



---

## Bestimmung von Anethol in Spirituosen – Vergleich von Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Festphasenmikroextraktion (HS-SPME)

Katrin Lachenmeier<sup>1</sup>, Frank Mußhoff<sup>1</sup>, Burkhard Madea<sup>1</sup>, Eva-Maria Sohnus<sup>2</sup>, Willi Frank<sup>2</sup> und Dirk W. Lachenmeier<sup>2#</sup>

<sup>1</sup> Institut für Rechtsmedizin der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Stiftsplatz 12, D-53111 Bonn

<sup>2</sup> Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt (CVUA) Karlsruhe, Weißenburger Str. 3, D-76187 Karlsruhe

---

### Zusammenfassung

In der in VO (EG) 2091/2002 mitgeteilten offiziellen Referenzmethode zur Bestimmung von Anethol in Spirituosen durch Gaschromatographie (GC) wird für zuckerhaltige Spirituosen (z. B. Sambuca) ein arbeitsintensives und zeitaufwendiges Extraktionsverfahren vorgeschrieben, da bei direkter Injektion der Proben eine Kontamination des GC-Injektors erfolgen würde. Ziel der vorliegenden Arbeit war daher, die Extraktion von Anethol aus Spirituosenproben zu verbessern. Dazu wurde eine gegenüber der Referenzmethode wesentlich beschleunigte Flüssig-Flüssig-Extraktion (FFE) mit n-Hexan entwickelt. Daneben wurde als moderne Alternative die Headspace-Festphasenmikroextraktion (Solid-phase microextraction, HS-SPME) evaluiert. Sowohl FFE als auch HS-SPME zeigten sehr gute Linearitäten mit Korrelationskoeffizienten über 0,99 und sehr gute Präzisionen zwischen 0,8 und 4,7%. Beim Vergleich beider Verfahren, sowie der Referenzmethode zeigte sich eine signifikante lineare Korrelation der Ergebnisse ( $R > 0,95$ ). Erstmals konnte gezeigt werden, dass HS-SPME/GC/MS eine schnelle, empfindliche und robuste Alternative für die Analyse von Anethol in alkoholischen Getränken darstellt. Gegenüber der Referenzmethode wurde mit beiden Verfahren bei vergleichbarer Präzision eine wesentlich verkürzte und vereinfachte Probenvorbereitung erreicht,

wobei HS-SPME durch die nur 6-minütige vollautomatische Extraktion die größten Vorzüge bietet.

### Summary

In Commission Regulation (EC) No 2091/2002, an official reference method for the gas chromatographic determination of anethole in spirit drinks is given. For liqueurs that contain a large amount of sugars (e.g. Sambuca), a labour-intensive and time-consuming extraction procedure is required, because direct injection of the samples would contaminate the GC injection port. Therefore, in this study, the extraction of anethole from spirit drinks was improved. A substantially accelerated liquid-liquid extraction (LLE) procedure using n-hexane was developed. In addition, as an up-to-date alternative, headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) was evaluated. Both LLE and HS-SPME showed very good linearities with coefficients of correlation greater than 0.99 and very good pre-

---

# Korresp. Autor: Lachenmeier@web.de, Tel.: 0721-926-5434 Fax: 0721-926-5539



cisions between 0.8 and 4.7%. The comparison of both procedures, as well as of the reference method, revealed a significant linear correlation of the results ( $R > 0.95$ ). For the first time HS-SPME/GC/MS was shown as a fast, sensitive and reliable alternative for the analysis of anethole in alcoholic beverages. In comparison to the reference method, both procedures accomplished a significantly shortened and simplified sample preparation with comparable accuracy. The fully automated HS-SPME extraction, requiring only 6 min, offered the largest advantages.

**Keywords:** Anethol, Anis, Extraktion, Festphasenmikroextraktion, HS-SPME, Spirituosen / anethole, anise, extraction, solid-phase microextraction, HS-SPME, spirit drink

## 1 Einleitung

(*E*)-1-Methoxy-4-(1-propenyl)benzen (Anethol) ist eine flüchtige Verbindung, die natürlicherweise in vielen Kräutern und Gewürzen vorkommt<sup>1</sup>). Für die Aromatisierung von Spirituosen werden oft Mazerate, Destillate oder Extrakte der Pflanzen Sternanis (*Illicium verum* Hook. Fil.), Anis (*Pimpinella anisum* L.) oder Fenchel (*Foeniculum vulgare* Mill.) verwendet, die im ätherischen Öl ca. 80–90% Anethol enthalten<sup>2</sup>). Nach umfangreichen Toxizitätsstudien wurde Anethol der GRAS-Status (Generally recognized as safe) zugestanden<sup>3–5</sup>). Die Wirkung von Anethol in alkoholischen Getränken wurde jedoch bislang nur unzureichend untersucht, da insbesondere die Effekte von Anethol und Ethanol nicht verlässlich unterschieden werden können<sup>6</sup>). Für bestimmte Spirituosen mit Anis wie Pastis, Sambuca oder Mistrà sind in VO (EWG) 1576/89<sup>7</sup>) und VO (EWG) 1014/90<sup>8</sup>) Höchst- und Mindestgehalte für Anethol festgelegt. Bei anderen anishaltigen Spirituosen wie Ouzo oder Raki wird der Anetholgehalt zur Feststellung der Verkehrsüblichkeit herangezogen.

