 104 Weaver KM, Luker RG, Neale ME (1984) *J Chromatogr* 301:288-291
- 105 Weaver KM, Awde DB (1986) *J Chromatogr* 367:438-442
- 106 Constant HL, Cordell GA (1995) *Journal of Natural Products* 58:1925-1928
- 107 Parrish M (1996) *J AOAC Int* 79:738-745
- 108 American Spice Trade Association (1985) Pungency of Capsicums and their oleoresins (HPLC), Method 211. Official Analytical Methods of the American Spice Trade Association. 3. Aufl. ASTA, Inc. Englewood Cliffs, NJ, USA
- 109 Organization for Standardization (1993) Draft International Standard ISO/DIS 7543-2
- 110 Saria A, Lembeck F, Skofitsch G (1981) *J Chromatogr* 208:41-46
- 111 Johnson EK, Thompson HC, Bowman MC (1982) *J Agric Food Chem* 30:324-329
- 112 Collins MD, Wasmund LM, Bosland PW (1995) *Hort Sci* 30:137-139
- 113 Cooper TH, Guzinski JA, Fisher C (1991) *J Agric Food Chem* 39:2253-2256
- 114 Lu J, Cwik M (1997) *J Chromatogr B* 701:135-139
- 115 Manual des Elektrochemischen Detektors Merck L-3500 A, Version 2.1 (2/96)
- 116 Kawada T, Watanabe T, Katsura K, Takami H, Iwai K (1985) *J Chromatogr* 329:99-105
- 117 Chiang GH (1979) *J Food Sci* 51:499-503
- 118 Vogelgesang J (1992) Avenue des Tranquets 152, B-1150 Brüssel
- 119 Naumer H, Heller W (1990) *Untersuchungsmethoden in der Chemie (Einführung in die moderne Analytik)* 2. Auflage. Georg Thieme Verlag Stuttgart New York, S 46-50

- <sup>120</sup> Butte W, Eilers J, Kirsch M (1982) *Analytical Letters* 15 (A10):841-850
- <sup>121</sup> Tanaka FS, Wien RG (1973) *J Chromatogr* 87:85-93
- <sup>122</sup> Vosmann K, Klein E, Weber N (1997) *J Chromatogr A* 773:239-247
- <sup>123</sup> Richtlinie 94/36/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 30.Juni 1994 über Farbstoffe, die in Lebensmittel verwendet werden dürfen. Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften Nr. L 237/13 vom 10.09.1994
- <sup>124</sup> Richtlinie 95/45/EG der Kommission vom 26. Juli 1995 zur Festlegung spezifischer Reinheitskriterien für Lebensmittelfarbstoffe. Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaft Nr. L 226 vom 22.09.1995
- <sup>125</sup> Richtlinie 2001/50/EG der Kommission vom 3.Juli 2001 zur Änderung der Richtlinie 95/45/EG zur Festlegung spezifischer Reinheitskriterien für Lebensmittelfarbstoffe. Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaft Nr. L 190/14 vom 12.07.2001
- <sup>126</sup> Zewdie Y, Bosland PW (2001) *Biochem Systematic and Ecology* 29:161-169
- <sup>127</sup> Rymal KS, Cospier RD, Smith DA (1984) *J Assoc Off Anal Chem* 67:658-659
- <sup>128</sup> International Organisation for Standardization (1984) International Standard ISO 7540; Ground (powdered) paprika (*Capsicum annum* Linnaeus)-Specification [ISO 7540-1984 (E)]. Behr's Verlag Berlin
- <sup>129</sup> Organikum (1988), 17. Auflage VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften Berlin, S 412 und 618



## Anhang

### 16 Capsaicinoidgehalte und -muster frischer Paprikafrüchte

n: Anzahl der Einzelfrüchte bzw. Fruchthälften

Tab. 48: Gesamtcapsaicinoidgehalte (mg/kg Frischgewicht) und -muster aus Einzelfrüchten

