



Analyse von Weinaromen

Verduften ausgeschlossen

Die Nase vorn hat, wer bei der Bestimmung geruchsverursachender Verbindungen unterschiedliche Extraktionstechniken kombinieren, wahlweise ein- oder zweidimensional trennen, massenselektiv und zeitgleich olfaktorisch bestimmen oder interessante Fraktionen sammeln kann, um sie erneut derselben oder einer anderen Analyse zuzuführen. Dass sich genannte Schritte effizient und praktikabel auf nur einem GC/MS-System realisieren lassen, haben japanische Wissenschaftler jüngst erfolgreich demonstriert.

In puncto seiner olfaktorischen Fähigkeiten zieht der Mensch gegenüber seinen tierischen Artgenossen den Kürzeren. Das Riechzentrum eines Hundes zum Beispiel ist rund 40 Mal größer als das seines Herrchens. Der Schäferhund etwa verfügt über 220 Millionen Riechzellen, unsereiner kommt auf lediglich fünf Millionen. Weil der Hund schneller und intensiver atmet, bringt er es zudem auf eine signifikant größere Riechleistung, das heißt, er nimmt mehr geruchsverursachende Verbindungen pro Zeiteinheit wahr. Dass aber der Mensch den Hund an der Leine führt und nicht umgekehrt, belegt: Der Geruchssinn ist zwar wichtig, entscheidet jedoch nicht darüber, wer Herr ist und wer Hund! Homo sapiens verfügt über eine Vielzahl unterschiedlichster Kompetenzen, mit denen er seine olfaktorischen Defizite trefflich ausgleichen kann.

Etwa durch seine Fähigkeit, Analysegeräte zu entwickeln, mit denen sich Geruchsverursacher auch aus komplexen Matrices sowohl sensorisch als auch analytisch, spricht: qualitativ und quantitativ bestimm-

men lassen. Insbesondere die Gaschromatographie (GC), verbunden mit der Olfaktometrie (O), erweist sich als überaus wirksame Methode: Durch Teilen des Eluats am Säulende lässt sich ein Olfactory Detection Port (ODP) anschließen, um potenziell geruchsaktive Verbindungen zu erschnüffeln und zu bewerten und zeitgleich die Signale mittels eines massenselektiven Detektors unter Zuhilfenahme der in Datenbanken gespeicherten massenspektrometrischen Informationen zu identifizieren.

Nebenbei bemerkt, die Kombination von ODP und MSD macht eine Schwäche der Technik offenkundig: „Nicht immer zeigt sich im Chromatogramm ein Signal, obgleich man zum selben Zeitpunkt mit der Nase am ODP einen sensorischen Eindruck erhält“, sagt Dr. Nobuo Ochiai, Applikationsspezialist von GERSTEL K.K. in Tokio, Japan. Damit steht wohl außer Frage, dass die menschliche Nase in puncto Riechleistung zwar nicht mit der des Hundes konkurrieren kann, sie ist jedoch von Fall zu Fall immer noch sensitiver in ihrer Wahrnehmung, als jedes Messgerät. Bereits wenige Milligramm Methylmercaptan etwa, ein in Knoblauch enthaltenes Arom, in 100 Mio. Kubikmetern Luft genügen, um im Menschen eine Hier-stimmt-etwas-nicht-Emp-

findung auszulösen. Um die Vorstellungskraft von der Größe des Raumes zu beflügeln: Das Gemäuer des Kölner Doms umschließt ein Volumen von rund 260.000 Kubikmetern Luft. Wenn es um einen flüchtigen Geruchseindruck geht oder darum, einen Geruch bewusst wahrzunehmen und ihn konkret beschreiben zu können, bedarf es hingegen einer vielfach höheren Duftstoffkonzentration oder aber es gelingt, störende Begleitgerüche zu entfernen, um die Riechzellen in der Nase zu entlasten.

