

**Enantiodifferenzierung von 2-Methoxy-3-*sec*-butylpyrazin
und Quantifizierung weiterer Alkylmethoxypyrazine
mittels multidimensionaler gaschromatographischer Methoden**

vom Fachbereich Chemie
der Universität Kaiserslautern
zur Verleihung des akademischen Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“ genehmigte Dissertation

D 386

vorgelegt von
**Dipl.-Lebensmittelchemikerin
Charlotte Legrum**

Datum der wissenschaftlichen Aussprache: 19.06.2019

Erstgutachter: Prof. Dr. Ulrich Fischer
Zweitgutachterin: Prof. Dr. Elke Richling
Beratender Gutachter: PD Dr. Hans-Georg Schmarr

Rechtsverbindliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die eingereichte Arbeit mit dem Titel

Enantiodifferenzierung von 2-Methoxy-3-*sec*-butylpyrazin und Quantifizierung weiterer Alkylmethoxypyrazine mittels multidimensionaler gaschromatographischer Methoden

selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst habe.

Diese Arbeit oder Teile davon sind bislang keiner anderen Prüfungsbehörde als Prüfungsarbeit vorgelegt worden.

Charlotte Legrum

Kaiserslautern, Juli 2019

Veröffentlichungen

Artikel in Fachjournalen (peer-review)

- [P1] Legrum, C., Gracia-Moreno, E., Lopez, R., Potouridis, T., Langen, J., Slabizki, P., Weiland, J., und Schmarr, H.-G., *Quantitative analysis of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in German Sauvignon blanc wines by MDGC-MS or MDGC-MS/MS for viticultural and enological studies*. Eur. Food Res. Technol., 239(4): 549–558, 2014.
- [P2] Schmarr, H.-G., Slabizki, P., und Legrum, C., *Optimization in multidimensional gas chromatography applying quantitative analysis via a stable isotope dilution assay*. Anal. Bioanal. Chem., 405(20): 6589–6593, 2013.
- [P3] Legrum, C., Slabizki, P., und Schmarr, H.-G., *Enantiodifferentiation of 3-sec-butyl-2-methoxypyrazine in different species using multidimensional and comprehensive two-dimensional gas chromatographic approaches*. Anal. Bioanal. Chem., 407(1): 253–263, 2015.
- [P4] Slabizki, P., Legrum, C., Meusinger, R., und Schmarr, H.-G., *Characterization and analysis of structural isomers of dimethyl methoxypyrazines in cork stoppers and ladybugs (*Harmonia axyridis* and *Coccinella septempunctata*)*. Anal. Bioanal. Chem., 406(25): 6429–6439, 2014.
- Slabizki, P., Legrum, C., Meusinger, R., und Schmarr, H.-G., *Erratum to: Characterization and analysis of structural isomers of dimethyl methoxypyrazines in cork stoppers and ladybugs (*Harmonia axyridis* and *Coccinella septempunctata*)*. Anal. Bioanal. Chem., 406(29): 7743–7744, 2014.
- [P5] Slabizki, P., Legrum, C., Wegmann-Herr, P., Fischer, C., und Schmarr, H.-G., *Quantification of cork off-flavor compounds in natural cork stoppers and wine by multidimensional gas chromatography mass spectrometry*. Eur. Food Res. Technol., 242(6): 977–986, 2016.

Beiträge in Fachzeitschriften

- [P6] Legrum, C. und Schmarr, H.-G., *Enantioselektive Analyse von 2-Methoxy-3-sec-Butylpyrazin mittels multidimensionaler Gaschromatographie und Massenspektrometrie*. Lebensmittelchemie, 67(4): 98–99, 2013.
- [P7] Legrum, C. und Schmarr, H.-G., *Bestimmung von Alkyl-methoxypyrazinen in verschiedenen Spezies mittels HS-SPME-und enantio-MDGC-QqQ-MS*. Lebensmittelchemie, 68(5): 94–96, 2014.

Vorträge

- [V1] Legrum, C., H.-G. Schmarr, *Enantioselektive Analyse von 2-Methoxy-3-sec-Butylpyrazin mit MDGC-MS*. Arbeitstagung des Regionalverbands Südwest der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, Fachgruppe in der GDCh, Karlsruher Institut für Technologie, 19.–20.03.2013.
- [V2] Legrum, C., H.-G. Schmarr, *Bestimmung von 3-Alkyl-2-methoxypyrazinen in verschiedenen Spezies mittels HS-SPME und enantio-MDGC-QqQ-MS*. 24. Doktorandenseminar Hohenroda, 05.–07.01.2014.
- [V3] Legrum, C., H.-G. Schmarr, *Bestimmung von 3-Alkyl-2-Methoxypyrazinen in verschiedenen Spezies mittels HS-SPME und enantio-MDGC-QqQ-MS*. Arbeitstagung des Regionalverbands Südwest der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, Fachgruppe in der GDCh, Kompetenzzentrum Weinforschung am Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum (DLR) Rheinpfalz, 10.–11.03.2014.
- [V4] Legrum, C., H.-G. Schmarr, *Determination of Alkyl-Methoxypyrazines in Various Species using HS-SPME and enantio-MDGC-QqQ-MS*. 38th International Symposium on Capillary Chromatography (ISCC) and 11th GC×GC Symposium, May 18–23, 2014 Congress Centre, Riva del Garda, Italy.
- [V5] Legrum, C., *HS-SPME in der Spurenanalytik: Beispiele aus der Weinaroma-Forschung*. SPME-Anwendertreffen von Supelco/Sigma-Aldrich, auf Einladung, Stuttgart, 30.06.–01.07.2014.

Posterpräsentation

- [A1] Legrum, C. und Schmarr, H.-G., *Enantioselektive Analyse von 2-Methoxy-3-sec-Butylpyrazin mit multidimensionaler Gaschromatographie und Massenspektrometrie*. 42. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Braunschweig, Deutschland, 2013.

Kurzfassung

Alkylmethoxypyrazine (MPs) stellen eine wichtige Stoffgruppe mit Aromarelevanz für vegetative, sogenannte grüne Noten in vielen Lebensmitteln dar. Die Vertreter 2-Isopropyl-3-methoxypyrazin (IPMP), 2-Methoxy-3-*sec*-butylpyrazin (SBMP) und 2-Isobutyl-3-methoxypyrazin (IBMP) sind auf Grund der niedrigen Geruchsschwellenwerte als potente Aromastoffe relevant. Sie werden endogen je nach Spezies in variierenden Konzentrationen und Relationen zueinander gebildet (ppt-Bereich für *Vitis vinifera* Weinbeeren bis ppb-Bereich für Gemüse). Diese und weitere MPs kommen auch in den Körperflüssigkeiten von Insekten vor, z. B. in Marienkäferspezies wie *Coccinella septempunctata* und *Harmonia axyridis*. Je nach Befallsmenge der Weintrauben mit Marienkäfern während der Lese können sie bei der ungewünschten Mitverarbeitung in der Weinherstellung Fehlnoten hervorbringen. Weiterhin werden MPs durch einige Mikroorganismen gebildet und können direkt oder indirekt (über Kontaktmaterialien) zu einem Eintrag und damit potentiell zu einem Fehleroma, z. B. in Wein, führen.

Die Biogenese der MPs ist bis auf die *O*-Methylierung der Alkylhydroxypyrazine im letzten Schritt noch nicht vollständig aufgeklärt. Bisherige Studien deuten an, dass die proteinogenen Aminosäuren als Ausgangsstoffe fungieren. Beim SBMP gibt es eine chirale Seitenkette, deren Konformation Rückschlüsse auf den Einbau der entsprechenden Aminosäure L-Isoleucin liefern kann.

Im Hinblick auf die Analytik sind die Konzentrationsbereiche von MPs in Gemüsesorten gut zugänglich mit klassischen Extraktionsverfahren und einfachen chromatographischen Trenn- sowie Detektionsmethoden. Im Bereich der sensorischen Geruchsschwellenwerte in Wein von wenigen ng/L und hinsichtlich der komplexen Matrix Wein reichen die Nachweisgrenzen der meisten, auch modernen, Methoden allerdings nicht aus.