gesamt (mg/kg)	C %	DC %	NDC %	n	Herkunftsland (Kaufdatum)	Farbe
169,3	55,4	39,9	4,6	5	Spanien (211098)	rot
154,2	53,5	41,7	4,8	5		
249,7	53,6	41,7	5,2	5		
196,2	52,9	38,9	6,6	20		
248,8	54,5	38,9	6,6	20		
227,3	54,9	38,1	7,0	20		grün
205,5	47,2	42,6	10,2	1		
246,5	46,5	41,5	12,0	1		
258,8	45,5	42,7	11,7	1		orange
189,6	58,7	32,8	8,5	1		
192,2	51,4	38,0	10,6	1		orange- grün
373,1	49,6	41,9	8,4	1		
263,8	62,8	31,3	5,9	1	rot	
287,3	61,7	33,0	5,3	1		
22,7	47,7	33,2	19,1	3	Griechenland (200299)	grün
47,0	55,3	30,8	13,9	3		
27,1	52,0	29,7	18,3	3		
284,5	61,1	32,0	7,0	1	Jordanien (060199)	grün
147,8	51,1	35,1	13,9	1		
231,8	56,2	34,4	9,3	1		
252,7	60,1	26,3	13,6	1	Holland (270799)	grün
299,9	61,3	28,2	10,5	1		
243,7	62,5	26,0	11,5	1		
129,1	57,1	34,1	8,8	1	Türkei (251198)	grün
61,8	57,6	32,3	10,1	1		

Tab. 49: Capsaicinoidgehalte (mg/kg Frischgewicht) und -Muster aus Fruchthälften (jeweils nur eine Hälfte berücksichtigt)

<b>gesamt (mg/kg)</b>	<b>C %</b>	<b>DC %</b>	<b>NDC %</b>	<b>n</b>	<b>Herkunftsland (Kaufdatum)</b>	<b>Farbe</b>
234,6	56,5	37,1	6,4	10	Spanien (211098)	rot
212,5	57,2	37,0	5,8	10		
159,0	60,3	33,9	5,8	10		
93,4	58,4	32,6	9,1	8	Spanien (290699)	rot
97,0	55,7	34,5	9,8	8		
206,7	63,3	32,3	4,4	2	Israel (190599)	rot
294,2	53,1	40,4	6,5	2		
310,5	61,4	33,6	5,1	2		
222,8	61,5	33,1	5,3	5		
223,6	58,5	36,9	4,5	2	Ägypten (250599)	rot
285,6	58,5	37,0	4,5	2		
328,6	60,6	33,7	5,7	2		
268,8	58,6	34,1	7,3	5		
322,9	61,9	33,0	5,1	5		
307,5	65,1	26,9	8,0	5	Holland (270799)	grün
221,6	64,6	26,9	8,5	5		
200,1	68,4	25,7	6,0	5		
235,5	64,4	28,6	7,0	5		
181,1	66,0	25,0	9,0	5	Holland (250899)	grün
241,5	67,4	24,7	7,9	5		
265,5	68,2	27,2	4,6	8	Italien (210999)	rot
116,8	67,7	27,8	4,4	8		
190,3	67,0	27,8	5,2	8		

Tab. 50: Capsaicinoidgehalte und -muster (C, DC und NDC) der Früchte aus Gewächshausanbau, sortiert nach Tagen nach der Blüte und aufsteigendem Capsaicinoidgehalt, höchster und niedrigster Wert fettgedruckt

Tage nach der Blüte	gesamt (mg/kg)	C %	DC %	NDC %
<b>33 - 42</b>	<b>194,0</b>	52,9	34,1	13,0
	216,1	45,6	34,3	14,6
	260,6	48,8	36,3	15,0
	339,0	48,8	36,7	14,5
	342,5	47,7	32,9	19,5
	355,1	51,6	35,7	12,7
	367,9	39,9	40,5	19,6
	429,3	46,0	38,5	11,4
	447,3	52,5	36,0	11,4
	448,6	50,7	36,6	12,7
	465,3	53,2	35,1	11,7
	474,3	45,1	39,4	15,5
	483,3	48,3	38,1	13,5
	513,4	<b>37,6</b>	<b>41,7</b>	<b>20,6</b>
	536,7	52,5	35,9	11,6
813,2	45,7	39,2	15,0	
<b>62-66</b>	282,2	47,9	38,1	14,0
	349,7	42,3	40,8	17,0
	563,5	<b>58,3</b>	<b>29,6</b>	12,0
	<b>814,1</b>	51,8	35,8	12,3
<b>Nachblüte</b>	247,5	45,2	40,4	14,4
	532,1	49,4	40,1	10,1
	536,4	48,0	39,9	12,1
	563,3	48,7	37,9	13,4
	593,6	51,5	36,1	12,4
	668,8	50,2	36,9	12,9
	777,7	52,9	37,5	<b>9,5</b>