Per Knopfdruck in die zweite Dimension

So illusorisch die Idee mit dem Ausblenden olfaktorischer Störungen klingt, so einfach lässt sie sich technisch umsetzen – und zwar in einem einzigen GC/MS-System, das für die wahlweise ein- und zweidimensionale Trennung (1D/2D) vorbereitet und mit einem MSD sowie einem parallelgeschalteten ODP ausgestattet ist. Mit ihrem kompakten Selectable-1D/2D-GC-O/MS-System, das einen Wechsel zwischen 1D- und 2D-Trennung eines Heart-cuts des interessanten Chromatogrammbereichs auf Mausklick ermöglicht, haben Dr. Ochiai und Kollegen bereits erfolgreich unter anderem Arom- und Duftstoffe in Lebensmittel- und Kon-



sumgütern sensitiv und sicher nachgewiesen, also Probenarten, die über eine als komplex zu bezeichnende Matrix verfügen. Darin befindliche koeludierende Bestandteile können die Analyse sowie die Zuordnung der Signale im Chromatogramm beziehungsweise Olfaktogramm, in das der Anwender seinen Geruchseindruck des jeweiligen Signals auf einer Zeitachse einträgt, erschweren beziehungsweise vereiteln.

Wie die Praxis zeigt, gelingt es leider nicht per se, trotz mehrdimensionaler Schaltungen und Geruchswahrnehmung im ODP, zu passender Retentionszeit auch Signale im Gesamt-Ionen-Chromatogramm (TIC) aufzuzeichnen; ein Anzeichen dafür, dass die Konzentration der interessanten Analyten zu gering ist. Um nun aber ein reproduzierbares Signal im MSD zu erzielen, haben sich die japanischen Wissenschaftler dafür entschieden, die infrage kommenden Fraktionen mit einem einkanaligen präparativen Fraktionensammler (Single Trap Preparative Fraction Collector, Single-PFC) anzureichern.

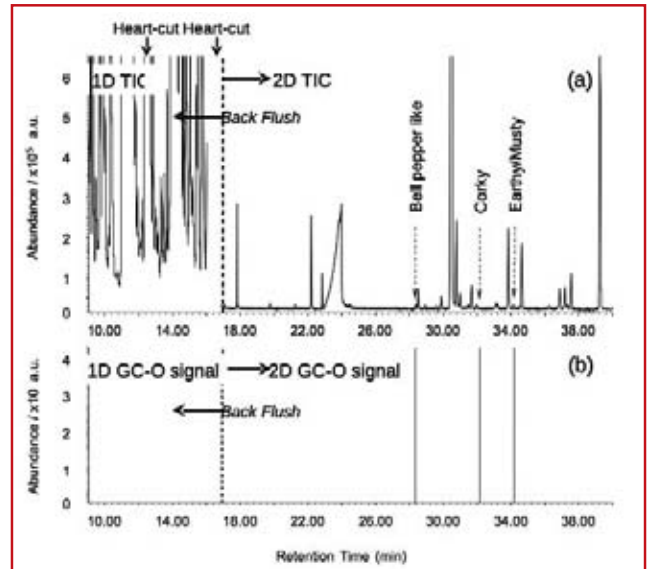
Leistungstest mit dotiertem Wein

Indem sie zwei kommerziell erhältliche Weißweine der Rebsorte Sauvignon blanc und Chardonnay untersuchten, stellten Dr. Nobuo Ochiai und Kollegen ihr kombiniertes Selectable-1D/2D-GC-O/MS-Single-PFC-System auf die Probe. Seine Praxistauglichkeit testeten sie durch den Nachweis von Fehlgerüchen, namentlich Trichloranisol (TCA), den klassischen Korkschmecker, 2-Isobutyl-3-Methoxy-pyrazin (IBMP), das einen paprikaartigen Geschmack besitzt, sowie das muffig-erdige Geosmin, mit dem sie den Wein versetzten. Bereits winzigste Mengen genannter Verbindungen reichen aus, um von der menschlichen Nase wahrgenommen zu werden: Bei IBMP genügen 25 ng/L, TCA „stinkt uns“ bereits bei 5 ng/L und Geosmin in einer Konzentration von 50 ng/L. Um die Leistungsfähigkeit der Aufkonzentrierung mittels Single-PFC zu bestimmen, versetzten sie den Wein jeweils mit

