

**Geographische Herkunftsbestimmung von
Walnüssen (*Juglans regia* L.) und Detektion von
Erdnüssen (*Arachis hypogaea* L.) in
Lebensmitteln mittels NMR-Spektroskopie**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

Dr. rer. nat.

Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

Fachbereich Chemie, Institut für Organische Chemie

der Universität Hamburg

vorgelegt von

Caroline Schmitt

Hamburg, 2020

1. Gutachter: Dr. Thomas Hackl
2. Gutachter: Prof. Dr. Joachim Thiem

Datum der Disputation: 15.01.2021

Datum der Druckfreigabe: 03.02.2021

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von April 2017 bis April 2020 am Institut für Organische Chemie sowie der *Hamburg School of Food Science* des Fachbereichs Chemie der Universität Hamburg unter der Anleitung von Herrn Dr. Thomas Hackl und Herrn Prof. Dr. Markus Fischer angefertigt.

Die vorliegende Arbeit wurde aus Mitteln des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) aufgrund eines Beschlusses des deutschen Bundestages gefördert (Förderkennzeichen: 2816500914). Die Projekträgerschaft erfolgt über die Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) im Rahmen des Programms zur Innovationsförderung. Geleitet wird das Konsortium durch die HAMBURG SCHOOL OF FOOD SCIENCE. Im Zentrum stehen Entwicklungen im Bereich instrumenteller Analytik für die Authentifizierung von Lebensmitteln.

*„Eventually all things fall into place. Until then, laugh at the confusion,
live for the moments and know everything happens for a reason.”*

(Albert Schweitzer)

I. Publikationsliste

C. Schmitt, T. Bastek, A. Stelzer, T. Schneider, M. Fischer, T. Hackl, Detection of Peanut Adulteration in Food Samples by NMR Spectroscopy, *J. Agric. Food Chem.* **2020**, *68*, 14364–14373.

C. Schmitt, T. Schneider, L. Rumask, M. Fischer, T. Hackl, Food Profiling: Determination of the Geographical Origin of Walnuts by NMR Spectroscopy using the Polar Extract, *J. Agric. Food Chem.* **2020**, *68*, 15526–15534.

T. Hackl, R. Bachmann, C. Schmitt, S. Watermann, Mit Metabolic Profiling gegen Betrug, *Nachrichten aus der Chemie* **2020**, *68*, 58–61.

S. Watermann, C. Schmitt, T. Schneider, T. Hackl, Comparison of Regular, Pure Shift and Fast 2D NMR Experiments for Determination of the Geographical Origin of Walnuts, *Metabolites* **2021**, *11*, 39.

Tagungsbeiträge (Poster)

Food Profiling: Determination of the Authenticity of Walnuts by NMR-Spectroscopy, EUROISMAR, **2019**, Berlin.

¹H-NMR-Spektroskopie zur Analyse der geographischen Herkunft von Walnüssen, Regionalverbandstagung Nord der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, **2019**, Hamburg.

¹H-NMR-Spectroscopy for Analysis of the Geographical Origin of Walnuts, Fachgruppe Magnetische Resonanzspektroskopie, **2018**, Leipzig.

¹H-NMR-Spectroscopy for Analysis of the Geographical Origin of Truffles, Fachgruppe Magnetische Resonanzspektroskopie, **2017**, Bayreuth.

II. Inhaltsverzeichnis

I. Publikationsliste	I
II. Inhaltsverzeichnis	II
III. Abkürzungsverzeichnis	IV
1. Zusammenfassung	1
2. Abstract	3
3. Einleitung.....	5
3.1. <i>Metabolomics</i>	6
3.2. Nüsse und nussähnliche Lebensmittel	9
3.2.1. Walnuss	9
3.2.2. Erdnuss	11
3.2.3. Mandel und Haselnuss	13
3.3. <i>Metabolomics</i> in der Lebensmittelanalytik	14
3.4. NMR-Spektroskopie im <i>Metabolomics</i> -Bereich	17
3.5. Multivariate Statistik	19
3.5.1. Hauptkomponentenanalyse	21
3.5.2. Klassifizierungsverfahren	23
3.5.3. Validierung.....	25
4. Zielsetzung	26
5. Material und Methoden	27
5.1. Materialien und Geräte.....	27
5.2. Kernspinresonanzspektroskopie	29
5.3. Säulenchromatographie	30
5.4. Probenvorbereitung.....	32
5.5. Phosphatpuffer.....	32
5.6. Extraktionen	32
5.7. Synthese des chemischen Markers (2 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-4-Hydroxy-1-methylpyrrolidin-2-carbonsäure (5)	36
5.8. Multivariate Statistik	37
6. Ergebnisse und Diskussion.....	39

6.1. Geographische Herkunftsbestimmung von Walnüssen	39
6.1.1. Extraktion von Walnüssen.....	40
6.1.2. Stabilitätsmessung.....	43
6.1.3. Identifizierung von Metaboliten in Walnüssen	46
6.1.4. Hauptkomponentenanalyse mittels Extraktionsmethode A.....	65
6.1.5. Hauptkomponentenanalyse mittels Extraktionsmethode B.....	81
6.2. Untersuchung von Mischungen mit Erdnuss	107
6.2.1. Extraktionen.....	107
6.2.2. Stabilitätsmessung.....	112
6.2.3. Vergleich mit ¹ H-NMR-Spektren von Extrakten ähnlicher Lebensmittel.....	115
6.2.4. Beimischung von Erdnüssen.....	124
6.2.5. Quantifizierung von Erdnussbeimischungen	131
6.2.6. Identifizierung des chemischen Markers	137
7. Literaturverzeichnis.....	148
8. Anhang	156
8.1. Verwendete Chemikalien	156
8.2. KMR-Stoffe	160
8.3. Walnussproben	161
8.4. Weitere Nussproben	174
8.5. Analyse der Erdnussbeimischungen	176
8.6. NMR-Spektren	185
8.7. Multivariate Statistik	186
8.7.1. Liste der variablen <i>Buckets</i> der Extraktionsmethode A	186
8.7.2. Liste der variablen <i>Buckets</i> der Extraktionsmethode B	187
8.7.3. PCA <i>Score</i> - und <i>Loading</i> -Plots	188
8.7.4. Box-Whisker-Plots	192
8.8. Python Skript.....	193
9. Danksagung	195
10. Eidesstattliche Erklärung.....	196

III. Abkürzungsverzeichnis

16-OMC	16-O-Methylcafestol
1D/2D	ein-/zweidimensional
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
AQ	Akquisitionszeit, engl. <i>acquisition time</i>
ASAP	<i>acceleration by sharing adjacent polarization</i>
ATM	<i>automatic tuning module</i>
BBFO	<i>broadband fluorine observed</i>
BBO	<i>broadband observed</i>
BMRB	<i>Biological Magnetic Resonance Data Bank</i>
CH	Schweiz
CL	Chile
CMPG	Carr-Purcell-Meiboom-Gill
CN	China
COSY	<i>correlation spectroscopy</i>
CV	Kreuzvalidierung, engl. <i>cross-validation</i>
<i>d</i>	deuteriert
Da	Dalton
DA	Diskriminanzanalyse
DE	Deutschland
DIPSI	<i>decoupling in the presence of scalar interactions</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
enzym.	enzymatisch
<i>et al.</i>	und andere, lat. <i>et alii</i>
EU	Europa
FDA	<i>United States Food and Drug Administration</i>
FID	freier Induktionszerfall, engl. <i>free induction decay</i>
FR	Frankreich
FT	Fourier Transformation
GC	Gaschromatographie
GHS	Global harmonisiertes System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien
HMBC	<i>heteronuclear multiple bond correlation</i>
HMDB	<i>Human Metabolome Database</i>

HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, engl. <i>high performance liquid chromatography</i>
HSFS	<i>Hamburg School of Food Science</i>
HSQC	<i>heteronuclear single quantum coherence</i>
HU	Ungarn
ICP-OES	<i>inductively coupled plasma-optical emission spectrometry</i>
IgE	Immunglobulin E
IRMS	Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie, engl. <i>isotope-ratio mass spectrometry</i>
IT	Italien
<i>J</i>	Skalare Kopplungskonstante
kg	Kilogramm
LC-MS	Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung, engl. <i>liquid chromatography-mass spectrometry</i>
LDA	Lineare Diskriminanzanalyse
LOD	Nachweisgrenze, engl. <i>limit of detection</i>
LOQ	Bestimmungsgrenze, engl. <i>limit of quantitation</i>
MANOVA	<i>multivariate analysis of variance</i>
MIR	mittlere Infrarotspektroskopie, engl. <i>mid-infrared spectroscopy</i>
MS	Massenspektrometrie
NIR	Nahinfrarotspektroskopie, engl. <i>near-infrared spectroscopy</i>
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie, engl. <i>nuclear magnetic resonance spectroscopy</i>
NOE	Kern-Overhauser-Effekt, engl. <i>nuclear overhauser effect</i>
NOESY	<i>nuclear overhauser enhancement spectroscopy</i>
NS	Scanzahl, engl. <i>number of scans</i>
O1	<i>transmitter frequency offset</i>
OMS	Octamethylcyclotetrasiloxan
PC	Hauptkomponente, engl. <i>principal component</i>
PCA	Hauptkomponentenanalyse, engl. <i>principal component analysis</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion, engl. <i>polymerase chain reaction</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionenkonzentration, lat. <i>potentia hydrogenii</i>
PK	Pakistan
PLS-DA	<i>partial least squares-discriminant analysis</i>
ppm	<i>parts per million</i>
R ²	Bestimmtheitsmaß

RG	<i>receiver gain</i>
RP	<i>reversed-phase</i>
RSM	<i>random subspace model</i>
se/TOCSY	<i>selective total correlation spectroscopy</i>
SNR	Signal-Rausch-Verhältnis, engl. <i>signal-to-noise ratio</i>
SOP	<i>standard operation procedure</i>
SVM	<i>support vector machine</i>
SW	spektrale Weite, engl. <i>spectral width</i>
TMS	Tetramethylsilan
TSP	Trimethylsilylpropionat
TR	Türkei
u.a.	unter anderem
USA/US	<i>United States of America</i>
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i>
UV	Ultraviolett
v. Chr.	vor Christus
WEFT	<i>water eliminated fourier transform</i>
z.B.	zum Beispiel

1. Zusammenfassung

Die NMR-Spektroskopie eignet sich im Bereich der Lebensmittelanalytik zur Untersuchung von Verfälschungen von Lebensmitteln (*Food Fraud*). Die Authentizität von Lebensmitteln kann mittels eines *Metabolomics*-basierten Ansatzes untersucht werden. Hierbei wird die Gesamtheit der Stoffwechselprodukte betrachtet, um diverse Fragestellungen, wie beispielsweise die Frage nach der geographischen Herkunft oder der Produktionsweise (biologisch/konventionell), zu untersuchen. Es können jedoch auch spezifische chemische Marker analysiert werden, um gezielt illegale und für den Verbraucher potentiell gesundheitsgefährdende Lebensmittelbeimischungen zu detektieren.

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst verschiedene Walnussextrakte durch Verwendung von deuterierten Lösungsmitteln und -gemischen (Acetonitril- d_3 , Methanol- d_4 , Acetonitril- d_3 /Methanol- d_4 (1:1) und Phosphatpuffer (pH = 7)/Methanol- d_4 /Chloroform- d (5:4:6)) hergestellt und die ^1H -NMR-Spektren hinsichtlich der Dispersion der Signale untersucht. Es wurden die letzteren zwei Extraktionsmethoden ausgewählt und zusätzlich die Stabilität der Extrakte über die Zeit untersucht. Beide Extraktionsmethoden wiesen eine hinreichende Stabilität auf, sodass im nächsten Schritt eine *standard operation procedure* (SOP) sowohl für die Aufarbeitung und Lagerung als auch die Extraktion der Walnussproben entwickelt wurde. Zudem wurde eine Metabolitenidentifizierung durchgeführt, indem die zwei Extraktionen in einem größeren Maßstab durchgeführt wurden und die Extrakte anschließend mittels Umkehrphasensäulenchromatographie fraktioniert wurden. Die einzelnen Fraktionen wurden danach mittels verschiedener NMR-Experimente untersucht. Hierbei wurden sechzehn Metaboliten aus unterschiedlichen Stoffklassen (u.a. Aminosäuren, Kohlenhydraten, organischen Säuren) identifiziert. Eine Verifizierung erfolgte mittels internen Standards und dem Vergleich der chemischen Verschiebungen und Kopplungskonstanten mit gängigen Datenbanken.

Zur Entwicklung einer Methode für die geographische Herkunftsbestimmung wurden insgesamt 235 authentische Walnussproben akquiriert. Die Probenakquise erfolgte in Zusammenarbeit mit der *Hamburg School of Food Science* (HSFS). Die Messungen der Proben als Triplikate erfolgten an einem 400 MHz Spektrometer und nach der Prozessierung der ^1H -NMR-Spektren wurde zur Visualisierung der Daten eine Hauptkomponentenanalyse (PCA) durchgeführt. Die Klassifizierung erfolgte mit der linearen *support vector machine* und einer wiederholten verschachtelten Kreuzvalidierung, wobei insgesamt neun zwei-Klassen-Modelle erstellt wurden. Mit der polaren Extraktion (Phosphatpuffer/Methanol- d_4 /Chloroform- d) wurden Genauigkeiten von 78.0% ($\pm 2.3\%$) bis 96.6% ($\pm 0.6\%$) erhalten. Die Zuordnungs-

Zusammenfassung

genauigkeiten nach Extraktion mit Acetonitril- d_3 und Methanol- d_4 (1:1) lagen zwischen 81.1% ($\pm 1.2\%$) und 95.9% ($\pm 0.8\%$).

Im zweiten Teil der Arbeit wurden Mischungen mit Erdnuss untersucht. Dazu wurden $^1\text{H-NMR}$ -Spektren polarer Extrakte (Phosphatpuffer/Methanol- d_4 /Chloroform- d) von chemisch und visuell ähnlichen Lebensmitteln (Haselnuss, Walnuss, Mandel) analysiert. Hierbei wurde ein Singulett bei 3.05 ppm im polaren Extrakt der Erdnuss als Indikator für Erdnussbeimengungen verwendet. Der chemische Marker wurde als *N*-Methyl-*trans*-4-hydroxy-L-prolin identifiziert und die Struktur durch Verwendung des synthetisierten Metaboliten als interner Standard bestätigt. Da es sich bei Erdnüssen um ein biologisches System handelt, wurde der Konzentrationsbereich des Markers aus zwölf Proben bestimmt und die biologische Varianz mit 14% abgeschätzt. Durch Mischungsreihen von Erdnuss und der ausgewählten Lebensmittel mit anschließender Auswertung mittels linearer Regression wurden Modelle zur semi-quantitativen Berechnung von Beimischungen erstellt. Die Nachweisgrenze wurde auf Grund der biologischen Varianz bei einer niedrigen Scanzahl (NS = 8) auf 4% abgeschätzt.

2. Abstract

NMR spectroscopy is suitable in the field of food analysis for the investigation of adulteration of food (food fraud). The authenticity of food can be investigated using a metabolomics based approach. In this context, the entirety of metabolites is considered in order to investigate frequent questions, such as the question of geographical origin or the production method (biological/conventional). However, specific chemical markers can also be analysed in order to specifically detect illegal food additives that are potentially hazardous to the health of consumers.

In the present work, different walnut extracts were first prepared by using different deuterated solvents and mixtures (acetonitrile- d_3 , methanol- d_4 , phosphate buffer (pH = 7), acetonitrile- d_3 /methanol- d_4 (1:1) and phosphate buffer (pH = 7)/methanol- d_4 /chloroform- d (5:4:6)) and the ^1H NMR spectra were examined with respect to the dispersion of the signals. The latter two extraction methods were selected and the stability of the extracts over time was investigated. Both extraction methods showed sufficient stability, so that in the next step a standard operation procedure (SOP) was developed for the processing and storage as well as the extraction of the walnut samples. In addition, a metabolite identification was carried out by extraction on a larger scale and then fractionating both extracts by reversed phase column chromatography. The individual fractions were then analysed by different NMR experiments. Sixteen metabolites from different substance classes (including amino acids, carbohydrates, organic acids) were identified. A verification was carried out by means of internal standards and by comparing the chemical shifts and coupling constants with common databases.

A total of 235 authentic walnut samples were acquired for the development of a method for determination of the geographical origin. The sample acquisition was carried out in cooperation with the *Hamburg School of Food Science* (HSFS). The measurements of the samples as a triplicate were performed on a 400 MHz spectrometer and after processing the ^1H NMR spectra a principal component analysis (PCA) was carried out to visualise the data. For classification the linear support vector machine and repeated nested cross-validation were used and in total nine two-class models were built. With polar extraction (phosphate buffer/methanol- d_4 /chloroform- d) accuracies from 78.0% ($\pm 2.3\%$) to 96.6% ($\pm 0.6\%$) were obtained. The accuracies of classification after extraction with acetonitrile- d_3 and methanol- d_4 (1:1) were between 81.1% ($\pm 1.2\%$) and 95.9% ($\pm 0.8\%$).

In the second part of the work, mixtures with peanuts were investigated. For this purpose ^1H NMR spectra of polar extracts (phosphate buffer/methanol- d_4 /chloroform- d) of chemically and visually similar foods (hazelnut, walnut, almond) were analysed. A singlet at 3.05 ppm in

Abstract

the polar extract of peanut was used as an indicator for peanut admixtures. The chemical marker was identified as *N*-methyl-*trans*-4-hydroxy-L-proline and the structure was confirmed by using the synthesised metabolite as internal standard. Since peanuts are a biological system, the concentration range of the marker was determined from twelve samples and the biological variance was estimated as 14%. By preparation of series of mixtures with peanut and the selected food with subsequent evaluation by linear regression, models for the semi-quantitative calculation of admixtures were established. The limit of detection was estimated for a low number of scans (NS = 8) as 4% due to the biological variance.

3. Einleitung

Die Verfälschung von Lebensmitteln (*Food Fraud*) mit Produkten minderwertiger Qualität stellt ein verbreitetes Problem in der Lebensmittelindustrie dar.^[1] Ein häufiger Anreiz zur Verfälschung von Lebensmitteln sind beispielsweise hohe Preisunterschiede, da diese zu einer Gewinnsteigerung führen können.^[2] Auch bei einem geringeren Preisunterschied kann die Verfälschung von großen Mengen einen wirtschaftlichen Vorteil zur Folge haben. Bei *Food Fraud* handelt es sich nicht nur um einen finanziellen Betrug, sondern es können den Konsumenten auch potentiell gesundheitliche Schäden zugefügt werden. Durch Beimengungen mit nicht deklarierten Lebensmitteln, die Allergene oder giftige Substanzen enthalten können, besteht eine Gefahr für den Verbraucher. Ein Beispiel ist der chinesische Milchskandal im Jahr 2008, bei dem Milch und Säuglingsnahrung die stickstoffreiche Substanz Melamin zugesetzt wurde, sodass durch den erhöhten Stickstoffanteil ein höherer Proteingehalt vorgetäuscht werden konnte.^[3] Bei diesem Skandal wurden mehr als 290.000 Menschen vergiftet und sechs Säuglinge starben infolgedessen durch Nierenversagen.^[4] Ein weiteres Beispiel für Lebensmittelbetrug ist der sogenannte Pferdefleischskandal aus dem Jahr 2013, bei dem als Rindfleischprodukte deklarierte Lebensmittel mit Pferdefleisch verfälscht wurden.^[5] Seit 2011 werden durch Europol/Interpol die sogenannten OPSON-Operationen organisiert, deren Ziel die Aufdeckung von Lebensmittelbetrug ist. So wurden in der Operation OPSON VI bei Kontrollen beispielsweise in 1.300 kg gehackten Haselnüssen ein Anteil von 8.2% Erdnüssen festgestellt.^[6] Die Verwendung von Erdnüssen als kostengünstiges Verfälschungsmittel kann neben einem wirtschaftlichen Schaden für Produzenten eine mögliche Gesundheitsgefährdung, beispielsweise durch Allergie ausgelöste Anaphylaxie, für den Verbraucher darstellen.^[7] Dass Nüsse von *Food Fraud* betroffen sind, wurde somit bereits am Beispiel von Haselnüssen demonstriert.^[6] Des Weiteren wurden im Jahr 2018 (OPSON VII) 1.2 Tonnen Walnüsse aus der Ukraine aufgrund von fehlenden Pflichtdokumenten beschlagnahmt.^[8] Die folgende Operation OPSON VIII (2018/2019) legte den Schwerpunkt auf die Verfälschung von qualitativ hochwertigem Arabica Kaffee mit den preisgünstigeren Robusta Bohnen.^[9]

Durch den wachsenden globalen Handel mit Lebensmitteln ist es notwendig, robuste Methoden zur Authentizitätsprüfung zu entwickeln. Bei einem forschungsorientierten Ansatz, u.a. bezogen auf die Frage nach der geographischen/botanischen Herkunft oder der Verfälschung mit anderen Lebensmitteln, werden moderne hochauflösende *Omic*-Technologien eingesetzt.^[10] Zu diesen Technologien zählt das Forschungsfeld *Metabolomics*, in dem bei der Untersuchung des Metaboloms sowohl die Kernspinresonanz-Spektroskopie (NMR-Spektroskopie, engl. *nuclear magnetic resonance spectroscopy*) als auch die Massen-

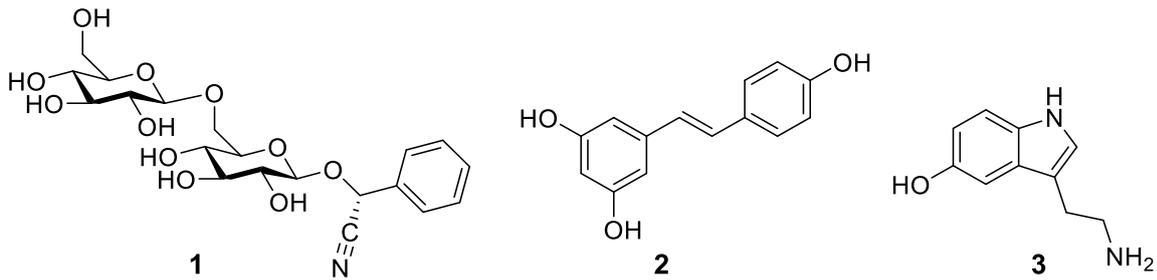
spektrometrie (MS) als gängige Analyseverfahren etabliert sind. Die NMR-Spektroskopie wurde beispielsweise zur Detektion einer gezielten Markersubstanz (16-O-Methylcafestol) zur Unterscheidung von Arabica und Robusta Kaffee verwendet.^[11] Auch die geographische Herkunftsbestimmung von Lebensmitteln ist in Kombination mit statistischen Auswertungsverfahren möglich, was beispielsweise anhand der Haselnuss sowohl mit Anwendung der NMR-Spektroskopie als auch mit einer Methode basierend auf der Kopplung von Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie (LC-MS, engl. *liquid chromatography-mass spectrometry*) gezeigt wurde.^[2,12]

3.1. *Metabolomics*

Das Metabolom umfasst die Gesamtheit aller Metaboliten in einem Organismus oder einer Zelle und liefert Informationen über den physiologischen Zustand des Systems.^[13] Metaboliten werden dabei als chemische Verbindungen (<1.5 kDa) definiert, bei denen es sich um Zwischenprodukte oder Produkte von enzymkatalysierten Stoffwechselreaktionen handelt.^[13,14] Sie sind erforderlich für den Erhalt, das Wachstum und die Funktion eines Organismus und können in primäre und sekundäre Metaboliten unterteilt werden.^[15] Dabei zählen zu den primären Metaboliten Verbindungen, die essentiell für den Organismus sind, wie zum Beispiel Nukleotide als Bausteine für das Erbgut (DNA, engl. *deoxyribonucleic acid*), Kohlenhydrate als Energiespeicher sowie Fettsäuren oder Vitamine.^[16] Sekundäre Metaboliten sind nicht essentiell, jedoch spezifisch für einen Organismus oder eine verwandte Gruppe von Organismen und können beispielsweise Verbindungen aus den Strukturklassen der Terpene, Alkaloide oder Flavonoide sein.^[17–19] Diese chemischen Verbindungen können dem Organismus Vorteile verschaffen und zum Beispiel Funktionen als Fraßschutz oder Lockmittel übernehmen.^[18] Im Folgenden werden drei Beispiele für Sekundärmetaboliten aus Nüssen und nussähnlichen Lebensmitteln und deren biologische Funktion vorgestellt. Zu den sekundären Metaboliten zählt beispielsweise Amygdalin (**1**), welches in Mandeln vorkommt und den cyanogenen Glykosiden zugeordnet wird.^[17] Die Freisetzung von Blausäure aus dieser Substanz dient aufgrund der Toxizität als Schutz vor Fraßfeinden.^[20] Eine andere Art von Schutzmechanismus übernimmt das als Phytoalexin wirkende Stilben-Derivat Resveratrol (**2**) aus Erdnüssen, indem es vermehrt bei einer Infektion durch Schimmelpilze produziert wird, um diese zu hemmen.^[21,22] Ein weiteres Beispiel ist der humane Neurotransmitter Serotonin (**3**), welcher in Walnüssen in hohen Konzentrationen vorkommt, jedoch dort eine Rolle beim Abbau von Ammoniak spielt.^[23–25]

Einleitung

Die Strukturen der drei Beispiele für Sekundärmetaboliten sind in Schema 1 dargestellt.



Schema 1: Amygdalin (**1**) aus Mandeln, Resveratrol (**2**) aus Erdnüssen und Serotonin (**3**) aus Walnüssen als Beispiele für Sekundärmetaboliten. Das cyanogene Glykosid **1** wird von der Pflanze als Fraßschutz genutzt und das Stilben **2** dient als Phytoalexin zum Schutz bei Infektionen durch z.B. Schimmelpilze. Serotonin (**2**) übernimmt in Walnüssen eine Funktion beim Abbau von Ammoniak.^[20,21,24]

Für den Menschen spielen sekundäre Metaboliten anderer Organismen eine wichtige Rolle, da diese beispielsweise als Antibiotika, Arzneistoffe, Herbizide oder Lebensmitteladditive Anwendung finden.^[18] Die Untersuchung des Metaboloms wird als *Metabolomics* bezeichnet und ist als Forschungsfeld in die sogenannten *Omics*-Disziplinen eingeordnet. In Abbildung 1 sind zunächst die Zusammenhänge der *Omics*-Disziplinen schematisch dargestellt.

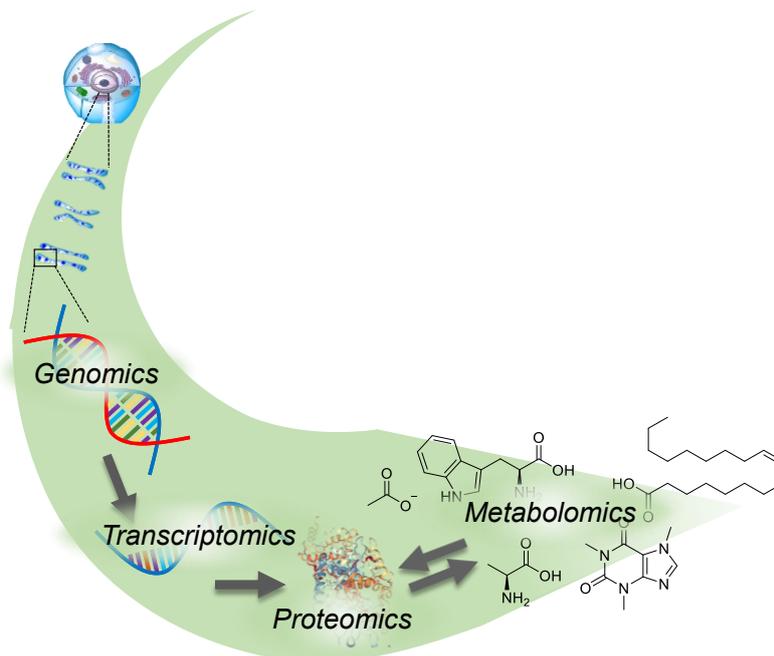


Abbildung 1: Schematische Darstellung der *Omics*-Disziplinen.^[26] Neben dem Forschungsfeld *Metabolomics*, werden die *Omics*-Technologien *Genomics*, *Transcriptomics* und *Proteomics* dargestellt. Während sich *Genomics* mit dem Genom beschäftigt, liegt der Fokus von *Transcriptomics* auf dem Transkriptom. Das Proteom umfasst die Gesamtheit aller Proteine und wird im Forschungsfeld *Proteomics* untersucht.^[10]

Neben *Metabolomics* zählen zu den *Omics*-Technologien zusätzlich die Forschungsfelder *Genomics*, bei dem der Schwerpunkt auf der Untersuchung des Genoms liegt, und *Transcriptomics*, welches sich mit der vom Genom transkribierten Information beschäftigt.^[10]

Einleitung

Im Bereich *Proteomics* wird die Gesamtheit der Proteine betrachtet. Das Zusammenwirken der Moleküle des Genoms, Transkriptoms und Proteoms sowie der Informationsfluss zwischen diesen wird durch das Zentrale Dogma der Biochemie beschrieben.^[27] Dabei handelt es sich um ein komplexes und hochdynamisches System, bei dem die traditionelle Beschreibung der linearen Abhängigkeit nicht mehr zutreffend ist.^[28] Die zellulären Prozesse sind miteinander vernetzt und regulative Effekte können auftreten.^[28] Das Metabolom ist, neben dem Proteom, das Teilgebiet, welches am schnellsten auf äußere Einflüsse reagiert. Zu den exogenen Faktoren zählen unter anderem Umwelteinflüsse, das Klima (z.B. Temperatur, Niederschlagsmenge), Mikroorganismen oder die Bodenzusammensetzung.^[10]

Die ersten Anwendungen des Forschungsfeldes *Metabolomics* gehen zurück bis 2000 – 1500 v. Chr. im alten China, wo mit Hilfe von Ameisen der Glucosegehalt in Urinproben untersucht wurde und somit Rückschlüsse auf Diabetes gezogen wurden.^[29] Im heutigen Verständnis handelt es sich bei *Metabolomics* um eine *Screening*-Methode, bei der eine große Probenanzahl analysiert und in Kombination mit Chemometrie ausgewertet wird.^[30] Dies fand bereits in den 1940er Jahren durch Williams *et al.* erste Anwendungen.^[29] Sie untersuchten Körperflüssigkeiten auf individuelle Veränderungen, um Zusammenhänge mit Krankheiten, wie Schizophrenie, zu erkennen.^[29] Zu den gängigsten Analysemethoden im Forschungsfeld *Metabolomics* zählen die NMR-Spektroskopie und massenspektrometrische Methoden.^[31] Die Auswahl hängt dabei von der untersuchten Matrix sowie der Fragestellung ab.^[30] Die Fragestellungen sind vielfältig und umfassen beispielsweise die Frage nach der Authentizität von Lebensmitteln, Untersuchung von Krankheiten oder auch von Stoffwechselwegen.^[13] Auch für die Erforschung und Charakterisierung von sekundären Metaboliten in ihrem metabolischen Zusammenhang bietet sich *Metabolomics* an.^[18] Durch die Entdeckung und Identifizierung von unterschiedlichen Metaboliten bestand die Notwendigkeit der Sammlung von beispielsweise spektroskopischen Daten in Datenbanken. Sowohl in der *Human Metabolome Database* (HMDB), die im Jahr 2007 veröffentlicht wurde und derzeit über 110 000 Einträge zu Metaboliten im menschlichen Körper beinhaltet, als auch in der *Biological Magnetic Resonance Data Bank* (BMRB) können NMR-spektroskopische Daten von biologischen Molekülen eingesehen werden.^[32,33]

3.2. Nüsse und nussähnliche Lebensmittel

Der Konsum von Nüssen und Samen ist ein wichtiger Bestandteil der menschlichen Ernährung.^[34] Ein Grund hierfür ist, dass Verbraucher immer mehr an einer gesunden Ernährung interessiert sind und Nüsse für ihren hohen Gehalt an ungesättigten Fettsäuren und Antioxidantien bekannt sind.^[35] Ein weiterer wichtiger Aspekt für Verbraucher ist die Nährstoffzusammensetzung sowie die durch den Konsum potentiell positiven Auswirkungen auf die Gesundheit.^[36] Auch die Qualität und Authentizität von Lebensmitteln nehmen eine zunehmend wichtige Rolle ein.^[36] In den folgenden Kapiteln werden die Walnuss und Haselnuss repräsentativ für Nüsse und die Erdnuss und Mandel für nussähnliche Lebensmittel näher beschrieben. Obwohl es sich bei Mandeln und Erdnüssen botanisch nicht um Nüsse handelt, werden sie auf Grund des ähnlichen Geschmacks und der Verwendung meist in Studien mit einem Fokus auf Baumnüssen mit aufgeführt und in dieser Arbeit zur Vereinfachung als Nüsse bezeichnet.

3.2.1. Walnuss

Die Walnuss (*Juglans regia* L.) aus der Familie der Walnussgewächse (*Juglandaceae*) stammt ursprünglich aus Asien und wurde in Europa und Amerika weiter verbreitet.^[37] Inzwischen bestehen 21 verschiedene Arten der Walnuss, wozu beispielsweise die Schwarznuss (*Juglans nigra*) und die kalifornische *Juglans hindsii* zählen.^[37] Wenn die Walnuss reif ist, fällt sie zu Boden und kann geerntet werden.^[37] Sie wird meist im getrockneten Zustand konsumiert.^[34] In Abbildung 2 sind Walnüsse in Schale sowie die essbaren Kerne dargestellt.



Abbildung 2: Walnüsse in Schale sowie die essbaren Kerne, die meist im getrockneten Zustand konsumiert werden.

Walnüsse besitzen im Vergleich zu anderen Nüssen den höchsten Gesamtgehalt an Polyphenolen.^[38] Zudem sind Walnüsse reich an Linolsäure, Linolensäure, Ölsäure, Palmitinsäure und Stearinsäure, die zu den ungesättigten Fettsäuren zählen.^[39] Das hohe Verhältnis von ungesättigten zu gesättigten Fettsäuren soll zur Senkung des Cholesterinspiegels beitragen.^[40] Des Weiteren soll sich der Verzehr von Walnüssen positiv auf die Gesundheit auswirken, beispielsweise das Risiko für Herz-Kreislauf- oder koronaren

Einleitung

Erkrankungen senken und Symptome lindern, die durch altersbedingte oder neurologische Störungen hervorgerufen werden.^[41]

Walnüsse sind, nach Mandeln, die Nüsse mit der zweitgrößten Produktion weltweit. Von dem Erntejahr 2018/19 sind sowohl die globale Nussproduktion (**A**) als auch die Produktionsmenge in Tonnen nach Ländern von Walnüssen in Schale (**B**) in Abbildung 3 dargestellt.^[42]

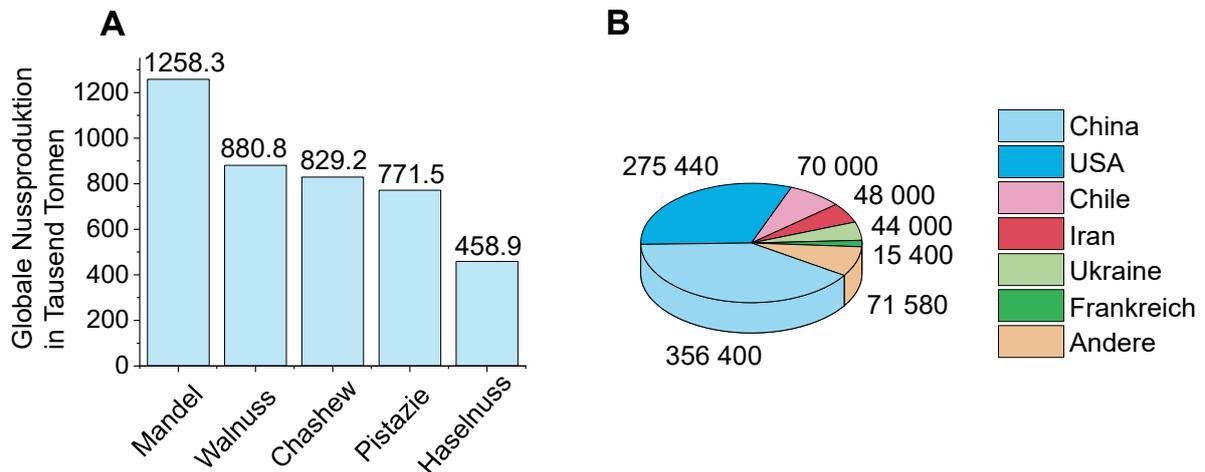


Abbildung 3: **A:** Globale Nussproduktion in Tausend Tonnen aus dem Erntejahr 2018/19. Mandeln gehören zu den weltweit am meisten produzierten Nüssen, gefolgt von Walnüssen und Chashews.^[42] **B:** Produktionsmenge von Walnüssen in Schale in Tonnen sortiert nach Ländern aus dem Erntejahr 2018/19.^[42]

Im Erntejahr 2018/19 zählten Walnüsse mit ca. 881 000 Tonnen, nach Mandeln mit ca. 1258 000 Tonnen, an zweiter Stelle zu den Nüssen mit der größten globalen Produktionsmenge (**A**).^[42] In dieser Statistik der Produktionsmenge werden lediglich Baumnüsse berücksichtigt. Hierbei wird deutlich, dass Nüsse in der menschlichen Ernährung eine große Rolle spielen. Zu den Hauptanbauländern (**B**) zählten im Erntejahr 2018/19 China, mit einer Produktionsmenge von 356 400 Tonnen (40%) Walnüssen in Schale, gefolgt von den Vereinigten Staaten von Amerika (USA, engl. *United States of America*) mit einer Produktionsmenge von ca. 275 440 Tonnen (31%).^[42] Walnüsse werden zudem in Chile, europäischen Ländern und im Iran angebaut.^[42]

3.2.2. Erdnuss

Die Erdnuss (*Arachis hypogaea* L.) wird botanisch den Hülsenfrüchten (*Fabaceae*) zugeordnet und stammt ursprünglich aus Südamerika, von wo aus sie nach Europa, Afrika und Asien verbreitet wurde.^[43,44] Bei der *Arachis hypogaea* handelt es sich um eine einjährige Pflanze mit Pfahlwurzel, die etwa 45 – 60 cm hoch wird und unterirdisch Hülsen produziert, in denen die Samen vorliegen.^[43] Die protein- und fettreichen Samen der Pflanze sind von einer dünnen Testa umhüllt, die zum Schutz vor Mikroorganismen aus dem Boden dient.^[43] In Abbildung 4 sind geröstete Erdnüsse mit Hülse, Testa und die zum Verzehr geeigneten Kerne dargestellt.



Abbildung 4: Erdnüsse mit geschlossener Hülse, der dünnen Testa sowie den essbaren Kernen. Erdnüsse werden meist im gerösteten Zustand verkauft und verzehrt.

Die weltweite Produktionsmenge von Erdnüssen betrug im Erntejahr 2018/19 ca. 37.5 Millionen Tonnen.^[42] Der Hauptproduzent war China mit 15.5 Millionen Tonnen, was 41% der Gesamterntemenge entspricht.^[42] Zu weiteren Anbauländern zählen Indien, Nigeria, USA, Indonesien und Argentinien.^[42] Abbildung 5 zeigt zum einen den Konsum von Erdnüssen im Vergleich zu anderen Nüssen im Jahr 2018 (**A**) und zum anderen die weltweite Produktionsmenge in Tausend Tonnen von Erdnüssen nach Ländern im Erntejahr 2018/19 (**B**).^[42,45]

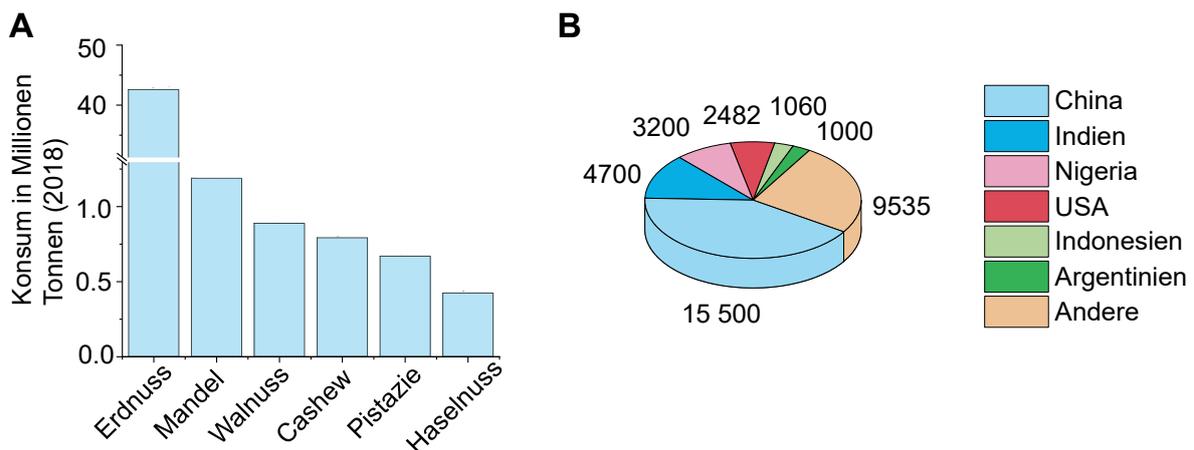


Abbildung 5: A: Konsum von verschiedenen Nüssen im Jahr 2018. Erdnüsse sind mit 42.6 Millionen Tonnen die am meisten konsumierten Nüsse weltweit. An zweiter Stelle stehen Mandeln, gefolgt von Walnüssen und Cashews.^[45] **B:** Produktionsmenge von Erdnüssen in Tausend Tonnen im Erntejahr 2018/19 nach Ländern. Der Hauptproduzent war China mit 15.5 Millionen Tonnen Erdnüssen.^[42] Weitere Anbauländer sind Indien, Nigeria und die USA.^[42]

Einleitung

Anhand der Statistik zu den meist konsumierten Nüssen weltweit wird deutlich, dass Erdnüsse eine besondere Rolle in der Ernährung von Menschen einnehmen. Mit ca. 43 Millionen Tonnen gehören Erdnüsse mit Abstand zu den am meisten konsumierten Nüssen weltweit.^[45] Neben den an zweiter und dritter Stelle stehenden Mandeln (1.2 Millionen Tonnen) und Walnüssen (0.89 Millionen Tonnen) zählen Cashews, Pistazien und Haselnüsse ebenfalls zu häufig konsumierten Nüssen.^[45] Erdnüsse sind zudem vergleichsweise günstig und werden meist geröstet oder in verarbeiteten Lebensmitteln konsumiert.^[7] Der Konsum von nur geringen Mengen kann jedoch bei Allergikern lebensbedrohlich sein.^[46] Lebensmittelallergien äußern sich als ungünstige Immunreaktion auf bestimmte Proteine, die zu verschiedenen Symptomen führen können.^[47] Davon betroffen sein können Organe, wie die Haut, der Atmungsstrakt oder das Herz-Kreislauf-System.^[47] Die Schätzungen der Prävalenz von Lebensmittelallergien können allgemein stark voneinander abweichen und wird in Industrieländern zwischen 5 bis 10% geschätzt.^[48] Dies ist vermutlich auf unterschiedliche Studienmethodiken sowie die jeweils untersuchten geographischen Bereiche zurückzuführen.^[48] Erdnüsse sind die häufigste Ursache von durch Lebensmitteln ausgelöster Anaphylaxie in den USA.^[7] In den häufigsten Fällen konsumierten Menschen, die einen allergischen Schock erlitten, unwissentlich Erdnuss enthaltene Nahrung.^[46] Es sind etwa 1% Kinder sowie 0.6% Erwachsene der US-amerikanischen Bevölkerung von Erdnussallergie betroffen.^[7] Die Erdnussallergie wird den Typ-I-Allergien zugeordnet, bei der Allergiker bei der ersten Exposition mit der Produktion von Immunglobulin E (IgE) Antikörpern gegen das Lebensmittelprotein reagieren.^[47] IgE-Antikörper können an Rezeptoren von beispielsweise Mastzellen und Basophilen binden.^[49] Bei einer zweiten Exposition werden diese aktiviert und es kommt zu einer Kreuzvernetzung der Rezeptoren, sodass z.B. die zu den Botenstoffen zählenden Leukotriene, Prostaglandine, Cytokine und Histamin freigesetzt werden.^[49] Durch die Freisetzung der Botenstoffe kommt es zu einer allergischen Sofortreaktion.^[49] Bisher besteht der Schutz für Betroffene in der Expositionsprophylaxe, bei versehentlicher Aufnahme des Allergens finden Adrenalin-Autoinjektoren Anwendung und auch Immuntherapien stehen im Fokus der Forschung.^[50] Bei der oralen Immuntherapie werden Betroffene dem Erdnussallergen in geringen Dosen über einen längeren Zeitraum ausgesetzt, um dessen Toleranzgrenze zu erhöhen.^[47] Beispielsweise wurde in Phase II einer klinischen Studie im Jahr 2018 das Arzneimittel Palforza® (AR101), welches Erdnussprotein enthält, zur oralen Immuntherapie bei Erdnussallergie getestet.^[51] Nach ca. sechs Monaten der Behandlung konnten Teilnehmer der Studie die 18-fache Menge des Allergens tolerieren.^[51] Während der Studie erlitten 28 von 29 Teilnehmern mindestens ein unerwünschtes Ereignis und sechs von 29 Teilnehmern mussten abbrechen.^[51] Hierbei wird deutlich, dass Allergiker auf die korrekte Deklaration von Erdnuss enthaltenen Lebensmitteln angewiesen sind.

3.2.3. Mandel und Haselnuss

Zu den ältesten kultivierten Baumnüssen gehören Mandeln (*Prunus dulcis MILLER*), die botanisch den Steinfrüchten zugeordnet und hauptsächlich in Regionen mit mediterranem Klima, wie in den USA sowie Spanien, angebaut werden.^[37] Der Mandelbaum wird in die Familie der Rosengewächse (*Rosaceae*) eingeordnet und die nährstoffreichen Nüsse sind eine gute Quelle für Vitamin E und Magnesium.^[35] Zudem sind sie reich an Fettsäuren und Mineralien und stellen eine pflanzliche Quelle für Proteine dar.^[37] Mandelkerne mit einem niedrigen Gehalt an Lipiden sind geeignet zur Verarbeitung zu Mandelmilch oder -mehl.^[35] Kerne mit einem hohen Lipidgehalt werden sowohl in der Backindustrie, beispielsweise zur Verarbeitung zu Nougat, als auch zur Extraktion des Öls verwendet.^[52] Mandelöl findet Anwendung in der Kosmetikindustrie und in Pharmazeutika.^[52] Wie zuvor in Abbildung 3 gezeigt, sind sie mit ca. 1258 000 Tonnen die Baumnüsse mit der größten Produktionsmenge weltweit. Zu den Hauptanbauländern zählen die USA, die mit 80% (1.0 Millionen Tonnen) den größten Anteil zur weltweiten Produktionsmenge im Erntejahr 2018/19 beitrugen, sowie Australien (6%) und Spanien (5%).^[42] Im Jahr 2018 gehörten sie mit ca. 1.2 Millionen Tonnen zu den zweitbeliebtesten konsumierten Nüssen weltweit (Abbildung 5).

Die Haselnuss (*Corylus avellana*) aus der Familie der Birkengewächse (*Betulaceae*) wird beispielsweise in Ländern wie der Türkei, den USA und Georgien kultiviert.^[37] Der Großteil an Haselnüssen (ca. 90 – 95%) wird geschält als Kerne verkauft.^[37] Diese finden hauptsächlich Anwendung in Schokoladenprodukten und Backwaren.^[37] Einen großen Anteil der enthaltenen Nährstoffe, neben Proteinen, Vitaminen und Phytosterolen, nimmt das Haselnussöl mit 50 – 70% ein, welches ebenfalls als Lebensmittel oder in der Back- und Kosmetikindustrie Anwendung findet.^[35] Im Erntejahr 2018/19 betrug die weltweite Haselnussproduktion ca. 459 000 Tonnen.^[42] Von diesen stammen 63% (287 5500 Tonnen) aus der Türkei, gefolgt von 13% (61 100 Tonnen) aus Italien, 6% (27 880 Tonnen) aus Aserbajdschan und 4% aus Georgien.^[42] Zu weiteren Anbauländern zählen die USA, Chile und Iran.^[42]

3.3. *Metabolomics* in der Lebensmittelanalytik

In der Lebensmittelanalytik wird das Forschungsfeld *Metabolomics* für die Untersuchung von diversen Fragestellungen eingesetzt.^[53] Hierzu zählen u.a. die Überprüfung der Authentizität und die Identifizierung von Metaboliten in Lebensmitteln.^[53] Zudem können Veränderungen im Metabolom von Lebensmitteln durch Lagerung oder Schimmelpilzbefall untersucht werden und Rückschlüsse daraus gezogen werden.^[53] Zu den gängigen analytischen Methoden zählen Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (GC-MS), LC-MS sowie NMR-Spektroskopie.^[53]

Bei der Untersuchung der Authentizität von Lebensmitteln sind Studien zur geographischen Herkunftsbestimmung bekannt, die sich mit verschiedenen analytischen Methoden mit unterschiedlichen Matrices (Haselnuss, Mandel) beschäftigen.^[12,54] In Bezug auf Walnüsse wurde eine geographische Herkunftsanalyse von Esteki *et al.* mit Nüssen aus sechs unterschiedlichen Regionen des Irans durchgeführt.^[55] Durch Gaschromatographie wurden Chromatogramme mit den entsprechenden Fettsäure-Mustern erhalten und mittels multivariater Statistik ausgewertet.^[55] Mit Verwendung eines PCA-lineare Diskriminanzanalyse-Modells (LDA, engl. *linear discriminant analysis*) wurden hohe Zuordnungsgenauigkeiten des Training-Sets (99.2%) und des Test-Sets (98.3%) erhalten, jedoch nur ein Erntejahr betrachtet.^[55] Gu *et al.* untersuchten mit einem *partial least squares*-Diskriminanzanalyse-Modell (PLS-DA, engl. *partial least squares-discriminant analysis*) Walnüsse aus dem autonomen Gebiet Xinjiang in China.^[56] Bei der PLS-DA handelt es sich um eine Methode, bei der die Gruppenzugehörigkeit bekannt ist, um somit eine maximale Trennung von Proben Gruppen zu erreichen.^[57] Es wurden Proben aus drei unterschiedlichen Regionen sowohl mit Nahinfrarotspektroskopie (NIR, engl. *near-infrared spectroscopy*) als auch mit mittlerer Infrarotspektroskopie (MIR, engl. *mid-infrared spectroscopy*) untersucht.^[56] Eine höhere Zuordnungsgenauigkeit des Modells, bezogen auf die geographische Herkunftsbestimmung, konnte mit den NIR-Daten (Training-Set: 99.8%, Test-Set: 99.6%) im Vergleich zu den MIR-Daten (Training-Set: 89.9%, Test-Set: 86.6%) erhalten werden.^[56] Es wurden ebenfalls Walnüsse aus lediglich einem Erntejahr untersucht. Des Weiteren wurde die NMR-Spektroskopie von Popescu *et al.* angewendet, um Unterschiede verschiedener Genotypen von Walnüssen aus unterschiedlichen geographischen Herkünften zu untersuchen.^[36] Hierbei wurden insgesamt 64 Proben aus Ländern, wie hauptsächlich Rumänien und den USA, verwendet.^[36] Es erfolgte eine Charakterisierung des chemischen Profils, eine Analyse mittels Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie ($\delta^{13}\text{C}$ -IRMS, engl. *isotope-ratio mass spectrometry*) und die Untersuchung des Fettsäure-Profiles mit ^1H -NMR-Spektroskopie und anschließender Auswertung mittels Diskriminanzanalyse (DA).^[36]

Einleitung

Neben der geographischen Herkunftsanalyse ist die Detektion von Verfälschungen mit anderen Lebensmitteln ein großes Feld der Lebensmittelanalytik. Ein aktuelles Beispiel, welches in der von Europol/Interpol organisierten Operation VIII (2018/2019) untersucht wurde, ist die Verfälschung des qualitativ hochwertigen Arabica Kaffees mit den preiswerteren Robusta Bohnen.^[9] Hierbei wurde die NMR-Spektroskopie zur Detektion einer gezielten Markersubstanz (16-O-Methylcafestol (**4**), 16-OMC) zur Unterscheidung von Arabica und Robusta Kaffee verwendet.^[11] Der spektrale Bereich des chemischen Markers um 3.16 ppm ist in Abbildung 6 dargestellt.

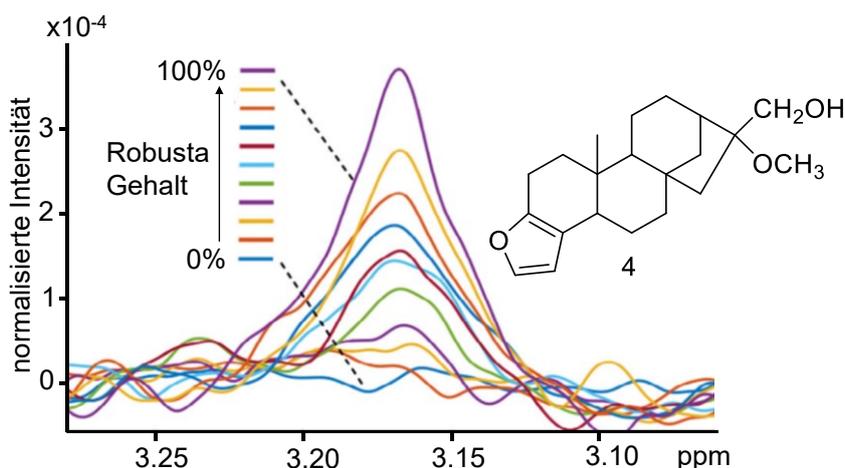


Abbildung 6: Es ist der Bereich des ¹H-NMR-Spektrums (60 MHz) des chemischen Markers 16-OMC (**4**) nach Defernez *et al.* verändert gezeigt.^[58] Die NMR-Spektren zeigen die Intensitätszunahme des Signals der Methoxygruppe bei 3.16 ppm in verschiedenen Mischungen von Robusta und Arabica.^[58]

An einem 60 MHz Spektrometer wurden ¹H-NMR-Spektren des lipophilen Extraktes von Mischungen von Arabica und Robusta Kaffee gemessen.^[58] Das Signal bei 3.16 ppm wurde der Methoxygruppe von 16-OMC (**4**) zugeordnet und es ist ein Intensitätsanstieg bei zunehmendem Robusta Gehalt zu beobachten.^[58] In einem weiteren Beispiel wurden Kakaoschalen in Kakao mit einer *targeted* Methode mittels einer MS-basierten Methode anhand von chemischen Markern nachgewiesen.^[59] Verfälschungen treten zudem häufig bei Speiseölen auf, daher entwickelten Mannina *et al.* eine NMR-basierte Methode zur Detektion vom preiswerteren Haselnussöl als Verfälschung in Olivenöl, mit der bis zu 10% Beimengungen detektiert wurden.^[60] Als Verfälschungsmittel werden häufig preiswerte Lebensmittel mit hoher Verfügbarkeit verwendet, wozu beispielsweise auch Erdnüsse zählen. Bei der Verwendung von Erdnüssen besteht eine potentielle Gesundheitsgefährdung für Verbraucher, da es sich um ein Lebensmittel mit allergenem Potential handelt.^[7] Der Nachweis von Erdnüssen kann auf Basis der allergenen Proteine erfolgen. Dabei werden DNA-basierte Methoden, wie die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, engl. *polymerase chain reaction*), immunologische Methoden (ELISA, engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*) und auch MS-

Einleitung

basierte Methoden verwendet.^[61–66] Die Detektion von Erdnüssen kann jedoch auch mit anderen analytischen Methoden erfolgen, so entwickelten Gosh *et al.* eine Methode zur Unterscheidung von Erdnüssen und verschiedenen Getreiden und Nüssen mittels NIR-Spektroskopie in Kombination mit PCA und einem PLS-DA-Modell.^[1] Des Weiteren wurde eine Methode mit optischer Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-OES, engl. *inductively coupled plasma-optical emission spectrometry*) mittels chemometrischer Methoden ausgewertet, um Erdnüsse in Mandeln nachzuweisen.^[67] Bei der Klassifizierung wurden die Probengruppen in Erdnuss, Mandel und verfälschte Proben eingeteilt und mit einem LDA-Modell wurden 100% der Proben der entsprechenden Gruppe korrekt zugeordnet.^[67] Bei dem Test-Set wurde eine Genauigkeit von 98% erhalten.^[67]

3.4. NMR-Spektroskopie im *Metabolomics*-Bereich

Die NMR-Spektroskopie zählt zu den wichtigsten Methoden für die Strukturaufklärung.^[68] Felix Bloch und Edward M. Purcell entdeckten das Phänomen der Kernspinresonanz in Festkörpern und Flüssigkeiten unabhängig voneinander im Jahr 1946.^[68] Inzwischen findet die NMR-Spektroskopie Anwendung in verschiedenen Bereichen, wie der Chemie, Biologie, Physik und Medizin, bei diversen Fragestellungen, wie z.B. der Untersuchung von Reaktionsmechanismen oder dynamischen Prozessen.^[68,69] Das Forschungsfeld *Metabolomics* zählt zu den neueren Anwendungsgebieten und bringt unterschiedliche Herausforderungen mit sich. Zum einen werden meist komplexe Gemische untersucht, die eine Vielzahl von Metaboliten verschiedener Stoffklassen mit einem großen dynamischen Konzentrationsbereich aufweisen. Die chemische Verschiebung und Linienbreite sind dabei abhängig von dem pH-Wert, der Ionenstärke, der Temperatur und dem Proteingehalt.^[70] Zum anderen sind die Matrices vielfältig und reichen von Lebensmitteln über Biofluide bis hin zu Zellen.^[71] Hier zeigen sich die Vorteile der NMR-Spektroskopie, da es sich um eine nicht-destruktive Methode handelt und sowohl der geringe Aufwand für die Probenvorbereitung als auch die kurzen Analysezeiten im *Metabolomics*-Bereich vorteilhaft sind.^[71] Außerdem können eine Vielzahl an ein- und zweidimensionalen NMR-Experimenten zur Identifizierung von Metaboliten herangezogen werden. Neben der qualitativen Identifizierung nimmt die Quantifizierung eine wichtige Rolle ein, die durch den proportionalen Zusammenhang zwischen den Signalen im NMR-Spektrum und der Konzentration der Metaboliten ermöglicht wird.^[72] Ein Nachteil ist die geringe Sensitivität der Methode und speziell in einem *Metabolomics*-basierten Ansatz die Überlagerung von Signalen.^[72] Bei einem *Metabolomics*-basierten Ansatz wird zwischen *targeted* und *non-targeted* Methoden unterschieden. In einer *targeted* Methode werden gezielt spezifische Metaboliten betrachtet.^[57] Bei *non-targeted* Methoden repräsentieren die NMR-Spektren das charakteristische metabolische Profil einer Probe.^[55] Hierbei handelt es sich um hoch komplexe multivariate Daten, die mittels Chemometrie ausgewertet werden können.^[55]

Im Bereich *Metabolomics* werden hauptsächlich Protonenspektren gemessen, da der ^1H -Kern im Vergleich zu anderen Kernen, wie ^{31}P , ^{13}C , ^{15}N oder ^{17}O , die höchste Sensitivität aufweist.^[57] Bei der Messung von Protonenspektren von wässrigen Lösungen mit D_2O bereitet das HDO Restsignal vom Wasser Schwierigkeiten, da es meist eine wesentlich höhere Intensität aufweist als die Signale der Substanzen.^[69] Für die Spektrenaufnahme ist das eindimensionale *nuclear overhauser enhancement spectroscopy* (1D- ^1H -NOESY)-Experiment im *Metabolomics*-Bereich etabliert, da die effektive Unterdrückung des Wassers durch das Experiment nur wenig Optimierung bedarf und die Pulssequenz für moderne Spektrometer zugänglich ist.^[73] Die Wasserunterdrückung erfolgt beim 1D- ^1H -NOESY-Experiment durch die

water eliminated fourier transform (WEFT)-Sequenz.^[73] Durch die kleinere T_1 -Relaxationszeit (Spin-Gitter-Relaxationszeit) des Wassers, im Vergleich zu den gelösten Substanzen, sowie die Anwendung von Phasenzyklen und einer geeigneten Mischzeit wird das Wassersignal ausgelöscht.^[72] Die schnellere Relaxationszeit des Lösungsmittels resultiert aus dem *radiation damping*.^[74] Hierbei handelt es sich um einen Effekt, bei dem die Induktion eines entgegengesetzten Magnetfeldes durch das Lösungsmittelsignal erfolgt, welches wie ein Puls mit entgegengesetzter Phase wirkt.^[73,74] Eine weitere Pulssequenz zur Aufnahme von ^1H -NMR-Spektren ist das *zgesgp*-Experiment. Dies verwendet die *excitation sculpting* Sequenz für die Wasserunterdrückung. Zudem wird das ^1H -Experiment, bei dem die Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG)-Sequenz verwendet wird, um Proteinsignale herauszufiltern, im *Metabolomics*-Bereich angewendet.^[75] Auch das *heteronuclear single quantum coherence spectroscopy* (HSQC)-Experiment, welches hauptsächlich Anwendung in der Strukturaufklärung durch Identifizierung von $^1J_{\text{CH}}$ -Kopplungen findet, kann für einen *Metabolomics*-basierten Ansatz verwendet werden.^[76] Da die Messzeit eines 2D-NMR-Experiments erheblich länger ist als bei der Aufnahme von Protonenspektren, werden optimierte Experimente, wie das zweidimensionale *acceleration by sharing adjacent polarization* (ASAP)-HSQC, verwendet.^[77]

Für die Strukturidentifizierung werden zusätzlich zweidimensionale Experimente, wie das homonukleare *H,H-correlation spectroscopy* (COSY) oder NOESY-Experiment, eingesetzt.^[78] Transiente Kern-Overhauser-Effekte (NOE, engl. *nuclar overhauser effect*) werden analysiert, um Informationen über die räumliche Anordnung im Molekül zu erhalten.^[78] Das *heteronuclear multiple bond correlation* (HMBC)-Spektrum gibt Informationen über Kopplungen mit einer Reichweite über mehrere Bindungen.^[79] Da im *Metabolomics*-Bereich komplexe Gemische betrachtet werden, eignen sich zudem selektive NMR-Experimente. Für die Identifizierung einzelner Spinsysteme durch die Übertragung der Magnetisierung von einem Kern zu einem koppelnden Kern wird das selektive 1D-*total correlation spectroscopy* (TOCSY)-Experiment (*se/TOCSY*) verwendet.^[78] Bei diesem Experiment wird die Frequenz des selektiven Pulses auf die Resonanzfrequenz des anzuregenden Protons eingestellt.^[69] Daraufhin folgt eine Mischphase unter Spin-Lock-Bedingungen, bei der die Magnetisierung des angeregten Protons auf weitere Protonen des gleichen Spinsystems übertragen wird.^[69] Dementsprechend wird nach der darauffolgenden Aufnahme des freien Induktionszerfalls (FID, engl. *free induction decay*) und Fourier Transformation (FT) ein Spektrum erhalten, welches die Signale von koppelnden Protonen eines Spinsystems zeigt.^[69] Analog werden in einem eindimensionalen selektiven NOESY-Experiment (*se/NOESY*) Kopplungen von einem angeregten Proton durch den Raum detektiert.^[79]

3.5. Multivariate Statistik

Bei der Analyse von großen Datensätzen, wie sie in *Metabolomics*-basierten Ansätzen meist erhalten werden, werden multivariate Analysemethoden zur Datenreduktion verwendet, um relevante Informationen zu erhalten.^[80] Bei der Datenanalyse können Variablen mit einem Informationsgehalt von Variablen ohne Information (z.B. Rauschen) getrennt werden.^[80] Eine sogenannte *feature selection* kann dabei helfen, Variablen mit einem hohen Informationsgehalt auszuwählen.^[80] Dabei wird eine Teilmenge der vorhandenen Variablen zur Bildung eines Modells verwendet. Für die Auswertung von NMR-Daten können Variablen identische Informationen über Signale desselben Metaboliten liefern und entsprechend manuell aussortiert werden. Zudem können Variablen im Bereich vom Rauschen entfernt und das Verhältnis zwischen Variablen und Proben reduziert werden.^[81] Mit der Information der Variablen kann zusätzlich ein Modell zur Vorhersage unbekannter Proben erstellt werden.^[80] Die anschließende Auswertung erfolgt über multivariate statistische Verfahren, wobei zwischen gerichteten und ungerichteten Methoden unterschieden wird.^[31] Bei ungerichteten Methoden wird das Signalmuster untersucht, während bei gerichteten Methoden spezifische Merkmale einzeln betrachtet werden.^[31] Zur allgemeinen Analyse und Veranschaulichung von Daten bieten sich zunächst sogenannte Boxplots an (Abbildung 7).^[80]

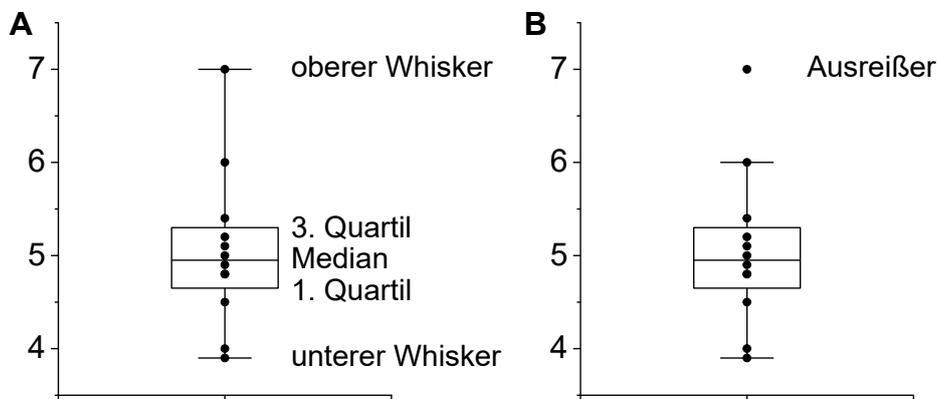


Abbildung 7: **A:** Boxplot zur Veranschaulichung der Lage und Streuung von Daten. Im Bereich der Box liegen 50% der Datenpunkte und die horizontale Linie kennzeichnet den Median. Unterhalb des 1. Quartils und oberhalb des 3. Quartils liegen jeweils 25% der Messwerte. Die Antennen (Whisker) zeigen die Spannweite zum minimalen und maximalen Wert. **B:** Im modifizierten Boxplot erfolgt eine abweichende Darstellung, bei der zusätzlich potentielle Ausreißer angezeigt werden.^[80]

Im Boxplot wird die Lage und Streuung von Werten graphisch dargestellt und der Median durch die horizontale Linie gekennzeichnet.^[82] Die Box umfasst den Bereich des Quartilabstands, in dem 50% der Werte liegen. Unterhalb des 1. Quartils und oberhalb des 3. Quartils liegen somit jeweils 25% der Messwerte.^[80] Die Antennen, auch Whisker genannt, stellen die Spannweite zum Minimum und Maximum der Datenreihe dar (**A**).^[82] Potentielle Ausreißer in der Datenreihe können in einer modifizierten Darstellung des Boxplots ermittelt werden (**B**).^[80]

Zu den grundlegenden Verfahren multivariater Analysemethoden zählen hauptsächlich die Regressions-, Varianz-, Diskriminanz- sowie Hauptkomponentenanalyse.^[82] Die Regressionsanalyse wird im Fall einer abhängigen und einer oder mehrerer unabhängigen Variablen herangezogen, damit Zusammenhänge beschrieben und Prognosen durchgeführt werden können.^[82] Die Güte einer Regressionsanalyse wird mit dem Bestimmtheitsmaß (R^2) angegeben, dessen dimensionsloser Wert zwischen Null und Eins liegt.^[82] Je höher der R^2 -Wert ist, desto besser ist die Anpassung des Modells und umso präziser können Voraussagen getroffen werden.^[82] Bei der Varianzanalyse wird zwischen zwei Varianten unterschieden. Bei der Betrachtung von nur einer abhängigen Variablen handelt es sich um eine univariate Varianzanalyse (ANOVA, engl. *analysis of variance*), bei mehr als einer abhängigen Variablen wird eine multivariate Varianzanalyse (MANOVA, engl. *multivariate analysis of variance*) verwendet.^[82] Bei der Diskriminanzanalyse werden Gruppenunterschiede untersucht und es kann anschließend basierend auf den Ergebnissen eine Klassifizierung durchgeführt werden.^[82]

Bei der Analyse von Substanzgemischen, wie sie bei der Anwendung der NMR, IR, LC-MS oder GC-MS im Forschungsbereich *Metabolomics* auftreten, ist die Anwendung multivariater statistischer Verfahren notwendig, um die relevanten Informationen aus den komplexen Datensätzen extrahieren zu können.^[30] Die Prozessierung der Rohdaten stellt einen wesentlichen Bestandteil vor der Auswertung dar.^[31] Im Fall von NMR-Spektren werden häufig digitale Filter verwendet, wie der Baseopt Filter der Firma Bruker, durch die bei der automatischen Prozessierung bessere Resultate bezüglich der Phasenkorrektur und der Basislinie erzielt werden.^[83] Ebenfalls muss eine Kalibrierung des Spektrums auf ein definiertes Referenzsignal erfolgen. Häufig werden im *Metabolomics*-Bereich polare Extrakte untersucht, wobei Trimethylsilylpropionsäure (TSP- d_4 , $\delta = 0.00$ ppm) oder bei weniger polaren Extrakten auch Octamethylcyclotetrasiloxan (OMS, $\delta = 0.085$ ppm) als Alternative zum flüchtigen Tetramethylsilan (TMS, $\delta = 0.00$ ppm) Anwendung finden. Im NMR-Spektrum wird jedes Signal durch eine Vielzahl an Datenpunkten beschrieben, die jedoch alle dieselbe Information enthalten. Daher erfolgt eine Datenreduktion durch das sogenannte *bucketing*, bei dem die NMR-Spektren in einzelne Teilbereiche unterteilt werden. Hierbei bestehen zwei Möglichkeiten, zum einen kann das *bucketing* automatisch mit einer voreingestellten Breite (z.B. 0.03 ppm) durchgeführt werden und zum anderen kann eine manuelle Auswahl von *Buckets* mit variabler Breite erfolgen. Dabei ist zu beachten, dass bei einer manuellen Durchführung *Signal shifts* berücksichtigt werden sollten, die bei einer zu kleinen *Bucket*-Größe je nach Spektrum einem anderen *Bucket* zugeordnet sein könnten.^[31] Zudem können Signale von Metaboliten im NMR-Spektrum in mehreren *Buckets* vorkommen, was eine stärkere Gewichtung zur Folge hat.^[31] Die Auswahl von zu großen *Buckets* kann auch

problematisch sein, da Informationen über geringer konzentrierte Metaboliten verloren gehen können. Zudem werden für die weitere Analyse irrelevante Signale des Lösungsmittels und des Standards ausgeschlossen, indem sie beim *bucketing* nicht mit einbezogen werden. Durch anschließende Normalisierung der Daten werden Varianzen entfernt, die durch Probenaufarbeitung entstehen können.^[31] Konzentrationsunterschiede von Metaboliten werden durch das *Scaling* berücksichtigt.^[31] Skalierungsverfahren basieren auf der Division der einzelnen Variablen durch einen Faktor, der für jede Variable verschieden ist.^[84] Bei der Skalierung nach der Einheitsvarianz wird als Faktor die Standardabweichung verwendet.^[84] Werden bei einem Modell relevante Variablen vernachlässigt, so wird dies als *underfitting* bezeichnet, was zu einer schlechten Vorhersage des Modells führt.^[82] Zudem kann es jedoch auch zu einem *overfitting* kommen, wenn die Trennung zweier Probengruppen zu restriktiv beschrieben wird.^[85] Denn obwohl das Modell in der Kalibrierung eine gute Vorhersage liefert, so kommt es bei der Vorhersage von unbekanntem Proben zu einer schlechten Vorhersage und das Modell ist dementsprechend nicht robust.^[80] Die statistische Auswertung wird zudem negativ beeinflusst, wenn die Variablenanzahl die Probenanzahl übersteigt, da infolgedessen das sogenannte statistische Rauschen steigt und es sich Abhängigkeiten zwischen den Daten zeigen, die jedoch keine Grundlage haben. Als Methode zur Visualisierung der Daten bietet sich die Hauptkomponentenanalyse an, durch die eine Datenreduzierung erfolgt und die Daten nach der größten Varianz getrennt werden.

3.5.1. Hauptkomponentenanalyse

Bei der Hauptkomponentenanalyse handelt es sich um eine ungerichtete multivariate Analyseverfahren, bei der Merkmale mit der größten Varianz eines Probensatzes betrachtet werden.^[10] Diese Methode wurde erstmals im Jahr 1901 durch den Mathematiker Karl Pearson beschrieben.^[86] Seither findet sie unter anderem Anwendung in Natur- als auch in Sozialwissenschaften.^[80] Die PCA bietet sich an, um einen Überblick über Homogenität, Trends, Clusterbildung und Ausreißer der Daten zu erhalten.^[30]

Einleitung

Bei der PCA werden aus den Messdaten zunächst durch eine Linearkombination latente Variablen, die Hauptkomponenten (PC), berechnet.^[80] Anschließend werden die Ausgangsdaten in ein neues Koordinatensystem überführt, welches aus den berechneten Hauptkomponenten gebildet wurde.^[80] Das Prinzip der PCA stellt eine Datenreduktion dar, indem mehrere Variablen zu wenigen Hauptkomponenten zusammengefasst werden.^[80] Das Prinzip der PCA wird in Abbildung 8 graphisch dargestellt.^[80]

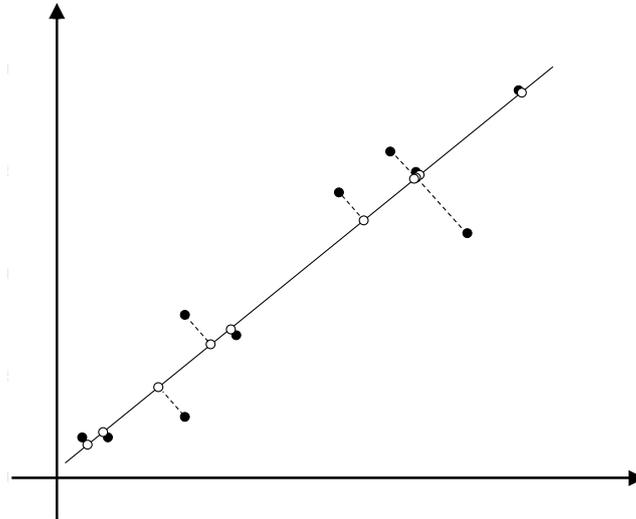


Abbildung 8: Gezeigt ist das Prinzip der Hauptkomponentenanalyse. Es sind Messwerte (schwarz) in einem Koordinatensystem graphisch aufgetragen. Die Datenpunkte werden auf eine Gerade projiziert (weiß), die in Richtung der maximalen Varianz zeigt. Die Bestimmung der orthogonalen zweiten PC verläuft analog, sodass diese die zweitgrößte Varianz abbildet.^[80]

Es sind insgesamt zehn Messwerte (schwarz) in einem Koordinatensystem aufgetragen.^[80] Die Datenpunkte werden anschließend auf eine Achse projiziert (weiß), mit der die größtmögliche Varianz dargestellt wird und die somit in Richtung dieser zeigt.^[80] Die Hauptkomponente verläuft demnach so, dass sich für die Achse das kleinste Fehlerquadrat in Bezug auf die Datenpunkte ergibt. Der Ursprung liegt im Mittelwert über alle Daten entlang der Achse. Die Projektionen der Daten als neue Koordinatenwerte werden auch als *Scores* bezeichnet und das neue Koordinatensystem ist um den Nullwert konstruiert.^[80] Der Weg vom ursprünglichen in das neue Koordinatensystem der Hauptkomponenten wird durch die *Loadings* beschrieben.^[80] Sie geben die Gewichtung der Variablen aus dem Originaldatenraum an, was bedeutet, dass ein hoher *Loading*-Wert einer Variable auf eine Signifikanz für die PC hinweist.^[80] Die Richtung im *Score*-Plot korrespondiert demnach mit der aus dem *Loading*-Plot.^[30] Bei Bestimmung der zweiten Hauptkomponente wird analog vorgegangen. Es wird erneut eine Achse in Richtung der zweitgrößten Varianz bestimmt, jedoch mit der Voraussetzung, dass diese orthogonal zur ersten Hauptkomponente steht.^[80] Mit diesem Prinzip können weitere Hauptkomponenten berechnet werden, die entsprechend die nächstgrößte Varianz abbilden.

3.5.2. Klassifizierungsverfahren

Die Modellerstellung für die Zuordnung unbekannter Proben kann mit verschiedenen Verfahren erfolgen. Dabei ist zu beachten, dass die Auswahl eines Klassifizierungsverfahrens vom Datensatz und der Fragestellung abhängt und somit kein ideales Verfahren existiert.^[82]

Zu bekannten Verfahren zählen die Regressions- und Diskriminanzanalyse sowie Entscheidungsbäume, *k*-nächste-Nachbarn (engl. *k-nearest neighbor*) und *support vector machine* (SVM) Klassifikatoren.^[87] Die lineare Diskriminanzanalyse dient ebenso wie die PCA der Datenreduzierung, gehört jedoch zu den gerichteten Analysen.^[82] Durch eine LDA können Zusammenhänge von Gruppenzugehörigkeiten analysiert und unbekannte Proben basierend auf ihren Merkmalsvariablen zugeordnet werden.^[82] Die logistische Regression gehört ebenfalls, wie die Diskriminanzanalyse, zu den klassischen statistischen Analyseverfahren zur Klassifizierung, wird aber auf Grund der Verwendung einer s-förmigen logistischen Funktion den nicht-linearen Analyseverfahren zugeordnet.^[82] Es wird die Wahrscheinlichkeit bestimmt, mit der ein Objekt in Abhängigkeit von Variablen in eine Gruppe eingeordnet werden kann.^[82]

Bei der SVM handelt es sich um ein Klassifizierungsverfahren, welches durch Vapnik *et al.* eingeführt wurde und auf der Bildung einer linearen Hyperebene zur bestmöglichen Trennung von Objekten basiert.^[88] Das Prinzip der SVM ist in Abbildung 9 dargestellt.