Tab. 51: Capsaicinoidgehalte und -muster (C, DC, NDC, HomoC, DSVA, HomoDC I und HomoDC II) der Früchte aus Gewächshausanbau, sortiert nach aufsteigendem Capsaicinoidgehalt, niedrigster und höchster Wert jeweils fettgedruckt

gesamt (mg/kg)	C %	DC %	NDC %	HomoC %	DSVA %	HomoDC I %	HomoDC II %
<b>214,7</b>	47,8	30,8	11,7	2,9	1,9	1,0	3,8
228,6	43,1	32,4	13,8	<b>3,2</b>	<b>2,3</b>	1,2	4,1
236,5	45,8	41,1	13,0	2,2	1,4	1,1	4,3
290,1	43,8	32,6	13,5	3,0	1,8	1,1	4,2
312,2	43,9	33,6	13,9	2,5	1,7	1,0	3,5
313,1	43,2	34,3	12,7	2,5	2,5	1,1	3,9
329,9	48,2	<b>30,1</b>	13,3	2,6	1,5	0,9	3,5
372,8	44,3	33,4	13,2	2,7	1,6	0,9	3,8
379,1	38,1	34,0	16,7	2,7	2,3	<b>1,6</b>	4,5
390,1	46,9	32,5	11,6	2,8	1,8	1,1	3,2
400,4	42,7	34,5	14,1	2,5	1,6	1,0	3,7
403,9	45,0	33,3	13,8	2,0	1,1	0,7	4,2
406,4	<b>36,1</b>	36,7	<b>17,8</b>	2,0	1,7	1,2	<b>4,6</b>
445,5	44,7	<b>37,4</b>	<b>10,6</b>	2,4	1,2	0,7	3,0
480,8	48,9	33,5	<b>10,6</b>	2,3	<b>1,0</b>	0,7	2,9
492,0	46,2	33,4	11,6	2,7	1,8	1,0	3,3
508,5	48,7	32,1	10,7	2,9	1,9	1,0	2,7
522,8	44,7	35,3	12,5	2,3	1,3	0,7	3,2
552,1	47,6	38,6	10,2	1,9	1,3	0,7	<b>2,9</b>
559,4	46,1	38,2	11,6	2,1	2,4	0,8	3,2
584,9	48,2	33,0	10,6	2,7	1,5	0,9	3,1
592,6	46,3	36,0	12,7	2,2	<b>2,5</b>	0,9	4,0
619,2	49,3	34,6	11,9	2,3	1,4	0,7	3,4
650,0	<b>50,2</b>	31,9	11,1	2,2	1,1	0,6	<b>2,9</b>
<b>871,1</b>	42,7	36,6	14,0	<b>1,7</b>	1,2	<b>0,5</b>	3,2

## 17 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
MeCN	Acetonitril
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
ASTA	American Spice Trade Association
C	Capsaicin
CIE	Commission Internationale de l'Éclairage (internationale Beleuchtungskommission)
CiVA	Citronellsäurevanillylamid
DC	Dihydrocapsaicin
DSVA	Decansäurevanillylamid
ELCD	Elektrochemischer Detektor
FID	Flammenionisationsdetektor
GC	Gaschromatographie
HomoC	Homocapsaicin
HomoDC	Homodihydrocapsaicin
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
HRGC	High Resolution Gas Chromatography
HZ	Hertz
ID	Innendurchmesser
IS	Interner Standard
ISO	International Organization for Standardization
LsBA	Laurinsäurebenzylamid
MeOH	Methanol
MHz	Megahertz
MS	Massenspektrometrie
NDC	Nordihydrocapsaicin
NMR	Kernresonanzspektroskopie
NPD	Stickstoff/Phosphor-selektiver Detektor
NWG	Nachweisgrenze
POD	Peroxidasen
PSVA	Pelargonsäurevanillylamid
RP	Reversed Phase (Umkehrphase)
RT	Raumtemperatur
Tab.	Tabelle
TMSH	Trimethylsulfoniumhydroxid
TRI	2,4,6-Triphenoxy-1,3,5-triazin
UV	Ultraviolett