folgenden 15 Standardverbindungen in pg-Dosen: Hexanal, 1-Hexanol, 3-Hexenol, Linalool, Citronellol, Geraniol, p-Cymen-8-ol, Phenethylalkohol, Guaiacol, Ethylhexanoat, Ethylacetat, Phenethylacetat, Beta-Damascenon, Gamma-Nonalacton und Limonen.

Die dotierten Wohl- und Fehlgerüche extrahierten die Wissenschaftler in geschlossenen Headspace-Vials unter Einsatz der Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE) mit dem GERSTEL-Twister. Im Anschluss wurden die PDMS-ummantelten Rührstäbchen entnommen, trocken getupft und in Glasröhrchen überführt. Die thermische Desorption der Analyten erfolgte automatisiert durch den GERSTEL-MultiPurpose-Sampler (MPS) in der GERSTEL-Thermal-Desorption Unit (TDU): Die Starttemperatur im TDU betrug 30 °C (Haltezeit 0,5 min) und wurde mit 720 °C/min auf 200 °C (Haltezeit 3 min) und einem Desorptionsfluss von 50 mL/min gesteigert. Bei dem eingesetzten Trägergas handelte es sich um Helium. Die desorbierten Analyten wurden im GC-Einlass, dem GERSTEL-KaltAufgabeSystem (KAS), bei 10 °C auf einem mit Tenax TA gepackten Liner fokussiert und temperaturprogrammiert mit 720 °C/min auf 240 °C aufgeheizt und im Splitlos-Modus (2 min) auf die 1D-Trennsäule überführt; die Endtemperatur wurde für die Dauer des GC-Laufs beibehalten.

Bei dem eingesetzten GC/MS-System handelte es sich um eine Kombination von GC 7890 und MSD 5975C von Agilent Technologies. Die Trennung in der ersten Dimension erfolgte auf einer DB-Wax-Säule von Agilent Technologies (30 m lang, 0,25 mm ID, 0,25 µm Filmdicke), die Trennung in der zweiten Dimension auf einer DB-5-Säule (10 m lang, 0,18 mm ID, 0,40 µm Filmdicke), ebenfalls von Agilent Technologies. Beide Säulen befanden sich nicht im GC-Ofen, sondern in zwei am GC-Gehäuse von außen montierten, unabhängig voneinander heiz- und



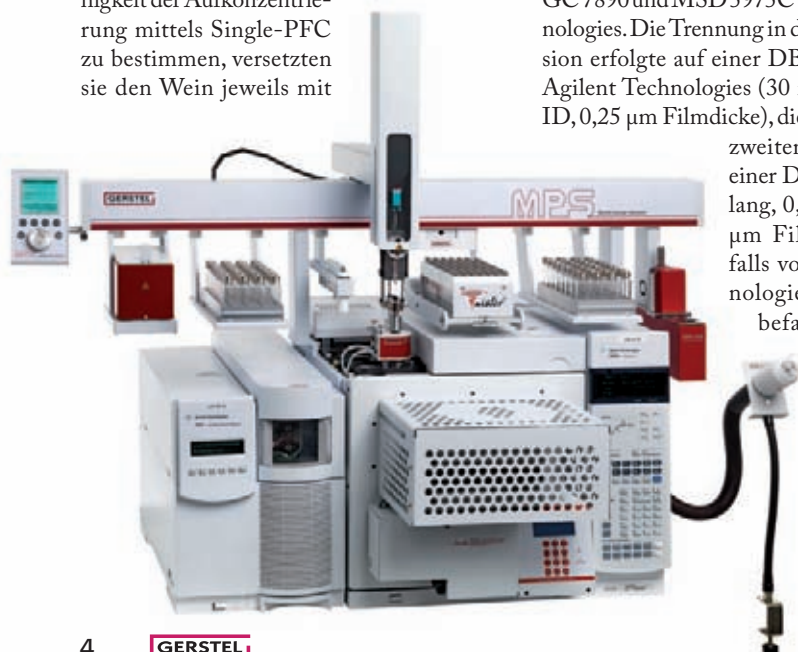
1D/2D-TIC und olfaktometrische Signale, erhalten vom SBSE-TD-Selectable-1D/2D-GC-O/MS für im Bereich von 5-50 ng/L gespickten Wein. (a) = 1D/2D-TIC; (b) = 1D/2D olfaktometrische Signale.