Die Mehrzahl der in der Literatur beschriebenen Methoden zum quantitativen Nachweis von Anethol in Spirituosen verwendet Gaschromatographie (GC) zur Stofftrennung in Verbindung mit Flammenionisationsdetektion (FID)<sup>9–14</sup>) oder Massenspektrometrie (MS)<sup>15–17</sup>). Daneben wird eine flüssigkeitschromatographische Methode mit Fluoreszenzdetektion beschrieben<sup>18</sup>).

In der VO (EG) 2091/2002 wurde eine offizielle Referenzmethode zur Bestimmung von Anethol in Spirituosen durch GC/FID mitgeteilt<sup>9</sup>), die zuvor in einer internationalen Laborvergleichsuntersuchung validiert wurde<sup>14</sup>). Dabei wurde festgestellt, dass bei direkter Injektion von zuckerhaltigen Spirituosen (z. B. Sambuca) eine Kontamination des GC-Injektors erfolgt und daher ein vorläufiges Extraktionsverfahren vorgeschlagen, das jedoch sehr arbeitsintensiv, zeitaufwendig und nicht automatisierbar ist (Dauer 2,5 h)<sup>9</sup>). Ziel der vorliegenden Arbeit war daher, die Extraktion von Anethol aus Spirituosenproben zu verbessern. Dazu wurde eine gegenüber der Referenzmethode wesentlich beschleunigte Flüssig-Flüssig-Extraktion (FFE) entwickelt.

Als moderne Alternative wurde daneben die Headspace-Festphasenmikroextraktion (Solid-phase microextraction, HS-SPME) evaluiert, die sich bereits für die Bestimmung von Anethol in Tabakprodukten bewährt hat<sup>19–21</sup>). Im Bereich der Spirituosenanalytik wurde HS-SPME bereits als ideales Extraktionsverfahren für die Bestimmung von Monoterpenen wie Thujon eingesetzt<sup>22</sup>). Die Absorption erfolgt bei der SPME an einer von außen mit Polydimethylsiloxan beschichteten Faser, die zur Anreicherung der Analyten in den Headspace über der Probe exponiert wird. Nach dieser lösungsmittelfreien Extraktion erfolgt die Desorption durch Einführung der Faser in den heißen Injektor des GC/MS-Systems. Alle Arbeitsschritte werden ohne manuelle Intervention auf einem Autosampler-Roboter ausgeführt. Extraktions- und Desorptionsbedingungen (Temperatur, Zeit) der HS-SPME-Methode wurden optimiert.

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Probenvorbereitung

Referenzmethode<sup>9</sup>)

50 ml Probe und 5 ml 96% Ethanol werden mit 12 g Ammoniumsulfat und 8,6 g Natriumphosphat mind. 30 min lang geschüttelt und danach 2 Stunden gekühlt ( $< 5^\circ\text{C}$ ). 2 ml der klaren Alkoholschicht werden entnommen und im Messkolben mit Ethanol (45% vol) auf 20 ml aufgefüllt und mit GC/FID bestimmt (Dauer  $> 2,5$  h).

FFE

1 ml Probe wird nach Zugabe von 1-Undecanol als internem Standard jeweils dreimal mit n-Hexan extrahiert. Die vereinigten Extrakte werden mit n-Hexan auf 50 ml aufgefüllt und direkt mittels GC/FID bestimmt (Dauer ca. 20 min).

HS-SPME

10  $\mu\text{l}$  einer 1:100 verdünnten Probe, 1 ml Phosphat-Puffer (pH 7) und 10  $\mu\text{l}$  Cyclodecanon (ISTD,  $c = 50$  ng/ml) werden in ein Headspace-Glasfläschen gegeben und mit einer magnetischen Bördelkappe verschlossen. Zur thermischen Equilibrierung werden die Proben 1 min bei  $35^\circ\text{C}$  im Agitator des Autosamplers geschüttelt. Die Extraktion erfolgt durch sechsminütige Exposition der SPME-Faser in den Headspace über der Probe. Die Analyten werden danach im Injektor des GC/MS-Systems bei  $250^\circ\text{C}$  thermisch desorbiert (Dauer 6 min). Nach jeder Analyse wurde ein leeres Glasfläschen als „blank sample“ nach derselben Methode bearbeitet, um Verschleppungen auszuschließen.