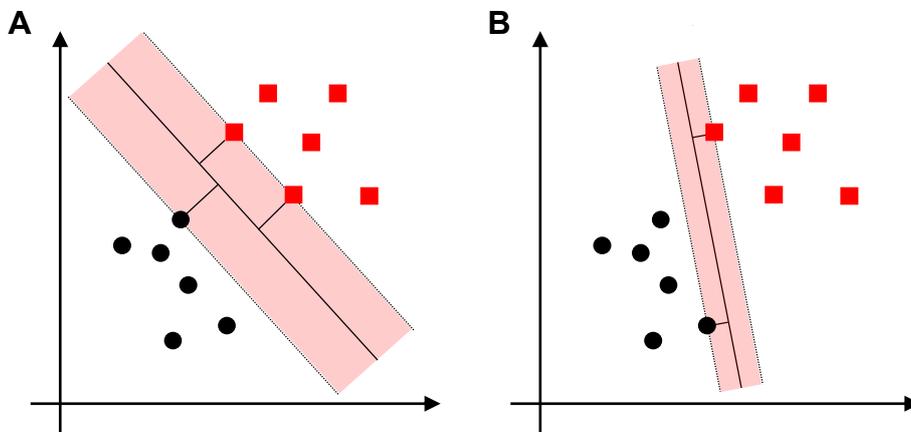


Abbildung 9: Klassifizierung mittels der *support vector machine* im zweidimensionalen Raum. Die beiden Probengruppen (schwarz, rot) werden in beiden Fällen **A** und **B** durch eine Hyperebene getrennt, die mit Hilfe von Datenpunkten, den sogenannten Stützvektoren, erstellt wurde. Im gezeigten Beispiel sind theoretisch unterschiedliche Trennebenen denkbar und zwei schematisch dargestellt. Da jedoch eine Maximierung der Fläche zwischen Hyperebene und Stützvektoren angestrebt wird, würde in diesem Beispiel die Hyperebene aus **A** bevorzugt werden.^[89]

In der SVM wird die Hyperebene anhand von Datenpunkten, den sogenannten Stützvektoren, beschrieben.^[89] Dabei wird eine Maximierung der Fläche zwischen der Hyperebene und den Stützvektoren angestrebt.^[89] Im dargestellten Beispiel zeigt die Hyperebene in **A** im Vergleich zu **B** einen größeren Abstand (*large margin*) zu den Stützvektoren und würde somit bevorzugt werden.^[89] Bei einer Zuordnung eines neuen Datenpunktes einer unbekannt Probe wird

Einleitung

ermittelt, auf welcher Seite der Hyperebene dieser liegt und demnach würde er einer Gruppe zugeordnet werden. Andere nicht-lineare Varianten der *support vector machine* verwenden den sogenannte *Kernel-Trick*.^[88] *Kernels* stellen funktionale skalare Produkte in einem höherdimensionalen Raum dar.^[88] Zu diesen Varianten zählen zum Beispiel die kubische oder quadratische SVM.

Bei einem kleinen Probensatz kann ein einzelnes Klassifizierungsmodell ein verzerrtes Ergebnis darstellen und eine hohe Varianz aufweisen.^[90] Ein solches Modell mit einer schwachen Leistung kann beispielsweise verbessert werden, indem mehrere Klassifikatoren kombiniert werden und eine Zuordnung abschließend basierend auf einer finalen Entscheidungsregel erfolgt.^[90] Zu diesen Klassifizierungsverfahren, bei denen eine Kombination mehrerer Modelle erfolgt, zählt zum Beispiel das *random subspace* Modell (RSM).^[91] Hierbei wird je ein zufälliges Set aus Variablen zur Bildung der einzelnen Modelle verwendet.^[91] RSM wird häufig auf Entscheidungsbäume angewendet und eignet sich auch für LDA oder *k-nearest neighbor* Klassifizierungen.^[90]

3.5.3. Validierung

Die Zuverlässigkeit eines Modells wird durch eine Validierung beurteilt.^[92] Die Validierung eines Modells kann sowohl extern als auch intern erfolgen.^[92] Bei einer externen Validierung wird der Datensatz meist im Verhältnis 2:1 geteilt, sodass ein vom Training-Set unabhängiges Test-Set entsteht.^[92] Mit dem Training-Set wird das Modell anschließend erstellt und das Test-Set wird zur Überprüfung der Vorhersagegenauigkeit verwendet.^[92] Zu internen Validierungen zählen beispielsweise die Kreuzvalidierung (CV) und *Resampling*-Verfahren.^[92] Die bekanntesten *Resampling*-Verfahren sind die von Efron *et al.* entwickelte Bootstrap-Methode und das Jackknife-Verfahren.^[93,94] In vielen chemometrischen Studien wird jedoch die Kreuzvalidierung verwendet, die eine Möglichkeit zur Validierung darstellt, sollte der Datensatz zu klein zur Entnahme eines Test-Sets sein.^[31] Durch die CV kann der Vorhersagefehler des Klassifizierungsmodells abgeschätzt werden.^[88] Das Prinzip einer *k*-fachen Kreuzvalidierung besteht in der Aufteilung des Datensatzes in *k* Sub-Sets, wobei jeweils eines bei der Modellerstellung zurückgehalten wird.^[92] Beispielsweise erfolgt die Modellerstellung und anschließende Vorhersage mit einem Test-Set bei einer 5-fachen Kreuzvalidierung insgesamt fünfmal.^[95] Da dabei fünf verschiedene Modelle erstellt werden, gibt die Kreuzvalidierung einen Hinweis auf die Variabilität des Modells und zusätzlich werden zufällig hohe Vorhersagegenauigkeiten durch eine bestimmte Zusammensetzung eines Test-Sets ausgeglichen.^[95] Des Weiteren kann eine verschachtelte Kreuzvalidierung (engl. *nested cross-validation*) verwendet werden.^[96] Hierbei wird das Modell in einer inneren Schleife trainiert und durch eine äußere Schleife bewertet.^[96] Der gesamte Datensatz wird für die äußere Kreuzvalidierung in fünf Sub-Sets unterteilt und je vier Sub-Sets zum Training-Set vereint.^[97] Das Modell wird mittels des Training-Sets in der inneren *k*-fachen Kreuzvalidierung trainiert.^[97] Das übrige Sub-Set dient anschließend als Test-Set und der Vorgang wird insgesamt fünfmal wiederholt, damit jede Probe einmal im Test-Set vorkommt.^[97] Der verschachtelte CV Ansatz liefert ein weniger verzerrtes Modell im Gegensatz zur *k*-fachen CV.^[88] Zudem kann der gesamte Datensatz anschließend erneut zufällig in fünf Sub-Sets unterteilt werden und der Prozess wiederholt werden, sodass eine wiederholte verschachtelte CV durchgeführt wird.

4. Zielsetzung

Bei einem wirtschaftlich motivierten Lebensmittelbetrug steht die Gewinnsteigerung im Vordergrund, die durch Umdeklaration oder Beimengungen von preisgünstigeren Lebensmitteln erreicht wird. Hierbei können Konsumenten getäuscht werden, indem ein Produkt hoher Qualität mit minderwertiger Ware verfälscht wird. Werden Erdnüsse als kostengünstiges Verfälschungsmittel verwendet, kann für Konsumenten eine potentielle Gefahr durch nicht deklarierte Allergene und folglich gesundheitliche Schäden entstehen. Ebenfalls kann Lebensmittelbetrug in Bezug auf die geographische Herkunftsbezeichnung auftreten, denn Produkte spezieller Herkunft werden national, aber auch international als qualitativ hochwertig angesehen und erzielen so höhere Marktpreise.

Zur Authentizitätsprüfung von Lebensmitteln sollte ein *Metabolomics*-basierter Ansatz mittels NMR-Spektroskopie entwickelt werden. Hierfür sollten Walnüsse, welche zu den fettreichen Lebensmitteln zählen, als Test-Matrix untersucht werden. Der Fokus sollte zunächst auf der Probenakquise liegen, da authentische Proben eine unerlässliche Grundlage für die Entwicklung einer Methode zur Herkunftsbestimmung darstellen. Anschließend sollte eine *standard operation procedure* (SOP) zur Aufarbeitung, Lagerung und Extraktion der Proben entwickelt werden. Es sollten diverse Extraktionsmethoden mit deuterierten Lösungsmitteln und -gemischen getestet werden. Mit dem authentischen Probenmaterial sollte anschließend eine *non-targeted* Methode zur Herkunftsbestimmung entwickelt werden. Hierbei sollten maschinelles Lernen und statistische Auswertungsverfahren zur Erstellung von verschiedenen zwei-Klassen-Modellen eingesetzt werden und das erhaltene Modell zur Herkunftsbestimmung von Walnüssen abschließend validiert werden. Des Weiteren sollten Metaboliten im Extrakt der Walnuss mittels Verwendung chromatographischer Methoden und internen Standards identifiziert werden.

Erdnüsse werden auf Grund der hohen Verfügbarkeit sowie des geringen Preises verwendet, um visuell ähnliche Lebensmittel zu strecken. Hierbei stellt es eine Herausforderung dar, Erdnussbeimengungen in gemahlene Lebensmittel (Mandel, Haselnuss oder Walnuss) auf Grund der visuellen und chemischen Ähnlichkeit nachzuweisen. Mittels NMR-Spektroskopie sollte eine *targeted* Methode entwickelt werden, um Erdnüsse qualitativ und quantitativ in unterschiedlichen Lebensmitteln nachzuweisen. Der chemische Marker sollte zum einen identifiziert und zum anderen aus Erdnüssen isoliert werden. Die Verifizierung sollte durch Synthese und Verwendung als interner Standard erfolgen. Es sollten verschiedene Mischungsreihen mit Erdnuss durchgeführt werden und die Auswertung mit linearer Regression erfolgen. Des Weiteren sollte das Modell mit Proben anderer Herkunft geprüft und die biologische Varianz des chemischen Markers untersucht werden.

5. Material und Methoden

5.1. Materialien und Geräte

Chemikalien:

Die Chemikalien und Lösungsmittel wurden von den Firmen erworben und ohne weitere Reinigung verwendet. Natriumtrimethylsilylpropionat (99.0%) wurde von der Firma DEUTERO GMBH bezogen. Natriumazid (99.5%), Kaliumdihydrogenphosphat (>99.0%), Dikaliumhydrogenphosphat (>98.0%), *trans*-4-Hydroxy-L-prolin ($\geq 99.0\%$), *N*-Methyl-*cis*-4-hydroxy-L-prolin ($\geq 98.0\%$), 5-Hydroxytryptamin ($\geq 98.0\%$), Äpfelsäure ($\geq 99.0\%$) und Natriumborhydrid wurden von SIGMA ALDRICH erworben. Formaldehyd (37%), Natriumhydroxid (99.0%) und Dichlormethan (99.5%) wurden von der Firma GRÜSSING GMBH bezogen. Acetonitril (HPLC grade), 2-Propanol (99.5%), Chloroform (99.0%), Essigsäure (99.0%), Methanol (99.8%) und Tetrahydrofuran (99.7%) wurden von VWR erworben. Octamethylcyclotetrasiloxan (98.0%) wurde von der Firma ALFA AESAR erworben. *n*-Hexan (99.0%) wurde von der Firma TH.GEYER GMBH bezogen. Die Aminosäuren L-Alanin (>99.5%), L-Arginin (>99.5%), L-Asparaginsäure (>99.5%), L-Glutaminsäure (>99.5%), L-Isoleucin (>99.5%), L-Leucin (>99.5%), L-Threonin (>99.5%), L-Tyrosin (>99.0%) und L-Valin (>99.5%) wurden von der Firma FLUKA bezogen. Cholinchlorid (99.0%) wurde von der Firma ACROS ORGANICS erworben.

Deuterierte Lösungsmittel:

Die für die NMR-Spektroskopie verwendeten deuterierten Lösungsmittel Chloroform-*d* (99.8%) und Methanol-*d*₄ (99.8%) wurden von EURISOTOP bezogen. Deuteriumoxid (99.9%) und Acetonitril-*d*₃ (99.5%) wurden von der Firma DEUTERO GMBH erworben.

Gefriertrocknungsanlage:

Die Lyophilisierung des Nussmehls und von wässrigen Lösungen erfolgte an einer ALPHA 1-4 LD_{plus} Gefriertrocknungsanlage der Firma CHRIST.

Handknackmaschine:

Zur Entfernung der Schale wurde eine WAL MAN Handknackmaschine der FEUCHT-OBSTTECHNIK GMBH verwendet.

Homogenisierer:

Für die Extraktion der Nussproben wurde der Bead Ruptor 24 der Firma OMNI INTERNATIONAL verwendet.

Massenspektrometrie:

Die Aufnahme von Massenspektren erfolgten an einem 6224 ESI-TOF Spektrometer der Firma AGILENT.

Messermühle:

Zum Vermahlen von Walnuss- und Erdnussproben wurde eine Grindomix 300 Messermühle der Firma RETSCH verwendet.

NMR-Röhrchen:

Es wurden 5 mm NMR-Röhrchen der Firma DEUTERO GMBH verwendet.

pH-Messgerät:

Der pH-Wert von Pufferlösungen wurde mittels eines Orion Star A111 pH-Meters der Firma THERMO SCIENTIFIC eingestellt.

Pipetten und Pipettenspitzen:

Es wurden Pipetten (Reference[®] 2) der Firma EPPENDORF mit entsprechenden epT.I.P.S[®] Spitzen verwendet.

Polarimeter:

Die Messung des spezifischen Drehwinkels erfolgte an einem P8000 Polarimeter der A. KRÜSS OPTRONIC GMBH.

Reinstwasseranlage:

Milliporewasser wurde durch die Verwendung eines arium[®] pro UV-Reinstwassersystems der Firma SARTORIUS gewonnen.

Spin-Filter:

Es wurden Amicon[®] Ultra centrifugal Spin-Filter (*cut-off*: 3 kDa) der Firma MERCK verwendet. Diese wurden vor der Verwendung durch Zentrifugation (14 000 rcf, 22 °C, 15 Minuten) mit je 400 µL Natronlauge (0.1 M) zur Entfernung des in der Membran enthaltenen Glycerins gereinigt. Dieser Vorgang wurde insgesamt fünfzehn Mal durchgeführt und die Spin-Filter anschließend mit je 400 µL Phosphatpuffer (50 mM) zentrifugiert (14 000 rcf, 22 °C, 15 Minuten).

Spin-Tubes:

Es wurden 2 mL Safe-Lock Tubes der Firma EPPENDORF verwendet.

Ultraschallbad:

Es wurde ein Ultraschallbad Sonorex RK 1028 BH der Firma BANDELIN verwendet, um Lösungsmittel für die HPLC zu entgasen und zu durchmischen.

Vortex-Schüttler:

Zum Durchmischen von Extraktionslösungen wurde der Digital Vortexmischer von VWR verwendet.

Waage:

Es wurde eine Waage A200S der Firma SARTORIUS ANALYTIC verwendet.

Zentrifuge:

Zur Zentrifugation von Extrakten wurden eine Zentrifuge 5417R und 5804R der Firma EPPENDORF verwendet.

5.2. Kernspinresonanzspektroskopie

Die Aufnahme der Spektren erfolgte in der spektroskopischen Abteilung des Instituts für Organische Chemie der Universität Hamburg. Für die Herkunftsbestimmung und Untersuchung von Mischungen mit Erdnuss wurden die NMR-Spektren an einem Bruker Avance III HD 400 MHz Spektrometer mit einem 5 mm BBO-Probenkopf mit ATM und z-Gradient vermessen. Des Weiteren erfolgten Messungen zur Identifizierung von Metaboliten an einem Bruker Avance III HD 600 MHz Spektrometer, welches mit einem 5 mm BBFO-Probenkopf mit ATM und z-Gradient ausgestattet war. Die Kalibrierung erfolgte gegen Trimethylsilylpropionsäure ($\delta = 0.00$ ppm) oder Octamethylcyclotetrasiloxan ($\delta = 0.085$ ppm). Die Auswertung erfolgte mit der Software TopSpin 3.5 (Bruker). Die Zuordnung der Signale erfolgt anhand der Nummerierung der zugehörigen Abbildung, die nach dem zugrunde liegenden Naturstoff festgelegt wurde.

Die Aufnahme der 1D-¹H-NOESY-Spektren mit Wasserunterdrückung (Pulssequenz: *noesygppr1d*) erfolgte an einem Bruker Avance III HD 400 MHz Spektrometer bei 300 K mit einer Scanzahl (NS) von 128. Die spektrale Weite (SW) betrug 8417.5 Hz bei einer Akquisitionszeit (AQ) von 3.89 Sekunden. Der *receiver gain* (RG) wurde auf 64 und der *transmitter frequency offset* (O1) auf 1932.6 Hz (MeOD/D₂O) bzw. 1778.2 Hz (MeOD/CD₃CN)

eingestellt. Es wurde eine exponentielle Fensterfunktion mit einem *Linebroadening*-Wert von 0.3 Hz angewendet. Die Spektren wurden anschließend kalibriert sowie mittels automatischer Basislinienkorrektur und manueller Phasenkorrektur prozessiert.

Die Aufnahme der ¹H-NMR-Spektren mit Wasserunterdrückung (Pulssequenz: *zgesgp*) zur Identifizierung von Metaboliten erfolgte an einem Bruker Avance III HD 600 MHz Spektrometer bei 298 K mit einer Scanzahl (NS) von 128/256. Die SW betrug 9615.4 Hz bei einer AQ von 3.41 Sekunden. Der RG wurde auf 2050 und der O1 auf 2821.8 Hz eingestellt. Es wurde eine exponentielle Fensterfunktion mit einem *Linebroadening*-Wert von 0.3 Hz angewendet. Die Spektren wurden anschließend kalibriert sowie mittels automatischer Phasen- und Basislinienkorrektur prozessiert. Quantitative Messungen erfolgten mit einem Relaxationsdelay $d1 = 60$ Sekunden und $O1 = 2898.63$ Hz.

Selektive NMR-Experimente (Pulssequenz: *seldigpzs*, *selnogpzs*) erfolgten an einem Bruker Avance III HD 600 MHz Spektrometer bei 298 K mit einer Scanzahl (NS) von 256. Die SW betrug 8417.5 Hz bei einer AQ von 1.95 Sekunden. Beim *se/TOCSY*-Experiment wurde der RG auf 912 und die *mixing-time* auf 0.08 Sekunden eingestellt. Für den Spin-Lock wurde die *decoupling in the presence of scalar interactions* (DIPSI-2)-Sequenz verwendet und der GPZ0-Wert des z-Filters wurde auf 9% eingestellt. Beim *se/NOESY*-Experiment wurde der RG auf 228 und die *mixing-time* auf 0.8 Sekunden eingestellt. Der O1 wurde auf eine ausgewählte Einstrahlfrequenz und der *Digitization mode* auf digital eingestellt. Es wurde eine exponentielle Fensterfunktion mit einem *Linebroadening*-Wert von 0.3 Hz angewendet. Die Spektren wurden anschließend kalibriert sowie mittels automatischer Phasen- und Basislinienkorrektur prozessiert.

5.3. Säulenchromatographie

Automatisierte *reversed-phased* Chromatographie:

Die automatisierte Umkehrphasenchromatographie (RP-Chromatographie, engl. *reversed-phased chromatography*) wurde an einem Sepacore[®] Flash System mit Control Unit C-620 der Firma BÜCHI durchgeführt. Die Fraktionierung erfolgte durch Einsatz des BÜCHI Fraction Collectors C-660. Die UV-Detektion erfolgte mittels eines BÜCHI UV-Photometers C-640 bei den Wellenlängen $\lambda = 220, 254, 280, 320$ nm. Es wurden eine Flash RS 40 C₁₈ec sowie Flash RS 15 C₁₈ec der Firma MACHERY-NAGEL eingesetzt.

Fraktionierung des Walnussextraktes:

Methode A:

0 – 5 min H₂O + 0.1% Ameisensäure (100%), 5 – 25 min CH₃CN + 0.1% Ameisensäure (0 – 100%), 25 – 30 min CH₃CN + 0.1% Ameisensäure (100%), Flussrate: 20 mL min⁻¹, Fraktionsgröße: 15 mL.

Methode B:

0 – 15 min H₂O + 0.1% Ameisensäure (100%), 15 – 25 min CH₃CN + 0.1% Ameisensäure (0 – 100%), 25 – 30 min CH₃CN + 0.1% Ameisensäure (100%), Flussrate: 15 mL min⁻¹, Fraktionsgröße: 10 mL.

Fraktionierung des Erdnussextraktes:

Methode A :

0 – 15 min H₂O + 0.1% Ameisensäure (100%), 15 – 25 min CH₃CN + 0.1% Ameisensäure (0 – 100%), 25 – 30 min CH₃CN + 0.1% Ameisensäure (100%), Flussrate: 20 mL min⁻¹, Fraktionsgröße: 10 mL.

Methode B:

0 – 10 min H₂O (100%), Flussrate: 40 mL min⁻¹, Fraktionsgröße: 15 mL.

Methode C:

0 – 10 min CH₃CN (0 – 50%), 10 – 12 min CH₃CN (50 – 100%), 12 – 15 min CH₃CN (100%), Flussrate: 40 mL min⁻¹, Fraktionsgröße: 10 mL/5 mL.

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC):

Es wurde eine präparative HPLC-Anlage Infinity der Firma AGILENT TECHNOLOGIES verwendet. Für die Umkehrphasenchromatographie wurde eine VP 250/10 Nucleodur C₁₈ Pyramid Säule der Firma MACHEREY-NAGEL verwendet.

Fraktionierung des polaren Erdnussextraktes: 0 – 10 min CH₃CN (5%), 10 – 20 min CH₃CN (5 – 95%), 20 – 25 min CH₃CN (95%), Flussrate: 4 mL min⁻¹, Fraktionsgröße: 1.33 mL.

5.4. Probenvorbereitung

Die Walnussproben wurden zunächst mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und mittels einer Nussknackmaschine von der Schale befreit. Nach erneutem Schockfrieren wurden 100 g der Walnuskerne mit 150 g Trockeneis vermengt und in einer Messermühle gemahlen. Das Mehl wurde für 48 Stunden gefriergetrocknet und bis zur Extraktion bei -20 °C gelagert.

Die Erdnussproben wurden manuell von der Schale und Testa befreit und mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Dann wurden 100 g der Erdnuskerne mit 150 g Trockeneis vermengt und in einer Messermühle gemahlen. Das Mehl wurde für 48 Stunden gefriergetrocknet und bis zur Extraktion bei -20 °C gelagert.

5.5. Phosphatpuffer

Herstellung der Stammlösungen:

Zur Herstellung einer TSP- d_4 -Stammlösung wurden 87 mg (0.50 mmol) Natriumtrimethylsilylpropionat eingewogen und in 10 mL D_2O gelöst. Anschließend wurde eine Natriumazid-Stammlösung erstellt, indem 0.26 g (4.0 mmol) Natriumazid in 10 mL D_2O gelöst wurden.

Herstellung des Phosphatpuffers (50 mM):

Es wurden 0.68 g (5.0 mmol) Kaliumdihydrogenphosphat und 0.87 g (5.0 mmol) Dikaliumhydrogenphosphat eingewogen und mit 100 mL D_2O versetzt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 2 mL der TSP- d_4 -Stammlösung sowie 1 mL der Natriumazid-Stammlösung. Der pH-Wert wurde mit deuterierter Natronlauge sowie Salzsäure auf einen Wert von 7.0 eingestellt ($pD = 7.4$). Anschließend wurde die Lösung mit D_2O auf 200 mL aufgefüllt und der pH Wert erneut überprüft.

5.6. Extraktionen

Extraktionsmethode A

Für das Methanol/Acetonitril-Extrakt wurden 302.5 ± 2.5 mg des Nusslyophilisats als Triplikat eingewogen. Anschließend erfolgte die Zugabe von zwei Stahlkugeln ($\varnothing = 2$ mm). Danach wurden 500 μ L Methanol- d_4 , 500 μ L Acetonitril- d_3 (0.5 mM OMS) zum Lyophilisat hinzugegeben und drei Minuten bei 3.1 m/s in einer Kugelmühle extrahiert. Es wurde bei 14 000 rcf und 4 °C für zehn Minuten zentrifugiert. Danach wurden 100 μ L des Überstands abgenommen und dieser mit 600 μ L Methanol- d_4 verdünnt. Zuletzt wurden 600 μ L des verdünnten Extraktes abgenommen und in ein 5 mm NMR-Tube überführt.

Extraktionsmethode B

Für das polare Extrakt wurden 301 ± 1 mg des Nusslyophilisats als Triplikat eingewogen. Anschließend erfolgte die Zugabe von zwei Stahlkugeln ($\varnothing = 2$ mm). Danach wurden 400 μ L Methanol- d_4 , 500 μ L Chloroform- d sowie 600 μ L Phosphatpuffer (50 mM) zum Lyophilisat hinzugegeben und drei Minuten bei 3.1 m/s in einer Kugelmühle extrahiert. Es wurde bei 14 000 rcf und 4 °C für zehn Minuten zentrifugiert. Danach wurden 100 μ L des Überstands abgenommen und dieser mit 600 μ L Phosphatpuffer verdünnt. Zuletzt wurden 600 μ L des verdünnten Extraktes abgenommen und in ein 5 mm NMR-Tube überführt.

Extraktionsmethode C

Für das Methanol-Extrakt wurden 301 ± 1 mg des Nusslyophilisats eingewogen. Anschließend erfolgte die Zugabe von zwei Stahlkugeln ($\varnothing = 2$ mm) und 1000 μ L Methanol- d_4 . Das Gemisch wurde drei Minuten bei 3.1 m/s in einer Kugelmühle extrahiert und bei 14 000 rcf und 4 °C für zehn Minuten zentrifugiert. Zuletzt wurden 600 μ L des verdünnten Extraktes abgenommen und in ein 5 mm NMR-Tube überführt.

Extraktionsmethode D

Für das Acetonitril-Extrakt wurden 301 ± 1 mg des Nusslyophilisats eingewogen. Anschließend erfolgte die Zugabe von zwei Stahlkugeln ($\varnothing = 2$ mm) und 1000 μ L Acetonitril- d_3 . Das Gemisch wurde drei Minuten bei 3.1 m/s in einer Kugelmühle extrahiert und bei 14 000 rcf und 4 °C für zehn Minuten zentrifugiert. Zuletzt wurden 600 μ L des verdünnten Extraktes abgenommen und in ein 5 mm NMR-Tube überführt.

Polare Extraktion von Walnüssen

Es wurden 6 g Walnusslyophilisat mit 60 mL Methanol für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel bei 40 °C unter vermindertem Druck entfernt und der Vorgang wiederholt. Anschließend wurden zum Rückstand 40 mL Methanol, 60 mL Wasser und 50 mL Chloroform gegeben und die Suspension für 90 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde für 30 Minuten bei 8000 rpm und 4 °C zentrifugiert, die wässrige Phase abgenommen und das Methanol unter vermindertem Druck entfernt. Das Wasser wurde durch Lyophilisation entfernt, der Rückstand in 15 mL Wasser gelöst und bei 14 000 rcf und 22 °C für 15 Minuten durch Amicon® Ultra centrifugal Spin-Filter gereinigt. Das Filtrat wurde lyophilisiert und der Rückstand (190 mg) mittels automatisierter Umkehrphasensäulenchromatographie mit Methode B fraktioniert. Die einzelnen Fraktionen wurden lyophilisiert und der Rückstand in je 600 μ L Phosphatpuffer (50 mM) zur Messung am 600 MHz Spektrometer aufgenommen.

Stufenweise Extraktion von Walnüssen

Es wurden 100 g Walnusslyophilisat mit 750 mL Methanol für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel bei 35 °C unter vermindertem Druck entfernt und der Vorgang wiederholt. Anschließend wurden zum Rückstand 337 mL eines Gemisches aus Methanol und Acetonitril (1:1) gegeben und die Suspension für zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde für 30 Minuten bei 8000 rpm und 4 °C zentrifugiert, die organische Phase abgenommen und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

Zum Rückstand wurden 300 mL *n*-Hexan gegeben und die Suspension für zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde für 30 Minuten bei 8000 rpm und 4 °C zentrifugiert, die organische Phase abgenommen und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt (Extrakt 1).

Es wurden zum in *n*-Hexan unlöslichen Rückstand 300 mL Dichlormethan gegeben und die Suspension für zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde für 30 Minuten bei 8000 rpm und 4 °C zentrifugiert, die organische Phase abgenommen und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt (Extrakt 2).

Danach wurden zum in Dichlormethan unlöslichen Rückstand 300 mL Acetonitril gegeben und die Suspension für zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde für 30 Minuten bei 8000 rpm und 4 °C zentrifugiert, die organische Phase abgenommen und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt (Extrakt 3).

Zuletzt wurden zum in Acetonitril unlöslichen Rückstand 300 mL Methanol gegeben und für zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde für 30 Minuten bei 8000 rpm und 4 °C zentrifugiert, die organische Phase abgenommen und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt (Extrakt 4). Der Rückstand (500 mg) wurde mittels automatisierter RP-Säulenchromatographie mit Methode A fraktioniert. Die einzelnen Fraktionen wurden lyophilisiert und der Rückstand in je 600 µL Methanol-*d*₄ aufgenommen. Es wurden ¹H-NMR-Spektren der Fraktionen an einem 600 MHz Spektrometer gemessen und die Fraktionen 15 – 21 mit der höchsten Dispersion an Signalen im NMR-Spektrum vereint und nach Methode B erneut fraktioniert. Die einzelnen Fraktionen wurden lyophilisiert und der Rückstand in je 600 µL Phosphatpuffer (50 mM) zur Messung am 600 MHz Spektrometer aufgenommen.

Extraktion von Mischungen mit Erdnuss

In Tabelle 1 sind die Mischungsverhältnisse von Erdnuss mit jeweils einem zusätzlichen Lebensmittel (Haselnuss/Walnuss/Mandel) aufgelistet.

Tabelle 1: Verwendete Mischungsverhältnisse von Erdnuss mit jeweils Haselnuss, Walnuss und Mandel als verfälschtes Lebensmittel.

Erdnuss [%]	Lebensmittel [%]	Erdnuss [%]	Lebensmittel [%]
100	0	8	92
90	10	6	94
80	20	4	96
70	30	2	98
60	40	1	99
50	50	0.8	99.2
40	60	0.6	99.4
30	70	0.4	99.6
20	80	0	100
10	90		

Es wurde das Lyophilisat von zwei Nüssen als Triplikat in einem entsprechenden Mischungsverhältnis eingewogen. Anschließend erfolgte die Extraktion nach Methode B.

Polare Extraktion von Erdnüssen

Es wurden 6 g Erdnusslyophilisat mit 60 mL Methanol für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel bei 40 °C unter vermindertem Druck entfernt und der Vorgang wiederholt. Anschließend wurden zum Rückstand 40 mL Methanol, 60 mL Wasser und 50 mL Chloroform gegeben und die Suspension für 90 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde für 30 Minuten bei 8000 rpm und 4 °C zentrifugiert, die wässrige Phase abgenommen und das Methanol unter vermindertem Druck entfernt. Das Wasser wurde durch Lyophilisation entfernt und der Rückstand in 15 mL Wasser gelöst und bei 14 000 rcf und 22 °C für 15 Minuten durch Amicon® Ultra centrifugal Spin-Filter gereinigt. Das Filtrat wurde lyophilisiert und der Rückstand mittels automatisierter RP-Säulenchromatographie fraktioniert.

A: Zur Identifizierung des Erdnuss-Markers erfolgte die automatisierte RP-Säulenchromatographie nach Methode A. Die einzelnen Fraktionen wurden lyophilisiert und der Rückstand in je 600 µL Phosphatpuffer (50 mM) aufgenommen.

B: Zur Isolierung des Erdnuss-Markers erfolgte die automatisierte RP-Säulenchromatographie zunächst nach Methode B. Die einzelnen Fraktionen wurden lyophilisiert und der Rückstand in je 600 μL Phosphatpuffer (50 mM) aufgenommen. Die $^1\text{H-NMR}$ -Spektren (600 MHz) der Fraktionen wurden auf das Marker-Signal bei 3.05 ppm hin untersucht und die relevanten Fraktionen vereint. Der lyophilisierte Rückstand der vereinten Fraktionen wurde mit Methode C fraktioniert. Die Vorgehensweise wurde wiederholt und die Fraktionierung erfolgte mit Methode C mit einer veränderten Fraktionsgröße von 5 mL. Nachdem die relevanten Fraktionen vereint und lyophilisiert wurden, erfolgte eine Fraktionierung des Rückstands (112 mg) mittels HPLC (Methode A). Der spezifische Drehwinkel der Fraktion 10 betrug $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -7.1^\circ$ (c 0.49, H_2O).

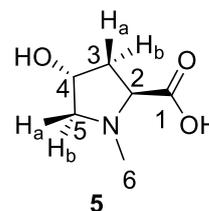
5.7. Synthese des chemischen Markers (2S,4R)-4-Hydroxy-1-methylpyrrolidin-2-carbonsäure (5)

Name: *N*-Methyl-*trans*-4-hydroxy-L-prolin (5)

Summenformel: $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{NO}_3$

Molmasse: $145.16 \text{ g mol}^{-1}$

Spezifischer Drehwinkel: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -17.2^\circ$ (c 0.50, H_2O)



Die Synthese erfolgte nach der Methode von Sondengam *et al.*^[98] Eine Suspension von 208 mg (1.59 mmol) *trans*-4-Hydroxy-L-prolin in 4 mL Methanol wurde mit 3 mL (0.03 mol) Formaldehyd (37%) versetzt und das Reaktionsgemisch für zwei Stunden unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde es auf 0°C gekühlt, 308 mg (8.14 mmol) Natriumborhydrid hinzugegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Nachdem das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt wurde, wurden zum Rückstand 2 mL Methanol hinzugegeben. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt mittels Umkehrphasensäulenchromatographie mit Methode B gereinigt. Danach wurden 15 mg mittels HPLC mit Methode A gereinigt. Das Produkt wurde nach Lyophilisation der Fraktion 10 als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (deuterierter Phosphatpuffer (50 mM, pH = 7), 600 MHz, 298 K):

δ [ppm] = 4.66 – 4.62 (m, 1H, H-4), 4.20 (dd, $^3J_{H-2,H-3a} = 7.5$, $^3J_{H-2,H-3b} = 11.1$ Hz, 1H, H-2), 3.96 (dd, 1H, $^2J_{H-5a,H-5b} = 13.0$ Hz, $^3J_{H-5b,H-4} = 4.8$ Hz, 1H, H-5b), 3.20 (ddd, $^2J_{H-5b,H-5a} = 13.0$ Hz, $^3J_{H-5a,H-4} = 2.0$, $^4J_{H-5a,H-3a} = 2.0$ Hz, 1H, H-5a), 3.05 (s, 3H, H-6), 2.49 (dddd, $^2J_{H-3a,H-3b} = 14.1$ Hz, $^3J_{H-3a,H-2} = 7.5$ Hz, $^3J_{H-3a,H-4} = 2.0$, $^4J_{H-3a,H-5a} = 2.0$ Hz, 1H, H-3a), 2.26 (ddd, $^2J_{H-3b,H-3a} = 14.1$ Hz, $^3J_{H-3b,H-4} = 5.0$, $J_{H-3b,H-2} = 11.1$ Hz, 1H, H-3b).

¹³C-NMR (deuterierter Phosphatpuffer (50 mM, pH = 7), 151 MHz, 298 K):

δ [ppm] = 172.9 (C-1), 70.0 (C-2), 69.4 (C-4), 62.6 (C-3), 43.1 (C-6), 38.2 (C-5).

HRMS (ESI⁺): ([M+H]⁺) berechnet für C₆H₁₁NO₃: m/z = 146.0812, gefunden: m/z = 146.0807.

IR (ATR):

$\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3343, 2857, 1602, 1447, 1388, 1350, 1245, 1204, 1179, 1128, 1073, 1027, 944, 813, 773, 699, 672, 629, 552, 518.

5.8. Multivariate Statistik

Die Hauptkomponentenanalyse wurde mit Hilfe der Software Amix der Firma BRUKER durchgeführt. Die *Buckets* wurden manuell mit variabler Größe ausgewählt. Für die Extraktionsmethode A wurden 183 und für Extraktionsmethode B 106 *Buckets* definiert (Anhang, Abschnitt 8.7.1 und 8.7.2). Die Normalisierung der *Buckets* erfolgte auf die Gesamtintensität der Signale. Die Skalierung der Variablen basiert auf der Einheitsvarianz. Das Standard-Konfidenzniveau wurde auf 95% eingestellt. Die Anzahl der Hauptkomponenten wurde auf eine minimal erklärte Varianz von 95% festgelegt. Für die Signifikanzanalyse wurde ein nach Godpaster *et al.* veränderter Kruskal-Wallis Test mit einem Konfidenzniveau von 95% durchgeführt, wobei die Bonferroni-Korrektur auf die *p*-Werte angewendet wurde.^[99] Bei der Extraktionsmethode A wurden *Buckets* als signifikant bezeichnet, wenn der *p*-Wert unter 0.00027322 und bei der Extraktionsmethode B unter 0.0004717 lag. Für die Darstellung der PCA Score- und *Loading*-Plots wurden die entsprechenden Daten aus Amix in die Software Origin 2019 (ORIGINLAB) exportiert. Für die Klassifizierung wurde die Software Matlab 2019a (THE MATHWORKS, INC.) verwendet. Die dort implementierte *Classification Learner App* enthält verschiedene Klassifizierungsverfahren, wie beispielsweise Entscheidungsbäume, *support vector machines*, *k-nearest neighbor* und kombinierte Klassifizierungsverfahren. Die normalisierte und skalierte *Bucket*-Liste wurde aus Amix nach Matlab exportiert und als Klassifizierungsverfahren wurde für die gesamten Modelle die lineare *support vector machine* verwendet, wobei das *Box constraint level* auf eins und die Multiklassenmethode auf *one-vs-*

Material und Methoden

one eingestellt wurde. Zur Validierung wurde eine wiederholte verschachtelte Kreuzvalidierung durchgeführt. Hierzu wurde das Datenset von zwei Ländern zufällig in fünf Teile unterteilt. Vier dieser Teile wurden zum Training-Set kombiniert und das Modell in einer 5-fachen inneren Kreuzvalidierung trainiert. Das erhaltene Modell wurde anschließend mit dem zuvor ausgelassenen Teil (Test-Set) validiert. Dieser Prozess wurde wiederholt, sodass eine 5-fache äußere Kreuzvalidierung durchgeführt wurde, bei der jeweils ein anderer Teil als Test-Set herausgenommen wurde. Somit kommt jede Probe genau einmal im Test-Set vor. Der gesamte Prozess wurde insgesamt fünfmal mit je zufällig neu gemischten Teilen wiederholt. Das Ergebnis wurde jeweils als Konfusionsmatrix dargestellt, in der die zugeordneten Proben als Zahl und die Genauigkeiten in Prozent angegeben sind.

6. Ergebnisse und Diskussion

Da die Verfälschung von Lebensmitteln (*Food Fraud*) ein weit verbreitetes Problem für den Verbraucher und indirekt für die Lebensmittelindustrie darstellt, stand die Authentizitätsbestimmung dieser im Fokus der Arbeit. Mit Verwendung der NMR-Spektroskopie wurden zwei unterschiedliche Fälle von potentiell *Food Fraud* untersucht. Im ersten Teil steht die geographische Herkunftsbestimmung im Fokus, da die Herkunft aus bestimmten Regionen vom Verbraucher meist mit Qualität verbunden wird und die Nachfrage nach regionalen Produkten besteht. Ein Modell zur geographischen Herkunftsanalyse wurde am Beispiel von Walnüssen als lipidreiche Matrix entwickelt. Im zweiten Teil wurden Beimischungen von Erdnuss in anderen Nüssen untersucht und eine *targeted* Methode zur Detektion der Verfälschung entwickelt.

6.1. Geographische Herkunftsbestimmung von Walnüssen

Walnüsse weisen im Vergleich mit anderen Baumnüssen die zweitgrößte Produktionsmenge weltweit auf und sind bekannt für ihren hohen Gehalt an ungesättigten Fettsäuren, die sich positiv auf die Gesundheit auswirken sollen.^[35] Die Qualität und Authentizität von Lebensmitteln nehmen eine zunehmend wichtige Rolle ein, weshalb die Nachfrage nach analytischen Methoden zur Überprüfung der Parameter für diverse Matrices besteht.^[36] Lebensmittel sind vielfältig und weisen unterschiedliche Zusammensetzungen an Metaboliten auf, so zählen Walnüsse beispielsweise zu lipidreichen Lebensmitteln. Aufgrund der individuellen Zusammensetzung werden Probenvorbereitungen und die Extraktionsmethoden stets auf das zu untersuchende Lebensmittel angepasst.

Für die Entwicklung einer Methode zur geographischen Herkunftsbestimmung sind authentische Proben unerlässlich. Die authentischen Proben wurden in den Erntejahren 2017, 2018 und 2019 in Zusammenarbeit mit der HSFS akquiriert. Die Authentizität der Proben wurde dabei durch die Lieferanten deklariert und die erhaltenen Informationen der einzelnen Proben sind im Anhang in der Tabelle 19 einzusehen. Die Walnussproben wurden nach Erhalt schockgefroren und bis zur Aufarbeitung bei -20 °C gelagert. Walnüsse in Schale wurden geknackt, vermahlen und lyophilisiert. Die Gefriertrocknung wurde durchgeführt, da die Proben einen unterschiedlichen Wassergehalt aufweisen können und enzymatische Aktivitäten und damit verbundene Veränderungen der Metaboliten während der Lagerung reduziert werden.^[72] Das Lyophilisat diente als Basis für die Extraktion, bei der deuterierte Lösungsmittel zur Reduzierung der Probenvorbereitungszeit verwendet wurden, damit anschließend eine

Messung mit NMR-Spektroskopie durchgeführt werden konnte. Da jedes Lebensmittel eine individuelle Zusammensetzung von Metaboliten aufweist, musste zunächst eine Extraktionsmethode mit zugehöriger *standard operation procedure* (SOP) entwickelt werden.

6.1.1. Extraktion von Walnüssen

Für die Entwicklung einer SOP zur Erstellung eines Modells zur geographischen Herkunftsbestimmung von Walnüssen wurden zunächst verschiedene Lösungsmittel und -gemische getestet. Es wurden ^1H -NMR-Spektren gemessen und diese hinsichtlich der Effizienz der Extraktion mit Bezug auf Anzahl und Konzentration der Metaboliten untersucht, wobei die Anzahl nur im relativen Vergleich der Spektren untereinander abgeschätzt werden kann. Weiterhin muss berücksichtigt werden, dass Lipide häufig lange Alkenylketten enthalten. Aufgrund der vielen Protonen in chemisch sehr ähnlicher Umgebung werden in den NMR-Spektren wenige stark überlagerte Signale von hoher Intensität erhalten, bei denen eine Unterscheidung einzelner Metaboliten nur sehr eingeschränkt möglich ist. In Abbildung 10 sind drei verschiedene ^1H -NMR-Spektren im Vergleich dargestellt.

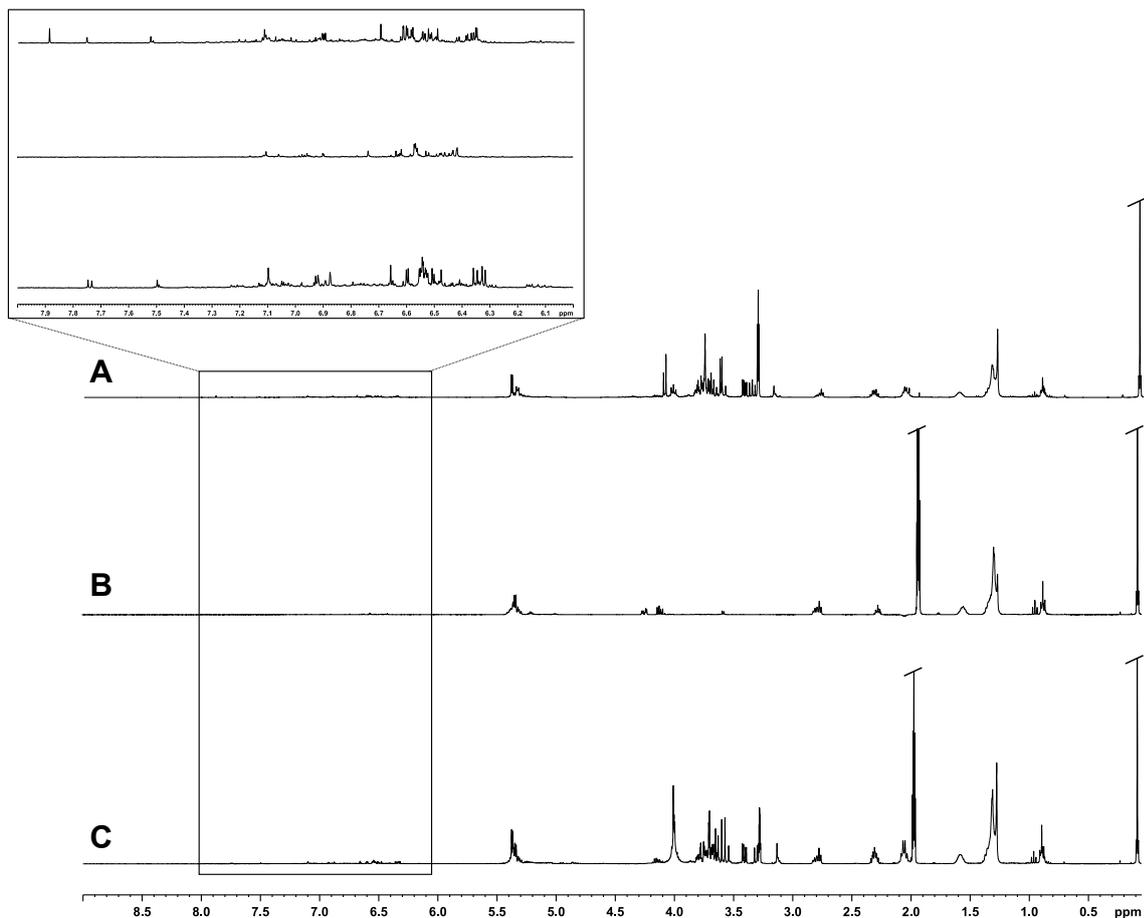


Abbildung 10: ^1H -NMR-Spektren (400 MHz, NS = 128) von Walnussextrakten. Die NMR-Spektren wurden auf das OMS-Signal bei 0.085 ppm kalibriert. **A:** Methanol- d_4 ; **B:** Acetonitril- d_3 ; **C:** Methanol- d_4 /Acetonitril- d_3 (1:1). In den gesamten NMR-Spektren sind hauptsächlich relativ breite Signale von Fettsäuren zu erkennen. Der aromatische Bereich von 6.0 – 8.0 ppm ist hervorgehoben.

Ergebnisse und Diskussion

Das obere $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum wurde nach Extraktion mit Methanol- d_4 erhalten (**A**). Beim zweiten Extrakt wurde als Lösungsmittel Acetonitril- d_3 (**B**) und beim dritten ein Gemisch aus Methanol- d_4 /Acetonitril- d_3 (1:1) verwendet (**C**). Es ist zu erkennen, dass die drei NMR-Spektren hauptsächlich Signale von Fettsäuren enthalten. Insgesamt treten jedoch wenige Signale auf, lediglich durch Einsatz von polarem Methanol (**A** und **C**) werden auch Signale im Bereich der Kohlenhydrate beobachtet. Im aromatischen Bereich treten viele Signale auf, die jedoch im Vergleich zu den Signalen der Fettsäuren eine geringere Intensität aufweisen. Die Intensitäten der Signale der NMR-Spektren der Extraktionen (**A**) und (**C**) sind im Vergleich zur Extraktion (**B**) höher. Bei Verwendung des Lösungsmittelgemisches (**C**) ist die gleichzeitige Extraktion von unterschiedlichen Metabolitenklassen gegeben, da sowohl polare Substanzen, wie Kohlenhydrate, aber auch Phenole und die unpolaren Fettsäuren extrahiert werden. Dieser Aspekt spricht für eine Verwendung des Gemisches bei der Extraktionsmethode zur Erstellung eines Modells für die Herkunftsanalyse, da potentiell vermehrt sekundäre Metaboliten der unpolaren Verbindungsklassen (z.B. Terpene, Flavonoide) auftreten und als chemische Marker identifiziert werden könnten. Zudem wurden im NMR-Spektrum viele Signale im Bereich von 6.00 bis 7.00 ppm detektiert, welche vermutlich von Phenolen hervorgerufen werden. Als interner Standard zur Referenz kann bei diesem Extrakt beispielweise OMS eingesetzt werden. Bei längeren Standzeiten von ca. zwölf Stunden konnte jedoch im NMR-Röhrchen ein farbloser Niederschlag beobachtet werden. Daher wurde als zusätzlicher Schritt eine Verdünnung mit der abschließenden Zugabe der 6-fachen Menge von deuteriertem Methanol am Ende der SOP durchgeführt. Bei dem verdünnten Extrakt konnte anschließend nach längeren Standzeiten kein farbloser Niederschlag mehr beobachtet werden.

Als nächstes wurde ein polares Extrakt untersucht. Hierbei bietet sich die Verwendung von Puffern an, damit der pH-Wert für die gesamten Proben identisch ist und Signal-*shifts* verringert werden können. Es werden häufig Phosphatpuffer eingesetzt, da diese keine zusätzlichen Signale im NMR-Spektrum zeigen und einen breiten Pufferbereich aufweisen. Eine Zwei-Phasen-Extraktion mit Chloroform diente dazu, die unpolaren Metaboliten zu entfernen. Auch der Einsatz von Methanol zur Fällung von Proteinen wird empfohlen, damit die Signale in den NMR-Spektren durch fehlende enzymatische Aktivität über längere Zeit stabil bleiben. Als interner Standard zur Kalibrierung der NMR-Spektren wird meist TSP- d_4 zugesetzt. Die Zwei-Phasen-Extraktion wurde bereits erfolgreich auf Haselnüsse angewendet.^[12] Das ^1H -NMR-Spektrum des polaren Extraktes der Walnuss ist in Abbildung 11 dargestellt.

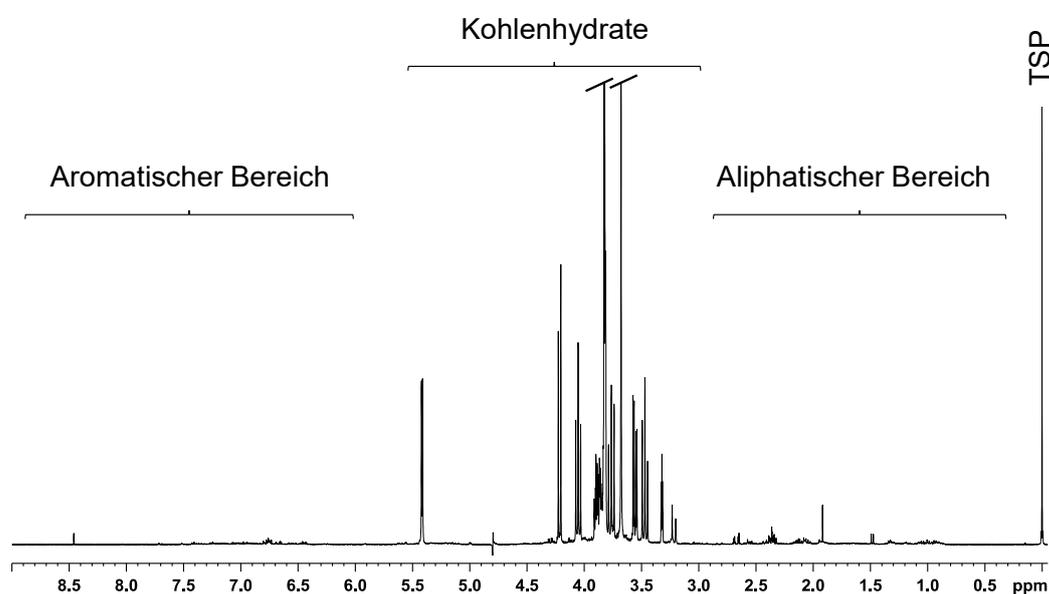


Abbildung 11: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz, NS = 128) des polaren Extraktes. Das NMR-Spektrum kann in drei Bereiche eingeteilt werden. Im aliphatischen Bereich treten beispielsweise Signale von Aminosäuren und organischen Säuren auf. Im Bereich der Kohlenhydrate befinden sich Signale mit der höchsten Intensität. Der aromatische Bereich hingegen zeigt lediglich wenige Signale geringer Intensität.

Das ^1H -NMR-Spektrum des polaren Extraktes wurde mit Verwendung einer Zwei-Phasen-Extraktion (Phosphatpuffer (pH = 7)/Methanol- d_4 /Chloroform- d (5:4:6)) erhalten und zeigt im aliphatischen Bereich eine hohe Dispersion von Signalen, die beispielsweise Aminosäuren zugeordnet werden können. Im Bereich der Kohlenhydrate treten Signale mit der höchsten Intensität auf. Es ist bekannt, dass Walnüsse einen hohen Anteil an Saccharose (6) aufweisen,^[100] deren Signale das ^1H -NMR-Spektrum des polaren Extraktes dominieren. Im aromatischen Bereich hingegen werden wenige Signale mit geringer Intensität erhalten. Auf Grund der hohen Dispersion der Signale im NMR-Spektrum bietet sich diese Extraktionsmethode ebenfalls an. Sowohl die erste (Methanol- d_4 /Acetonitril- d_3 (1:1)) als auch die zweite Extraktion (Phosphatpuffer (pH = 7)/Methanol- d_4 /Chloroform- d (5:4:6)) wurden anschließend auf deren Stabilität über die Zeit bei Raumtemperatur untersucht.

6.1.2. Stabilitätsmessung

Idealerweise tritt in den Extrakten mit der Zeit keine Veränderung der Signale auf, da dies bei einer hohen Probenanzahl und somit potentiell längeren Standzeiten die Auswertungen verfälschen würde und keine Vergleichbarkeit gegeben wäre. Daher wurde das polare Extrakt der Walnuss auf dessen Stabilität untersucht. Die Ergebnisse der Stabilitätsmessung mit ausgewählten NMR-Spektren im Vergleich sind in Abbildung 12 dargestellt. Hierbei sind beispielhaft relevante Bereiche, die Veränderungen in Signalintensitäten aufweisen, farblich hervorgehoben.

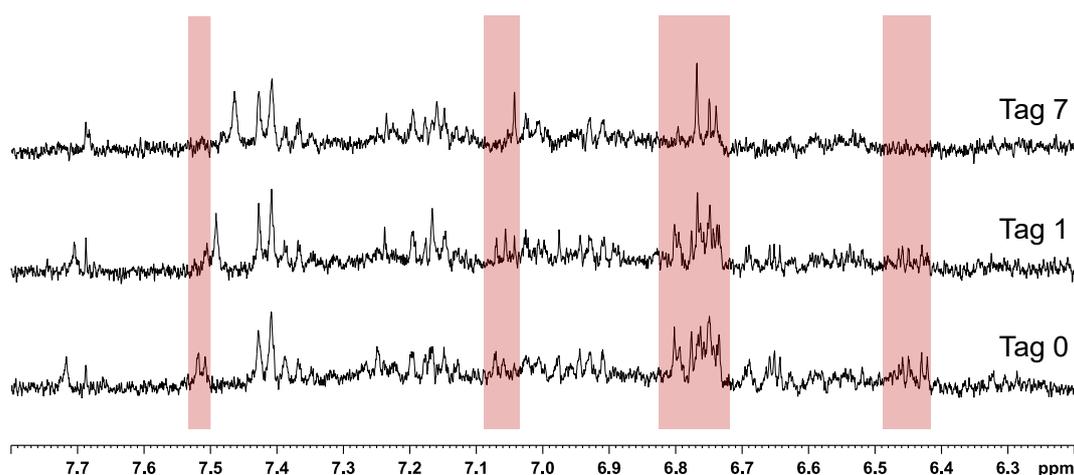


Abbildung 12: Es sind die Ausschnitte des aromatischen Bereichs der ^1H -NMR-Spektren (400 MHz, NS = 128) des polaren Extraktes der Walnuss dargestellt, welches bei einer Verwendung des Gemisches aus deuteriertem Phosphatpuffer, Methanol- d_4 und Chloroform- d erhalten wurde. Es werden die Spektren gezeigt, die am Tag der Extraktion (Tag 0), am Folgetag (Tag 1) und nach einer Woche (Tag 7) gemessen wurden. Die farblich markierten Bereiche im Ausschnitt der Spektren von 6.20 – 7.80 ppm weisen beispielhaft auf Veränderungen von Signalintensitäten hin.

Im aromatischen Bereich der ^1H -NMR-Spektren des polaren Extraktes der Walnuss konnten Signalveränderungen beobachtet werden. Bei der chemischen Verschiebung von 7.52 ppm wurde beispielsweise eine Signalintensitätsabnahme beobachtet. Ebenfalls treten Veränderungen im Signalmuster im Bereich von 7.08 – 7.04 ppm sowie 6.81 – 6.73 ppm auf. Bei einer chemischen Verschiebung von 6.44 ppm nimmt die Intensität des Signals innerhalb eines Tages bei Raumtemperatur bereits gering ab, nach einer Woche ist das Signal nicht mehr im Spektrum zu beobachten. Insgesamt ist das Extrakt jedoch, ausgenommen der genannten Signale im aromatischen Bereich, ausreichend stabil.

Ergebnisse und Diskussion

Anschließend wurde ebenfalls der weniger polare Extrakt auf dessen Stabilität untersucht. In Abbildung 13 ist als Ausschnitt der aromatische Bereich der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der Stabilitätsmessung des weniger polaren Extraktes (Methanol- d_4 /Acetonitril- d_3) dargestellt.

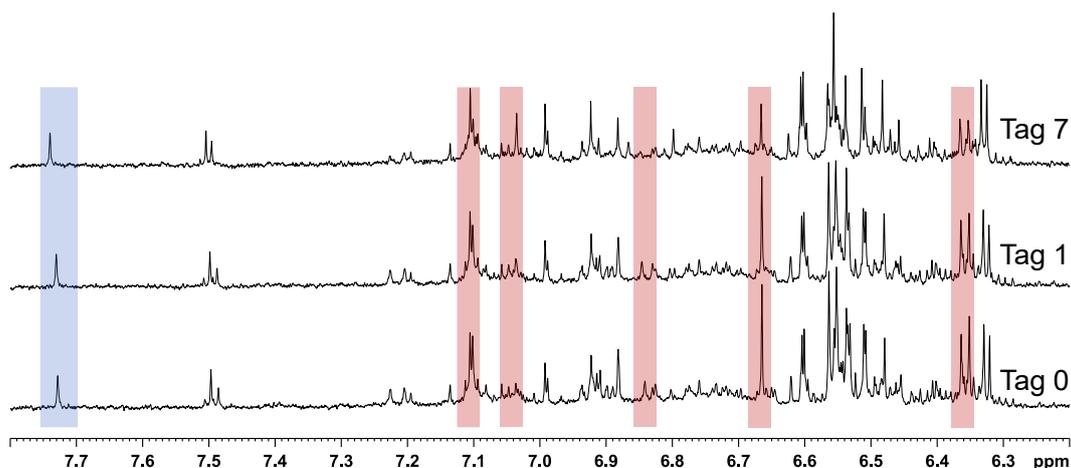


Abbildung 13: Es sind die Ausschnitte des aromatischen Bereichs der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren (400 MHz, NS = 128) des weniger polaren Extraktes der Walnuss dargestellt, welches bei einer Verwendung eines Gemisches aus deuteriertem Methanol und Acetonitril im Verhältnis 1:1 erhalten wurde. Es wird das NMR-Spektrum gezeigt, welches am Tag der Extraktion (Tag 0), am Folgetag (Tag 1) und nach einer Woche (Tag 7) gemessen wurde. Die farblich rot markierten Bereiche im Ausschnitt der Spektren von 6.20 – 7.80 ppm weisen beispielhaft auf Veränderungen von Signalintensitäten hin. Der blau markierte Bereich zeigt als Beispiel für *Signal-shifts* ein Singulett, welches am Tag der Extraktion bei 7.73 ppm, nach einer Woche jedoch bei 7.74 ppm detektiert wurde.

Es ist der aromatische Bereich der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren als Ausschnitt dargestellt, da im Bereich der Signale der Fettsäuren keine Veränderungen auftraten. Es konnten zum einen jedoch einzelne *Signal-shifts* beobachtet werden. Dafür exemplarisch ist das Singulett bei 7.73 ppm blau markiert. Ein weiterer *shift* trat zusätzlich bei einem Singulett bei einer chemischen Verschiebung von 3.18 ppm auf. Außerdem konnte die Abnahme der Intensität einzelner Signale beobachtet werden. Hierfür sind das Singulett bei 6.66 ppm und das Dublett bei 6.36 ppm Beispiele. Ebenfalls konnten in den Bereichen von 6.82 – 6.85 und 7.09 – 7.11 ppm Intensitätsabnahmen beobachtet werden. Im Gegensatz dazu steigt die Intensität eines Singuletts bei 7.04 ppm. Die einzelnen Veränderungen sind teilweise jedoch nach einem Tag bei Raumtemperatur noch nicht zu erkennen, sodass die Trends erst bei den Messungen nach vier bis sieben Tagen nach der Extraktion erkannt wurden.

Ergebnisse und Diskussion

Beide Extraktionsmethoden weisen hauptsächlich im aromatischen Bereich einzelne Veränderungen von Signalintensitäten auf. Zusätzlich treten im weniger polaren Extrakt (Methanol- d_4 /Acetonitril- d_3) einzelne Signal-*shifts* auf. Insgesamt weisen die Extrakte jedoch eine ausreichende Stabilität auf, wenn zwischen der Extraktion und Messung nicht mehr als 24 Stunden liegen. Beide Extraktionsmethoden wurden zur Aufnahme der Daten für die Herkunftsbestimmung verwendet, um die Ergebnisse abschließend vergleichen zu können. Im Folgenden wurde zunächst das polare Extrakt hinsichtlich der enthaltenen Metaboliten untersucht, da dieses eine Vielzahl an Signalen aufwies und einzelne dieser potentiell relevant für die Herkunftsbestimmung sein könnten.

6.1.3. Identifizierung von Metaboliten in Walnüssen

Bei Lebensmittelextrakten handelt es sich um hoch komplexe Gemische von Metaboliten aus diversen Stoffklassen in unterschiedlichen Konzentrationen. Um eine Identifizierung zu erleichtern, bietet sich eine säulenchromatographische Fraktionierung an, damit eine Vortrennung erreicht und die Signalanzahl innerhalb eines NMR-Spektrums reduziert wird. Dieser Abschnitt der Arbeit wurde im Rahmen einer Bachelorarbeit durchgeführt.^[101] Um auch geringer konzentrierte Metaboliten im polaren Extrakt der Walnuss zu identifizieren, wurde die polare Extraktion im größeren Maßstab (1:20) durchgeführt. Es wurde nach der Zwei-Phasen-Extraktion mit Wasser/Methanol und Chloroform das eingeeengte Extrakt mit automatisierter Umkehrphasensäulenchromatographie mit Wasser als Elutionsmittel isokratisch (Methode B) fraktioniert. Von den daraus resultierenden Fraktionen wurden anschließend ¹H-NMR-Spektren an einem 600 MHz Spektrometer gemessen. Ausgewählte Fraktionen mit isoliert vorliegenden Signalen wurden hinsichtlich der Metaboliten untersucht und zusätzliche NMR-Experimente, wie zum Beispiel das *se*/TOCSY- und *se*/NOESY-Experiment, durchgeführt. Die zusätzlich verwendeten Experimente wurden zur Strukturidentifizierung herangezogen, da mithilfe dieser einzelne Spinsysteme und die potentielle Verknüpfung dieser detektiert werden können. Die Identifizierung von Metaboliten erfolgte durch die Analyse einzelner Spinsysteme, die durch *se*/TOCSY-Experimente detektiert wurden, den Vergleich der chemischen Verschiebungen und Kopplungskonstanten mittels Datenbanken^[32,33] sowie den Einsatz von internen Standards zur Verifizierung. In Abbildung 14 sind ausgewählte Fraktionen des polaren Extraktes gezeigt, die im Folgenden näher untersucht wurden.

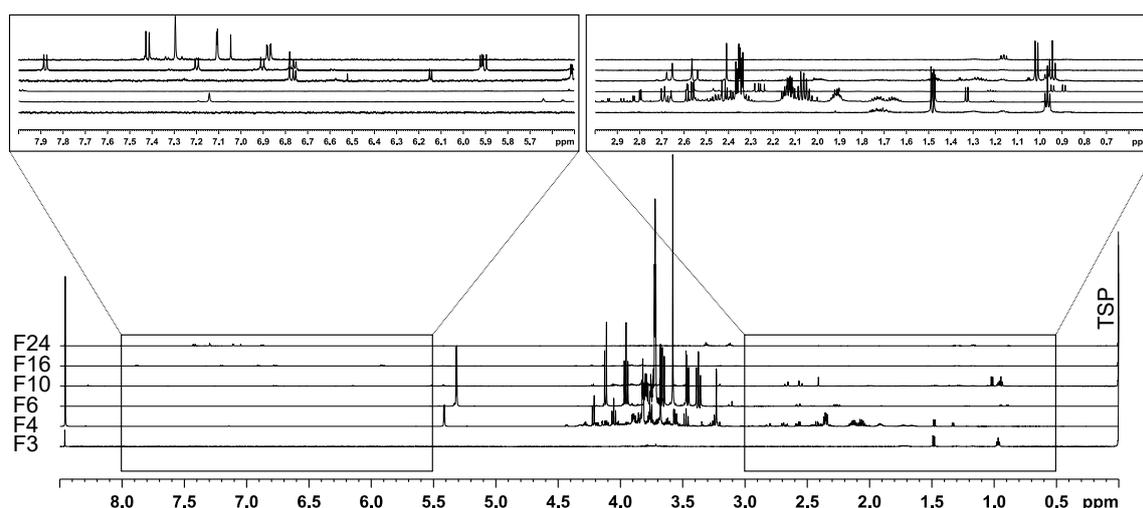


Abbildung 14: ¹H-NMR-Spektren (600 MHz) ausgewählter Fraktionen nach polarer Extraktion einer Walnussprobe und anschließender automatisierter Umkehrphasensäulenchromatographie. In Fraktion 4 und 6 überwiegen Signale im Bereich der Kohlenhydrate. Der aliphatische Bereich ist vergrößert dargestellt und weist in jeder Fraktion ein unterschiedliches Signalmuster auf. Der aromatische Bereich ist ebenfalls vergrößert dargestellt.

Ergebnisse und Diskussion

In der dritten Fraktion wurden isolierte Signale im aliphatischen Bereich detektiert. Die vierte bis neunte Fraktion wies Signale hoher Intensität im Bereich der Kohlenhydrate auf. Insgesamt waren in den vorderen Fraktionen vermehrt Signale hoher Intensität im aliphatischen Bereich zu erkennen. Im aromatischen Bereich traten meist Signale mit einer geringen Intensität auf. Insgesamt wurde die Signaldichte in den Fraktionen im Vergleich zum $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Gesamtextraktes erfolgreich verringert, sodass im Folgenden eine Identifizierung mit weiteren NMR-Experimenten ermöglicht wurde. Es werden die durch selektive NMR-Experimente detektierten Spinsysteme aus spezifischen Fraktionen dargestellt. In der dritten Fraktion wurde ein aus drei Signalen bestehendes Spinsystem identifiziert, welches in Abbildung 15 dargestellt ist.

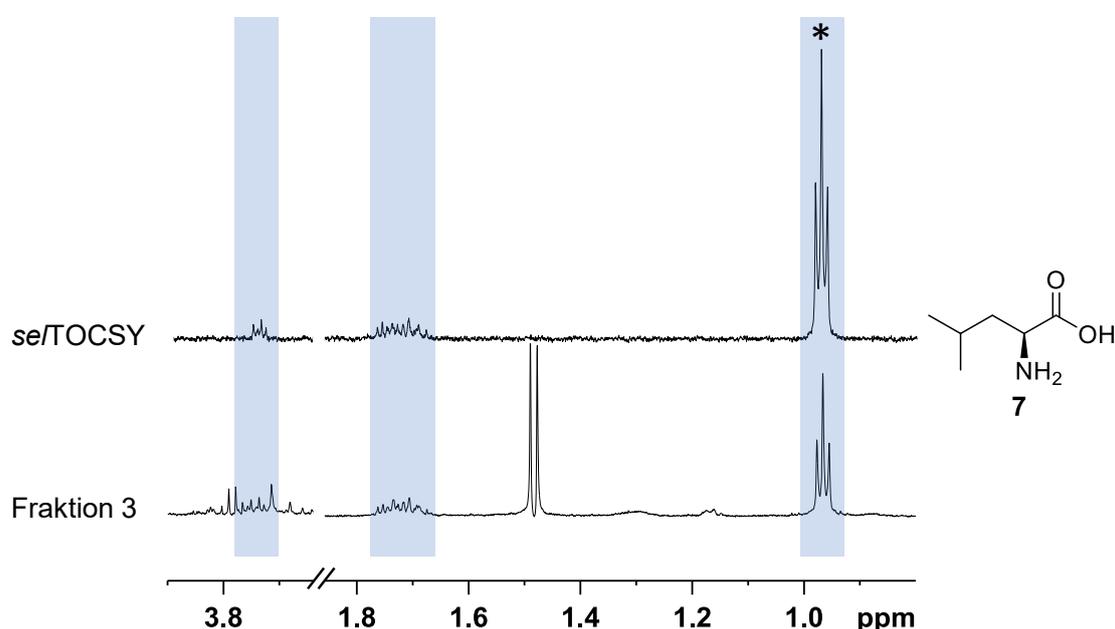


Abbildung 15: Es sind Ausschnitte eines *se/TOCSY*-Spektrums (eingestrahlte Frequenz: 521 Hz) und des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums der dritten Fraktion dargestellt. Die Fraktion 3 wurde nach polarer Extraktion und Umkehrphasensäulenchromatographie erhalten und es konnte ein Spinsystem (blau) mit einem *pseudo*-Triplett bei 0.97 ppm und zwei Multipletts ($\delta = 1.66 - 1.78$, 3.72 – 3.76 ppm) detektiert werden. Das Spinsystem wurde der Aminosäure Leucin (7) zugeordnet.

Das detektierte Spinsystem ist in blau gekennzeichnet und die eingestrahlte Frequenz (521 Hz) wurde markiert. Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum enthielt insgesamt wenige Signale, wobei mit dem *se/TOCSY*-Experiment ein Spinsystem bestehend aus einem *pseudo*-Triplett bei 0.97 ppm und zwei Multipletts bei 1.66 – 1.78 und 3.72 – 3.76 ppm identifiziert werden konnte. Das Multiplett mit der höchsten chemischen Verschiebung lag im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum überlagert vor und konnte nur durch die selektive Anregung eines koppelnden Protons detektiert und dem Spinsystem zugeordnet werden. Die Kopplungskonstante des *pseudo*-Tripletts betrug 6.5 Hz. Das Signalmuster ist charakteristisch für die Aminosäure Leucin (7). In dieser Fraktion trat neben den Signalen des identifizierten Spinsystems ein Dublett hoher

Ergebnisse und Diskussion

Intensität bei 1.48 ppm auf, dieses konnte jedoch ebenfalls in der vierten Fraktion beobachtet werden, in der es anschließend untersucht wurde. In der vierten Fraktion wurden insgesamt sechs Metaboliten identifiziert. Von diesen sind zwei in Abbildung 16 dargestellt.

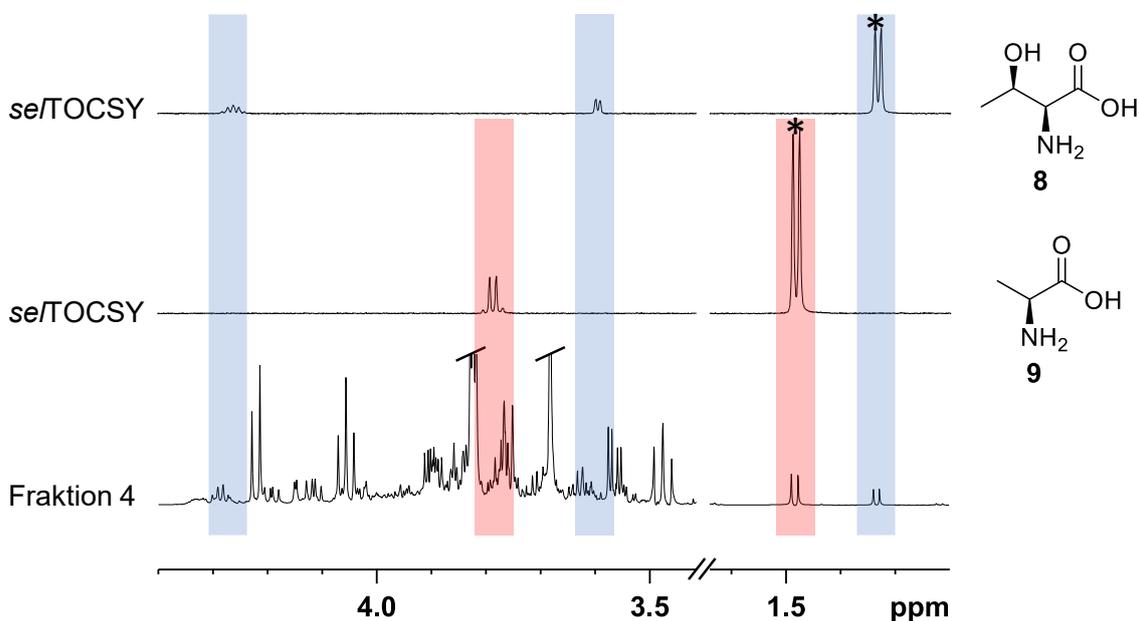


Abbildung 16: Es sind Ausschnitte von *se*/TOCSY-Spektren und des ¹H-NMR-Spektrums der vierten Fraktion dargestellt. Die Fraktion 4 wurde nach polarer Extraktion und Umkehrphasensäulenchromatographie erhalten und es sind beispielhaft zwei Spinsysteme markiert, die mit einem *se*/TOCSY-Experiment identifiziert wurden. Das erste Spinsystem (blau) zeigte sowohl je ein Dublett bei 1.33 ppm und 3.59 ppm als auch ein Multipllett bei 4.28 – 4.23 ppm (eingestrahlte Frequenz: 740 Hz). Das Spinsystem wurde der Aminosäure Threonin (8) zugeordnet. Das zweite Spinsystem (rot) zeigte neben einem Dublett bei 1.48 ppm ein Quartett bei 3.79 ppm und wurde der Aminosäure Alanin (9) zugeordnet (eingestrahlte Frequenz: 830 Hz).

Die zwei detektierten Spinsysteme sind jeweils in unterschiedlichen Farben gekennzeichnet und die eingestrahlte Frequenz wurde jeweils markiert. Beim ersten Spinsystem konnten mit einer Einstrahlfrequenz von 740 Hz dem Dublett bei 1.33 ppm zwei weitere Signale zugeordnet werden. Hierzu zählten ein Dublett bei 3.59 ppm und ein Multipllett bei 4.28 – 4.23 ppm, die im NMR-Spektrum der vierten Fraktion durch andere Signale überlagert vorlagen. Das Signalmuster ist charakteristisch für die Aminosäure Threonin (8). In einem weiteren *se*/TOCSY-Experiment mit einer Einstrahlfrequenz von 830 Hz konnte dem Dublett bei 1.48 ppm ein weiteres Signal (Quartett bei 3.79 ppm) zugeordnet werden. Das Quartett war im NMR-Spektrum der vierten Fraktion nicht ersichtlich, da es von Signalen höherer Intensität überlagert wurde. Die Kopplungskonstante von 7.3 Hz entspricht einer ³J-Kopplung, die zusammen mit dem Signalmuster auf die Aminosäure Alanin (9) schließen lässt.

Ergebnisse und Diskussion

In Abbildung 17 sind die NMR-Spektren von zwei *se*/TOCSY-Experimenten und das ¹H-NMR-Spektrum der vierten Fraktion dargestellt.

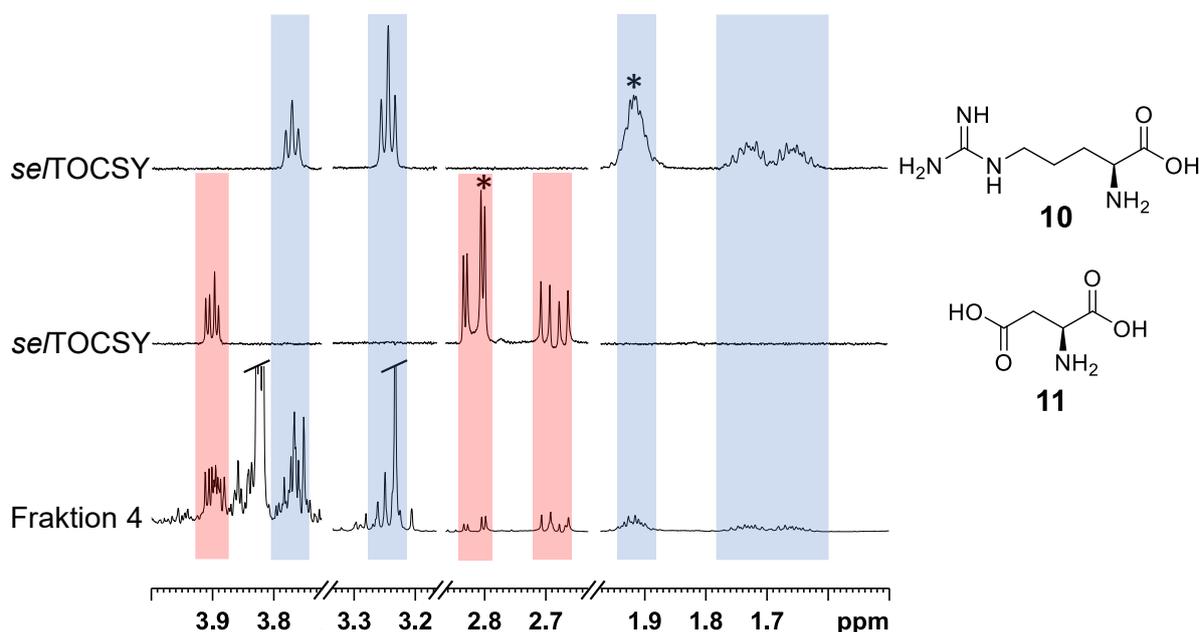


Abbildung 17: Es sind Ausschnitte von *se*/TOCSY-Spektren und des ¹H-NMR-Spektrums der vierten Fraktion dargestellt. Die Fraktion 4 wurde nach polarer Extraktion und Umkehrphasensäulenchromatographie erhalten und es sind beispielhaft zwei Spinsysteme markiert, die mit einem *se*/TOCSY-Experiment identifiziert wurden. Das erste Spinsystem (blau) zeigte sowohl zwei Multipletts ($\delta = 1.60 - 1.78, 1.87 - 1.97$ ppm) als auch zwei Dublett vom Dubletts bei 3.25 und 3.78 ppm (eingestrahle Frequenz: 1091 Hz). Das Spinsystem wurde der Aminosäure Arginin (**10**) zugeordnet. Das zweite Spinsystem (rot) zeigte insgesamt drei Dublett vom Dubletts ($\delta = 2.68, 2.82, 3.90$ ppm) und wurde der Aminosäure Asparaginsäure (**11**) zugeordnet (eingestrahle Frequenz: 1621 Hz).