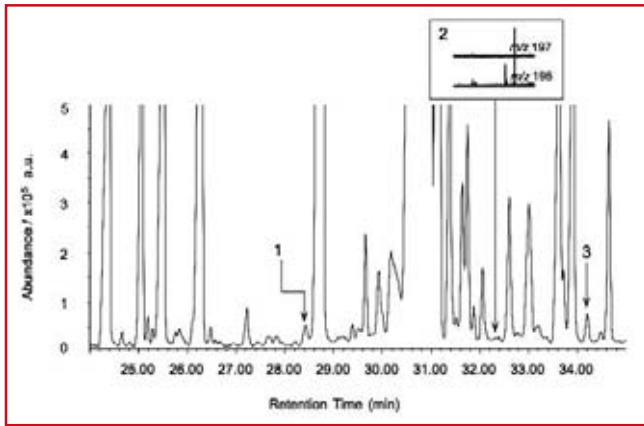
kühlbaren Low-Thermal-Mass-(LTM)-Modulen (Agilent Technologies). Der GC-Ofen behält während der gesamten Analysendauer eine konstante Temperatur von 250 °C und beheimatete ausschließlich die Transferkapillaren sowie die Module zur Überführung auf ODP, MSD und Single-PFC.

Bewertung der 1D/2D-Trennung und der PFC-Anreicherung

In zwei Schritten gingen die japanischen Wissenschaftler schließlich vor: Zuerst testeten sie die Funktionstüchtigkeit ihres einkanaligen PFC-Moduls (GERSTEL) unter Einsatz eines Adsorbensröhrchens, das über eine geschickte Säulenschaltung angesteuert wurde. Was, am Rande bemerkt, hervorragend gelang, wie Dr. Nobuo Ochiai und Kollegen berichten: Es ergab sich eine sehr gute Wiederfindung von 85–98 % mit einer relativen Standardabweichung (RSD) von < 3,2 % (n = 7), schreiben die Wissenschaftler. Anschließend evaluierten sie die Wiederfindung der Anreicherung mit 20 Injektionszyklen, die bei 98–116 % lag. Dr. Nobuo Ochiai: „Die hohen Wiederfindungen der PFC-Anreicherung der Modellverbindungen im Sub-ng-Bereich zeugen von der Güte und Wirksamkeit des verwendeten Systems.“

Im Anschluss an diese ersten Testläufe erfolgte die Identifizierung der dotierten Off-Flavor-Verbindungen mittels Selectable-1D/2D-GC-O/MS nach automatisierter Thermodesorption. Die Temperatur der 1D-Säule wurde programmiert von 40 °C (2 min) mit 10 °C/min auf 240 °C hochgefahren. Die Temperatur der 2D-Säule betrug ebenfalls 40 °C und wurde entweder während des GC-Laufes bei diesem Wert belassen oder, zur 2D-Trennung, programmiert mit 5 °C/min auf 150 °C und mit 20 °C/min auf 280 °C (gehalten) hochgeheizt.





1D/2D-TIC und Massenchromatogramm (m/z 195 und 197) der PFC-Anreicherung mit 20 Injektionszyklen für gespickten Wein (Zoom in 2D-GC-MS-Analyse). (1) = IBMP zu 25 ng/L; (2) = TCA zu 5 ng/L; (3) = Geosmin zu 50 ng/L.