### 2.2 Geräte und Hilfsmittel

GC/FID

Verwendet wird ein Agilent 6850 Gaschromatograph mit einem 6850 Automatic Liquid Sampler. Säule: DX-1, 30 m, 0,25 mm Filmstärke, i. D. 0,32 mm. Split 1:20, 1  $\mu\text{l}$  Einspritzmenge. Messbedingungen: Inj.-Temp.  $280^\circ\text{C}$ , FID-Temp.

280 °C, Oven-Temp.-Progr. 60 °C (1 min), 5 °C/min auf 180 °C (0 min), 20 °C/min auf 280 °C.

#### GC/MS

Für die HS-SPME/GC/MS Analysen wird ein *Agilent* Modell 6890 Series Plus Gaschromatograph in Kombination mit einem Modell 5973N Massenspektrometer (MSD) und einem CTC-Combi-PAL-Autosampler (*Chromtech*, Idstein, Deutschland) verwendet. Temperaturprogramm: Starttemp. 40 °C, 4 min gehalten, 10 °C/min auf 120 °C, 30 °C/min auf 280 °C, 5 min gehalten. 100 µm Polydimethylsiloxan (PDMS)-Fasern werden von *Supelco* (Deisenhofen, Deutschland) bezogen.

#### 2.3 Methodenoptimierung

##### FFE

Zur Optimierung der Flüssig-Flüssig-Extraktion wurden folgende Extraktionsmittel evaluiert: n-Hexan, t-Butylmethylether sowie Dichlormethan/n-Pentan (40:60, v+v).

##### HS-SPME

Folgende Methodenparameter wurden sukzessive optimiert: Temperaturen für die Extraktion, Extraktionszeiten, Desorption. Zur Verwendung als interner Standard wurden die Verbindungen Cyclodecan, 3-Nonanon, 2,6-Dimethylheptenol und Cyclodecanon evaluiert.

#### 2.4 Validierung

Die Genauigkeit der Methoden, ausgedrückt durch die Parameter Präzision (rel. Standardabweichung) und Richtigkeit (systematische Ergebnisabweichung, Bias), wurde durch mehrfache Extraktionen und Analysen von jeweils einer Sambuca- und Pastis-Probe unter Wiederholbedingungen (gleicher Prüfer, kurze Zeitabstände) und unter Laborbedingungen (Extraktion an 6 verschiedenen Tagen) bestimmt. Die Linearität der Methoden wurde zwischen 0,5 und 5 g/l (GC/FID) bzw. zwischen 0,1 und 5 g/l (GC/MS) evaluiert (jeweils bezogen auf die Messlösungen). Zur Bestimmung von Nachweis- und Bestimmungsgrenze nach DIN 32645 wurden jeweils separate Kalibrierkurven im Bereich der Nachweisgrenze vermessen (GC/FID: 0,5–10 mg/l, GC/MS: 0,1–2 mg/l)<sup>23,24</sup>). Die Extraktionsausbeute der FFE wurde durch Dotierung von authentischen Proben mit jeweils 2 g/l Anethol bestimmt. Die Ausbeute der HS-SPME wurde durch mehrfache Extraktion derselben Probe bestimmt, bis kein Anetholsignal mehr erhalten wurde. Die Extraktionsausbeute wurde dann als Verhältnis der Peakfläche der ersten Extraktion zur durch Integration der exponentiellen Regressionskurve bestimmten Gesamtfläche aller Extraktionen berechnet.

Zum Methodenvergleich wurden 30 Proben aus dem Untersuchungsgut des CVUA Karlsruhe sowohl mit der Referenzmethode-GC/FID, als auch mit FFE-GC/FID und HS-SPME/GC/MS gemessen und die Methoden mittels linearer Regression verglichen.

Statistische Auswertungen erfolgten mit Standard-Programmen. Eine statistische Signifikanz wurde unterhalb des 0,05-Wahrscheinlichkeitsniveaus angenommen. Linearitäten wurden mit dem Pearson-Test überprüft.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Methodenoptimierung

##### FFE

Das in der Literatur bereits als geeignet für die Extraktion von Anethol aus ätherischen Ölen beschriebene n-Hexan<sup>25</sup>), zeigte auch bei der FFE von Spirituosenproben die höchsten Wiederfindungen der evaluierten Extraktionsmittel. n-Hexan wurde daher für alle weiteren Untersuchungen verwendet. Beim Vergleich mit der Extraktionsmethode aus dem Referenzverfahren, dass auf einer Phasentrennung zwischen alkoholischer und wässriger Phase beruht, zeigte die hier entwickelte FFE mit n-Hexan keine systematischen Ergebnissabweichungen. Es liegt eine signifikante lineare Korrelation der Ergebnisse beider Verfahren vor ( $r = 1,00$ ;  $p < 0,001$ ).