Die weiteren zwei detektierten Spinsysteme sind jeweils in unterschiedlichen Farben gekennzeichnet und die eingestrahle Frequenz wurde jeweils markiert. Bei einer Einstrahlfrequenz von 1091 Hz wurde ein Spinsystem detektiert, welches neben zwei Multipletts mit einer chemischen Verschiebung von 1.60 – 1.78 und 1.87 – 1.97 ppm zwei Dublett vom Dubletts ($\delta = 3.25, 3.78$ ppm) aufwies. Das Signalmuster ist charakteristisch für die Aminosäure Arginin (**10**). Des Weiteren konnte mit einem *se*/TOCSY-Experiment mit einer Einstrahlfrequenz von 1621 Hz ein Spinsystem detektiert werden, welches insgesamt drei Dublett vom Dubletts aufwies. Die chemische Verschiebung betrug zum einen 2.68 und zum anderen 2.82 ppm. Bei beiden Signalen konnte eine ²J-Kopplung von 17.5 Hz detektiert werden, was einer geminalen Kopplung entspricht. Das dritte Dublett vom Dublett lag bei einer chemischen Verschiebung von 3.90 ppm. Zusammenfassend lässt das Spinsystem auf die Aminosäure Asparaginsäure (**11**) schließen.

In Abbildung 18 sind zwei weitere Spinsysteme, die durch selektive NMR-Experimente in der vierten Fraktion detektiert wurden, und das ^1H -NMR-Spektrum der Fraktion 4 dargestellt.

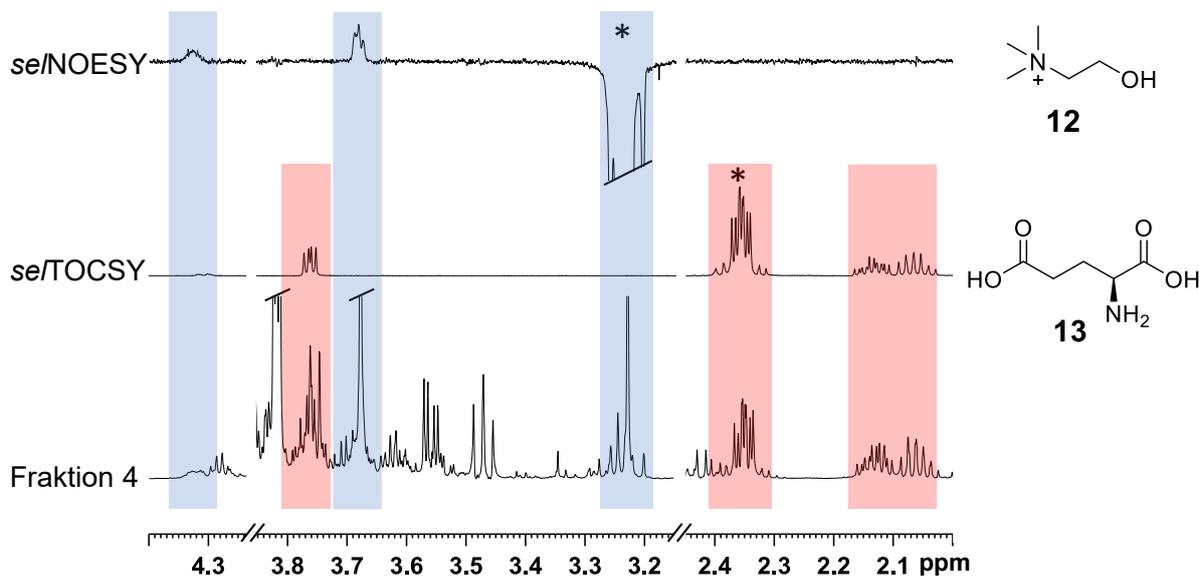


Abbildung 18: Es sind sowohl Ausschnitte eines *se*/NOESY- als auch eines *se*/TOCSY- und des ^1H -NMR-Spektrums der vierten Fraktion dargestellt. Die Fraktion 4 wurde nach polarer Extraktion und Umkehrphasensäulenchromatographie erhalten und es konnten zwei weitere Spinsysteme mit selektiven NMR-Experimenten identifiziert werden. Im *se*/NOESY-Spektrum konnte bei einem Singulett bei 3.23 ppm eine Kopplung durch den Raum zu zwei Multipletts ($\delta = 3.66 - 3.70$, $4.30 - 4.35$ ppm) detektiert werden (eingestrahlte Frequenz: 1880 Hz). Das Spinsystem wurde Cholin (**12**) zugeordnet. Das zweite Spinsystem (rot) zeigte insgesamt drei Multipletts ($\delta = 2.02 - 2.10$, $2.10 - 2.17$, $2.31 - 2.40$ ppm) und ein Dublett vom Dublett bei 3.76 ppm und wurde der Aminosäure Glutaminsäure (**13**) zugeordnet (eingestrahlte Frequenz: 1362 Hz).

Es sind zum einen das detektierte Spinsystem sowie das räumlich koppelnde System jeweils in unterschiedlichen Farben gekennzeichnet und die eingestrahlte Frequenz wurde jeweils markiert. In Fraktion 4 wurde ein Singulett bei 3.23 ppm detektiert, dessen Multiplizität im Zusammenhang mit der chemischen Verschiebung auf eine *N*-Methyl-Gruppe hindeutet. Dieses Signal wurde mit einem *se*/NOESY-Experiment mit einer Einstrahlfrequenz von 1880 Hz auf direkte Kopplungen hin untersucht. Es wurden darauf hin zwei Multipletts detektiert ($\delta = 3.66 - 3.70$, $4.30 - 4.35$ ppm), deren chemische Verschiebung auf Heteroatome in Nachbarschaft hinweisen. Das Signalmuster wurde Cholin (**12**) zugeordnet. Als nächstes wurde mit einem *se*/TOCSY-Experiment ein Spinsystem detektiert, welches neben drei Multipletts ($\delta = 2.02 - 2.10$, $2.10 - 2.17$, $2.31 - 2.40$ ppm) ein Dublett vom Dublett bei 3.76 ppm mit Kopplungskonstanten von 4.8 und 7.2 Hz aufwies. Das Signalmuster wurde der Aminosäure Glutaminsäure (**13**) zugeordnet. Insgesamt wurden somit in der vierten Fraktion fünf Aminosäuren und Cholin (**12**) identifiziert. Da die fünfte Fraktion ein ähnliches Signalmuster wie die vierte Fraktion aufwies, erfolgte anschließend die Analyse der sechsten Fraktion mittels selektiver NMR-Experimente.

Ergebnisse und Diskussion

In der sechsten Fraktion weisen die Signale von Saccharose (**6**) die höchste Intensität auf. Ein Ausschnitt des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums der Fraktion sowie eines *se*/NOESY-Spektrums ist in Abbildung 19 dargestellt.

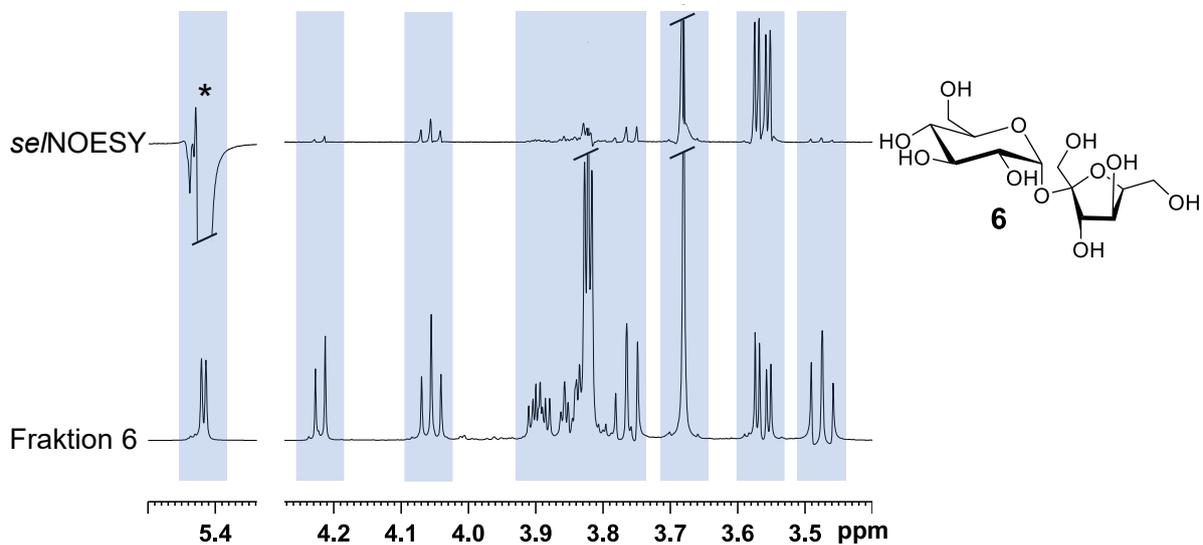


Abbildung 19: Ausschnitte des *se*/NOESY- und $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums der sechsten Fraktion mit Signalen im Bereich der Kohlenhydrate, die Saccharose (**6**) zugeordnet wurden. Die Fraktion 6 wurde nach polarer Extraktion und Umkehrphasensäulenchromatographie erhalten. Die Einstrahlfrequenz des selektiven NMR-Experiments wurde auf 3190 Hz eingestellt.

Die Signale hoher Intensität des Metaboliten Saccharose (**6**) dominieren das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der sechsten Fraktion. Das Signal des anomeren Protons (Dublett bei 5.42 ppm) wurde mit einer Kopplungskonstante von 4.0 Hz detektiert, was die α -konfigurierte Glucose-Einheit bestätigt. Es wurde ein selektives NOESY-Experiment mit einer Einstrahlfrequenz von 3190 Hz durchgeführt, um die glycosidische Verknüpfung der beiden Spinsysteme zu bestätigen. Die Signale von Saccharose (**6**) konnten bis einschließlich der zehnten Fraktion detektiert werden.

Obwohl die Signale des Kohlenhydrates **6** das NMR-Spektrum dominieren, ist es mit selektiven NMR-Experimenten möglich, die Spinsysteme von niedriger konzentrierten Metaboliten in derselben Fraktion zu detektieren. Die Fraktion 6 wurde demnach weiter nach Metaboliten hin untersucht.

Ergebnisse und Diskussion

In der sechsten Fraktion wurden zusätzlich zwei Spinsysteme mit *se*/TOCSY-Experimenten identifiziert, die in Abbildung 20 dargestellt sind.

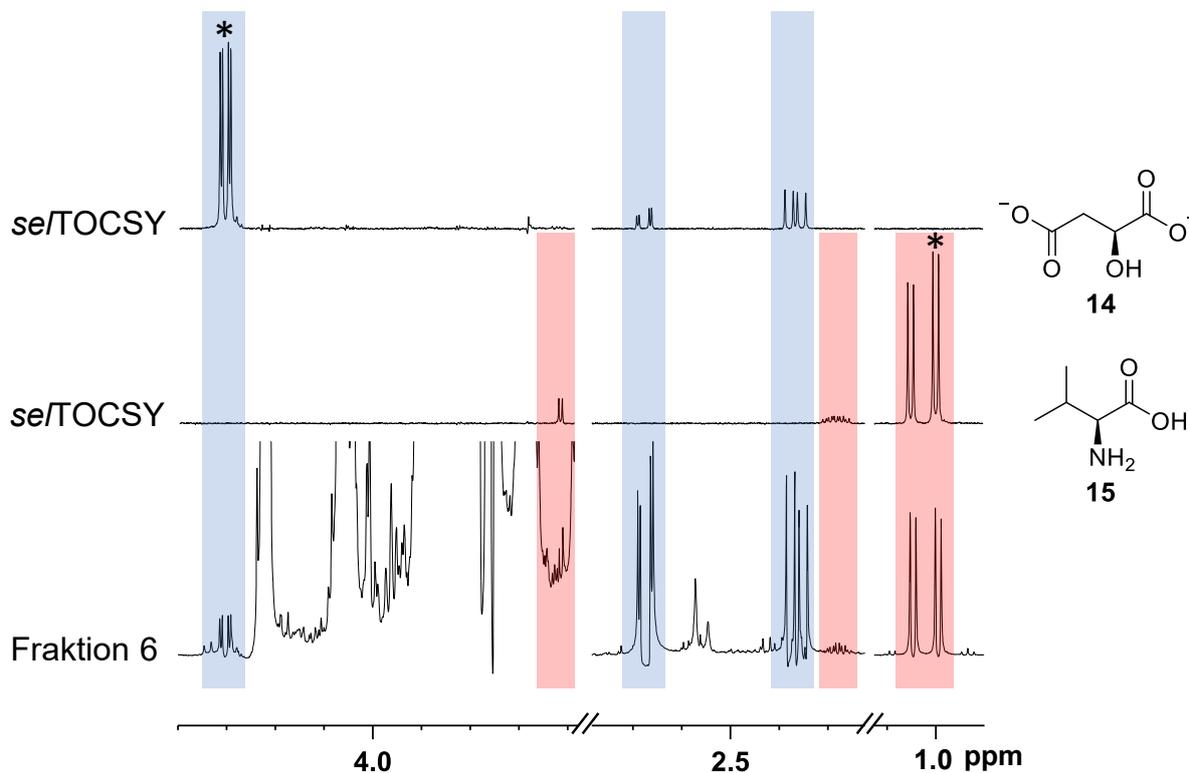


Abbildung 20: Es sind Ausschnitte von *se*/TOCSY-Spektren und des ¹H-NMR-Spektrums der sechsten Fraktion dargestellt. Die Fraktion 6 wurde nach polarer Extraktion und Umkehrphasensäulenchromatographie erhalten und es konnten zwei weitere Spinsysteme mit dem *se*/TOCSY-Experiment identifiziert werden. Das erste Spinsystem (blau) zeigte drei Dublett vom Dubletts bei einer chemischen Verschiebung von 2.37, 2.67 und 4.30 ppm (eingestrichelte Frequenz: 2522 Hz). Das Spinsystem wurde dem Salz der Äpfelsäure Malat (**14**) zugeordnet. Das zweite Spinsystem (rot) besteht aus drei Dubletts bei 0.89, 0.94 und 3.62 ppm und einem Multiplett bei 2.25 – 2.32 ppm. Dieses wurde der Aminosäure Valin (**15**) zugeordnet (eingestrichelte Frequenz: 535 Hz).

Die zwei detektierten Spinsysteme sind jeweils in unterschiedlichen Farben gekennzeichnet und die eingestrichelte Frequenz wurde jeweils markiert. Das erste Spinsystem wurde in der sechsten Fraktion mit einem *se*/TOCSY-Experiment mit einer Einstrahlfrequenz von 2522 Hz identifiziert. Hierbei wurden insgesamt drei Dublett vom Dubletts ($\delta = 2.37, 2.67, 4.30$ ppm) detektiert. Die beiden Signale im aliphatischen Bereich bei 2.37 und 2.67 ppm zeigen eine ²J-Kopplung von 15.3 Hz und zusätzlich eine Kopplung zu jeweils dem Dublett vom Dublett bei 4.30 ppm, was auf diastereotope Protonen am selben Kohlenstoffatom hinweist. Die recht starke Tieffeld-Verschiebung von 4.30 ppm deutet auf eine Carboxyl-Funktion sowie einem zusätzlichem Heteroatom in Nachbarschaft hin. Das Spinsystem ist charakteristisch für die organische Säure Malat (**14**). Das Spinsystem des zweiten Metaboliten zeigte drei Dubletts bei 0.89, 0.94 und 3.62 ppm sowie ein Multiplett bei 2.25 – 2.32 ppm. Das Signalmuster weist auf die Aminosäure Valin (**15**) hin. Da in den drei darauffolgenden Fraktionen ebenfalls die Signale von Saccharose (**6**) dominierten, wurde im Anschluss die zehnte Fraktion mit selektiven NMR-Experimenten untersucht, da in dieser isoliert vorliegende Signale im

aliphatischen Bereich detektiert wurden. In der zehnten Fraktion wurden zwei weitere Metaboliten aus dem polaren Extrakt identifiziert, deren Spinsysteme durch *se*/TOCSY-Experimente detektiert wurden (Abbildung 21).

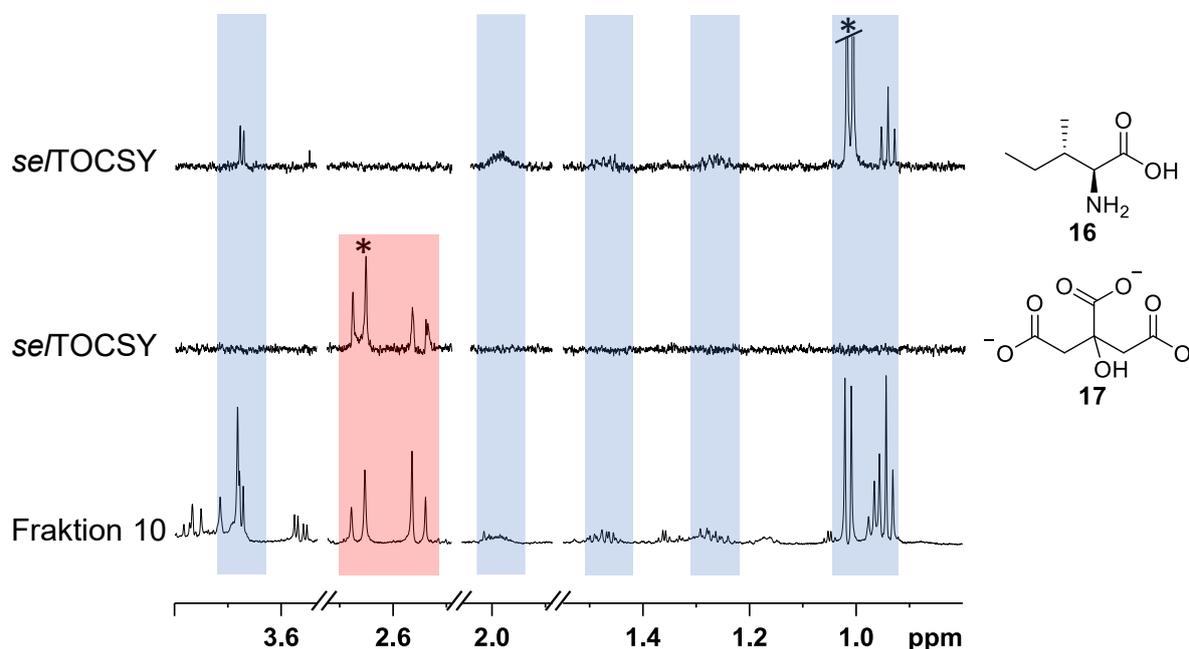


Abbildung 21: Es sind Ausschnitte von *se*/TOCSY-Spektren und des ^1H -NMR-Spektrums der zehnten Fraktion dargestellt. Die Fraktion 10 wurde nach polarer Extraktion und Umkehrphasensäulenchromatographie erhalten und es konnten zwei weitere Spinsysteme mit dem *se*/TOCSY-Experiment identifiziert werden. Das erste Spinsystem (blau) zeigte ein Dublett bei 1.02 ppm, welches eine Kopplung zu einem Triplett bei 0.94 ppm aufwies. Zum Spinsystem zählen zusätzlich sowohl drei Multipletts ($\delta = 1.23 - 1.30$, $1.43 - 1.51$, $1.95 - 2.02$ ppm) als auch ein Dublett bei 3.68 ppm (eingestrahlte Frequenz: 552 Hz). Das Spinsystem ist charakteristisch für die Aminosäure Isoleucin (**16**). Das zweite Spinsystem (rot) besteht aus zwei Dubletts bei 2.55 und 2.67 ppm und wurde der organischen Säure Citrat (**17**) zugeordnet (eingestrahlte Frequenz: 542 Hz).

Die zwei detektierten Spinsysteme sind jeweils in unterschiedlichen Farben gekennzeichnet und die eingestrahelten Frequenzen wurden markiert. In der zehnten Fraktion wurde mit einem *se*/TOCSY-Experiment mit einer Einstrahlfrequenz von 552 Hz ein Spinsystem mit einem Dublett bei 1.02 ppm, einem Triplett bei 0.94 ppm, drei Multipletts ($\delta = 1.23 - 1.30$, $1.43 - 1.51$, $1.95 - 2.02$ ppm) und einem Dublett bei 3.68 ppm detektiert. Das Signalmuster ist charakteristisch für die Aminosäure Isoleucin (**16**). Des Weiteren wurde ein Spinsystem, bestehend aus zwei Dubletts bei 2.55 und 2.67 ppm mit einer 2J -Kopplung von 15.2 Hz, detektiert. Dieses wurde der organischen Säure Citrat (**17**) zugeordnet. Die darauffolgenden Fraktionen enthielten hauptsächlich Signale von bereits identifizierten Metaboliten, daher wurde im Anschluss die Fraktion 16 untersucht, da in dieser Signale im aromatischen Bereich detektiert wurden.

Es wurde ein weiterer Metabolit aus dem polaren Extrakt identifiziert, dessen Spinsystem in der Fraktion 16 durch *se*/TOCSY-Experimente detektiert wurde (Abbildung 22).

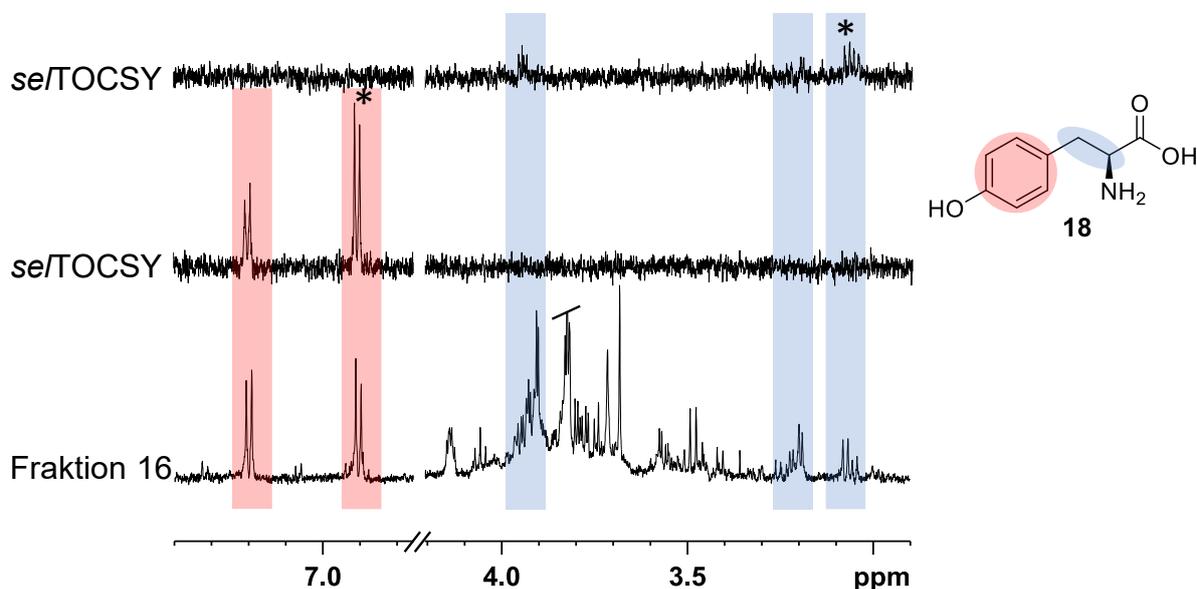


Abbildung 22: Es sind Ausschnitte von *se*/TOCSY-Spektren und des ¹H-NMR-Spektrums der Fraktion 16 dargestellt. Diese wurde nach polarer Extraktion und Umkehrphasensäulenchromatographie erhalten. Das erste Spinsystem bestand aus drei Dublett vom Dubletts bei 3.21, 3.06 und 3.95 ppm (Einstrahlfrequenz: 1778 Hz). Das zweite Spinsystem (rot) zeigte eine Kopplung zwischen zwei Signalen im aromatischen Bereich bei einer chemischen Verschiebung von 7.20 und 6.91 ppm (eingestrahle Frequenz: 4261 Hz). Das Signalmuster der beiden Spinsysteme wurde der Aminosäure Tyrosin (**18**) zugeordnet.

Die zwei detektierten Spinsysteme sind jeweils in unterschiedlichen Farben gekennzeichnet und die eingestrahle Frequenz wurde jeweils markiert. In der Fraktion 16 wurde mit einem *se*/TOCSY-Experiment ein Spinsystem bestehend aus drei Dublett vom Dubletts ($\delta = 3.06, 3.21, 3.95$ ppm) detektiert (Einstrahlfrequenz: 1778 Hz). Mit einer Einstrahlfrequenz von 4261 Hz wurde die Kopplung zwischen aromatischen Protonen eines AA'XX'-Systems detektiert, deren Signale eine chemische Verschiebung von 7.20 und 6.91 ppm aufwiesen. Die beiden Dublett vom Dubletts mit den beiden niedrigsten chemischen Verschiebungen des ersten Spinsystems sind im *se*/TOCSY-Spektrum nicht eindeutig zu erkennen, weisen jedoch im ¹H-NMR-Spektrum der Fraktion 16 einen Dacheffekt auf. Das relative Integral dieser betrug, ausgehend von je zwei charakteristischen AA'XX'-Protonen für die aromatischen Signale, 2:2:1:1, was auf diastereotope Protonen hinweist. Das Signalmuster mit den Integralverhältnissen ist charakteristisch für die Aminosäure Tyrosin (**18**). Das Signal des H_α-Protons lag im ¹H-NMR-Spektrum der Fraktion 16 überlagert vor und wurde jedoch durch das *se*/TOCSY-Experiment beobachtet. Die darauffolgenden Fraktionen zeigten lediglich Signale mit geringen Intensitäten, daher wurde danach die Fraktion 24 auf Metaboliten hin untersucht. In dieser wurden Signale hoher Intensität sowohl im aromatischen als auch im aliphatischen Bereich detektiert.

In Fraktion 24 wurden drei Spinsysteme detektiert, die in Abbildung 23 dargestellt sind.

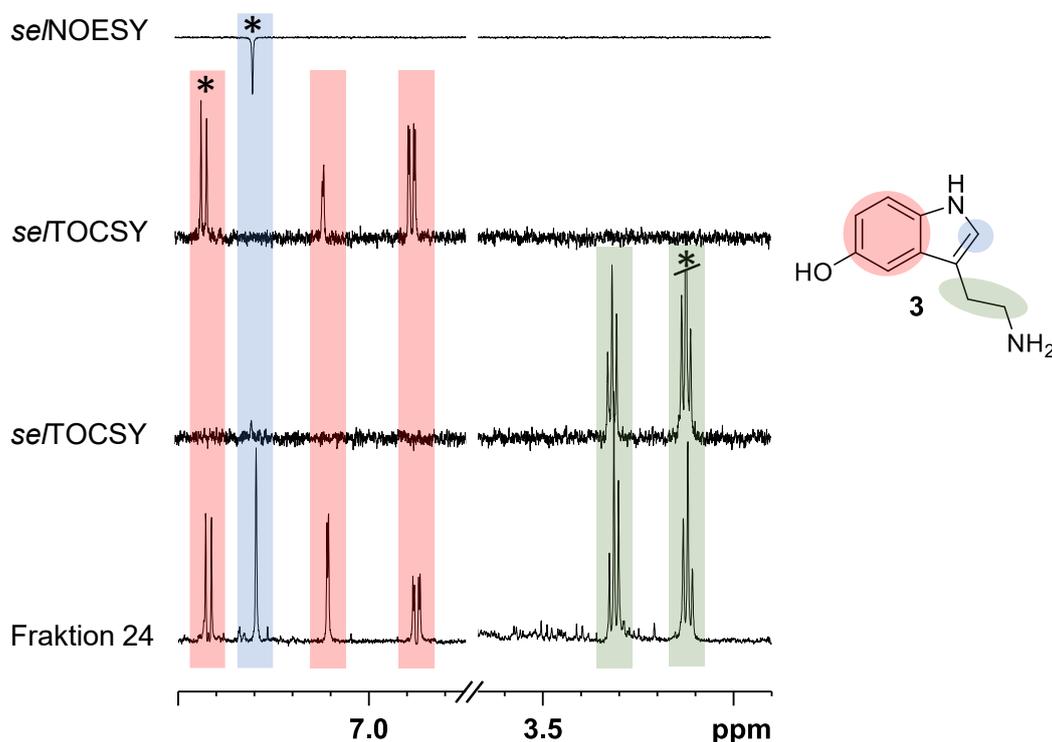


Abbildung 23: Es sind sowohl Ausschnitte von $se/TOCSY$ -Spektren, eines $se/NOESY$ - und des 1H -NMR-Spektrums der Fraktion 24 dargestellt. Die Fraktion wurde nach polarer Extraktion und Umkehrphasensäulenchromatographie erhalten und es konnten drei Spinsysteme identifiziert werden. Mit dem $se/NOESY$ -Experiment konnten bei dem Singulett (blau) bei einer chemischen Verschiebung von 7.30 ppm keine direkten Kopplungen detektiert werden (Einstrahlungsfrequenz: 4320 Hz). Das zweite Spinsystem (rot) wurde mit einem $se/TOCSY$ -Experiment identifiziert und besteht aus Signalen im aromatischen Bereich, wozu zwei Dubletts bei 7.42 und 7.11 ppm und ein Dublett vom Dublett bei 6.88 ppm zählen (eingestrahelte Frequenz: 4395 Hz). Das dritte Spinsystem (grün) wies zwei Triplets mit einem Dacheffekt bei 3.12 und 3.31 ppm auf (eingestrahelte Frequenz: 1813 Hz). Das Signalmuster der drei Spinsysteme wurde Serotonin (**3**) zugeordnet.

Die drei detektierten Spinsysteme sind jeweils in unterschiedlichen Farben gekennzeichnet und die eingestrahelte Frequenz wurde jeweils markiert. Es wurde zum einen mit einem $se/TOCSY$ -Experiment (Einstrahlungsfrequenz: 1813 Hz) ein Spinsystem bestehend aus zwei Triplets bei einer chemischen Verschiebung von 3.12 und 3.31 ppm detektiert. Diese zeigten einen Dacheffekt und eine 3J -Kopplung mit 7.2 Hz, was auf eine jeweils terminal substituierte gesättigte C_2 -Kette schließen lässt. Zum anderen wurde mit einer Einstrahlungsfrequenz von 4395 Hz ein Spinsystem detektiert, welches Signale im aromatischen Bereich zeigte. Hierzu zählte ein Dublett bei 7.42 ppm, welches eine *ortho*-Kopplung von 8.9 Hz zu einem Dublett vom Dublett bei 6.88 ppm aufwies. Dieses zeigte hingegen zusätzlich eine *meta*-Kopplung ($^4J = 2.4$ Hz) zu einem Dublett bei einer chemischen Verschiebung von 7.11 ppm. Dies lässt auf einen 1,2,4-trisubstituierten Aromaten schließen. Zusätzlich wurde in der Fraktion 24 ein Singulett bei 7.30 ppm detektiert, bei dem mit einem $se/NOESY$ -Experiment mit einer Einstrahlungsfrequenz von 4320 Hz jedoch keine weiteren Kopplungen identifiziert wurden. Jedoch

Ergebnisse und Diskussion

wurde durch das gleiche Integralverhältnis eine Zugehörigkeit zum aromatischen Spinsystem vermutet. Unter Berücksichtigung des Singuletts deutet das Signalmuster auf Serotonin (**3**) hin, welches in hohen Konzentrationen in Walnüssen vorkommt und dort eine Rolle beim Abbau von Ammoniak spielt.^[24]

Insgesamt wurden sechs verschiedene Fraktionen mit selektiven NMR-Experimenten zur Identifizierung von Metaboliten im polaren Extrakt von Walnüssen untersucht. Dabei wurden insgesamt vierzehn Metaboliten identifiziert, von denen neun zu den Aminosäuren zählen. Zudem konnten Serotonin (**3**), Cholin (**12**), Saccharose (**6**) und die zwei organischen Säuren Malat (**14**) und Citrat (**17**) identifiziert werden. Durch den Vergleich der chemischen Verschiebungen aus Datenbanken konnten aus dem Gesamtextrakt zusätzlich die organischen Säuren Acetat (**19**) und Formiat (**20**) identifiziert und durch Verwendung interner Standards bestätigt werden. Die *spike-in*-Experimente sind in Abbildung 24 dargestellt.

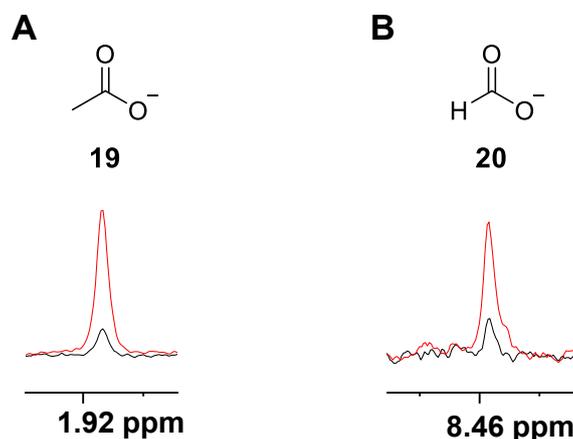


Abbildung 24: Es sind sowohl das Referenz-¹H-NMR-Spektrum des polaren Gesamtextraktes (schwarz) als auch das NMR-Spektrum nach Zugabe des internen Standards (rot) dargestellt (400 MHz, NS = 32). Als interne Standards wurden zum einen Essigsäure (Acetat, **A**) und zum anderen Ameisensäure (Formiat, **B**) verwendet. Beide Metaboliten wurden somit im polaren Extrakt nachgewiesen.

Für die *spike-in*-Experimente wurde zunächst je ein Referenzspektrum des polaren Gesamtextraktes der Walnuss gemessen. Anschließend wurden als interne Standards die organischen Säuren **19** und **20** hinzugegeben und erneut ein ¹H-NMR-Spektrum gemessen. Die Intensität des Singuletts bei 1.92 ppm wies einen Anstieg durch Zugabe von Acetat (**19**) auf (**A**). Des Weiteren wurde eine Intensitätszunahme des Singuletts bei 8.46 ppm durch Zugabe von Formiat (**20**) beobachtet (**B**). Beide Singulets wurden ebenfalls mit identischer chemischer Verschiebung im ¹H-NMR-Spektrum (600 MHz) in der zweiten Fraktion detektiert.

Ergebnisse und Diskussion

In Tabelle 2 sind die aus dem polaren Extrakt der Walnuss identifizierten Metaboliten mit den chemischen Verschiebungen, Multiplizitäten und Kopplungskonstanten zusammengefasst.

Tabelle 2: Zusammenfassung der durch polare Extraktion und Umkehrphasensäulenchromatographie identifizierten Metaboliten im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (600 MHz) der Walnuss. Sowohl die chemische Verschiebung, Multiplizität, Kopplungskonstanten als auch die Fraktion, aus der der entsprechende Metabolit identifiziert wurde, sind angegeben.

δ [ppm]	Multiplizität	J (Hz)	Metabolit	Fraktion
1.92	s	–	Acetat	2
1.48	d	7.3	Alanin	4
3.79	q	7.3		
1.60 – 1.78	m	–	Arginin	4
1.87 – 1.97	m	–		
3.25	dd	6.8, 6.8		
3.78	dd	6.1, 6.1		
2.68	dd	8.6, 17.5	Asparaginsäure	4
2.82	dd	3.8, 17.5		
3.90	dd	3.8, 6.5		
3.23	s	–	Cholin	4
3.66 – 3.70	m	–		
4.30 – 4.35	m	–		
2.55	d	15.2	Citrat	10
2.67	d	15.2		
8.46	s	–	Formiat	2
2.02 – 2.10	m	–	Glutaminsäure	4
2.10 – 2.17	m	–		
2.31 – 2.40	m	–		
3.76	dd	4.8, 7.2		
0.94	t	7.2	Isoleucin	10
1.02	d	7.2		
1.23 – 1.30	m	–		
1.43 – 1.51	m	–		
1.95 – 2.02	m	–		
3.68	d	4.1		
0.97	<i>pseudo-t</i>	6.5	Leucin	3
1.66 – 1.78	m	–		
3.72 – 3.76	m	–		
2.37	dd	10.2, 15.3	Malat	6
2.67	dd	3.0, 15.3		
4.30	dd	3.0, 10.3		
3.12	t	7.2	Serotonin	24
3.31	t	7.2		
6.88	dd	2.4, 8.9		
7.11	d	2.4		
7.30	s	–		
7.42	d	8.9		

Ergebnisse und Diskussion

δ [ppm]	Multiplizität	J (Hz)	Metabolit	Fraktion
5.42	d	4.0		
4.23	d	8.9		
4.05	dd	8.6, 8.6		
3.87 – 3.92	m	–		
3.87 – 3.80	m	–		
3.76	dd	9.3, 9.3	Saccharose	6
3.69	d	12.6		
3.67	d	12.6		
3.56	dd	4.0, 10.0		
3.47	dd	9.5, 9.5		
1.33	d	6.7		
3.59	d	5.0	Threonin	4
4.23 – 4.28	m	–		
3.06	dd	8.0, 14.5		
3.21	dd	5.1, 14.5		
3.95	dd	–	Tyrosin	16
6.91	<i>pseudo-d</i>	8.7		
7.20	<i>pseudo-d</i>	8.7		
0.89	d	7.1		
0.94	d	7.1		
2.25 – 2.32	m	–	Valin	6
3.62	d	4.4		

Ergebnisse und Diskussion

Auch die durch selektive NMR-Experimente identifizierten Metaboliten wurden analog zu den organischen Säuren Acetat (**19**) und Formiat (**20**) verifiziert, indem interne Standards zum polaren Gesamtextrakt der Walnuss hinzugegeben wurden. In Abbildung 25 sind die *spike-in*-Experimente zusammengefasst.

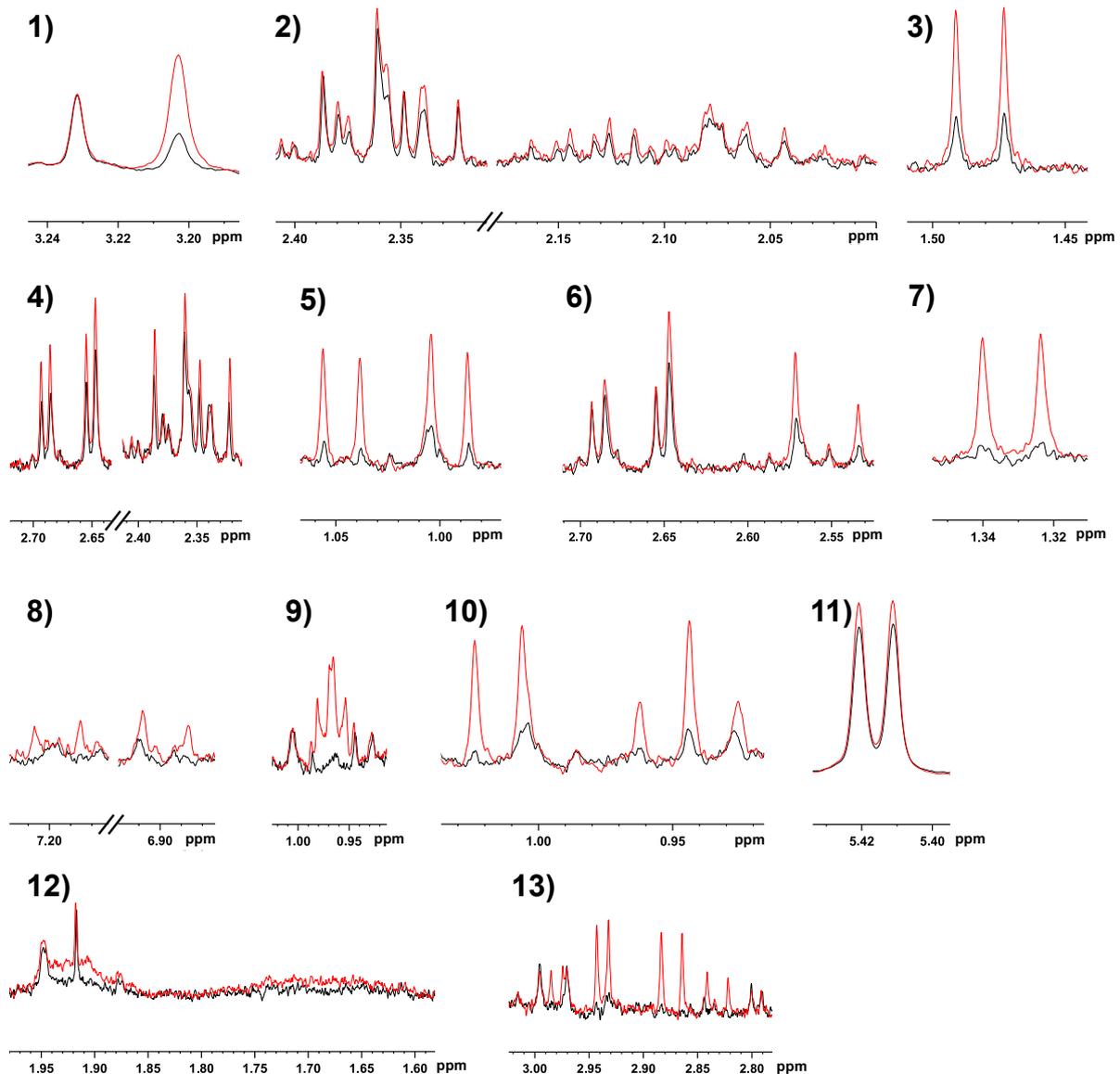


Abbildung 25: Als Referenz wurde ein ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz, NS = 32) des polaren Extraktes der Walnuss (schwarz) gemessen. Danach wurden jeweils interne Standards hinzugeben (rot), um die zuvor durch selektive NMR-Experimente identifizierten Metaboliten zu verifizieren. Verwendete Standards: 1) Cholinchlorid, 2) L-Glutaminsäure, 3) L-Alanin, 4) Äpfelsäure, 5) L-Valin, 6) Zitronensäure, 7) L-Threonin, 8) L-Tyrosin, 9) L-Leucin, 10) L-Isoleucin, 11) Saccharose, 12) L-Arginin, 13) L-Asparaginsäure. Die Signale von Tyrosin (**18**) im aromatischen Bereich konnten im ^1H -NMR-Spektrum des Gesamtextraktes nicht eindeutig zugeordnet und somit nur bedingt als Referenz zum internen Standard verwendet werden.

Es sind ausgewählte Ausschnitte der ^1H -NMR-Spektren der *spike-in*-Experimente dargestellt. Hierzu wurde zunächst ein Referenz-NMR-Spektrum (schwarz) gemessen und anschließend 1 – 5 μL einer 0.1 M Lösung des internen Standards hinzugegeben. Das ^1H -NMR-Spektrum wurde erneut gemessen (rot), wobei eine Intensitätszunahme der entsprechenden Signale des

Ergebnisse und Diskussion

Standards beobachtet wurde. Mit Ausnahme von Serotonin (**3**) und Tyrosin (**18**) wurden einzelne Signale im Gesamtspektrum den identifizierten Metaboliten eindeutig zugeordnet. Das ^1H -NMR-Spektrum des polaren Extraktes ist in Abbildung 26 mit den einzelnen Signalen mit entsprechend zugeordneten Metaboliten dargestellt.

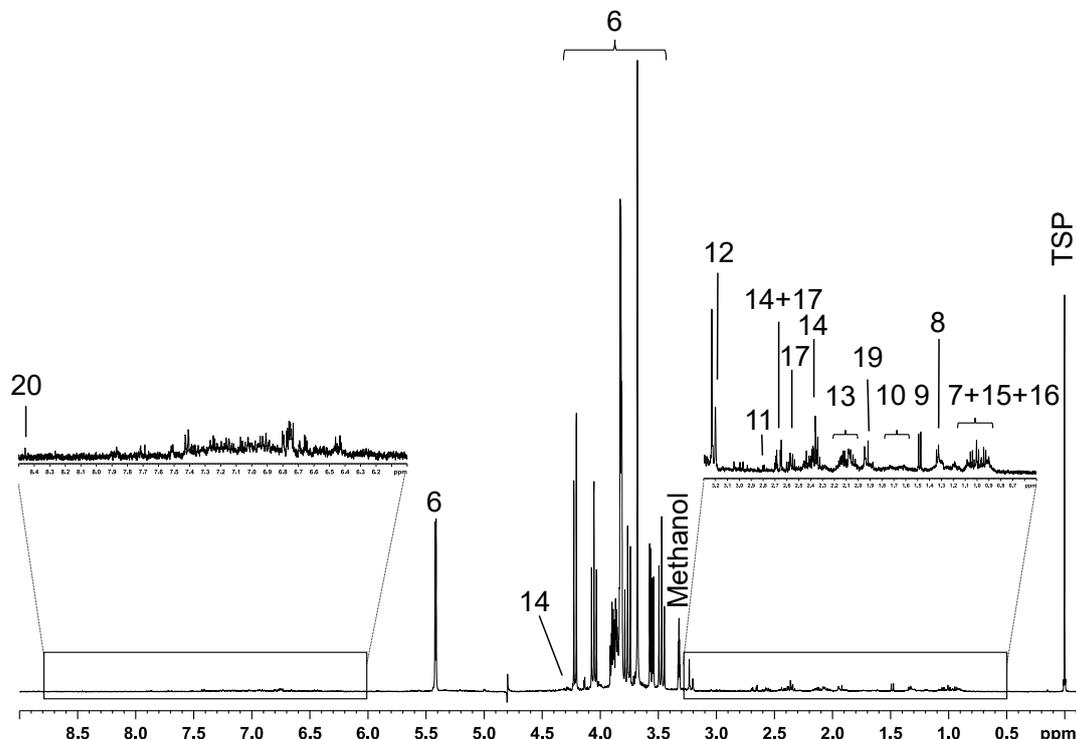


Abbildung 26: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz, NS = 128) des polaren Extraktes der Walnuss mit den Signalen entsprechend zugeordneten Metaboliten. Zugeordnete Metaboliten: Saccharose (**6**), Leucin (**7**), Threonin (**8**), Alanin (**9**), Arginin (**10**), Asparaginsäure (**11**), Cholin (**12**), Glutaminsäure (**13**), Malat (**14**), Valin (**15**), Isoleucin (**16**), Citrat (**17**), Acetat (**19**), Formiat (**20**).

Die identifizierten Metaboliten wurden den Signalen im Gesamtextrakt zugeordnet. Hierbei wurden bei den Aminosäuren lediglich einzelne Signale im aliphatischen Bereich zugeordnet, da die restlichen Signale (z.B. H_α) überlagert vorlagen. Bei Saccharose (**6**) wurden die gesamten Signale zugeordnet, da diese das ^1H -NMR-Spektrum dominieren. Ebenfalls wurden die Singulett-Signale der organischen Säuren Acetat (**19**) und Formiat (**20**) eindeutig zugeordnet. Die Signale von Citrat (**17**) und Malat (**14**) lagen bei 2.67 ppm überlagert vor. Die Signale von Tyrosin (**18**) und Serotonin (**3**) waren im NMR-Spektrum des Gesamtextraktes nicht ersichtbar. Diese Metaboliten wurden jedoch durch Verwendung selektiver NMR-Experimente aus der Walnuss identifiziert.

Auch die zweite Extraktionsmethode (Methanol/Acetonitril, 1:1) wurde im größeren Maßstab (1:333) durchgeführt, um eine Identifizierung von Metaboliten zu vereinfachen. Hierbei wurde das Fettsäuremuster im Extrakt jedoch nicht näher untersucht, da die mit dem höchsten Gehalt in Walnüssen vorkommenden Fettsäuren (u.a. Linolsäure, Linolensäure, Ölsäure) bereits

Ergebnisse und Diskussion

bekannt sind.^[39] Da bei dem Lösungsmittelgemisch Fettsäuren extrahiert werden, wurde der Rückstand im Anschluss zur vollständigen Entfernung dieser sowohl mit *n*-Hexan als auch mit Dichlormethan extrahiert. Ein weiterer Schritt durch Extraktion mittels Acetonitril wurde durchgeführt, sodass der in Methanol lösliche Rückstand erhalten wurde. Der Rückstand wurde mit automatisierter Umkehrphasensäulenchromatographie mittels Methode A fraktioniert, die Fraktionen 15 – 21 mit der höchsten Dichte an Signalen im ¹H-NMR-Spektrum vereint und mittels Methode B erneut fraktioniert. Es wurden ¹H-NMR-Spektren der einzelnen Fraktionen an einem 600 MHz Spektrometer gemessen. Eine ausgewählte Fraktion wurde hinsichtlich eines zuvor im polaren Extrakt noch nicht identifizierten Metaboliten untersucht und zusätzlich selektive NMR-Experimente durchgeführt. In Abbildung 27 wurden drei Spinsysteme mit *se*/TOCSY-Experimenten detektiert und das ¹H-NMR-Spektrum der Fraktion 28 ist dargestellt.

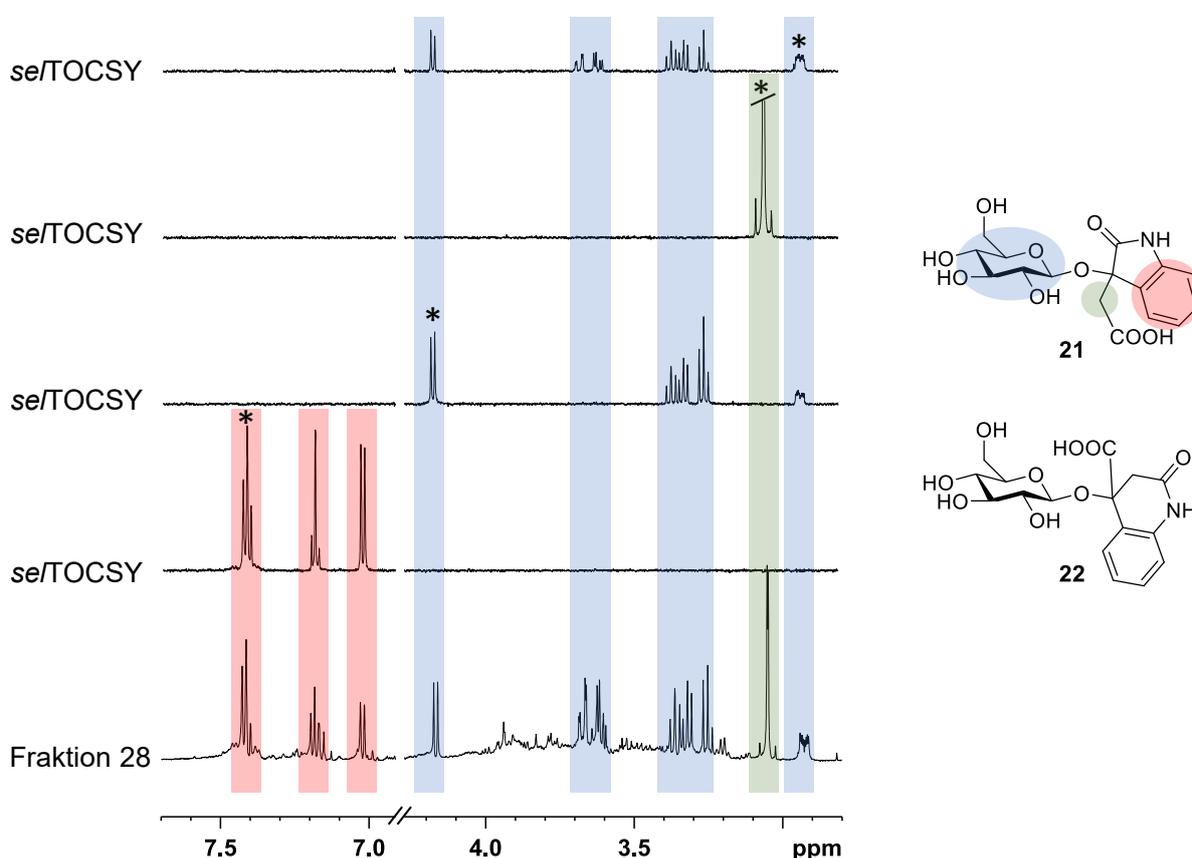


Abbildung 27: Es sind Ausschnitte von vier *se*/TOCSY-Spektren und des ¹H-NMR-Spektrums der Fraktion 28 dargestellt. Diese wurde nach einer stufenweisen Extraktion mit Methanol/Acetonitril (1:1), *n*-Hexan, Dichlormethan und Acetonitril und zweimaliger Umkehrphasensäulenchromatographie erhalten. Es konnte zum einen ein Spinsystem bestehend aus aromatischen Protonen (rot, Einstrahlfrequenz: 4404 Hz) und zum anderen im Bereich der Kohlenhydrate (blau, Einstrahlfrequenz 1711 und 2456 Hz) detektiert werden. Ein drittes Spinsystem (grün) wies lediglich zwei Dubletts auf (Einstrahlfrequenz: 1785 Hz).

Die drei detektierten Spinsysteme sind jeweils in unterschiedlichen Farben gekennzeichnet und die eingestrahlte Frequenz wurde jeweils markiert. Im aromatischen Bereich wurde ein Spinsystem (rot) detektiert, welches je ein Dublett bei 7.42 und 7.16 ppm und je zwei Dublett

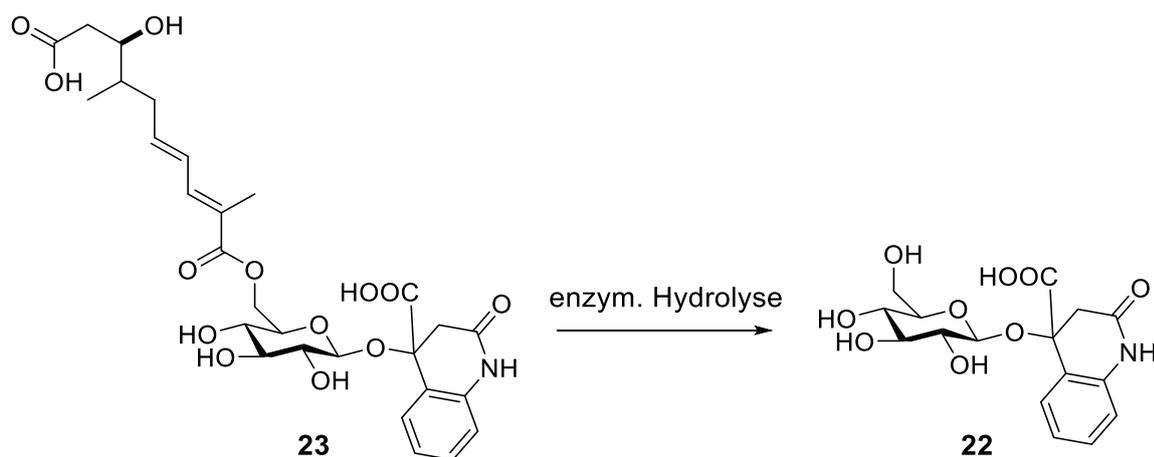
Ergebnisse und Diskussion

vom Dubletts bei 7.41 und 7.18 ppm aufweist. Die Multiplizitäten weisen auf einen 1,2-disubstituierten Aromaten hin. Das zweite Spinsystem konnte nur mittels *se*/TOCSY-Experimenten mit unterschiedlichen Einstrahlfrequenzen identifiziert werden. Bei einer Einstrahlfrequenz von 2456 Hz wurden dem Dublett bei 4.18 ppm ($^3J = 8.1$ Hz) insgesamt drei Dublett vom Dubletts ($\delta = 3.36, 3.32, 3.25$ ppm) und ein Dublett vom Dublett vom Dublett (ddd) bei einer chemischen Verschiebung von 2.93 ppm zugeordnet. Wurde das *se*/TOCSY-Experiment jedoch mit einer Einstrahlfrequenz von 1711 Hz durchgeführt, konnte eine zusätzliche Kopplung des ddd's zu zwei weiteren Dublett vom Dubletts ($\delta = 3.67, 3.61$ ppm) detektiert werden. Als drittes Spinsystem (grün) wurden mit einer Einstrahlfrequenz von 1785 Hz zwei Dubletts bei 3.06 und 2.93 ppm detektiert, die im ^1H -NMR-Spektrum einen starken Dacheffekt aufweisen und eine 2J -Kopplung von 14.8 Hz zeigen. Mit Hilfe eines HSQC-Experiments konnte die zugehörige ^{13}C -Verschiebung ermittelt werden. In Tabelle 3 sind die ^1H - und ^{13}C -Verschiebungen der Signale des Metaboliten zusammengefasst.

Tabelle 3: Zusammenfassung der detektierten ^1H -NMR-Signale mit deren Multiplizitäten und Kopplungskonstanten. Die ^{13}C -Verschiebungen wurden anhand des HSQC-Spektrums ermittelt. Die ^{13}C -Verschiebung der markierten (*) quartären Kohlenstoffatome wurde aus dem HMBC-Spektrum ermittelt.

$^1\text{H-NMR } \delta$ [ppm]	Multiplizität	J [Hz]	$^{13}\text{C-NMR } \delta$ [ppm]
–	–	–	180.9*
–	–	–	176.2*
–	–	–	142.7*
–	–	–	80.2*
7.42	d	7.5	130.5
7.41	dd	8.5, 8.5	125.2
7.18	dd	7.8, 7.8	122.7
7.02	d	8.1	110.5
4.18	d	8.1	97.7
3.67	dd	2.4, 12.5	59.8
3.61	dd	4.7, 12.5	59.8
3.36	dd	9.3, 9.3	68.9
3.32	dd	9.3, 9.3	72.5
3.25	dd	9.1, 9.1	75.4
3.06	d	14.8	44.2
3.04	d	14.8	44.2
2.93	ddd	2.4, 4.7, 10.2	75.5

Bei den Dubletts vom Dubletts bei 3.67 und 3.61 ppm wurde mithilfe des HSQC-Spektrums ermittelt, dass es sich um eine CH₂-Gruppe mit diastereotopen Protonen handelt. Das selbe wurde bei den Dubletts bei 3.06 und 3.04 ppm beobachtet. Im 2D-NOESY-Experiment konnte eine Kopplung zwischen den Dubletts bei 3.06 und 3.04 ppm zum Dublett des aromatischen Systems bei 7.42 ppm beobachtet werden und somit die Konnektivität der Spinsysteme beobachtet werden. Die Signale im Bereich der Kohlenhydrate weisen auf eine Glucose-Einheit hin, deren anomeres Proton eine Kopplungskonstante von 8.1 Hz aufwies und somit auf eine β -Konfiguration geschlossen wurde. Hierbei handelt es sich vermutlich um das Indolin-Derivat **21**. Die (3*R*/3*S*)-3-(β -D-Glucopyranosyloxy)-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-indol-3-essigsäure (**21**) wurde von Singldinger *et al.* bereits aus Haselnüssen identifiziert.^[102] Der Metabolit wurde ebenfalls aus Orangen, Maulbeeren und Sauerkirschen isoliert.^[103–105] Die Struktur **22** ist zunächst jedoch ebenfalls denkbar. So wurde von Ito *et al.* Glansreginin A (**23**) aus Walnüssen extrahiert und zur Strukturaufklärung des Metaboliten saure und enzymatische Hydrolysen durchgeführt.^[106] Dabei wurde das Chinolon-Derivat **22** durch enzymatische Hydrolyse von Glansreginin A (**23**) als Fragment nachgewiesen (Schema 2).^[106]



Schema 2: Die in der Studie von Ito *et al.* durchgeführte enzymatische Hydrolyse des aus Walnüssen isolierten Glansreginins A (**23**) führte zum Fragment **22**.^[106]

Aufgrund der beobachteten Kopplung zwischen den Dubletts bei 3.06 und 3.04 ppm zum Dublett des aromatischen Systems bei 7.42 ppm im 2D-NOESY-Spektrum wurde jedoch die Struktur **21** vermutet. Denn die räumliche Nähe der diastereotopen Protonen der CH₂-Gruppe des Indolinfragments zum anomeren Proton der Glucose-Einheit sowie zum aromatischen System deutet auf (3*R*/3*S*)-3-(β -D-Glucopyranosyloxy)-2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-indol-3-essigsäure (**21**) hin, welche zuvor noch nicht aus Walnüssen identifiziert wurde. Die Konfiguration am Stereozentrum der Indolin-Einheit ist noch nicht aufgeklärt.

Ergebnisse und Diskussion

Zusätzlich wurden in der Fraktion 21 die Signale von Serotonin (**3**) detektiert, welches bereits aus dem polaren Extrakt identifiziert wurde. In Abbildung 28 ist das *spike-in*-Experiment zur Verifizierung der Struktur dargestellt.

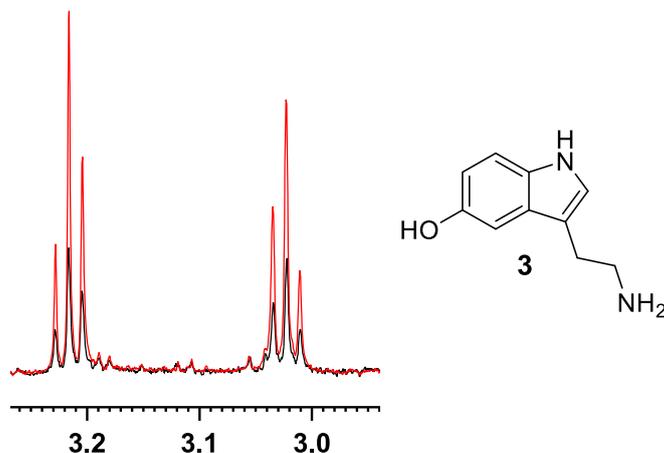


Abbildung 28: Ausschnitt des ^1H -NMR-Referenzspektrums (600 MHz, NS = 64) der Fraktion 21 und des NMR-Spektrums nach Zugabe von Serotonin (**3**) als interner Standard. Die Fraktion wurde nach stufenweiser Extraktion und Umkehrphasensäulenchromatographie erhalten. Es ist ein Anstieg der Intensitäten der zugehörigen Signale zu erkennen.

Serotonin (**3**) wurde mittels eines *spike-in*-Experiments verifiziert. Die Fraktion 21 wies die Signale des Metaboliten auf, welcher bereits im polaren Extrakt identifiziert wurde. Es wurde nach Messung eines Referenzspektrums der Fraktion 21 Serotonin (**3**) als interner Standard hinzugegeben, wobei eine Intensitätszunahme der entsprechenden Signale beobachtet werden konnte.

Die Identifizierung von Metaboliten im Walnussextrakt diente der eindeutigen Zuordnung einzelner Signale im NMR-Spektrum zu entsprechenden Verbindungen. Diese Metaboliten können bei der Herkunftsbestimmung potentiell relevant sein. Nach der erfolgreichen Identifizierung von Metaboliten mithilfe der Fraktionierung des Walnussextraktes und Verifizierung mittels *spike-in*-Experimenten, wurden die authentischen Walnussproben zur Erstellung eines Modells zur Herkunftsbestimmung gemessen.

6.1.4. Hauptkomponentenanalyse mittels Extraktionsmethode A

Durch die Verwendung eines Gemisches aus Methanol- d_4 und Acetonitril- d_3 (1:1, Methode A) als Extraktionsmittel wurden $^1\text{H-NMR}$ -Spektren erhalten, die sowohl Signale der unpolaren Fettsäuren als auch der polaren Kohlenhydrate aufwiesen. Es wurde zunächst diese Extraktionsmethode verwendet, um die Ergebnisse anschließend mit der polareren Extraktion zu vergleichen. Die Extraktion mittels Methode A und Messung der 235 authentischen Walnussproben erfolgte als Triplikat mit der 1D- $^1\text{H-NOESY}$ Pulssequenz mit Wasserunterdrückung. Die Triplikate wurden gemessen, um Fehler bei der Probenvorbereitung auszuschließen. Es wurde eine automatische Basis- und eine manuelle Phasenkorrektur durchgeführt. Die Kalibrierung erfolgte auf OMS als Referenz. Die Visualisierung wurde zunächst mit der Software Amix durchgeführt, wobei 183 *Buckets* manuell gewählt wurden. Die anschließende Darstellung der Ergebnisse der PCA erfolgte jeweils mit der Software Origin. Der dreidimensionale PCA *Score-Plot* der gesamten Walnussproben und die Verteilung der Proben auf verschiedene Länder sind in Abbildung 29 dargestellt.

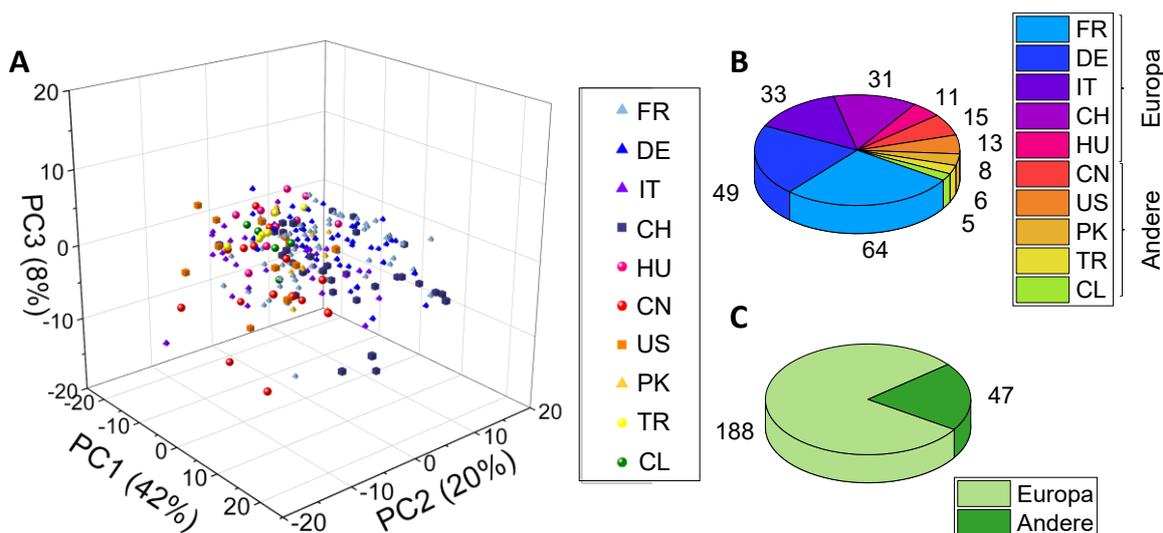


Abbildung 29: **A:** PCA *Score-Plot* der gesamten authentischen Walnussproben aus insgesamt zehn verschiedenen Ländern. CH: Schweiz, CL: Chile, CN: China, DE: Deutschland, FR: Frankreich, HU: Ungarn, IT: Italien, PK: Pakistan, TR: Türkei, US: USA. Die verwendeten 183 *Buckets* können im Anhang (Abschnitt 8.7.1) eingesehen werden. Erklärte Varianz: PC1: 42%, PC2: 20%, PC3: 8%. **B:** Verteilung der Proben nach Ländern. Die Gruppen mit der höchsten Probenanzahl sind Frankreich, Deutschland, Italien und Schweiz. **C:** Verteilung der Proben nach europäischen und nicht-europäischen Ländern (Andere). Der Probengruppe Europa wurden die Länder FR, DE, IT, CH und HU zugeordnet.

Die einzelnen Probengruppen zeigen eine starke Überlappung der Cluster (**A**). Innerhalb einer Gruppe streuen die Proben über einen breiten Bereich. Die Länder mit der größten Probenanzahl sind Frankreich, Deutschland, Italien und Schweiz (**B**). Zu den Probengruppen mit einer geringen Anzahl an Proben gehören Pakistan, Türkei und Chile. Diese Gruppen können einzeln aufgrund der niedrigen Probenanzahl nicht für die statistische Auswertung

Ergebnisse und Diskussion

herangezogen werden. Eine Verwendung ist je nach Fragestellung jedoch möglich, wie beispielsweise bei der Unterscheidung von europäischen und nicht-europäischen Ländern (Andere) (C). Um Ausreißer zu identifizieren, wurden die manuell gewählten 183 *Buckets* verwendet und Hauptkomponentenanalysen der einzelnen Länder durchgeführt, bei der die Triplikate auf deren Streuung im *Score-Plot* hin untersucht wurden. In Abbildung 30 ist die PCA der einzelnen Triplikate der Probengruppe China exemplarisch für die Untersuchung von Ausreißern innerhalb einer Probengruppe dargestellt.

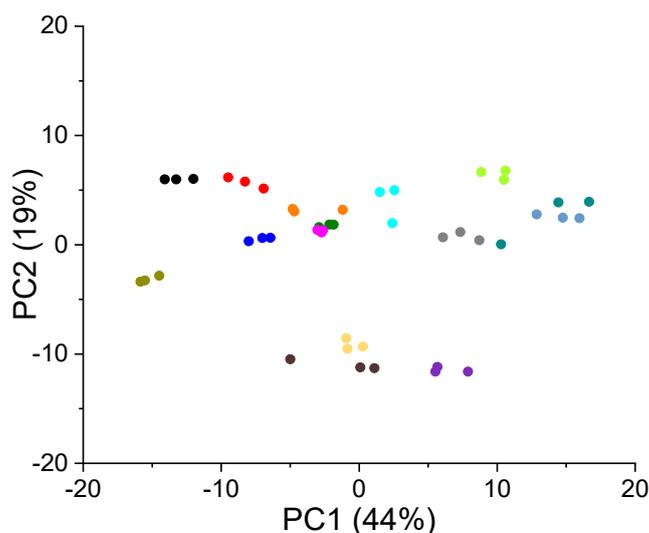


Abbildung 30: Zweidimensionale Darstellung der PCA der Probengruppe China mit fünfzehn unterschiedlich eingefärbten Proben, bei der 183 *Buckets* verwendet wurden. Die *Buckets* können im Anhang (Abschnitt 8.7.1) eingesehen werden. Die Einzelmessungen der Proben liegen jeweils bei ähnlichen Koordinaten vor und es konnten keine Ausreißer beobachtet werden. Erklärte Varianz: PC1: 44%, PC2: 19%.

Die Triplikate der fünfzehn chinesischen Proben sind jeweils in der selben Farbe dargestellt. Sie liegen bei ähnlichen Koordinaten vor und es wurde kein Ausreißer beobachtet. Dieser Vorgang wurde ebenfalls für die anderen Probengruppen wiederholt, wobei ebenfalls keine Ausreißer beobachtet wurden. Zur übersichtlicheren Darstellung wurden für die folgenden Hauptkomponentenanalysen lediglich Einzelmessungen betrachtet. Hierbei wurde je die erste Messung der Triplikate verwendet.

Im Folgenden wurde der Einfluss von Sorten untersucht. Insgesamt ist die Sorte bei 174 der 235 Proben bekannt. Die am häufigsten vorkommenden Sorten im Datensatz sind Lara (47), Franquette (23), Chandler (20), Tulare (13) und Fernor (11). Die Sorte Lara ist auf die Länder FR (30), DE (2), CH (2) und IT (13) verteilt. Die Proben der Sorte Franquette sind wie folgt auf die Länder verteilt: FR (19), CH (2), DE (1) und USA (1). Die Sorte Chandler ist auf die Länder IT (11), USA (3), CH (2), CN (2), CL (1) und TR (1) verteilt. Proben der Sorte Tulare liegen aus Italien (9), China (2) und den USA (2) vor. Walnussproben der Sorte Fernor stammen aus

Ergebnisse und Diskussion

FR (8), CH (2) und TR (1). Zur Überprüfung des Sorteneinflusses wurde die geographische Herkunft der ausgewählten Proben auf Frankreich eingegrenzt. Französische Proben wurden als geeignet angesehen, da die größte Anzahl an Proben mit bekannten Sorten, wie Lara, Franquette und Fernor, aus diesem Land stammen.

Die zuvor 183 manuell gewählten *Buckets* wurden für die entsprechende PCA verwendet. Der PCA Score-Plot mit den französischen Walnussproben ist in Abbildung 31 dargestellt.

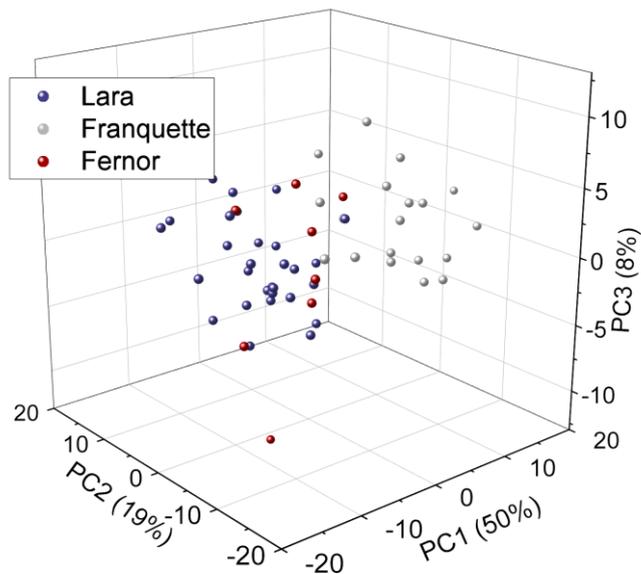


Abbildung 31: PCA Score-Plot der französischen Proben der Sorten Lara, Franquette und Fernor. Es sind Cluster der einzelnen Sorten zu erkennen, wobei Überlappungen auftreten. Die Proben der Sorte Fernor weisen eine hohe Varianz innerhalb der Probengruppe auf. Auf Grund der PCA kann auf einen Sorteneinfluss geschlossen werden. Erklärte Varianz: PC1: 50%, PC2: 19%, PC3: 8%.

Für die PCA wurden Proben der Sorte Lara (30), Franquette (19) und Fernor (8) aus Frankreich verwendet. Im PCA Score-Plot zeigen die Probengruppen der drei Sorten überlappende Cluster, wobei die Varianz innerhalb einer Gruppe groß ist. Trotzdem kann auf einen Sorteneinfluss in der PCA geschlossen werden, welcher in den Modellen zur Herkunftsbestimmung mit einfließt. Im Folgenden wurden insgesamt neun verschiedene zwei-Klassen-Modelle erstellt, da binäre Systeme übersichtlicher und schneller zu analysieren sind als Mehrklassen-Modelle. Im Folgenden werden zunächst die Ergebnisse von insgesamt fünf verschiedenen Klassifizierungen (DE/CN, DE/FR, DE/IT, CH/US, EU/Andere) dargestellt.

Unterscheidung von Walnussproben aus Deutschland und China

Es wurde eine Hauptkomponentenanalyse mit 49 deutschen und 15 chinesischen Proben durchgeführt. Hierfür wurden die zuvor 183 manuell gewählten *Buckets* verwendet. Der PCA Score-Plot der Walnussproben aus China und Deutschland ist sowohl zwei- als auch dreidimensional in Abbildung 32 dargestellt.

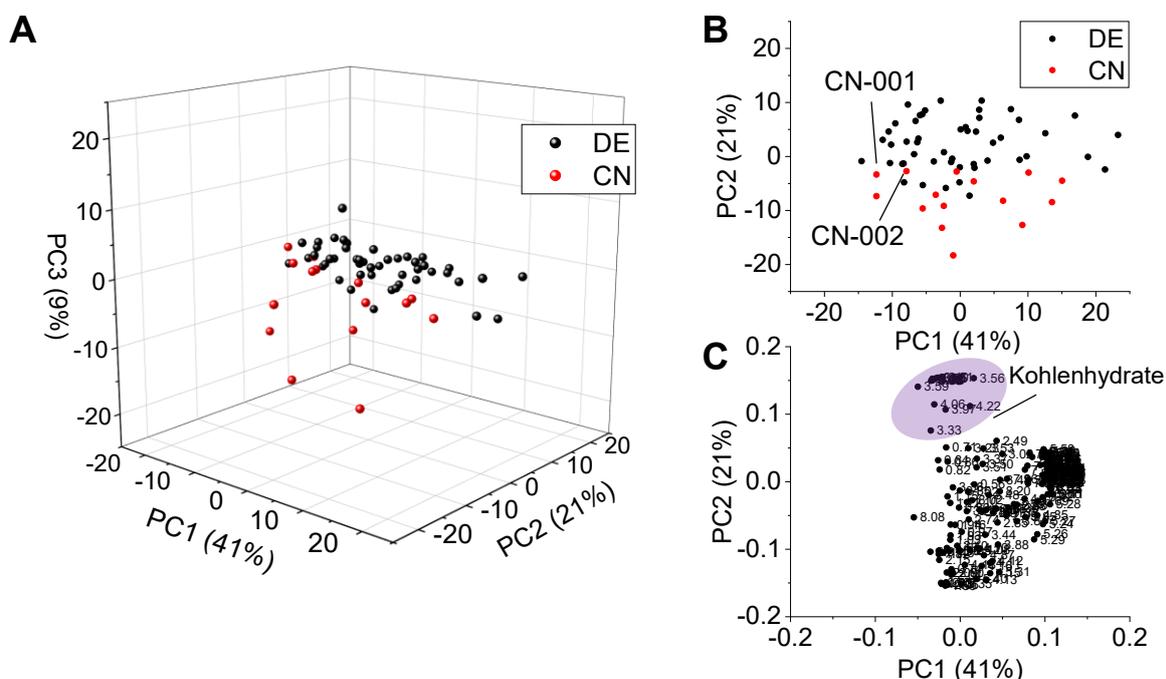


Abbildung 32: **A:** PCA Score-Plot der chinesischen (rot) und deutschen (schwarz) Proben. Beide Probengruppen bilden Cluster, die einen gering überlappenden Bereich aufweisen. Erklärte Varianz: PC1: 41%, PC2: 21%, PC3: 9%. **B:** Zweidimensionale Darstellung der PCA von Proben aus China und Deutschland. Die markierten Proben CN-001 und CN-002 liegen im überlappenden Bereich der beiden Probengruppen. **C:** Darstellung der zugehörigen *Loadings*. Die *Buckets* mit den höchsten positiven Werten entlang der PC2 sind markiert und entsprechen im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum dem Bereich, in dem Signale von Kohlenhydraten auftreten.