In dieser Arbeit wurde daher eine routinefähige Analysemethode zur Quantifizierung von MPs im Spurenbereich bis unterhalb der Geruchsschwellenwerte von ca. 1 bis 2 ng/L

in Weißwein entwickelt. Zur Probenvorbereitung wurde die automatisierte Festphasenmikroextraktion (*solid phase micro extraction*, SPME) aus dem Dampfraum (*headspace*, HS) eingesetzt (HS-SPME). Die Trennung erfolgte mittels *heart-cut* multidimensionaler oder umfassender zweidimensionaler GC (H/C MDGC oder GC×GC). Zur Detektion waren die Massenspektrometrie (MS) für den ppb-Bereich und die Tandem-MS (MS/MS), besonders zur Absicherung gegenüber Co-Elutionen, zielführend. Für eine möglichst verlässliche Quantifizierung, gerade im Spurenbereich, wurde der Stabilisotopenverdünnungsassay eingesetzt. Die optimierte HS-SPME H/C MDGC-MS/MS-Methode lieferte Nachweisgrenzen unterhalb der Geruchsschwellenwerte der MPs in Wein und erfasste neben den klassischen Vertretern IPMP, SBMP und IBMP auch die Isomere des Dimethylmethoxy-pyrazins und 2-Ethyl-3-methoxy-pyrazin (EtMP). Als Kernstück für die Enantiodifferenzierung des SBMPs wurde je eine der Trennsäulen (in MDGC und GC×GC) durch eine Trennsäule mit chiralen Selektoren in der stationären Phase ersetzt.

Die Quantifizierung von MPs in Gemüsesorten ergab, in Übereinstimmung mit Werten aus der Literatur, Gehalte von wenigen ng/kg bis µg/kg. Quantitative Ergebnisse in Wein (Sauvignon blanc und Cabernet blanc) zeigten Einflüsse von oenologischen und weinbaulichen Verfahren auf die MP-Konzentrationen. Die Enantiodifferenzierung des SBMPs ergab, dass in allen bisher analysierten Gemüse-, Wein- und Marienkäfer-Proben nur das (*S*)-SBMP detektiert wurde, die Seitenkette also wie im L-Isoleucin (*S*)-Konfiguration aufweist. Dieses Ergebnis kann zur Hypothese, dass MPs aus den natürlichen Aminosäuren gebildet werden, beitragen. Die Erweiterung der Analysemethoden auf weitere MPs ermöglichte die zweifelsfreie Zuordnung der Isomere 3-Methoxy-2,5-dimethylpyrazin (DMMP) und 2-Methoxy-3,5-dimethylpyrazin (MDMP) von denen lediglich das MDMP in Korkextrakten und Wein mit untypischen Korkfehlton detektiert und erstmals in den Marienkäferspezies *Harmonia axyridis* und *Coccinella septempunctata* nachgewiesen wurde.

Die in dieser Arbeit entwickelten Spurenanalysemethoden ermöglichen die Erfassung der MPs im Bereich weniger ng/L und somit auch weitere Studien zu Einflüssen auf endogene MP-Gehalte in *Vitis vinifera* oder zu Einflüssen auf Wein durch oenologische Verfahren oder Kontamination aus anderen Quellen. Zur weiteren Abklärung der Biogenese ist die Entwicklung geeigneter Markierungsstudien nötig. Für die Analyse solcher Versuche sind die gezeigten Methoden zur Quantifizierung (und Enantiodifferenzierung) von MPs im Spurenbereich notwendig.

Abstract

Alkyl methoxypyrazines (MPs) have been identified in foodstuffs of plant origin as potent flavor compounds, contributing significantly to the characteristic vegetative, so-called green sensory impression of products made thereof. Of particular interest are 2-isopropyl-3-methoxypyrazin (IPMP), 2-methoxy-3-*sec*-butylpyrazin (SBMP) and 2-isobutyl-3-methoxypyrazin (IBMP) as they are often dominating in flavor due to their low odor thresholds. Biogenesis of MPs takes place in various species, resulting in varying concentration levels and distributions (ppt levels in *Vitis vinifera* wine berries, ppb levels in vegetables). The before mentioned and further MPs are also found in body fluids of insects such as ladybugs, e. g. in the species *Coccinella septempunctata* and *Harmonia axyridis*. Ladybugs may play a role in the generation of off-flavors in wine in case of their incorporation during harvest and wine making. Furthermore, MPs are products from the metabolism of certain microorganisms and could lead to off-flavors indirectly via contact materials like cork stoppers for wine.

The last step in the proposed biosynthetic pathway(s) was clarified als *O*-methylation of alkyl hydroxypyrazines, whereas the initial steps considering naturally occurring amino acids as starting materials are not yet fully explored. In case of SBMP, the alkyl side chain may thus derive from L-isoleucine, resulting in the same, namely (*S*)-configuration of the stereo center in SBMP.

Considering analytical approaches, MPs in high concentration levels as in vegetables are accessible using classical extraction techniques, simple separation and detection techniques. On the other hand, for lower concentration ranges near the odor thresholds of MPs in wine and for the highly complex matrix of wine most analytical methods do not yield the necessary levels of detections.

In this work a trace-level method for routine analysis and quantitation of MPs in the concentration range of the odor thresholds in white wine of 1 to 2 ng/L was developed.

The extraction of the analytes was based on automated *headspace solid phase micro extraction* (HS-SPME). The separation was done either by heart-cut multidimensional GC (H/C MDGC) or comprehensive two-dimensional GC (GC×GC). MPs were detected using mass spectrometry (MS) in the selected ion monitoring (SIM) mode, especially for higher concentrations. To better clarify co-elution situations and for lower MP concentrations, tandem MS (MS/MS) was used in the selected reaction monitoring (SRM) mode. For a more reliable quantitation of trace levels, the stable isotope dilution assay (SIDA) was applied. The optimized method using HS-SPME H/C MDGC-MS/MS had levels of detection at concentrations below the odor thresholds of MPs in wine and allowed for the analysis of further MPs (isomers of dimethyl methoxypyrazine). As the core piece of enantiodifferentiation, one of the analytical columns in MDGC or GC×GC was replaced by a column with chiral selectors on the stationary phase, enabling the evaluation of the enantiomeric composition of SBMP in various samples.

The quantitation of MPs in vegetable samples in this work revealed levels in the range of a few ng/kg up to µg/kg, which is in accordance with results from literature. Quantitative studies of wine (Sauvignon blanc and Cabernet blanc) indicated influences of oenological and viticultural processes on MP levels. The evaluation of the enantiomeric composition of SBMP resulted in the exclusive detection of (*S*)-SBMP in all analyzed samples, various vegetables, wine and ladybug species. The congruency of the configuration of the stereo center in the side chain of (*S*)-SBMP and the side chain of L-Isoleucin supports the hypothesis that natural amino acids serve as starting material in the biosynthesis of MPs. Extending the optimized H/C MDGC method, a successful separation of the isomers 3-methoxy-2,5-dimethylpyrazin (DMMP) und 2-methoxy-3,5-dimethylpyrazin (MDMP) was achieved. Of these isomers only MDMP was detected in cork and wine with an atypical cork off-flavor and it was identified for the first time in two ladybug species, *Harmonia axyridis* and *Coccinella septempunctata*.

The methods developed in this work allowed for the quantitation of MPs in the range of a few ng/L. This can be used for further studies on influences on endogenic MP levels in *Vitis vinifera* or on influences on MP levels in wine by oenological processes or by contamination from different sources. For further clarification on the biogenesis of MPs, studies using labeled precursors or intermediates have to be developed. For the analysis of the resulting compounds from these fundamental studies, the quantitative (and enantioselective) analytical methods described here are essential.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Literaturübersicht	1
1.1	Einführung zu Alkylmethoxypyrazinen	1
1.1.1	Bedeutung für Lebensmittel	1
1.1.2	Bedeutung für Wein	3
1.1.3	Entstehung und Beeinflussung von Grünnoten in Wein	7
1.1.4	Fehlaromen in Wein durch Alkylmethoxypyrazine	10
1.1.4.1	Marienkäferton als Fehlton in Wein	10
1.1.4.2	Korkton als Fehlton in Wein	13
1.1.5	Behandlungsmittel und -verfahren zur Verringerung der Alkylmethoxypyrazin-Gehalte in Most und Wein	14
1.1.6	Hypothesen zur Biogenese	16
1.1.6.1	Stereochemie des SBMPs	19
1.2	Analyseverfahren für Alkylmethoxypyrazine	21
1.2.1	Probenvorbereitung	21
1.2.2	Alkylmethoxypyrazine als Majorkomponenten	22
1.2.3	Alkylmethoxypyrazine als Minorkomponenten	23
1.2.4	Vorteil multidimensionaler Trenntechniken	26
1.2.4.1	Multidimensionale Gaschromatographie	28
1.2.4.2	Umfassende zweidimensionale Gaschromatographie	29
1.2.5	Enantiodifferenzierung	30
1.2.5.1	Chiralität	30
1.2.5.2	Grundlagen der Enantiomerenanalytik	33
1.2.5.3	Cyclodextrine als chirale Selektoren	34
1.2.5.4	Thermodynamik in der chromatographischen Enantiomeren-trennung	35