##### HS-SPME

Die SPME-Methodenparameter Extraktionstemperatur sowie die Extraktionszeiten und Desorptionsbedingungen wurden sukzessive optimiert. Die Desorptionsgeschwindigkeit der Analyte von der Faser ist bei 250 °C im Injektor des GC so hoch, dass diese als unkritisch zu bezeichnen ist. Eine Desorptionsdauer von 6 min erwies sich als ausreichend um sicher zu stellen, dass keine Restmengen in der PDMS-Phase zurückgeblieben waren. Die größten Effekte wurden bei der Optimierung der Extraktionsdauer und Extraktionstemperatur beobachtet.

Die Inkubation der Proben bei erhöhten Temperaturen vor und während des Absorptionsvorgangs führte zu einer Verbesserung der Empfindlichkeit, da hierdurch der Übertritt der Analyten von der wässrigen in die gasförmige Phase erleichtert wird. Anethol wies bei 35 °C ein Maximum auf, bei höheren Temperaturen war eine Abnahme der Ausbeute zu beobachten (Abb. 1). Diese Temperatur wurde deshalb für das Verfahren ausgewählt. Für die HS-SPME ist es notwendig, dass sich ein 3-Phasen-Gleichgewicht zwischen der flüssigen Phase der Probe, der Gasphase und der festen Phase der Faser einstellt. Bei den flüchtigen Analyten ist bereits nach 6 min eine Gleichgewichtseinstellung gegeben, längere Extraktionszeiten führten wieder zu einer Abnahme der Ausbeute (Abb. 2).

#### 3.2 Validierungsergebnisse

Die Anwendbarkeit beider Methoden wurde durch die Analyse von unterschiedlichen Spirituosen unter Beweis gestellt (Anetholgehalte: 0,49 bis 2,09 g/l). Die Validierungsergebnisse von FFE und HS-SPME sind in Tabelle 1 verglichen. Das Ergebnis der Bestimmung der Extraktionsausbeute der