Jeder Punkt in der PCA entspricht einer Probe aus China (rot) oder Deutschland (schwarz). Es sind zwei Cluster zu erkennen, die gering überlappen (**A**). In der zweidimensionalen Darstellung der PCA sind die Proben CN-001 und CN-002 markiert, da diese im überlappenden Bereich des Clusters der deutschen Proben liegen (**B**). Die entsprechenden *Loadings* sind ebenfalls gezeigt (**C**), wobei eine Trennung der Probengruppen entlang der zweiten Hauptkomponente durch Variablen im Bereich der Kohlenhydrate zu erkennen ist. Diese zeichnen sich durch die hohen positiven *Loading*-Werte aus und korrelieren mit den *Score*-Werten der Proben aus Deutschland. *Loadings* mit einem Wert von unter 3.00 ppm mit hohen negativen Werten entlang der zweiten PC wurden den Fettsäuren zugeordnet. Zu den in Walnüssen vorkommenden Fettsäuren zählen u.a. Linolsäure, Linolensäure und Ölsäure.^[39] Diese *Loadings* korrelieren mit den *Score*-Werten der chinesischen Proben. Anschließend wurde zur Identifizierung von relevanten *Buckets* zur Unterscheidung deutscher und

Ergebnisse und Diskussion

chinesischer Proben der Kruskal-Wallis Test durchgeführt, bei dem insgesamt 44 der 183 verwendeten *Buckets* mit $p < 0.00027322$ als relevant bezeichnet wurden. Die entsprechenden *Buckets* können den Kohlenhydraten und den Fettsäuren zugeordnet werden. Für die Modellerstellung zur geographischen Herkunftsanalyse zur Unterscheidung von Proben aus Deutschland und China wurde eine wiederholte verschachtelte Kreuzvalidierung mit einem linearen *support vector machine* Algorithmus durchgeführt, deren Vorgehensweise in Abbildung 33 dargestellt ist.

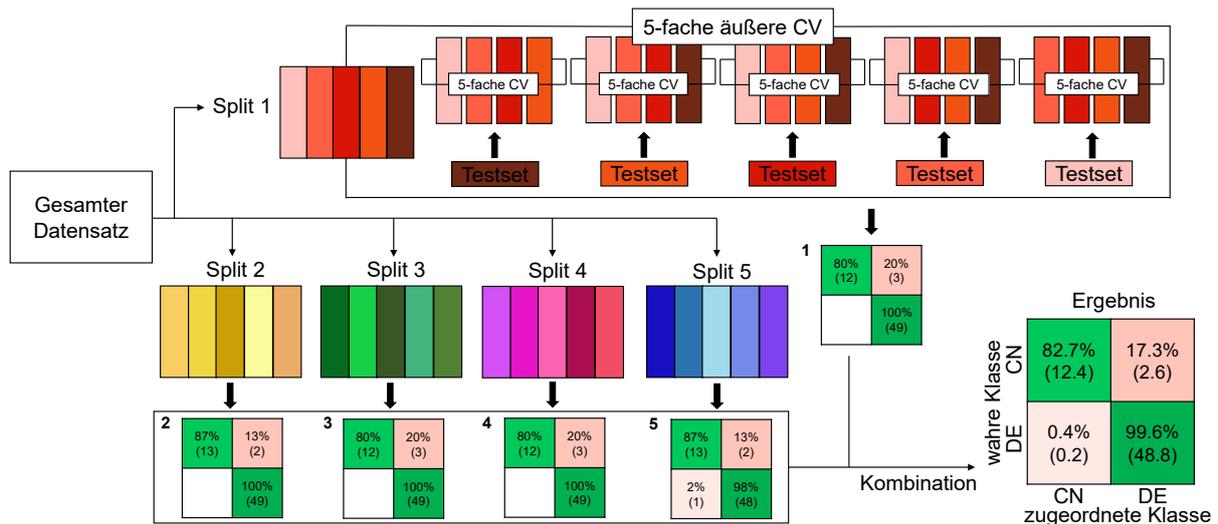


Abbildung 33: Durchführung einer wiederholten verschachtelten Kreuzvalidierung (CV) am Beispiel der Modellerstellung für die Zuordnung von deutschen und chinesischen Walnussproben. Der gesamte Datensatz wurde zufällig in fünf Teile unterteilt. Das Training-Set wurde aus der Kombination vier dieser Teile erstellt und das Modell in einer 5-fachen inneren CV trainiert. Das Modell wurde anschließend anhand des übrig gebliebenen Teils als Test-Set validiert. Der Prozess wurde fünfmal mit neuen Kombinationen der Teile wiederholt (5-fache äußere CV). Das Ergebnis des ersten Durchlaufs mit dem Split 1 wurde als Konfusionsmatrix 1 dargestellt. Der gesamte Prozess der verschachtelten CV wurde mit unterschiedlich neu gemischten Splits (Split 2 – 5) wiederholt, sodass fünf verschiedene Konfusionsmatrices (1 – 5) erhalten wurden, die zu einer kombiniert wurden. In der finalen Konfusionsmatrix sind die Ergebnisse der Zuordnungen als Zahlen und die Genauigkeiten in Prozent angegeben. Die Genauigkeit des erhaltenen Modells (CN/DE) betrug 95.9% ($\pm 0.8\%$).

Für die verschachtelte Kreuzvalidierung wurde der gesamte Datensatz zunächst zufällig in fünf Teile eingeteilt. Das Training-Set wurde aus vier kombinierten Teilen zusammengesetzt und der außen vorgelassene Teil stellte das Test-Set dar. Das Modell wurde in einer 5-fachen inneren Kreuzvalidierung trainiert und mit dem Test-Set validiert. Dieser Prozess wurde insgesamt fünfmal mit unterschiedlichen Kombinationen der Teile (5-fache äußere Kreuzvalidierung) durchgeführt. Das Ergebnis der verschachtelten Kreuzvalidierung wurde in einer Konfusionsmatrix (1) dargestellt. Der gesamte Prozess wurde anschließend noch viermal mit zufällig neu erstellten Splits (Split 2 – 5) wiederholt. Hierbei wurden zusätzlich vier weitere Konfusionsmatrices erhalten (2 – 5). Die insgesamt fünf Matrices wurden zu einer Konfusionsmatrix kombiniert, um das Ergebnis übersichtlich darzustellen. Dabei sind die Zuordnungen als Zahlen und die Genauigkeiten in Prozent angegeben. Die Genauigkeit des Modells wird mit der entsprechenden Standardabweichung angegeben. Als Klassifizierungsverfahren wurde eine lineare *support vector machine* verwendet. Die Klassifizierungsgenauigkeit des

Modells betrug 95.9% ($\pm 0.8\%$). Deutsche Walnussproben wurden mit einer hohen Genauigkeit von 99.6% und chinesische mit ca. 83% richtig zugeordnet. Die niedrigere Zuordnungsgenauigkeit der Proben aus China ist hauptsächlich auf falsche Klassifizierungen der chinesischen Proben CN-001 und CN-002 zurückzuführen, die in den gesamten Splits jeweils Deutschland zugeordnet wurden. Diese Proben lagen in der PCA im überlappenden Bereich des Clusters der deutschen Proben. Als nächstes wurde untersucht, ob deutsche Walnüsse auch von französischen unterschieden werden können.

Unterscheidung von Walnussproben aus Deutschland und Frankreich

Anschließend erfolgte analog die Untersuchung der deutschen und französischen Walnussproben. Für die Hauptkomponentenanalyse wurden die zuvor manuell 183 ausgewählten *Buckets* verwendet. In der PCA in Abbildung 34 entspricht jeder Punkt je einer Probe aus Frankreich (blau) oder Deutschland (schwarz).

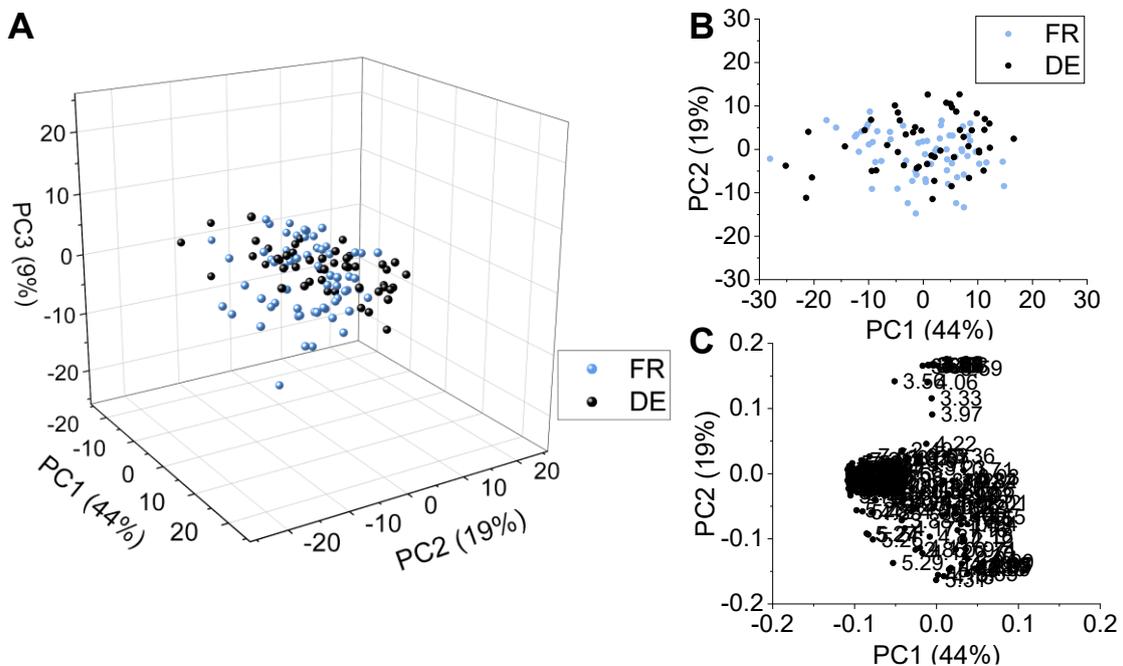


Abbildung 34: **A:** Dreidimensionaler PCA Score-Plot der Proben aus Deutschland (schwarz) und Frankreich (blau). Die Cluster der Probengruppen überlappen und es ist keine Trennung zu erkennen. Erklärte Varianz: PC1: 44%, PC2: 19%, PC3: 9%. **B:** Zweidimensionale Darstellung der PCA mit überlappenden Clustern der Probengruppen. **C:** Entsprechender *Loading*-Plot mit den 183 verwendeten *Buckets*.

Für die PCA wurden 64 Proben aus Frankreich und 49 aus Deutschland verwendet. In dem dreidimensionalen PCA Score-Plot liegen die zwei Cluster der beiden Probengruppen (DE/FR) überlagert vor (**A**). In der zweidimensionalen Darstellung der PCA ist keine Trennung der Probengruppen zu erkennen (**B**). Auch bei der Betrachtung des PCA Score-Plots mit Verwendung der PC1 und PC3 konnte lediglich ein stark überlappenden Bereich der Cluster der beiden Probengruppen beobachtet werden. Außerdem ist der *Loading*-Plot (**C**) ist

Ergebnisse und Diskussion

dargestellt, wobei eine Korrelation mit den Score-Werten der Probengruppen durch die Überlagerung der Cluster erschwert und kein eindeutiger Trend aufgrund des überlappenden Bereichs der Cluster zu erkennen ist. Anschließend erfolgte die Klassifizierung mit dem linearen *support vector machine* Algorithmus und der wiederholten verschachtelten Kreuzvalidierung. Das Ergebnis der Zuordnungen von deutschen und französischen Walnussproben ist als Konfusionsmatrix in Abbildung 35 dargestellt.

wahre Klasse	FR	91.9% (58.8)	8.1% (5.2)
	DE	27.8% (13.6)	72.2% (35.4)
		FR	DE
		zugeordnete Klasse	

Abbildung 35: Konfusionsmatrix der Klassifizierung von Walnussproben aus Deutschland und Frankreich. Diese resultiert aus der Kombination von fünf Matrices, die durch die wiederholte verschachtelte Kreuzvalidierung erhalten wurden. Die Ergebnisse der Zuordnungen sind als Zahlen und die Genauigkeiten in Prozent angegeben. Genauigkeit: 83.4% ($\pm 2.0\%$).

In der Konfusionsmatrix sind die Zuordnungen als Zahlen und die Genauigkeiten in Prozent angegeben. Das Modell wies eine Genauigkeit von 83.4% ($\pm 2.0\%$) auf. Die französischen Proben wurden mit einer Genauigkeit von ca. 92% und die deutschen mit ca. 72% richtig zugeordnet. Es wurden neun der 16 deutschen Proben aus Baden-Württemberg mindestens einmal falsch klassifiziert, was durch die geographische Nähe zu Frankreich erklärt werden kann. Insgesamt wurden ca. 28% der 49 deutschen Proben falsch zugeordnet. Es wurde ein Kruskal-Wallis Test durchgeführt, bei dem insgesamt neun der insgesamt 183 verwendeten *Buckets* mit $p < 0.00027322$ als relevant bezeichnet wurden. In Tabelle 4 sind die neun relevanten *Buckets* mit den jeweiligen Bonferroni-korrigierten p -Werten dargestellt.

Tabelle 4: Signifikante *Buckets* mit $p < 0.00027322$ für die Unterscheidung von deutschen und französischen Proben unter Angabe der entsprechenden Bonferroni-korrigierten p -Werte.

<i>Bucket</i>	p -Wert	<i>Bucket</i>	p -Wert	<i>Bucket</i>	p -Wert
1.001	3.80E-05	1.449	1.19E-05	3.269	9.33E-06
1.052	1.36E-05	1.956	3.61E-05	3.442	2.09E-04
1.430	2.34E-06	2.154	2.56E-04	3.877	1.82E-04

Von den neun relevanten *Buckets* liegen sechs im Bereich der Fettsäuresignale und drei weisen Signale im Bereich der Kohlenhydrate auf. Im Folgenden wurde die Unterscheidung zwischen Walnussproben aus Deutschland und Italien untersucht.

Unterscheidung von Walnussproben aus Deutschland und Italien

Anschließend erfolgte die Untersuchung der deutschen und italienischen Walnussproben. In Abbildung 36 ist die zwei- und dreidimensionale Darstellung der PCA mit entsprechendem *Loading*-Plot gezeigt.

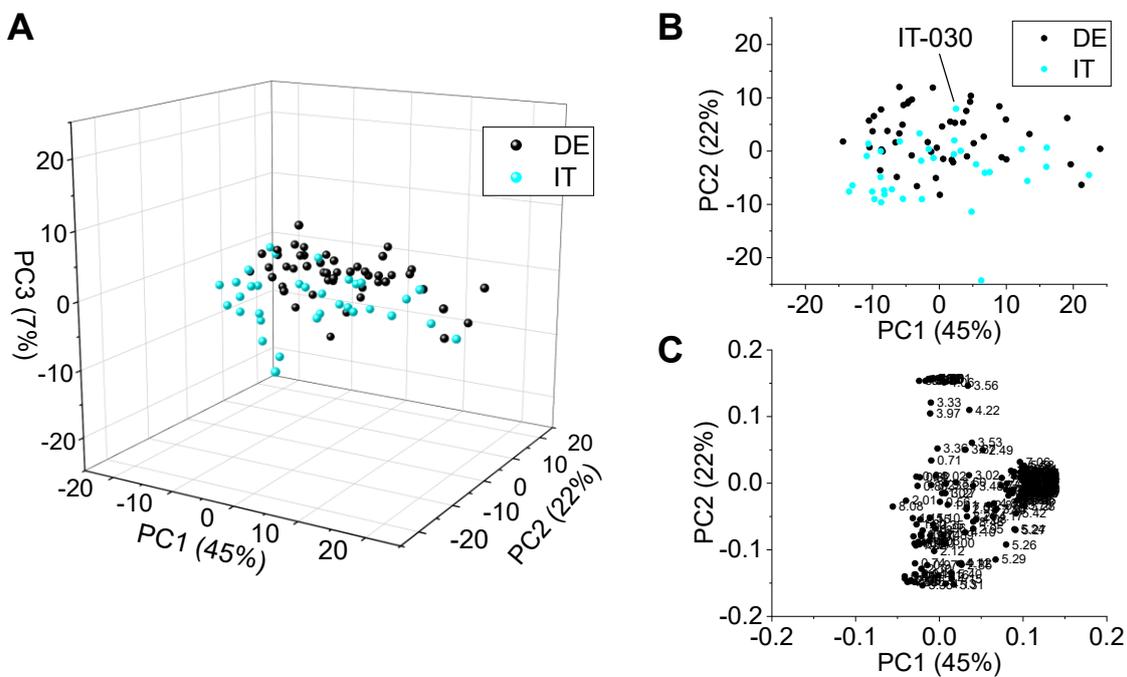


Abbildung 36: **A:** Dreidimensionale Darstellung der PCA mit Proben aus Deutschland (schwarz) und Italien (türkis), bei der zwei überlappende Cluster zu erkennen sind. Erklärte Varianz: PC1: 45%, PC2: 22%, PC3: 7%. **B:** Zweidimensionale Darstellung der PCA mit überlappenden Clustern der beiden Probengruppen. Die markierte Probe IT-030 liegt am nächsten zum Cluster der deutschen Proben. **C:** Zugehöriger *Loading*-Plot mit den 183 verwendeten *Buckets*.

Die 49 Walnussproben aus Deutschland (schwarz) und 33 aus Italien (türkis) sind als einzelne Punkte dargestellt und zeigen jeweils überlappende Cluster (**A**). In der zweidimensionalen Darstellung (**B**) mit dem zugehörigen *Loading*-Plot (**C**) ist zu erkennen, dass eine Gruppe von Variablen mit hohen positiven Werten entlang der zweiten Hauptkomponente mit den *Score*-Werten der deutschen Proben korrelieren. Die *Buckets* liegen im Bereich von 3.32 bis 5.38 ppm und wurden den Signalen im Bereich der Kohlenhydrate zugeordnet. Die Probe IT-030 wurde als Beispiel markiert, da diese am nächsten im Bereich der deutschen Proben liegt und potentiell anfällig für eine falsche Klassifizierung ist. Die Klassifizierung erfolgte mit der linearen SVM und einer wiederholten verschachtelten Kreuzvalidierung.

Ergebnisse und Diskussion

Die bei der Klassifizierung der deutschen und italienischen Walnussproben erhaltene Konfusionsmatrix ist in Abbildung 37 dargestellt.

wahre Klasse	DE	89.8% (44.0)	10.2% (5.0)
	IT	17.6% (5.8)	82.4% (27.2)
		DE	IT
		zugeordnete Klasse	

Abbildung 37: Konfusionsmatrix der Zuordnung von italienischen und deutschen Walnussproben. Die Matrix wurde durch die Kombination der aus der wiederholten verschachtelten Kreuzvalidierung resultierenden fünf Matrices erhalten. Die Ergebnisse der Zuordnungen sind als Zahlen und die Genauigkeiten in Prozent angegeben. Genauigkeit: 86.8% ($\pm 0.9\%$).

In der Konfusionsmatrix sind die Zuordnungen als Zahlen und die Genauigkeiten in Prozent angegeben. Die Genauigkeit des Modells zur Klassifizierung von Walnussproben aus Deutschland und Italien betrug 86.8% ($\pm 0.9\%$). Deutsche Proben wurden mit einer hohen Genauigkeit von ca. 90% richtig zugeordnet. Mit einer niedrigeren Genauigkeit von ca. 82% wurden italienische Proben richtig zugeordnet. Beispielsweise wurde in allen fünf Splits die Probe IT-030 falsch zugeordnet, die bereits in der PCA am nächsten zum Cluster der deutschen Probengruppe lag. Insgesamt wurde jedoch ein Modell mit guten Zuordnungsgenauigkeiten erhalten. Anschließend wurde die Unterscheidung von Proben aus der Schweiz und den USA untersucht.

Unterscheidung von Walnussproben aus der Schweiz und den USA

Es wurden 31 Proben aus der Schweiz und dreizehn Proben aus den USA untersucht. Die PCA, bei der die zuvor manuell gewählten 183 *Buckets* verwendet wurden, ist sowohl zwei- als auch dreidimensional mit entsprechendem *Loading*-Plot in Abbildung 38 dargestellt.

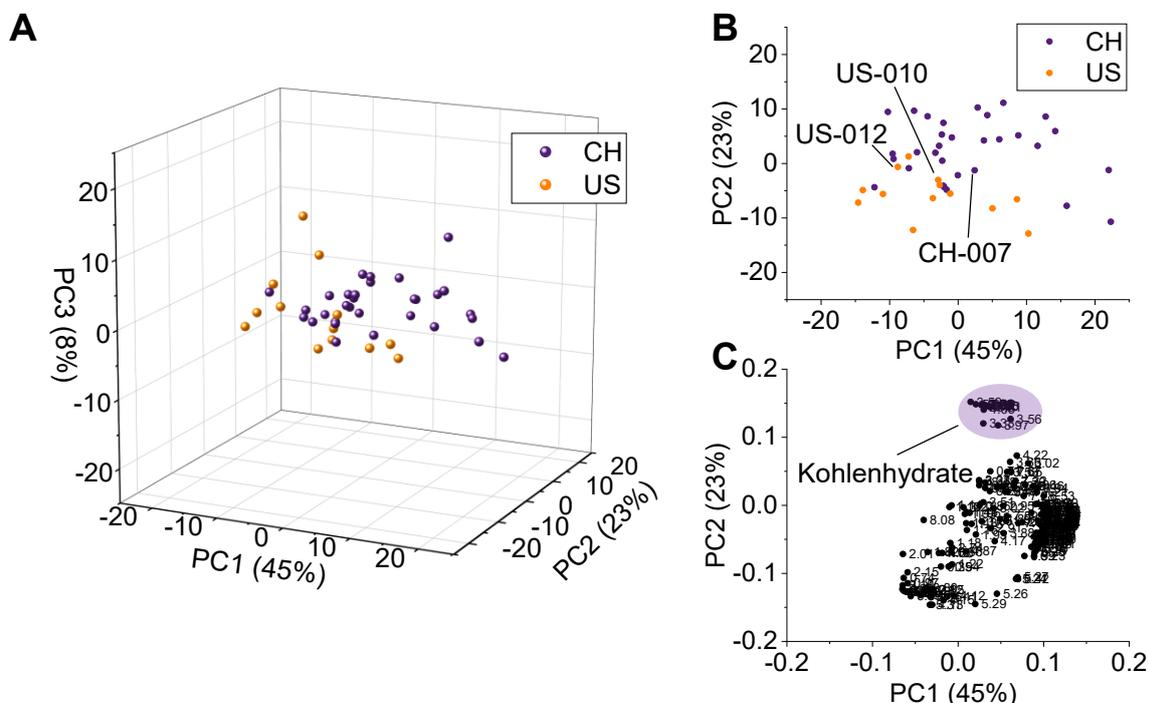


Abbildung 38: **A:** Dreidimensionaler PCA Score-Plot der Probengruppen Schweiz (orange) und USA (violett). Erklärte Varianz: PC1: 45%, PC2: 23%, PC3: 8%. **B:** Zweidimensionale Darstellung der PCA. Die markierten Proben aus den USA (US-010, US-012) und der Schweiz (CH-007) liegen im Cluster der jeweils anderen Gruppe. **C:** Zugehöriger *Loading*-Plot mit den 183 verwendeten *Buckets*. Die *Buckets* mit den höchsten positiven Werten entlang der PC2 sind markiert und entsprechen im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum dem Bereich, in dem Signale von Kohlenhydraten auftreten.

In der PCA repräsentiert ein Punkt eine Einzelmessung einer Probe aus den USA (violett) oder der Schweiz (orange). Es sind zwei Cluster der Probengruppen zu erkennen, die einen gering überlappenden Bereich aufweisen (**A**). Die Trennung der Cluster erfolgt entlang der zweiten Hauptkomponente, die eine erklärte Varianz von 23% aufweist. Ausgewählte Proben aus der Schweiz und den USA, die im überlappenden Bereich des Clusters der anderen Probengruppe liegen, sind in der zweidimensionalen Darstellung der PCA exemplarisch markiert (**B**). Im *Loading*-Plot können Variablen mit hohen positiven Werten entlang der zweiten Hauptkomponente hauptsächlich Signalen im Bereich der Kohlenhydrate zugeordnet werden (**C**). Diese korrelieren mit den *Score*-Werten der Proben aus der Schweiz. *Loadings* mit hohen negativen Werten entlang PC1 sowie PC2 können hauptsächlich den Fettsäuren zugeordnet werden und korrelieren mit den *Score*-Werten der Proben aus den USA. Für die Klassifizierung der Walnussproben wurde eine lineare SVM mit wiederholter verschachtelter

Ergebnisse und Diskussion

Kreuzvalidierung angewendet. Das Ergebnis ist als Konfusionsmatrix in Abbildung 39 dargestellt.

wahre Klasse	CH	93.5% (29.0)	6.5% (2.0)
	US	26.2% (3.4)	73.8% (9.6)
		CH	US
		zugeordnete Klasse	

Abbildung 39: Ergebnis der Klassifizierung von Walnussproben aus den USA und der Schweiz. Die Konfusionsmatrix zeigt das kombinierte Ergebnis aus den fünf Matrices, die bei der verschachtelten Kreuzvalidierung erhalten wurden. Die Ergebnisse der Zuordnungen sind als Zahlen und die Genauigkeiten in Prozent angegeben. Genauigkeit: 87.7% ($\pm 2.3\%$).

Die Zuordnungen der Klassifizierung sind als Zahlen und die Genauigkeiten in Prozent angegeben. Das Modell wies eine Zuordnungsgenauigkeit von 87.7% ($\pm 2.3\%$) auf. Die Proben aus der Schweiz wurden mit einer Genauigkeit von ca. 94% richtig zugeordnet. Eine falsche Zuordnung fand beispielsweise in den gesamten fünf Splits bei einer Probe (CH-007) statt. Mit einer geringeren Genauigkeit von ca. 74% wurden Proben aus den USA richtig zugeordnet. Hierbei kam es beispielsweise bei den Proben US-010 und US-012 in jedem der fünf Splits zur falschen Klassifizierung. Insgesamt wurde jedoch ein Modell mit einer guten Zuordnungsgenauigkeit erhalten, welches die Unterscheidung von Proben aus den USA und der Schweiz ermöglicht. Anschließend wurde die Unterscheidung von Walnussproben aus europäischen und nicht-europäischen Ländern untersucht.

Unterscheidung von Walnussproben aus europäischen und anderen Ländern

Bei der Unterscheidung von Proben aus europäischen und anderen Ländern wurden die gesamten akquirierten Walnussproben verwendet. Hierzu zählten 188 Proben aus europäischen und 47 aus nicht-europäischen Ländern. Die zwei- sowie dreidimensionale Darstellung der PCA mit entsprechendem *Loading*-Plot ist in Abbildung 40 dargestellt.

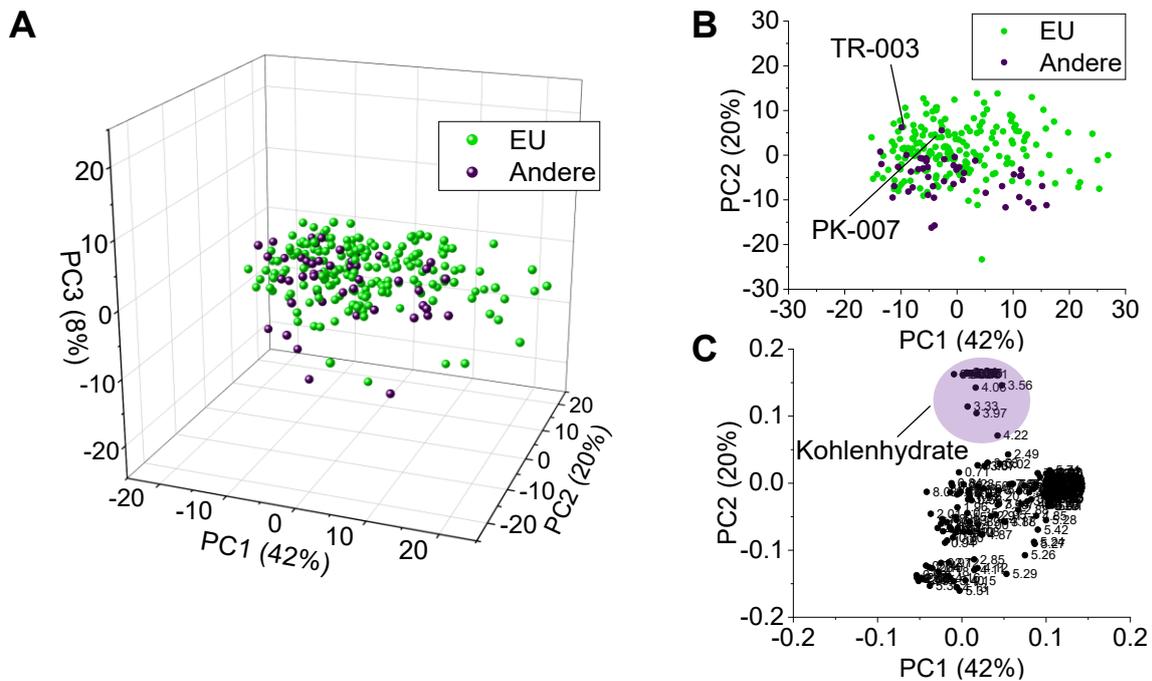


Abbildung 40: **A:** Dreidimensionale Darstellung der PCA der Proben aus europäischen (grün) und anderen Ländern (lila). Erklärte Varianz: PC1: 42%, PC2: 20%, PC3: 8%. **B:** Zweidimensionale Darstellung der PCA. Die beiden Probengruppen liegen überlagert vor und zwei potentiell zur falschen Klassifizierung anfällige Proben (TR-003, PK-007) wurden markiert. **C:** *Loading*-Plot mit den 183 verwendeten *Buckets*. Die *Buckets* mit den höchsten positiven Werten entlang der PC2 sind markiert und entsprechen im ¹H-NMR-Spektrum dem Bereich, in dem Signale von Kohlenhydraten auftreten.

In der PCA repräsentiert jeder Punkt eine Probe aus einem europäischen (grün) oder einem nicht-europäischen (lila) Herkunftsland. Die Länder Frankreich, Deutschland, Italien, Ungarn und Schweiz wurden in die Probengruppe EU eingeordnet. Die restlichen Länder (Andere) umfassen China, USA, Pakistan, Chile und die Türkei, da die nicht-europäische Fläche dieses Landes überwiegt. Die beiden Probengruppen (EU/Andere) liegen ineinander und es wurde keine deutliche Trennung beobachtet (**A**). Beim Vergleich der zweidimensionalen Darstellung der PCA (**B**) mit den entsprechenden *Loadings* (**C**) ist zu erkennen, dass Variablen mit hohen positiven Werten entlang der zweiten Hauptkomponente, die Signalen im Bereich der Kohlenhydraten (u.a. Saccharose (**6**)) zugeordnet werden können, mit den europäischen Proben korrelieren.

Ergebnisse und Diskussion

Die Klassifizierung der Proben erfolgte mit der linearen SVM und einer wiederholten verschachtelten Kreuzvalidierung. Das Ergebnis ist in Abbildung 41 dargestellt.

wahre Klasse	Andere	73.2% (34.4)	26.8% (12.6)
	EU	16.9% (31.8)	83.1% (156.2)
		Andere	EU
		zugeordnete Klasse	

Abbildung 41: Konfusionsmatrix der Klassifizierung von europäischen und nicht-europäischen Walnussproben. Diese resultiert aus der Kombination der fünf Matrices, die bei der verschachtelten Kreuzvalidierung erhalten wurden. Die Ergebnisse der Zuordnungen sind als Zahlen und die Genauigkeiten in Prozent angegeben. Genauigkeit: 81.1% ($\pm 1.2\%$).

Die Zuordnungen der Klassifizierung sind als Zahlen und die Genauigkeiten in Prozent angegeben. Die Zuordnungsgenauigkeit des erhaltenen Modells betrug 81.1% ($\pm 1.2\%$). Es wurden ca. 83% der Proben aus europäischen Ländern richtig zugeordnet. Mit einer geringeren Genauigkeit von ca. 73% wurden nicht-europäische Proben richtig zugeordnet. Zu einer falschen Klassifizierung in jedem der fünf Splits kam es beispielsweise bei den Proben TR-003 und PK-007, die bereits in Abbildung 40 (B) markiert wurden. Die Zuordnungsgenauigkeit ist niedriger im Vergleich zu den zuvor gezeigten Modellen. Insbesondere bei der Probengruppe der nicht-europäischen Länder ist die Varianz der *Bucket*-Werte aufgrund der geographischen Breite hoch, was die Zuordnung erschwert. Trotzdem ist ein Trend bei der Zuordnung zu erkennen. Es wurden noch vier weitere Klassifizierungen (IT/FR, FR/CH, IT/CH, DE/CH) durchgeführt, die im Folgenden zusammengefasst werden.

Weitere Klassifizierungen (IT/FR, FR/CH, IT/CH, DE/CH)

Die Probengruppen mit den höchsten Probenanzahlen wurden für die Durchführung von vier weiteren Klassifizierungen verwendet. Die dreidimensionalen PCA Score-Plots sind in Abbildung 42 dargestellt. Die zweidimensionalen PCA Score-Plots der Klassifizierungen mit entsprechendem *Loading*-Plot können im Anhang (Abschnitt 8.7.3) eingesehen werden.

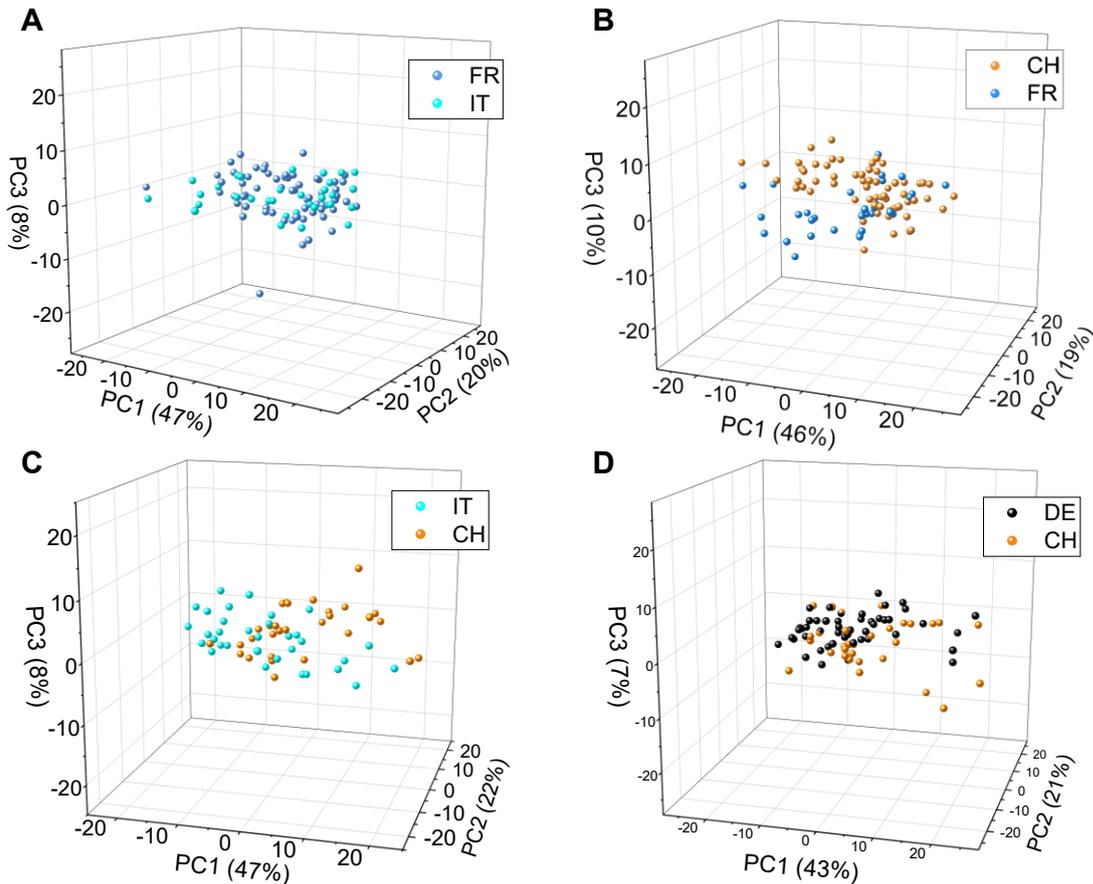


Abbildung 42: Dreidimensionale Darstellung der PCA Score-Plots von vier weiteren Klassifizierungen. **A:** PCA der Proben aus Frankreich (blau) und Italien (türkis). Erklärte Varianz: PC1: 47%, PC2: 20%, PC3: 8%. **B:** PCA der Proben aus der Schweiz (orange) und Frankreich (blau). Erklärte Varianz: PC1: 46%, PC2: 19%, PC3: 10%. **C:** PCA der Proben aus der Schweiz (orange) und Italien (türkis). Erklärte Varianz: PC1: 47%, PC2: 22%, PC3: 8%. **D:** PCA der Proben aus Deutschland (schwarz) und der Schweiz (orange). Erklärte Varianz: PC1: 43%, PC2: 21%, PC3: 7%.

In den PCA Score-Plots repräsentiert jeder Punkt eine Walnussprobe. Die französischen und italienischen Proben weisen eine hohe Varianz innerhalb der Probengruppe auf und zeigen überlappende Cluster (**A**). Im *Loading*-Plot wiesen *Buckets* einen hohen negativen Wert entlang PC2 auf, die den Signalen aus dem Kohlenhydraten-Bereich zugeordnet wurden und mit den Proben aus der Schweiz korrelierten. Die Probengruppen Schweiz und Frankreich zeigen ineinander liegende Cluster und es konnte keine Trennung beobachtet werden (**B**). Im PCA Score-Plot der Proben aus Italien und der Schweiz liegen zwei Cluster der

Ergebnisse und Diskussion

Probengruppen vor, die jedoch einen überlappenden Bereich zeigen (**C**). Hierbei konnte im *Loading*-Plot beobachtet werden, dass *Buckets* von Signalen aus dem Kohlenhydraten-Bereich mit hohen positiven Werten entlang PC2 mit den Proben aus der Schweiz korrelierten. Bei der Probengruppe Deutschland und Schweiz konnte im PCA Score-Plot keine Trennung der Probengruppen beobachtet werden (**D**). Anschließend wurden Klassifizierungen mittels der linearen SVM durchgeführt. In Abbildung 43 sind die durch wiederholte verschachtelte Kreuzvalidierung erhaltenen Konfusionsmatrices dargestellt.

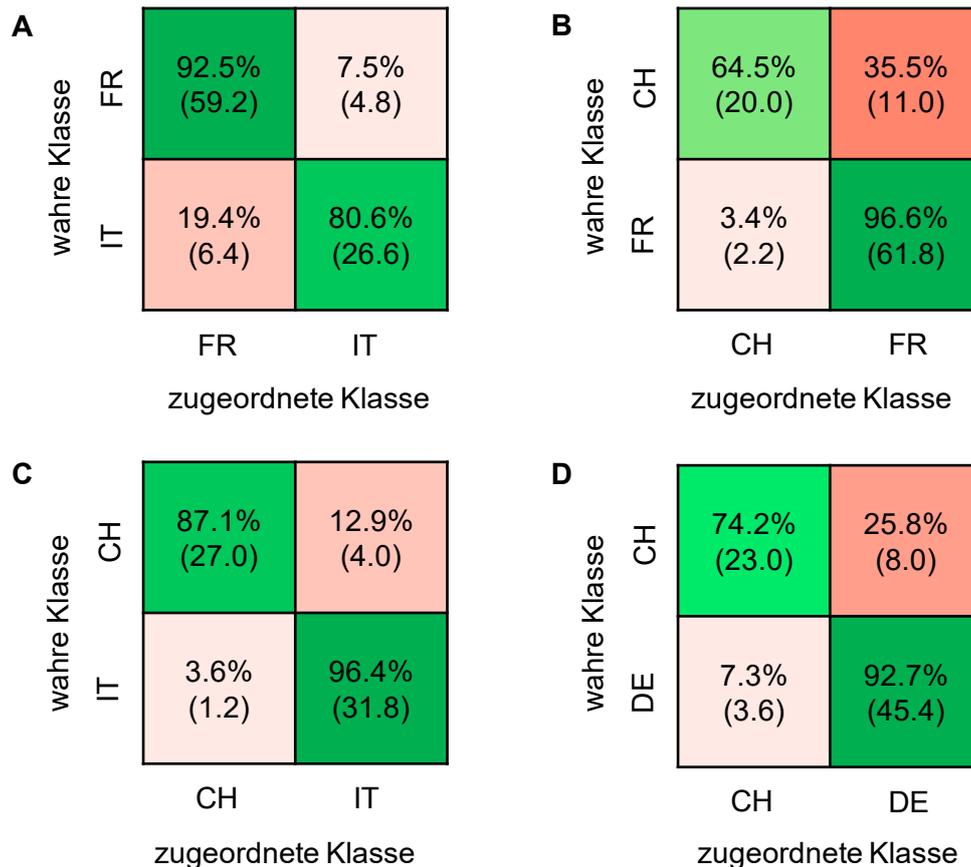


Abbildung 43: Konfusionsmatrices weiterer Klassifizierungen. Diese resultierten je aus der Kombination der fünf Matrices, die bei der verschachtelten Kreuzvalidierung erhalten wurden. Die Ergebnisse der Zuordnungen sind als Zahlen und die Genauigkeiten in Prozent angegeben. **A:** Klassifizierung von IT/FR. Genauigkeit: 88.5% ($\pm 1.5\%$). **B:** Klassifizierung von CH/FR. Genauigkeit: 86.1% ($\pm 1.2\%$). **C:** Klassifizierung von CH/IT. Genauigkeit: 91.9% ($\pm 1.5\%$). **D:** Klassifizierung von CH/DE. Genauigkeit: 85.5% ($\pm 0.6\%$).

Bei der Klassifizierung von italienischen und französischen Walnussproben wurde eine Genauigkeit von 88.5% ($\pm 1.5\%$) erhalten (**A**). Insgesamt wurden ca. 93% der französischen Proben richtig klassifiziert, während mit einer etwas geringeren Genauigkeit von ca. 81% italienische Proben korrekt zugeordnet wurden. Bei der Zuordnung von Proben aus Frankreich und der Schweiz wurde eine Genauigkeit von 86.1% ($\pm 1.2\%$) erhalten (**B**). Mit einer hohen Genauigkeit von ca. 97% wurden französische Proben richtig zugeordnet. Von den Proben aus der Schweiz wurden jedoch mit einer geringen Genauigkeit nur ca. 65% richtig zugeordnet.

Ergebnisse und Diskussion

Bei der Klassifizierung von Walnussproben aus Italien und der Schweiz wurde eine Genauigkeit von 91.9% ($\pm 1.5\%$) erhalten (**C**). Hierbei wurden italienische Proben mit einer hohen Genauigkeit von ca. 96% richtig zugeordnet, während Proben aus der Schweiz mit einer etwas geringeren Genauigkeit von ca. 87% richtig zugeordnet wurden. Bei der Zuordnung von Proben aus Deutschland und der Schweiz wurde eine Genauigkeit von 85.5% ($\pm 0.6\%$) erhalten (**D**). Die Zuordnung von deutschen Proben erfolgte mit einer hohen Genauigkeit von ca. 93%, wobei es bei einer Probe (DE-043) aus Baden-Württemberg in jedem der fünf Splits zur falschen Klassifizierung kam. Proben aus der Schweiz wurden mit einer geringeren Genauigkeit von ca. 74% richtig zugeordnet.

Insgesamt zeigten die neun zwei-Klassen-Modelle bei der Zuordnung hohe Genauigkeiten von 81.1% ($\pm 1.2\%$) bis 95.9% ($\pm 0.8\%$). Die Erstellung von Klassifizierungsmodellen wurde zum Vergleich anschließend erneut durchgeführt, jedoch mit Verwendung der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der polareren Extraktion. Hierbei wurden für die wiederholte verschachtelte Kreuzvalidierung identische Zusammensetzungen der einzelnen Trainings- und Test-Sets zur Vergleichbarkeit verwendet.

6.1.5. Hauptkomponentenanalyse mittels Extraktionsmethode B

Für die Hauptkomponentenanalyse wurden die authentischen Walnussproben als Triplikate mit Extraktionsmethode B (Methanol- d_4 /Phosphatpuffer (pH = 7)/Chloroform- d) extrahiert und die ^1H -NMR-Spektren gemessen. Hierbei wurde die 1D- ^1H -NOESY Pulssequenz mit Wasserunterdrückung verwendet. Die Triplikate wurden gemessen, um Fehler bei der Probenvorbereitung auszuschließen. Nach automatischer Basis- und manueller Phasenkorrektur wurde auf TSP- d_4 als Referenz kalibriert. Die ^1H -NMR-Spektren der Walnussproben wurden auf erste Auffälligkeiten hin untersucht und es wurde je eine Probe aus Italien (IT-029) und Deutschland (DE-007) beobachtet, die einen im Vergleich zu den anderen Proben der Gruppe hohen Glucosegehalt aufwiesen. Die beiden Proben wurden jedoch nicht aus dem Datensatz entfernt, da eine Variabilität bei biologischen Proben auftreten kann und somit nicht als Ausreißer gewertet wurden. Die gesamten authentischen Walnussproben wurden zunächst mit Hilfe der Software Amix visualisiert. Danach wurden 106 *Buckets* manuell gewählt und eine Hauptkomponentenanalyse durchgeführt, um einen ersten Überblick über die gesamten Daten zu erhalten. Der PCA Score-Plot der gesamten Walnussproben wurde mit der Software Origin dargestellt (Abbildung 44).

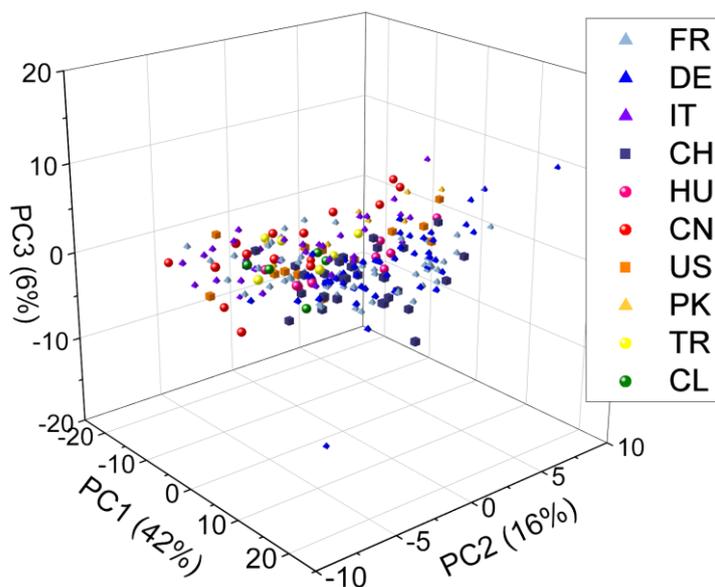


Abbildung 44: PCA Score-Plot der gesamten authentischen Walnussproben aus insgesamt zehn verschiedenen Ländern. CH: Schweiz, CL: Chile, CN: China, DE: Deutschland, FR: Frankreich, HU: Ungarn, IT: Italien, PK: Pakistan, TR: Türkei, US: USA. Die verwendeten 106 *Buckets* können im Anhang (Abschnitt 8.7.2) eingesehen werden. Erklärte Varianz: PC1: 42%, PC2: 16%, PC3: 6%.

Die einzelnen Cluster zeigen eine starke Überlappung mit den jeweils anderen Probengruppen. Des Weiteren zeigen die Proben innerhalb einer Gruppe eine hohe Varianz und streuen somit über einen breiten Bereich. Um Ausreißer zu identifizieren, wurden ebenfalls die manuell gewählten 106 *Buckets* verwendet und Hauptkomponentenanalysen der

Ergebnisse und Diskussion

einzelnen Länder durchgeführt, um die Triplikate zu untersuchen. Als exemplarisches Beispiel ist der PCA Score-Plot der Probengruppe China in Abbildung 45 dargestellt.

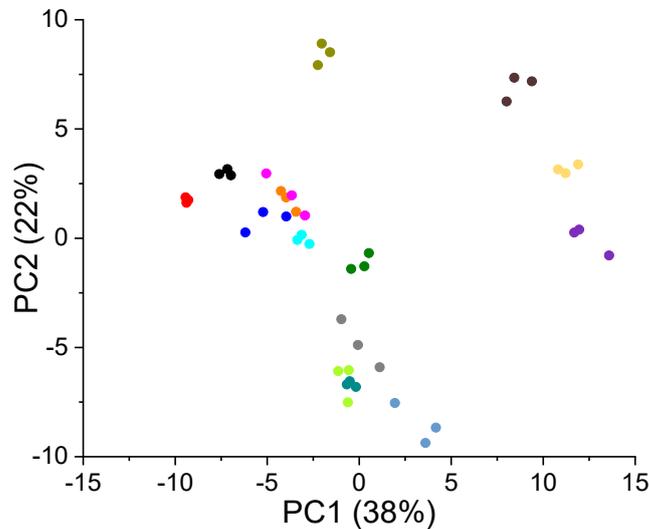


Abbildung 45: Zweidimensionale Darstellung der PCA der Probengruppe China mit fünfzehn unterschiedlich eingefärbten Proben bei der 106 *Buckets* verwendet wurden. Die *Buckets* können im Anhang (Abschnitt 8.7.2) eingesehen werden. Die Einzelmessungen der Proben liegen jeweils bei ähnlichen Koordinaten vor und es konnten keine Ausreißer beobachtet werden. Erklärte Varianz: PC1: 38%, PC2: 22%.

Jeder Punkt in Abbildung 45 stellt eine gemessene Probe dar. Die einzelnen Triplikate sind jeweils in unterschiedlichen Farben dargestellt und die drei Einzelmessungen einer Probe lagen bei jeweils ähnlichen Koordinaten vor. Es konnten sowohl in der PCA der chinesischen Proben als auch in der PCA der anderen Länder keine Ausreißer beobachtet werden. Zur übersichtlicheren Darstellung wurden für die folgenden Hauptkomponentenanalysen lediglich Einzelmessungen betrachtet. Hierbei wurde je die erste Messung der Triplikate verwendet. Anschließend wurde der Einfluss von Sorten anhand der französischen Walnussproben mit den drei Sorten Lara, Franquette und Fernor untersucht.

Ergebnisse und Diskussion

Die zuvor 106 manuell gewählten *Buckets* wurden anschließend verwendet, um eine PCA mit den Proben der Sorte Lara (30), Franquette (19) und Fernor (8) aus Frankreich durchzuführen (Abbildung 46).

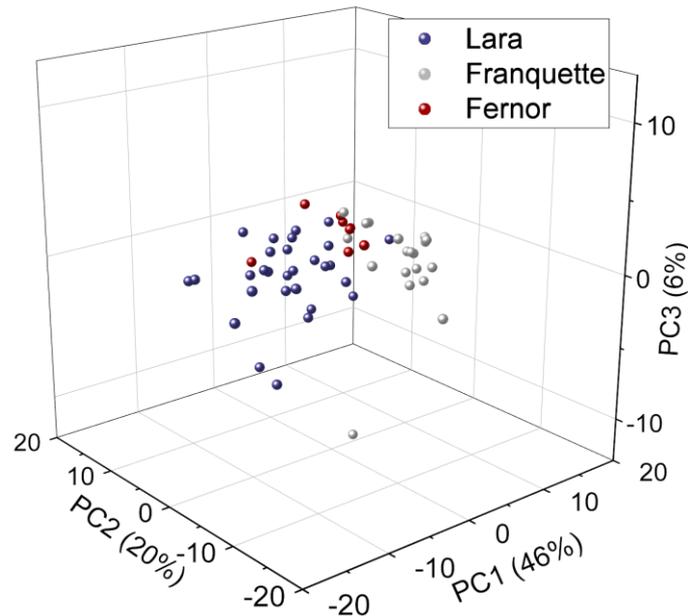


Abbildung 46: PCA Score-Plot der französischen Proben der Sorten Lara, Franquette und Fernor. Es sind Cluster der einzelnen Sorten zu erkennen, wobei Überschneidungen auftreten. Die Proben der Sorte Fernor liegen zwischen den Proben der Sorten Lara und Franquette. Auf Grund der PCA kann auf einen Sorteneinfluss geschlossen werden. Erklärte Varianz: PC1: 46%, PC2: 20%, PC3: 6%.

Die Probengruppen der drei Sorten zeigen im PCA Score-Plot Cluster, wobei die Proben der Sorte Fernor zwischen denen der Sorten Lara und Franquette liegen. Hierbei kann auf einen Sorteneinfluss in der PCA geschlossen werden, welcher in den Modellen zur Herkunftsbestimmung mit einfließt. Dies wurde ebenfalls bei der Verwendung der Extraktionsmethode A beobachtet. Im Folgenden wurden zunächst insgesamt fünf verschiedene zwei-Klassen-Modelle betrachtet (DE/CN, DE/FR, DE/IT, CH/US, EU/Andere).

Unterscheidung von Walnussproben aus Deutschland und China

Zur Erstellung eines Modells zu geographischen Herkunftsbestimmung wurden 49 deutsche und 15 chinesische Proben verwendet. Der entsprechende PCA Score-Plot der Proben aus China und Deutschland ist sowohl zwei- als auch dreidimensional in Abbildung 47 dargestellt.

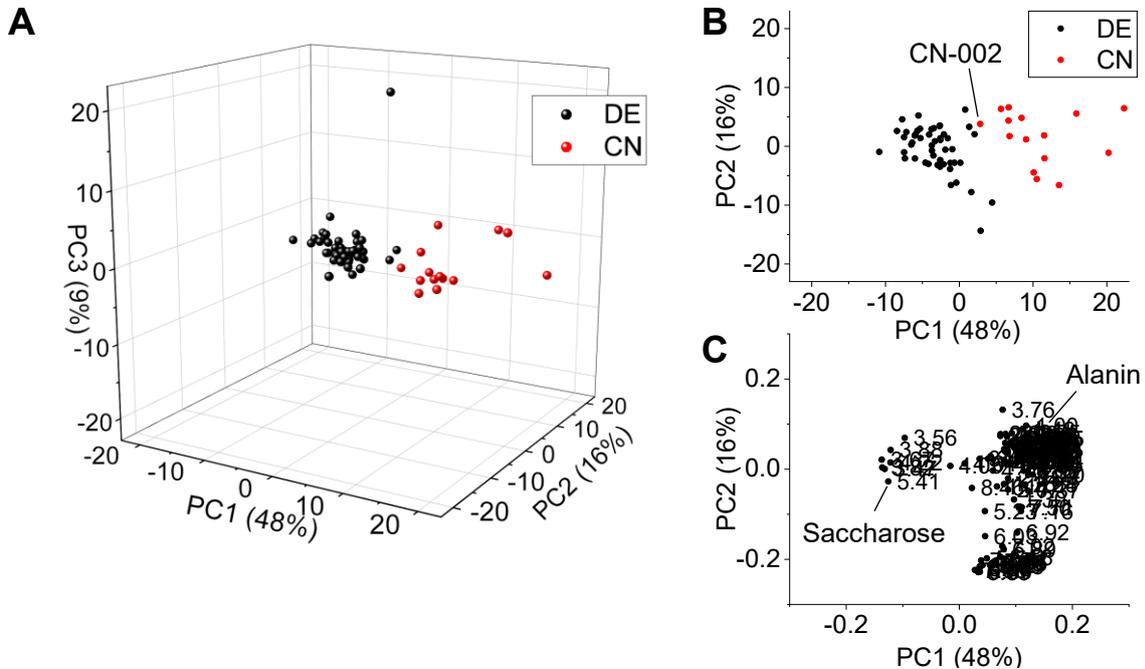


Abbildung 47: **A:** PCA Score-Plot der chinesischen (rot) und deutschen (schwarz) Proben. Beide Probengruppen bilden separierte Cluster. Erklärte Varianz: PC1: 48%, PC2: 16%, PC3: 9%. **B:** Zweidimensionale Darstellung der PCA von Proben aus China und Deutschland. Die markierte Probe CN-002 liegt am nächsten am Cluster der deutschen Proben. **C:** Darstellung der zugehörigen *Loadings*. Das *Bucket* von Saccharose (6) (5.41 ppm) und Alanin (9) (1.48 ppm) ist markiert.

Jeder einzelne Punkt entspricht einer Walnussprobe aus China (rot) oder Deutschland (schwarz). Beide Probengruppen zeigen in der PCA je einen separierten Cluster (**A**). Dies ist auch in der zweidimensionalen Darstellung (**B**) der PCA zu erkennen, deren entsprechende *Loadings* ebenfalls gezeigt sind (**C**). Eine Variable mit einem hohen negativen Wert entlang der ersten Hauptkomponente wurde dem Metaboliten Saccharose (6) zugeordnet. Dieser trägt zur Trennung der Probengruppen bei, da er mit den negativen *Score*-Werten der Proben aus Deutschland korreliert. Die *Buckets* von 0.95 – 1.05 ppm mit den hohen positiven Werten entlang der PC1 können aliphatischen Signalen von Aminosäuren, wie Leucin (7), Isoleucin (16) und Valin (15), zugeordnet werden. Auch das *Bucket* bei 1.48 ppm von Alanin (9) zeigt einen positiven *Loading*-Wert und korreliert mit den positiven *Score*-Werten der chinesischen Proben. Um potentiell relevante Metaboliten zur Unterscheidung von Walnussproben aus China und Deutschland zu identifizieren, wurde der Kruskal-Wallis Test durchgeführt, bei dem insgesamt 80 der 106 verwendeten *Buckets* mit $p < 0.0004717$ als

Ergebnisse und Diskussion

relevant bezeichnet wurden. Zu signifikanten *Buckets*, denen Metaboliten zugeordnet wurden, zählen unter anderem Saccharose (**6**) (5.41 ppm), Alanin (**9**) (1.48 ppm), Threonin (**8**) (1.34 ppm) und Isoleucin (**16**) (0.95 ppm). Als Beispiele für relevante *Buckets* sind zusätzlich die Bereiche der Signale der beiden Metaboliten Saccharose (**6**) und Alanin (**9**) in ausgewählten ^1H -NMR-Spektren und Box-Whisker-Plots in Abbildung 48 dargestellt.

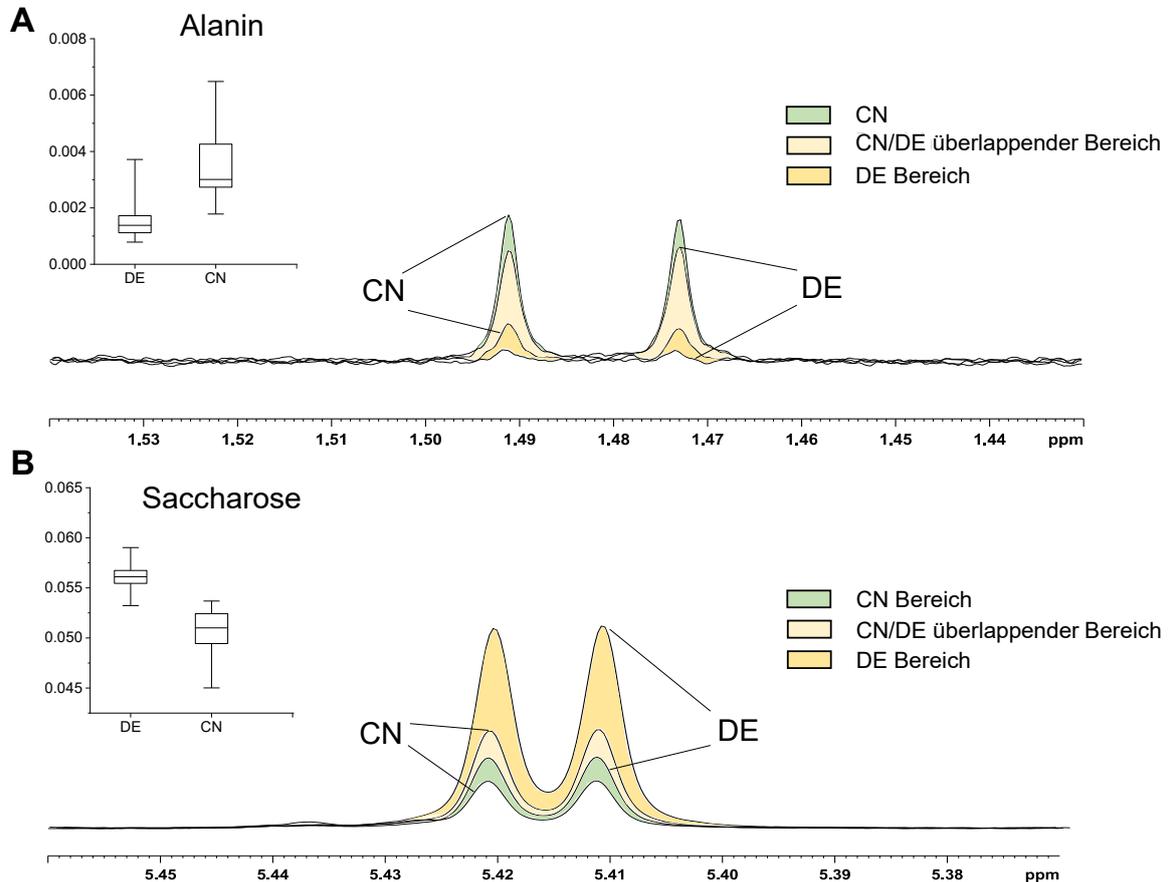


Abbildung 48: ^1H -NMR-Spektren ausgewählter Proben aus Deutschland und China mit Box-Whisker-Plots, die die skalierten Werte der *Buckets* zeigen. **A:** Vergleich der Proben mit der niedrigsten und höchsten Konzentration von Alanin (**9**) (1.48 ppm). Die Konzentration von Alanin (**9**) in chinesischen Proben ist im Durchschnitt höher als in deutschen Proben. **B:** Die Konzentration von Saccharose (**6**) ist in Proben aus Deutschland im Durchschnitt höher als in chinesischen Proben.

Beide Metaboliten tragen zur Trennung der beiden Probengruppen bei, wobei die Konzentration von Saccharose (**6**) in deutschen Walnussproben höher ist als in den chinesischen. Im Gegensatz dazu weisen die Proben aus China eine höhere Konzentration von Alanin (**9**) auf.

Ergebnisse und Diskussion

Für die Modellerstellung zur geographischen Herkunftsanalyse zur Unterscheidung von Proben aus Deutschland und China wurde eine wiederholte verschachtelte Kreuzvalidierung durchgeführt, die in Abbildung 49 beschrieben wird.

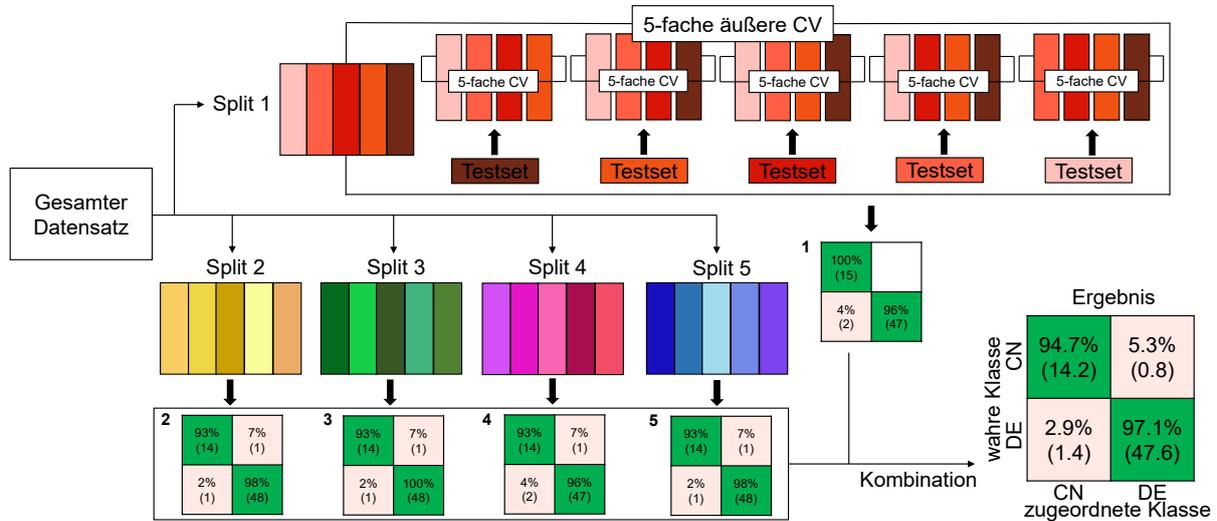


Abbildung 49: Durchführung einer wiederholten verschachtelten Kreuzvalidierung (CV) am Beispiel der Modellerstellung für die Zuordnung von deutschen und chinesischen Walnussproben. Der gesamte Datensatz, bestehend aus Proben aus China und Deutschland, wurde in fünf Teile eingeteilt. Vier Teile wurden zum Training-Set kombiniert und das Modell in einer 5-fachen inneren CV trainiert. Dieses wurde anschließend anhand des übrig gebliebenen Teils als Test-Set validiert. Der Prozess wurde fünfmal mit neuen Kombinationen der Teile wiederholt (5-fache äußere CV). Das Ergebnis des ersten Durchlaufs mit Verwendung des Splits 1 wurde als Konfusionsmatrix 1 dargestellt. Der gesamte Prozess der verschachtelten CV wurde danach mit zufällig neu gemischten Splits (Split 2 – 5) wiederholt, sodass fünf verschiedene Konfusionsmatrices (1 – 5) erhalten wurden, die zu einer kombiniert wurden. In der finalen Konfusionsmatrix sind die Ergebnisse der Zuordnungen als Zahlen und die Genauigkeiten in Prozent angegeben. Die Genauigkeit des erhaltenen Modells betrug 96.6% (±0.6%).

Die bei der verschachtelten Kreuzvalidierung insgesamt fünf erhaltenen Matrices wurden zu einer Konfusionsmatrix kombiniert, um das Ergebnis übersichtlich darzustellen. Dabei sind die Zuordnungen als Zahlen und die Genauigkeiten in Prozent angegeben. Die Genauigkeit des Modells wird mit der entsprechenden Standardabweichung angegeben. Als Klassifizierungsverfahren wurde eine lineare *support vector machine* verwendet. Die Klassifizierungsgenauigkeit des Modells betrug 96.6% (±0.6%). Deutsche Proben wurden mit einer Genauigkeit von ca. 97% zugeordnet, wobei die falschen Klassifizierungen auf die Proben DE-007 und DE-027 zurückgeführt wurden. Die falschen Klassifizierungen bei den chinesischen Proben wurde auf die Probe CN-002 zurückgeführt. Diese lag in der PCA am nächsten zum Cluster der deutschen Proben und wurde entsprechend viermal in unterschiedlichen Splits (Split 2 – 5) falsch zugeordnet. Zur Unterscheidung von deutschen und chinesischen Proben wurde somit ein robustes Modell mit einer hohen Zuordnungsgenauigkeit erhalten. Anschließend wurde die Unterscheidung von deutschen und französischen Walnussproben untersucht.

Unterscheidung von Walnussproben aus Deutschland und Frankreich

Danach wurde die Unterscheidung von 64 französischen und 49 deutschen Proben untersucht. Es wurde eine PCA durchgeführt, bei der jeder Punkt eine Probe aus Frankreich (blau) oder Deutschland (schwarz) darstellt (Abbildung 50).

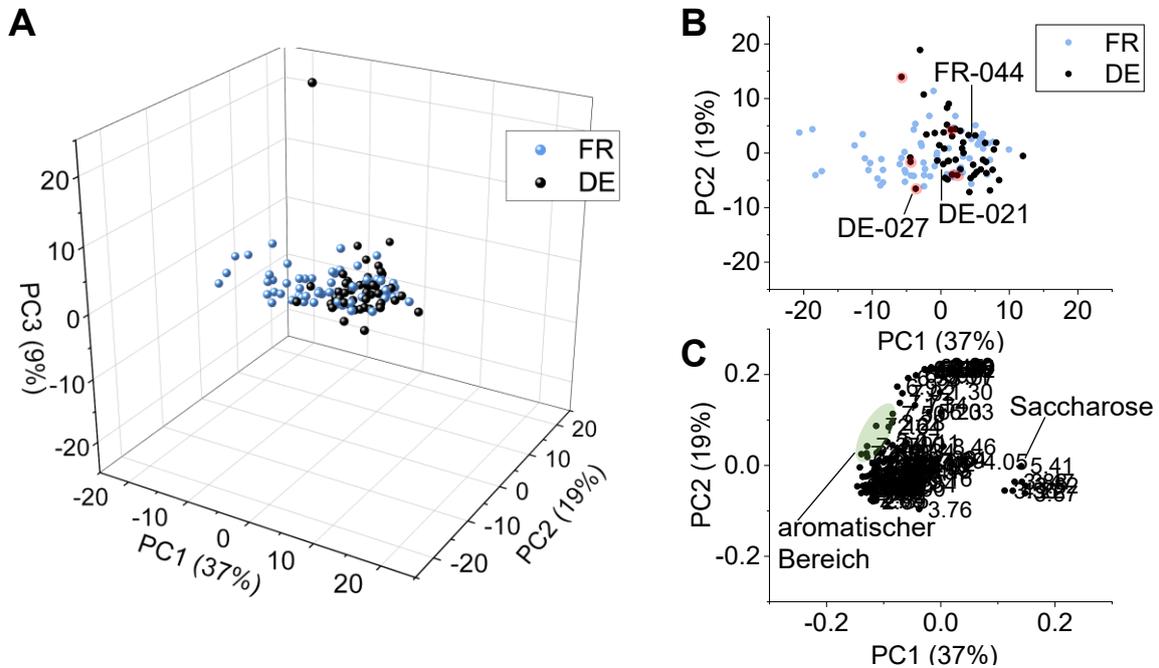


Abbildung 50: **A:** Dreidimensionaler PCA Score-Plot der Proben aus Deutschland (schwarz) und Frankreich (blau). Die Cluster der Proben zeigen einen überlappenden Bereich. Erklärte Varianz: PC1: 37%, PC2: 19%, PC3: 9%. **B:** Zweidimensionale Darstellung der PCA. Proben, die mehrmals falsch klassifiziert wurden, sind exemplarisch markiert. Die sechs rot markierten Proben aus Deutschland wurden mindestens einmal falsch zugeordnet und weisen als Herkunft Baden-Württemberg auf. **C:** Zugehöriger Loading-Plot mit markierten Zuordnungen der Buckets.

In dem PCA Score-Plot sind zwei Cluster der beiden Probengruppen (DE/FR) zu erkennen, die jedoch einen überlappenden Bereich zeigen (**A**). Proben, die im Cluster der jeweils anderen Probengruppe liegen, sind u.a. DE-021, DE-027 und FR-044 (**B**). Im entsprechenden Loading-Plot (**C**) ist zu erkennen, dass die Variable mit einem hohen positiven Wert entlang der ersten Hauptkomponente, der Saccharose (**6**) zugeordnet wurde, mit den Score-Werten der deutschen Proben korreliert. Die höchsten negative Werte zeigen Buckets, die im aromatischen Bereich liegen. Nach Durchführung eines Kruskal-Wallis Tests wurden von den insgesamt 106 verwendeten Buckets 26 mit $p < 0.0004717$ als relevant bezeichnet. Hierzu zählten u.a. Buckets der Aminosäuren, darunter auch das Bucket bei 1.48 ppm, welches Alanin (**9**) zugeordnet wurde. Ein ebenfalls signifikantes Bucket bei 1.92 ppm wurde dem Signal des Acetats (**19**) zugeordnet.

Ergebnisse und Diskussion

Die Klassifizierung erfolgte mit dem linearen *support vector machine* Algorithmus und der wiederholten verschachtelten Kreuzvalidierung. Das Ergebnis der Zuordnungen von deutschen und französischen Proben ist als Konfusionsmatrix in Abbildung 51 dargestellt.

wahre Klasse	FR	94.7% (60.6)	5.3% (3.4)
	DE	11.4% (5.6)	88.6% (43.4)
		FR	DE
		zugeordnete Klasse	

Abbildung 51: Konfusionsmatrix der Klassifizierung von Walnussproben aus Deutschland und Frankreich. Diese resultiert aus der Kombination von fünf Matrices, die durch die wiederholte verschachtelte Kreuzvalidierung erhalten wurden. Die Ergebnisse der Zuordnungen sind als Zahlen und die Genauigkeiten in Prozent angegeben. Genauigkeit: 92.0% ($\pm 1.8\%$).

Die Zuordnungen der Klassifizierung sind als Zahlen und die Genauigkeiten in Prozent angegeben. Französische Walnussproben wurden mit einer Genauigkeit von ca. 95% richtig zugeordnet. Zu falsch klassifizierten Proben zählt beispielsweise die Probe FR-044, die in allen fünf Splits fälschlicherweise Deutschland zugeordnet wurde. Die Genauigkeit der Zuordnung von deutschen Proben lag bei ca. 89%. Falsche Zuordnungen in jedem Split fanden u.a. bei den Proben DE-010, DE-021 und DE-027 statt, die in der PCA im Cluster der französischen Proben lagen. Sechs mindestens einmal falsch zugeordnete Proben aus Deutschland (DE-008, DE-023, DE-025, DE-027, DE-040, DE-043) weisen als Herkunft das Bundesland Baden-Württemberg auf, welches eine geographische Nähe zu Frankreich aufweist. Trotzdem wies das Modell eine hohe Genauigkeit von 92.0% ($\pm 1.8\%$) auf. Im Folgenden wurde die Unterscheidung von deutschen und italienischen Proben untersucht.

Unterscheidung von Walnussproben aus Deutschland und Italien

Bei der Unterscheidung von deutschen und italienischen Walnussproben wurden ebenfalls die 106 manuell gewählten *Buckets* verwendet. Es wurde eine Hauptkomponentenanalyse durchgeführt, deren Ergebnis in Abbildung 52 dargestellt ist.

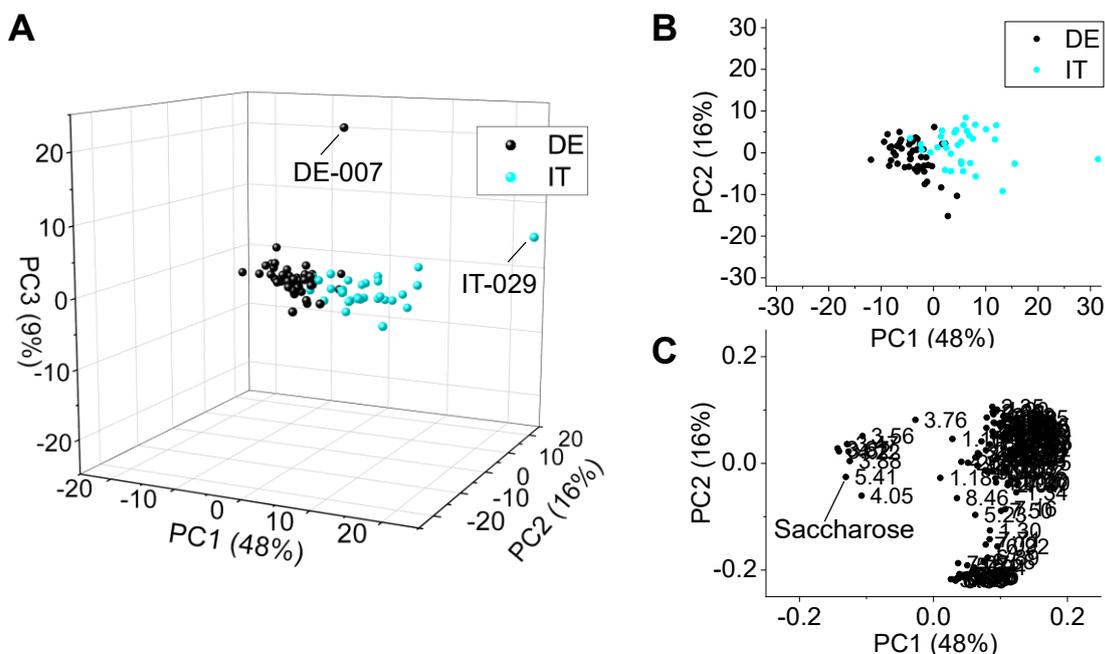


Abbildung 52: **A:** Dreidimensionale Darstellung des PCA Score-Plots mit Proben aus Deutschland (schwarz) und Italien (türkis), bei der zwei überlappende Cluster zu erkennen sind. Zwei Proben liegen nicht im Cluster der eigenen Probengruppe. Die markierten Proben IT-029 und DE-007 weisen eine erhöhte Konzentration an Glucose auf und wurden daher nicht als Ausreißer gewertet. Erklärte Varianz: PC1: 48%, PC2: 16%, PC3: 9%. **B:** Zweidimensionale Darstellung der PCA. **C:** Zugehöriger Loading-Plot mit Markierung der Variable, der Saccharose (6) zugeordnet wurde.

Die 49 Walnussproben aus Deutschland (schwarz) und 33 aus Italien (türkis) sind als einzelne Punkte dargestellt und zeigen jeweils einen Cluster (**A**). Die Cluster überlappen jedoch und zwei Proben waren auffällig, da sie nicht im Cluster der eigenen Probengruppe lagen. Hierzu zählten die Proben DE-007 und IT-029, die bereits bei der ersten Analyse der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren auffielen, da sie eine im Vergleich zu den anderen Proben der Gruppe erhöhte Glucosekonzentration aufwiesen. Die Proben wurden für die spätere Klassifizierung nicht aussortiert, da biologische Varianz auftreten kann und dies folglich nicht als Ausreißer gewertet wurde. Auch in der zweidimensionalen Darstellung der PCA (**B**) ist eine Trennung entlang der PC1 mit einem geringfügig überlappenden Bereich zu erkennen. Im korrespondierenden Loading-Plot (**C**) weisen entlang der ersten Hauptkomponente *Buckets*, die Signalen im Bereich der Kohlenhydrate zugeordnet wurden, die höchsten negativen Loading-Werte auf. Diese korrelieren mit den Score-Werten der Walnussproben aus Deutschland. Entlang der PC2 weisen *Buckets*, die u.a. Informationen über aromatische

Ergebnisse und Diskussion

Signale enthalten, die höchsten negativen *Loading*-Werte auf. Anschließend wurde eine Signifikanzanalyse durchgeführt, bei der von den insgesamt 106 verwendeten *Buckets* 75 mit $p < 0.0004717$ als relevant bezeichnet wurden. Hierzu zählten beispielsweise *Buckets*, die den Signalen von Protonen aliphatischer Aminosäuren oder Kohlenhydraten zugeordnet wurden. Die Klassifizierung erfolgte mit der linearen *support vector machine*. Das Ergebnis der wiederholten verschachtelten Kreuzvalidierung ist in Abbildung 53 dargestellt.

wahre Klasse	DE	93.5% (45.8)	6.5% (3.2)
	IT	16.4% (5.4)	83.6% (27.6)
		DE	IT
		zugeordnete Klasse	

Abbildung 53: Konfusionsmatrix der Klassifizierung von Proben aus Italien und Deutschland. Die Erstellung der Matrix erfolgte aus der Kombination der fünf Matrices, die bei der wiederholten verschachtelten CV erhalten wurden. Die Ergebnisse der Zuordnungen sind als Zahlen und die Genauigkeiten in Prozent angegeben. Genauigkeit: 89.3% ($\pm 1.4\%$).