1.2.5.5	Kombination von multidimensionalen mit enantioselektiven Trenntechniken	36
1.2.6	Quantifizierung mittels Stabilisotopenverdünnungsassay	39
1.3	Bisherige Arbeiten des Arbeitskreises	41
1.4	Zielsetzung	43
1.4.1	Etablierung von Methoden zur Spurenanalyse von Alkylmethoxy-pyrazinen	43
1.4.2	Enantiodifferenzierung von SBMP	43
1.4.3	Anwendung der analytischen Verfahren in der Praxis	44
2	Ergebnisse und Diskussion	47
2.1	Methodenentwicklung	47
2.1.1	P1: Methodenvergleich SPE//MDGC-MS (SIM) gegenüber SPE//MDGC-MS/MS (SRM)	49
2.1.1.1	Einführung und Methodisches	49
2.1.1.2	Manuskript P1 zum Vergleich zweier MDGC-MS-Methoden	51
2.1.1.3	Diskussion der Unterschiede beider Methoden	70
2.1.2	P2: Optimierung der MDGC bei Quantifizierung mittels SIDA	71
2.1.2.1	Schnittfensterlänge und Isotopeneffekt	71
2.1.2.2	Manuskript P2 zur Optimierung der MDGC	74
2.1.2.3	Vorteile zeitlich kurzer Schnittfenster	83
2.1.2.4	Grenzen der Minimierung von Schnittfensterlängen	84
2.1.3	P3: Enantioselektive multidimensionale und umfassende zweidimensionale Methoden	86
2.1.3.1	Manuskript P3 zu enantioselektiven multidimensionalen GC-Methoden	87
2.1.3.2	Enantiomerenverteilung in SBMP-Referenzsubstanzen	110
2.1.3.3	Methodenvergleich eMDGC-MS (SIM) gegenüber eMDGC-MS/MS (SRM)	111
2.1.3.4	Diskussion der Unterschiede beider Methoden	113
2.1.3.5	Entwicklung einer HS-SPME enantio-GC×GC-MS-Methode	114
2.1.3.6	Optimierung der enantio-GC×GC-Methode	115

2.1.4	P ₄ : eMDGC-MS/MS für die Analyse weiterer Alkylmethoxy-pyrazine	116
2.1.4.1	Manuskript P ₄ zur Charakterisierung und Analytik von Dimethylmethoxy-pyrazinen	117
2.1.4.2	Beschaffung und Charakterisierung der Referenzsubstanzen	138
2.1.4.3	Analysemethode für Dimethylmethoxy-pyrazin-Isomere	139
2.1.4.4	Relevanz eindeutiger chemischer Zuordnung von Isomeren	139
2.2	Analysenergebnisse	141
2.2.1	MP-Gehalte in Gemüse	141
2.2.2	MP-Gehalte in <i>Vitis vinifera</i> Wein	143
2.2.2.1	Weinbauliche Einflüsse	143
2.2.2.2	Oenologische Einflüsse	143
2.2.3	Enantiomerisierung von 2-Methoxy-3-sec-butylpyrazin	144
2.2.3.1	In einer Auswahl an Gemüsesorten	144
2.2.3.2	In zwei Marienkäferspezies	144
2.2.3.3	In <i>Vitis vinifera</i> -Spezies	145
2.2.4	Dimethylmethoxy-pyrazine	145
2.2.4.1	Marienkäfer	145
2.2.4.2	Kork	146
2.2.4.3	Wein	146
3	Zusammenfassung	147
A	Anhang	153
A.1	Posterpräsentation [A1] zu Alkylmethoxy-pyrazin-Gehalten in Gemüse	153
A.2	Van't-Hoff-Plots der Enantiomere des SBMP	155
	Verzeichnisse	157
	Literaturverzeichnis	165
	Lebenslauf	187
	Danksagung	189

1 Einleitung und Literaturübersicht

1.1 Einführung zu Alkylmethoxypyrazinen

Alkylmethoxypyrazine (MPs) leiten sich von der Grundstruktur des Pyrazins ab, einem Sechsring mit zwei gegenüber angeordneten Stickstoff-Heteroatomen (1,4-Diazin, s. Abb. 1.1). Die übrigen vier aromatischen Kohlenstoffatome können mit Alkyl-, Alkoxy-, Acetyl-, Aldehyd- und weiteren Seitengruppen substituiert sein. Aromatische Amine sind sehr schwache Basen¹, die erst in stark saurem Milieu protoniert werden. Substituierte Pyrazine sind in der Natur weit verbreitet und auf Grund ihres charakteristischen Geruchs als Aromastoffe in einer Vielzahl von frischen oder prozessierten Lebensmitteln bekannt. Je nach Substitutionsmuster rufen sie bei uns Menschen verschieden starke und charakteristische Gerüche hervor [1–3].

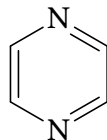


Abbildung 1.1: Strukturformel von Pyrazin (1,4-Diazin)

1.1.1 Bedeutung für Lebensmittel

Bei Lebensmitteln kann man zwei Entstehungsarten der substituierten Pyrazine unterscheiden. In der Natur selbst wird eine große Bandbreite an Pyrazinen über die Biogenese in den entsprechenden Organismen wie etwa Mikroorganismen, Pflanzen und Insekten

¹pK_S-Werte um 1 je nach Substituenten; Pyrazin: 1,22 ± 0,10 bei 25 °C; Methoxypyrazin: 0,53 ± 0,10 bei 25 °C; Berechnungen mittels Advanced Chemistry Development Software V 11.02 (©1994–2016 ACD/Labs) gemäß SciFinder (©2016 American Chemical Society)

gebildet [4]. Hier kommen vor allem enzymatisch katalysierte Bildungswege in Frage, die in Abschnitt 1.1.6, S. 16 kurz behandelt werden.

Ein anderer Weg der Entstehung beruht auf nicht-enzymatischen Prozessen, die bei der Erhitzung von Lebensmitteln (beispielsweise beim Rösten von Nüssen, Kakao und Kaffee, beim Grillen von Fleisch, beim Kochen oder Backen von Kartoffeln [5]) ablaufen. Im Zuge der Maillard-Reaktion (nicht-enzymatische Bräunungsreaktion) entstehen durch Kondensationsreaktionen aus Zuckern und Aminosäuren zahlreiche substituierte Pyrazine, die sich durch Röstaromen auszeichnen [4, 5].

Anzahl, Position und Art der Substituenten wirken sich direkt auf Qualität und Potenz der Aromaeigenschaft aus. Sind beispielsweise zwei Methylgruppen in den Positionen 2 und 5 angeordnet (2,5-Dimethylpyrazin) wird ein erdiger, an rohe Kartoffeln erinnernder Geruch hervorgerufen. Der Geruchsschwellenwert dieser Verbindung ist mit ca. *2 parts per million*, 10^{-6} (ppm) in Wasser relativ hoch. Liegen eine Ethyl- und eine Methoxygruppe benachbart am Pyrazinring vor (2-Ethyl-3-methoxypyrazin) wird zwar eine ähnliche, erdige Geruchsqualität hervorgerufen aber diese Verbindung besitzt einen wesentlich niedrigeren Geruchsschwellenwert von ca. *400 parts per trillion*, 10^{-12} (ppt), in Wasser [3, 5]. Der Geruchsschwellenwert gibt an, ab welcher Konzentration eine Verbindung olfaktorisch wahrgenommen wird und ist neben den chemischen und räumlichen Substanzeigenschaften abhängig von der Matrix, in der die Bestimmung vorgenommen wird.

Stehen eine Methoxy- und eine Alkylgruppe benachbart an der selben Seite der Pyrazin-Struktur, hat dies eine deutliche Minderung der Geruchsschwelle in den ppt-Bereich zur Folge [3]. Drei wichtige Vertreter dieser MPs sind 2-Isobutyl-3-methoxypyrazin (2-(2-Methylpropyl)-3-methoxypyrazin) (IBMP), 2-Isopropyl-3-methoxypyrazin (2-(1-methylethyl)-3-methoxypyrazin) (IPMP) und 2-Methoxy-3-*sec*-butylpyrazin (2-Methoxy-3-(1-methylpropyl)pyrazin) (SBMP) (s. Abb. 1.2), welche u. a. in verschiedenen rohen und gekochten pflanzlichen Lebensmitteln identifiziert worden sind. Sie können mit den Attributen grüne Paprika, Erbse und rohe Kartoffel beschrieben werden [6] und werden als potente Aromastoffe eingestuft, da sie in vielen Matrices in Konzentrationen oberhalb ihrer äußerst niedrigen Geruchsschwellenwerte von 1 bis 2 ppt in Wasser [3, 7, 8] vorliegen. Auf Grund der Vielzahl an Veröffentlichungen zum Vorkommen und zur Relevanz von Methoxypyrazinen in Lebensmitteln sei auf Übersichtsartikel [5, 9] verwiesen.