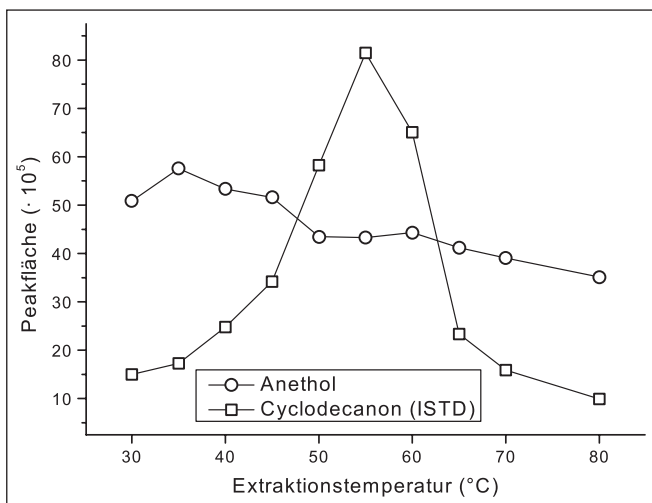


Abb. 1 Optimierung der HS-SPME-Extraktionstemperatur

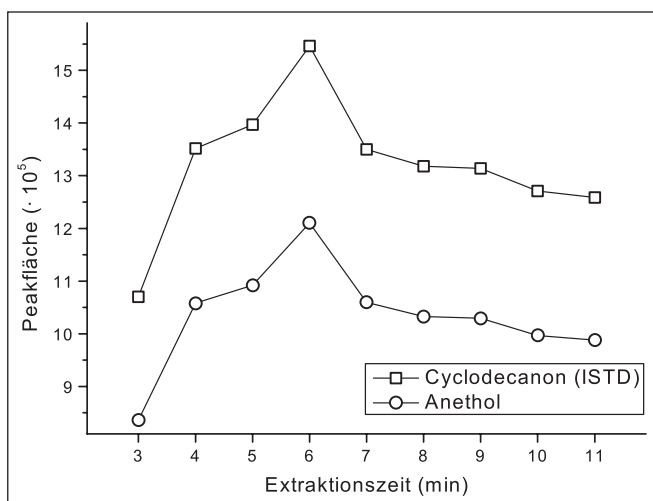


Abb. 2 Optimierung der HS-SPME-Extraktionszeit

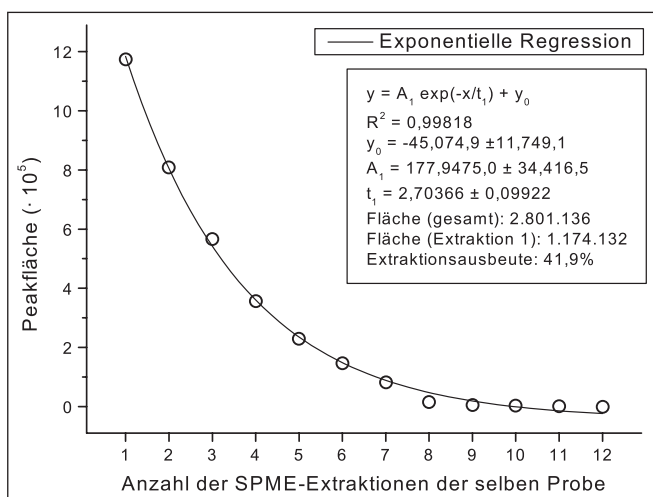


Abb. 3 Bestimmung der HS-SPME-Extraktionsausbeute von Anethol

HS-SPME ist in Abb. 3 dargestellt. Sowohl FFE als auch HS-SPME zeigten sehr gute Linearitäten mit Korrelationskoeffizienten über 0,99 und sehr gute Präzisionen zwischen 0,8 und 4,7%. Die Nachweisgrenzen lagen unter Berücksichtigung des mittels Eichkurvenverfahrens nach DIN 32645 evaluierten Bereiches und der jeweiligen Probenverdünnung bei 0,3 mg/l (HS-SPME) bzw. 10 mg/l (FFE). Die Nachweisgrenzen beider Verfahren liegen damit deutlich unter den in Spirituosenprobe zu erwartenden Anetholgehalten von ca. 0,5–2 g/l. Eine empfindliche und selektive Überprüfung des Anetholgehaltes ist mit beiden Verfahren gewährleistet. Beim Vergleich beider Verfahren zeigte sich eine signifikante lineare Korrelation der Ergebnisse ( $r = 0,95$ ;  $p < 0,001$ ). Chromatogramme einer authentischen Sambucaprobe extrahiert mit FFE und HS-SPME sind in Abb. 4 und Abb. 5 vergleichend dargestellt. In beiden Fällen wurden keine Interferenzen oder Matrixstörungen beobachtet. Alle untersuchten Spirituosen erfüllten die Anforderungen der EU-Verordnungen hinsichtlich ihrer Anetholgehalte.

#### 4 Diskussion

Probenvorbereitung, Extraktions- und Desorptionsbedingungen (Temperatur, Zeit) der FFE und HS-SPME-Methode wurden im Hinblick auf möglichst einfache Handhabung und kurze Analysendauer optimiert. Matrixbedingte Störungen der Analytik (z.B. Kontamination des Injektors) wurden durch die Flüssig-Flüssig- oder Headspace-Extraktionstechnik eliminiert.

Bei beiden Methoden, HS-SPME und FFE, hängen die Wiederfindungen der Analyten von deren Phasenübergangskoeffizienten ab. Bei der FFE wird eine Homogenisierung der

Tab. 1 Validierungsdaten FFE und HS-SPME (S: Sambuca, P: Pastis)

	FFE	SPME	
<b>Extraktausbeute [%]</b>	84,3	41,9	
<b>NG [mg/l]</b>	10	0,3	
<b>BG [mg/l]</b>	33	1,3	
<b>Wiederholbedingungen (n = 6)</b>			
<b>Präzision [%]</b>	<b>S</b>	0,94	2,82
	<b>P</b>	0,89	0,80
<b>Richtigkeit [%]</b>	<b>S</b>	-13,1	-3,6
	<b>P</b>	-13,8	-4,0
<b>Laborbedingungen (n = 18)</b>			
<b>Präzision [%]</b>	<b>S</b>	1,38	4,23
	<b>P</b>	1,3	4,74
<b>Richtigkeit [%]</b>	<b>S</b>	-14,5	-6,3
	<b>P</b>	-17,0	-7,1
<b>Regressionsgerade</b>			
<b>linearer Bereich [g/l]</b>	0,5–5	0,1–5	
<b>Korrelationskoeffizient</b>	0,999	0,994	

zwei flüssigen Phasen durchgeführt, um die Einstellung der Gleichgewichtskonzentrationen zu beschleunigen. Demgegenüber ist bei der HS-SPME eine Homogenisierung der Phasen nicht möglich, und der Übergang der Moleküle von der flüssigen in die gasförmige Phase ist geschwindigkeitsbestimmend. Die Kinetik der Headspace-Extraktion wird auch stark durch Eigenschaften der Matrix wie Viskosität und Lipophilie sowie die Diffusionsgeschwindigkeit der Analyten in der Matrix beeinflusst<sup>26)</sup>. Diese Eigenschaften erklären die im Vergleich zur FFE relativ geringe Extraktionsausbeute der HS-SPME (Abb. 3).