Für das MS und den ODP wählten die japanischen Wissenschaftler ein Splitverhältnis von 1:2.

Das MS wurde im Scan- und im SIM-Modus betrieben. Der Scan-Bereich betrug 29 bis 300 (m/z), die Scan-Geschwindigkeit 2,68 Hz. Im SIM wurden 9 Ionen beobachtet (m/z 124, 151 und 94 für IBMP, m/z 112, 125 und 182 für Geosmin, m/z 195, 197 und 210 für TCA; m/z 124 [IBMP], 112 [Geosmin] und 195 [TCA] wurden für die Bestimmung verwendet). Die Geschwindigkeit für die Datenakquisition betrug 3 Hz für jedes Ion. Die Temperatur des ODP betrug 250 °C.

Off-Flavor-Verbindungen in Ultraspurenmengen nachweisen

So viel vorneweg: IBMP, TCA und Geosmin wurde mittels SBSE-TD-Selectable-1D/2D-GC-O/MS im Scan-Modus analysiert und olfaktorisch eindeutig bestimmt. Die Retentionszeiten des GC-O-Signals lagen bei 12,45 min (IBMP), 16,25 min (TCA) und 16,55 min (Geosmin). „Diese Peaks waren jedoch vollständig verborgen im 1D-TIC“, schreiben die Wissenschaftler. Deshalb wurden die relevanten Bereiche im 1D-Chromatogramm (Retentionszeiten: 12,40-12,55 min und 16,10-17,00 min) ausgeschnitten (Heart-cut) und der 2D-Trennung zugeführt.

Die 2D-GC-O/MS erfolgte unmittelbar nach dem 1D-Lauf auf demselben System, ohne jede Veränderung. Nebenbei bemerkt: Die 2D-Trennung startete bei einer Retentionszeit von 17,50 min; zeitgleich wurde der Eluent durch Modulation des Eingangsdrucks aus der 1D-Säule rückgespült.

Die drei Off-Flavor-Verbindungen wurden schließlich olfaktorisch im Zuge der 2D-Trennung klar detektiert, wenngleich sich bei der MS-Detektion im Scan-Modus kein verwertbares Signal zeigte. Um nun auch im Scan-Modus Signale zu erhalten, führten die Wissenschaftler eine Anreicherung der Zielverbindungen von 20 sequenziell vermessenen SBSE-Proben mittels nach-

geschaltetem Single-PFC durch. Die Tenax-TA-Falle des PFC wurde anschließend auf demselben System thermisch desorbiert und mittels 2D-GC-O/MS analysiert, ohne dass am Systemaufbau etwas verändert wurde.

Die Ergebnisse der Messung sprechen für sich:

Die Peaks von IBMP und Geosmin, die ihren olfaktometrischen Signalen entsprachen, konnten auch im 2D-TIC identifiziert werden. Obgleich der TCA-Peak im 2D-TIC fast vollständig verborgen lag, wurden spezifische Massenchromatogramme (z. B. m/z 195 und 197) zeitgleich mit dem olfaktometrischen Signal von TCA aufgezeichnet.

Die Massenspektren aller Zielverbindungen wurden unter Verwendung der Agilent-ChemStation mit denen einer Wiley-Library verglichen. Nach der Identifizierung erfolgte eine Quantifizierung der drei Off-Flavor-Verbindungen im Sauvignon blanc mittels Einzel-SBSE-TD-1D/2D-GC-O/MS im SIM-Modus unter Verwendung einer 4-Punkt-Standardadditions-Kalibration.

Für alle Verbindungen wurde eine sehr gute Linearität mit Korrelationskoeffizienten (r^2) von mehr als 0,9990 erhalten. Nur IBMP wurde in der Sauvignon-blanc-Probe detektiert und in einem Ultraspurenbereich von 13 ng/L bestimmt (RSD = 4,4 %, $n = 6$).