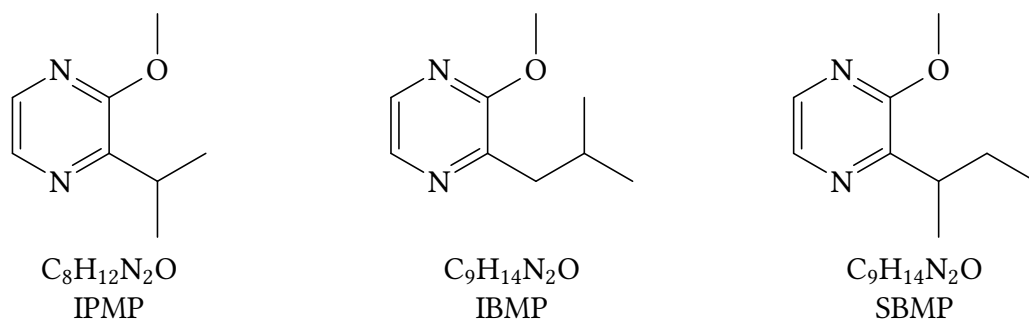


Abbildung 1.2: Struktur- und Summenformeln der drei Alkylmethoxypyrazine IPMP, IBMP und SBMP

1.1.2 Bedeutung für Wein

Wein ist nicht nur ein traditionell hoch geschätztes Genussmittel, sondern er stellt auf Grund seiner Komplexität und seinem stetigen Wandel immer wieder neue Herausforderungen an Weinbauer, Winzer, Oenologen und chemische Analytiker und lässt auch die Verbraucher und Genießer stetig neue Entdeckungen machen. Wein wird durch vollständige oder teilweise alkoholische Gärung von frischen, auch eingemaischten Weintrauben (Früchte der Weinrebe *Vitis vinifera* (*V. vinifera*)) oder von Traubenmost hergestellt. Die üblichen Verfahrensschritte bei der Weinherstellung sind in Abb. 1.3 gezeigt. Für die sensorische Beurteilung von Wein, und damit auch die Entscheidung des Verbrauchers über Akzeptanz oder Ablehnung, spielt vor allem das Aroma eine Rolle. Das flüchtige, geruchlich wahrnehmbare Profil wird am eindrucklichsten durch die mengenmäßig kleinste, aber dennoch vielfältigste Gruppe von Inhaltsstoffen geprägt – die Aromastoffe. Gerade die Mischung und das Zusammenspiel mehrerer hundert dieser flüchtigen Verbindungen aus diversen chemischen Stoffgruppen machen das Weinaroma aus [10–13]. Dabei haben Rebsorte, Lage und Klima, weinbauliche Maßnahmen, Gärungsprozesse und oenologische Behandlungsverfahren, Lagerung und Alterung ihren jeweiligen Einfluss.

Neben qualitativ ähnlichen Geruchsbeiträgen innerhalb bestimmter chemischer Stoffgruppen im Wein (z. B. Monoterpene, die florale Attribute ausmachen, oder Ester, die fruchtige Noten prägen) kommen auch einzelne flüchtige Verbindungen mit hoher aromagebender Potenz vor, zu denen die MPs zählen. Von besonderer Relevanz ist das IBMP, welches als Hauptkomponente der MPs in Weinen wie Sauvignon blanc und Cabernet sauvignon vorkommt [15–17]. Das IBMP vermag es einen vegetativen, „grünen“ Geruch, auch im komplexen Gemisch mit den übrigen Aromastoffen in Wein, hervor zu rufen

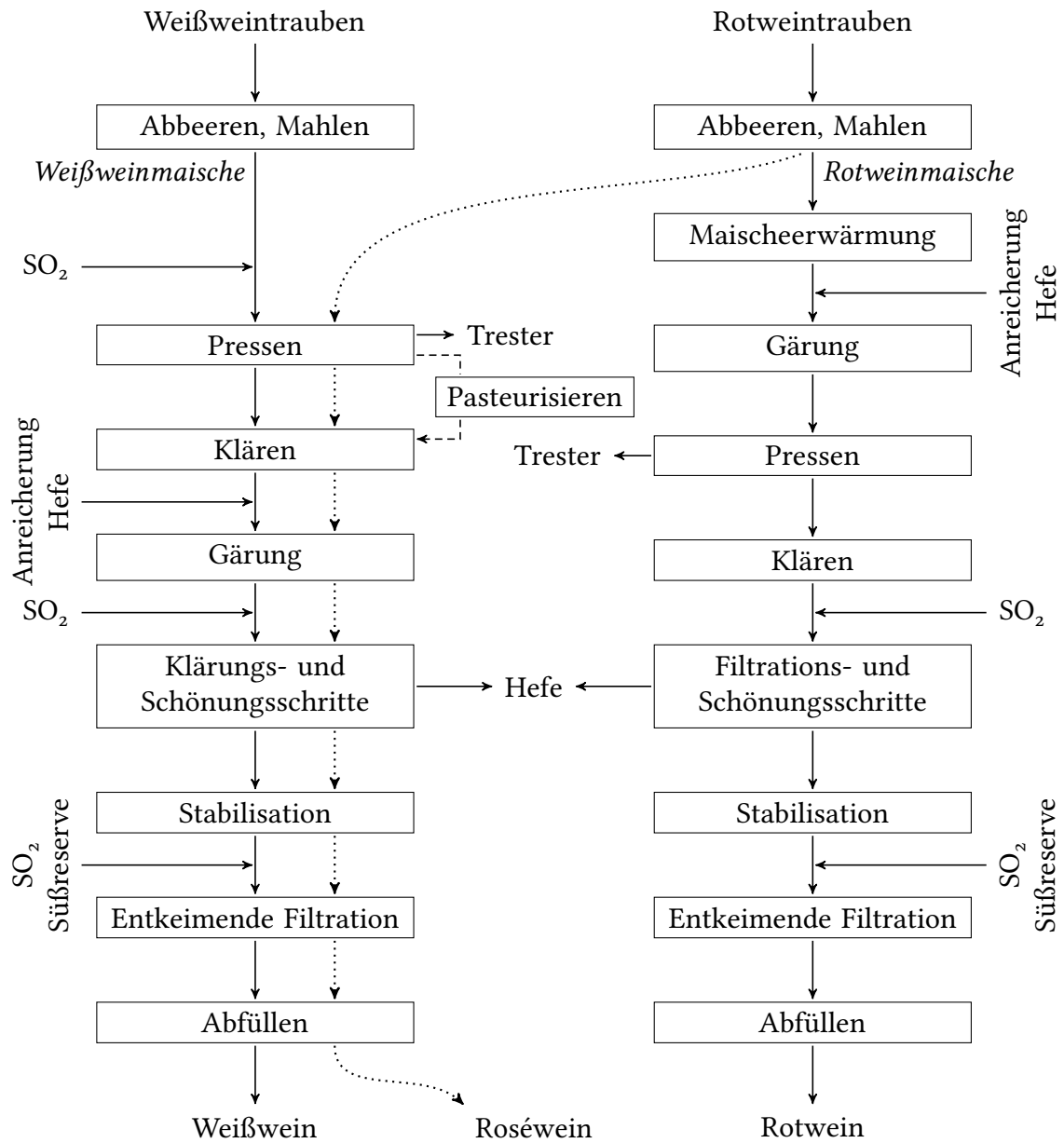


Abbildung 1.3: Überblick über die Verfahrensschritte bei der Weinherstellung, nach [14]

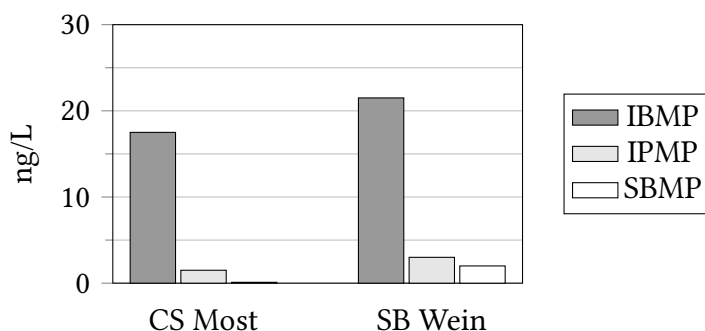


Abbildung 1.4: Konzentration verschiedener Alkylmethoxyppyrazine in Cabernet sauvignon Most (CS Most) und Sauvignon blanc Wein (SB Wein), reproduziert nach [19]

[18]. IPMP kommt in Cabernet sauvignon und Sauvignon blanc mit ca. einem Zehntel der Konzentration von IBMP vor, SBMP mit noch niedrigeren Anteilen (s. Abb. 1.4) [19].