Um den Matrixeinfluss auf die Extraktionsausbeute zu kompensieren, ist daher der Einsatz eines geeigneten internen Standards von entscheidender Bedeutung für die Anwendbarkeit einer HS-SPME-Methode. Deuterierte Analoga des Anethols, die sich in ihren Extraktionseigenschaften identisch wie der Analyt verhalten, waren kommerziell nicht erhältlich. Reine länger-kettige aliphatische und aromatische Kohlenwasserstoffe erwiesen sich als wenig geeignet, da sie ein vom Anethol vollständig unterschiedliches SPME-Extraktionsverhalten zeigten. Reproduzierbare Ergebnisse ließen sich hierbei nicht erzielen. Ebenso führte ein genereller Verzicht auf interne Standards zu sehr schlechten

Korrelationen der Kalibrationsfunktionen. Das bereits für die Bestimmung von Monoterpenen als interner Standard bewährte Cyclodecanon<sup>22)</sup> verhält sich annähernd gleich wie der Analyt Anethol in Bezug auf Extraktionsgeschwindigkeit und -ausbeute und erbrachte die besten Resultate. Zudem kommt Cyclodecanon natürlicherweise nicht in Spirituosenproben vor und weist auch bei der gaschromatographischen Trennung ein sehr ähnliches Elutionsverhalten wie Anethol auf (Abb. 5). Das in der Referenzmethode als interner Standard vorgeschlagene 4-Allylanisol (Estragol) kann dagegen auch natürlicherweise in Spirituosenproben vorkommen, so dass jede Probe zusätzlich auf dessen Anwesenheit zu prüfen wäre.

Erstmals konnte gezeigt werden, dass HS-SPME/GC/MS eine schnelle, empfindliche und robuste Alternative gegenüber herkömmlichen Extraktionsverfahren für die Analyse von Anethol in alkoholischen Getränken darstellt. Der Einsatz des CTC-Combi-PAL-Autosamplers bietet für den Einsatz in der SPME weitreichende Vorteile. Alle Schritte, die für die HS-SPME notwendig sind, wie Erhitzen und Schütteln der Probe, Extraktion im Headspace bei erhöhter Temperatur und Desorption im Injektor des GC sind

programmierbar und werden automatisch ausgeführt. Der Analytiker hat lediglich die Aufgabe des Befüllens der Probengefäße und ihrer Überführung auf den Probenteller des Autosamplers, wodurch die Anzahl von Fehlerquellen bezüglich der Reproduzierbarkeit der einzelnen Arbeitsschritte deutlich vermindert wird.

Der Einsatz der universellen PDMS-Faser bietet im Vergleich mit der von Clark und Bunch<sup>21)</sup> für die Extraktion von Anethol aus Tabakerzeugnissen für am geeignetsten befundenen Carbowax-Divinylbenzen-Faser keine Nachteile hinsichtlich Präzision oder Nachweisgrenzen. Von Vorteil ist die Möglichkeit der gleichzeitigen Bestimmung weiterer unpolarer Monoterpenen (z. B. Thujon) in einer einzigen Probensequenz (kein Faserwechsel notwendig). Über 90 Analysen konnten mit einer Faser durchgeführt werden, ohne dass eine signifikante Abnahme der Extraktionsausbeuten beobachtet wurde.

Wie den Validierungsdaten zu entnehmen ist, sind die Verfahren sensitiv, selektiv und reproduzierbar. Die Nachweisgrenzen des hochselektiven HS-SPME-Verfahrens in Verbindung mit GC/MS sind so gering, dass eine starke Verdünnung der Proben durchgeführt werden muss und nur eine