Die Zuordnungen der Klassifizierung sind als Zahlen und die Genauigkeiten in Prozent angegeben. Die Genauigkeit des Modells zur Klassifizierung von Walnussproben aus Deutschland und Italien betrug 89.3% ($\pm 1.4\%$). Deutsche Proben wurden mit einer hohen Genauigkeit von ca. 94% richtig zugeordnet. Mit einer etwas niedrigeren Genauigkeit von ca. 84% wurden italienische Proben richtig zugeordnet.

Unterscheidung von Walnussproben aus der Schweiz und den USA

Zur Erstellung eines Modells zur geographischen Herkunftsbestimmung wurden 31 Proben aus der Schweiz und dreizehn Proben aus den USA verwendet. Es wurde eine PCA durchgeführt, in der jeder Punkt eine Probe aus den USA (orange) und der Schweiz (violett) darstellt (Abbildung 54).

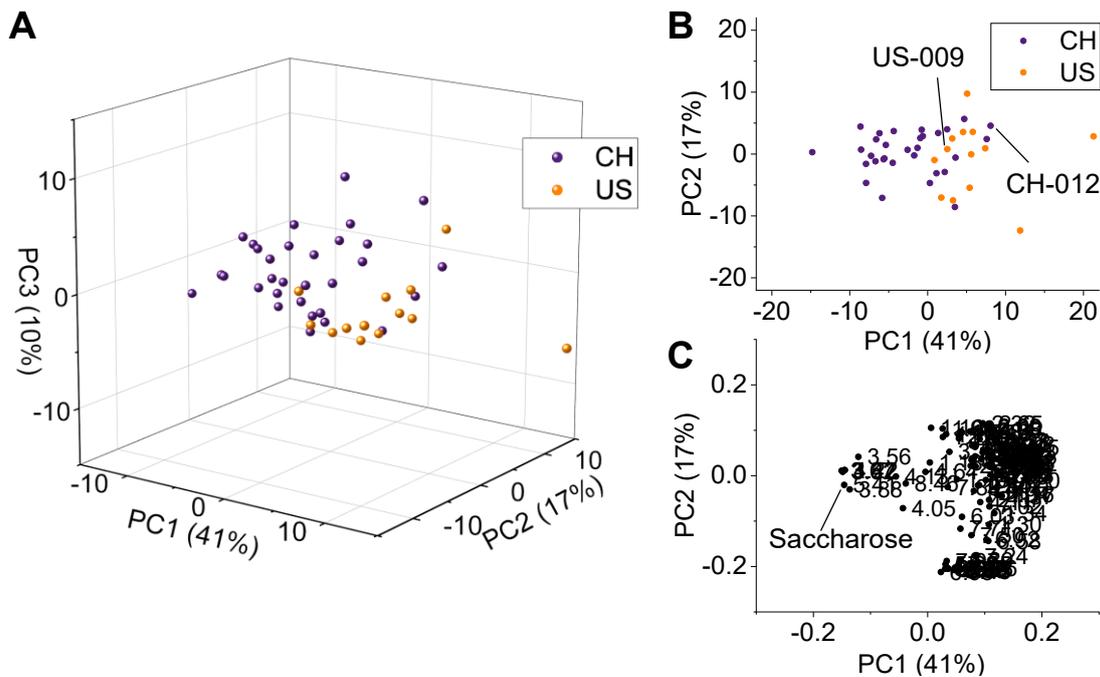


Abbildung 54: **A:** Dreidimensionaler PCA Score-Plot der Probengruppen Schweiz (orange) und USA (violett). Erklärte Varianz: PC1: 41%, PC2: 17%, PC3: 10%. **B:** Zweidimensionale Darstellung der PCA. Die markierten Proben (CH-012, US-009) liegen im Cluster der jeweils anderen Gruppe. **C:** Loading-Plot mit dem Bucket, dem Saccharose (6) zugeordnet wurde, welches einen hohen negativen Loading-Wert entlang der ersten PC aufweist.

In der PCA ist zu erkennen, dass die Proben aus den USA und der Schweiz eine hohe Varianz innerhalb der Probengruppe aufweisen (A). Es sind exemplarisch je eine Probe aus den USA (US-009) sowie aus der Schweiz (CH-012) markiert, da sie im Cluster der jeweils anderen Probengruppe liegen und daher anfällig für eine falsche Klassifizierung sind (B). Einen Einfluss auf die Trennung der Probengruppen entlang der ersten Hauptkomponente zeigen Variablen, die den Kohlenhydraten (u.a. Saccharose (6)) zugeordnet wurden (C). Diese korrespondieren mit den Score-Werten der Proben aus der Schweiz. Der höchste positive Loading-Wert entlang PC2 wurde bei dem Bucket 2.32 ppm beobachtet, welchem noch kein Metabolit zugeordnet werden konnte. Es wurde ein Signifikanztest durchgeführt, bei dem 29 der 106 für die PCA verwendeten Variablen als besonders signifikant angegeben wurden.

Ergebnisse und Diskussion

Viele der als relevant ermittelten *Buckets* liegen im Bereich der Kohlenhydrate. Ebenfalls wurden sieben *Buckets* mit Signalen im aromatischen Bereich, deren zugehörige Metaboliten nicht identifiziert wurden, als signifikant angezeigt. Für die Modellerstellung wurde das lineare *support vector machine* Klassifizierungsverfahren verwendet. Das Ergebnis der wiederholten verschachtelten CV ist als Konfusionsmatrix in dargestellt.

wahre Klasse	CH	92.9% (28.8)	7.1% (2.2)
	US	30.8% (4.0)	69.2% (9.0)
		CH	US
		zugeordnete Klasse	

Abbildung 55: Ergebnis der Klassifizierung von Walnussproben aus den USA und der Schweiz. Die Konfusionsmatrix zeigt das kombinierte Ergebnis aus den fünf Matrices, die bei der wiederholten verschachtelten CV erhalten wurden. Die Ergebnisse der Zuordnungen sind als Zahlen und die Genauigkeiten in Prozent angegeben. Genauigkeit: 85.9% ($\pm 0.9\%$).

Die Zuordnungen der Klassifizierung sind als Zahlen und die Genauigkeiten in Prozent angegeben. Die Klassifizierungsgenauigkeit des erhaltenen Modells zur Unterscheidung von Walnussproben aus der Schweiz und den USA betrug 85.9% ($\pm 0.9\%$). Es wurden ca. 93% der Proben aus der Schweiz richtig zugeordnet. Eine geringere Genauigkeit von ca. 69% wurde für die Zuordnung von Walnussproben aus den USA erhalten. In den gesamten fünf Splits wurden die Proben US-009 und CH-012, die bereits in der Abbildung 54 (**B**) markiert wurden, falsch klassifiziert. Insgesamt wurden konsistente Ergebnisse in der wiederholten verschachtelten CV erhalten, was für ein robustes Modell spricht.

Unterscheidung von Walnussproben aus europäischen und anderen Ländern

Die Unterscheidung von Proben aus europäischen und anderen Ländern wurde untersucht, wobei die gesamten akquirierten Walnussproben verwendet wurden. Es wurde eine PCA durchgeführt, die in Abbildung 56 dargestellt ist.

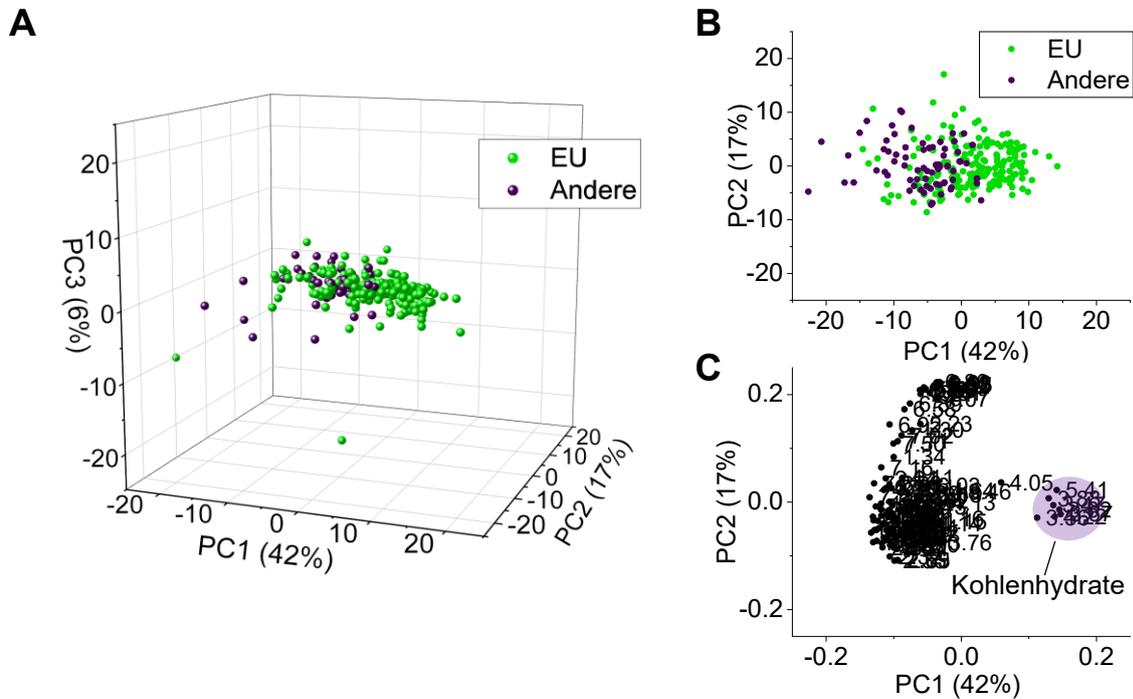


Abbildung 56: **A:** Dreidimensionale Darstellung der PCA der Proben aus europäischen (grün) und anderen Ländern (lila). Erklärte Varianz: PC1: 42%, PC2: 17%, PC3: 6%. **B:** Zweidimensionale Darstellung der PCA. Die beiden Probengruppen liegen überlagert vor. **C:** *Loading*-Plot mit markiertem Bereich von Variablen, denen Signale im Bereich der Kohlenhydrate zugeordnet wurden.

Jeder Punkt in der PCA repräsentiert eine Probe aus einem europäischen (grün) oder nicht-europäischen Herkunftsland (lila). Zu den Ländern der Probengruppe EU zählen Frankreich, Deutschland, Italien, Ungarn und Schweiz. Die restlichen Probengruppen, inklusive der Proben aus der Türkei, wurden zur Probengruppe der anderen Länder (Andere) zusammengefasst. Die beiden Probengruppen (EU/Andere) bilden Cluster, die jedoch einen großen Überlappungsbereich aufweisen (**A**). Beim Vergleich der zweidimensionalen Darstellung der PCA (**B**) mit den entsprechenden *Loading*-Werten (**C**) ist zu erkennen, dass Variablen mit hohen positiven Werten entlang der ersten Hauptkomponente, die den Kohlenhydraten (u.a. Saccharose (**6**)) zugeordnet werden können, mit den europäischen Proben korrespondieren. Nach einer Signifikanzanalyse wurden 74 der 106 verwendeten *Buckets* mit $p < 0.0004717$ als relevant angegeben.

Ergebnisse und Diskussion

Die Klassifizierung erfolgte mit der linearen *support vector machine* und unter Anwendung der wiederholten verschachtelten Kreuzvalidierung. Das Ergebnis ist als Konfusionsmatrix in Abbildung 57 dargestellt.

wahre Klasse	Andere	53.2% (25.0)	46.8% (22.0)
	EU	1.8% (3.4)	98.2% (184.6)
		Andere	EU
		zugeordnete Klasse	

Abbildung 57: Konfusionsmatrix der Klassifizierung von europäischen und nicht-europäischen Walnussproben. Diese resultiert aus der Kombination der fünf Matrices, die bei der wiederholten verschachtelten CV erhalten wurden. Die Ergebnisse der Zuordnungen sind als Zahlen und die Genauigkeiten in Prozent angegeben. Genauigkeit: 89.2% ($\pm 0.4\%$).

Die Zuordnungen der Klassifizierung sind als Zahlen und die Genauigkeiten in Prozent angegeben. Bei der Klassifizierung wurde eine Genauigkeit von 89.2% ($\pm 0.4\%$) erhalten. Europäische Proben wurden mit einer Genauigkeit von ca. 98% richtig zugeordnet, während die nicht-europäischen Proben mit einer geringeren Genauigkeit von ca. 53% zugeordnet wurden. Bei der Erstellung des Modells lag ein Ungleichgewicht der Probenverteilung vor, da insgesamt 188 Proben aus europäischen und hingegen lediglich 47 aus nicht-europäischen Ländern akquiriert wurden. Zudem ist die Varianz innerhalb der Probengruppen aufgrund der geographischen Breite groß. Trotzdem ist ein Trend der Klassifizierung zu erkennen. Anschließend wurden weitere Klassifizierungen der Gruppen mit der höchsten Probenanzahl durchgeführt und im Folgenden zusammengefasst.

Weitere Klassifizierungen (IT/FR, FR/CH, IT/CH, DE/CH)

Anschließend erfolgte die Klassifizierung von IT/FR, FR/CH, IT/CH und DE/CH. Die dreidimensionalen PCA Score-Plots sind in Abbildung 58 dargestellt. Die zweidimensionalen PCA Score-Plots mit entsprechendem *Loading*-Plot können im Anhang (Abschnitt 8.7.3) eingesehen werden.

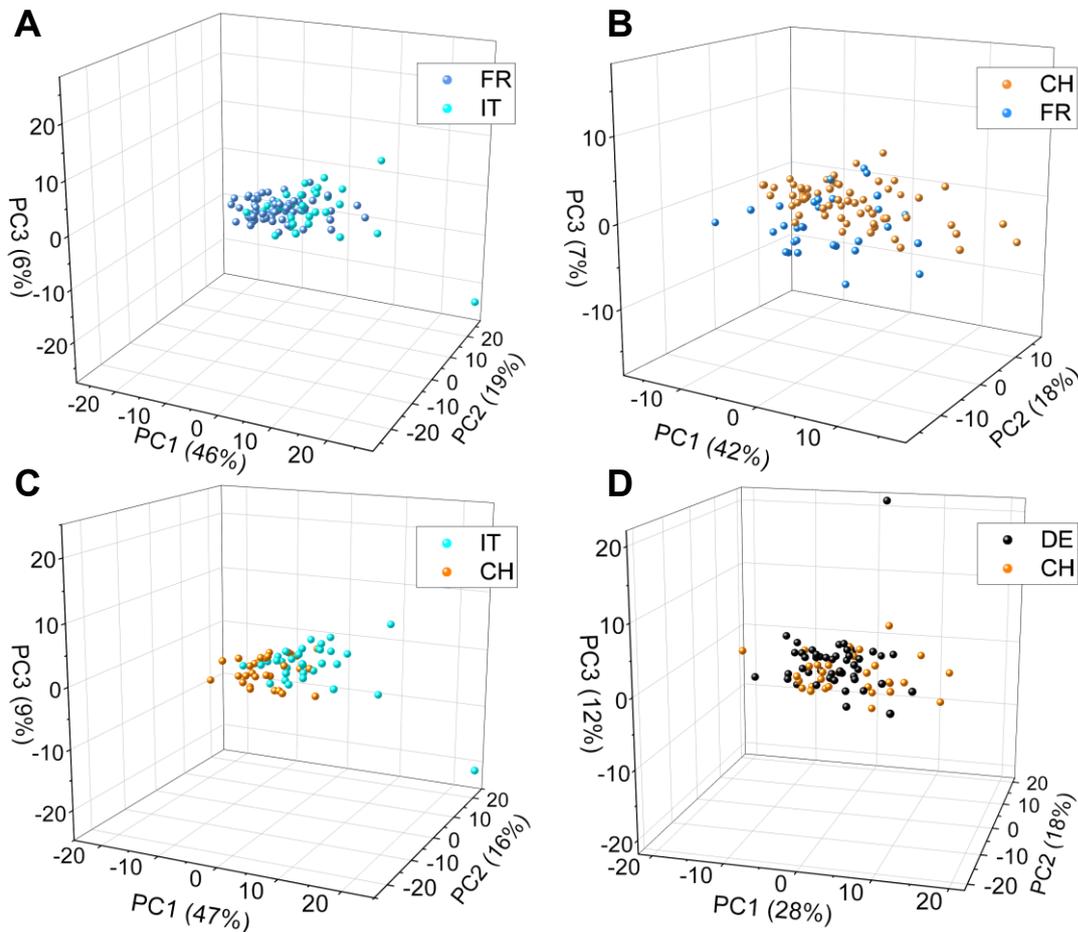


Abbildung 58: Dreidimensionale Darstellung der PCA von vier weiteren Klassifizierungen. **A:** PCA der Proben aus Frankreich (blau) und Italien (türkis). Erklärte Varianz: PC1: 46%, PC2: 19%, PC3: 6%. **B:** PCA der Proben aus der Schweiz (orange) und Frankreich (blau). Erklärte Varianz: PC1: 42%, PC2: 18%, PC3: 7%. **C:** PCA der Proben aus der Schweiz (orange) und Italien (türkis). Erklärte Varianz: PC1: 47%, PC2: 16%, PC3: 9%. **D:** PCA der Proben aus Deutschland (schwarz) und der Schweiz (orange). Erklärte Varianz: PC1: 28%, PC2: 18%, PC3: 12%.

In den PCA Score-Plots repräsentiert jeder Punkt eine Walnussprobe. Die französischen und italienischen Proben zeigen entlang PC1 Cluster, die jedoch einen überlappenden Bereich aufweisen (**A**). Die Probengruppen Schweiz und Frankreich zeigen ebenfalls Cluster, die einen stark überlappenden Bereich aufweisen (**B**). Im PCA Score-Plot der Proben aus Italien und der Schweiz liegen zwei Cluster vor, die jedoch einen geringen überlappenden Bereich zeigen (**C**). Bei den Probengruppen Deutschland und Schweiz konnte im PCA Score-Plot keine Trennung beobachtet werden (**D**). Anschließend wurden Klassifizierungen mittels der

Ergebnisse und Diskussion

linearen SVM durchgeführt. In Abbildung 59 sind die Konfusionsmatrices der Klassifizierung nach wiederholter verschachtelter Kreuzvalidierung dargestellt.

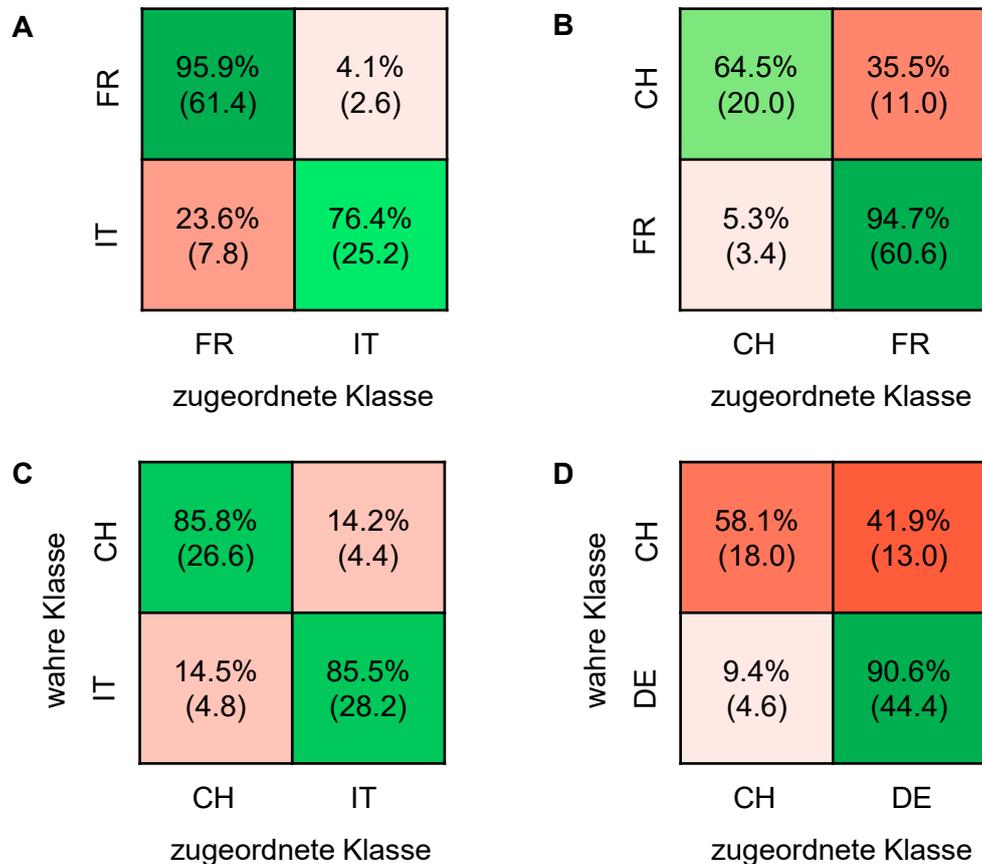


Abbildung 59: Die Konfusionsmatrices resultieren aus der Kombination der fünf Matrices, die bei der wiederholten verschachtelten Kreuzvalidierung erhalten wurden. Die Ergebnisse der Zuordnungen sind als Zahlen und die Genauigkeiten in Prozent angegeben. **A:** Die Genauigkeit der Zuordnung bei der Klassifizierung von französischen und italienischen Walnussproben betrug 89.3% ($\pm 2.1\%$). **B:** Die Zuordnungsgenauigkeit der Klassifizierung von Proben aus der Schweiz und Frankreich betrug 84.8% ($\pm 2.1\%$). **C:** Bei der Klassifizierung von Proben aus Italien und der Schweiz betrug die Genauigkeit 85.6% ($\pm 0.6\%$). **D:** Die Genauigkeit der Zuordnung bei der Klassifizierung von Walnussproben aus Deutschland und der Schweiz betrug 78.0% ($\pm 2.3\%$).

Bei der Klassifizierung von italienischen und französischen Walnussproben wurde eine Genauigkeit von 89.3% ($\pm 2.1\%$) erhalten (**A**). Insgesamt wurden ca. 96% der französischen Proben richtig klassifiziert, während mit einer geringeren Genauigkeit von ca. 76% italienische Proben korrekt zugeordnet wurden. Bei der Zuordnung von Proben aus Frankreich und der Schweiz wurde eine Genauigkeit von 84.8% ($\pm 2.1\%$) erhalten (**B**). Mit einer hohen Genauigkeit von ca. 95% wurden französische Proben richtig zugeordnet. Von den Proben aus der Schweiz wurden jedoch mit einer geringen Genauigkeit nur ca. 65% richtig zugeordnet. Bei der Klassifizierung von Walnussproben aus Italien und der Schweiz wurde eine Genauigkeit von 85.6% ($\pm 0.6\%$) erhalten (**C**). Hierbei wurden sowohl Proben aus Italien als auch Proben aus der Schweiz mit einer Genauigkeit von ca. 86% richtig zugeordnet. Bei der Zuordnung von Proben aus Deutschland und der Schweiz wurde eine Genauigkeit von 78.0% ($\pm 2.3\%$)

Ergebnisse und Diskussion

erhalten (**D**). Die Zuordnung von deutschen Proben erfolgte mit einer Genauigkeit von ca. 91%. Proben aus der Schweiz wurden mit einer deutlich geringeren Genauigkeit von ca. 58% richtig zugeordnet.

Insgesamt zeigten die neun zwei-Klassen-Modelle hohe Genauigkeiten von 78.0% ($\pm 2.3\%$) bis 96.6% ($\pm 0.6\%$). Im Folgenden werden die Zuordnungsgenauigkeiten der Modelle beider Extraktionsmethoden zusammengefasst und gegenübergestellt.

Zusammenfassung

Mit beiden Extraktionsmethoden A und B wurden zwei-Klassen-Modelle zur Herkunftsbestimmung von Walnüssen mit Verwendung der linearen SVM erstellt. In Tabelle 5 sind die Zuordnungsgenauigkeiten mit entsprechender Standardabweichung der einzelnen Modelle gegenübergestellt.

Tabelle 5: Vergleich der Zuordnungsgenauigkeiten der Klassifizierungsmodelle mit der linearen SVM mit entsprechender Standardabweichung beider Extraktionsmethoden.

Modell	Genauigkeit (MeOD/CD ₃ CN)	Genauigkeit (MeOD/D ₂ O)
CN/DE	95.9% ($\pm 0.8\%$)	96.6% ($\pm 0.6\%$)
DE/FR	83.4% ($\pm 2.0\%$)	92.0% ($\pm 1.8\%$)
CH/US	87.7% ($\pm 2.3\%$)	85.9% ($\pm 0.9\%$)
DE/IT	86.8% ($\pm 0.9\%$)	89.3% ($\pm 1.4\%$)
EU/Andere	81.1% ($\pm 1.2\%$)	89.2% ($\pm 0.4\%$)
FR/IT	88.5% ($\pm 1.5\%$)	89.3% ($\pm 2.1\%$)
FR/CH	86.1% ($\pm 1.2\%$)	84.8% ($\pm 2.1\%$)
IT/CH	91.9% ($\pm 1.5\%$)	85.6% ($\pm 0.6\%$)
DE/CH	85.5% ($\pm 0.6\%$)	78.0% ($\pm 2.3\%$)

Die Genauigkeiten der Modelle mit der weniger polaren Extraktion (Methanol-*d*₄/Acetonitril-*d*₃) lagen zwischen 81.1% ($\pm 1.2\%$) und 95.9% ($\pm 0.8\%$). Die Zuordnungsgenauigkeiten mit der polaren Extraktionsmethode B (Methanol-*d*₄/deuterierter Phosphatpuffer/Chloroform-*d*) lagen zwischen 78.0% ($\pm 2.3\%$) und 96.6% ($\pm 0.6\%$). Insgesamt bieten beide Extraktionsmethoden eine Möglichkeit zur Erstellung von Modellen zur geographischen Herkunftsbestimmung von Walnüssen. Die polarere Methode B zeigte im direkten Vergleich in fünf Fällen höhere Zuordnungsgenauigkeiten. Es konnte demnach gezeigt werden, dass sich auch das polare Extrakt zur Herkunftsbestimmung eignet. Einen Einfluss auf die Trennung von Probengruppen zeigten bei beiden Extraktionsmethoden insbesondere *Buckets*, denen Signale im Bereich der Kohlenhydrate zugeordnet wurden. Zudem wiesen *Buckets*, denen Signale aliphatischer Protonen von Aminosäuren zugeordnet wurden und nur im polareren Extrakt auftraten, häufig eine hohe Signifikanz auf. Es können jeweils keine spezifischen chemischen Marker angegeben werden, sondern lediglich Beispiele für relevante *Buckets* gezeigt werden.

Ergebnisse und Diskussion

Für beide Extraktionsmethoden werden im Folgenden relevante *Buckets*/Metaboliten vorgestellt und die in den Modellen jeweils falsch zugeordneten Proben gegenübergestellt. Ausgewählte Box-Whisker-Plots von relevanten *Buckets* der einzelnen zwei-Klassen-Modelle (Extraktionsmethode A und B) werden zunächst in Abbildung 60 zusammengefasst.

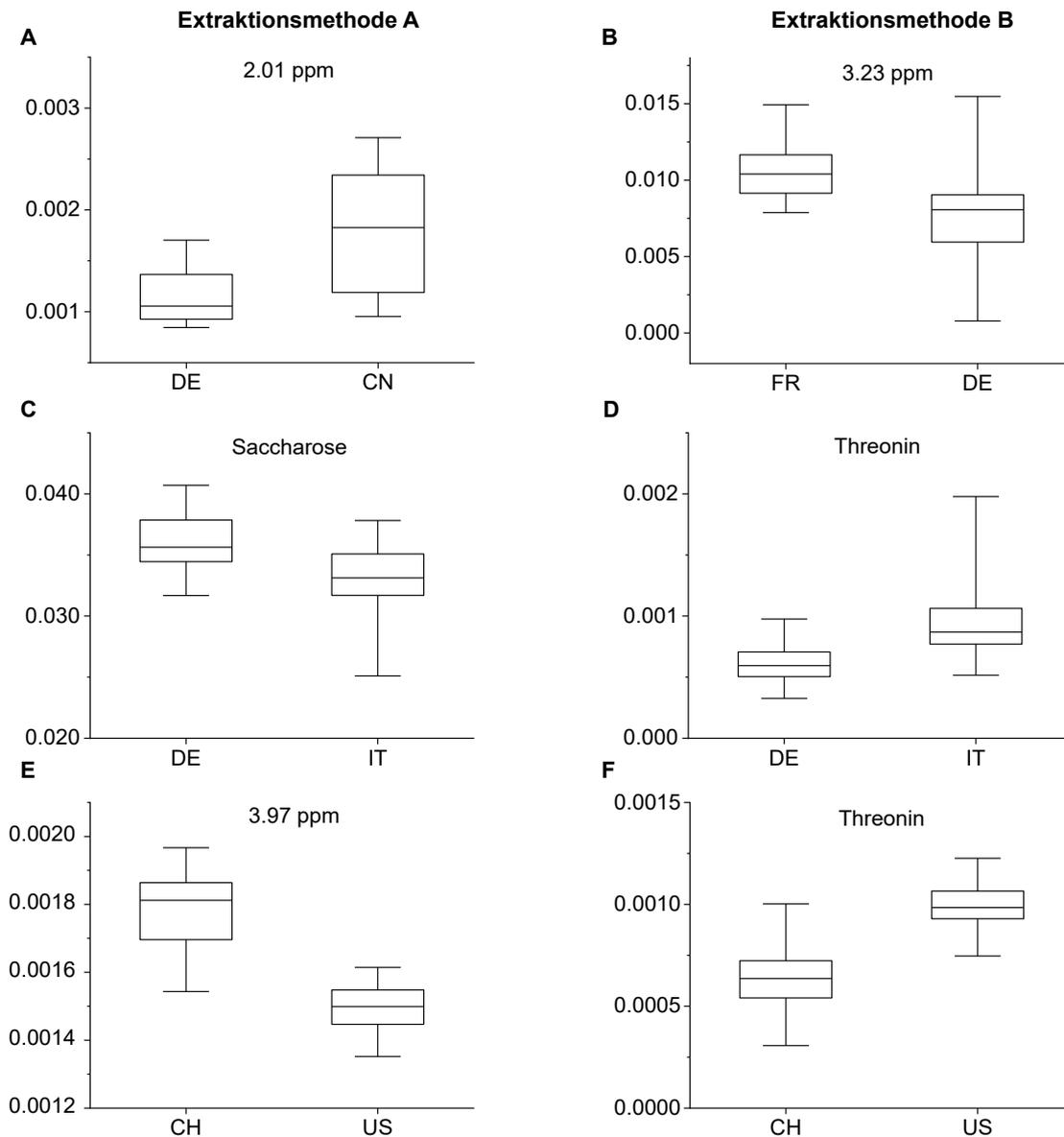


Abbildung 60: Box-Whisker-Plots von relevanten Metaboliten für die Unterscheidung von Walnüssen aus zwei unterschiedlichen Ländern. Diese zeigen die skalierten Werte der ausgewählten *Buckets*. Links: Extraktionsmethode A, Rechts: Extraktionsmethode B. **A:** Das *Bucket* bei 2.01 ppm konnte keinem Metaboliten zugeordnet werden. Dieser zeigt in chinesischen Proben eine erhöhte Konzentration im Vergleich zu deutschen Proben. **B:** Das *Bucket* bei 3.23 ppm zeigt einen Einfluss auf die Unterscheidung von französischen und deutschen Walnüssen. **C:** Saccharose (**6**) weist in deutschen Proben eine erhöhte Konzentration auf und zeigt einen Einfluss auf die Trennung der Probengruppen Deutschland und Italien. **D:** Threonin (**8**) weist eine erhöhte Konzentration in italienischen im Vergleich zu deutschen Proben auf. **E:** Dem *Bucket* bei 3.97 ppm konnte kein Metabolit zugeordnet werden. Dieser weist in Proben aus der Schweiz eine erhöhte Konzentration auf im Vergleich zu Proben aus den USA. **F:** Threonin (**8**) zur Unterscheidung von Proben aus der Schweiz und den USA. Die Konzentration ist in Proben aus den USA vergleichsweise höher als bei den Proben aus der Schweiz.

Ergebnisse und Diskussion

Im Modell der Klassifizierung von deutschen und chinesischen Proben anhand des polaren Extraktes wurden 2.9% der fünfzehn Proben falsch zugeordnet. Diese falschen Zuordnungen wurden ausschließlich auf die Probe CN-002 zurückgeführt. Diese Probe wurde ebenfalls bei der Methanol- d_4 /Acetonitril- d_3 -Extraktion in jedem der fünf Splits falsch zugeordnet. Bei der Klassifizierung anhand der Extraktionsmethode A wurden insgesamt 17.3% der chinesischen Proben falsch zugeordnet. Hinzu kommt hierbei, dass bei dieser Extraktion auch die Probe CN-001 fünfmal sowie zusätzlich die Probe CN-013 zweimal und die Probe CN-015 einmal falsch zugeordnet wurde. Bei der Unterscheidung von deutschen und chinesischen Proben anhand des polaren Extraktes wurden Alanin (**9**) und Saccharose (**6**) als relevante Marker bereits vorgestellt. Im weniger polaren Extrakt (Extraktionsmethode A) wurde als Beispiel das *Bucket* bei 2.01 ppm im Bereich der Fettsäuren betrachtet, dessen skalierte Werte eine hohe Varianz aufweisen (**A**). Der zugehörige, nicht identifizierte Metabolit wies in Proben aus China eine erhöhte Konzentration auf.

Bei der Unterscheidung von Walnussproben aus Frankreich und Deutschland wurde bei der polaren Extraktion zum Beispiel das *Bucket* bei 3.23 ppm als relevant identifiziert (**B**). Der zugehörige Metabolit kommt in etwas höheren Konzentrationen in Proben aus Frankreich vor. Bei der Klassifizierung auf Basis der polaren Extraktionsmethode B wurden 11.4% der 49 Proben aus Deutschland falsch zugeordnet. Anhand der weniger polaren Extraktion wurde ein Anteil von 27.8% der deutschen Proben falsch zugeordnet. Auffällig bei der Klassifizierung mithilfe beider Extraktionsmethoden war, dass relativ viele Proben aus Baden-Württemberg falsch zugeordnet wurden, was durch die Nähe zu Frankreich erklärt werden kann. Bei der Klassifizierung auf Basis der polaren Extraktionsmethode B betrug der Anteil der falsch zugeordneten Proben mit der Herkunft Baden-Württemberg einen Wert von ca. 57%. Im Vergleich betrug dieser Wert bei der Klassifizierung mit der weniger polaren Extraktion einen Wert von ca. 43%.

Bei der Unterscheidung von deutschen und italienischen Walnüssen wurden anhand des Modells auf Basis der weniger polaren Extraktionsmethode A 17.6% der 33 italienischen Proben und 10.2% der 49 deutschen Proben falsch zugeordnet. Anhand der polaren Extraktion wurden ebenfalls mit einem höheren Anteil von 16.4% die italienischen und von 6.5% deutsche Proben falsch klassifiziert. Im Probenstet der deutschen und italienischen Walnüsse wurden zwei Ausreißer ermittelt (DE-007, IT-029), die jedoch nicht aussortiert wurden, da sie eine erhöhte Konzentration von Glucose aufwiesen und somit zu den biologischen Ausreißern gezählt wurden. Bei der Klassifizierung wurde die italienische Probe jeweils in beiden Modellen immer richtig zugeordnet. Die deutsche Walnussprobe wurde im Modell der polaren Extraktion falsch klassifiziert, was hingegen nicht bei Verwendung des

Ergebnisse und Diskussion

Modells der weniger polaren Extraktion beobachtet werden konnte. Zu den Beispielen für relevante Metaboliten bei Verwendung der Extraktionsmethode A zählt beispielsweise Saccharose (**6**), welche in erhöhten Konzentrationen in Proben aus Deutschland vorkommt (**C**). Relevant für die Unterscheidung von deutschen und italienischen Walnüssen auf Basis des Klassifizierungsmodells der polaren Extraktionsmethode B ist beispielsweise die Aminosäure Threonin (**8**), da diese eine erhöhte Konzentration in italienischen Walnüssen aufweist (**D**).

Bei der Unterscheidung von Proben aus den USA und der Schweiz wurden auf Basis der weniger polaren Extraktion 26.2% der dreizehn Proben aus den USA sowie 6.5% der 31 Proben aus der Schweiz falsch zugeordnet. Im Vergleich dazu wurden auf Basis der polaren Extraktionsmethode B mit einem ähnlichen Anteil von 30.8% der Proben aus den USA und 7.1% der Proben aus der Schweiz falsch klassifiziert. Die Probe US-012 wurde nur mit dem Modell der polaren Extraktion (Extraktionsmethode B) in allen fünf Splits falsch zugeordnet, während diese anhand des Modells der weniger polaren Extraktion lediglich einmal falsch klassifiziert wurde. Bei der polaren Extraktion wurde zudem beispielsweise die Probe CH-012 fünfmal falsch zugeordnet, während diese Probe im Modell der weniger polaren Extraktion immer richtig klassifiziert wurde. Im Modell des weniger polaren Extraktes zeigt das *Bucket* bei 3.97 ppm im Bereich der Fettsäuren einen Einfluss auf die Trennung der Probengruppen (**E**). Der zugehörige Metabolit konnte nicht identifiziert werden, dieser kommt in Proben aus der Schweiz jedoch in erhöhten Konzentrationen vor als in Proben aus den USA. Auch für die Unterscheidung von Walnüssen aus den USA und der Schweiz war Threonin (**8**) relevant. Die Aminosäure **8** zeigte in Walnüssen aus den USA eine erhöhte Konzentration im Vergleich zu Proben aus der Schweiz (**F**).

Ergebnisse und Diskussion

In Abbildung 61 sind Box-Whisker-Plots als Beispiel für relevante *Buckets* des zwei-Klassen-Modells EU/Andere sowie CH/DE dargestellt.

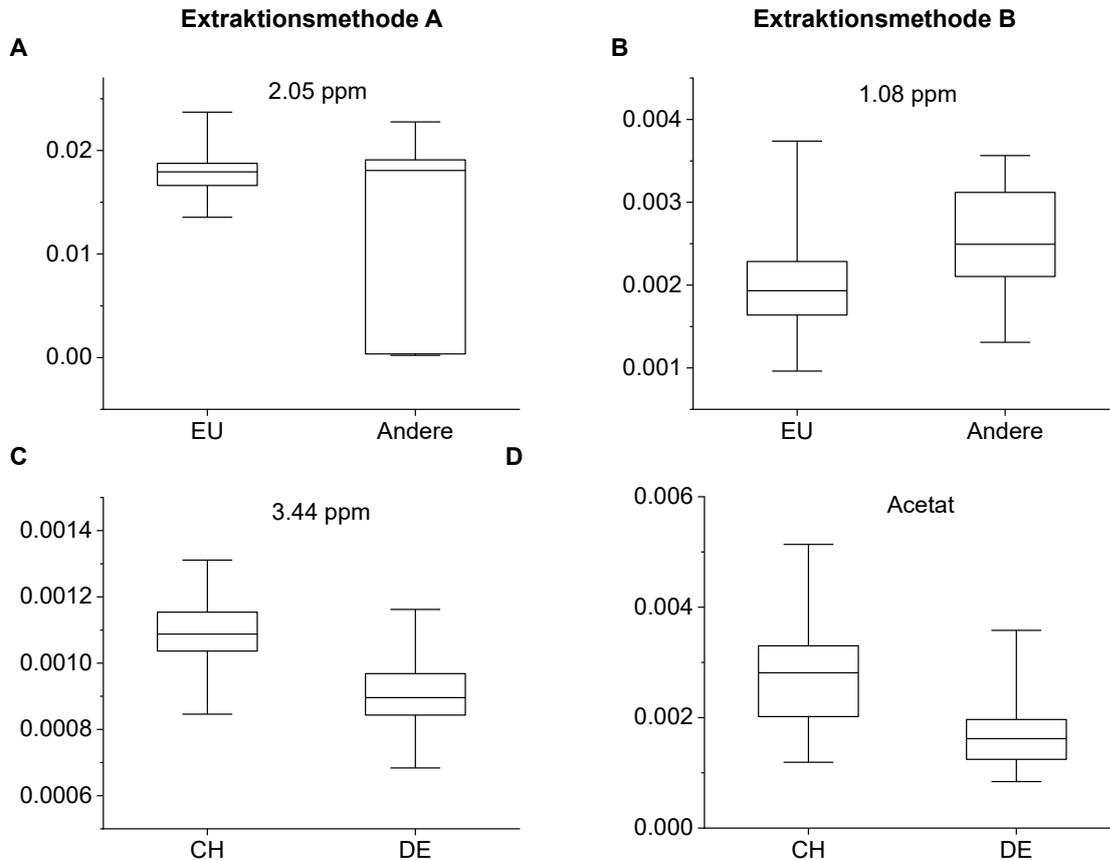


Abbildung 61: Box-Whisker-Plots der relevanten Metaboliten für die Unterscheidung von Walnüssen des Modells EU/Andere sowie CH/DE. Diese zeigen die skalierten Werte der ausgewählten *Buckets*. Links: Extraktionsmethode A, Rechts: Extraktionsmethode B. **A:** Das *Bucket* bei 2.05 ppm konnte keinem Metaboliten zugeordnet werden. Die skalierten Werte des *Buckets* weisen bei nicht-europäischen Proben eine hohe Varianz auf. **B:** Der dem *Bucket* bei 1.08 ppm zugehörige Metabolit zeigt erhöhte Konzentrationen in Walnüssen aus nicht-europäischen Ländern. **C:** Das *Bucket* bei 3.44 ppm zur Unterscheidung von Proben aus Deutschland und der Schweiz. **D:** Acetat (**19**) zeigt einen Einfluss bei der Unterscheidung von Proben aus Deutschland und der Schweiz.

Das *Bucket* bei 2.05 ppm im Bereich der Fettsäuren wurde bei der Unterscheidung von Proben aus europäischen und nicht-europäischen Ländern als relevant identifiziert (**A**). Hierbei ist auffällig, dass die Varianz der skalierten Werte der *Buckets* bei den Proben aus nicht-europäischen Ländern hoch ist, was vermutlich auf die geographische Breite zurückgeführt werden kann. Die Varianz der skalierten Werte des *Buckets* bei 1.08 ppm ist bei den Proben aus nicht-europäischen Ländern ebenfalls höher als bei den Proben aus europäischen Ländern (**B**). Drei weitere Beispiele von *Buckets*, bei denen dies deutlich wird, sind im Anhang (Abschnitt 8.7.4) aufgeführt. Bei der Unterscheidung von Walnussproben aus europäischen und nicht-europäischen Ländern wurden anhand des Modells auf Basis der weniger polaren Extraktionsmethode A 16.9% der 188 europäischen Proben und 26.8% der 47 nicht-europäischen Proben falsch zugeordnet. Anhand der polaren Extraktion wurden 1.8% der

Ergebnisse und Diskussion

europäischen und 53.2% der nicht-europäischen Proben falsch klassifiziert. Bei der Klassifizierung auf Basis dieser polaren Extraktionsmethode B wurden die falschen Zuordnungen von europäischen Walnussproben auf drei französische Walnussproben (FR-048, FR-049, FR-057), eine Probe aus Ungarn sowie italienische Proben zurückgeführt. Hierbei lagen die prozentualen Anteile der falsch zugeordneten Proben bei 64.7% aus Italien, 29.4% aus Frankreich und 5.9% aus Deutschland. Die zuvor genannten französischen Proben sowie weitere französischer Herkunft wurden ebenfalls bei der weniger polaren Extraktion falsch klassifiziert. Hierbei lagen die höchsten prozentualen Anteile der falsch zugeordneten Proben bei 64% aus Italien, ca. 15% aus Frankreich und ca. 6% aus Deutschland. Die restlichen ca. 15% der falsch zugeordneten Proben verteilen sich auf die Länder Schweiz und Ungarn.

Bei der Unterscheidung von Walnussproben aus Deutschland und der Schweiz wurden anhand des Modells auf Basis der weniger polaren Extraktionsmethode A insgesamt 7.3% der 49 deutschen Proben falsch zugeordnet. Hierbei wurde die Probe DE-043 fünfmal falsch klassifiziert. Die Probe DE-043 stammt aus Baden-Württemberg, was die häufige falsche Zuordnung erklären könnte. Zudem wurde die Probe DE-048 (Herkunft: Hessen) insgesamt fünfmal falsch klassifiziert. Mit dem Modell auf Basis der polaren Extraktion wurde ein höherer Anteil von 9.4% der deutschen Proben falsch klassifiziert. Die zuvor genannten deutschen Proben wurden immer richtig klassifiziert, stattdessen wurden jedoch weitere Proben (z.B. DE-015 und DE-027) deutscher Herkunft falsch zugeordnet. Für die Unterscheidung von Walnussproben aus Deutschland und der Schweiz ist der Box-Whisker-Plot des *Buckets* bei 3.44 ppm dargestellt, welcher als relevant identifiziert wurde (**C**). Im polaren Extrakt wurde beispielsweise Acetat (**19**) als relevant für die Unterscheidung identifiziert (**D**).

Ergebnisse und Diskussion

Die Box-Whisker-Plots der weiteren Klassifizierungen sind in Abbildung 62 dargestellt. Die den *Buckets* zugehörigen Metaboliten wurden nicht identifiziert und dienen als Beispiel für relevante *Buckets*.

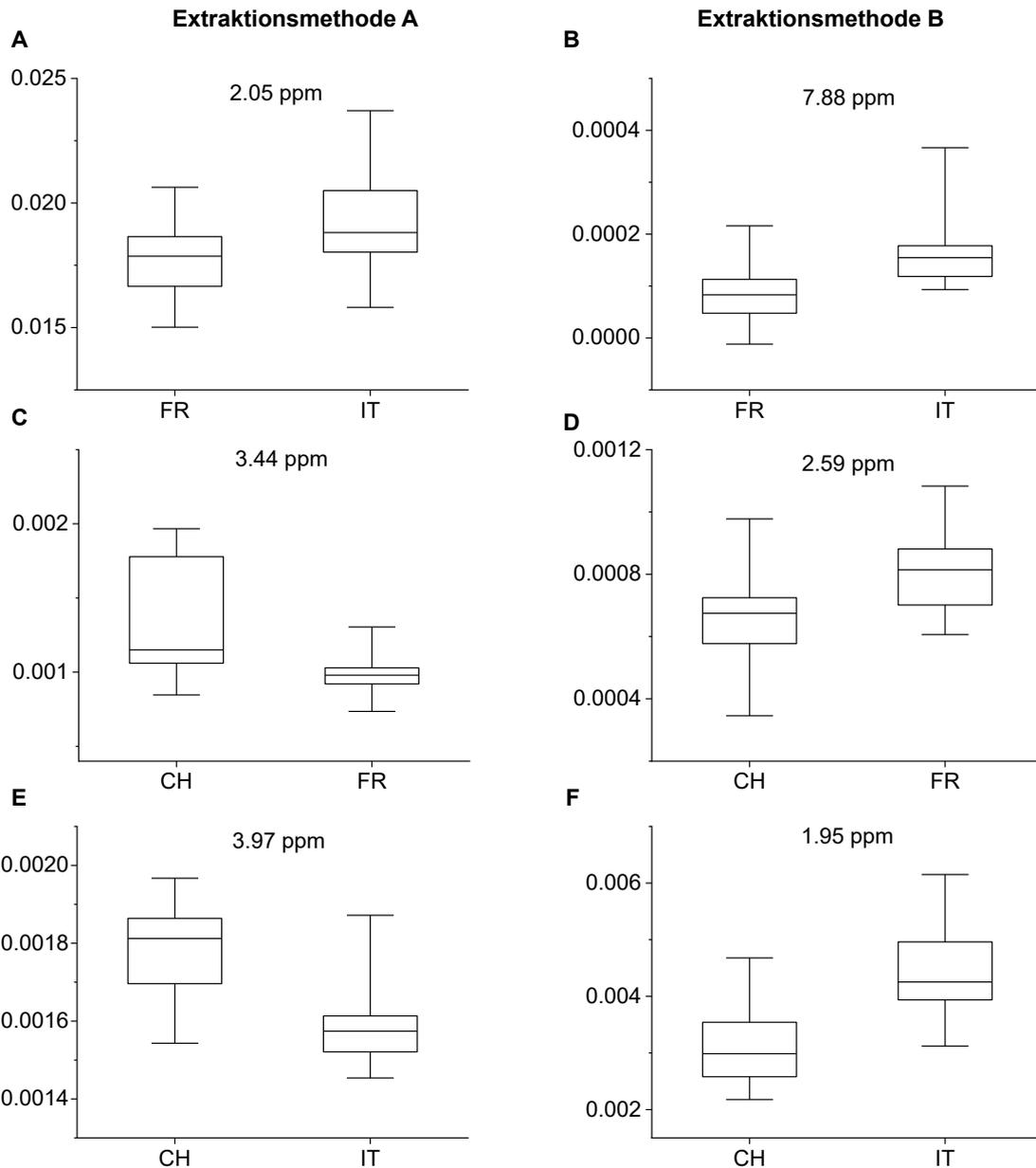


Abbildung 62: Es sind die Box-Whisker-Plots von relevanten *Buckets* für die Unterscheidung von Walnüssen aus zwei unterschiedlichen Ländern dargestellt. Diese zeigen die skalierten Werte der ausgewählten *Buckets*. Links: Extraktionsmethode A, Rechts: Extraktionsmethode B. **A:** Das *Bucket* bei 2.05 ppm konnte keinem Metaboliten zugeordnet werden. Dieser weist in italienischen Proben erhöhte Konzentrationen auf. **B:** Das *Bucket* bei 7.88 ppm ist relevant für die Unterscheidung von französischen und italienischen Proben, da der zugehörige Metabolit in italienischen Proben eine erhöhte Konzentration aufweist. **C:** Das *Bucket* bei 3.44 ppm zur Unterscheidung von Proben aus Frankreich und der Schweiz. **D:** Dem *Bucket* bei 2.59 ppm wurde noch kein Metabolit zugeordnet. Dieser ist bei der Unterscheidung von Walnussproben aus der Schweiz und aus Frankreich relevant, da er eine erhöhte Konzentration in französischen Proben aufweist. **E:** Dem *Bucket* bei 3.97 ppm konnte kein Metabolit zugeordnet werden. Dieser weist in Proben aus der Schweiz vergleichsweise geringfügig höhere Konzentrationen auf als in Proben aus Italien. **F:** Das *Bucket* bei 1.95 ppm ist relevant für die Unterscheidung von Proben aus Italien und der Schweiz, da der zugehörige Metabolit in italienischen Proben eine erhöhte Konzentration aufweist.

Ergebnisse und Diskussion

Als exemplarisches Beispiel für ein relevantes *Bucket* für die Unterscheidung von französischen und italienischen Proben ist das *Bucket* bei 2.05 ppm dargestellt (**A**). Diesem konnte kein Metabolit zugeordnet werden, dieser zeigte jedoch eine geringfügig erhöhte Konzentration in Proben aus Italien. Hierbei fällt zudem auf, dass die Varianz der skalierten Werte des *Buckets* in beiden Fällen deutlich geringer ist als im Vergleich zum zuvor gezeigten Beispiel der Proben aus nicht-europäischen Ländern. Bei der Unterscheidung der Proben anhand des polaren Extraktes wurde eine erhöhte Konzentration eines noch nicht zugeordneten Metaboliten des *Buckets* bei 7.88 ppm für italienische Proben beobachtet (**B**). Bei der Klassifizierung auf Basis der polaren Extraktionsmethode B wurden 23.6% der 33 Proben aus Italien und 4.1% der 64 Proben aus Frankreich falsch zugeordnet. Auch anhand der weniger polaren Extraktion wurde ein ähnlicher Anteil von 19.4% der italienischen und 7.5% der französischen Proben falsch zugeordnet. Bei der Klassifizierung auf Basis des Modells des polaren Extraktes wurden die Falschzuordnungen auf vier verschiedene französische Proben (FR-032, FR-027, FR-051, FR-054) zurückgeführt. Diese wurden bei der Klassifizierung anhand der weniger polaren Extraktion immer richtig zugeordnet, stattdessen wurde jedoch eine Vielzahl anderer Proben aus Frankreich falsch klassifiziert. Die Probe IT-030 wurde in allen fünf Splits beider Extraktionsmethoden falsch zugeordnet.

Bei der Klassifizierung von Walnussproben aus Frankreich und der Schweiz wurden mit dem Modell auf Basis der weniger polaren Extraktionsmethode A 3.4% der 64 französischen und ein hoher Anteil von 35.5% der 31 Proben aus der Schweiz falsch klassifiziert. Die Anteile der falschen Klassifizierung anhand des Modells auf Basis der polaren Extraktion lagen bei 5.3% der französischen und 35.5% der Proben aus der Schweiz. Die Proben FR-002 und FR-059 wurden bei der weniger polaren Extraktion in den gesamten fünf Splits falsch zugeordnet. Bei der Klassifizierung mittels des Modells der polaren Extraktionsmethode B wurde die Probe FR-002 ebenfalls fünfmal falsch klassifiziert, während die Probe FR-059 immer richtig zugeordnet wurde. In der polaren Extraktion wurden beispielsweise die Proben CH-006, CH-007 und CH-014 immer falsch zugeordnet, was ebenfalls bei der Klassifizierung mit der weniger polaren Extraktion beobachtet werden konnte. Die gesamten Proben aus der Schweiz stammen aus dem Kanton Thurgau, welcher ca. 105 km von der französischen Grenze entfernt liegt. Für die Unterscheidung von Walnussproben aus Frankreich und der Schweiz ist der Box-Whisker-Plot des *Buckets* bei 3.44 ppm dargestellt (**C**). Diesem und auch dem *Bucket* bei 2.59 ppm, welches exemplarisch für die polare Extraktion dargestellt ist, konnte noch kein Metabolit zugeordnet werden (**D**).

Ergebnisse und Diskussion

Bei der Unterscheidung von Walnussproben aus Italien und der Schweiz wurden anhand des Modells auf Basis der weniger polaren Extraktionsmethode A 3.6% der 33 italienischen Proben und 12.9% der 31 Proben aus der Schweiz falsch zugeordnet. Anhand der polaren Extraktion wurden 14.5% der italienischen und 14.2% der Proben aus der Schweiz falsch klassifiziert. Bei der Klassifizierung anhand des Modells auf Basis der weniger polaren Extraktion wurde die Probe IT-001 in vier der fünf Splits falsch zugeordnet. Diese italienische Probe wurde anhand des Modells auf Basis der polaren Extraktion lediglich einmal falsch klassifiziert. Bei der weniger polaren Extraktionsmethode A erfolgte in jedem Split die falsche Zuordnung der Probe CH-013. Diese wurde ebenfalls bei der Klassifizierung mit dem Modell auf Basis der polaren Extraktion immer falsch zugeordnet. Das *Bucket* bei 3.97 ppm wurde bei der Unterscheidung von Proben aus Italien und der Schweiz (Extraktionsmethode A) als relevant identifiziert (**E**). Der zugehörige, nicht identifizierte Metabolit zeigte eine geringfügig erhöhte Konzentration in den Proben aus der Schweiz. Bei der polaren Extraktion wurde das *Bucket* bei 1.95 ppm im aliphatischen Bereich als relevant identifiziert (**F**). Diesem *Bucket* wurde ebenfalls kein Metabolit zugeordnet, dieser zeigte im Vergleich erhöhte Konzentration in den Proben aus Italien.

Insgesamt wurden für beide Extraktionsmethoden ähnliche Trends bei der falschen Klassifizierung von Proben festgestellt. Es zeigte sich, dass die Klassifizierungen von Proben anhand der Modelle auf Basis des polaren und weniger polaren Extraktes mit jeweils hohen Zuordnungsgenauigkeiten erfolgte. Bei insgesamt fünf der neun Klassifizierungsmodelle von Walnussproben konnte eine höhere Zuordnungsgenauigkeit mit dem Modell auf Basis des polaren Extraktes erzielt werden. Beide Extraktionsmethoden eignen sich demnach zur Erstellung eines Modells zur geographische Herkunftsbestimmung von Walnüssen.

6.2. Untersuchung von Mischungen mit Erdnuss

Die Beimischung von günstigeren Lebensmittelwaren, wie zum Beispiel gemahlene Erdnüsse, in visuell ähnliche Lebensmittel zum Erzielen von höheren Gewinnen ist eine bekannte Problemstellung in der Lebensmittelindustrie.^[6] Bei der Verwendung von Erdnüssen besteht zusätzlich eine potentielle Gesundheitsgefährdung für Verbraucher, die sich beispielsweise durch eine Allergie ausgelöste Anaphylaxie äußern kann.^[7] Hierbei ist die Entwicklung von Methoden notwendig, mit denen qualitativ und quantitativ wirtschaftlich relevante Beimischungen detektiert werden können. Die NMR-Spektroskopie bietet bei der Fragestellung eine Alternative zu herkömmlichen Methoden, da durch kurze Analysenzeiten ein hoher Probendurchsatz möglich ist.^[11] Des Weiteren bietet sie den Vorteil, dass gleichzeitig eine Strukturaufklärung von potentiellen chemischen Markern, durch die Möglichkeit der Anwendung unterschiedlicher Experimente, erfolgen kann.^[11] Von Verfälschung betroffene Lebensmittel können auf Grund visueller und chemischer Ähnlichkeit beispielsweise Haselnüsse, Mandeln und Walnüsse sein. Die in diesem Kapitel gezeigten Ergebnisse zur Untersuchung von Verfälschungen mit Erdnüssen wurden im Rahmen von zwei Bachelorarbeiten durchgeführt.^[107,108]

6.2.1. Extraktionen

Mit Hilfe der NMR-Spektroskopie können Erdnussbeimischungen detektiert werden, wenn ein entsprechender Indikator isoliert im NMR-Spektrum vorhanden ist. Durch die kurze Analysenzeit bietet sich hierbei die Aufnahme von ¹H-NMR-Spektren an. Zur Methodenentwicklung wurde eine handelsübliche Erdnussprobe erworben und von dieser geschälte Kerne vermahlen und lyophilisiert. Als erster Schritt sollte eine geeignete Extraktionsmethode entwickelt werden, mit der sichtbare Unterschiede in den verschiedenen Spektren erkennbar sind. Dies dient der Identifizierung eines geeigneten essentiellen Markers, der zur Analyse von Erdnuss als Verfälschungsmittel Anwendung finden soll. Zunächst wurden die ¹H-NMR-Spektren eines Walnuss- und Erdnussextraktes zum Vergleich gemessen, um eine geeignete Extraktionsmethode festzulegen und abschließend auf weitere Lebensmittel, wie Mandeln und Haselnüssen, zu übertragen. Demnach wurden Walnuss- und Erdnussslyophilisat mit deuterierten Lösungsmitteln und -gemischen, wie Acetonitril-*d*₃, Methanol-*d*₄, Acetonitril-*d*₃/Methanol-*d*₄ (1:1) und Phosphatpuffer (pH = 7)/Methanol-*d*₄/Chloroform-*d* (5:4:6), extrahiert und vermessen. Die erhaltenen NMR-Spektren wurden verglichen, um potentielle Marker-Signale zu ermitteln und eine Extraktionsmethode für weitere Analysen festzulegen.

Ergebnisse und Diskussion

In Abbildung 63 sind die beiden ^1H -NMR-Spektren des Erdnuss- und Walnussextraktes, auf Basis der Methanol- d_4 -Extraktion, gegenübergestellt.

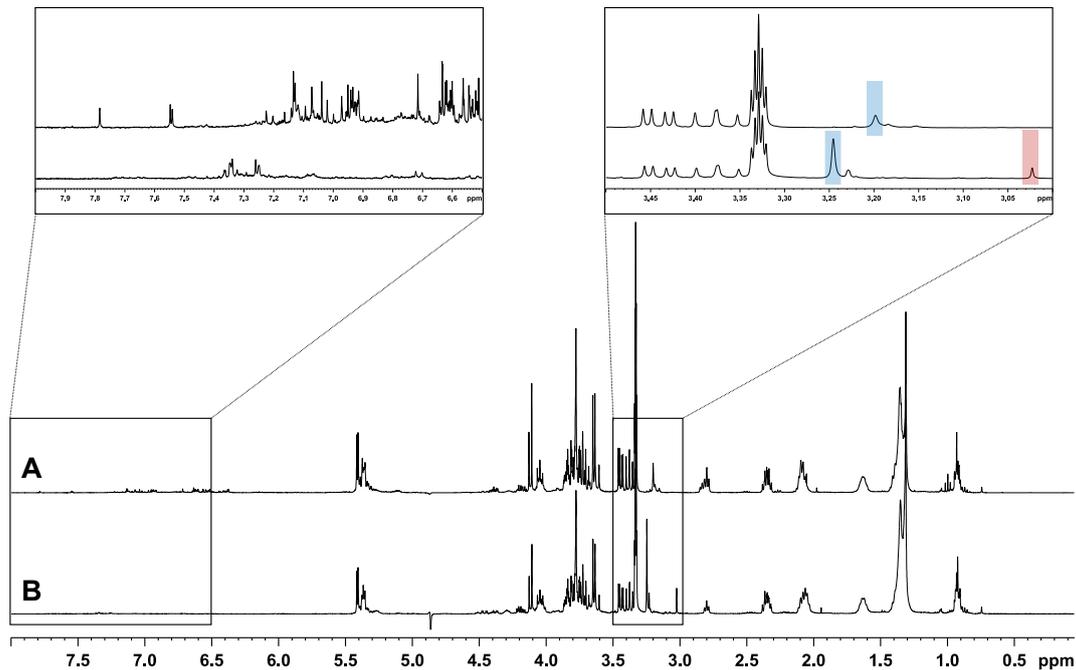


Abbildung 63: Das ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz, NS = 128) der Methanol-Extraktion des Walnuss- (**A**) und des Erdnussextraktes (**B**). Beispielhafte Signale, die nur im Spektrum **B** auftreten, sind ein Singulett bei 3,00 ppm sowie das blau markierte Singulett des bekannten Metaboliten Cholins (**12**) bei 3,23 ppm. Das Singulett des Cholins (**12**) ist im Spektrum des Walnusssyophilisats (**A**) mit einer geringeren chemischen Verschiebung von 3,19 ppm zu erkennen. Da im Spektrum des Walnussextraktes deutlich mehr Signale vorzufinden sind, unterscheidet sich der aromatische Bereich der NMR-Spektren.

Die NMR-Spektren weisen Gemeinsamkeiten hinsichtlich der Signale auf, die im aliphatischen Bereich auftreten und Fettsäuren zugeordnet werden können. Zudem treten in den Spektren der beiden Lebensmittel Signale von Saccharose (**6**) auf. Ein Unterschied ist jedoch im Signalbereich von 2,90 – 3,30 ppm erkennbar. Zum einen tritt ein Singulett bei 3,00 ppm im Spektrum des Erdnussextraktes (**B**) auf, welches nicht im Extrakt der Walnuss vorzufinden ist. Des Weiteren weist das Singulett des Metaboliten Cholins (**12**) im Spektrum des Walnussextraktes (**A**) mit 3,19 ppm eine geringere chemische Verschiebung, im Vergleich zum ^1H -NMR-Spektrum des Erdnussextraktes bei 3,23 ppm, auf. Im aromatischen Bereich des ^1H -NMR-Spektrums des Walnussextraktes treten mehr Signale auf, was in Abbildung 63 im vergrößerten Ausschnitt von 6,50 – 8,00 ppm zu erkennen ist. Diese sind für die Problemstellung jedoch nicht relevant, da ein Signal nur als Marker dienen kann, wenn es spezifisch im ^1H -NMR-Spektrum des Erdnussextraktes auftritt. Diese Extraktionsmethode eignet sich dennoch auf Grund des Singuletts bei 3,00 ppm potentiell für weitere Analysen beim Vergleich von Walnuss/Erdnuss.

Ergebnisse und Diskussion

Anschließend wurden beide Lyophilisate mit deuteriertem Acetonitril extrahiert und die Extrakte mittels NMR-Spektroskopie vermessen. Die ^1H -NMR-Spektren sind in Abbildung 64 gegenübergestellt.

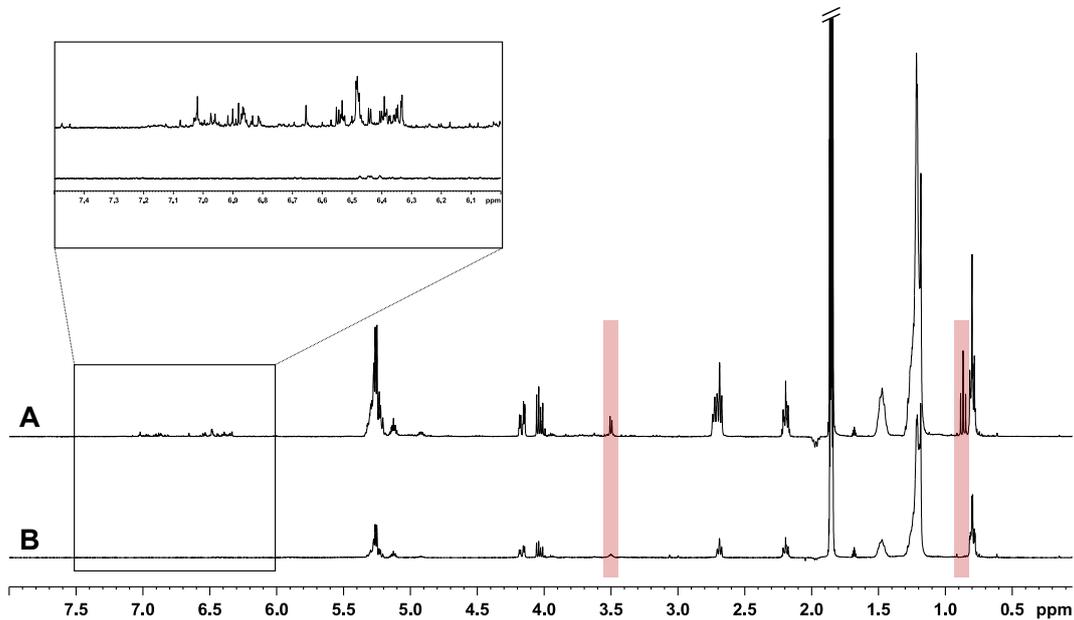


Abbildung 64: Die ^1H -NMR-Spektren (400 MHz, NS = 128) der Acetonitril-Extrakte von Walnüssen (**A**) sowie Erdnüssen (**B**). Die NMR-Spektren wurden auf das OMS-Signal bei 0.085 ppm kalibriert. Sie zeigen in den farblich gekennzeichneten Bereichen ein unterschiedliches Signalmuster, wie z.B. bei einer chemischen Verschiebung von 3.58 ppm. Des Weiteren ist im Spektrum des Walnussextraktes (**A**) ein Triplett bei einer chemischen Verschiebung von 0.95 ppm zu erkennen, während im Spektrum des Erdnussextraktes (**B**) kein Signal zu beobachten ist. Der aromatische Bereich des ^1H -NMR-Spektrums des Walnussextraktes (**A**) weist deutlich mehr Signale auf. Die Spektren sind, bezogen auf das Signalmuster, vergleichbar und weisen jedoch keine für die Problemstellung relevanten Unterschiede auf, da keine Signale ausschließlich im Spektrum des Erdnussextraktes (**B**) vorkommen.

Bei der Extraktion mit Acetonitril- d_3 wurde OMS ($\delta = 0.085$ ppm) als interner Standard zugesetzt. Beide Spektren sind vergleichbar und weisen hauptsächlich Signale von Fettsäuren, beispielsweise zwischen 0.5 und 3.0 ppm, auf. Der aromatische Bereich weist Unterschiede auf, da im Spektrum des Walnussextraktes (**A**) viele Signale enthalten sind, die im Extrakt **B** nicht vorzufinden sind. Auch bei einer chemischen Verschiebung von 0.95 ppm konnte ein für Walnüsse spezifisches Signal beobachtet werden, welches für die Problemstellung jedoch nicht relevant ist. Des Weiteren zeigten die Spektren bei einer chemischen Verschiebung von 3.58 ppm Unterschiede im Signalmuster. Da keine spezifischen Signale im Spektrum des Erdnussextraktes (**B**) auftreten, kann diese Extraktionsmethode nicht für weitere Analysen verwendet werden.

Ergebnisse und Diskussion

Anschließend wurden beide Lebensmittel jeweils mit einem Gemisch aus Methanol- d_4 und Acetonitril- d_3 im Verhältnis 1:1 extrahiert. Hierbei wurde ebenfalls OMS ($\delta = 0.085$ ppm) als interner Standard verwendet. In Abbildung 65 sind die beiden $^1\text{H-NMR}$ -Spektren zunächst im Vergleich dargestellt.

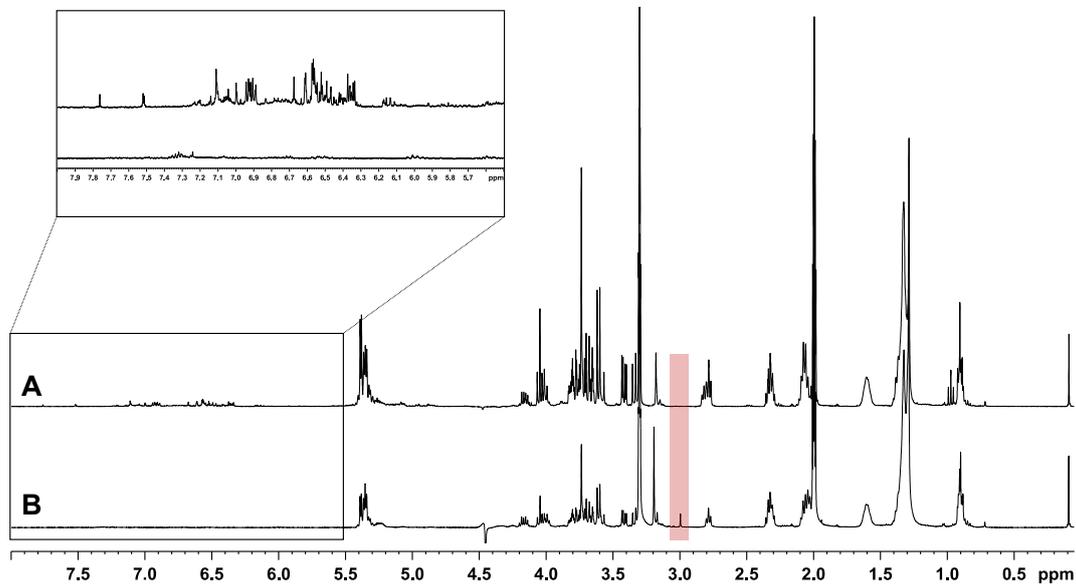


Abbildung 65: Die $^1\text{H-NMR}$ -Spektren (400 MHz, NS = 128) der Extrakte, die mit einem Gemisch aus Methanol- d_4 und Acetonitril- d_3 im Verhältnis 1:1 erhalten wurden. Die NMR-Spektren wurden auf das OMS-Signal bei 0.085 ppm kalibriert. Sie zeigen kaum Unterschiede, lediglich im aromatischen Bereich weist das Spektrum des Walnuss-extraktes (**A**) mehr Signale auf als das Spektrum des Erdnussextraktes (**B**). Wie auch bei der Extraktion mit Methanol- d_4 konnte ein Singulett, in diesem Fall bei einer chemischen Verschiebung von 2.99 ppm im Spektrum des Erdnussextraktes (**B**), beobachtet werden.

Im Spektrum des Walnuss-extraktes (**A**) sind im aromatischen Bereich deutlich mehr Signale vorzufinden als im Spektrum des Erdnussextraktes (**B**), diese sind für die Problemstellung jedoch nicht relevant. Insgesamt gleichen sich die Spektren zu denen, die bei der Extraktion mit Acetonitril- d_3 erhalten wurden, denn es wurden ebenfalls Signale von Fettsäuren detektiert. Durch den Zusatz von Methanol- d_4 als polares Lösungsmittel wurden jedoch zusätzlich Metaboliten, wie Saccharose (**6**) und Glucose, extrahiert. Es konnte lediglich ein potentiell als Marker geeignetes Singulett bei einer chemischen Verschiebung von 2.99 ppm im Spektrum des Erdnussextraktes (**B**) beobachtet werden, welches jedoch eine geringe Intensität aufweist. Es treten keine weiteren geeigneten Signale auf, die spezifisch auf den Zusatz von Erdnüssen hinweisen können. Diese Extraktionsmethode ist auf Grund der vergleichsweise geringen Intensität des relevanten Signals nur bedingt geeignet zur weiteren Analyse von Mischungen.

Abschließend wurden die Lyophilisate mittels eines Gemisches aus deuteriertem Phosphatpuffer, Methanol- d_4 und Chloroform- d im Verhältnis 5:4:6 extrahiert. Als Standard wurde hierbei TSP- d_4 ($\delta = 0.00$ ppm) verwendet. Die polaren Extrakte wurden anschließend mittels NMR-Spektroskopie vermessen und verglichen. In Abbildung 66 sind die ^1H -NMR-Spektren der polaren Extrakte gegenübergestellt.

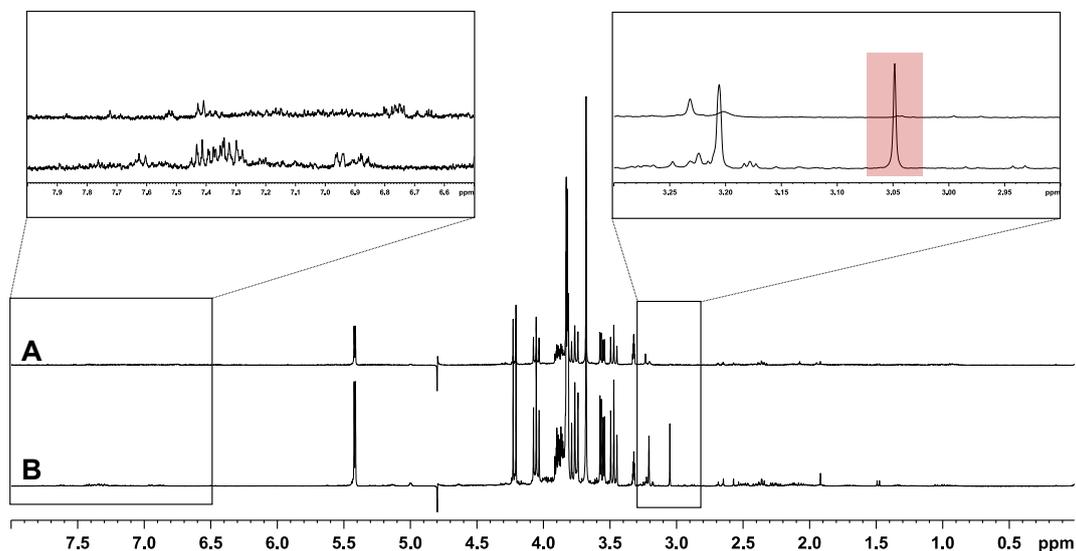


Abbildung 66: Die ^1H -NMR-Spektren (400 MHz, NS = 128) der polaren Extrakte des Walnuss- (**A**) sowie Erdnusslyophilisats (**B**). Die NMR-Spektren wurden auf das TSP- d_4 -Signal bei 0.00 ppm kalibriert. Durch Verwendung von polaren Lösungsmitteln konnte eine Vielzahl an Metaboliten extrahiert werden, was anhand der hohen Anzahl von diversen Signalen zu erkennen ist. Die Extraktion ist für die weitere Analyse von Gemischen geeignet, da bei 3.05 ppm ein Singulett hoher Intensität auftritt, welches ausschließlich im Spektrum des Erdnussextraktes (**B**) zu erkennen ist. Das Spektrum des Walnussextraktes (**A**) weist bei einer chemischen Verschiebung von 3.04 ppm ein Dublett geringer Intensität auf.

Anhand des Vergleichs der ^1H -NMR-Spektren wird deutlich, dass die Extraktion (Phosphatpuffer/Methanol- d_4 /Chloroform- d) für die folgende Analyse von Gemischen mittels NMR-Spektroskopie geeignet ist, da im Spektrum des Erdnussextraktes (**B**) bei einer chemischen Verschiebung von 3.05 ppm ein Singulett hoher Intensität zu erkennen ist. Hierbei ist anzumerken, dass im Spektrum des Walnussextraktes (**A**) bei einer ähnlichen chemischen Verschiebung von 3.04 ppm ein Dublett geringerer Intensität vorzufinden ist, was in folgenden Gemischanalysen berücksichtigt werden sollte. Das Singulett bei 3.05 ppm ist dennoch als Marker für den Zusatz von Erdnuss geeignet. Vermutlich ist dieser Marker identisch zu dem potentiellen Markersignal im methanolischen Erdnussextrakt.

Bei den zwei polaren Extraktionen (Phosphatpuffer/Methanol- d_4 /Chloroform- d und Methanol- d_4) handelt es sich demnach um geeignete Methoden, da die erhaltenen ^1H -NMR-Spektren einen Marker in Form eines isoliert aufgelösten Singuletts, der auf den Zusatz von Erdnuss hinweisen könnte, aufweisen. Nachdem geeignete Extraktionsmethoden aus-

gearbeitet wurden, sollte als nächstes die Stabilität der ausgewählten Extrakte überprüft werden.

6.2.2. Stabilitätsmessung

Die Stabilität von Extrakten spielt eine wichtige Rolle, da eine Veränderung von Signalen im Spektrum mit der Zeit bei einer hohen Probenanzahl und somit potentiell längeren Standzeiten nicht erwünscht ist. Da beide $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der polaren Extraktionsmethoden den ausgewählten Marker als Hinweis auf den Zusatz von Erdnuss enthalten, wurde für beide Extrakte eine Stabilitätsmessung durchgeführt. Hierbei wurden die Extrakte bei Raumtemperatur sowohl am Tag der Extraktion als auch an allen folgenden Tagen gemessen bis die Messreihe nach einer Woche beendet wurde.

Methanol-Extrakt

Ein Ausschnitt der Spektren der Stabilitätsmessung des Methanol-Extraktes von Erdnüssen ist als Beispiel in Abbildung 67 dargestellt.