In trockenem Weißwein wurden niedrige Geruchsschwellenwerte von 1 bis 2 ng/L bestimmt (für IBMP und IPMP) und eine erkennbare Grünnote ab 8 ng/L IBMP festgestellt [18]. In Rotwein liegt die Geruchsschwelle des IBMP mit ca. 15 ng/L etwas höher [20]. Die erste quantitative Bestimmung von IBMP in Wein der Sorte Sauvignon blanc ergab eine Konzentration von 35 ppt [21], welche deutlich über der Geruchs- und Erkennungsschwelle liegt. Dieses Beispiel macht deutlich, dass die natürlich vorkommenden Gehalte von bis zu 50 ng/L MPs in bestimmten Weinsorten das Weinaroma entscheidend prägen können. Die durch MPs hervorgerufene Grünnote ist besonders in neuseeländischen oder den sogenannten *cool-climate* Sauvignon blanc Weinen ausgeprägt, was sich durch höhere IBMP-Gehalte erklärt [17, 22, 23]. In diesen Weinen wird – im Gegensatz zu *hot-climate* Sauvignon blanc Weinen mit exotisch fruchtigen Attributen – gerade dieses stark vegetative, an grüne Paprika erinnernde Aroma geschätzt.

Weltweit gehört Sauvignon blanc zu den zehn wichtigsten Rebsorten [24]. In Deutschland ist Sauvignon blanc nicht weit verbreitet (0,8 % der bestockten Rebfläche in 2014, 1,1 % in 2017), aber die Anbaufläche stieg über die letzten Jahre hinweg stetig an (von 581 ha im Jahr 2010 über 849 ha in 2014 auf 1117 ha in 2017) [25, 26]. Im Vergleich dazu betrug im Jahr 2014 die mit Riesling bestockte Rebfläche (die am häufigsten angebaute Rebsorte in Deutschland) ca. 23 400 ha. Der größte Teil der mit Sauvignon blanc bestockten Rebfläche (366 ha in 2014, 457 ha in 2017) befindet sich im Weinanbaugebiet Pfalz [25–27]. Der zunehmende Anbau, der wachsende Bekanntheitsgrad der Sorte und die auf sie gerichtete

sensorische Erwartung (gerade im Vergleich mit ausländischen Weinen) sind Gründe, die Einflussfaktoren auf MP-Gehalte und die Grünnoten auch im hiesigen Klima besser verstehen zu wollen [28–31].

Im Gegensatz zu dem gewünschten, positiv bewerteten Einfluss des IBMP auf das vegetative Aroma kann das Vorhandensein von anderen MPs in ähnlichen Konzentrationsbereichen im Wein zu einem unangenehmen Geruchseindruck führen. In diesem Zusammenhang ist der sogenannte Marienkäferton (engl. *ladybug taint*) zu nennen, der mit verstärktem vegetativen und in Richtung Erdnuss, grüne Paprika, Spargel gehenden Geruch beschrieben wird [32]. Die Ursache dieses Fehltons (engl. *off-flavor*) liegt in der Mitverarbeitung von Marienkäfern bei der Weinherstellung.

Als Hauptursache für den Marienkäferton wird IPMP angesehen [32, 33], welches die Hauptkomponente flüchtiger MPs in den Marienkäferspezies *Harmonia axyridis* (asiatischer Marienkäfer, *multicolored asian lady beetle*) (*H. axyridis*) und *Coccinella septempunctata* (Siebenpunkt Marienkäfer) (*C. septempunctata*) darstellt [34–36]. Neben IPMP, SBMP und IBMP wurde weiterhin ein Dimethylmethoxypyrazin als Fehlton hervorrufende Verbindung aus Marienkäfern diskutiert, das massenspektrometrisch dem 3-Methoxy-2,5-dimethylpyrazin (DMMP) zugeordnet wurde [36, 37] (s. Abb. 1.5). An dieser Stelle soll nicht unerwähnt bleiben, dass IPMP, IBMP und das 2-Methoxy-3,5-dimethylpyrazin (MDMP) (s. Abb. 1.5) auch in Korken vorkommen können (s. Abschnitt 1.1.4.2, S. 13). Über die Verkorkung von Weinflaschen gelangen sie in den Wein und können dort zu einem Fehlton führen (Grünnote; grüne Paprika; staubig/muffig) [38–42].

Ein weiteres, in Trauben und Wein beschriebenes MP ist das 2-Ethyl-3-methoxypyrazin (EtMP) (s. Abb. 1.5). In vielen Studien wurde es meist unterhalb der Bestimmungsgrenzen detektiert (wenige ng/L) [43–45]. Solche geringen Konzentrationen weit unter der Geruchsschwelle von 425 ng/L in Wasser [3] sind organoleptisch nicht ausschlaggebend. In nur wenigen Proben konnten die EtMP-Gehalte überhaupt quantifiziert werden. Hierzu zählen Beerensäfte unterschiedlicher Sorten mit bis zu 20 ng/L EtMP [46]. In vereinzelt Proben wie in einem Cabernet sauvignon Wein wurden Gehalte von über 1000 ng/L EtMP berichtet, ein Konzentrationsbereich in dem ein Aromaeinfluss zu erwarten ist [19].

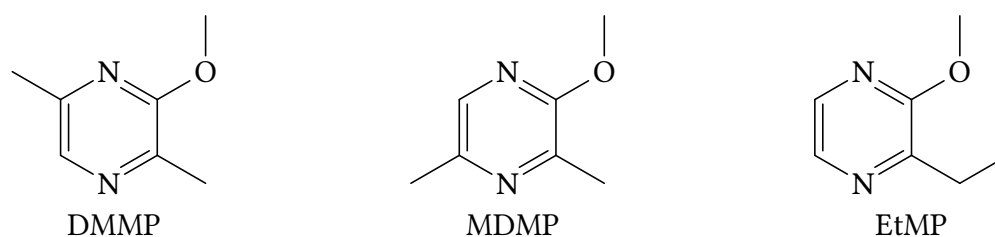


Abbildung 1.5: Strukturformeln der Stellungen- und Strukturisomere DMMP, MDMP und EtMP, alle mit der Summenformel $C_7H_{10}N_2O$

1.1.3 Entstehung und Beeinflussung von Grünnoten in Wein

Obwohl noch nicht genau entschlüsselt, aus welchen Ausgangsverbindungen und in welchen Schritten Alkylmethoxypyrazine in der Natur entstehen, ist es erwiesen, dass sie von *V. vinifera* Spezies selbst gebildet werden. Dabei wird die Endkonzentration von MPs in der Beere und dann im daraus hergestellten Wein durch etliche Faktoren beeinflusst.

Zunächst ist entscheidend, ob MPs in einer Rebsorte in sensorisch relevanten Mengen vorkommen. Bisher waren solche MP-Gehalte beispielsweise in den Sorten Cabernet franc, Cabernet sauvignon, Merlot [16, 47], Sauvignon blanc [21, 47], Sémillon [23, 47, 48] und Carmenere [49, 50] messbar. In manchen Sorten (Spätburgunder, Riesling, Chardonnay) wurden in unreifen Beeren Spuren der MPs (vor allem IBMP) gefunden, die im reifen Stadium aber meist unter den analytischen Nachweisgrenzen lagen [48, 51]. Eine in den verschiedenen Pflanzenteilen unterschiedliche Genexpression der an der Biogenese beteiligten Enzyme (s. Abschnitt 1.1.6) bewirkt, dass die Konzentration der MPs in Stielen, Beerenhaut und Samen wesentlich höher ist als im Fruchtfleisch der Beeren (s. Abb. 1.6) [52]. Der Aufbau der Weinbeere und des Stielgerüsts der Traube ist in Abb. 1.7 schematisch dargestellt.