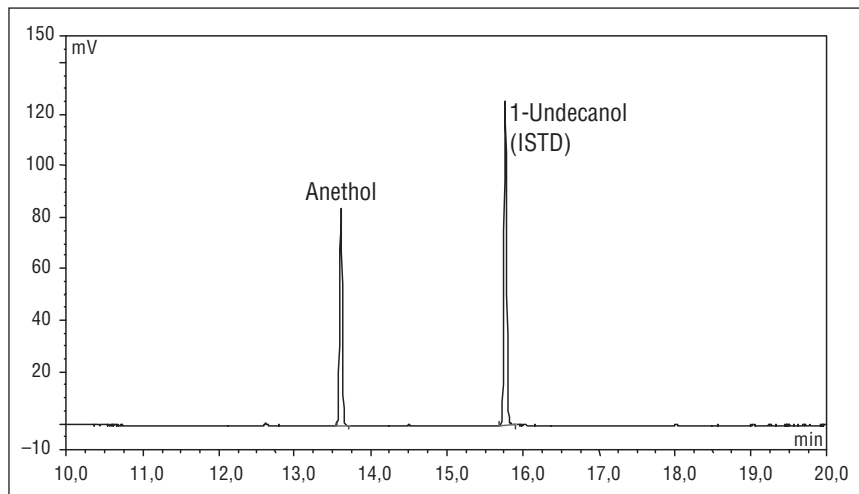


Abb. 4 GC/FID-Chromatogramm einer authentischen Sambucaprobe (40%Vol) nach FFE-Extraktion

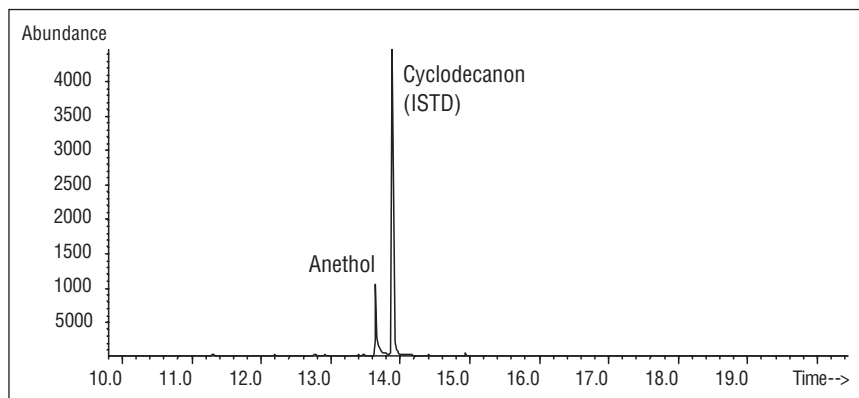


Abb. 5 GC/MS-TIC-Chromatogramm einer authentischen Sambucaprobe (40%Vol) nach HS-SPME-Extraktion

geringe Probemenge zur Analyse eingesetzt werden kann. Dies führte dazu, dass die Präzision des HS-SPME-Verfahrens geringer als die des FFE-Verfahrens ist, wobei aber die Präzisionen beider Verfahren in der Größenordnung der Präzisionen des Referenzverfahrens liegen<sup>9)</sup>.

## 5 Schlussbetrachtung

Die Methodenvalidierung ergab, dass sowohl FFE/GC/FID als auch HS-SPME/GC/MS geeignet sind, einen sicheren quantitativen Nachweis von Anethol in Spirituosen zu führen. Gegenüber der Referenzmethode wurde mit beiden Verfahren bei vergleichbarer Präzision eine wesentlich verkürzte und vereinfachte Probenvorbereitung erreicht, wobei HS-SPME durch die nur 6-minütige vollautomatische Extraktion die größten Vorzüge bietet. Die GC/MS Analytik bietet darüber hinaus den Vorzug der eindeutigen Absicherung der Identität des Analyten.

Nur noch in Fällen, die zu einer Beanstandung führen würden, wird die aufwendige Referenzmethodik zur Absicherung der Befunde durchgeführt.