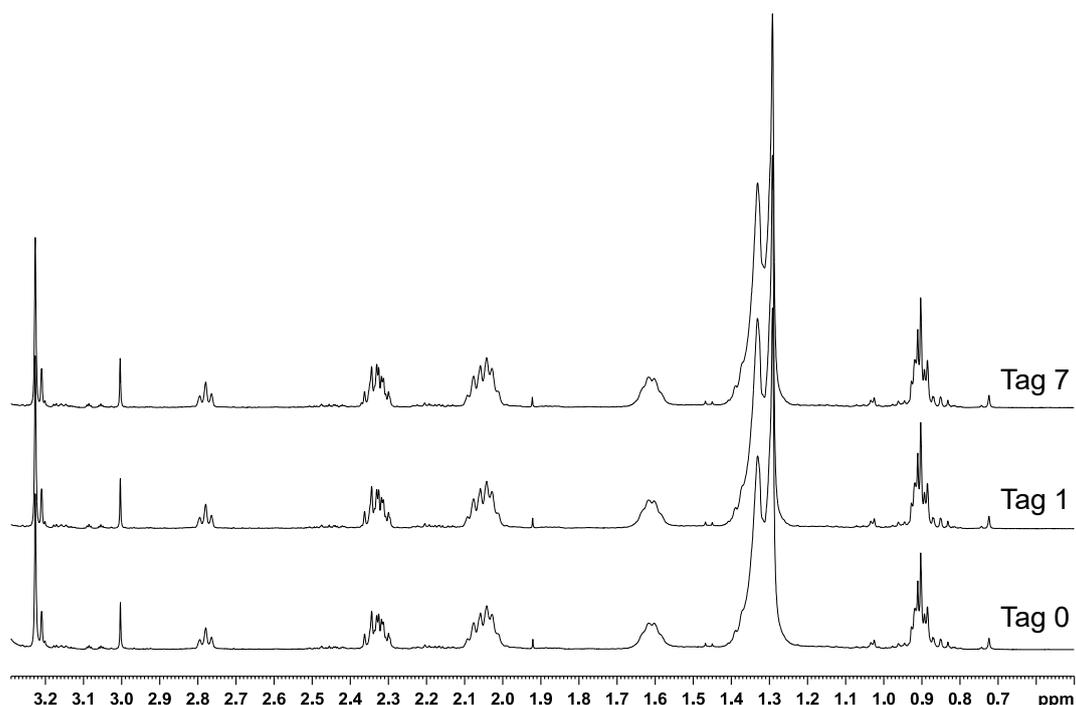


Abbildung 67: Ausschnitt der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren (400 MHz, NS = 128) des Extraktes der Erdnuss, welche bei der Stabilitätsmessung erhalten wurden. Als Beispiel ist der aliphatische Bereich von 0.50 – 3.30 ppm der Spektren, die am Tag der Extraktion (Tag 0), am Folgetag (Tag 1) und nach einer Woche (Tag 7) gemessen wurden, dargestellt. Es ist zu sehen, dass keine Veränderung der Signale innerhalb der ersten sieben Tage bei Raumtemperatur zu beobachten sind und das Methanol-Extrakt demnach eine ausreichende Stabilität aufweist.

Bei der Stabilitätsmessung des Erdnussextraktes, welches durch Verwendung von Methanol- d_4 erhalten wurde, sind keine sichtbaren Veränderungen der Signale in den ersten sieben Tagen nach der Extraktion zu erkennen. Das Singulett bei 3.00 ppm des potentiellen

Ergebnisse und Diskussion

Markers weist ebenfalls keine Intensitätsänderung auf, weshalb die Extraktionsmethode für die analytische Fragestellung geeignet ist.

Anschließend wurde die Stabilität des methanolischen Walnussextraktes über eine Woche bei Raumtemperatur überprüft. In Abbildung 68 ist ein Ausschnitt der Spektren der Stabilitätsmessung des Walnussextraktes dargestellt. Hierbei sind relevante Bereiche, die Veränderungen in Signalintensitäten aufweisen, farblich hervorgehoben.

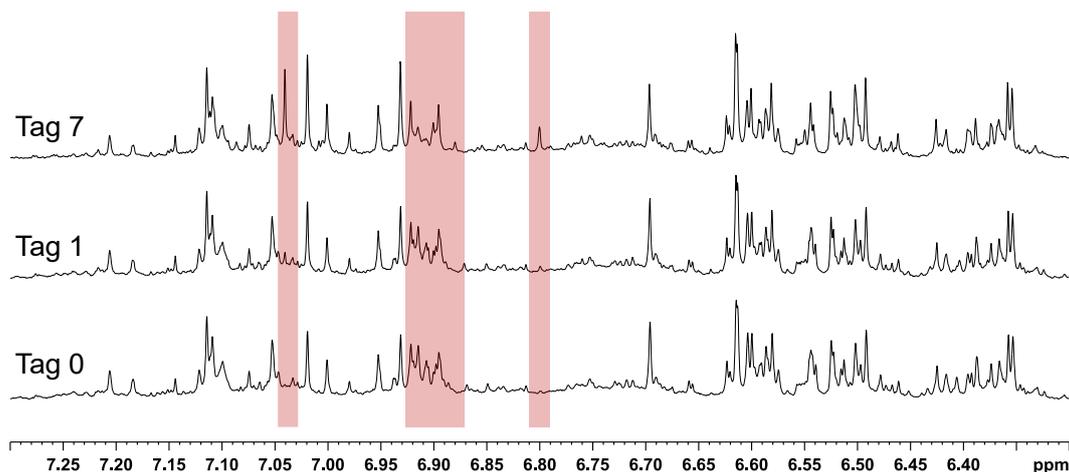


Abbildung 68: Ausschnitt des aromatischen Bereichs von 6.30 – 7.30 ppm der ^1H -NMR-Spektren (400 MHz, NS = 128) der Stabilitätsmessung des methanolischen Extraktes der Walnuss. Beispielhaft dargestellt sind die Spektren, die am Tag der Extraktion (Tag 0), am Folgetag (Tag 1) und nach einer Woche (Tag 7) gemessen wurden. Bereiche, in denen Veränderungen der Signalintensitäten beobachtet werden konnten, sind farblich hervorgehoben. Das Walnussextrakt weist wenige Bereiche auf, in denen Veränderungen der Signalintensitäten beobachtet werden konnten.

Im Vergleich zum NMR-Spektrum des Walnussextraktes, welches am Tag der Extraktion gemessen wurde, weist das Spektrum des Folgetages wenige Veränderungen in den Signalintensitäten auf. Diese sind in der Abbildung 68 farblich hervorgehoben. Hierzu zählt beispielsweise ein Singulett bei einer chemischen Verschiebung von 7.04 ppm, dessen Intensität zunimmt. Die Zunahme ist innerhalb von einem Tag jedoch sehr gering und nach sieben weiteren Tagen bei Raumtemperatur weist das Singulett eine starke Intensitätszunahme auf. Ebenfalls treten Veränderungen im Bereich von 6.87 – 6.93 ppm auf. Auch bei einer chemischen Verschiebung von 6.80 ppm ist die Intensitätszunahme eines Singuletts zu beobachten. Außerdem traten bei vier Signalen (3.19 ppm (s), 7.52 ppm (d), 7.76 ppm (s), 8.52 ppm (s)) geringe Signal-*shifts* auf. Insgesamt ist das Extrakt jedoch, ausgenommen von wenigen Bereichen im Tieffeld, stabil.

Phosphatpuffer/Methanol- d_4 /Chloroform- d -Extrakt

Es wurde eine Stabilitätsmessung des polaren Extraktes durchgeführt, welches mit Verwendung eines Gemisches aus deuteriertem Phosphatpuffer, Methanol- d_4 und Chloroform- d (5:4:6) erhalten wurde. Die Stabilitätsmessung erfolgte analog zu der des methanolischen Extraktes. In Abbildung 69 sind ausgewählte ^1H -NMR-Spektren der Stabilitätsmessung des Erdnussextraktes zum Vergleich dargestellt.

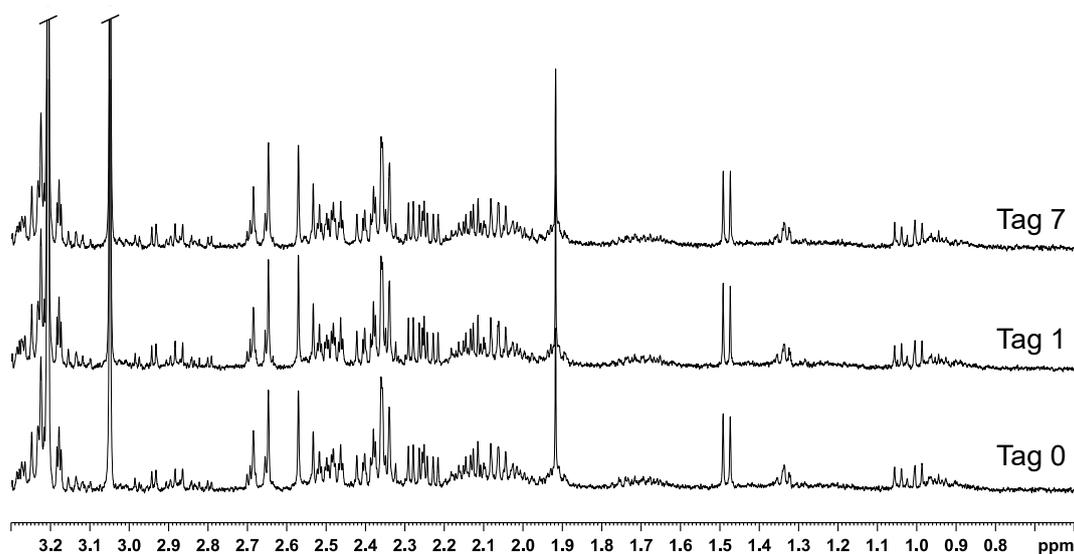


Abbildung 69: Ausschnitt der ^1H -NMR-Spektren (400 MHz, NS = 128) der durchgeführten Stabilitätsmessung des Erdnussextraktes (Phosphatpuffer/Methanol- d_4). Dargestellt ist der aliphatische Bereich von 0.60 – 3.30 ppm der NMR-Spektren, die am Tag der Extraktion (Tag 0), am Folgetag (Tag 1) und nach einer Woche (Tag 7) gemessen wurden. Da im gesamten Spektrum keine Änderungen der Signalintensitäten über die Zeit bei Raumtemperatur festgestellt werden konnten, weist das Extrakt eine ausreichende Stabilität auf.

Das polare Extrakt des Erdnuslyophilisats weist bei einer Lagerung von einer Woche bei Raumtemperatur keine Veränderungen der Signalintensitäten im ^1H -NMR-Spektrum auf und ist daher stabil. Auch das Singulett bei einer chemischen Verschiebung von 3.05 ppm ist stabil und eignet sich somit als Indikator für Erdnussbeimischungen. Die Extraktionsmethode kann demnach potentiell für weitere Analysen verwendet werden. Die Stabilitätsmessung des polaren Extraktes der Walnuss wurde bereits in Abschnitt 6.1.2 gezeigt. Bei dieser wurden lediglich wenige Veränderungen im aromatischen Bereich beobachtet, somit wies das Extrakt eine ausreichende Stabilität auf.

Die zwei unterschiedlichen polaren Extrakte der Erdnuss sind über einen Zeitraum von einer Woche bei einer Lagerung bei Raumtemperatur stabil. In den Extrakten der Walnuss konnten wenige Veränderungen der Intensitäten von Signalen im aromatischen Bereich der ^1H -NMR-Spektren nachgewiesen werden. Diese Instabilität im aromatischen Bereich ist jedoch vernachlässigbar, da der identifizierte Marker in einem anderen Bereich liegt und somit eine für die Fragestellung ausreichende Stabilität vorliegt. Somit weisen beide Extrakte eine

vergleichbare Stabilität auf. Im Folgenden sollten zusätzlich Mischungen, wie Erdnuss/Haselnuss sowie Erdnuss/Mandel, untersucht werden, weshalb als nächstes überprüft wurde, ob im Spektrum der Extrakte der weiteren Rohstoffe störende Signale im Bereich des Markers vorhanden sind.

6.2.3. Vergleich mit $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von Extrakten ähnlicher Lebensmittel

Nachdem ein für Beimischungen in Walnuss geeignetes Marker-Signal detektiert sowie die Stabilität der Extrakte überprüft wurde, sollte anschließend ermittelt werden, ob das Signal zusätzlich als Marker bei Extrakten ähnlicher Lebensmittel, wie zum Beispiel von Haselnüssen und Mandeln, geeignet ist. Hierbei kann das chemische Profil ähnlich sein und die visuelle Unterscheidung der gemahlenden Nüsse stellt eine Herausforderung dar. Des Weiteren wurden insgesamt zwölf Erdnussextrakte unterschiedlicher Herkunft (USA, Ägypten, Israel, Südafrika) untersucht, um sicherzustellen, dass das Marker-Signal nicht nur zufällig in der zuvor verwendeten Erdnussprobe vorkommt.

Es wurden zunächst Proben der vier unterschiedlichen Nüsse mit Methanol- d_4 extrahiert und die $^1\text{H-NMR}$ -Spektren verglichen. In Abbildung 70 sind die $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der Extrakte gegenübergestellt.

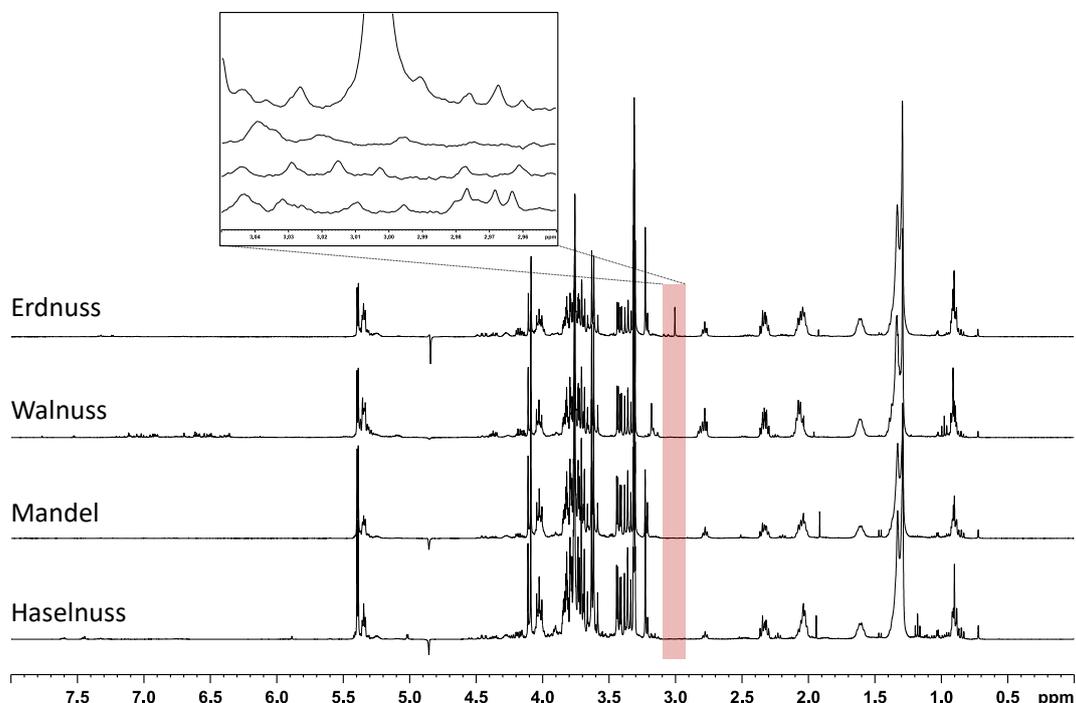


Abbildung 70: $^1\text{H-NMR}$ -Spektren (400 MHz, NS = 128) der unterschiedlichen Lebensmittelextrakte. Der Bereich des Markers (rot) um 3.00 ppm ist vergrößert dargestellt. Hierbei ist zu erkennen, dass im Bereich des potentiellen Erdnuss-Markers in den Spektren der Mandel und Haselnuss weitere Signale auftreten. Die polare Extraktionsmethode ist demnach nicht universell geeignet.

Ergebnisse und Diskussion

Anhand der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren ist zu erkennen, dass die Methanol- d_4 -Extraktionsmethode nur bedingt geeignet ist, da in den weiteren Spektren von Walnuss, Haselnuss und Mandel, die gemahlen eine visuelle Ähnlichkeit zu Erdnüssen aufweisen, Signale im Bereich des Markers auftreten, wenn auch nur von geringer Intensität. Daher wurden als nächstes die $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der polaren Extraktion mit deuteriertem Phosphatpuffer sowie Methanol- d_4 analysiert (Abbildung 71).

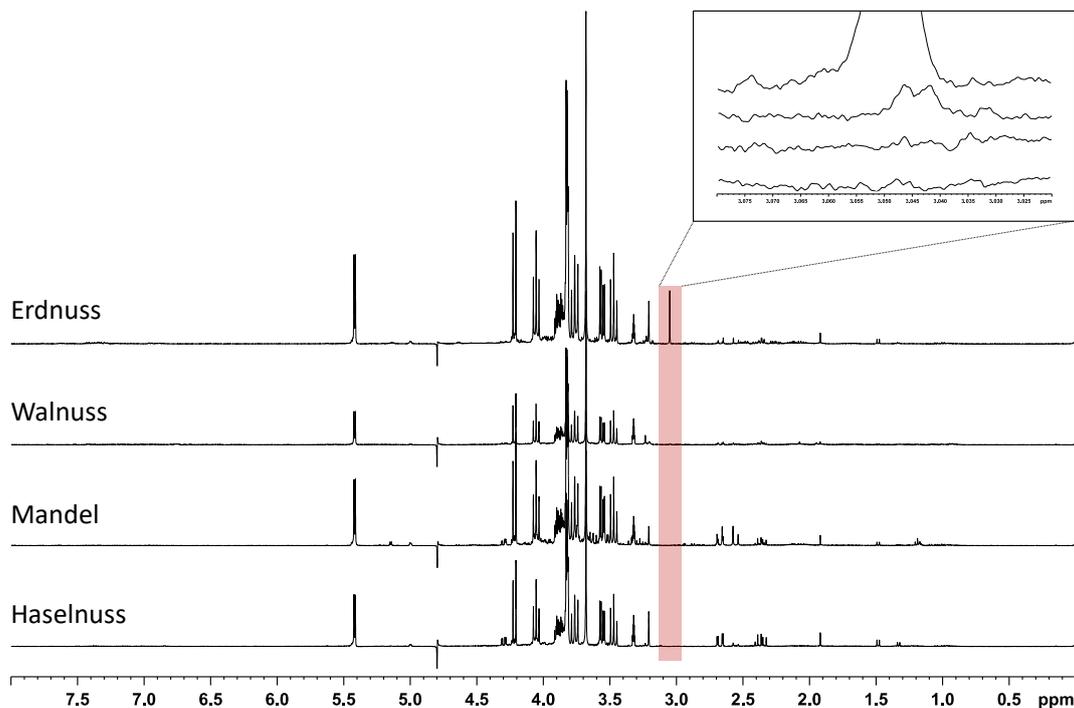


Abbildung 71: $^1\text{H-NMR}$ -Spektren (400 MHz, NS = 128) der unterschiedlichen Lebensmittelextrakte. Der Bereich des Markers (rot) ist vergrößert dargestellt. Lediglich im Spektrum des Walnussextraktes befindet sich ein Dublett geringer Intensität im Bereich des Markers. Die polare Extraktionsmethode ist für die Analyse von Mischungen geeignet.

Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des polaren Extraktes der Lebensmittel wurde hinsichtlich weiterer Signale untersucht. Hierbei wurden im Spektrum der Mandel und Haselnuss keine weiteren Signale im Bereich des Markers um 3,05 ppm detektiert, lediglich im Spektrum des Walnussextraktes wurde das bereits bekannte Dublett geringer Intensität bei 3,04 ppm erhalten. Da bei Verwendung des Methanol- d_4 Extraktes Signale sowohl im NMR-Spektrum des Mandel- als auch des Haselnussextraktes detektiert wurden, wurde diese Methode nicht weiter angewendet und die folgenden Analysen von Mischungen mit der Extraktion durch Verwendung eines Gemisches aus Phosphatpuffer, Methanol- d_4 und Chloroform- d durchgeführt.

Ergebnisse und Diskussion

Die Extrakte (Phosphatpuffer/Methanol- d_4 /Chloroform- d) der Mandel und Haselnuss wurden analog zum Walnuss- und Erdnussextrakt auf Stabilität überprüft. In Abbildung 72 sind ausgewählte Spektren der Stabilitätsmessung des Mandelextraktes dargestellt.

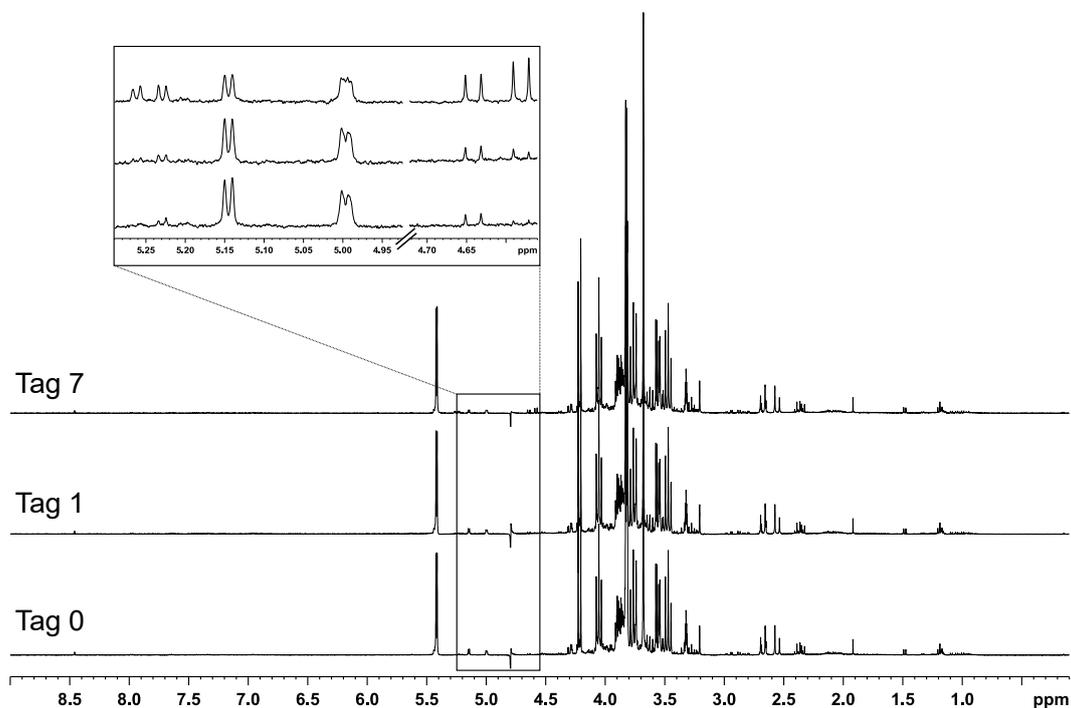


Abbildung 72: ^1H -NMR-Spektren (400 MHz, NS = 128) der durchgeführten Stabilitätsmessung des Mandelextraktes (Phosphatpuffer/Methanol- d_4) vom Tag der Extraktion (Tag 0), am Folgetag (Tag 1) und nach einer Woche (Tag 7). Der Bereich von 4.55 – 5.30 ppm, in dem Veränderungen detektiert wurden, ist vergrößert dargestellt. Das Extrakt weist insgesamt eine ausreichende Stabilität auf.

Im vergrößerten Ausschnitt der ^1H -NMR-Spektren sind Veränderungen von spezifischen Signalen zu erkennen. Es konnte bei zwei Dubletts bei einer chemischen Verschiebung von 4.58 ppm und 4.64 ppm eine Zunahme der Intensität über die Zeit bei Raumtemperatur detektiert werden. Dies wurde ebenfalls im Bereich von 5.22 – 5.27 ppm beobachtet. Das Dublett bei 5.15 ppm wies im ^1H -NMR-Spektrum nach einem Tag bei Raumtemperatur keine sichtbare Veränderung auf. Mit der Zeit konnte jedoch als Trend eine Intensitätsabnahme beobachtet werden. Insgesamt konnten keine weiteren sichtbaren Veränderungen in den ^1H -NMR-Spektren des Mandelextraktes beobachtet werden, daher weist es eine ausreichende Stabilität auf.

Ergebnisse und Diskussion

In Abbildung 73 ist die Stabilitätsmessung des Haselnussextraktes dargestellt, welches für eine Woche bei Raumtemperatur gelagert wurde.

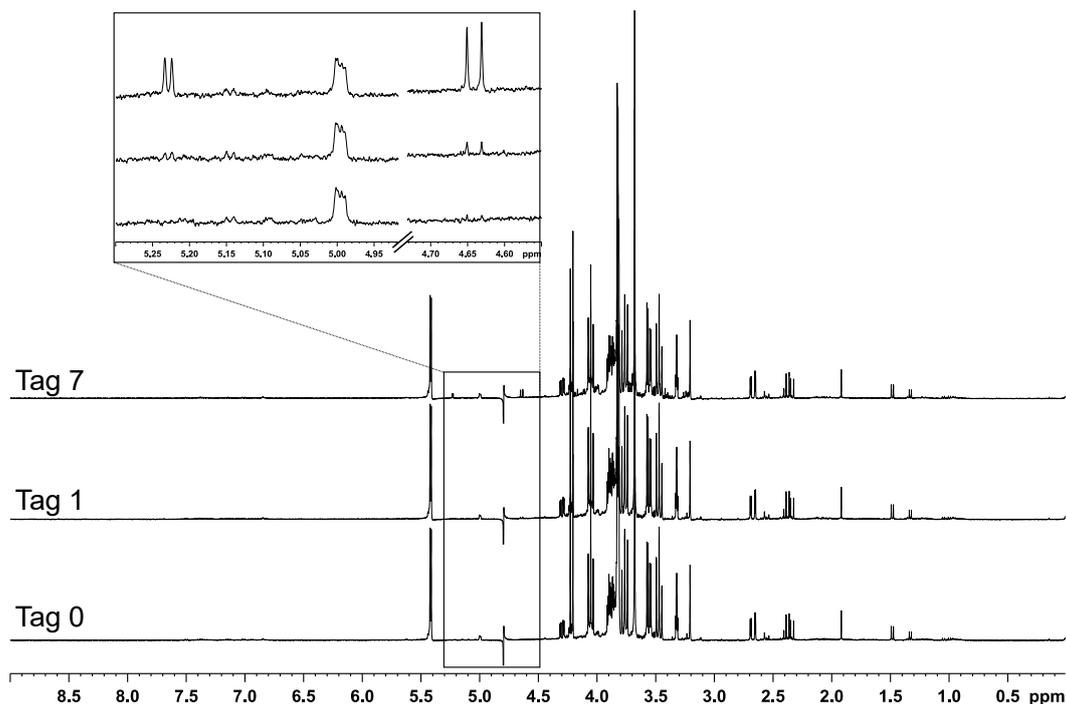


Abbildung 73: ¹H-NMR-Spektren (400 MHz, NS = 128) der durchgeführten Stabilitätsmessung des Haselnussextraktes (Phosphatpuffer/Methanol-*d*₄). Der Bereich von 4.55 – 5.30 ppm, in dem Veränderungen detektiert wurden, ist vergrößert dargestellt. Die Intensität der Dubletts bei 5.23 ppm und 4.64 ppm nimmt mit der Zeit bei Raumtemperatur zu.

Im vergrößerten Ausschnitt der ¹H-NMR-Spektren der Stabilitätsmessung ist zu erkennen, dass sowohl das Dublett bei 5.23 ppm als auch das bei 4.64 ppm mit der Zeit bei Raumtemperatur an Intensität zunehmen. Die Signale sind auf die anomeren Protonen von Glucose zurückzuführen.^[12] In den Spektren konnten keine weiteren sichtbaren Veränderungen beobachtet werden, wodurch das Extrakt eine ausreichende Stabilität aufweist.

Ergebnisse und Diskussion

Als nächstes wurden jeweils fünf ^1H -NMR-Spektren von Proben der Nüsse aus unterschiedlichen Herkunftsländern (Anhang, Tabelle 20) gemessen und miteinander verglichen (Abbildung 74), um die Unterschiede zwischen einzelnen Proben abzuschätzen und zu analysieren, ob weiterhin im Bereich des Singulett bei 3.05 ppm keine Signale detektiert werden. Hierbei wurde die zuvor festgelegte polare Extraktionsmethode verwendet.

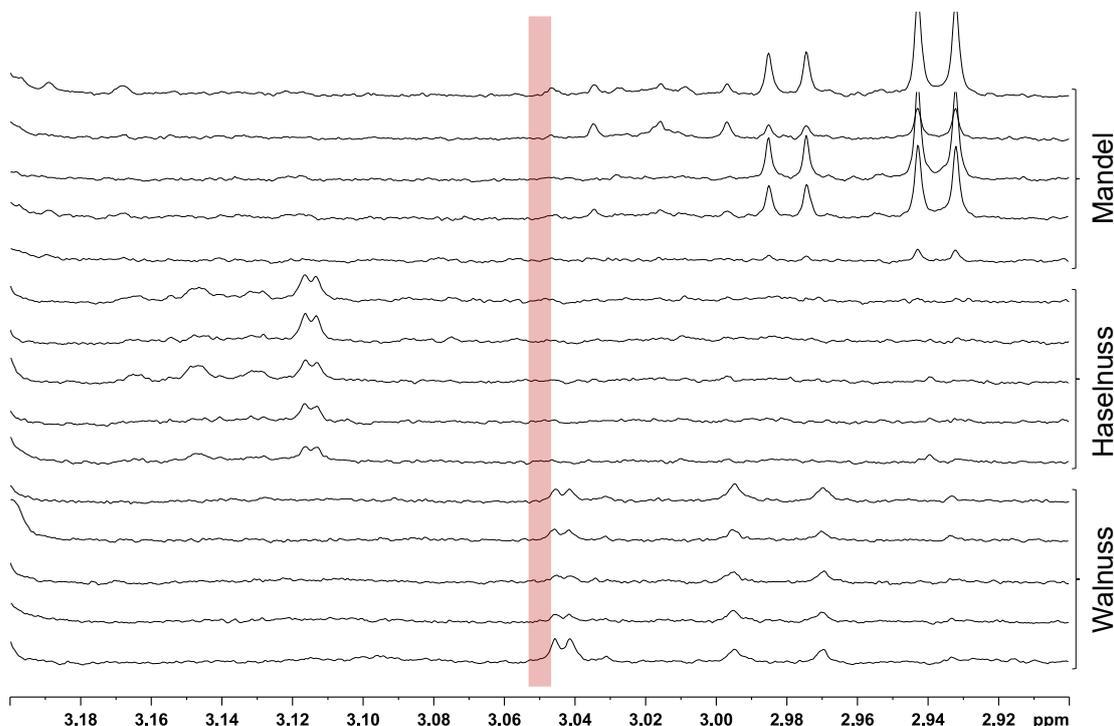


Abbildung 74: Vergleich der ^1H -NMR-Spektren (400 MHz, NS = 128) im Bereich von 2.90 – 3.20 ppm von je fünf Proben von Mandeln, Haselnüssen und Walnüssen unterschiedlicher Herkunft. Der Bereich des potentiellen Markers für Erdnussbeimischungen ist farblich markiert. Es ist zu erkennen, dass lediglich in den Spektren der Walnussproben bei einer chemischen Verschiebung von 3.04 ppm ein Dublett geringer und unterschiedlicher Intensität zu erkennen ist. Die Spektren der Haselnuss- und Mandelproben weisen in diesem Bereich keine Signale auf.

Beim Vergleich der Spektren der Walnüsse unterschiedlicher Herkunft ist zu erkennen, dass einige Intensitätsunterschiede von Signalen zu beobachten sind, aber keine qualitativen Unterschiede auftreten. Dies trifft ebenfalls auf die Spektren der Haselnussextrakte zu, in denen keine Unterschiede im Signalmuster zu erkennen sind, dafür jedoch geringe Intensitätsunterschiede von Signalen, wie zum Beispiel bei einer chemischen Verschiebung von 5.00 ppm, beobachtet werden können. Anders ist es jedoch bei den Spektren der Mandelextrakte, bei denen sowohl Unterschiede in Signalintensitäten, wie zum Beispiel bei einer chemischen Verschiebung von 2.94 und 2.87 ppm, als auch im Signalmuster ($\delta = 3.03$ ppm und $\delta = 2.30$ ppm) zu erkennen sind. Dies beeinflusst die Analyse von Mischungen mit Erdnuss jedoch nicht, da im Bereich von 3.05 ppm keine Signale vorzufinden sind. Es konnte demnach ermittelt werden, dass das Singulett nicht nur bei Mischungen mit Walnüssen, sondern auch mit weiteren ähnlichen Rohstoffen, wie Mandeln und Haselnüssen,

Ergebnisse und Diskussion

unabhängig von der Probe Anwendung findet. Die Herkunft des verfälschten Lebensmittels hat keinen Einfluss auf die Analyse, solange im Bereich des Singulett bei 3.05 ppm keine weiteren Signale vorhanden sind.

Als nächstes wurde überprüft, ob der Marker des Erdnussextraktes, unabhängig vom Herkunftsland, Teil des Signalmusters des NMR-Spektrums ist. Es wurden zusätzlich elf weitere Erdnussproben erworben, je 100 g geschälte Kerne vermahlen, lyophilisiert und polar extrahiert. Die ^1H -NMR-Spektren der insgesamt zwölf vorliegenden unterschiedlichen Erdnussproben wurden anschließend hinsichtlich des Singulett bei 3.05 ppm untersucht (Abbildung 75).

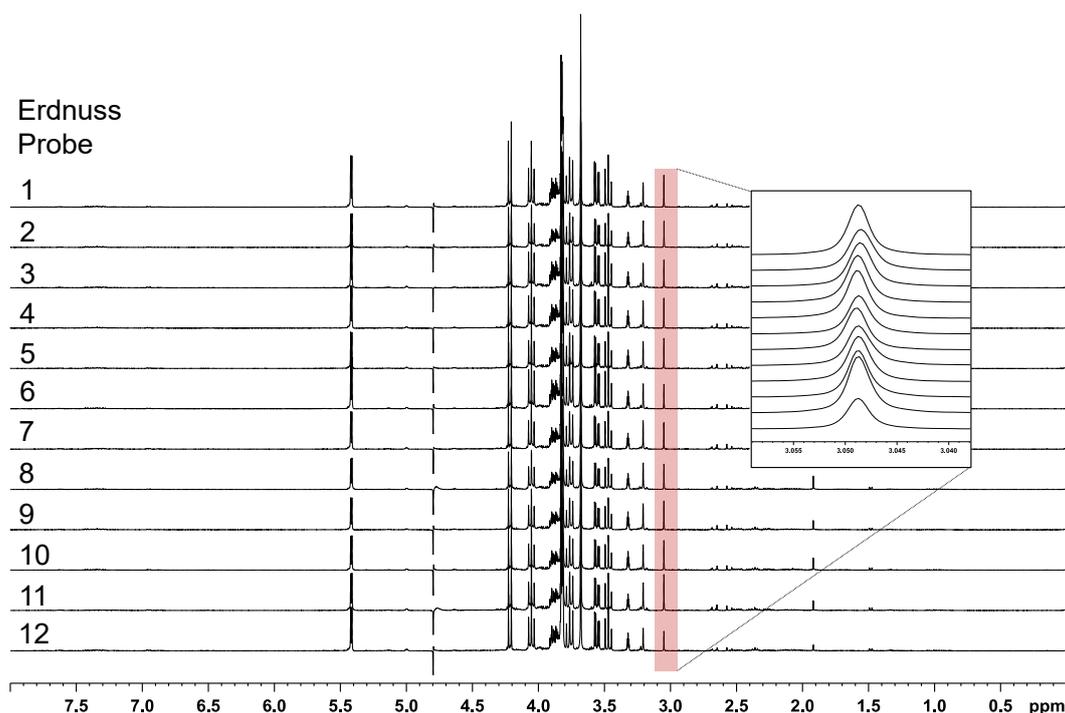


Abbildung 75: Vergleich der ^1H -NMR-Spektren (400 MHz, NS = 128) der zwölf Erdnussproben. Der Bereich des potentiellen Markers für Erdnussbeimischungen ist farblich markiert und vergrößert dargestellt. Insgesamt ist das Singulett in den gesamten Proben der Erdnüsse zu beobachten, ist somit ein geeigneter Marker und kann für die weiteren Analysen herangezogen werden. Auffällig ist jedoch, dass der Metabolit je nach Probe in unterschiedlicher Konzentration vorliegt.

Die Informationen zu den verwendeten Erdnussproben kann im Anhang (Tabelle 20) eingesehen werden. Der Marker zur Erkennung von Beimischungen von Erdnuss als Verfälschungsmittel ist in den ^1H -NMR-Spektren der zwölf verwendeten Proben zu erkennen, weshalb angenommen werden kann, dass dieser, unabhängig vom Herkunftsland, dem Signalmuster des Erdnussextraktes zugehörig ist. Auffällig ist jedoch, dass das Singulett bei 3.05 ppm je nach Probe mit verschiedenen Intensitäten vorliegt, was auf die biologische Varianz des Metaboliten zurückgeführt werden kann. Um diese abzuschätzen, wurden die relativen Integrale des Singulett verglichen.

Ergebnisse und Diskussion

Die relativen Integrale des Singulets in den $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der zwölf Erdnussproben, die bereits in Abbildung 75 gezeigt wurden, sind in Tabelle 6 aufgelistet.

Tabelle 6: Vergleich der relativen Integrale des Singulets bei 3.05 ppm der zwölf Erdnussproben nach polarer Extraktion. Die $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der Proben wurden gemessen und die relativen Integrale des Singulets bei 3.05 ppm bestimmt. Der Mittelwert, die Standardabweichung sowie die prozentuale Standardabweichung wurden berechnet und es konnte eine Abweichung von 14% ermittelt werden.

Erdnussprobe	Integral
1	1.00
2	0.92
3	0.92
4	0.97
5	0.97
6	0.80
7	0.86
8	0.91
9	0.95
10	0.94
11	1.23
12	0.65
Mittelwert	0.93
Standardabweichung	0.13
Prozentuale Standardabweichung	14%

Die Ergebnisse der relativen Integrale der zwölf Erdnussproben zeigen eine prozentuale Abweichung von 14%. Die Erdnussprobe 12 mit der Herkunft Ägypten ist in der Probengruppe am auffälligsten, da das Signal des Markers die geringste Intensität besitzt. Die Probe mit der höchsten Intensität ist dagegen Probe 11 (Herkunft: Ägypten). Um weitere Vergleichswerte zu erhalten, wurden als nächstes einzelne Erdnusskerne auf das Singulett und die biologische Varianz untersucht.

Es wurden zunächst je fünf Erdnüsse unterschiedlicher geographischer Herkunft (USA, Ägypten, Südafrika) geschält und die zwei einzelnen Kerne (Bezeichnung A und B) aus der Schale entnommen. Die insgesamt zehn Kerne der Probe eines Herkunftslandes wurden schockgefroren, im Mörser vermahlen, analog zu den Erdnussproben 1 – 12 extrahiert und vermessen.

Ergebnisse und Diskussion

Anschließend wurden die relativen Integrale des Singulettts bei 3.05 ppm bestimmt und verglichen (Tabelle 7).

Tabelle 7: Vergleich der relativen Integrale des Singulettts bei 3.05 ppm im polaren Extrakt von einzelnen Kernen. Hierfür wurden aus je fünf Erdnüssen die zwei einzelnen Kerne (Bezeichnung A und B) entnommen, schockgefroren, manuell vermahlen und polar extrahiert. Die relativen Integrale des Singulettts bei 3.05 ppm im ^1H -NMR-Spektrum wurden ermittelt und der Mittelwert, die Abweichung und die prozentuale Abweichung innerhalb der Proben aus einzelnen Ländern (USA, Ägypten, Südafrika) berechnet.

USA		Ägypten		Südafrika	
Bezeichnung	Integral	Bezeichnung	Integral	Bezeichnung	Integral
Nuss 1A	1.00	Nuss 1A	0.87	Nuss 1A	0.91
Nuss 1B	0.81	Nuss 1B	1.04	Nuss 1B	1.16
Nuss 2A	0.92	Nuss 2A	3.00	Nuss 2A	1.69
Nuss 2B	0.76	Nuss 2B	2.48	Nuss 2B	1.11
Nuss 3A	1.35	Nuss 3A	1.72	Nuss 3A	2.11
Nuss 3B	1.39	Nuss 3B	1.53	Nuss 3B	2.00
Nuss 4A	0.54	Nuss 4A	1.27	Nuss 4A	1.15
Nuss 4B	0.66	Nuss 4B	1.55	Nuss 4B	1.13
Nuss 5A	0.89	Nuss 5A	2.12	Nuss 5A	0.82
Nuss 5B	0.90	Nuss 5B	2.51	Nuss 5B	0.63
Mittelwert	0.92	Mittelwert	1.81	Mittelwert	1.27
Standard- abweichung	0.26	Standard- abweichung	0.66	Standard- abweichung	0.47
Prozentuale Standard- abweichung	28%	Prozentuale Standard- abweichung	36%	Prozentuale Standard- abweichung	37%

Anhand der relativen Integrale des Singulettts bei 3.05 ppm wurde die biologische Varianz abgeschätzt, indem zunächst die Ergebnisse der einzelnen Kerne innerhalb der Länder verglichen wurden. Die Intensitäten und relativen Integrale des Signals unterscheiden sich in den einzelnen Probengruppen teilweise deutlich voneinander. Die Abweichungen lagen im Bereich von 28 – 37%, wobei die größte Abweichung in der Probengruppe des Herkunftslandes Südafrika erhalten wurde. Die geringste Abweichung von 28% wurde für die Probe aus den USA erhalten. Die Intensitätsunterschiede fallen deutlich größer als bei den Messungen der Erdnussproben 1 – 12 aus. Bei der Betrachtung der gesamten 30 ^1H -NMR-Spektren einzeln vermahlener Kerne konnte eine Abweichung von 46% berechnet werden. Dennoch konnte der Metabolit in jedem einzelnen Erdnusskern detektiert werden.

Ergebnisse und Diskussion

Hierbei wird deutlich, dass die niedrigeren und erhöhten Konzentrationen des Metaboliten in den zuvor analysierten Erdnussproben durch Verwendung von je 100 g Erdnusskernen beim Vermahlen ausgeglichen wurden. Die biologische Varianz des Markers, die mit 14% abgeschätzt wurde, sollte bei quantitativen Berechnungen von Erdnussbeimischungen berücksichtigt werden.

Des Weiteren wurde die thermische Stabilität des Markers überprüft, indem zehn Erdnusskerne der Probe 8 als Referenz zunächst schockgefroren, gemahlen und polar extrahiert wurden. Zum Vergleich wurden ebenfalls zehn Erdnusskerne bei 180 °C für sechs Stunden geröstet und anschließend analog zur Messung vorbereitet. In Abbildung 76 sind die ^1H -NMR-Spektren der Referenz- und der gerösteten Probe dargestellt.

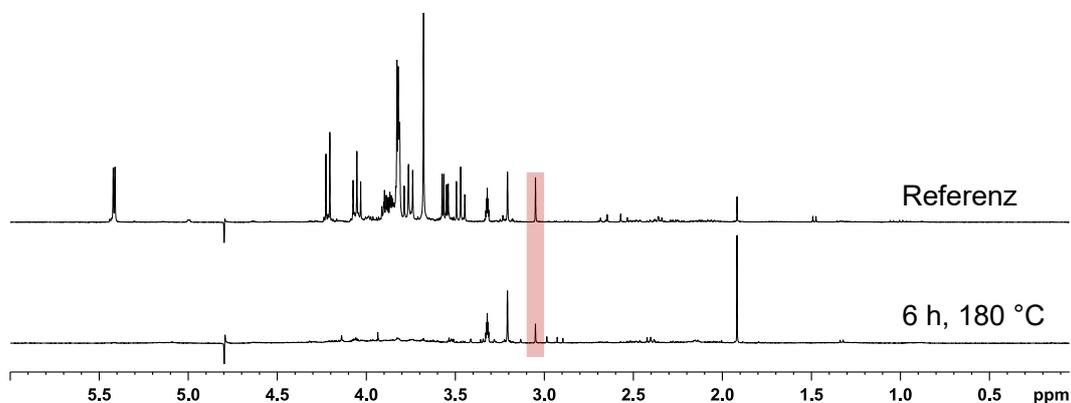


Abbildung 76: ^1H -NMR-Spektren (400 MHz, NS = 128) des polaren Extraktes von zehn Erdnusskernen der Referenzprobe und einer Probe, die zuvor für sechs Stunden bei 180 °C geröstet wurde. Das Markersignal wurde farblich markiert und wurde mit einer geringeren Intensität im NMR-Spektrum der gerösteten Probe detektiert.

Das Singulett des Markers ist nach sechs Stunden bei 180 °C im ^1H -NMR-Spektrum vorzufinden, während viele Signale nicht mehr detektiert wurden. Hierzu zählen beispielsweise die Signale des Kohlenhydraten Saccharose (**6**). Das Singulett des Markers weist lediglich eine geringere Intensität im Vergleich zum Signal im Referenzspektrum auf. Die Stabilität des Markers konnte jedoch gezeigt werden. Als nächstes sollten Mischungen mit Erdnuss als Verfälschungsmittel durchgeführt werden.

6.2.4. Beimischung von Erdnüssen

Zum Schutz von Verbrauchern vor Betrug durch Beimischungen von günstigeren Lebensmitteln in qualitativ hochwertige Rohstoffe, sollte ermittelt werden, bis zu welchem prozentualen Anteil die Beimischung von Erdnüssen mittels NMR-Spektroskopie nachgewiesen werden kann. Hierbei können bereits geringe Mengen der Erdnuss-Beimischungen eine Gefahr darstellen, da sich diese zusätzlich gesundheitsgefährdend auf den Verbraucher auswirken können.^[7] So kann beispielsweise durch die Beimischung von Erdnüssen bei einem entsprechenden Allergiker ein anaphylaktischer Schock hervorgerufen werden.^[7] Hierzu wurde eine Messreihe von verschiedenen Mischungen aus Erdnuss-lyophilisat und visuell ähnlichen gemahlene Nüssen (Walnuss, Haselnuss, Mandel) angefertigt.

Zur Identifizierung von Beimischungen von Erdnüssen in gemahlene Rohstoffen wurden verschiedene Mischungsverhältnisse als Triplikate eingewogen, polar extrahiert und anschließend jeweils zwei ¹H-NMR-Spektren mit unterschiedlicher Scanzahl (NS = 8, NS = 128) gemessen. Die Aufnahme von NMR-Spektren mit geringer Scanzahl dienen der Entwicklung einer Methode mit kurzer Analysenzeit. Durch Verwendung einer höheren Scanzahl sollte überprüft werden, ob sich die Nachweisgrenze so steigern lässt. Die erhaltenen Spektren wurden zunächst kalibriert und mittels automatischer Phasen- und Basislinienkorrektur prozessiert. Es wurde automatisiert das Signal-Rausch-Verhältnis (*signal-to-noise ratio*, SNR, Signal-Region: 3.0394 ppm bis 3.0575 ppm, Noise-Region: -1.000 ppm bis -2.000 ppm) des Marker-Signals bestimmt. Durch Verwendung eines Python-Skripts (Anhang, Abschnitt 8.8) wurden die SNR-Werte automatisch aus den Daten der Spektren extrahiert. Diese wurden anschließend für eine lineare Regression gegen den realen Anteil von Erdnuss im jeweiligen Gemisch aufgetragen. Zusätzlich erfolgte eine Auswertung mittels der erhaltenen relativen Integrale im Signalbereich von 3.0394 bis 3.0575 ppm. Im Folgenden werden die Ergebnisse der linearen Regression der Erdnuss/Walnuss-Mischungsreihe dargestellt. Anschließend werden die Ergebnisse der Erdnuss/Haselnuss- sowie Erdnuss/Mandel-Mischungsreihe gezeigt.

Erdnuss/Walnuss-Mischungen

Als erstes wurden verschiedene Mischungsverhältnisse von Walnüssen mit Erdnüssen in Gewichtsanteilen eingewogen, extrahiert und das polare Extrakt vermessen. Für die Erstellung der Mischungsreihe wurde die Erdnussprobe 1 verwendet. Die Gemischspektren wurden mit einer unterschiedlichen Scanzahl (NS = 8, 128) gemessen und sowohl die ermittelten SNR-Werte als auch die relativen Integrale des Singulets bei 3.05 ppm anschließend gegen den berechneten Anteil von Erdnuss aufgetragen (Abbildung 77).

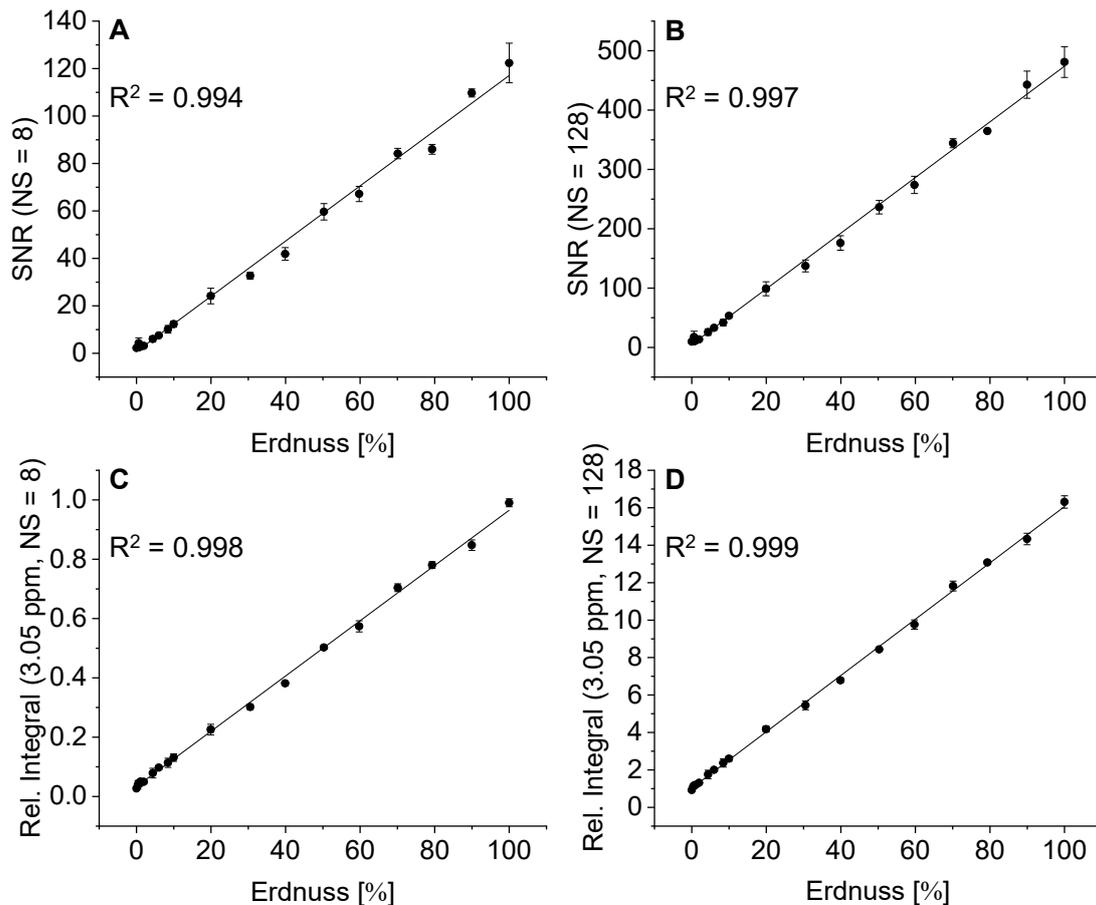


Abbildung 77: Auftragung des berechneten Erdnuss-Anteils in Gemischproben mit Walnuss gegen das erhaltene Signal-Rausch-Verhältnis bei Verwendung einer Scanzahl von 8 (A) und 128 (B). Zusätzlich sind die graphischen Auftragungen des berechneten Erdnuss-Anteils gegen das relative Integral des Marker-Signals mit einer Scanzahl von 8 (C) und 128 (D) dargestellt. Der lineare Zusammenhang wird durch die hohen Bestimmtheitsmaße (R^2) von 0.994 bis 0.999 deutlich. Die Werte, die für die Erstellung der Graphen verwendet wurden, sind im Anhang (Abschnitt 8.5) aufgelistet.

Bei der Auftragung der Ergebnisse resultierend aus der Verwendung des Signal-Rausch-Verhältnisses und einer geringeren Scanzahl konnte bei der linearen Regression ein Bestimmtheitsmaß (R^2) von 0.994 erhalten werden. Der adäquate lineare Zusammenhang wird auch bei den weiteren linearen Regressionen mit einem Bestimmtheitsmaß von jeweils zwischen 0.997 und 0.999 deutlich. Das erhaltene Regressionsmodell kann für quantitative Berechnungen von Erdnussbeimischungen verwendet werden. Anschließend wurden die

Ergebnisse und Diskussion

^1H -NMR-Spektren der Mischungen analysiert, um den geringsten erkennbaren prozentualen Anteil an Beimischung abzuschätzen. Die Nachweisgrenze wird als die geringste Menge des Analyten beschrieben, die mittels einer Methode detektiert werden kann.^[109] Diese kann sowohl mathematisch als auch visuell aus dem NMR-Spektrum ermittelt werden. Bei einem mathematischen Ansatz wird die Nachweisgrenze (LOD, engl. *limit of detection*) bei einem Wert für das Signal-Rausch-Verhältnis von drei beschrieben, da erst ab diesem Wert ein Signal vom Grundrauschen unterschieden werden kann.^[110] Die Bestimmungsgrenze (LOQ, engl. *limit of quantitation*) hingegen ist die geringste Konzentration des Analyten, welche quantitativ mit Präzision bestimmt werden kann.^[111] Der Wert für das Signal-Rausch-Verhältnis beträgt in diesem Fall zehn.^[111] In der folgenden Auswertung der Mischungsreihen wurde der Mittelwert der SNR-Werte der Blindproben (Grundrauschen der Proben ohne Erdnuss-Beimengung) jeweils bei der Berechnung des LOD sowie LOQ anhand der Regressionsgerade berücksichtigt und die Werte zusätzlich visuell abgeschätzt.

In Abbildung 78 sind Ausschnitte des Bereichs des Singulett bei 3.05 ppm der ^1H -NMR-Spektren der Extrakte mit unterschiedlichen Mischungsverhältnissen von Erdnuss und Walnuss dargestellt.

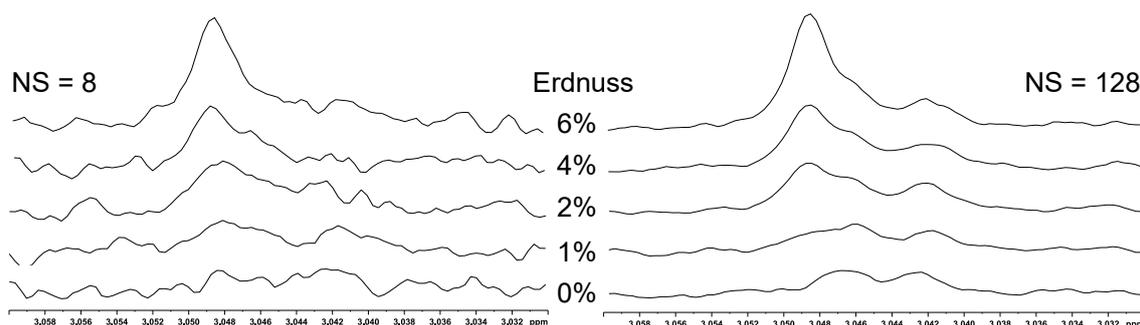


Abbildung 78: Ausschnitt der ^1H -NMR-Spektren (400 MHz, NS = 8 und NS = 128) der Extrakte aus Erdnuss/Walnuss-Gemischen. Dargestellt ist der Bereich von 3.03 – 3.06 ppm, in dem deutlich wird, dass eine visuelle Unterscheidung des Dubletts bei einer chemischen Verschiebung von 3.04 ppm aus dem Walnussextrakt und dem Marker aus dem Erdnussextrakt ($\delta = 3.05$ ppm) bis zu einer Beimischung von ca. 2% Erdnuss bei NS = 128 möglich ist.

In Abbildung 78 sind ausgewählte ^1H -NMR-Spektren der Walnuss-Mischungsreihe mit einem Erdnussanteil von 0 – 6% sowohl für NS = 8 als auch NS = 128 graphisch dargestellt. Anhand der ^1H -NMR-Spektren der Gemische ist zu erkennen, dass die beiden Signale, das Dublett der Walnuss und das Singulett der Erdnuss, auf Grund der unterschiedlichen chemischen Verschiebung voneinander unterschieden werden können. Das Singulett des Erdnussextraktes ist im Gemischspektrum (NS = 128) bei einer Beimischung von 1 – 2% als Schulter im Dublett des Walnussextraktes zu erkennen. Deutlich erkennbar ist das Marker-Signal ab einer Beimischung von ca. 2%. In den Spektren, die mit einer geringeren Scanzahl (NS = 8)

gemessen wurden, ist das Singulett ab einer Beimischung von ca. 4% Erdnuss visuell zu erkennen. Bei der mathematischen Ermittlung mittels der Regressionsgeraden liegt der LOD mit NS = 8 bei ca. 4% und mit NS = 128 bei ca. 2% Beimengung. Dies stimmt mit der visuellen Einschätzung überein. Der LOQ für die Messreihe mit NS = 8 liegt bei ca. 10% und mit NS = 128 bei ca. 3% Beimengung.

Erdnuss/Haselnuss-Mischungen

Als nächstes wurde zur Identifizierung von Beimischungen von gemahlene Erdnüssen in Haselnuss verschiedene Mischungen erzeugt, extrahiert und anschließend mit unterschiedlicher Scanzahl (NS = 8, 128) vermessen. Für die Erstellung der Mischungsreihe wurde die Erdnussprobe 2 verwendet. Sowohl die erhaltenen SNR-Werte als auch die relativen Integrale des Singulett bei 3.05 ppm wurden gegen den berechneten Anteil von Erdnuss aufgetragen (Abbildung 79).

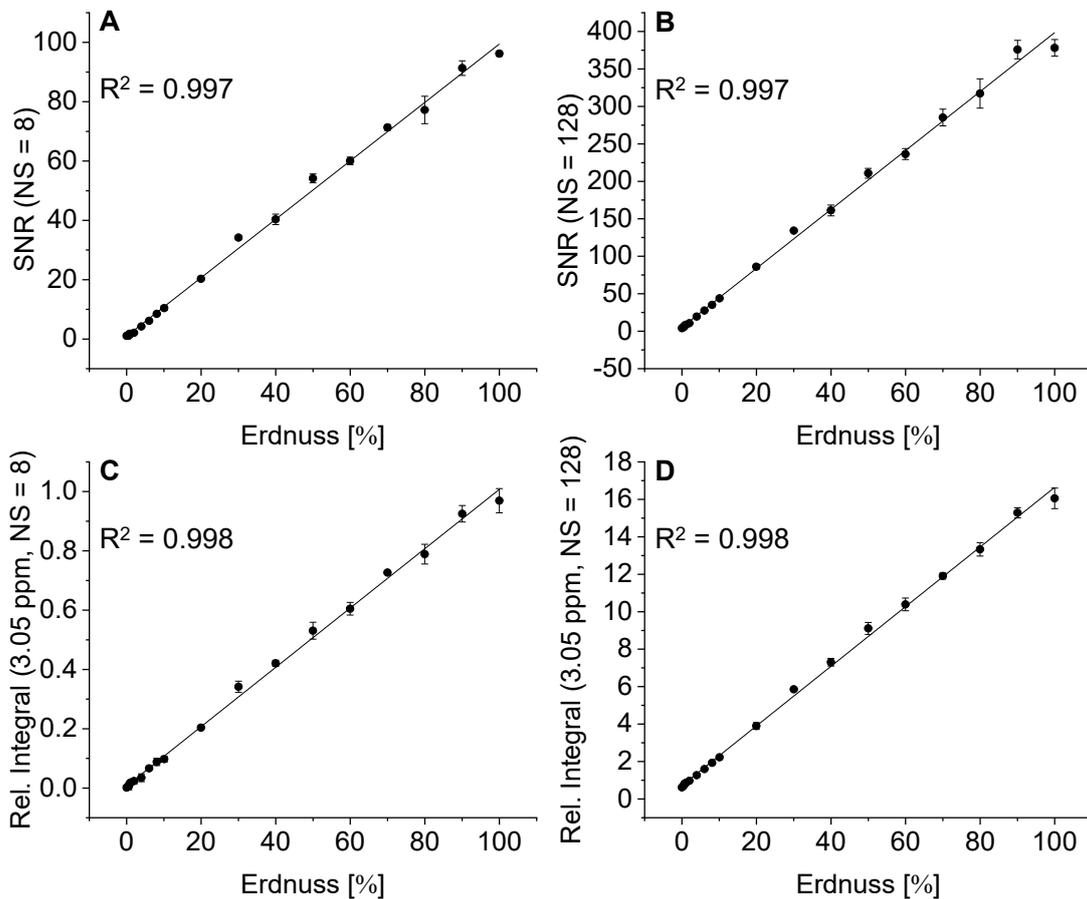


Abbildung 79: Auftragung des berechneten Erdnuss-Anteils in Gemischproben mit Haselnüssen gegen das erhaltene Signal-Rausch-Verhältnis bei Verwendung einer Scanzahl von 8 (A) und 128 (B). Zusätzlich sind die graphischen Auftragungen des berechneten Erdnuss-Anteils gegen das relative Integral des Marker-Signals mit einer Scanzahl von 8 (C) und 128 (D) dargestellt. Der lineare Zusammenhang wird durch die hohen Bestimmtheitsmaße (R^2) von 0.997 bis 0.998 deutlich. Die Werte, die für die Erstellung der Graphen verwendet wurden, sind im Anhang (Abschnitt 8.5) aufgelistet.

Ergebnisse und Diskussion

Bei den linearen Regressionen wurden hohe Bestimmtheitsmaße von 0.997 bis 0.998 erhalten, welche einen adäquaten linearen Zusammenhang zeigen. Das erhaltene Modell der linearen Regression kann für quantitative Berechnungen verwendet werden. Um eine Nachweisgrenze abschätzen zu können, wurden zunächst die ^1H -NMR-Spektren der Gemische analysiert. Die Spektren der Gemischextrakte aus Erdnuss und Haselnuss sind zunächst als Beispiel in Abbildung 80 dargestellt.

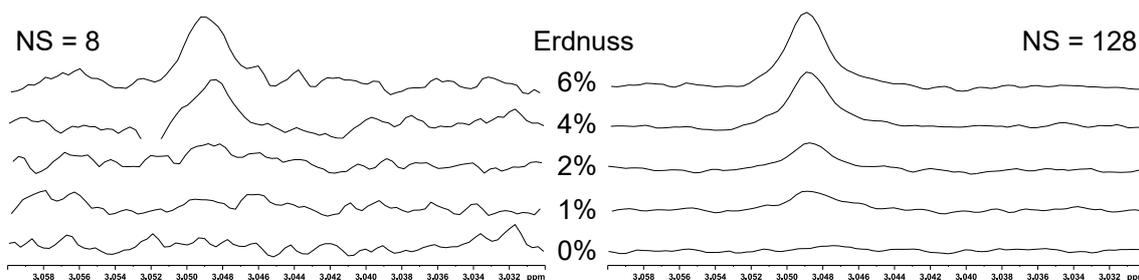


Abbildung 80: Der Bereich von 3.03 – 3.06 ppm als Ausschnitt der ^1H -NMR-Spektren (400 MHz, NS = 8 und NS = 128) der Extrakte aus Erdnuss/Haselnuss-Gemischen ist dargestellt. Bei einer Beimischung von 2% Erdnuss ist das Marker-Signal bei NS = 128 deutlich zu erkennen.

Es sind ausgewählte ^1H -NMR-Spektren der Haselnuss-Mischungsreihe mit einem Erdnussanteil von 0 – 6% sowohl für NS = 8 als auch NS = 128 graphisch dargestellt. Auch in den Gemischspektren mit Haselnuss ist ersichtlich, dass das Singulett bei 3.05 ppm des Erdnussextraktes (NS = 128) bei einem Anteil von ca. 2% im Gemisch nachgewiesen werden kann. In den Spektren, die mit einer Scanzahl von 8 gemessen wurden, kann das Singulett visuell ab einer Beimischung von ca. 4% erkannt werden. Bei der mathematischen Ermittlung liegt der LOD mit NS = 8 bei ca. 3% und mit NS = 128 bei ca. 0.5% Beimischung. Der berechnete Wert liegt hierbei unter dem zuvor visuell abgeschätzten Wert. Der LOQ für die Messreihe mit NS = 8 liegt bei ca. 10% und mit NS = 128 bei ca. 2% Beimischung.

Erdnuss/Mandel-Mischungen

Zuletzt wurden Beimischungen von Erdnuss- in Mandellyophilisat analysiert, indem verschiedene Mischungen angefertigt, polar extrahiert und anschließend zweimal mit unterschiedlicher Scanzahl (NS = 8, 128) vermessen wurden. Für die Erstellung der Mischungsreihe wurde die Erdnussprobe 1 verwendet. Sowohl die erhaltenen SNR-Werte als auch die relativen Integrale des Singulettts bei 3.05 ppm wurden gegen den berechneten Anteil von Erdnuss aufgetragen. In Abbildung 81 sind die Graphen mit den Ergebnissen der Erdnuss/Mandel-Mischungen dargestellt.

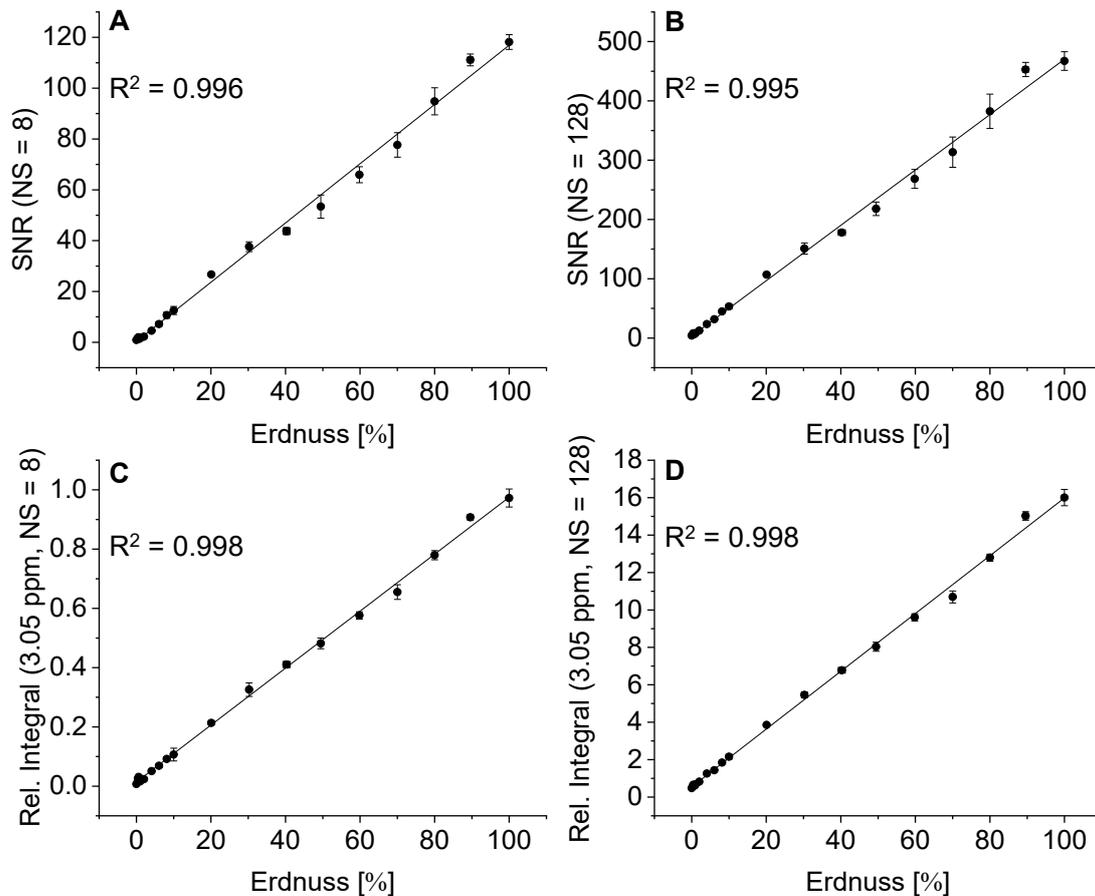


Abbildung 81: Auftragung des berechneten Erdnuss-Anteils in Gemischproben mit Mandeln gegen das erhaltene Signal-Rausch-Verhältnis bei Verwendung einer Scanzahl von 8 (A) und 128 (B). Zusätzlich sind die graphischen Auftragungen des berechneten Erdnuss-Anteils gegen das relative Integral des Marker-Signals mit einer Scanzahl von 8 (C) und 128 (D) dargestellt. Der lineare Zusammenhang wird durch die hohen Bestimmtheitsmaße (R^2) von 0.995 bis 0.998 deutlich. Die Werte, die für die Erstellung der Graphen verwendet wurden, sind im Anhang (Abschnitt 8.5) aufgelistet.

Insgesamt konnten bei den linearen Regressionen ebenfalls hohe Bestimmtheitsmaße von 0.995 bis 0.998 erzielt werden, wodurch der adäquate lineare Zusammenhang deutlich wird. Das erhaltene Modell der linearen Regression kann für quantitative Bestimmungen von Erdnussanteilen in unbekanntem Mischungen angewendet werden. Als nächstes wurden die

Ergebnisse und Diskussion

^1H -NMR-Spektren der Gemische analysiert, um eine Nachweisgrenze abschätzen zu können. Die Gemischspektren der Extrakte aus Erdnuss und Mandel sind in Abbildung 82 dargestellt.

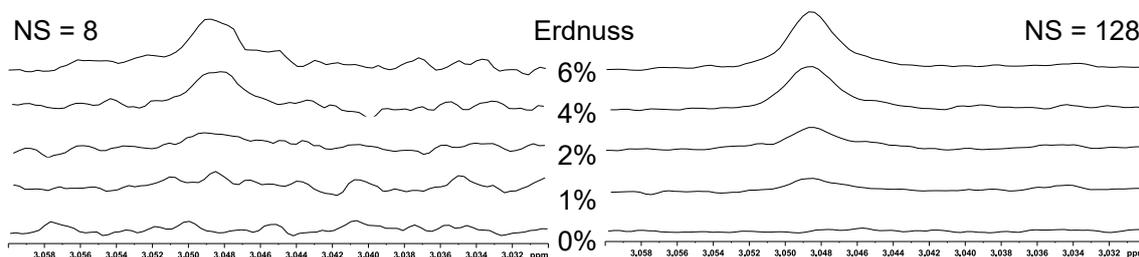


Abbildung 82: Ausschnitt der ^1H -NMR-Spektren (400 MHz, NS = 8 und NS = 128) der Gemischextrakte aus Mandel- und Erdnusslyophilisat. Es ist der Bereich von 3.03 – 3.06 ppm dargestellt, in dem das Singulett als Marker des Zusatzes von Erdnuss auftritt. Dieses ist bei NS = 128 bis zu einer Beimischung von ca. 2% Erdnuss noch zu erkennen.

Es sind ausgewählte ^1H -NMR-Spektren der Mandel-Mischungsreihe mit einem Erdnussanteil von 0 – 6% sowohl für NS = 8 als auch NS = 128 graphisch dargestellt. Hierbei ist zu erkennen, dass das Marker-Signal bei Verwendung von 128 Scans ab einer Beimischung von ca. 2% zu beobachten ist. Dieses ist ebenfalls in den ^1H -NMR-Spektren bei Verwendung einer Scanzahl von 8 bis zu einer Beimischung von ca. 4% Erdnuss zu erkennen. Bei der mathematischen Ermittlung liegt der LOD mit NS = 8 bei ca. 3% und mit NS = 128 bei ca. 0.8% Beimischung. Der berechnete Wert liegt hierbei unter dem zuvor visuell abgeschätzten Wert. Der LOQ für die Messreihe mit NS = 8 liegt bei ca. 9% und mit NS = 128 bei ca. 2% Beimischung.

Insgesamt konnten bei Messungen mit einer geringen Scanzahl von 8 und somit mit einer relativ kurzen Messzeit von ca. zwei Minuten bereits 4% Beimischungen von Erdnuss in unterschiedlichen Lebensmitteln, wie Haselnuss, Mandel und Walnuss, erkannt werden. Bei 16-facher Messzeit (NS = 128) konnte die Nachweisgrenze herabgesetzt werden und ca. 2% Erdnuss-Beimischungen detektiert werden. Hierbei handelt es sich um eine Abschätzung der Nachweisgrenze, die auf Grund der vorhandenen biologischen Varianz des Metaboliten nicht genau ermittelt werden kann. Die Regressionsmodelle, die durch Auftragungen der Signal-Rausch-Verhältnisse gegen den berechneten Anteil an Erdnuss im Gemisch erhaltenen wurden, können zur semi-quantitativen Bestimmung von Erdnussbeimischungen in unbekanntem Proben angewendet werden. Dies sollte als nächster Schritt anhand von je neun hergestellten Gemischproben überprüft werden.

6.2.5. Quantifizierung von Erdnussbeimischungen

Abschließend wurde überprüft, ob der Anteil von Erdnuss in einem unbekanntem Gemisch anhand der Kalibriergeraden akkurat berechnet werden kann. Wie zuvor beschrieben, weist das Marker-Signal eine biologische Varianz auf, die in der vorhandenen Probengruppe von Erdnüssen mit 14% abgeschätzt wurde. Aus diesem Grund handelt es sich um eine semi-quantitative Bestimmung von Erdnussbeimischungen. Für die Mischung der Blindproben wurden Erdnussproben verwendet, die nicht für die Erstellung der jeweiligen Kalibriergerade verwendet wurden. Auch bei den verfälschten Lebensmitteln, wie Mandel, Haselnuss und Walnuss, wurde beachtet, dass Proben aus verschiedenen Erntejahren und Herkunftsländern verwendet wurden. Die verwendeten Proben können im Anhang (Tabelle 20) eingesehen werden.

Hierzu wurden jeweils für alle Mischungen neun Blindproben mit einem Erdnussanteil von 1.5 – 27% erstellt, welche analog zu den Mischungsreihen extrahiert und ebenfalls sowohl mit einer Scanzahl von 8 als auch mit einer Scanzahl von 128 gemessen wurden. Anschließend wurden die Spektren kalibriert und mittels automatischer Phasen- und Basislinienkorrektur prozessiert. Es wurde das gemittelte Signal-Rausch-Verhältnis berechnet und mittels der Geradengleichung der jeweiligen Kalibriergeraden die prozentualen Anteile von Erdnuss in den Proben berechnet. In Tabelle 8 sind zunächst die durch lineare Regression erhaltenen Modelle sowie Bestimmtheitsmaße und abgeschätzten Nachweisgrenzen zusammengefasst.

Tabelle 8: Die Modelle der linearen Regressionen der einzelnen Mischungsreihen, die durch die Auswertung mittels SNR erhalten wurden, sind dargestellt. Die abgeschätzte Nachweisgrenze (LOD) sowie die erhaltenen Bestimmtheitsmaße (R^2) sind bei Verwendung der unterschiedlichen Anzahl an Scans (NS) angegeben.

Verfälschtes Lebensmittel	NS	R^2 (SNR/Integral)	LOD	Modell der linearen Regression (SNR)
Walnuss	8	0.994/0.998	>4%	$y = 0.77721 + 1.16327 \cdot x$
	128	0.997/0.999	>2%	$y = 4.92591 + 4.69144 \cdot x$
Mandel	8	0.996/0.998	>4%	$y = 0.31802 + 1.16597 \cdot x$
	128	0.995/0.998	>2%	$y = 3.36174 + 4.66916 \cdot x$
Haselnuss	8	0.997/0.998	>4%	$y = 0.99714 + 0.98465 \cdot x$
	128	0.997/0.998	>2%	$y = 5.23451 + 3.93275 \cdot x$

In Tabelle 8 ist zu sehen, dass die Bestimmtheitsmaße der linearen Regressionen Werte zwischen 0.994 und 0.999 aufweisen. Bei der Nachweisgrenze handelt es sich um einen abgeschätzten Wert, der bei einer geringeren Scanzahl bei ca. 4% und bei einer längeren Messzeit bei ca. 2% liegt. Die Modelle der linearen Regression, die durch Auswertung mittels SNR erhalten wurden, werden im Folgenden verwendet, um die Erdnussanteile in den

Ergebnisse und Diskussion

hergestellten Blindproben zu analysieren. In der Tabelle 9 sind die Ergebnisse der semi-quantitativen Bestimmung von Erdnuss- in Walnusslyophilisat dargestellt.

Tabelle 9: Ergebnisse der semi-quantitativen Bestimmung von Erdnuss- in Walnusslyophilisat. Angegeben sind die jeweils verwendeten Walnuss- und Erdnussproben, die im Anhang (Tabelle 20) eingesehen werden können. Des Weiteren ist der durch Triplikate gemittelte SNR Wert dargestellt. Der durch die Kalibriergeraden berechnete Erdnussanteil ist dem realen Anteil gegenübergestellt und mit der Abweichung in Prozent angegeben.

Walnuss- probe	NS	SNR	Berechneter Anteil [%]	Realer Erdnuss- Anteil [%]	Abweichung [%]	Erdnuss- probe
1	8	4.38	3.10	1.51	105.07	4
	128	19.04	3.01		99.13	
4	8	4.75	3.42	2.98	14.82	5
	128	18.85	2.97		0.38	
2	8	5.70	4.24	4.98	14.94	6
	128	23.01	3.85		22.60	
7	8	8.94	7.01	6.96	0.73	7
	128	38.71	7.20		3.41	
5	8	10.83	8.64	9.03	4.30	8
	128	47.22	9.01		0.14	
3	8	15.88	12.98	13.02	0.28	9
	128	67.09	13.25		1.76	
6	8	18.98	15.65	17.03	8.11	10
	128	79.83	15.97		6.26	
8	8	41.63	35.12	23.05	52.33	11
	128	164.49	34.01		47.53	
9	8	22.81	18.94	26.98	29.79	12
	128	96.50	19.52		27.66	

Bei der Betrachtung der Ergebnisse der Erdnuss/Walnuss Blindproben in Tabelle 9 wird deutlich, dass die biologische Varianz des Marker-Signals einen Einfluss auf die Berechnung des Erdnussanteils in einer unbekanntenen Probe hat und zu Abweichungen führt. Zudem hat auch das Dublett geringer Intensität im ¹H-NMR-Spektrum der Walnuss einen Einfluss auf die Berechnungen. Die höchste Abweichung von 105% wurde bei der Erdnussprobe 4 bei 8 Scans berechnet, wobei die verwendete Erdnuss-Beimengung unter der ermittelten Nachweisgrenze von 2% für Messungen mit NS = 128 liegt. Bei der Beimengung mit Erdnussprobe 11 wurde der Anteil zu hoch berechnet, was auf die hohe Konzentration des Markers in dieser Probe zurückzuführen ist. Es konnten jedoch auch Erdnussanteile akkurat berechnet werden, wie im Beispiel der Mischung aus Walnussprobe 5 und Erdnussprobe 8 mit einer Abweichung von 0.1% mit 128 Scans zu erkennen ist. Eine etwas höhere Abweichung von 4% wurde mit 8 Scans berechnet. Die hierbei verwendete Erdnussprobe 8 zeigte eine ähnliche Konzentration des Markers im Vergleich zur Probe, die für die Kalibrierreihe verwendet wurde, weshalb die Berechnungen in diesem Fall akkurater waren. Bei der Mischung mit Erdnussprobe 9, die

Ergebnisse und Diskussion

einen realen Erdnussanteil von 13.02% aufwies, wurde ein Anteil von 12.98% (NS = 8) bzw. 13.25% (NS = 128) berechnet. Hier wird deutlich, dass es sich um eine semi-quantitative Bestimmung handelt, der Erdnussanteil einer unbekanntenen Probe aber generell abgeschätzt werden kann. In Tabelle 10 sind die Ergebnisse der semi-quantitativen Bestimmung von Erdnuss- in Mandellyphilisolat dargestellt.