Neben diesen intrinsischen Faktoren spielen vor allem die Beerenreifung (s. Abb. 1.8) und die klimatischen Einflüsse eine große Rolle. Die MP-Konzentration nimmt im Verlauf des initialen Beerenwachstums (Phase 1 in Abb. 1.8) zu und erreicht ihr Maximum kurz vor der einsetzenden Reifung (*Veraison*, zu erkennen am beginnenden Weichwerden und der Farbänderung der Beeren, Phase 2 in Abb. 1.8). Während der Beerenreifung (Phase 3) nimmt die Konzentration der MPs stark ab [17]. Der Konzentrationsverlauf der 2-Hydroxy-3-alkylpyrazine (HPs), welche nicht nur als Vorläufer, sondern auch als

1 Einleitung und Literaturübersicht

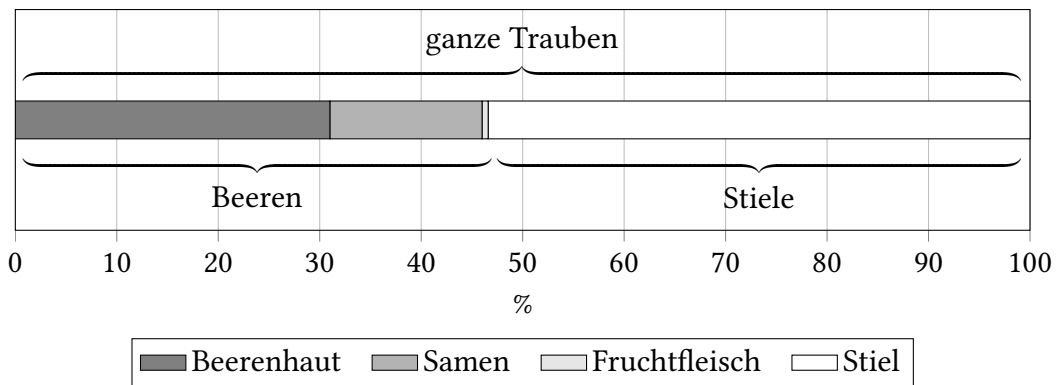


Abbildung 1.6: IBMP-Verteilung in Cabernet sauvignon (reproduziert nach [52])

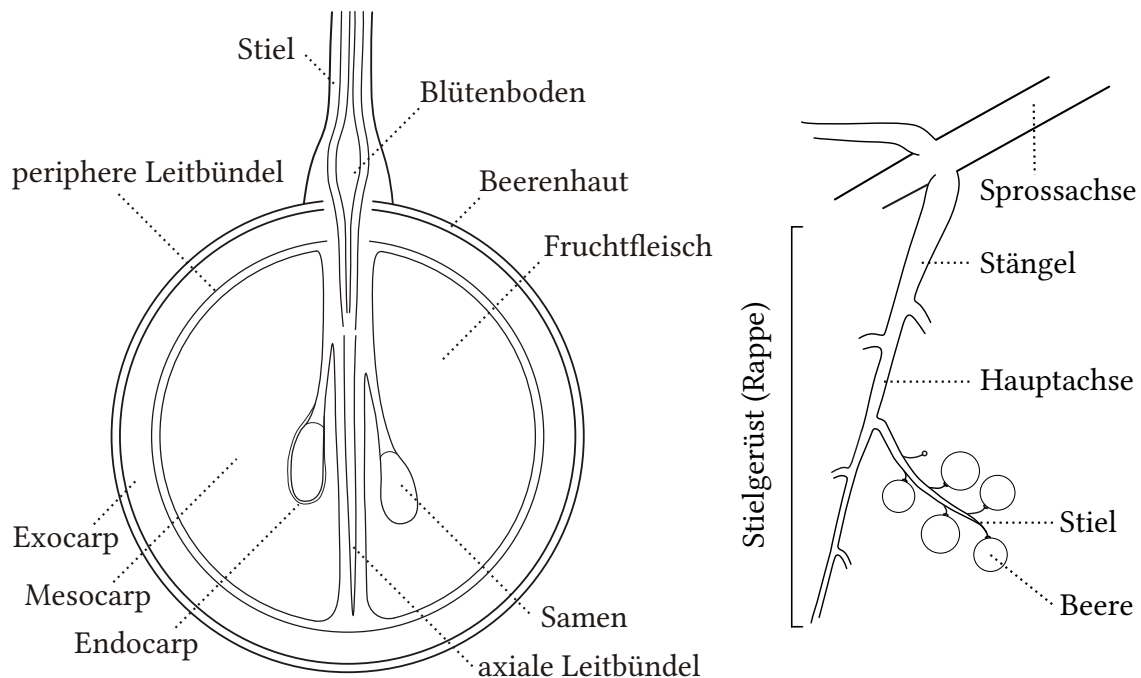


Abbildung 1.7: Querschnitt der Weinbeere (links) und Stielgerüst der Weintraube (rechts), schematisch (beide nach [53])

Abbauprodukte der MPs angesehen werden, zeigt im Reifeverlauf erst einen Anstieg [51] gefolgt von einem Abfall abhängig von der Rebsorte [54].

Es konnte gezeigt werden, dass höhere mittlere Temperaturen sowie Lichteinstrahlung vor der *Veraison* zu einer Anhäufung von MPs zum Zeitpunkt der *Veraison* führen. Wirken die beiden gleichen Faktoren nach der *Veraison* ein, kommt es zu einem stärkeren Abbau der MPs [48, 55]. Andere Studien zeigen, dass Lichtintensität vor der *Veraison* bereits

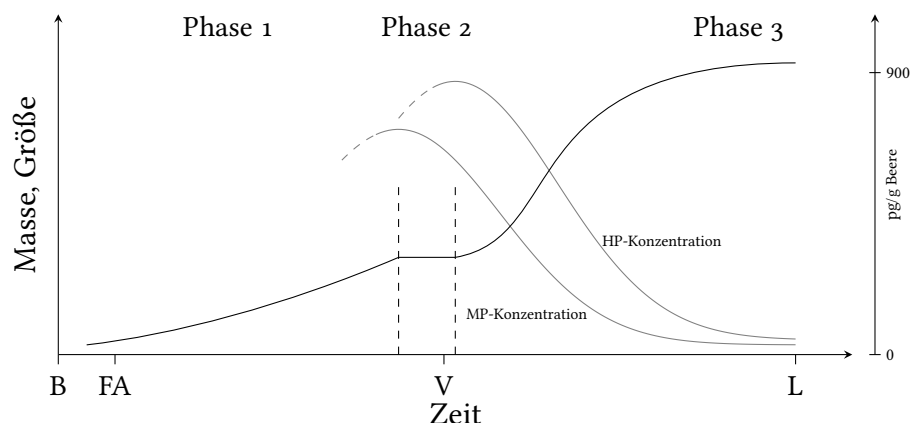


Abbildung 1.8: Größe (Masse) der Weinbeere in Abhängigkeit der Zeit mit Angabe der Entwicklungsstadien, B: Blüte; FA: Fruchtansatz; V: *Veraison*; L: Lese (nach [53]), sowie ungefähre Konzentrationsverläufe von IBMP und IBHP am Beispiel von California Merlot (nach [54])

Einflüsse auf die MP-Konzentration haben und die Weichen für die Abnahme der MPs über den Reifeverlauf stellen [56, 57]. Desweiteren sind Einflüsse, die mit der Wüchsigkeit der Rebe und der Wasserverfügbarkeit zusammenhängen, mit höheren MP-Gehalten korreliert worden [13, 55, 58].

Weiterhin führt eine frühe Entblätterung der Traubenzone (vor der *Veraison*) zu einer stärkeren Minderung von IBMP als eine Entblätterung im späteren Reifeverlauf. Auch ein hoher Grad der Entblätterung begünstigt den Abbau von IBMP in den Beeren [59]. Künstliche Beschattung hat, ähnlich wie die natürliche durch Belassen der Laubwand in der Traubenzone, höhere verbleibende IBMP-Gehalte zur Folge [60].

Neben diesen mikroklimatischen Veränderungen innerhalb von Parzellen ist das Klima einer gesamten Region ein noch größerer Einflussfaktor. In kälteren Regionen, die häufig auch geringere Sonneneinstrahlung aufweisen, verbleiben in den Beeren zum Zeitpunkt der Lese höhere MP-Gehalte als in warmen Regionen [17, 22, 60]. Auf die höheren MP-Gehalte in den Weinen aus kälteren Regionen ist die Namensgebung *cool-climate* Aromatik (vor allem im Zusammenhang mit Sauvignon blanc) zurückzuführen.

Nicht zuletzt bieten auch weinbauliche und oenologische Maßnahmen einen Gestaltungsspielraum für die Ausprägung von Grünnoten, allerdings nur so weit, wie es die MP-Gehalte im gelesenen Traubenmaterial maximal zulassen. Dazu gehört beispiels-

weise die „gestaffelte Lese“, durch die bewusst unreifere Trauben in das Gesamtlesegut integriert werden. Eine Steigerung der MPs im Most kann selbst im Weinkeller noch durch eine gezielte Extraktion aus den Beerenschalen, realisierbar durch die Variation der Kontaktzeit des Mostes mit diesen [61], erreicht werden. Auf Grund der Vielzahl an Veröffentlichungen zum Thema Methoxy-pyrazine und Grünnoten in Weinbeeren, Wein und weiteren Lebensmitteln sei auf Übersichtsartikel [5, 9, 19, 62, 63] verwiesen.