Erfreuliches Fazit zu ziehen

Dr. Nobuo Ochiai: „Mit unserem System lassen sich 1D-GC-O/MS-, 2D-GC-O/MS-, 1D-GC-PFC- und 2D-GC-PFC-Analysen durchführen, ohne dass eine Änderung des Systemaufbaus erforderlich ist.“ Die ThermalDesorptionUnit (TDU), mit dem das System ausgestattet ist, könne die angereicherten Verbindungen im Splitlosmodus in dasselbe GC-System injizieren und erlaube die Identifizierung von Geruchsverbindungen mittels 2D-GC-O/MS-Analyse im Scan-Modus. Die Leistungs-



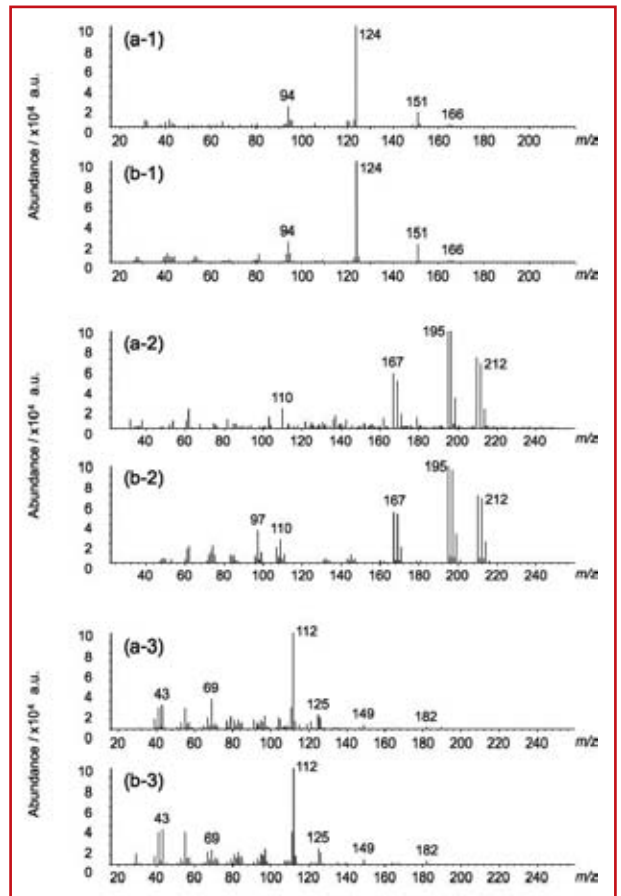
Kikuo Sasamoto

Dr. Nobuo Ochiai

fähigkeit des Systems konnten Dr. Nobuo Ochiai und Kikuo Sasamoto anhand der Identifizierung dreier Off-Flavor-Verbindungen, im vorliegenden Fall TCA, IBMP und Geosmin, demonstrieren, mit denen sie den untersuchten Wein in Mengen von 5–50 ng/L dotiert hatten. Die gute Leistungsfähigkeit der SBSE-PFC-Anreicherung (71–78 %) zeige, berichten die Wissenschaftler, „dass eine kombinierte Vorgehensweise, bestehend aus SBSE, TD, 1D/2D-GC-O/MS mit Single-PFC, praktikierbar ist für die Identifizierung von Geruchsverbindungen im ng/L-Bereich in wässrigen Proben“.

Literatur

Nobuo Ochiai, Kikuo Sasamoto, J. Chromatogr. A, 1218 (2011) 3180-3185.



Vergleich gemessener Massenspektren von IBMP (a-1), TCA (a-2) und Geosmin (a-3) in gespicktem Wein, erhalten mittels SBSE-Single-PFC-Anreicherung mit 20 Injektionszyklen und anschließende TD-1D/2D-GC-O/MS-Analyse mit Massenspektren aus der Wiley-Bibliothek für IBMP (b-1), TCA (b-2) und Geosmin (b-3).