Tabelle 10: Ergebnisse der semi-quantitativen Bestimmung von Erdnuss- in Mandellyphilisolat. Angegeben sind die jeweils verwendeten Mandel- und Erdnussproben, die im Anhang (Tabelle 20) eingesehen werden können. Des Weiteren ist der durch Triplikate gemittelte SNR Wert dargestellt. Der durch die Kalibriergerade berechnete Erdnussanteil ist dem realen Anteil gegenübergestellt und mit der Abweichung in Prozent angegeben.

Mandel-probe	NS	SNR	Berechneter Anteil [%]	Realer Erdnuss-Anteil [%]	Abweichung [%]	Erdnuss-probe
1	8	2.46	1.84	1.51	21.57	4
	128	9.92	1.40		7.05	
9	8	3.51	2.74	3.00	8.83	5
	128	15.94	2.69		10.32	
2	8	4.83	3.87	5.12	24.50	6
	128	21.41	3.87		24.56	
7	8	8.56	7.07	7.05	0.23	8
	128	33.01	6.35		9.91	
8	8	11.59	9.67	9.02	7.14	7
	128	45.50	9.02		0.02	
3	8	15.35	12.89	13.02	0.94	9
	128	63.10	12.79		1.70	
4	8	20.38	17.21	17.98	1.32	10
	128	81.76	16.79		1.14	
5	8	38.02	32.34	23.02	40.48	11
	128	154.73	32.42		40.85	
6	8	19.12	16.13	27.05	40.38	12
	128	79.28	16.26		39.89	

Bei der Berechnung von Erdnussbeimischungen in Mandeln wurden mit ca. 40 – 41% die höchsten Abweichungen bei Verwendung der Erdnussproben 11 und 12 erhalten. Diese Proben sind speziell im Probensatz, da sie die niedrigste und höchste Konzentration des Metaboliten enthalten. Beispielsweise wurde in der letzten Mischung ein Anteil von etwa 16% Erdnuss berechnet, obwohl in der Probe 27% enthalten waren. Bei Verwendung der Erdnussprobe 10 konnte der reale Erdnussanteil von 17.98% mit einer geringen Abweichung von ca. 1%, was einem berechnetem Anteil von ca. 17% entspricht, abgeschätzt werden. Es wird deutlich, dass die Berechnungen umso genauer sind, je ähnlicher der Konzentrationsgehalt des Metaboliten in den Proben ist, die zur Kalibrierreihe und für die Mischung verwendet wurden. Die in den ¹H-NMR-Spektren der Erdnussproben unterschiedlichen Intensitäten des Marker-Signals können graphisch in Form eines Box-Whisker-Plots dargestellt werden.

In Abbildung 83 ist der Box-Whisker-Plot mit ausgewählten Spektren der Erdnussextrakte dargestellt.

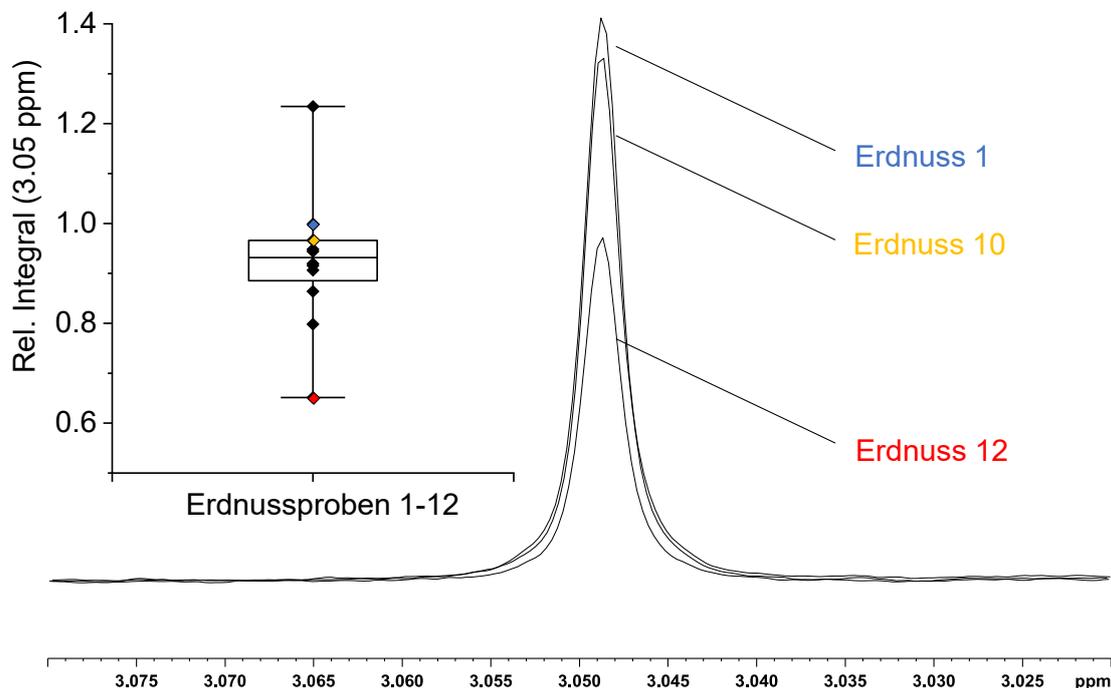


Abbildung 83: Darstellung des Box-Whisker-Plots mit den relativen Integralen des Marker-Signals bei 3.05 ppm der unterschiedlichen Erdnussproben 1 – 12. Farblich markiert sind die Werte der ebenfalls dargestellten dazugehörigen $^1\text{H-NMR}$ -Spektren. Erdnussprobe 1 (blau) wurde zur Erstellung der Kalibriergerade der Erdnuss/Mandel Mischungsreihe verwendet. Erdnussprobe 10 (gelb) zeigte eine ähnliche Intensität des Marker-Signals, was dazu führte, dass die Berechnung der Erdnussbeimischung mit Verwendung dieser Probe mit nur 1% Abweichung erfolgte. Erdnussprobe 12 (rot) zeigte eine deutlich geringere Intensität des Signals, infolgedessen kam es bei der Berechnung des Erdnussanteils zu einer Abweichung von ca. 40%, die dem Fehler entspricht, der durch die Konzentrationsunterschiede auftritt.

Im Box-Whisker-Plot in Abbildung 83 sind Werte farblich markiert und mit den entsprechenden $^1\text{H-NMR}$ -Spektren dargestellt. Hierzu zählt unter anderem das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Erdnussprobe 1 (blau), die für die Erstellung der Kalibrierreihe der Mandel/Erdnuss Mischreihe verwendet wurde. In der Abbildung 83 ist zu erkennen, dass die Intensität des Singulett im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Erdnussprobe 12 (rot) am meisten von der Probe zur Erstellung des linearen Regressionsmodells abweicht. Hiermit kann die hohe Abweichung von 40% bei Verwendung dieser Probe erklärt werden. Die Intensität des Singulett im NMR-Spektrum von Erdnussprobe 10 (gelb) ähnelt der aus der Probe 1. Dies führt zu der akkurateren Berechnung mit einer Abweichung von 1% zum wahren Wert. Auch die Erdnussprobe 4 zählt zu den Proben, die eine ähnliche Konzentration des Markers aufwiesen, weshalb bei der Berechnung der Erdnussbeimischung niedrigere Abweichungen erhalten wurden. Diese sind zusätzlich im Vergleich zu den Abweichungen, die mit dieser Probe bei den Walnuss-Mischungen erhalten wurden, deutlich geringer. Dies bestätigt, dass das Dublett geringer Intensität bei der Walnuss im Bereich des Markers einen negativen Einfluss auf die Berechnung hat.

Ergebnisse und Diskussion

In Tabelle 11 sind die Ergebnisse der semi-quantitativen Bestimmung von Erdnusslyophilisat in Haselnussmehl dargestellt.

Tabelle 11: Ergebnisse der semi-quantitativen Bestimmung von Erdnusslyophilisat in Haselnussmehl. Angegeben sind die jeweils verwendeten Haselnuss- und Erdnussproben, die im Anhang (Tabelle 20) eingesehen werden können. Des Weiteren ist der durch Triplikate gemittelte SNR Wert dargestellt. Der durch die Kalibriergerade berechnete Erdnussanteil ist dem realen Anteil gegenübergestellt und mit der Abweichung in Prozent angegeben.

Haselnuss- probe	NS	SNR	Berechneter Anteil [%]	Realer Erdnuss- Anteil [%]	Abweichung [%]	Erdnuss- probe
1	8	2.53	1.56	1.49	4.66	4
	128	11.60	1.62		8.59	
4	8	4.77	3.84	3.03	26.48	5
	128	19.03	3.51		15.71	
2	8	5.27	4.34	5.06	14.32	6
	128	23.73	4.70		7.10	
7	8	8.87	7.99	6.99	14.31	7
	128	39.20	8.64		23.51	
5	8	10.55	9.70	9.04	7.32	8
	128	42.98	9.60		6.20	
3	8	16.72	15.97	12.99	22.93	9
	128	67.60	15.86		22.05	
6	8	19.18	18.47	16.97	8.81	10
	128	76.46	18.11		6.71	
8	8	36.15	35.70	22.93	55.67	11
	128	147.95	36.29		58.22	
9	8	20.93	20.24	27.03	25.10	12
	128	87.67	20.96		22.44	

Die geringste Abweichung von ca. 4.7% zum realen Anteil wurde bei Verwendung der Erdnussprobe 4 erhalten. Bei dieser betrug der wahre Erdnussanteil ca. 1.5% und es wurde ein Anteil von 1.56% (NS = 8) und 1.62% (NS = 128) ermittelt. Die größte Abweichung von ca. 58% wurde bei Verwendung von Erdnussprobe 11 mit NS = 128 erhalten. Hierbei wurde ein Erdnussanteil von ca. 36% berechnet, obwohl der reale Anteil etwa 23% betrug. Die Erdnussanteile konnten insgesamt jedoch mittels des Modells der linearen Regression mit hinreichender Genauigkeit ermittelt werden.

Anhand der Blindproben konnte bestätigt werden, dass in einem beliebigen Gemisch mit Erdnuss der prozentuale Anteil anhand einer Kalibriergeraden als grober Richtwert erhalten werden kann, auch wenn eine unbekannte Mischung betrachtet wird. Der Grund dafür ist die biologische Varianz des Metaboliten, die mit 14% abgeschätzt wurde. Insgesamt konnten bereits mit kurzen Messzeiten (ca. zwei Minuten) ca. 4% an Erdnuss-Beimischung anhand des Markers der Erdnuss mittels NMR-Spektroskopie nachgewiesen werden. Mit längeren Messzeiten konnte die ungefähre Nachweisgrenze gesenkt werden, sodass das Signal als

Ergebnisse und Diskussion

Marker für Erdnuss-Beimischungen bis zu einem Anteil von ca. 2% nachgewiesen werden konnte. Ein Vorteil der Methode ist, dass die Genauigkeit der semi-quantitativen Bestimmung lediglich von der Erdnussprobe und deren Gehalt des Metaboliten abhängt, jedoch nicht vom verfälschten Lebensmittel und dessen geographische Herkunft oder Erntejahr. Durch diese Methode ist es möglich, Erdnuss qualitativ in gemahlene Lebensmittel nachzuweisen, solange im NMR-Spektrum des polaren Extraktes im Bereich des Marker-Signals um 3.05 ppm keine weiteren Signale auftreten, wie es bei Mandeln, Haselnüssen und Walnüssen der Fall war. Zudem sind nur kurze Analysenzeiten nötig, was einen hohen Probendurchsatz ermöglicht. Bei einer Wareneingangskontrolle wäre die erste Frage vermutlich, ob und nicht mit wie viel Erdnuss ein Produkt verfälscht wurde. Der Marker liefert einen zuverlässigen qualitativen Hinweis auf wirtschaftlich relevante Erdnussbeimischungen und sollte durch weitere Untersuchungen identifiziert werden.

6.2.6. Identifizierung des chemischen Markers

Zur Detektion von Erdnussbeimischungen in gemahlene, visuell und chemisch ähnlichen Rohstoffen wurde ein Singulett bei 3.05 ppm im ^1H -NMR-Spektrum des polaren Extraktes der Erdnuss verwendet. Um den zugehörigen Metaboliten zu identifizieren wurde die Extraktion von Erdnuss im größeren Maßstab durchgeführt. In Abbildung 84 ist zunächst das Gesamtspektrum des Erdnussextraktes, gemessen an einem 600 MHz Spektrometer, dargestellt.

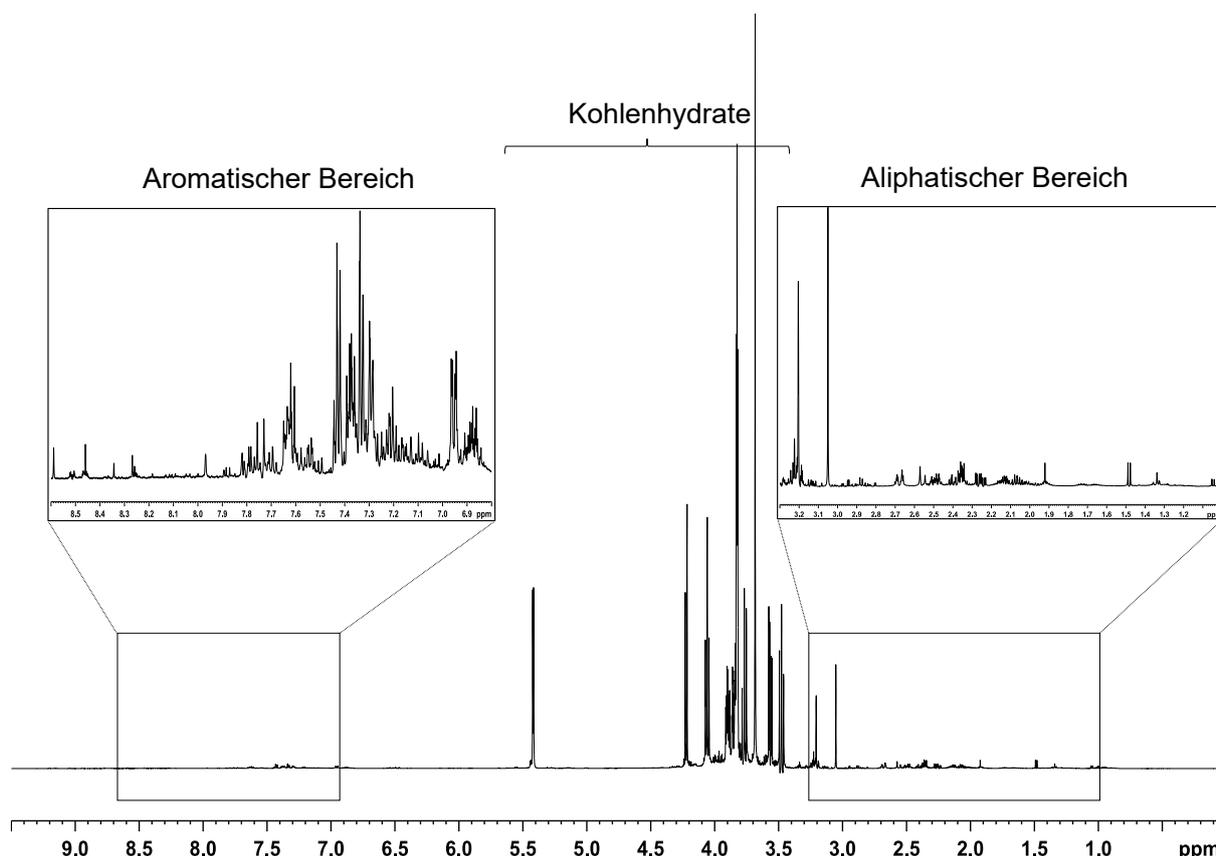


Abbildung 84: Gesamtspektrum (600 MHz, NS = 128) des polaren Erdnussextraktes. Das NMR-Spektrum kann in den aromatischen Bereich, den Bereich der Kohlenhydrate und aliphatischen Verbindungen eingeteilt werden. Die Kohlenhydratsignale zeigen die höchste Intensität im NMR-Spektrum, was eine Identifizierung von weniger stark konzentrierten Metaboliten im Spektrum erschwert.

Im ^1H -NMR-Spektrum des polaren Extraktes der Erdnuss ist zu erkennen, dass der Bereich um 4.00 ppm Signale mit der höchsten Intensität zeigt, welche Kohlenhydraten, wie Saccharose (**6**) und Glucose, zugeordnet werden können. Die Signale im aromatischen sowie aliphatischen Bereich sind weniger intensiv, was eine Identifizierung von Metaboliten in diesen Bereichen erschwert. Auch die Verwendung von 2D-NMR-Experimenten würde nur bedingt Informationen liefern, da der Kohlenhydrat-Bereich dominant ist. Daher ist es sinnvoll eine Fraktionierung mittels Umkehrphasensäulenchromatographie durchzuführen, um die Komplexität des NMR-Spektrums zu reduzieren. Mittels dieser Strategie sollten dem Marker-Metaboliten zugehörige Signale identifiziert werden. Das polare Extrakt des Erdnuss-

Ergebnisse und Diskussion

lyophilisats wurde demnach mittels automatisierter Umkehrphasensäulenchromatographie mit Methode A getrennt und die Fraktionen mittels NMR-Spektroskopie am 600 MHz Spektrometer vermessen. In Abbildung 85 ist der Bereich des Markers von ausgewählten, nach einmaliger Umkehrphasensäulenchromatographie erhaltenen, ^1H -NMR-Spektren von Fraktionen dargestellt.

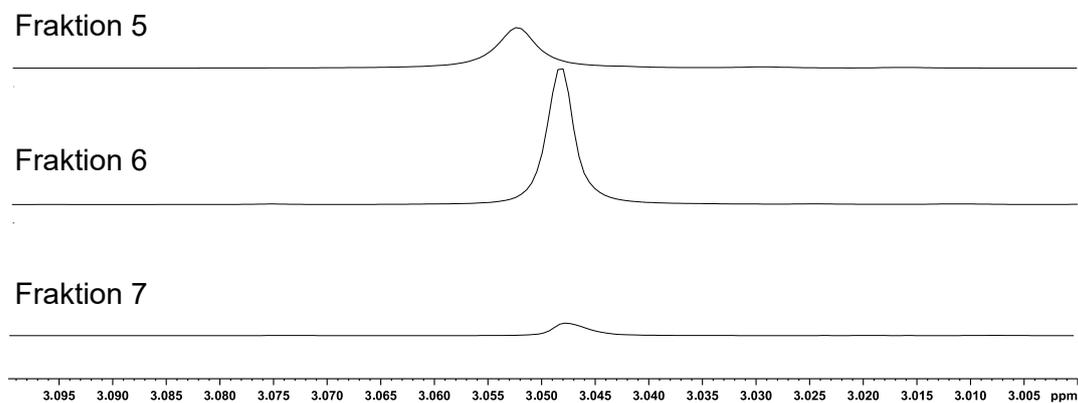


Abbildung 85: Ausschnitte der ^1H -NMR-Spektren (600 MHz, NS = 128) der Fraktionen 5 – 7 nach automatisierter Umkehrphasensäulenchromatographie. In Fraktion 5 wurde das Singulett des Markers zuerst detektiert. In Fraktion 6 zeigt dessen Konzentration ein Maximum und in der darauffolgenden erneut eine geringere Konzentration. Es ist ein Signal-*shift* des Signals zu beobachten.

Das Singulett wurde, neben weiteren Metaboliten, zunächst in Fraktion 5 mit geringer Intensität detektiert. In Fraktion 6 zeigt das Signal eine höhere und in der darauffolgenden Fraktion erneut eine geringere Intensität. Zudem ist ein geringer Signal-*shift* des Signals zu erkennen. Das Signal konnte zusätzlich mit geringer Intensität zusätzlich in den Fraktionen 8 und 9 detektiert werden. Der Verlauf in den NMR-Spektren kann mit ESI-MS Daten korreliert werden, um dem entsprechenden Metaboliten eine Masse zuzuordnen zu können. Diese Methode wurde im Arbeitskreis bereits bei der Identifizierung von Metaboliten aus komplexen Gemischen angewendet.^[112] Dabei werden aus den spektroskopischen Daten erhaltene extrahierte Delta-Chromatogramme (*extracted-delta chromatogram*, EDC) mit den aus den massenspektrometrischen Daten erhaltenen extrahierten Ionen-Chromatogrammen (*extracted-ion chromatogram*, EIC) verglichen. Hierbei wird der Korrelationskoeffizient nach Pearson berechnet, der die Stärke eines linearen Zusammenhangs beschreibt.^[113,114] Daher wurden ESI⁺-MS Spektren der jeweiligen Fraktionen gemessen und zunächst die Strategie anhand in der Fraktion bekannter vorhandener Metaboliten geprüft. Die relative Konzentration der bekannten Metaboliten Saccharose (**6**) und Cholin (**12**) wurde berechnet, indem das Verhältnis eines Integrals eines ausgewählten Signals zum TSP- d_4 -Referenzsignal berechnet wurde. Aus den massenspektrometrischen Daten wurde der relative Konzentrationsverlauf mit dem EIC der entsprechend bekannten Molekülmassen erhalten. Um die Zuverlässigkeit der Massenzuordnung der Strategie zu demonstrieren, sind in Abbildung 86 die beiden

Korrelationen für die in den Fraktionen vorkommenden bekannten Metaboliten Cholin (**12**) und Saccharose (**6**) gezeigt.

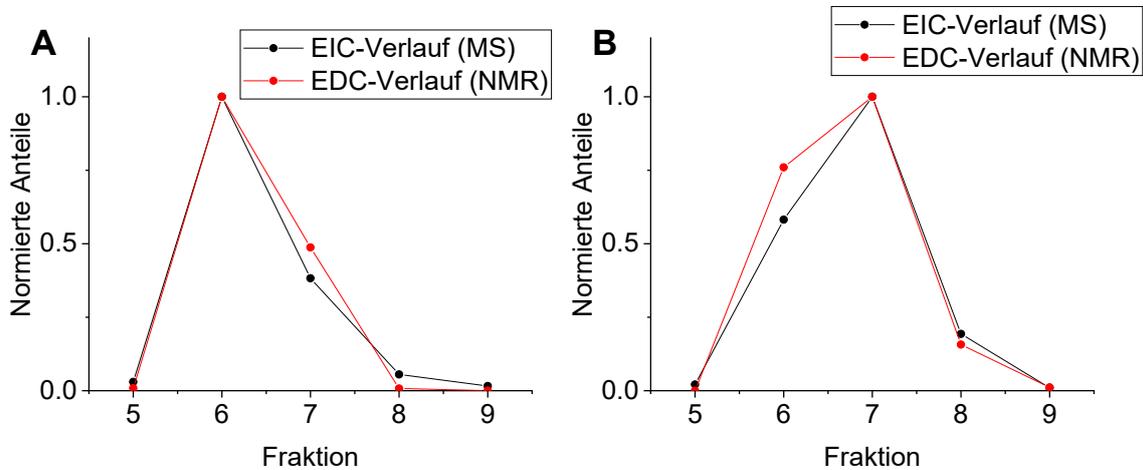


Abbildung 86: Korrelationsverläufe über fünf Fraktionen anhand von zwei bekannten Metaboliten im polaren Extrakt der Erdnuss. Die NMR und MS Daten wurden jeweils normiert. **A:** Korrelation des Singulett bei 3.21 ppm im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum mit der Masse $m/z = 104.1078$ von Cholin (**12**). Es wurde ein Korrelationskoeffizient von 0.994 berechnet. **B:** Korrelation des Dubletts bei 5.42 ppm im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum mit der Masse $m/z = 365.1057$ von Saccharose (**6**). Es wurde ein Korrelationskoeffizient von 0.984 berechnet.

In Abbildung 86 ist zunächst der Korrelationsverlauf von Cholin (**12**) dargestellt (**A**). Für die Korrelation wurde das Verhältnis der absoluten Intensität des Singulett bei 3.21 ppm zum TSP- d_4 -Referenzsignal bestimmt und normiert. Um den Verlauf der MS-Daten darzustellen, wurde der normierte EIC-Verlauf der gefundenen Masse $m/z = 104.1078$ verwendet. Für die Darstellung des Korrelationsverlaufs von Saccharose (**6**) wurde das Dublett des anomeren Protons bei 5.42 ppm und die gefundene Masse bei $m/z = 365.1057$ verwendet (**B**). Die Strategie bietet sich demnach für die Analyse des unbekanntes Markers an, um mit hoher Genauigkeit eine Masse zuzuordnen zu können.

Ergebnisse und Diskussion

In Tabelle 12 sind die erhaltenen Ergebnisse dargestellt, die zur Erstellung der Korrelationsverläufe verwendet wurden.

Tabelle 12: Die zur Erstellung der Korrelationsverläufe verwendeten Daten. Die Werte der EDC-Signale ergeben sich aus dem Verhältnis des entsprechenden Signals bezogen auf das TSP-*d*₄-Referenzsignal. Die Daten wurden zur besseren Vergleichbarkeit und Darstellung normiert. Für beide Metaboliten wurde ein hoher Korrelationskoeffizient berechnet.

Cholin (12)

Fraktion	EDC-Signal bei 3.21 ppm	EDC-Verlauf (normiert)	EIC-Area m/z = 104.1078	EIC-Verlauf (normiert)	Korrelationskoeffizient
1	0.0004	0.0057	1362.1900	0.0202	
2	0.0515	0.6650	45472.1000	0.6740	
3	0.0251	0.3241	17385.7100	0.2577	0.992
4	0.0004	0.0050	2512.0000	0.0372	
5	0.0000	0.0003	729.4200	0.0108	

Saccharose (6)

Fraktion	EDC-Signal bei 5.42 ppm	EDC-Verlauf (normiert)	EIC-Area m/z = 365.1057	EIC-Verlauf (normiert)	Korrelationskoeffizient
1	0.0000	0.0000	2722.3900	0.0116	
2	43.9993	0.3940	75620.0800	0.3222	
3	57.9185	0.5187	129976.4700	0.5537	0.984
4	9.0956	0.0815	25126.2200	0.1070	
5	0.6487	0.0058	1286.5200	0.0055	

Sowohl für Cholin (**12**) als auch für Saccharose (**6**) wurde ein hoher Korrelationskoeffizient berechnet. Das NMR-Signal bei 3.21 ppm von Cholin (**12**) korreliert mit dessen Masse bei $m/z = 104.1078$, was mit dem Korrelationskoeffizient von 0.992 gezeigt wird. Diese stimmt mit der monoisotopischen Masse von Cholin (**12**) ($m/z = 104.1070$) überein. Auch bei Saccharose (**6**) konnte eine hohe Korrelation mit einem Faktor von 0.984 zwischen dem Dublett des anomeren Protons bei 5.42 ppm und der Masse bei $m/z = 365.1057$ berechnet werden. Diese stimmt mit der berechneten Masse für $([M+Na]^+)$ von $m/z = 365.1054$ überein. Es konnte erfolgreich gezeigt werden, dass die Strategie bei der Fraktionierung angewendet werden kann. Daher bietet sie sich an, um für das NMR-Signal (Singulett bei 3.05 ppm) des unbekanntes Metaboliten eine entsprechende Masse zu ermitteln. Hierbei wurde analog zu den Testsubstanzen vorgegangen. Im ESI⁺-Massenspektrum wurde demnach eine Masse

gesucht, die stark mit dem Intensitätsverlauf des Singulett im NMR-Spektrum korreliert. In Abbildung 87 sind drei Korrelationsverläufe dargestellt, mit denen hohe Korrelationskoeffizienten berechnet wurden.

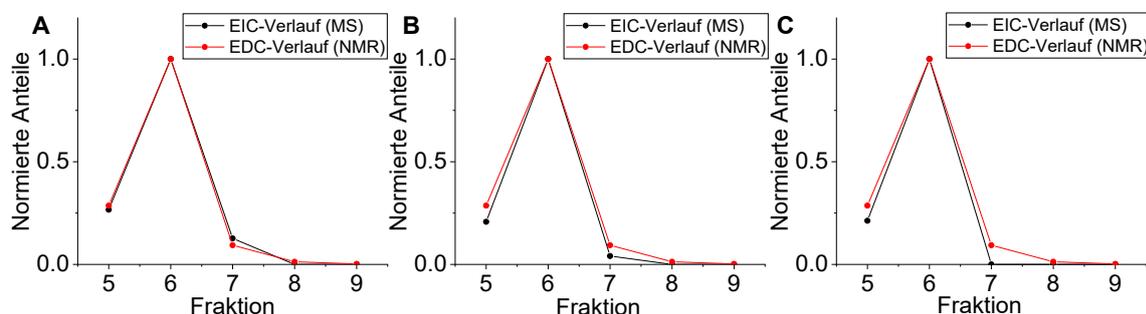


Abbildung 87: Korrelationsverläufe über fünf Fraktionen anhand des unbekannten chemischen Markers im polaren Extrakt der Erdnuss. Die NMR und MS Daten wurden jeweils normiert. **A:** Korrelation des Singulett bei 3.05 ppm im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum mit der gefundenen Masse $m/z = 82.0542$. Es wurde ein Korrelationskoeffizient von 0.999 berechnet. **B:** Korrelation des Singulett bei 3.05 ppm im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum mit der gefundenen Masse $m/z = 100.0749$. Es wurde ein Korrelationskoeffizient von 0.997 berechnet. **C:** Es ist die Korrelation des Singulett bei 3.05 ppm im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum mit der gefundenen Masse $m/z = 146.0779$ gezeigt. Es wurde ein Korrelationskoeffizient von 0.995 berechnet.

In den ESI^+ -Massenspektren konnten drei Massen ($m/z = 82.0542, 100.0749, 146.0779$) detektiert werden, die einen ähnlichen Verlauf zu den NMR-Daten zeigten. Hierbei wurde der Korrelationskoeffizient mit dem EDC-Verlauf des Singulett bei 3.05 ppm des unbekannten Markers bestimmt. Der Verlauf der MS-Daten wurde mit dem normierten EIC-Verlauf dargestellt. Die Werte, die für die erste Auftragung (**A**) verwendet wurden, sind in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13: Die zur Erstellung des Korrelationsverlaufs des unbekannten Metaboliten mit dem der gefundenen Masse $m/z = 82.0542$ verwendeten Daten. Die Werte des EDC-Signals ergeben sich aus dem Verhältnis des Singulett bei 3.05 ppm bezogen auf das TSP- d_4 -Referenzsignal. Die Daten wurden zur besseren Vergleichbarkeit und Darstellung normiert. Für die Masse $m/z = 82.0542$ wurde ein hoher Korrelationskoeffizient von 0.999 berechnet.

Fraktion	EDC-Signal bei 3.05 ppm	EDC-Verlauf (normiert)	EIC-Area $m/z = 82.0542$	EIC-Verlauf (normiert)	Korrelationskoeffizient
1	12.3259	0.2053	3177.5200	0.1912	
2	43.0394	0.7168	11927.0100	0.7178	
3	4.0138	0.0668	1512.0000	0.0910	0.999
4	0.5588	0.0093	0.0000	0.0000	
5	0.1082	0.0018	0.0000	0.0000	

Ergebnisse und Diskussion

Auch bei der zweiten detektierten Masse wurde ein hoher Korrelationskoeffizient ermittelt. Die Daten, die für die zweite Auftragung (**B**) in Abbildung 87 verwendet wurden, sind in Tabelle 14 dargestellt.

Tabelle 14: Die zur Erstellung des Korrelationsverlaufs des unbekanntes Metaboliten mit dem der gefundenen Masse $m/z = 100.0749$ verwendeten Daten. Die Werte des EDC-Signals ergeben sich aus dem Verhältnis des Singulett bei 3.05 ppm bezogen auf das TSP- d_4 -Referenzsignal. Die Daten wurden zur besseren Vergleichbarkeit und Darstellung normiert. Für die Masse $m/z = 100.0749$ wurde ein hoher Korrelationskoeffizient von 0.997 berechnet.

Fraktion	EDC-Signal bei 3.05 ppm	EDC-Verlauf (normiert)	EIC-Area $m/z = 100.0749$	EIC-Verlauf (normiert)	Korrelationskoeffizient
1	12.3259	0.2053	3344.7200	0.1662	
2	43.0394	0.7168	16125.8500	0.8011	
3	4.0138	0.0668	657.8700	0.0327	0.997
4	0.5588	0.0093	0.0000	0.0000	
5	0.1082	0.0018	0.0000	0.0000	

Die Verläufe der MS und NMR Daten zeigen einen ähnlichen Verlauf. Der EDC-Verlauf des Singulett bei 3.05 ppm des unbekanntes Metaboliten diente als Vergleich zum normierten EIC-Verlauf der MS-Daten. Die für die Auftragung verwendeten Daten sind in Tabelle 15 dargestellt.

Tabelle 15: Die zur Erstellung des Korrelationsverlaufs des unbekanntes Metaboliten mit dem der gefundenen Masse $m/z = 146.0779$ verwendeten Daten. Die Werte des EDC-Signals ergeben sich aus dem Verhältnis des Singulett bei 3.05 ppm bezogen auf das TSP- d_4 -Referenzsignal. Die Daten wurden zur besseren Vergleichbarkeit und Darstellung normiert. Für die Masse $m/z = 146.0779$ wurde ein hoher Korrelationskoeffizient von 0.995 berechnet.

Fraktion	EDC-Signal bei 3.05 ppm	EDC-Verlauf (normiert)	EIC-Area $m/z = 146.0779$	EIC-Verlauf (normiert)	Korrelationskoeffizient
1	12.3259	0.2053	985.7600	0.1753	
2	43.0394	0.7168	4636.1100	0.8247	
3	4.0138	0.0668	0.0000	0.0000	0.995
4	0.5588	0.0093	0.0000	0.0000	
5	0.1082	0.0018	0.0000	0.0000	

Ergebnisse und Diskussion

Insgesamt zeigten die Daten der drei gefundenen Massen einen zu den NMR-Daten korrelierten Verlauf. Die in den Tabellen berechneten Korrelationskoeffizienten von 0.999 für die Masse $m/z = 82.0542$, 0.997 für $m/z = 100.0749$ und 0.995 für $m/z = 146.0779$ weisen darauf hin, dass diese mit hoher Wahrscheinlichkeit dem Metaboliten zugeordnet werden können. Ein Grund für das Auftreten von drei verschiedenen Massen könnte sein, dass der zu identifizierende Metabolit fragmentiert. Die Massendifferenz von 18 g mol^{-1} könnte beispielsweise auf eine Abspaltung von Wasser hinweisen. Da die gefundenen Massen eine vollständige Identifizierung nicht ermöglichen, sollte der Metabolit im Folgenden aus dem komplexen Gemisch isoliert und die Strukturaufklärung somit erleichtert werden.

Es wurde eine polare Extraktion von Erdnusslyophilisat und eine automatisierte Umkehrphasensäulenchromatographie nach Methode B durchgeführt. Die Fraktionen wurden am 600 MHz Spektrometer (NS = 128) auf das Singulett bei 3.05 ppm untersucht. Die Fraktionen 10, 11, 12 und 13, in denen der Metabolit vorhanden war, wurden vereint und lyophilisiert. Anschließend wurde nach Methode C fraktioniert, die Fraktionen 15 und 16 mit dem Marker vereint und lyophilisiert. Es erfolgte eine erneute Fraktionierung mit den selben Parametern wie zuvor, jedoch mit einer verringerten Fraktionsgröße von 5 mL. In den $^1\text{H-NMR}$ -Spektren konnte der Marker in den Fraktionen 29 – 36 nachgewiesen werden. Die Fraktionen wurden vereint und mittels präparativer HPLC fraktioniert. Hierbei wurde die Fraktion 10 erhalten, die hauptsächlich Signale des Markers aufweist. In Abbildung 88 ist das polare Gesamtextrakt von Erdnüssen dargestellt sowie die Fraktion 10 nach dreimaliger Umkehrphasensäulenchromatographie und Trennung mittels präparativer HPLC.

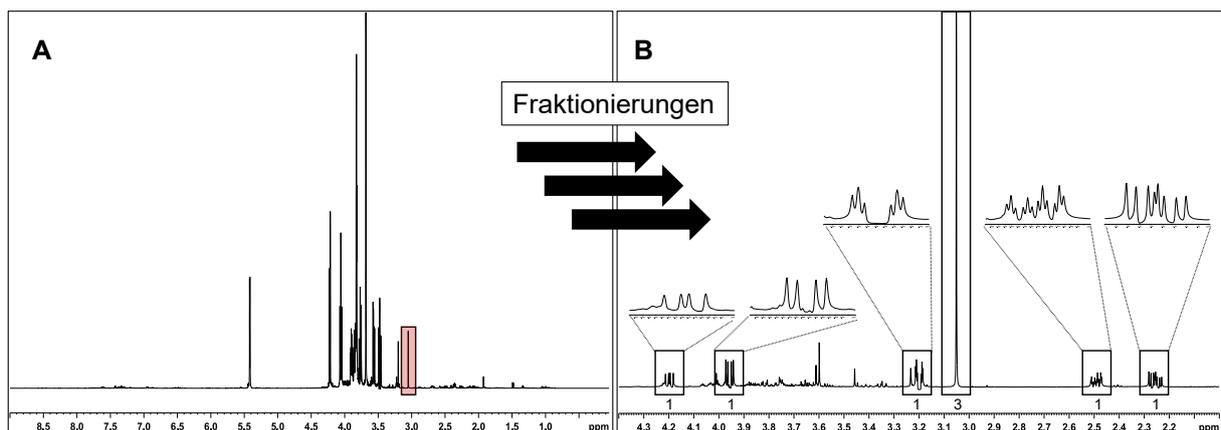


Abbildung 88: **A:** Gesamtspektrum (600 MHz, NS = 128) des polaren Erdnussextraktes. Das Singulett des Metaboliten, welcher zum Nachweis für Erdnüsse verwendet wurde, ist farblich markiert. **B:** Erhaltene Fraktion 10 nach dreimaliger Umkehrphasensäulenchromatographie und anschließender Fraktionierung mittels präparativer HPLC. Die relativen Integrale sind angegeben und die dadurch dem Singulett vermutlich zugehörigen Signale vergrößert dargestellt.

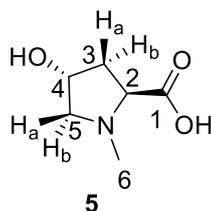
Ergebnisse und Diskussion

Durch mehrmalige Umkehrphasensäulenchromatographie sowie Fraktionierung mittels präparativer HPLC konnte der Metabolit aus dem polaren Gesamtextrakt (**A**) der Erdnuss mit wenigen Verunreinigungen isoliert werden. Das Spektrum der Fraktion 10 (**B**) zeigt die, durch die relativen Integrale, dem Metaboliten zugehörigen Signale. Zudem konnte zum einen die Aminosäure Tyrosin (**18**) detektiert werden, die charakteristische Multipletts von *para*-substituierten Aromaten bei 6.95 ppm und 7.62 ppm aufweist. Zum Anderen wurde bei 1.48 ppm ein Dublett detektiert, welches der Aminosäure Alanin (**9**) zugeordnet wurde. Die Verunreinigung der Fraktion 10 mit Tyrosin (**18**) beträgt ca. 11% und mit Alanin (**9**) 3%. Zu beachten ist, dass ein Signal auf Grund des unterdrückten Wassersignals nicht zu beobachten war, welches aber im Spektrum ohne Wasserunterdrückung als Multiplett zu beobachten ist. Das ¹H-NMR-Spektrum ohne Wasserunterdrückung kann im Anhang (Abbildung 90) eingesehen werden. Die Auswertung der NMR spektroskopischen Daten ist in Tabelle 16 zusammengefasst.

Tabelle 16: NMR spektroskopische Daten des Erdnuss-Markers in Fraktion 10. Es sind die chemischen Verschiebungen (δ), Multiplizitäten, Kopplungskonstanten (J), das Integral und die Zuordnung dargestellt.

δ [ppm]	Multiplizität	J [Hz]	Integral	Zuordnung
4.66 – 4.62	m	-	1	H-4
4.20	dd	7.5, 11.1	1	H-2
3.96	dd	13.0, 4.8	1	H-5b
3.20	ddd	13.0, 2.0, 2.0	1	H-5a
3.05	s	-	3	H-6
2.49	dddd	14.1, 7.5, 2.0, 2.0	1	H-3a
2.26	ddd	14.1, 11.1, 5.0	1	H-3b

Bei dem Singulett kann es sich beispielsweise um eine *N*-Methylgruppe handeln. Die chemische Verschiebung von 4.20 ppm des Dublett vom Dubletts deutet darauf hin, dass sich in Nachbarschaft eine Hydroxygruppe befinden könnte. Es wurde zusätzlich ein ¹³C-NMR-Spektrum der Fraktion gemessen, in dem ein Signal bei 172.9 ppm detektiert wurde, welches auf eine Carbonylgruppe hinweist (Anhang, Abbildung 91). Der Metabolit wurde durch Vergleich der chemischen Verschiebungen der Signale mit der Literatur identifiziert.^[115] In Schema 3 ist der Metabolit dargestellt.

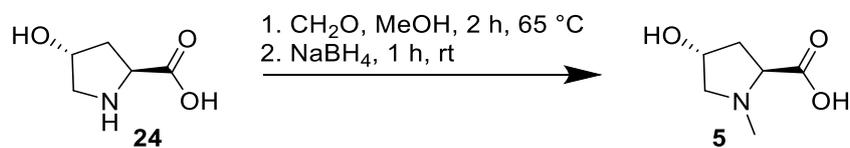


Schema 3: Strukturformel des Metaboliten *N*-Methyl-*trans*-4-hydroxy-L-prolin (**5**) mit Nummerierung der Protonen.

Ergebnisse und Diskussion

Die Nummerierung der Protonen entspricht der Zuordnung in Tabelle 16. Das Singulett bei 3.05 ppm, welches als Indikator für Verfälschungen mit Erdnuss dient, kann der *N*-Methylgruppe zugeordnet werden. Des Weiteren wurde von der Fraktion ein ESI⁺-MS-Spektrum gemessen, in dem der Molekülionenpeak bei $m/z = 146.0814$ identifiziert wurde. Diese stimmt mit der für $([M+H]^+)$ berechneten Masse von $m/z = 146.0817$ überein. Des Weiteren konnten die bereits zuvor dem Metaboliten zugeordneten Massen der Fragmente $m/z = 82.0659$ und 100.0763 detektiert werden. Diese sind laut Literatur auf die Abspaltung der Carboxylgruppe und Wasser zurückzuführen.^[116] Des Weiteren wurde eine Masse mit $m/z = 182.0795$ detektiert, welche der Aminosäure Tyrosin (**18**) mit einer für $([M+H]^+)$ berechneten Masse von $m/z = 182.0817$ zugeordnet werden kann. Der spezifische Drehwert der Fraktion 10 beträgt $[\alpha]_D^{20} = -7.1^\circ$ (c 0.49, H₂O). Der Wert kann durch weitere, in der Fraktion enthaltene optische Verbindungen, wie beispielsweise Tyrosin (**18**), beeinflusst werden. Er zeigt dennoch eine Tendenz, da die Fraktion optisch aktives Licht nach links dreht, ebenso wie die Aminosäuren L-Prolin und L-Hydroxyprolin, und stützt daher die Vermutung, dass es sich um diese als Grundbaustein handelt.^[117]

Um die vermutete Struktur von *N*-Methyl-*trans*-4-hydroxy-L-prolin (**5**) zu verifizieren, wurde der Metabolit synthetisiert (Schema 4).



Schema 4: Synthese von *N*-Methyl-*trans*-4-hydroxy-L-prolin (**5**) ausgehend von *trans*-4-Hydroxy-L-prolin (**24**).

trans-4-Hydroxy-L-prolin (**24**) wurde nach der Methode von Sondengam *et al.* methyliert, indem durch reduktive Aminierung mit Natriumborhydrid Metabolit **5** synthetisiert wurde.^[98] Der synthetisierte Metabolit **5** und das kommerziell erhältliche Isomer *N*-Methyl-*cis*-4-hydroxy-L-prolin (**25**) wurden jeweils einzeln in der aus Erdnuss isolierten Fraktion 10 als interner Standard verwendet, um die Struktur und Stereochemie zu bestätigen.

Ergebnisse und Diskussion

In Abbildung 89 sind die durchgeführten *spike-in*-Experimente mit den Metaboliten **5** und **25** dargestellt.

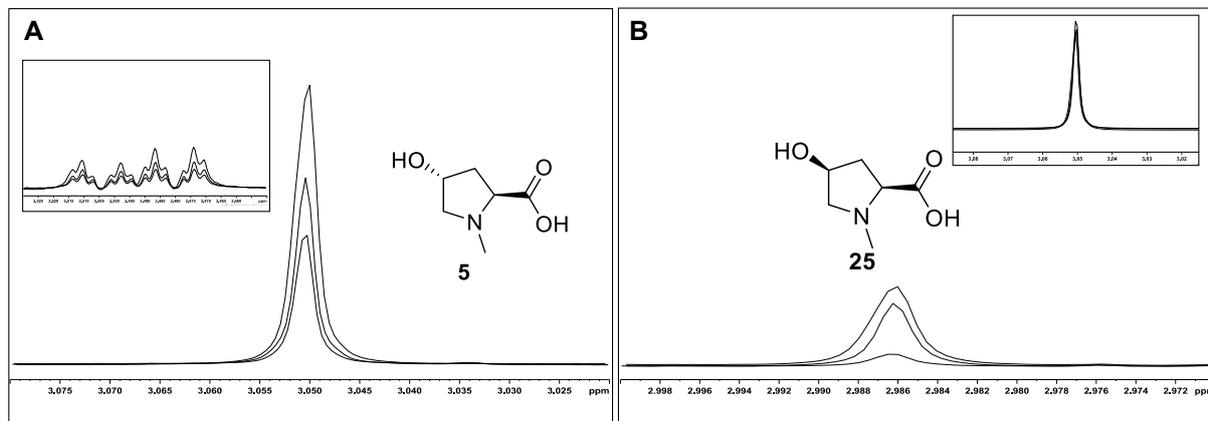


Abbildung 89: **A:** Der vermutete Marker wurde durch Verwendung des synthetisierten Metaboliten *N*-Methyl-*trans*-4-hydroxy-L-prolin (**5**) als interner Standard bestätigt. Es wurden Intensitätszunahmen der zum Metaboliten zugehörigen Signale beobachtet. **B:** Das *spike-in*-Experiment mit dem kommerziell erhältlichen Stereoisomer *N*-Methyl-*cis*-4-hydroxy-L-prolin (**25**) zeigt für die *N*-Methylgruppe eine Intensitätszunahme eines Singulets bei 2.99 ppm und kann daher ausgeschlossen werden. Die Intensität des Singulets bei 3.05 ppm ist vergrößert dargestellt und zeigt keine Intensitätszunahme.

Bei der Verwendung beider Metaboliten als interne Standards konnte bestätigt werden, dass es sich um *N*-Methyl-*trans*-4-hydroxy-L-prolin (**5**) handelt. Bei der Zugabe des Metaboliten konnte in der Fraktion 10 eine Zunahme der Intensitäten der zugehörigen Signale beobachtet werden. Im Gegensatz dazu wurde bei der Zugabe von *N*-Methyl-*cis*-4-hydroxy-L-prolin (**25**) eine Zunahme der Intensität eines Singulets bei 2.99 ppm für die *N*-Methylgruppe beobachtet. Die absolute Konzentration des Metaboliten wurde anhand der Erdnussprobe mit dem höchsten und geringsten Gehalt (Erdnussprobe 11 und 12) mit TSP- d_4 als Referenzsignal als grober Richtwert ermittelt. Demnach liegt diese in den gesamten Erdnussproben zwischen 5 mg mL^{-1} und 9 mg mL^{-1} .

Der Metabolit **5** wurde erstmals aus Erdnüssen im Jahr 1966 von Lee *et al.*, jedoch ohne Angabe der Konfiguration der Hydroxygruppe, beschrieben.^[118] Dies zeigt, dass der Metabolit zum chemischen Profil der Erdnuss gehört und somit als verlässlicher Marker für Erdnussbeimischungen geeignet ist. Der Metabolit beeinflusst vermutlich den osmotischen Zustand und soll beteiligt an Reaktionen auf Trockenstress sein.^[119,120] Des Weiteren soll er ein effektiver Inhibitor für Larvenentwicklung sein und somit eine Abwehrfunktion der Pflanze einnehmen.^[121] Er wurde beispielsweise aus der giftigen Pflanze *Ipomoea carnea* und aus Blättern von fünf Arten der *Copaifera*, einem tropischen Baum aus der Familie der Hülsenfrüchtler, isoliert.^[115,121] *N*-Methyl-*trans*-4-hydroxy-L-prolin (**5**) wurde in Rotalgen (*Chondria coerulescens*), in der Rinde des Baums *Croton gubouga* aus der Familie der Wolfsmilchgewächse (*Euphorbiaceae*) und *Stylosanthes scabra* nachgewiesen.^[116,122,123]

Ergebnisse und Diskussion

Bisher wurde der Metabolit **5** nur aus Pistazien als weiteres Lebensmittel isoliert.^[120] Zudem wurde er in hohen Konzentrationen in der in Australien beheimateten Pflanze *Melaleuca lanceolata* aus der Familie der Myrtengewächse (*Myrtaceae*) nachgewiesen.^[124] Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Konfiguration des Metaboliten **5** aus Erdnüssen aufgeklärt. Mit dessen Singulett bei 3.05 ppm im ¹H-NMR-Spektrum wurde eine *Screening*-Methode mit kurzer Analysezeit zur Detektion von wirtschaftlich relevanten Erdnussbeimischungen vorgestellt.

7. Literaturverzeichnis

- [1] S. Ghosh, P. Mishra, S. N. H. Mohamad, R. M. de Santos, B. D. Iglesias, P. B. Elorza, *Biosyst. Eng.* **2016**, *151*, 178–186.
- [2] S. Klockmann, E. Reiner, N. Cain, M. Fischer, *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 1456–1466.
- [3] R. Lattupalli, A. Kolluru, J. Yee, *ScientificWorldJournal.* **2008**, *8*, 949–950.
- [4] C. Xiu, K. K. Klein, *Food Policy* **2010**, *35*, 463–470.
- [5] S. Stanciu, *Procedia Econ. Financ.* **2015**, *23*, 697–703.
- [6] Europol/INTERPOL, *Operation OPSON VI - Targeting Counterfeit and Substandard Foodstuff and Beverage*, zu finden unter https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/official-controls-food-fraud_opson-vi-report.pdf (letzter Zugriff: **20.04.2020**).
- [7] F. D. Finkelman, *Curr. Opin. Immunol.* **2010**, *22*, 783–788.
- [8] Europol/INTERPOL, *Operation OPSON VII - Targeting Counterfeit and Substandard Foodstuff and Beverage*, zu finden unter https://www.europol.europa.eu/sites/default/files/documents/opson_vii_report_-_public_version.pdf (letzter Zugriff: **20.04.2020**).
- [9] Europol/INTERPOL, “OPSON VIII (2018/2019) - Verfälschungen bei Kaffee europaweit im Fokus,” zu finden unter https://www.bvl.bund.de/DE/Arbeitsbereiche/01_Lebensmittel/03_Verbraucher/16_Food_Fraud/06_OPSON_Operationen/OpsonVIII/OPSON_Operationen_node.html (letzter Zugriff: **15.05.2020**).
- [10] R. Matissek, M. Fischer, G. Steiner, *Lebensmittelanalytik*, 6. Auflage, Springer-Verlag GmbH, Berlin, **2018**.
- [11] Y. B. Monakhova, W. Ruge, T. Kuballa, M. Ilse, O. Winkelmann, B. Diehl, F. Thomas, D. W. Lachenmeier, *Food Chem.* **2015**, *182*, 178–184.
- [12] R. Bachmann, S. Klockmann, J. Haerdter, M. Fischer, T. Hackl, *J. Agric. Food Chem.* **2018**, *66*, 11873–11879.

Literaturverzeichnis

- [13] J. L. Markley, R. Brüschweiler, A. S. Edison, H. R. Eghbalnia, R. Powers, D. Raftery, D. S. Wishart, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2017**, *43*, 34–40.
- [14] A. P. Nwokeji, I. O. Enodiana, E. S. Raymond, O.-I. Osasere, A. H. Abiola, *Int. J. Technol. Enhanc. Emerg. Eng. Res.* **2016**, *4*, 1–8.
- [15] K. Dettmer, P. A. Aronov, B. D. Hammock, *Mass Spectrom. Rev.* **2007**, *26*, 51–78.
- [16] S. W. Drew, A. L. Demain, *Annu. Rev. Microbiol.* **1977**, *31*, 343–356.
- [17] M. Mazid, T. A. Khan, F. Mohammad, *Biol. Med.* **2011**, *3*, 232–249.
- [18] R. Breitling, A. Ceniceros, A. Jankevics, E. Takano, *Metabolites* **2013**, *3*, 1076–1083.
- [19] L. Taiz, E. Zeiger, *Plant Physiology*, 3. Auflage, Sinauer Associates Inc., Sunderland, **2002**.
- [20] C. A. Mora, J. G. Halter, C. Adler, A. Hund, H. Anders, K. Yu, W. J. Stark, *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64*, 3501–3507.
- [21] V. S. Sobolev, *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 1949–1954.
- [22] J. M. Sales, A. V. A. Resurreccion, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2014**, *54*, 734–770.
- [23] G. Habermehl, P. E. Hammann, H. C. Krebs, W. Ternes, *Naturstoffchemie*, 3. Auflage, Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, **2008**.
- [24] W. Große, *Phytochemistry* **1982**, *21*, 819–822.
- [25] E. Kirberger, L. Braun, *Biochim. Biophys. Acta* **1961**, *49*, 391–393.
- [26] A. Bijelic, M. Pretzler, C. Molitor, F. Zekiri, A. Rompel, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2015**, *54*, 14677–14680.
- [27] F. Crick, *Nature* **1970**, *227*, 561–563.
- [28] R. Goodacre, *Metabolomics* **2005**, *1*, 1–2.
- [29] J. Van Der Greef, A. K. Smilde, *J. Chemom.* **2005**, *19*, 376–386.
- [30] J. Trygg, E. Holmes, T. Lundstedt, *J. Proteome Res.* **2007**, *6*, 469–479.
- [31] M. M. W. B. Hendriks, F. A. va. Eeuwijk, R. H. Jellema, J. A. Westerhuis, T. H. Reijmers, H. C. J. Hoefsloot, A. K. Smilde, *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2011**, *30*, 1685–1698.

- [32] E. L. Ulrich, H. Akutsu, J. F. Doreleijers, Y. Harano, Y. E. Ioannidis, J. Lin, M. Livny, S. Mading, D. Maziuk, Z. Miller, et al., *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 402–408.
- [33] D. S. Wishart, Y. D. Feunang, A. Marcu, A. C. Guo, K. Liang, R. Vázquez-Fresno, T. Sajed, D. Johnson, C. Li, N. Karu, et al., *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, D608–D617.
- [34] L. L. Dean, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2018**, *120*, 1–14.
- [35] M. F. Ramadan, *Fruit Oils: Chemistry and Functionality*, 1. Auflage, Springer Nature Switzerland AG, Cham, **2019**.
- [36] R. Popescu, R. E. Ionete, O. R. Botoran, D. Costinel, F. Bucura, E. I. Geana, Y. F. J. Alabedallat, M. Botu, *Molecules* **2019**, *24*.
- [37] J. Janick, R. E. Paull, *The Encyclopedia of Fruits and Nuts*, 1. Auflage, CAB International, Oxfordshire, **2008**.
- [38] J. A. Vinson, Y. Cai, *Food Funct.* **2012**, *3*, 134–140.
- [39] L. Li, R. Tsao, R. Yang, J. K. G. Kramer, M. Hernandez, *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 1164–1169.
- [40] A. P. Simopoulos, *Am. Soc. Clin. Nutr.* **1999**, *70*, 560S-569S.
- [41] D. Hayes, M. J. Angove, J. Tucci, C. Dennis, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2016**, *56*, 1231–1241.
- [42] International Nut&DriedFruit, *Nuts & Dried Fruits Statistical Yearbook 2018/2019*, zu finden unter <https://www.nutfruit.org/industry/technical-resources> (letzter Zugriff: **23.04.2020**).
- [43] R. K. Varshney, M. K. Pandey, N. Puppala, *The Peanut Genome*, 1. Auflage, Springer International Publishing AG, Cham, **2017**.
- [44] D. A. Bender, A. E. Bender, *Benders' Dictionary of Nutrition and Food Technology*, 7. Auflage, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, **1999**.
- [45] Statista - Consumption of tree nuts worldwide in 2018, zu finden unter: <https://www.statista.com/statistics/1030815/tree-nut-global-consumption-by-type/> (letzter Zugriff: **23.04.2020**).
- [46] M. N. Primeau, R. Kagan, L. Joseph, H. Lim, C. Dufresne, C. Duffy, D. Prhcal, A. Clarke, *Clin. Exp. Allergy* **2000**, *30*, 1135–1143.

- [47] S. Anvari, J. Miller, C. Yeh, C. M. Davis, *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **2019**, *57*, 244–260.
- [48] J. Savage, C. B. Johns, *Immunol. Allergy Clin. North Am.* **2015**, *35*, 45–59.
- [49] S. Kumar, A. K. Verma, M. Das, P. D. Dwivedi, *Int. Immunopharmacol.* **2012**, *13*, 432–439.
- [50] A. W. Burks, L. W. Williams, R. M. Helm, C. Connaughton, G. Cockrell, T. O'Brien, *J. Allergy Clin. Immunol.* **1991**, *88*, 172–179.
- [51] J. A. Bird, J. M. Spergel, S. M. Jones, R. Rachid, A. H. Assa'ad, J. Wang, S. A. Leonard, S. S. Laubach, E. H. Kim, B. P. Vickery, et al., *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* **2018**, *6*, 476–485.
- [52] E. Rapposelli, M. P. Rigoldi, D. Satta, D. Delpiano, S. Secci, A. Porceddu, *Plants* **2018**, *7*, 1–17.
- [53] D. S. Wishart, *Trends Food Sci. Technol.* **2008**, *19*, 482–493.
- [54] M. Arndt, M. Rurik, A. Drees, K. Bigdowski, O. Kohlbacher, M. Fischer, *Food Control* **2020**, *115*, 107302.
- [55] M. Esteki, B. Farajmand, S. Amanifar, R. Barkhordari, Z. Ahadiyan, E. Dashtaki, M. Mohammadlou, Y. Vander Heyden, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2017**, *171*, 251–258.
- [56] X. Gu, L. Zhang, L. Li, N. Ma, K. Tu, L. Song, L. Pan, *J. Food Process Eng.* **2018**, *41*, 1–9.
- [57] L. Laghi, G. Picone, F. Capozzi, *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2014**, *59*, 93–102.
- [58] M. Defernez, E. Wren, A. D. Watson, Y. Gunning, I. J. Colquhoun, G. Le Gall, D. Williamson, E. K. Kemsley, *Food Chem.* **2017**, *216*, 106–113.
- [59] N. Cain, C. Marji, K. von Wuthenau, T. Segelke, M. Fischer, *Metabolites* **2020**, *10*, 91.
- [60] L. Mannina, M. D'Imperio, D. Capitani, S. Rezzi, C. Guillou, T. Mavromoustakos, M. D. M. Vilchez, A. H. Fernández, F. Thomas, R. Aparicio, *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 11550–11556.
- [61] M. Planque, T. Arnould, P. Delahaut, P. Renard, M. Dieu, N. Gillard, *Food Chem.* **2019**, *274*, 35–45.
- [62] R. Pilolli, E. De Angelis, L. Monaci, *Anal. Bioanal. Chem.* **2018**, *410*, 5653–5662.

Literaturverzeichnis

- [63] O. Stephan, S. Vieths, *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 3754–3760.
- [64] E. N. C. Mills, A. Potts, G. W. Plumb, N. Lambert, M. R. A. Morgan, *Food Agric. Immunol.* **1997**, *9*, 37–50.
- [65] S. L. Hefle, R. K. Bush, J. W. Yunginger, F. S. Chu, *J. Food Prot.* **1994**, *57*, 419–423.
- [66] E. Scaravelli, M. Brohée, R. Marchelli, A. J. Van Hengel, *Eur. Food Res. Technol.* **2008**, *227*, 857–869.
- [67] M. Esteki, Y. Vander Heyden, B. Farajmand, Y. Kolahderazi, *Food Control* **2017**, *82*, 31–41.
- [68] H. Günther, *NMR Spectroscopy - Basic Principles, Concepts, and Applications in Chemistry*, 3. Auflage, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, **2013**.
- [69] H. Friebolin, *Ein- Und Zweidimensionale NMR-Spektroskopie*, 5. Auflage, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, **2013**.
- [70] A. M. Weljie, J. Newton, P. Mercier, E. Carlson, C. M. Slupsky, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 4430–4442.
- [71] N. V. Reo, *Drug Chem. Toxicol.* **2002**, *25*, 375–382.
- [72] H. K. Kim, Y. H. Choi, R. Verpoorte, *Nat. Protoc.* **2010**, *5*, 536–549.
- [73] R. T. McKay, *Concepts Magn. Reson. Part A* **2011**, *38A*, 197–220.
- [74] V. V. Krishnan, N. Murali, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2013**, *68*, 41–57.
- [75] H. Pelantová, M. Bugáňová, J. Anýž, B. Železná, L. Maletínská, D. Novák, M. Haluzík, M. Kuzma, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2015**, *115*, 225–235.
- [76] R. Sharma, N. Gogna, H. Singh, K. Dorai, *RSC Adv.* **2017**, *7*, 29860–29870.
- [77] D. Schulze-Sünninghausen, J. Becker, B. Luy, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 1242–1245.
- [78] H. Kessler, H. Oschkinat, C. Griesinger, W. Bermel, *J. Magn. Reson.* **1986**, *70*, 106–133.
- [79] T. D. W. Claridge, *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*, 3. Auflage, Elsevier Ltd., Amsterdam, **2016**.

- [80] W. Kessler, *Multivariate Datenanalyse*, 1. Auflage, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, **2007**.
- [81] C. V. Di Anibal, M. P. Callao, I. Ruisánchez, *Talanta* **2011**, *86*, 316–323.
- [82] K. Backhaus, B. Erichson, W. Plinke, R. Weiber, *Multivariate Analysemethoden*, 15. Auflage, Springer Gabler Verlag, Berlin, **2018**.
- [83] D. Moskau, *Concepts Magn. Reson. Part B Magn. Reson. Eng.* **2002**, *15*, 164–176.
- [84] R. A. van den Berg, H. C. J. Hoefsloot, J. A. Westerhuis, A. K. Smilde, M. J. van der Werf, *BMC Genomics* **2006**, *7*, 1–15.
- [85] T. Dietterich, *ACM Comput. Surv.* **1995**, *27*, 326–327.
- [86] K. Pearson, *Philos. Mag.* **1901**, *2*, 559–572.
- [87] A. S. Ashour, Y. Guo, A. R. Hawas, G. Xu, *Heal. Inf. Sci. Syst.* **2018**, *6*, 1–10.
- [88] S. Varma, R. Simon, *BMC Bioinformatics* **2006**, *7*, 1–8.
- [89] C. J. C. Burges, *Data Min. Knowl. Discov.* **1998**, *2*, 121–167.
- [90] M. Skurichina, R. P. W. Duin, *Pattern Anal. Appl.* **2002**, *5*, 121–135.
- [91] A. Mert, N. Kılıç, E. Bilgili, *Expert Syst.* **2016**, *33*, 275–285.
- [92] M. Eliasson, S. Rannar, J. Trygg, *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2011**, *12*, 996–1004.
- [93] M. H. Quenouille, *Biometrika* **1956**, *43*, 353–360.
- [94] B. Efron, *Ann. Stat.* **1979**, *7*, 1–26.
- [95] S. Smit, M. J. van Breemen, H. C. J. Hoefsloot, A. K. Smilde, J. M. F. G. Aerts, C. G. de Koster, *Anal. Chim. Acta* **2007**, *592*, 210–217.
- [96] S. M. Kohl, M. S. Klein, J. Hochrein, P. J. Oefner, R. Spang, W. Gronwald, *Metabolomics* **2012**, *8*, 146–160.
- [97] B. Richter, M. Rurik, S. Gurk, O. Kohlbacher, M. Fischer, *Food Control* **2019**, *104*, 318–325.
- [98] B. L. Sondengam, J. Hentchoya Hémo, G. Charles, *Tetrahedron Lett.* **1973**, 261–263.
- [99] A. M. Goodpaster, L. E. Romick-Rosendale, M. A. Kennedy, *Anal. Biochem.* **2010**, *401*, 134–143.

- [100] A. Kazankaya, M. F. Balta, I. H. Yörük, F. Balta, P. Battal, *Asian J. Chem.* **2008**, *20*, 1519–1525.
- [101] L. Rumask, Identifizierung von Metaboliten in Walnüssen mittels NMR-Spektroskopie, *Bachelorarbeit* **2019**, Universität Hamburg.
- [102] B. Singldinger, A. Dunkel, D. Bahmann, C. Bahmann, D. Kadow, B. Bisping, T. Hofmann, *J. Agric. Food Chem.* **2018**, *66*, 4660–4673.
- [103] S. Piccolella, A. Fiorentino, S. Pacifico, B. D’Abrosca, P. Uzzo, P. Monaco, *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 1928–1935.
- [104] J. S. Yu, D. Lee, S. R. Lee, J. W. Lee, C. I. Choi, T. S. Jang, K. S. Kang, K. H. Kim, *Bioorg. Chem.* **2018**, *76*, 28–36.
- [105] J. Chamarro, A. Östin, G. Sandberg, *Phytochemistry* **2001**, *57*, 179–187.
- [106] H. Ito, T. Okuda, T. Fukuda, T. Hatano, T. Yoshida, *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 672–679.
- [107] A. Stelzer, Analyse von Erdnuss in Gemischen mittels ¹H-NMR-Spektroskopie, *Bachelorarbeit* **2020**, Universität Hamburg.
- [108] T. Bastek, Qualitative und quantitative Analyse von Erdnuss in Gemischen durch NMR Spektroskopie, *Bachelorarbeit* **2019**, Universität Hamburg.
- [109] D. A. Armbruster, T. Pry, *Clin. Biochem. Rev.* **2008**, *29 Suppl 1*, S49-52.
- [110] E. Desimoni, B. Brunetti, *Pharm. Anal. Acta* **2015**, *6*:355.
- [111] N. Saadati, M. P. Abdullah, Z. Zakaria, S. B. T. Sany, M. Rezayi, H. Hassonizadeh, *Chem. Cent. J.* **2013**, *7*, 1–10.
- [112] A. Bollen, Entwicklung einer NMR- und MS-basierten Strategie zur Identifizierung von Metaboliten aus Gemischen, *Dissertation* **2020**, Universität Hamburg.
- [113] H. Xu, Y. Deng, *IEEE Access* **2017**, *6*, 11634–11640.
- [114] P. Rowe, *Statistik Für Mediziner Und Pharmazeuten*, 1. Auflage, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, **2012**.
- [115] M. Haraguchi, S. L. Gorniak, K. Ikeda, Y. Minami, A. Kato, A. A. Watson, R. J. Nash, R. J. Molyneux, N. Asano, *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 4995–5000.

Literaturverzeichnis

- [116] S. Sciuto, R. Chillemi, M. Piattelli, G. Impellizzeri, *Phytochemistry* **1983**, *22*, 2311–2312.
- [117] K. Hayashi, Y. Fujii, R. Saito, H. Kanao, T. Hino, *Agric. Biol. Chem.* **1966**, *30*, 1221–1232.
- [118] L. S. Lee, N. J. Morris, V. L. Frampton, *J. Agric. Food Chem.* **1965**, *13*, 309–311.
- [119] G. Blunden, A. V. Patel, M. Adrian-Romero, P. Meléndez, *Biochem. Syst. Ecol.* **2004**, *32*, 1153–1158.
- [120] F. Sciubba, G. Capuani, M. E. Di Cocco, D. Avanzato, M. Delfini, *Food Res. Int.* **2014**, *62*, 66–73.
- [121] R. Figliuolo, S. Naylor, J. Wang, J. H. Langenheim, *Phytochemistry* **1987**, *26*, 3255–3259.
- [122] B. R. Thumma, B. P. Naidu, A. Chandra, D. F. Cameron, L. M. Bahnisch, C. Liu, *J. Exp. Bot.* **2001**, *52*, 203–214.
- [123] A. Augustus, H. W. B. Clewer, *J. Chem. Soc. Trans.* **1919**, 923–933.
- [124] G. P. Jones, B. P. Naidu, L. G. Paleg, E. R. T. Tiekink, M. R. Snow, *Phytochemistry* **1987**, *26*, 3343–3344.

8. Anhang

8.1. Verwendete Chemikalien

In Tabelle 17 sind die verwendeten Chemikalien und deren Gefahrenstoffpiktogramme, H- sowie P-Sätze aufgelistet.

Tabelle 17: Gefahrstoffverzeichnis der verwendeten Chemikalien.

Substanz	Gefahrstoffpiktogramm und Signalwort	H-Sätze	P-Sätze
2-Propanol	 Gefahr	225, 319, 336	210, 305+351+338, 370+378, 403+235
5-Hydroxytryptamin	 Gefahr	301, 361	201, 264, 280, 301+310+330, 308+313, 501
Acetonitril	 Gefahr	225, 302+312+332, 319	210, 280, 301+312+330, 302+352+312, 304+340+312, 305+351+338
Acetonitril- <i>d</i> ₃	 Gefahr	225, 302+312+332, 319	210, 280, 305+351+338
Ameisensäure (98%)	 Gefahr	226, 302, 314, 331	210, 280, 303+361+353, 304+340+310, 305+351+338, 403+233
Äpfelsäure	 Achtung	319	280, 305+351+338
Chloroform	 Gefahr	302, 315, 319, 331, 336, 351, 361d, 372	201, 260, 264, 280, 304+340+311, 403+233

Anhang

Substanz	Gefahrstoffpiktogramm und Signalwort	H-Sätze	P-Sätze
Chloroform- <i>d</i>	 Gefahr	302, 315, 319, 331, 351, 361d, 372	201, 260, 264, 280, 304+340+311, 403+233
Cholinchlorid	Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008		
Deuteriumchlorid	 Gefahr	290, 314, 335	234, 261, 303+361+353, 304+340+312, 305+351+338, 390
Deuteriumoxid	Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008		
D-Glucose	Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008		
Dichlormethan	 Achtung	315, 319, 336, 351	201, 261, 264, 280, 304+340+312, 308+313
Dikaliumhydrogenphosphat	Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008		
Essigsäure (99%)	 Gefahr	226, 290, 314	290, 280, 303+361+353, 304+340+310, 370+378 260, 280,
Formaldehyd (37%)	 Gefahr	301+311+331, 314, 317, 335, 341, 350, 370	303+361+353, 304+340, 305+351+338, 308+311
Kaliumdihydrogenphosphat	Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008		
Kohlenstoffdioxid, fest	Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008		

Anhang

Substanz	Gefahrstoffpiktogramm und Signalwort	H-Sätze	P-Sätze
L-Alanin		Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008	
L-Arginin		Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008	
L-Asparaginsäure Monohydrat		Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008	
L-Glutaminsäure		Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008	
L-Isoleucin		Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008	
L-Leucin		Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008	
L-Threonin		Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008	
L-Tyrosin		Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008	
L-Valin		Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008	
Methanol	 Gefahr	225, 301+311+331, 370	210, 280, 301+310+330, 302+352+312, 304+340+311
Methanol-d ₄	 Gefahr	225, 301+311+331, 370	210, 280, 302+352+312, 304+340+311, 370+378, 403+235
Natriumazid	 Gefahr	300+310+330, 373, 410	262, 273, 280, 301+310+330, 302+352+310, 304+340+310
Natriumborhydrid	 Gefahr	314, 301, 360F, 260	223, 280, 301+330+331, 304+340, 305+351+338, 310

Anhang

Substanz	Gefahrstoffpiktogramm und Signalwort	H-Sätze	P-Sätze
Natriumdeuteroxid	 Gefahr	290, 314	280, 301+330+331, 303+361+353, 305+351+338+310
Natriumhydroxid	 Gefahr	290, 314	280, 305+351+338, 310
Natriumtrimethylsilylpropionat	Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008		
<i>n</i> -Hexan	    Gefahr	225, 304, 315, 336, 361fd, 373, 411	210, 260, 273, 280, 301+310, 331, 370+378, 391
<i>N</i> -Methyl- <i>cis</i> -4-Hydroxy-L-prolin	 Achtung	317, 319	280, 305+351+338
<i>N</i> -Methyl- <i>trans</i> -4-Hydroxy-L-prolin	 Achtung	317, 319	261, 272, 280, 302+352, 305+351+338, 362+364
Octamethylcyclotetrasiloxan	  Achtung	226, 361	413, 281
Saccharose	Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008		
Stickstoff	 Achtung	280	410+403
Tetrahydrofuran	   Gefahr	225, 302, 319, 335, 351	210, 280, 301+312+330, 305+351+338, 370+378, 403+235
<i>trans</i> -4-Hydroxy-L-prolin	Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008		

Substanz	Gefahrstoffpiktogramm und Signalwort	H-Sätze	P-Sätze
Zitronensäure	 Achtung	319	264, 280, 305+351+338, 337+313

8.2. KMR-Stoffe

In Tabelle 18 sind die verwendeten KMR-Stoffe dargestellt.

Tabelle 18: Liste der verwendeten KMR-Stoffe der Kategorien 1a und 1b.

CAS-Nummer	Stoffname	Verfahren und eingesetzte Menge	Kategorie
67-66-3	Chloroform	Extraktion, 200 mL	K: 1b
865-49-6	Chloroform- <i>d</i>	NMR, 200 mL	K: 1b
50-00-0	Formaldehyd (37%)	Synthese, 3 mL	K: 1b

8.3. Walnussproben

In Tabelle 19 sind die Informationen der verwendeten Walnussproben aufgelistet.

Tabelle 19: Informationen der verwendeten Walnussproben mit Angabe der Lieferanten, der geographischen Herkunft, des Erntejahres, der Sorte und Bezeichnung.