1.1.4 Fehleraromen in Wein durch Alkylmethoxy-pyrazine

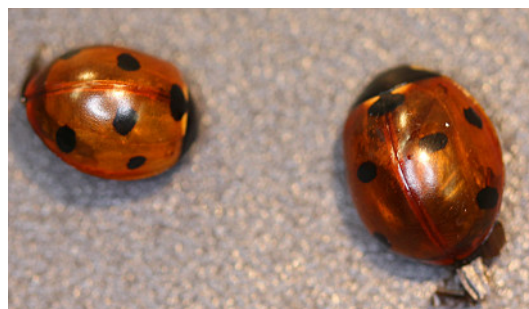
Während IBMP in einem Konzentrationsbereich von 5 bis 10 ng/L eine angenehme Grünnote in Sauvignon blanc Wein hervorruft [64], kann eine Verschiebung über diese Konzentration hinaus oder die Kombination mit anderen MPs ein unangenehmes Aroma erzeugen. Eine solche Situation kann durch verschiedene externe Faktoren entstehen und Weine aller Rebsorten betreffen.

1.1.4.1 Marienkäferaroma als Fehleraroma in Wein

Wie in Abschnitt 1.1.2 angedeutet, können die beiden Marienkäferspezies *H. axyridis* und *C. septempunctata* (s. Abb. 1.9) bei der Mitverarbeitung während der Weinherstellung Alkylmethoxy-pyrazine in solchen Konzentrationen abgeben, dass diese als Fehleraroma, den Marienkäferaroma, im Wein erkennbar werden.

Ursprünglich heimisch im asiatischen Raum wurde *H. axyridis* zur biologischen Schädlingsbekämpfung bei Nutzpflanzen (z. B. Soja, Pekan, Mais [65, 66]) in den USA eingeführt und ist seit Mitte der 90er Jahre fast flächendeckend vom mittleren Westen bis in den Osten der USA sowie in Teilen Kanadas verbreitet [67]. Das Vorkommen dieser Spezies wurde um 2000 außerdem in Südamerika und Europa verzeichnet [65].

Nach der Ernte der Nutzpflanzen und bei fallenden Temperaturen suchen sich Marienkäfer teils in großen Ansammlungen geschützte Orte für ihre Überwinterung [68]. Diese können natürliche Rückzugsmöglichkeiten wie Felsspalten sein, aber auch Häuserfassaden oder Weinberge. In letzteren finden sie in Form von reifen, ggf. mit Pilz befallenen Weinbeeren [65, 69] zusätzlich eine Nahrungsquelle zur Vorbereitung auf die Überwinterung. Gelangen die Käfer bei der Weinlese nun in das Lesegut, kann es

*H. axyridis**C. septempunctata*Abbildung 1.9: Die Marienkäferspezies *Harmonia axyridis* und *Coccinella septempunctata*

in der folgenden Herstellung zur Ausprägung eines unangenehmen Fehltons führen. In besonderem Ausmaß wurde die kanadische und amerikanische Weinwirtschaft im Jahr 2001 getroffen, als eine regelrechte Plage von *H. axyridis* zu einem erheblichen Anteil an produzierten Weinen mit Fehlton führte [67].

Ursache für den Marienkäfer-ton sind die geruchsaktiven Verbindungen, die in der Hämolymphe – der blutähnlichen Körperflüssigkeit von Insekten – vorliegen. Die Hämolymphe dient außer als Transportmittel für Nährstoffe und Stoffwechselprodukte auch der Abschreckung und chemischen Abwehr von (Fress-)feinden. Dazu enthält sie Alkaloide, antibiotisch wirksamen Substanzen und Aromastoffe [70], darunter MPs [71]. Das bedrohte Insekt sondert einen Teil der Hämolymphe durch aktives Auspressen (engl. *autohaemorrhage* oder *reflex bleeding*) ab [70–72]. Dies findet an bestimmten Stellen des Exoskeletts statt, beispielsweise an Gelenken der Extremitäten, an den Rändern von Flügeldecken und der Oberseite der Vorderbrust [73].

Entscheidend für die Erzeugung eines Fehltons durch Käfer während der Weinherstellung ist das Aufkommen der Käfer in den Trauben während der Lese. Kögel *et al.* konnten zeigen, dass bei *H. axyridis* bereits 3 bis 6 Käfer pro kg Lesegut ausreichen, um im daraus hergestellten Weiß- oder Rotwein das spezifische Fehleroma zu erzeugen [74]. Diese Ergebnisse bestätigten sich in weiteren, verschiedene Rebsorten umfassenden Studien [75–77].

IPMP ist das durch *H. axyridis* und *C. septempunctata* am stärksten in seiner Konzentration angehobene MP in betroffenem Wein [37, 78] und korreliert mit den typischen Geruchsattributen wie erdig/modrig/Erdnuss und grünes Gemüse/krautig, die mit dem Fehleroma in Verbindung gebracht werden [32, 33, 79]. Dieser Eintrag ist zurückzuführen auf die Gehalte und Verteilungsmuster von IPMP, SBMP und IBMP in beiden Marienkäferarten. IPMP ist in beiden Spezies die Major Komponente und wird im Vergleich zu den anderen MPs in Käfern selbst oder in den von ihnen beeinflussten Weinen am häufigsten detektiert. So konnten Kögel *et al.* in allen gaschromatographisch analysierten Extrakten von Marienkäfern beider Spezies IPMP nachweisen, aber nur in 36 bzw. 87 % der Fälle SBMP und 60 bzw. 30 % der Fälle IBMP (*C. septempunctata* jeweils vor *H. axyridis* genannt) [34]. Botezatu *et al.* analysierten die Veränderung der MP-Gehalte in gezielt mit Käfern hergestellten Weinen [37]. Sie fanden in rotem und weißem Wein im Vergleich zur Kontrolle eine Steigerung der IPMP-Gehalte durch beide Spezies. Außerdem wurden SBMP-Gehalte stärker durch *H. axyridis* angehoben, IBMP-Gehalte dagegen wurden nur durch *C. septempunctata* signifikant erhöht. Cai *et al.* analysierten *H. axyridis* direkt und fanden MP-Gehalte von unter 1 bis 29 ng/g Käfer IPMP, 0,3 bis 7 ng/g SBMP und von unter 0,01 bis 0,02 ng/g IBMP. Orangene *H. axyridis* enthielten dabei wesentlich höhere MP-Gehalte als gelbe [36]. Cudjoe *et al.* analysierten drei Käferarten im Vergleich und fanden in einer weiteren Art, *Hippodemia convergens*, höhere Gehalte als in *H. axyridis* und nur ca. ein Hundertstel dieses IPMP-Gehalts in *C. septempunctata* [35]. Dieser enorme Unterschied zwischen *H. axyridis* und *C. septempunctata* wurde in den zuvor genannten Arbeiten nicht beobachtet und könnte auf der Verwendung von aufgetauten, ehemals für den Leser unbekanntem Zeit eingefrorenen Käfern beruhen [34]. Studien von Pickering *et al.* deuteten darauf hin, dass *H. axyridis* bereits drei Tage *post mortem*, im Gegensatz zu lebendigen Käfern, bei der Herstellung von Rotwein keinen Marienkäferaroma mehr hervorruft [79]. Eine Erklärung ist, dass tote Käfer keine Hämolymphe mehr aktiv absondern können und die darin enthaltenen MPs lediglich durch den Pressvorgang oder eine Extraktion in den Most oder die Maische übergehen [79]. Denkbar ist auch die Abdampfung der MPs sowie der übrigen flüchtigen Stoffe aus der Hämolymphe *post mortem*.

Neben den drei besprochenen Vertretern der MPs wurde in beiden Marienkäferspezies auch das Vorkommen eines Dimethylmethoxy-pyrazins (vgl. Abb. 1.5, S. 7) berichtet. Zunächst ordnete man dieses MP aus *H. axyridis* anhand eines massenspektrometrischen Ab-

gleichs mit Datenbankeinträgen vorläufig dem 3-Methoxy-2,5-dimethylpyrazin (DMMP) zu [36]. Das Vorkommen derselben Verbindung wurde später von einer anderen Gruppe sowohl in unbehandelten Weinen, als auch in mit *H. axyridis* und *C. septempunctata* hergestellten Rot- und Weißweinen beschrieben [37].