## Literatur

- 1) Clark G. S.: Anethole. An aroma chemical profile. *Perfumer & Flavorist* **18**, 11–12 (1993).
- 2) Franke W.: *Nutzpflanzenkunde: nutzbare Gewächse der gemäßigten Breiten, Subtropen und Tropen*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1997).
- 3) Newberne P., R. L. Smith, J. Doull, J. I. Goodman, I. C. Munro, P. S. Portoghese, B. M. Wagner, C. S. Weil, L. A. Woods, T. B. Adams, C. D. Lucas und R. A. Ford: The FEMA GRAS assessment of trans-anethole used as a flavouring substance. *Food Chem. Toxicol.* **37**, 789–811 (1999).
- 4) Newberne P., R. L. Smith, J. Doull, J. I. Goodman, J. C. Munro, P. S. Portoghese, B. M. Wagner, C. S. Weil, L. A. Woods, T. B. Adams, J. B. Hallagan und R. A. Ford: GRAS flavoring substances 18. *Food Technol.* **52**, 65–66 (1998).
- 5) Waddell W. J.: Thresholds of carcinogenicity of flavors. *Toxicol. Sci.* **68**, 275–279 (2002).
- 6) Easterday O.: Safety evaluation of trans-anethole and allyl isothiocyanate (mustard oil). *Riv. Ital. EPPOS Spec. Num.*, 99–104 (1997).
- 7) Verordnung (EWG) Nr. 1576/89 des Rates vom 29. Mai 1989 zur Festlegung der allgemeinen Regeln für die Begriffsbestimmung, Bezeichnung und Aufmachung von Spirituosen. *ABI. EU* **L160**, 1–17 (1989).
- 8) Verordnung (EWG) Nr. 1014/90 der Kommission vom 24. April 1990 mit Durchführungsbestimmungen für die Begriffsbestimmung, Bezeichnung und Aufmachung von Spirituosen. *ABI. EU* **L105**, 9–10 (1990).
- 9) Verordnung (EG) Nr. 2091/2002 der Kommission vom 26. November 2002 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 2870/2000 mit gemeinschaftlichen Referenzanalysemethoden für Spirituosen. *ABI. EU* **L322**, 11–27 (2002).
- 10) Geahchan A., C. Khalife, P. Chambon and R. Chambon: Analysis of anisated fermented grape distillates by gas-liquid chromatography. *J. Food Compost. Anal.* **4**, 304–314 (1991).
- 11) Liddle P. A. P. and A. Bossard: The analysis of anethole and anethole-flavoured beverages by gas chromatography. In: *Nykänen, L. and P. Lehtonen* (eds.): *Proceedings of the Alko Symposium on flavour research of alcoholic beverages*. Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research, Helsinki, Finland, 99–109 (1984).
- 12) Karaali A. and N. Basoglu: Essential oils of Turkish anise seeds and their use in the aromatization of raki. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **200**, 440–442 (1995).
- 13) Parker R. G.: Gas-liquid chromatographic determination of anethole in liqueurs. *J. AOAC* **57**, 954–956 (1974).
- 14) Brereton P., S. Hasnip, A. Bertrand, R. Wittkowski and C. Guillou: Analytical methods for the determination of spirit drinks. *Trends Anal. Chem.* **22**, 19–25 (2003).
- 15) Fernandez-Garcia T., M. E. Martin and A. Casp: Quantification of significant volatile components of pacharan. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **206**, 414–416 (1998).
- 16) Yavas I. und A. Rapp: Gaschromatographisch-massenspektrometrische Untersuchungen der Aromastoffe von Raki. *Deut. Lebensm.-Rundsch.* **87**, 41–45 (1991).
- 17) Yavas I., A. Rapp und R. Rupprecht: Vergleichende gaschromatographische Untersuchungen von türkischen Anis-Spirituosen (Raki). *Deut. Lebensm.-Rundsch.* **87**, 242–245 (1991).
- 18) Curro P., G. Micali and F. Lanuzza: Determination of beta-asarone, safrole, isosafrole and anethole in alcoholic drinks by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **404**, 273–278 (1987).
- 19) Stanfill S. B., A. M. Calafat, C. R. Brown, G. M. Polzin, J. M. Chiang, C. H. Watson and D. L. Ashley: Concentrations of nine alkenylbenzenes, coumarin, piperonal and pulegone in Indian bidi cigarette tobacco. *Food Chem. Toxicol.* **41**, 303–317 (2003).
- 20) Stanfill S. B. and D. L. Ashley: Solid phase microextraction of alkenylbenzenes and other flavor-related compounds from tobacco for analysis by selected ion monitoring gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **858**, 79–89 (1999).
- 21) Clark T. J. and J. E. Bunch: Qualitative and quantitative analysis of flavor additives on tobacco products using SPME-GC-Mass spectroscopy. *J. Agr. Food Chem.* **45**, 844–849 (1997).
- 22) Kröner L. U., S. A. Padosch, M. S. Brückner, D. W. Lachenmeier, F. Mußhoff und B. Madea: Optimierung einer HS-SPME/GC/MS-Methode zur Bestimmung von  $\alpha$ -/ $\beta$ -Thujon in alkoholischen Getränken. *Lebensmittelchem.* **57**, 78 (2003).
- 23) Meier P. C. and R. E. Zünd: *Statistical methods in analytical chemistry*. Wiley, New York, USA (2000).
- 24) DIN 32 645: *Chemische Analytik: Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze, Ermittlung unter Wiederholbedingungen. Begriffe, Verfahren, Auswertung*. Beuth Verlag, Berlin, Germany (1994).
- 25) Fiori J., M. Hudaib, L. Valgimigli, S. Gabbanini and V. Cavrini: Determination of trans-anethole in *Salvia sclarea* essential oil by liquid chromatography and GC-MS. *J. Sep. Sci.* **25**, 703–709 (2002).
- 26) Lachenmeier D. W., L. Kroener, F. Musshoff and B. Madea: Determination of cannabinoids in hemp food products by use of headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **378**, 183–189 (2004).