Lieferant	Land	Region	Herkunft	Erntejahr	Sorte	Probe
Seeberger GmbH	Chile	unbekannt	unbekannt	2017	Serr	17-CL-001
Heinrich Brüning GmbH	Chile	unbekannt	unbekannt	2017	unbekannt	17-CL-002
Horst Walberg Trockenfrucht Import GmbH	Chile	unbekannt	unbekannt	2017	Chandler	17-CL-003
Großmarkt Hamburg	Chile	unbekannt	unbekannt	2017	unbekannt	17-CL-004
nutwork Handelsgesellschaft mbH	Chile	unbekannt	unbekannt	2018	Serr	18-CL-005
priv. Person Nr. 1	China	Xinjiang	unbekannt	2017	unbekannt	17-CN-001
priv. Person Nr. 2	China	unbekannt	unbekannt	2017	unbekannt	17-CN-002
CRP Food Import Export GmbH	China	Xinjiang	unbekannt	2017	Tulare	17-CN-005
CRP Food Import Export GmbH	China	Xinjiang	unbekannt	2018	unbekannt	18-CN-007
CRP Food Import Export GmbH	China	Xinjiang	unbekannt	2018	unbekannt	18-CN-008
CRP Food Import Export GmbH	China	Xinjiang	unbekannt	2018	Chandler	18-CN-009
CRP Food Import Export GmbH	China	Shanxi	unbekannt	2018	unbekannt	18-CN-010
CRP Food Import Export GmbH	China	Yunnan	unbekannt	2018	unbekannt	18-CN-011
CRP Food Import Export GmbH	China	Yunnan	unbekannt	2018	unbekannt	18-CN-012
CRP Food Import Export GmbH	China	Yunnan	unbekannt	2018	unbekannt	18-CN-013
CRP Food Import Export GmbH	China	unbekannt	unbekannt	2019	Tulare	19-CN-014
CRP Food Import Export GmbH	China	Shanxi	unbekannt	2019	unbekannt	19-CN-015
CRP Food Import Export GmbH	China	unbekannt	unbekannt	2019	Chandler	19-CN-016
CRP Food Import Export GmbH	China	Xinjiang	unbekannt	2019	unbekannt	19-CN-017
CRP Food Import Export GmbH	China	Yunnan	unbekannt	2019	unbekannt	19-CN-018
Isemarkt Hamburg	Deutschland	Niedersachsen	Altes Land	2017	unbekannt	17-DE-005

Anhang

Lieferant	Land	Region	Herkunft	Erntejahr	Sorte	Probe
Isemarkt Hamburg	Deutschland	Niedersachsen	Stade	2017	unbekannt	17-DE-006
Isemarkt Hamburg	Deutschland	Niedersachsen	Ostyork	2017	unbekannt	17-DE-007
Isemarkt Hamburg	Deutschland	Baden-Württemberg	Baden	2017	unbekannt	17-DE-008
priv. Person Nr. 3	Deutschland	Nordrhein-Westfalen	Petershagen	2017	unbekannt	17-DE-010
priv. Person Nr. 4	Deutschland	Schleswig-Holstein	Wedel	2018	unbekannt	18-DE-012
priv. Person Nr. 3	Deutschland	Nordrhein-Westfalen	Petershagen	2018	unbekannt	18-DE-013
priv. Person Nr. 3	Deutschland	Nordrhein-Westfalen	Petershagen	2018	unbekannt	18-DE-014
Lochwald-Riednuss GbR	Deutschland	Hessen	Biebesheim	2018	Lara	18-DE-015
Lochwald-Riednuss GbR	Deutschland	Hessen	Biebesheim	2018	Weinsberg 1	18-DE-016
Lochwald-Riednuss GbR	Deutschland	Hessen	Biebesheim	2018	Mars	18-DE-017
Lochwald-Riednuss GbR	Deutschland	Hessen	Biebesheim	2018	Seifersdorfer Runde	18-DE-018
Lochwald-Riednuss GbR	Deutschland	Hessen	Biebesheim	2018	Weidenheimer 139	18-DE-019
Lochwald-Riednuss GbR	Deutschland	Hessen	Biebesheim	2018	Hartley	18-DE-020
Lochwald-Riednuss GbR	Deutschland	Hessen	Biebesheim	2018	Franquette	18-DE-021
Baumschule Matthias Schott	Deutschland	Baden-Württemberg	Sasbach-Leiselheim	2018	Geisenheimer 139	18-DE-022
Baumschule Matthias Schott	Deutschland	Baden-Württemberg	Sasbach-Leiselheim	2018	Geisenheimer 286	18-DE-023
Baumschule Matthias Schott	Deutschland	Baden-Württemberg	Sasbach-Leiselheim	2018	Geisenheimer 120	18-DE-024
Baumschule Matthias Schott	Deutschland	Baden-Württemberg	Sasbach-Leiselheim	2018	Geisenheimer 1247	18-DE-025
Baumschule Matthias Schott	Deutschland	Baden-Württemberg	Sasbach-Leiselheim	2018	Geisenheimer 26	18-DE-026

Anhang

Lieferant	Land	Region	Herkunft	Erntejahr	Sorte	Probe
Baumschule Matthias Schott	Deutschland	Baden-Württemberg	Sasbach-Leiselheim	2018	Esterhazy II	18-DE-027
Baumschule Matthias Schott	Deutschland	Baden-Württemberg	Sasbach-Leiselheim	2018	Geisenheimer 1239	18-DE-028
Baumschule Matthias Schott	Deutschland	Baden-Württemberg	Sasbach-Leiselheim	2018	Weinsberg 1	18-DE-029
priv. Person Nr. 5	Deutschland	Sachsen-Anhalt	Wulferstedt	2018	unbekannt	18-DE-030
priv. Person Nr. 6	Deutschland	Niedersachsen	Celle	2018	unbekannt	18-DE-031
priv. Person Nr. 7	Deutschland	Niedersachsen	Westerbeck	2018	unbekannt	18-DE-032
Dennis Prigge Obstbau	Deutschland	Niedersachsen	Jork	2019	unbekannt	19-DE-033
priv. Person Nr. 7	Deutschland	Niedersachsen	Westerbeck	2019	unbekannt	19-DE-034
priv. Person Nr. 3	Deutschland	Nordrhein-Westfalen	Petershagen	2019	unbekannt	19-DE-035
priv. Person Nr. 3	Deutschland	Nordrhein-Westfalen	Petershagen	2019	unbekannt	19-DE-036
Baumschule Matthias Schott	Deutschland	Baden-Württemberg	Sasbach-Leiselheim	2019	Esterhazy II	19-DE-037
Baumschule Matthias Schott	Deutschland	Baden-Württemberg	Sasbach-Leiselheim	2019	Geisenheimer Nr. 139	19-DE-038
Baumschule Matthias Schott	Deutschland	Baden-Württemberg	Sasbach-Leiselheim	2019	Geisenheimer Nr. 286	19-DE-039
Baumschule Matthias Schott	Deutschland	Baden-Württemberg	Sasbach-Leiselheim	2019	Geisenheimer Nr 120	19-DE-040
Baumschule Matthias Schott	Deutschland	Baden-Württemberg	Sasbach-Leiselheim	2019	Geisenheimer Nr. 1239	19-DE-041
Baumschule Matthias Schott	Deutschland	Baden-Württemberg	Sasbach-Leiselheim	2019	Geisenheimer Nr. 26	19-DE-042
Baumschule Matthias Schott	Deutschland	Baden-Württemberg	Sasbach-Leiselheim	2019	unbekannt	19-DE-043
Lochwald-Riednuss GbR	Deutschland	Hessen	Biebesheim	2019	Geisenheim Nr. 26	19-DE-045

Anhang

Lieferant	Land	Region	Herkunft	Erntejahr	Sorte	Probe
Lochwald-Riednuss GbR	Deutschland	Hessen	Biebesheim	2019	Geisenheim Nr. 138	19-DE-046
Lochwald-Riednuss GbR	Deutschland	Hessen	Biebesheim	2019	Martlog	19-DE-047
Lochwald-Riednuss GbR	Deutschland	Hessen	Biebesheim	2019	Milotai 10	19-DE-048
Lochwald-Riednuss GbR	Deutschland	Hessen	Biebesheim	2019	Esterhazy II	19-DE-049
Lochwald-Riednuss GbR	Deutschland	Hessen	Biebesheim	2019	Mars	19-DE-050
Lochwald-Riednuss GbR	Deutschland	Hessen	Biebesheim	2019	Lara	19-DE-051
priv. Person Nr. 8	Deutschland	Nordrhein-Westfalen	Harsewinkel	2019	unbekannt	19-DE-052
priv. Person Nr. 8	Deutschland	Nordrhein-Westfalen	Herzebrock-Clarholz	2019	unbekannt	19-DE-053
priv. Person Nr. 8	Deutschland	Niedersachsen	Bad Laer	2019	unbekannt	19-DE-054
priv. Person Nr. 8	Deutschland	Nordrhein-Westfalen	Gütersloh	2019	unbekannt	19-DE-055
priv. Person Nr. 9	Deutschland	Niedersachsen	Ottersberg	2019	unbekannt	19-DE-056
Coopenoix	Frankreich	Auvergne-Rhône-Alpes	Isere/Drome/Savoie	2016	unbekannt	16-FR-002
Delphinoix	Frankreich	Auvergne-Rhône-Alpes	Isere/Drome/Savoie	2017	unbekannt	17-FR-003
Coopenoix	Frankreich	Auvergne-Rhône-Alpes	Isere/Drome/Savoie	2017	Lara	17-FR-004
SCA Unicoque	Frankreich	Auvergne-Rhône-Alpes	Allier	2017	Franquette	17-FR-008
SCA Unicoque	Frankreich	Nouvelle-Aquitaine	Gironde	2017	Lara	17-FR-009
SCA Unicoque	Frankreich	Nouvelle-Aquitaine	Charente	2017	Fernor	17-FR-010
SCA Unicoque	Frankreich	Nouvelle-Aquitaine	Deux-Sèvres	2017	Lara	17-FR-011
SCA Unicoque	Frankreich	Pays de la Loire	Sarthe	2017	Franquette	17-FR-012

Anhang

Lieferant	Land	Region	Herkunft	Erntejahr	Sorte	Probe
SCA Unicoque	Frankreich	Occitanie	Aude	2017	Franquette	17-FR-013
SCA Unicoque	Frankreich	Occitanie	Tarn-et-Garonne	2017	Lara	17-FR-014
SCA Unicoque	Frankreich	Nouvelle-Aquitaine	Gironde	2017	Fernor	17-FR-015
SCA Unicoque	Frankreich	Pays de la Loire	Sarthe	2017	Lara	17-FR-016
SCA Unicoque	Frankreich	Auvergne-Rhône-Alpes	Allier	2017	Lara	17-FR-017
SCA Unicoque	Frankreich	Occitanie	Aude	2017	Lara	17-FR-018
SCA Unicoque	Frankreich	Nouvelle-Aquitaine	Gironde	2017	Franquette	17-FR-019
SCA Unicoque	Frankreich	Nouvelle-Aquitaine	Lot-et-Garonne	2017	Lara	17-FR-020
SCA Unicoque	Frankreich	Nouvelle-Aquitaine	Charente	2017	Lara	17-FR-021
SCA Unicoque	Frankreich	Nouvelle-Aquitaine	Charente	2017	Franquette	17-FR-022
SCA Unicoque	Frankreich	Occitanie	Gers	2017	Lara	17-FR-023
SCA Unicoque	Frankreich	Nouvelle-Aquitaine	Lot-et-Garonne	2017	Fernor	17-FR-024
Nuss-Baumschule Gubler GmbH AG	Frankreich	unbekannt	unbekannt	2017	Franquette	17-FR-025
Nuss-Baumschule Gubler GmbH AG	Frankreich	unbekannt	unbekannt	2017	Lara	17-FR-026
Nuss-Baumschule Gubler GmbH AG	Frankreich	unbekannt	unbekannt	2017	Fernor	17-FR-027
nutwork Handelsgesellschaft mbH	Frankreich	unbekannt	unbekannt	2018	unbekannt	18-FR-028
SCA Unicoque	Frankreich	Auvergne-Rhône-Alpes	Allier	2018	Lara	18-FR-030
SCA Unicoque	Frankreich	Nouvelle-Aquitaine	Gironde	2018	Lara	18-FR-031

Anhang

Lieferant	Land	Region	Herkunft	Erntejahr	Sorte	Probe
SCA Unicoque	Frankreich	Nouvelle-Aquitaine	Charente	2018	Lara	18-FR-032
SCA Unicoque	Frankreich	Occitanie	Aude	2018	Lara	18-FR-033
SCA Unicoque	Frankreich	Occitanie	Gers	2018	Lara	18-FR-034
SCA Unicoque	Frankreich	Pays de la Loire	Sarthe	2018	Lara	18-FR-035
SCA Unicoque	Frankreich	Nouvelle-Aquitaine	Deux-Sèvres	2018	Lara	18-FR-036
SCA Unicoque	Frankreich	Nouvelle-Aquitaine	Charente	2018	Fernor	18-FR-037
SCA Unicoque	Frankreich	Auvergne-Rhône-Alpes	Allier	2018	Franquette	18-FR-038
SCA Unicoque	Frankreich	Nouvelle-Aquitaine	Charente	2018	Franquette	18-FR-039
SCA Unicoque	Frankreich	Occitanie	Aude	2018	Franquette	18-FR-040
SCA Unicoque	Frankreich	Pays de la Loire	Sarthe	2018	Franquette	18-FR-041
Intermarché	Frankreich	Dordogne	unbekannt	2018	Franquette	18-FR-043
priv. Person Nr. 10	Frankreich	Provence-Alpes-Côte d'Azur	Cogolin	2019	unbekannt	19-FR-044
Lochwald-Riednuss GbR	Frankreich	Isère	unbekannt	2019	Lara	19-FR-045
SCA Unicoque	Frankreich	Occitanie	Aude	2019	Lara	19-FR-046
SCA Unicoque	Frankreich	Occitanie	Gers	2019	Lara	19-FR-047
SCA Unicoque	Frankreich	Nouvelle-Aquitaine	Gironde	2019	Lara	19-FR-048
SCA Unicoque	Frankreich	Nouvelle-Aquitaine	Lot-et-Garonne	2019	Lara	19-FR-049
SCA Unicoque	Frankreich	unbekannt	unbekannt	2019	Lara	19-FR-050
SCA Unicoque	Frankreich	Nouvelle-Aquitaine	Gironde	2019	Franquette	19-FR-051

Anhang

Lieferant	Land	Region	Herkunft	Erntejahr	Sorte	Probe
SCA Unicoque	Frankreich	Occitanie	Aude	2019	Franquette	19-FR-052
SCA Unicoque	Frankreich	Pays de la Loire	Sarthe	2019	Franquette	19-FR-053
SCA Unicoque	Frankreich	Nouvelle-Aquitaine	Charente-Maritime	2019	Lara	19-FR-054
SCA Unicoque	Frankreich	Nouvelle-Aquitaine	Charente	2019	Franquette	19-FR-055
SCA Unicoque	Frankreich	Nouvelle-Aquitaine	Lot-et-Garonne	2019	Fernor	19-FR-056
SCA Unicoque	Frankreich	Auvergne-Rhône-Alpes	Allier	2019	Lara	19-FR-057
SCA Unicoque	Frankreich	Occitanie	Tarn-et-Garonne	2019	Lara	19-FR-058
SCA Unicoque	Frankreich	Nouvelle-Aquitaine	Charente	2019	Fernor	19-FR-059
SCA Unicoque	Frankreich	Nouvelle-Aquitaine	Charente-Maritime	2019	Franquette	19-FR-060
SCA Unicoque	Frankreich	Nouvelle-Aquitaine	Gironde	2019	Fernor	19-FR-061
SCA Unicoque	Frankreich	Pays de la Loire	Sarthe	2019	Lara	19-FR-062
SCA Unicoque	Frankreich	Auvergne-Rhône-Alpes	Allier	2019	Franquette	19-FR-063
SCA Unicoque	Frankreich	Nouvelle-Aquitaine	Deux-Sèvres	2019	Lara	19-FR-064
SCA Unicoque	Frankreich	Nouvelle-Aquitaine	Charente	2019	Lara	19-FR-065
nutwork Handelsgesellschaft mbH	Frankreich	unbekannt	unbekannt	2019	unbekannt	19-FR-066
Rieser Nuss GmbH & Co. KG	Frankreich	unbekannt	unbekannt	2019	Franquette	19-FR-067
Rieser Nuss GmbH & Co. KG	Frankreich	unbekannt	unbekannt	2019	Franquette	19-FR-068
Rieser Nuss GmbH & Co. KG	Frankreich	unbekannt	unbekannt	2019	unbekannt	19-FR-069
Rieser Nuss GmbH & Co. KG	Frankreich	unbekannt	unbekannt	2019	unbekannt	19-FR-070

Anhang

Lieferant	Land	Region	Herkunft	Erntejahr	Sorte	Probe
AgroTeamConsulting	Italien	Rovigo	Cambio di Villadose	2017	Chandler	17-IT-001
AgroTeamConsulting	Italien	Rovigo	Cambio di Villadose	2017	Tulare	17-IT-002
AgroTeamConsulting	Italien	Padova	Piazzola sul Brenta	2017	Lara	17-IT-003
AgroTeamConsulting	Italien	Napoli	Acerra	2018	Tulare	18-IT-004
AgroTeamConsulting	Italien	Napoli	Cicciano	2018	Chandler	18-IT-005
AgroTeamConsulting	Italien	Rovigo	Pettorazza	2018	Lara	18-IT-006
AgroTeamConsulting	Italien	Padova	Piazzola sul Brenta	2018	Tulare	18-IT-007
AgroTeamConsulting	Italien	Rovigo	Cambio di Villadose	2018	Chandler	18-IT-008
AgroTeamConsulting	Italien	Rovigo	Castelguglielmo	2018	Lara	18-IT-009
AgroTeamConsulting	Italien	Rovigo	Rovigo	2018	Tulare	18-IT-010
AgroTeamConsulting	Italien	Padova	Piazzola sul Brenta	2018	Chandler	18-IT-011
AgroTeamConsulting	Italien	Cuneo	Fossano	2018	Lara	18-IT-012
AgroTeamConsulting	Italien	Cuneo	Baldissero d'Alba	2018	Tulare	18-IT-013
AgroTeamConsulting	Italien	Cuneo	Fossano	2018	Chandler	18-IT-014
AgroTeamConsulting	Italien	Cuneo	Scaparoni	2018	Lara	18-IT-015
AgroTeamConsulting	Italien	Cuneo	Scaparoni	2018	Tulare	18-IT-016
AgroTeamConsulting	Italien	Cuneo	Scaparoni	2018	Chandler	18-IT-017
AgroTeamConsulting	Italien	Cuneo	Fossano	2018	Lara	18-IT-018
AgroTeamConsulting	Italien	Napoli	Acerra	2019	Tulare	19-IT-019
AgroTeamConsulting	Italien	Napoli	Cicciano	2019	Chandler	19-IT-020
AgroTeamConsulting	Italien	Rovigo	Pettorazza	2019	Lara	19-IT-021
AgroTeamConsulting	Italien	Padova	Piazzola sul Brenta	2019	Tulare	19-IT-022

Anhang

Lieferant	Land	Region	Herkunft	Erntejahr	Sorte	Probe
AgroTeamConsulting	Italien	Rovigo	Cambio di Villadose	2019	Chandler	19-IT-023
AgroTeamConsulting	Italien	Rovigo	San Bellino	2019	Lara	19-IT-024
AgroTeamConsulting	Italien	Rovigo	Rovigo	2019	Lara	19-IT-025
AgroTeamConsulting	Italien	Padova	Piazzola sul Brenta	2019	Chandler	19-IT-026
AgroTeamConsulting	Italien	Cuneo	Fossano	2019	Lara	19-IT-027
AgroTeamConsulting	Italien	Cuneo	Baldissero d'Alba	2019	Tulare	19-IT-028
AgroTeamConsulting	Italien	Cuneo	Fossano	2019	Chandler	19-IT-029
AgroTeamConsulting	Italien	Cuneo	Scaparoni	2019	Lara	19-IT-030
AgroTeamConsulting	Italien	Cuneo	Scaparoni	2019	Lara	19-IT-031
AgroTeamConsulting	Italien	Cuneo	Scaparoni	2019	Chandler	19-IT-032
AgroTeamConsulting	Italien	Fossano	Fossano - Frazione Tagliata	2019	Lara	19-IT-033
Mountain Fruits Pvt. Ltd.	Pakistan	Kashmir	Gupis	2017	unbekannt	17-PK-001
Mountain Fruits Pvt. Ltd.	Pakistan	Kashmir	Hundur	2017	unbekannt	17-PK-002
Mountain Fruits Pvt. Ltd.	Pakistan	Kashmir	Chinār	2017	unbekannt	17-PK-003
Mountain Fruits Pvt. Ltd.	Pakistan	Kashmir	Hasīs	2017	unbekannt	17-PK-004
Mountain Fruits Pvt. Ltd.	Pakistan	Kashmir	Aish	2017	unbekannt	17-PK-005
Mountain Fruits Pvt. Ltd.	Pakistan	Kashmir	Gahkuch	2017	unbekannt	17-PK-006
Mountain Fruits Pvt. Ltd.	Pakistan	Kashmir	Hātūn	2017	unbekannt	17-PK-007
Mountain Fruits Pvt. Ltd.	Pakistan	Kashmir	Gupis	2017	unbekannt	17-PK-008
Nuss-Baumschule Gubler GmbH AG	Schweiz	Thurgau	Hörhausen	2017	Geisenheim Nr.26	17-CH-004
Nuss-Baumschule Gubler GmbH AG	Schweiz	Thurgau	Hörhausen	2018	Geisenheim Nr.26	18-CH-006
Nuss-Baumschule Gubler GmbH AG	Schweiz	Thurgau	Hörhausen	2018	Hartley	18-CH-007
Nuss-Baumschule Gubler GmbH AG	Schweiz	Thurgau	Hörhausen	2018	Fernette	18-CH-008

Anhang

Lieferant	Land	Region	Herkunft	Erntejahr	Sorte	Probe
Nuss-Baumschule Gubler GmbH AG	Schweiz	Thurgau	Hörhausen	2018	Pedro	18-CH-009
Nuss-Baumschule Gubler GmbH AG	Schweiz	Thurgau	Hörhausen	2018	Serr	18-CH-010
Nuss-Baumschule Gubler GmbH AG	Schweiz	Thurgau	Hörhausen	2018	Broadview	18-CH-011
Nuss-Baumschule Gubler GmbH AG	Schweiz	Thurgau	Hörhausen	2018	Vina	18-CH-012
Nuss-Baumschule Gubler GmbH AG	Schweiz	Thurgau	Hörhausen	2018	Lara	18-CH-013
Nuss-Baumschule Gubler GmbH AG	Schweiz	Thurgau	Hörhausen	2018	Franquette	18-CH-014
Nuss-Baumschule Gubler GmbH AG	Schweiz	Thurgau	Hörhausen	2018	Chandler	18-CH-015
Nuss-Baumschule Gubler GmbH AG	Schweiz	Thurgau	Hörhausen	2018	Fernor	18-CH-016
Nuss-Baumschule Gubler GmbH AG	Schweiz	Thurgau	Hörhausen	2018	Parisienne	18-CH-017
Nuss-Baumschule Gubler GmbH AG	Schweiz	Thurgau	Hörhausen	2019	Chandler	19-CH-018
Nuss-Baumschule Gubler GmbH AG	Schweiz	Thurgau	Hörhausen	2019	Fernor	19-CH-019
Nuss-Baumschule Gubler GmbH AG	Schweiz	Thurgau	Hörhausen	2019	Meylannaise	19-CH-020
Nuss-Baumschule Gubler GmbH AG	Schweiz	Thurgau	Hörhausen	2019	Plovdivski	19-CH-024
Nuss-Baumschule Gubler GmbH AG	Schweiz	Thurgau	Hörhausen	2019	Milotai kensei	19-CH-025
Nuss-Baumschule Gubler GmbH AG	Schweiz	Thurgau	Hörhausen	2019	Ferbel	19-CH-026
Nuss-Baumschule Gubler GmbH AG	Schweiz	Thurgau	Hörhausen	2019	Ferjean	19-CH-027
Nuss-Baumschule	Schweiz	Thurgau	Hörhausen	2019	Lara	19-CH-028

Anhang

Lieferant	Land	Region	Herkunft	Erntejahr	Sorte	Probe
Gubler GmbH AG						
Nuss-Baumschule Gubler GmbH AG	Schweiz	Thurgau	Hörhausen	2019	Feradan	19-CH-029
Nuss-Baumschule Gubler GmbH AG	Schweiz	Thurgau	Hörhausen	2019	Feroutte	19-CH-030
Nuss-Baumschule Gubler GmbH AG	Schweiz	Thurgau	Hörhausen	2019	Franquette	19-CH-031
Nuss-Baumschule Gubler GmbH AG	Schweiz	Thurgau	Hörhausen	2019	Milotai bötermö	19-CH-032
Nuss-Baumschule Gubler GmbH AG	Schweiz	Thurgau	Hörhausen	2019	Milotai 10	19-CH-033
Nuss-Baumschule Gubler GmbH AG	Schweiz	Thurgau	Hörhausen	2019	Saturn	19-CH-034
Nuss-Baumschule Gubler GmbH AG	Schweiz	Thurgau	Hörhausen	2019	Mars	19-CH-035
Nuss-Baumschule Gubler GmbH AG	Schweiz	Thurgau	Hörhausen	2019	Geisenheim 139	19-CH-036
Nuss-Baumschule Gubler GmbH AG	Schweiz	Thurgau	Hörhausen	2019	Broadview	19-CH-037
Nuss-Baumschule Gubler GmbH AG	Schweiz	Thurgau	Hörhausen	2019	Dryanovski	19-CH-038
Ataman Çiftliği	Türkei	Kocaeli	Akmese	2017	Chandler	17-TR-001
Ataman Çiftliği	Türkei	Kocaeli	Akmese	2017	Fernor	17-TR-002
priv. Person Nr. 11	Türkei	Burdur	Göhlhisar	2017	Yalova	17-TR-003
Ataman Çiftliği	Türkei	Kocaeli	Akmese	2018	unbekannt	18-TR-004
Ataman Çiftliği	Türkei	Kocaeli	Akmese	2018	unbekannt	18-TR-005
priv. Person Nr. 11	Türkei	Burdur	Göhlhisar	2018	Yalova	18-TR-006
Nuss-Baumschule Gubler GmbH AG	Ungarn	unbekannt	unbekannt	2017	Milotai Botermo	17-HU-001
Nuss-Baumschule Gubler GmbH AG	Ungarn	unbekannt	unbekannt	2017	Milotai 10	17-HU-002

Anhang

Lieferant	Land	Region	Herkunft	Erntejahr	Sorte	Probe
Nuss-Baumschule Gubler GmbH AG	Ungarn	unbekannt	unbekannt	2017	A 117	17-HU-003
Julia Pryke (HungaryNuts)	Ungarn	Somogy	unbekannt	2017	unbekannt	17-HU-004
Julia Pryke (HungaryNuts)	Ungarn	Tolna	unbekannt	2017	unbekannt	17-HU-005
Julia Pryke (HungaryNuts)	Ungarn	Baranya	unbekannt	2017	unbekannt	17-HU-006
Julia Pryke (HungaryNuts)	Ungarn	Somogy	unbekannt	2018	unbekannt	18-HU-007
nutwork Handels- gesellschaft mbH	Ungarn	unbekannt	unbekannt	2018	A 117	18-HU-009
priv. person no. 12	Ungarn	Alsoszentiváni	unbekannt	2018	unbekannt	18-HU-010
priv. person no. 12	Ungarn	Milotai	unbekannt	2018	unbekannt	18-HU-011
nutwork Handels- gesellschaft mbH	Ungarn	unbekannt	unbekannt	2019	unbekannt	19-HU-012
Transgourmet Deutschland GmbH & Co. OHG	USA	unbekannt	unbekannt	2016	Howard	16-US-001
Heinrich Brüning GmbH	USA	unbekannt	unbekannt	2017	Chandler	17-US-007
GoldRiver Orchards, Inc. (The Barton Ranch)	USA	Kalifornien	unbekannt	2018	unbekannt	18-US-009
GoldRiver Orchards, Inc. (The Barton Ranch)	USA	Kalifornien	unbekannt	2018	Tulare	18-US-010
GoldRiver Orchards, Inc. (The Barton Ranch)	USA	Kalifornien	unbekannt	2018	Livermore	18-US-011
GoldRiver Orchards, Inc. (The Barton Ranch)	USA	Kalifornien	unbekannt	2018	unbekannt	18-US-012
GoldRiver Orchards, Inc. (The Barton Ranch)	USA	Kalifornien	unbekannt	2018	unbekannt	18-US-013
priv. person no. 13	USA	Wisconsin	Denmark	2018	Serr	18-US-014
nutwork Handels- gesellschaft mbH	USA	unbekannt	unbekannt	2018	Chandler	18-US-015
GoldRiver Orchards, Inc. (The Barton Ranch)	USA	Kalifornien	unbekannt	2019	Chandler	19-US-017
GoldRiver Orchards, Inc.	USA	Kalifornien	unbekannt	2019	Franquette	19-US-018

Anhang

Lieferant	Land	Region	Herkunft	Erntejahr	Sorte	Probe
(The Barton Ranch)						
GoldRiver Orchards, Inc. (The Barton Ranch)	USA	Kalifornien	unbekannt	2019	Tulare	19-US-019
GoldRiver Orchards, Inc. (The Barton Ranch)	USA	Kalifornien	unbekannt	2019	Howard	19-US-020

8.4. Weitere Nussproben

In Tabelle 20 sind die Proben zusammengefasst, die für den zweiten Teil der Arbeit verwendet wurden, in dem die Detektion von Erdnuss als Verfälschungsmittel im Fokus stand. Die Mandel- und Haselnussproben wurden von der HSFS aus weiteren Projekten zur Verfügung gestellt.

Tabelle 20: Zusammenfassung der Proben, die für den zweiten Teil der Arbeit verwendet wurden.

Lebensmittel	Probe	Erntejahr	Lieferant	Sorte	Land
Mandel	1	2016	Azienda Agricola Fontana Grande	Amara	Italien
	2	2017	Zentis GmbH & Co. KG	Butte	USA
	3	2017	Jens Bayer	unbekannt	Italien
	4	2018	CampMallorqui	unbekannt	Spanien
	5	2018	Georg Lemke GmbH & Co. KG	unbekannt	USA
	6	2018	Azienda Agricola Fontana Grande	Tuono	Italien
	7	2018	Georg Lemke GmbH & Co. KG	unbekannt	Afghanistan
	8	2019	Dr. Michelle Wirthensohn (School of Agriculture)	Monterey	Australien
	9	2019	Dr. Michelle Wirthensohn (School of Agriculture)	Carmel	Australien
Walnuss	1	2016	Transgourmet Deutschland GmbH & Co. OHG	Howard	USA
	2	2017	Nuss-Baumschule Gubler AG	A117	Ungarn
	3	2017	Mountain Fruits Pvt. Ltd.	unbekannt	Pakistan
	4	2017	Seeberger GmbH	Serr	Chile
	5	2018	priv. Person Nr. 11	unbekannt	Türkei
	6	2018	AgroTeamConsulting	Lara	Italien
	7	2018	Nuss-Baumschule Gubler AG	Franquette	Schweiz
	8	2019	Till Steinmetz	unbekannt	Frankreich
	9	2019	Dennis Prigge Obstbau	unbekannt	Deutschland

Anhang

Lebensmittel	Probe	Erntejahr	Lieferant	Sorte	Land
Haselnuss	1	2014	SCA Unicoque	Fertile de Coutard (Barcelona)	Frankreich
	2	2014	Erzeugerorganisation Deutscher Haselnussanbauer-UG	unbekannt	Deutschland
	3	2014	Schlüter & Maack GmbH/Hanseatic Trading Blaase BmbH	unbekannt	Georgien
	4	2015	Seeberger GmbH	Tonda	Italien
	5	2015	SCA Unicoque	Corabel	Frankreich
	6	2015	Schlüter & Maack GmbH/Hanseatic Trading Blaase BmbH	Cakildak findik	Türkei
	7	2016	AgroTeamConsulting/NocciolaRe	Tonda (Gentile) Romana	Italien
	8	2016	Ferrero OHG mbH	Tombul	Türkei
	9	2016	SCA Unicoque	Corabel	Frankreich
Erdnuss	1	unbekannt	Netto Marken-Discount AG & Co. KG	unbekannt	Ägypten
	2	unbekannt	Penny Markt GmbH	unbekannt	USA
	3	unbekannt	EDEKA AG & Co. KG	unbekannt	Israel
	4	2019	EDEKA AG & Co. KG	unbekannt	Südafrika
	5	unbekannt	EDEKA AG & Co. KG	unbekannt	USA
	6	unbekannt	Rewe-Markt GmbH	unbekannt	Ägypten
	7	unbekannt	Netto Marken-Discount AG & Co. KG	unbekannt	Ägypten
	8	unbekannt	Kaufland Stiftung & Co. KG	unbekannt	USA
	9	unbekannt	Kaufland Stiftung & Co. KG	unbekannt	USA
	10	unbekannt	Netto Marken-Discount AG & Co. KG	unbekannt	USA
	11	unbekannt	Aldi Einkauf GmbH & Co. OHG	unbekannt	Ägypten
	12	unbekannt	EDEKA AG & Co. KG	unbekannt	Ägypten

8.5. Analyse der Erdnussbeimischungen

In Tabelle 21 sind sowohl die Erdnussbeimischungen in Mandeln mit dem Mittelwert und der Standardabweichung als auch die SNR-Werte (NS = 8, NS = 128) mit entsprechendem Mittelwert und der Standardabweichung für die lineare Regression dargestellt.

Tabelle 21: Es sind die Erdnussbeimischungen in Mandeln mit dem Mittelwert und der Standardabweichung dargestellt. Zusätzlich sind die SNR-Werte (NS = 8, NS = 128) mit entsprechendem Mittelwert und der Standardabweichung für die lineare Regression aufgelistet.

Erdnuss [%]	Mittelwert [%]	Abweichung [%]	SNR (NS = 8)	Mittelwert [%]	Abweichung	SNR (NS = 128)	Mittelwert	Abweichung
100.00	100.00	0.00	119.47	118.16	2.91	476.20	467.23	15.68
100.00			114.60			445.18		
100.00			121.55			480.32		
90.05	89.58	0.72	114.24	111.12	2.31	464.04	452.93	11.99
88.57			108.60			436.28		
90.14			111.09			458.45		
79.97	80.02	0.05	99.02	94.83	5.33	387.09	382.44	29.00
80.08			98.15			415.41		
80.01			87.31			344.83		
70.04	70.04	0.19	73.73	77.67	4.82	310.61	313.51	25.57
70.27			76.08			283.74		
69.80			84.92			346.18		
59.89	59.83	0.09	63.12	65.94	3.13	250.40	268.42	16.01
59.71			65.42			265.55		
59.89			70.60			289.30		
49.87	49.48	0.39	55.67	53.39	4.56	222.57	218.00	11.37
49.62			57.48			229.06		
48.94			47.03			202.36		

Anhang

Erdnuss [%]	Mittelwert [%]	Abweichung [%]	SNR (NS = 8)	Mittelwert [%]	Abweichung	SNR (NS = 128)	Mittelwert	Abweichung
39.55	40.27	0.94	43.06	43.74	1.45	176.18	177.97	1.27
41.60			46.24			178.75		
39.67			43.26			178.99		
29.89	30.25	0.29	37.62	37.62	1.93	146.89	150.97	9.43
30.60			35.80			142.02		
30.26			40.49			164.01		
20.33	20.10	0.16	26.53	26.71	0.58	107.94	106.97	1.44
19.98			27.48			108.04		
19.99			26.11			104.93		
9.99	10.01	0.23	10.92	12.50	1.57	51.37	53.18	3.62
10.30			14.70			58.24		
9.74			12.16			49.93		
8.11	8.15	0.03	9.50	10.67	1.25	45.41	44.98	1.41
8.16			10.39			43.08		
8.19			12.49			46.46		
6.13	6.08	0.06	6.47	7.17	0.88	31.04	31.73	0.50
5.99			8.61			31.92		
6.11			7.39			32.23		
4.10	4.09	0.05	4.80	4.55	0.22	22.36	23.59	0.90
4.03			5.06			23.90		
4.15			4.53			24.49		
2.00	2.03	0.07	2.13	2.22	0.14	13.68	12.51	1.04
2.13			2.11			11.15		
1.97			2.41			12.69		

Anhang

Erdnuss [%]	Mittelwert [%]	Abweichung [%]	SNR (NS = 8)	Mittelwert [%]	Abweichung	SNR (NS = 128)	Mittelwert	Abweichung
1.04	1.01	0.03	1.68	1.59	0.28	8.28	8.23	0.52
1.03			1.22			8.83		
0.97			1.89			7.57		
0.80	0.81	0.02	1.71	1.33	0.07	6.15	6.74	0.49
0.83			1.62			7.34		
0.80			1.80			6.72		
0.57	0.60	0.03	2.67	1.98	0.37	6.48	6.84	0.46
0.60			2.37			6.55		
0.63			1.78			7.49		
0.43	0.42	0.02	1.99	1.79	0.21	8.19	7.86	0.89
0.43			1.61			8.74		
0.40			2.08			6.64		
0.00	0.00	0.00	1.39	0.90	0.14	4.48	4.16	0.23
0.00			1.26			3.96		
0.00			1.05			4.05		

Anhang

In Tabelle 22 sind sowohl die Erdnussbeimischungen in Walnüssen mit dem Mittelwert und der Standardabweichung als auch die SNR-Werte (NS = 8, NS = 128) mit entsprechendem Mittelwert und der Standardabweichung für die lineare Regression dargestellt.

Tabelle 22: Es sind die Erdnussbeimischungen in Walnüssen mit dem Mittelwert und der Standardabweichung dargestellt. Zusätzlich sind die SNR-Werte (NS = 8, NS = 128) mit entsprechendem Mittelwert und der Standardabweichung für die lineare Regression aufgelistet.

Erdnuss [%]	Mittelwert [%]	Abweichung [%]	SNR (NS = 8)	Mittelwert [%]	Abweichung	SNR (NS = 128)	Mittelwert	Abweichung
100.00	100.00	0.00	126.49	122.36	8.34	502.37	480.98	25.91
100.00			129.86			496.04		
100.00			110.72			444.51		
89.81	89.95	0.32	107.46	109.73	1.70	416.62	442.79	22.95
89.65			110.19			472.50		
90.39			111.56			439.26		
78.91	79.34	0.43	83.33	85.99	2.05	366.84	364.74	2.55
79.17			86.29			361.16		
79.93			88.34			366.24		
69.69	70.10	0.37	86.93	84.19	2.18	353.34	344.11	7.62
70.58			84.03			334.68		
70.04			81.60			344.31		
59.80	59.74	0.06	70.47	67.17	3.20	266.51	273.92	14.50
59.75			62.83			261.07		
59.66			68.21			294.18		
50.12	50.29	0.12	64.37	59.65	3.44	252.08	236.32	11.36
50.41			56.24			225.78		
50.33			58.36			231.10		
40.11	39.90	0.17	38.28	41.89	2.68	161.33	176.00	12.20
39.88			44.69			191.19		
39.70			42.69			175.48		

Anhang

Erdnuss [%]	Mittelwert [%]	Abweichung [%]	SNR (NS = 8)	Mittelwert [%]	Abweichung	SNR (NS = 128)	Mittelwert	Abweichung
30.87	30.52	0.37	33.17	32.73	1.41	147.89	137.38	10.02
30.00			30.82			123.89		
30.68			34.20			140.35		
18.95	19.93	0.71	21.82	24.16	3.28	89.07	98.88	11.81
20.28			28.80			115.48		
20.58			21.87			92.08		
9.85	9.99	0.11	14.14	12.32	1.31	57.50	53.30	2.98
10.02			11.74			50.93		
10.11			11.10			51.48		
8.94	8.46	0.37	12.17	10.14	1.59	49.36	41.81	5.35
8.03			8.28			37.70		
8.42			9.98			38.37		
6.13	6.01	0.11	7.81	7.52	0.23	32.11	33.06	1.50
6.03			7.24			35.18		
5.87			7.50			31.90		
4.06	4.38	0.24	4.66	6.06	1.21	20.15	25.82	5.51
4.65			5.93			24.02		
4.42			7.60			33.28		
1.97	1.96	0.08	2.95	3.18	0.21	15.06	13.49	1.12
2.06			3.15			12.89		
1.86			3.45			12.53		
1.19	1.06	0.10	2.43	2.86	0.31	11.51	11.62	0.64
1.03			3.14			12.45		
0.96			3.01			10.89		

Anhang

Erdnuss [%]	Mittelwert [%]	Abweichung [%]	SNR (NS = 8)	Mittelwert [%]	Abweichung	SNR (NS = 128)	Mittelwert	Abweichung
0.73	0.78	0.03	2.83	2.69	0.19	12.54	11.20	1.03
0.80			2.83			11.02		
0.80			2.42			10.03		
0.67	0.60	0.05	2.76	4.32	2.21	11.23	17.64	9.59
0.53			2.74			10.48		
0.60			7.45			31.20		
0.47	0.39	0.06	2.94	2.59	0.52	11.65	11.46	0.74
0.33			1.85			10.47		
0.37			2.97			12.26		
0.00	0.00	0.00	2.30	2.29	0.02	9.00	9.81	0.80
0.00			2.26			10.90		
0.00			2.32			9.54		

Anhang

In Tabelle 23 sind sowohl die Erdnussbeimischungen in Haselnüssen mit dem Mittelwert und der Standardabweichung als auch die SNR-Werte (NS = 8, NS = 128) mit entsprechendem Mittelwert und der Standardabweichung für die lineare Regression dargestellt.

Tabelle 23: Es sind die Erdnussbeimischungen in Haselnüssen mit dem Mittelwert und der Standardabweichung dargestellt. Zusätzlich sind die SNR-Werte (NS = 8, NS = 128) mit entsprechendem Mittelwert und der Standardabweichung für die lineare Regression aufgelistet.

Erdnuss [%]	Mittelwert [%]	Abweichung [%]	SNR (NS = 8)	Mittelwert [%]	Abweichung	SNR (NS = 128)	Mittelwert	Abweichung
100.00	100.00	0.00	95.68	96.22	0.86	393.21	378.14	11.14
100.00			97.45			366.63		
100.00			95.52			374.56		
90.08	90.04	0.07	91.56	91.34	0.88	386.92	375.79	12.41
89.93			94.23			381.99		
90.10			88.23			358.47		
80.03	79.98	0.04	83.43	77.22	2.45	344.81	317.20	19.57
79.99			72.30			301.73		
79.93			75.93			305.06		
69.99	70.01	0.02	70.51	71.31	4.63	278.17	285.15	11.18
70.03			72.63			300.93		
70.00			70.80			276.35		
59.94	59.96	0.03	61.23	60.05	0.94	243.72	236.43	7.38
59.95			60.62			226.32		
60.01			58.31			239.26		
49.98	49.99	0.02	56.19	54.15	1.26	218.45	210.82	6.52
49.97			53.59			211.50		
50.02			52.68			202.52		
39.95	39.99	0.04	42.70	40.34	1.49	170.34	161.17	7.23
40.05			39.84			160.48		
39.97			38.47			152.68		

Anhang

Erdnuss [%]	Mittelwert [%]	Abweichung [%]	SNR (NS = 8)	Mittelwert [%]	Abweichung	SNR (NS = 128)	Mittelwert	Abweichung
30.07	30.03	0.05	33.69	34.19	1.76	136.79	134.14	1.97
29.96			34.80			133.56		
30.05			34.09			132.06		
19.97	19.96	0.03	19.94	20.30	0.46	78.95	86.01	3.09
19.99			20.19			86.01		
19.93			20.76			84.84		
10.03	10.09	0.04	9.35	10.42	0.34	41.59	43.85	1.68
10.11			10.85			45.59		
10.12			11.06			44.38		
8.11	8.11	0.02	7.99	8.48	0.76	31.89	35.07	2.25
8.08			8.40			36.71		
8.13			9.03			36.61		
6.12	6.05	0.11	5.60	6.13	0.43	26.78	27.62	0.78
6.13			6.84			28.66		
5.89			5.93			27.42		
3.91	3.97	0.05	3.85	4.22	0.52	20.64	19.49	0.97
3.97			4.53			19.58		
4.03			4.26			18.26		
2.10	2.01	0.07	1.99	2.08	0.28	11.31	10.60	0.59
1.93			1.78			9.85		
2.00			2.48			10.65		
1.10	1.05	0.04	1.40	1.72	0.29	8.78	8.51	0.63
1.07			2.74			9.11		
1.00			1.02			7.64		

Anhang

Erdnuss [%]	Mittelwert [%]	Abweichung [%]	SNR (NS = 8)	Mittelwert [%]	Abweichung	SNR (NS = 128)	Mittelwert	Abweichung
0.80	0.81	0.02	1.32	1.74	0.74	7.72	7.65	1.23
0.83			2.12			6.11		
0.80			1.78			9.11		
0.63	0.61	0.03	1.02	1.15	0.33	6.65	6.37	0.34
0.57			0.85			6.57		
0.63			1.59			5.89		
0.40	0.40	0.03	1.25	1.10	0.32	5.15	5.07	0.77
0.37			0.99			4.09		
0.45			1.07			5.96		
0.00	0.00	0.00	1.30	1.06	0.18	4.54	4.08	0.46
0.00			0.97			3.45		
0.00			0.89			4.25		

8.6. NMR-Spektren

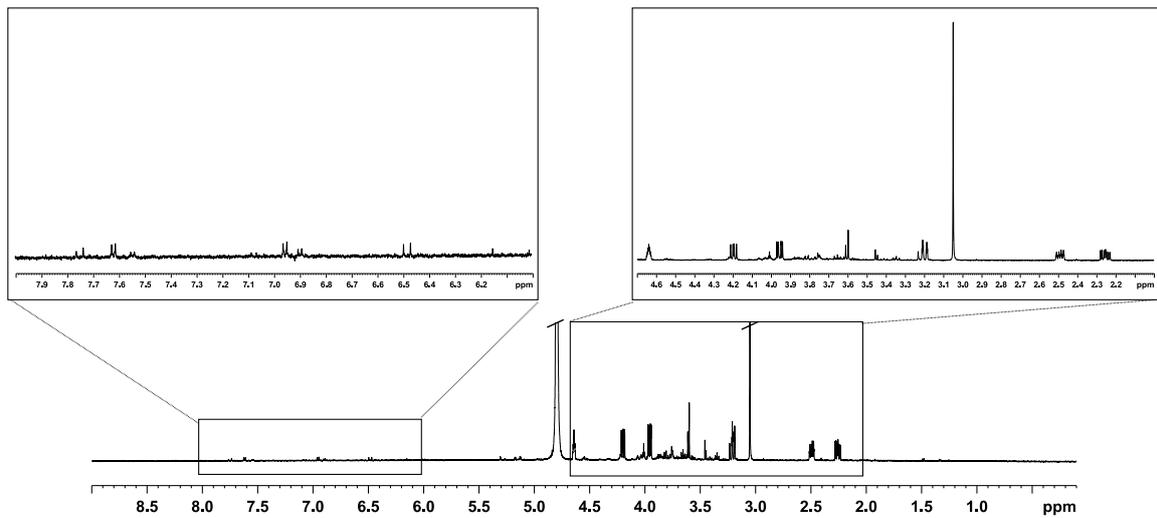


Abbildung 90: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (600 MHz, NS = 128) ohne Wasserunterdrückung der Fraktion 10 der Isolierung von *N*-Methyl-*trans*-4-hydroxy-L-prolin (5) aus Erdnüssen.

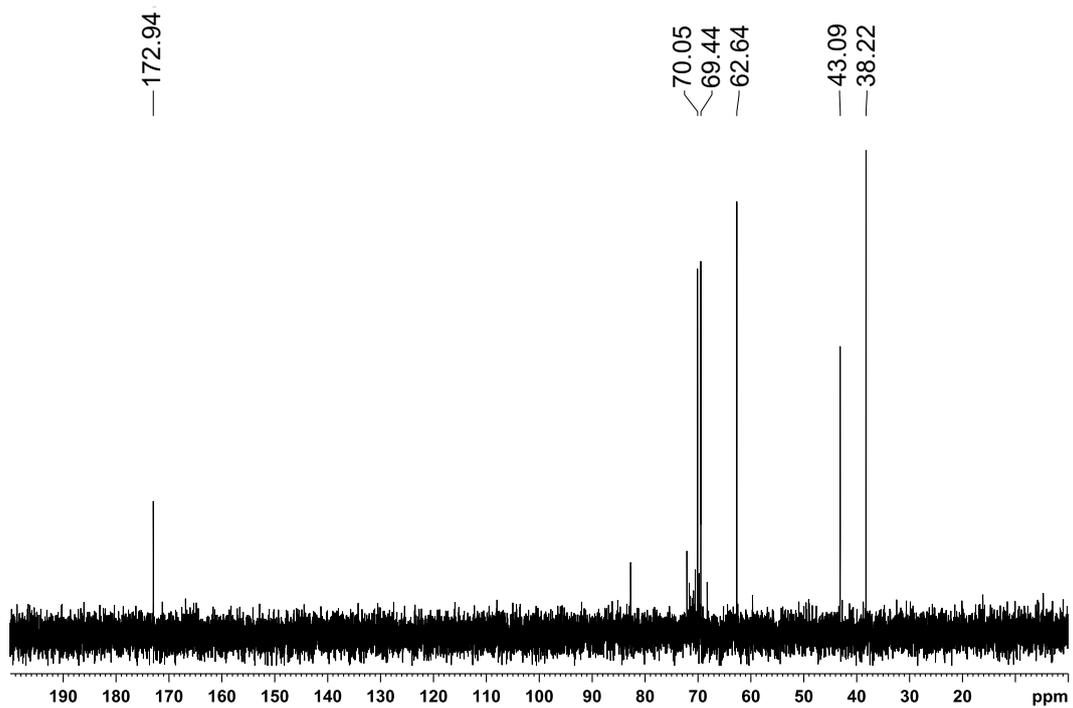


Abbildung 91: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum (151 MHz) der Fraktion 10 der Isolierung von *N*-Methyl-*trans*-4-hydroxy-L-prolin (5) aus Erdnüssen.

8.7. Multivariate Statistik

8.7.1. Liste der variablen *Buckets* der Extraktionsmethode A

A1: Variable *Buckets* (183) für verschiedene zwei-Klassen Modelle (MeOD/CD₃CN Extraktion).

[ppm]: 0.7213 – 0.6978; 0.747 – 0.7383; 1.414 – 1.2365; 0.5691 – 0.545; 0.3637 – 0.3354; 0.8144 – 0.7845; 0.849 – 0.8343; 0.9299 – 0.8676; 0.9415 – 0.9306; 0.9928 – 0.9418; 1.0098 – 0.9928; 1.0397 – 1.0288; 1.1087 – 1.0904; 1.1212 – 1.1081; 1.4365 – 1.4236; 1.4538 – 1.4448; 1.6602 – 1.5273; 1.8326 – 1.8001; 1.9054 – 1.8842; 1.9379 – 1.918; 1.9709 – 1.9417; 2.0098 – 2.0043; 2.1715 – 2.1356; 2.5529 – 2.429; 2.7481 – 2.7291; 2.8437 – 2.7493; 2.8594 – 2.8444; 2.8903 – 2.8755; 2.9249 – 2.9028; 3.2395 – 3.2257; 3.2745 – 3.2642; 3.3323 – 3.3108; 3.3368 – 3.3326; 3.357 – 3.3377; 3.3669 – 3.358; 3.3769 – 3.3673; 3.435 – 3.41; 3.4786 – 3.4501; 3.5024 – 3.4902; 3.5162 – 3.5037; 3.5486 – 3.5162; 3.5692 – 3.5489; 3.6026 – 3.5753; 3.6221 – 3.6026; 3.834 – 3.7785; 3.8475 – 3.834; 3.8619 – 3.8475; 3.8914 – 3.8626; 3.9778 – 3.9621; 4.0484 – 4.0285; 4.0699 – 4.0491; 4.0908 – 4.0725; 4.103 – 4.0914; 4.1097 – 4.1036; 4.1251 – 4.1187; 4.1393 – 4.1255; 4.1556 – 4.1396; 4.1669 – 4.1556; 4.1704 – 4.1665; 4.1852 – 4.1707; 4.8153 – 4.8012; 4.8381 – 4.8166; 4.8599 – 4.8381; 4.884 – 4.8602; 5.1889 – 5.0345; 5.2997 – 5.2843; 5.2859 – 5.2756; 5.2762 – 5.2608; 5.2618 – 5.2528; 5.2534 – 5.2361; 5.3263 – 5.3003; 5.3937 – 5.3658; 5.4101 – 5.3944; 5.4233 – 5.4111; 5.4505 – 5.4277; 5.4749 – 5.4515; 5.4977 – 5.4749; 5.5414 – 5.5199; 5.6008 – 5.5683; 5.6412 – 5.6046; 5.6765 – 5.6621; 5.691 – 5.6813; 5.7006 – 5.691; 5.7128 – 5.7019; 5.7234 – 5.7128; 5.7654 – 5.7558; 5.8094 – 5.7991; 5.847 – 5.8338; 5.7946 – 5.7751; 5.8325 – 5.8152; 5.9237 – 5.9086; 6.054 – 6.0392; 6.0852 – 6.062; 6.1131 – 6.0912; 6.1205 – 6.1134; 6.1368 – 6.1205; 6.1997 – 6.1869; 6.2344 – 6.2216; 6.2562 – 6.2424; 6.6164 – 6.5939; 6.6334 – 6.6177; 6.6806 – 6.6591; 6.3753 – 6.3166; 6.3959 – 6.3753; 6.4238 – 6.3965; 6.4514 – 6.4251; 6.4716 – 6.4514; 6.522 – 6.472; 6.5288 – 6.5224; 6.5744 – 6.5294; 6.5936 – 6.5744; 6.7878 – 6.7734; 6.7641 – 6.7564; 6.7422 – 6.7307; 6.7207 – 6.7121; 6.8681 – 6.7968; 6.9971 – 6.9849; 6.9721 – 6.9631; 7.0042 – 6.9994; 7.0125 – 7.0067; 7.0514 – 7.018; 7.0629 – 7.051; 7.1098 – 7.0902; 7.1146 – 7.1101; 7.1197 – 7.1159; 7.0889 – 7.0642; 7.1483 – 7.1287; 7.1981 – 7.1891; 7.2115 – 7.1993; 7.2423 – 7.2122; 7.322 – 7.3139; 7.3046 – 7.2937; 7.2911 – 7.2751; 7.538 – 7.4783; 7.6568 – 7.6401; 7.6728 – 7.6613; 7.598 – 7.5913; 7.7887 – 7.7222; 8.0863 – 8.0757; 8.0272 – 8.015; 7.9928 – 7.9254; 8.2041 – 8.1906; 8.5273 – 8.4294; 3.9627 – 3.9261; 4.571 – 4.5527; 4.6275 – 4.571; 4.6994 – 4.6577; 5.0313 – 4.9755; 5.2358 – 5.1867; 6.3172 – 6.281; 7.4199 – 7.3813; 0.8272 – 0.8169; 0.8632 – 0.8551; 1.0285 – 1.0111; 1.0583 – 1.0461; 1.1492 – 1.1431; 1.1671 – 1.1591; 1.1835 – 1.1781; 1.2243 – 1.2137; 2.0441 – 2.0268; 2.0608 – 2.0444; 2.0788 – 2.0608; 2.0964 – 2.0788; 2.1109 – 2.0964; 2.1272 – 2.1109; 2.9734 – 2.9281; 3.0681

– 2.9753; 3.4103 – 3.3904; 3.4494 – 3.435; 3.4864 – 3.4799; 3.7785 – 3.6825; 3.6822 – 3.6257; 4.0288 – 3.9791; 4.2587 – 4.1877; 4.9723 – 4.8881; 5.3658 – 5.327; 6.1766 – 6.1458; 6.1426 – 6.1384; 6.6893 – 6.6857; 6.8931 – 6.879; 6.9066 – 6.8937; 6.9281 – 6.9069; 6.9403 – 6.9281.

8.7.2. Liste der variablen *Buckets* der Extraktionsmethode B

B1: Variable *Buckets* (106) für verschiedene zwei-Klassen Modelle (MeOD/Phosphatpuffer/ CDCl_3 Extraktion).

[ppm]: 0.8882 – 0.8689; 0.9062 – 0.8914; 0.9354 – 0.9097; 0.9543 – 0.9376; 0.9732 – 0.9566; 0.9903 – 0.9793; 1.0114 – 0.9964; 1.0297 – 1.0175; 1.0445 – 1.0336; 1.0586 – 1.0500; 1.0939 – 1.0622; 1.1135 – 1.0988; 1.1440 – 1.1286; 1.1565 – 1.1443; 1.1658 – 1.1562; 1.1787 – 1.1719; 1.1909 – 1.1787; 1.2127 – 1.1915; 1.3498 – 1.3347; 1.3334 – 1.2743; 1.4994 – 1.4615; 1.9635 – 1.9308; 1.9317 – 1.9093; 1.9073 – 1.8964; 1.8929 – 1.8563; 2.0508 – 2.0338; 2.0319 – 2.0184; 2.0887 – 2.0544; 2.1844 – 2.0922; 2.2900 – 2.2730; 2.3070 – 2.2906; 2.3327 – 2.3112; 2.3442 – 2.3346; 2.3545 – 2.3442; 2.3667 – 2.3539; 2.3962 – 2.3705; 2.4254 – 2.3956; 2.4668 – 2.4277; 2.5429 – 2.5243; 2.5577 – 2.5449; 2.5814 – 2.5590; 2.6058 – 2.5821; 2.7034 – 2.6688; 2.6630 – 2.6357; 2.8090 – 2.7834; 2.8498 – 2.8260; 2.9801 – 2.9580; 3.0568 – 3.0251; 3.0215 – 2.9862; 3.2145 – 3.1746; 3.2783 – 3.2546; 3.2527 – 3.2138; 3.3663 – 3.3506; 3.3878 – 3.3682; 3.4132 – 3.3913; 3.4260 – 3.4132; 3.4334 – 3.4237; 3.5014 – 3.4369; 3.5881 – 3.5265; 3.5233 – 3.5034; 3.6915 – 3.6581; 3.7922 – 3.7313; 3.8391 – 3.7939; 3.9190 – 3.8417; 4.0202 – 3.9762; 4.0844 – 4.0214; 4.1441 – 4.1258; 4.1717 – 4.1575; 4.3161 – 4.2997; 4.2936 – 4.2741; 4.2423 – 4.1887; 4.1222 – 4.0978; 4.6538 – 4.6268; 5.0047 – 4.9828; 5.2396 – 5.2162; 5.4486 – 5.3706; 5.5725 – 5.5427; 6.0344 – 6.0216; 5.6415 – 5.6001; 5.5982 – 5.5757; 5.5256 – 5.4935; 6.4880 – 6.4110; 6.6739 – 6.6350; 6.7111 – 6.6751; 6.5958 – 6.5715; 6.7840 – 6.7268; 6.8128 – 6.7872; 7.0757 – 7.0655; 7.0648 – 7.0372; 7.0356 – 6.9984; 6.9891 – 6.9708; 6.9695 – 6.9380; 6.9380 – 6.8989; 6.8969 – 6.8764; 7.1830 – 7.1387; 7.2086 – 7.1862; 7.2574 – 7.2269; 7.4340 – 7.4186; 7.4163 – 7.3987; 7.3974 – 7.3778; 7.3772 – 7.3547; 7.3540 – 7.3364; 7.5431 – 7.4529; 7.7396 – 7.6744; 7.8952 – 7.8792; 8.4766 – 8.4451.

8.7.3. PCA Score- und Loading-Plots

Die folgenden Abbildungen wurden bei der Auswertung auf Basis der Extraktionsmethode A erhalten.

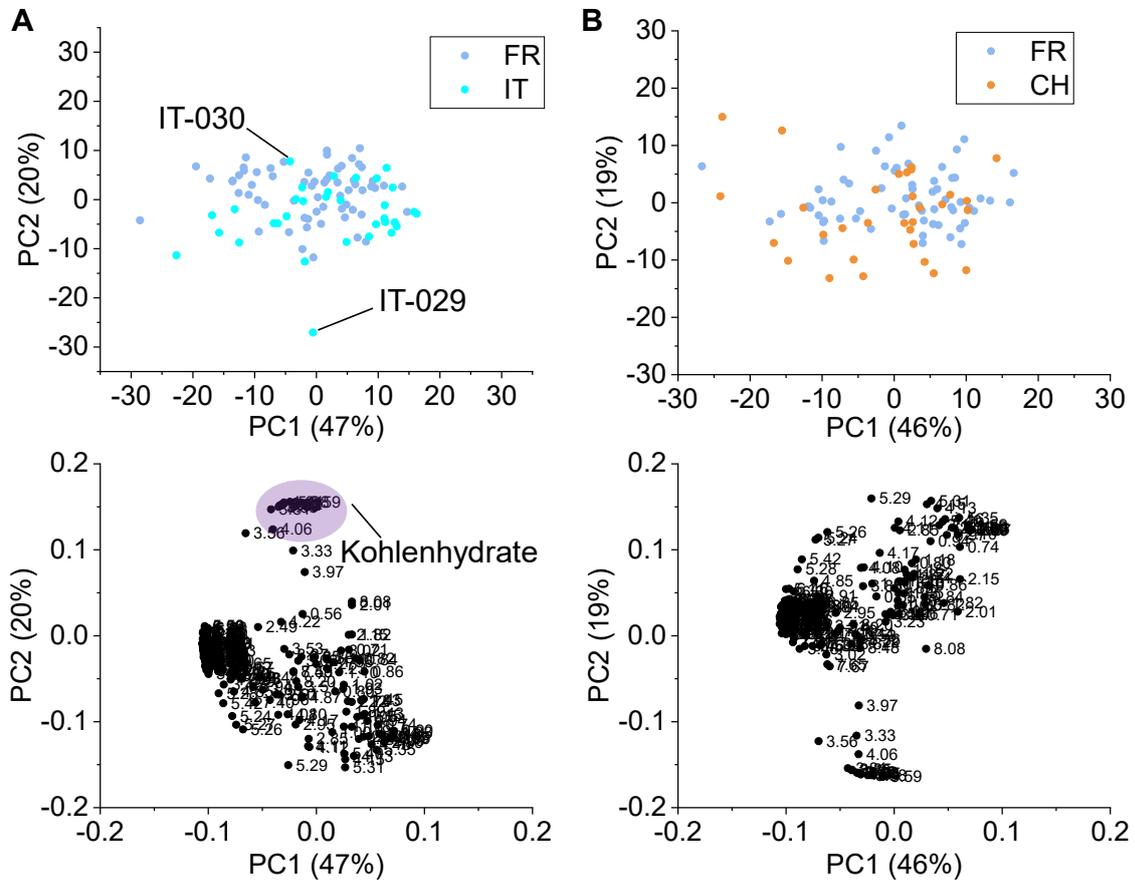


Abbildung 92: **A:** Zweidimensionaler PCA Score-Plot mit entsprechendem *Loading*-Plot der Probengruppen Frankreich (blau) und Italien (türkis). Erklärte Varianz: PC1: 47%; PC2: 20%. **B:** Zweidimensionaler PCA Score-Plot mit entsprechendem *Loading*-Plot der Probengruppen Frankreich (blau) und Schweiz (orange). Erklärte Varianz: PC1: 46%; PC2: 19%.

Anhang

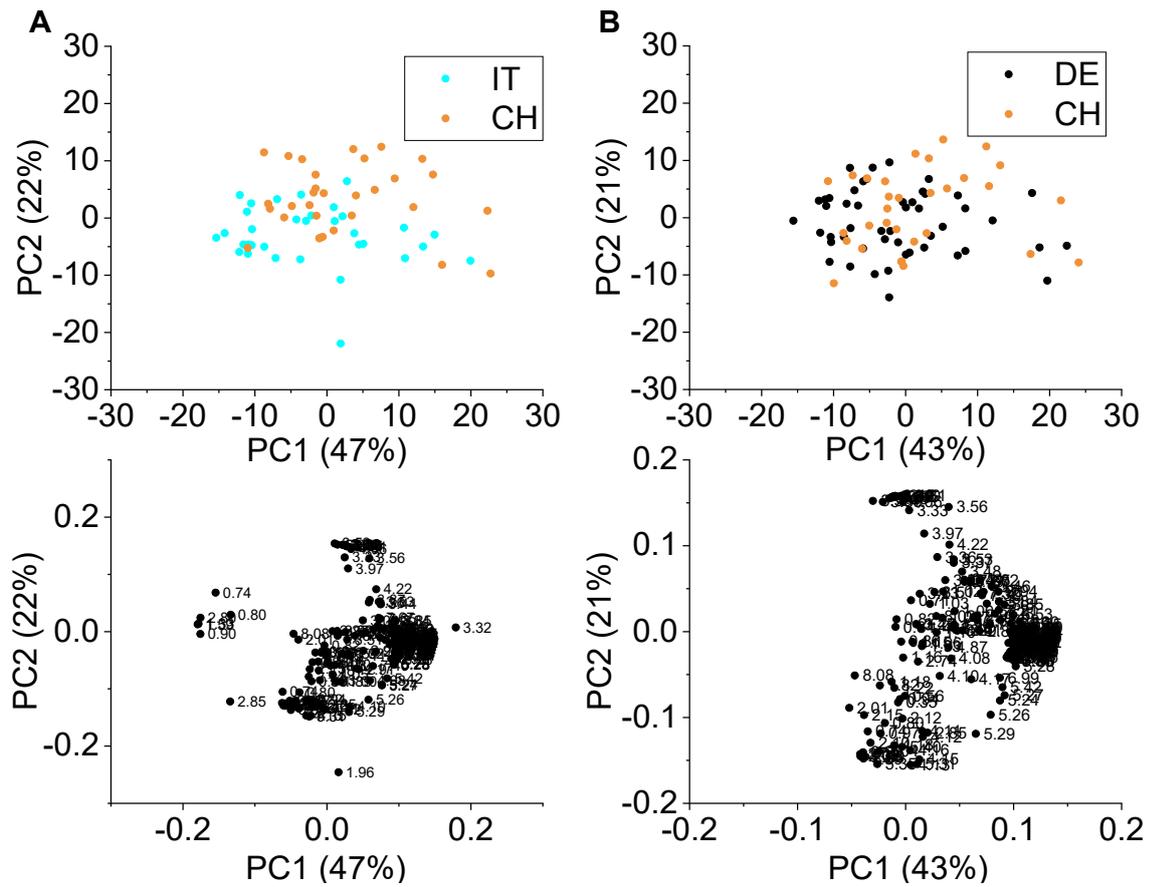


Abbildung 93: **A:** Zweidimensionaler PCA Score-Plot mit entsprechendem *Loading*-Plot der Probengruppen Schweiz (orange) und Italien (türkis). Erklärte Varianz: PC1: 47%; PC2: 22%. **B:** Zweidimensionaler PCA Score-Plot mit entsprechendem *Loading*-Plot der Probengruppen Deutschland (schwarz) und Schweiz (orange). Erklärte Varianz: PC1: 43%; PC2: 21%.

Anhang

Die folgenden Abbildungen wurden bei der Auswertung auf Basis der Extraktionsmethode B erhalten.

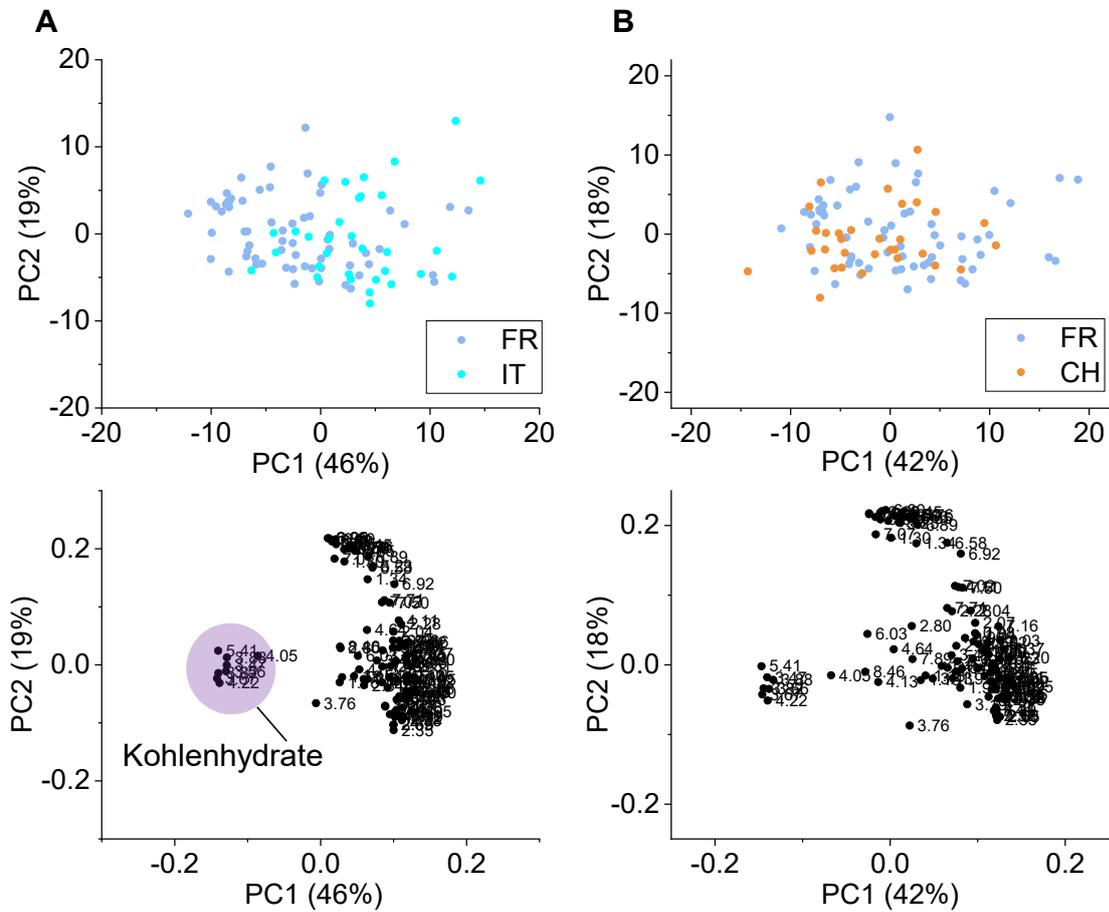


Abbildung 94: **A:** Zweidimensionaler PCA Score-Plot mit entsprechendem *Loading*-Plot der Probengruppen Frankreich (blau) und Italien (türkis). Erklärte Varianz: PC1: 46%; PC2: 19%. **B:** Zweidimensionaler PCA Score-Plot mit entsprechendem *Loading*-Plot der Probengruppen Frankreich (blau) und Schweiz (orange). Erklärte Varianz: PC1: 42%; PC2: 18%.

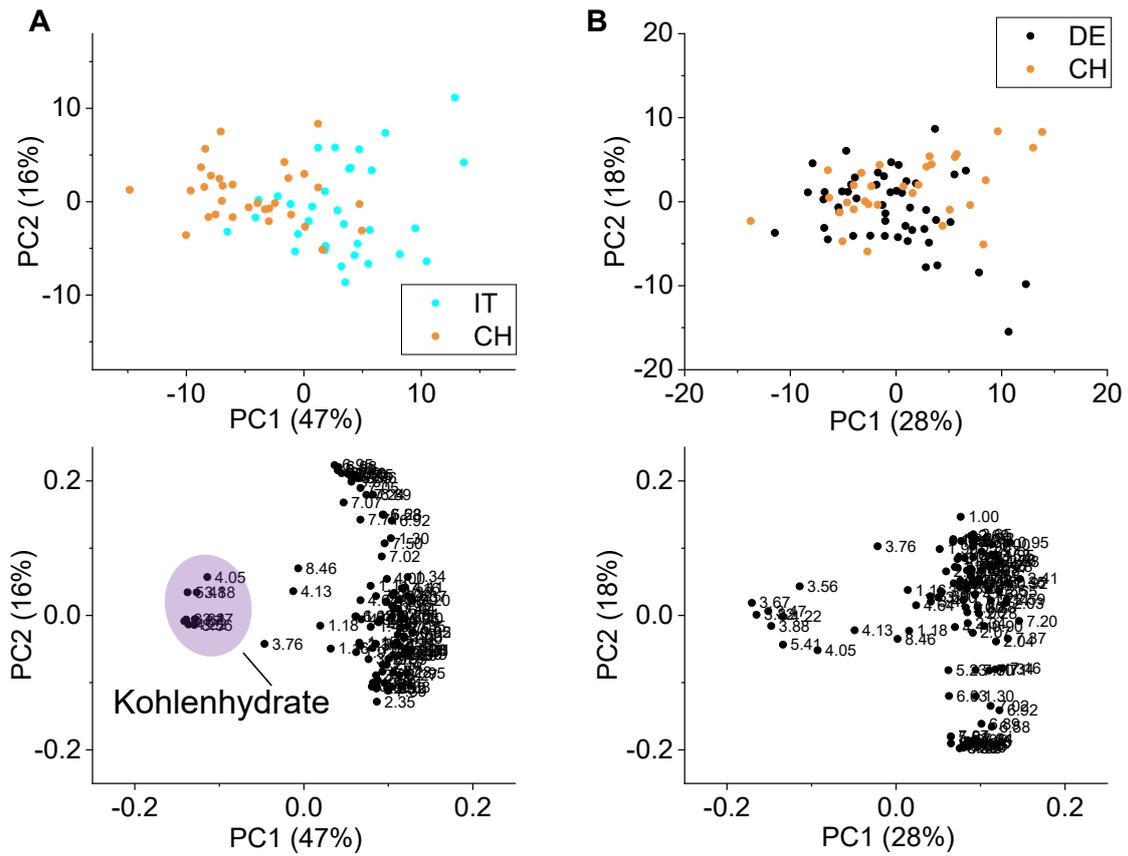


Abbildung 95: **A:** Zweidimensionaler PCA Score-Plot mit entsprechendem *Loading*-Plot der Probengruppen Schweiz (orange) und Italien (türkis). Erklärte Varianz: PC1: 47%; PC2: 16%. **B:** Zweidimensionaler PCA Score-Plot mit entsprechendem *Loading*-Plot der Probengruppen Deutschland (schwarz) und Schweiz (orange). Erklärte Varianz: PC1: 28%; PC2: 18%.

8.7.4. Box-Whisker-Plots

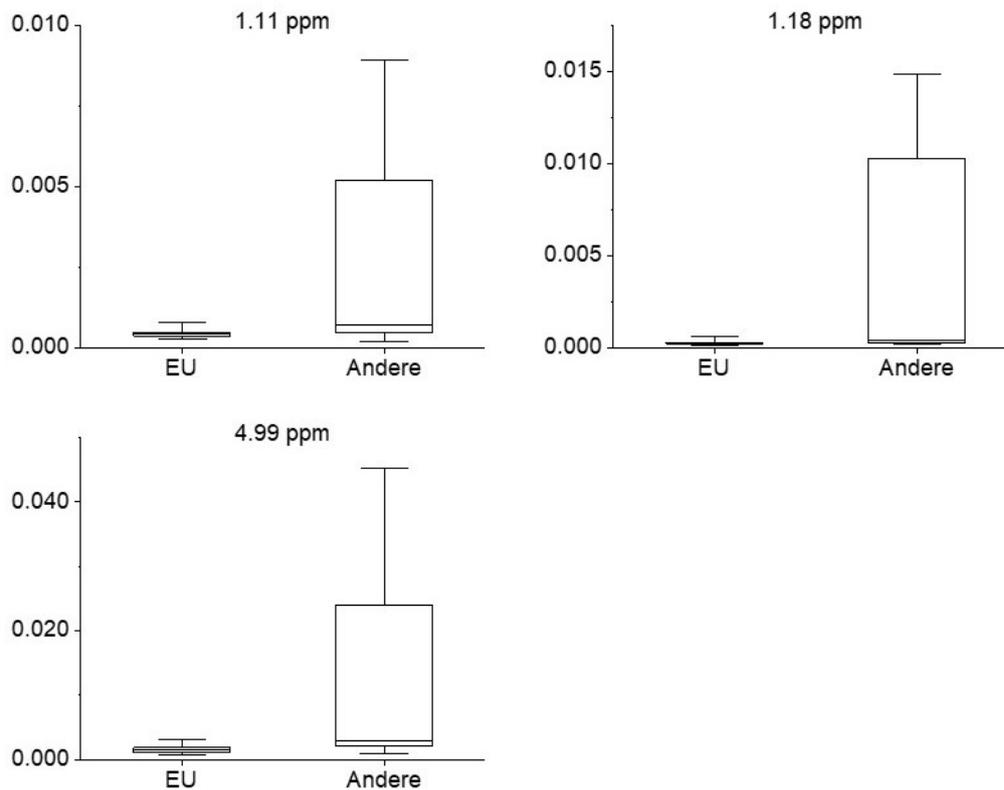


Abbildung 96: Box-Whisker-Plots ausgewählter *Buckets* (1.11 ppm, 1.18 ppm, 4.99 ppm) der Unterscheidung von europäischen und nicht-europäischen Walnussproben auf Basis von Extraktionsmethode B. Diese zeigen die skalierten Werte der *Buckets*. Die Streuung der Werte bei nicht-europäischen Ländern ist größer als bei den Proben aus europäischen Ländern, was vermutlich auf die geographische Breite zurückgeführt werden kann.

8.8. Python Skript

Im Folgenden ist das Python-Skript dargestellt, mit dem die seriell erhaltenen *sino*-Werte automatisch aus der *procs*-Datei der bearbeiteten NMR-Daten extrahiert werden können. Die Werte werden mittels des Skripts als Textdatei gespeichert.

```
import re

print('Welcher Ordnerpfad soll geöffnet werden?')
Ordner=input()
name=Ordner.split("\\")
a=0
längename=len(name)
länge=längename-1
while a<längename:
    if a<länge:
        a=a+1
        continue
    elif a==länge:
        dateiname=name[a]+'\.txt'
        break
    elif a<länge:
        break
print(dateiname)
Maximum=999
i=10
datei_out=open(dateiname, 'w')
datei_out.write('Experimentnummer, Anteil Erdnuss, Anteil Beimischung, Bestimmung,
Scanzahl, Sino\n')
print('Experimentnummer, Anteil Erdnuss, Anteil Beimischung, Bestimmung, Scanzahl,
Sino')
while i < Maximum:
    try:
        ordnername=Ordner.replace("\\','/")
        pfadmitte=('/')
        experimentnummer=str(i)
        pfadende=('/pdata/1/title')
        pfadname=ordnername+pfadmitte+experimentnummer+pfadende
        datei = open(pfadname)
        x=0
        for x, zeile in enumerate(datei):
            if x==1:
                title=zeile
                title=re.findall(r'-?\d+\.\?\d*', title)
                n=0
                while n < 4:
                    if n == 0:
                        Ewert=title[n]
                        n=n+1
                        continue
                    elif n==1:
                        Wwert=title[n]
                        n=n+1
```

```

        continue
    elif n==2:
        Bestimmung=title[n]
        n=n+1
        continue
    elif n==3:
        scanzahl=title[n]
        n=n+1
        break
    break
elif x<1:
    x=x+1
elif x>1:
    break
liste0=[]
datei.close()
pfadende=('/pdata/1/procs')
pfadname=ordnername+pfadmitte+experimentnummer+pfadende
datei = open(pfadname)
char='SINO'
x=0
for x, zeile in enumerate(datei):
    if char in zeile:
        sino=zeile
        sino=re.findall(r'-?\d+\.\?\d*', sino)
        sinozahl=sino[0]
        ausgabe='{}, {}, {}, {}, {}, {} \n'.format(experimentnummer, Ewert, Wwert,
Bestimmung, scanzahl, sinozahl)
        datei_out.write(ausgabe)
        print(ausgabe)
        x=x+1
    else:
        x=x+1
        continue
datei_in.close()
x=0
i=i+1
except:
    i=i+1
pass
datei_out.close()

```

9. Danksagung

Ich möchte mich zunächst bei Prof. Dr. Fischer für die Betreuung des Projekts und Hilfestellung bei Veröffentlichungen bedanken. Zudem bedanke ich mich bei Prof. Dr. Thiem für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ich bedanke mich bei Edris Riedel, Torben Segelke, Doreen Teske und vor allem Maïke Arndt für die gemeinsame Probenakquise und den interessanten Austausch innerhalb des Projekts. Ich bedanke mich bei allen Kooperationspartnern und Firmen, die uns mit authentischen Proben unterstützt haben.

Außerdem danke ich den Mitgliedern der NMR Abteilung. Hierbei möchte ich besonders Vera Prignitz und Claudia Wontorra nennen, es war immer sehr angenehm und einfach mit euch Messzeiten abzusprechen und ich bedanke mich für eure Hilfe bei den Messungen. Auch bei der MS-Abteilung möchte ich mich für die schöne Zeit im 4. Stock bedanken.

Des Weiteren bedanke ich mich ganz herzlich bei allen Praktikanten und Praktikantinnen für ihre Hilfe während meiner Promotion: Stephanie Watermann, Jasmin Janneschütz, Ursula Otterpohl, Navid Shakiba und Till Steinmetz. Ich bin sehr froh, dass ein Großteil von euch danach bei uns im Arbeitskreis, z.B. für die Masterarbeit oder Promotion, geblieben ist! Ein ganz besonderer Dank geht auch an meine Bachelorstudentinnen Alina Stelzer und Laura Rumask sowie meinen Bachelorstudenten Tim Bastek („Fruchtbande!“), die mich sehr unterstützt haben und mit denen ich eine schöne Zeit hatte.

Thomas, ich bedanke mich bei dir dafür, dass du mich in deinen Arbeitskreis aufgenommen hast und mir die Möglichkeit gegeben hast, so viel Neues dazuzulernen. Ich bedanke mich ganz herzlich bei René Bachmann für die fachliche Unterstützung und Einarbeitung ins Thema. Du bist mir sehr ans Herz gewachsen und ich bin sehr glücklich, dass ich auch weiterhin viel Kontakt zu dir und Christina habe. Außerdem bedanke ich mich bei Stephi, Navid, Thorsten und Johanna für die schönste Zeit im besten Arbeitskreis. Ich habe sehr gerne mit euch zusammengearbeitet!

Ich bedanke mich außerdem bei meiner Familie, ohne die dies alles nicht möglich gewesen wäre, für die Unterstützung und euer Interesse („Was machen die Nüsse?“) an meiner Arbeit. Denise, Katha, Nils und Carina, danke für eure Freundschaft und Hilfe während der Promotion, ich habe euch sehr lieb!

Abschließend bedanke ich mich bei Tobi, der immer für mich da war und mich unterstützt hat und der mir mit seiner Kreativität und neuen Ideen bei Problemlösungen geholfen hat. Danke, dass du immer für mich da bist!

10. Eidesstattliche Erklärung

„Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt zu haben. Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium. Ich versichere, dass diese Dissertation nicht in einem früheren Promotionsverfahren eingereicht wurde.“

Hamburg, 03.02.2021