1.1.4.2 Korkton als Fehlton in Wein

Kork dient seit über 2000 Jahren als Verschlussmaterial ([80]; gilt auch für die folgende Zusammenfassung). Bereits die Griechen und Römer verwendeten ihn als Stopfen für Amphoren. Der Bedarf an Kork sank mit dem Niedergang des Römischen Reiches ab, aber stieg ab Mitte des 17. Jahrhunderts wieder an, weil er als Verschluss für die nun industriell hergestellten Glasflaschen zum Einsatz kam.

Kork ist ein pflanzliches Gewebe, welches das Kambium (Zellbildungsgewebe) in die äußere Rindenschicht der Korkeiche *Quercus suber* bildet. Diese Art wächst in einer schmalen Region im westlichen Mittelmeerraum, wobei die größten kommerziellen Anbauflächen in Portugal liegen. Alle neun Jahre kann die nachgewachsene Korkschiebe geerntet werden. Zur Weiterverarbeitung werden die Platten zunächst gekocht um sie aufzuweichen und zu verformen (Glättung). Bei der anschließenden Lagerung dehydriert der Kork wieder, phenolische Inhaltsstoffe oxidieren und oft bildet sich auf der Oberfläche Schimmelpilzbewuchs aus. Nach erneutem Kochen und Trocknen wird die äußere härtere Schicht entfernt und das verbleibende Material weiter verarbeitet (Stanzen, Bleichen, Trocknen, Lagern, Beschichten).

Auf Grund der physicochemischen Eigenschaften eignet sich Kork sehr gut als Flaschenverschluss. Hierzu gehören die Komprimierbarkeit, Elastizität, chemische Inertheit, Undurchlässigkeit gegenüber Flüssigkeiten und ein hoher Reibungskoeffizient. Kork ist aber auch gasdurchlässig (dies kann zu Weinalterung durch Sauerstoff führen) und vermag auf Grund seiner Hydrophobizität apolare flüchtige Verbindungen zu adsorbieren. Besonders während der Lagerung ist es daher wichtig, das Material vor Pilzbefall und damit einhergehender Geruchsbildung zu schützen (in dem beispielsweise der Wassergehalt gering gehalten wird) und die Kontamination mit geruchsaktiven Stoffen aus der Umwelt zu vermeiden. Als Leitsubstanz für den klassischen Korkfehlton gilt das durch Mikroorganismen im und auf dem Kork selbst gebildete 2,4,6-Trichloranisol. Dieses stammt aus der *O*-Methylierung des chlorierten Phenols, welches durch das früher

übliche Bleichen mit chlorhaltigen Mitteln im Korken entstand. Heute wird der Chloreintrag in der Korkproduktion so gut wie möglich vermieden, was die Bildung von TCA im Kork selbst verringert, aber die nachträgliche Kontamination mit Geruchsstoffen oder die mikrobielle Bildung anderer muffiger Fehltöne nicht verhindern kann [80].

Aufgrund der oben genannten Eigenschaften kann demnach auch Kork eine weitere Quelle für Fehleraromen im Wein sein. Neben den etablierten, typischen Verbindungen wie 2,4,6-Trichloranisol, Geosmin, 2-Methylisoborneol und 1-Octen-3-ol können auch IPMP, IBMP und MDMP aus Kork in Wein gelangen. Das letztgenannte MDMP beispielsweise ist aus Kork mit „pilzig muffigem“ Geruch extrahiert, identifiziert und mit mikrobiellem Befall von Kork in Verbindung gebracht worden [39, 40]. Als Quellen für MDMP aus Kork gelten unterschiedliche Bakterien (besonders *Pseudomonas* und *Actinobacteria* Spezies), Hefen und Pilze [81, 82].

Die Erklärung eines auf IPMP und IBMP beruhenden Korktons wird dadurch erschwert, dass einige *V. vinifera* Spezies diese Substanzen selbst bilden. In geringen Konzentrationen leisten die MPs einen Beitrag zu einem angenehmen Aroma des Weines. Erst eine Erhöhung der Konzentration führt durch Unterdrückung fruchtiger Noten zum Entstehen eines Fehleraromas [83].

Allen *et al.* schlossen aus der Verschiebung der natürlichen Verhältnisse zwischen IBMP und IPMP zu Gunsten des IPMP auf einen Eintrag durch eine externe Quelle wie beispielsweise Kork. Auch hier ging man von der Bildung der MPs in Kork durch Mikroorganismen aus [84].

Zur weiteren Untersuchung der Thematik wurden Methoden zur Multikomponentenanalyse für *off-flavors* in Wein oder verwandten Matrices entwickelt, die hier nicht näher erläutert werden sollen [38, 85]. Für weitere Einblicke in die Probleme mit Kork sei an dieser Stelle auf Übersichtsartikel [86–88] verwiesen.

1.1.5 Behandlungsmittel und -verfahren zur Verringerung der Alkylmethoxypyrazin-Gehalte in Most und Wein

Gelangt eine sensorisch unangenehm hohe Konzentration von MPs in den Wein (z. B. durch unreifes Lesegut, Marienkäfer oder Kork), kann durch die üblichen Schönungs-

und Behandlungsmittel mangels Selektivität keine Verringerung ohne den Verlust anderer wertgebender Aromastoffe erzielt werden. So kann der Einsatz von Aktivkohle im Weinstadium zwar zur Minderung von MP-Gehalten dienen, allerdings entzieht diese auch weitere Aromastoffe [89].

Auf Grund der chemischen Stabilität der MPs blieben Bestrahlungsversuche (ultraviolettes oder sichtbares Licht) zur Verringerung der MP-Gehalte in Wein unwirksam [89]. Auch die Lagerung unter Licht- und Temperatureinfluss ergab keine nennenswerten Abnahmen der MP-Gehalte in Wein [90].

Da die MPs in der Beere gebildet werden und vor der Gärung im Most frei vorliegen oder in diesen eingebracht werden (z. B. durch Marienkäfer), kann die Zugabe von Silikon-schlauchstücken im Moststadium einen erheblichen Teil der MPs absorbieren und damit dem Most entziehen, ohne die in der folgenden Gärung entstehenden wertgebenden Aromastoffe zu beeinträchtigen [91]. Dieser Ansatz böte sich für Weine an, deren Charakter nicht auf den primären Traubenaromen beruht, da diese ebenfalls im Most frei vorliegen und durch das Silikonmaterial entzogen werden können. An dieser Stelle ist jedoch anzumerken, dass der Einsatz von Silikon zur Absorption unerwünschter Geruchsstoffe nicht als oenologisches Behandlungsmittel oder -verfahren durch die europäische und internationale Gesetzgebung zugelassen ist [92–94]. Wie für alle Lebensmittelkontaktmaterialien gelten auch für Materialien in der Weinerzeugung strenge Auflagen. Dazu gehört, dass diese keine organoleptische Veränderung im prozessierten Produkt bewirken sollen, was beim Einsatz von Silikon zum Entfernen von Aromastoffen gerade das Ziel ist.

Die beste Strategie Weinefehler zu beheben ist, die Ursache des Fehlers abzustellen oder zu minimieren. Im Falle zu stark ausgeprägter Grünnoten auf Basis der MPs ist die Vermeidung eines übermäßigen MP-Eintrags (z. B. durch die Wahl des Lesezeitpunktes, die Auswahl des Leseguts) die wirksamste und effektivste Präventionsmaßnahme gegen „grüne“ Fehleraromen. Als letzte Maßnahme zur Minderung von Grünnoten kann man gezielt mit MP-armen Weinen verschneiden.

1.1.6 Hypothesen zur Biogenese

Die Biogenese der MPs ist bis heute nicht vollständig aufgeklärt [4, 95–97]. In Analogie zum 1949 erstmals von Jones beschriebenen synthetischen Verfahren [98] wurde die Kondensation von Glyoxal mit einem Aminosäureamid auch als Biogeneseweg vorgeschlagen (s. Abb. 1.10, Substituenten 'R' in Tabelle 1.1) [8, 95]. Nursten und Sheen zweifelten diesen Weg an, da es keinen Anhaltspunkt für die Amidierung von Aminosäuren an der α -Carboxylgruppe gibt und es noch keinen Hinweis auf das Vorhandensein von Glyoxal in Pflanzenmaterial gab [99]. Statt Glyoxal ist die Beteiligung von Glyoxylsäure denkbar, die im intermediären Pflanzenstoffwechsel vorkommt. Die Zugabe von Glyoxylsäure hat in Fütterungsstudien von Bakterienkulturen keine Veränderung der MP-Bildung bewirkt [100, 101], was daran liegen kann, dass sie nicht von diesen Bakterien genutzt werden konnte [101].

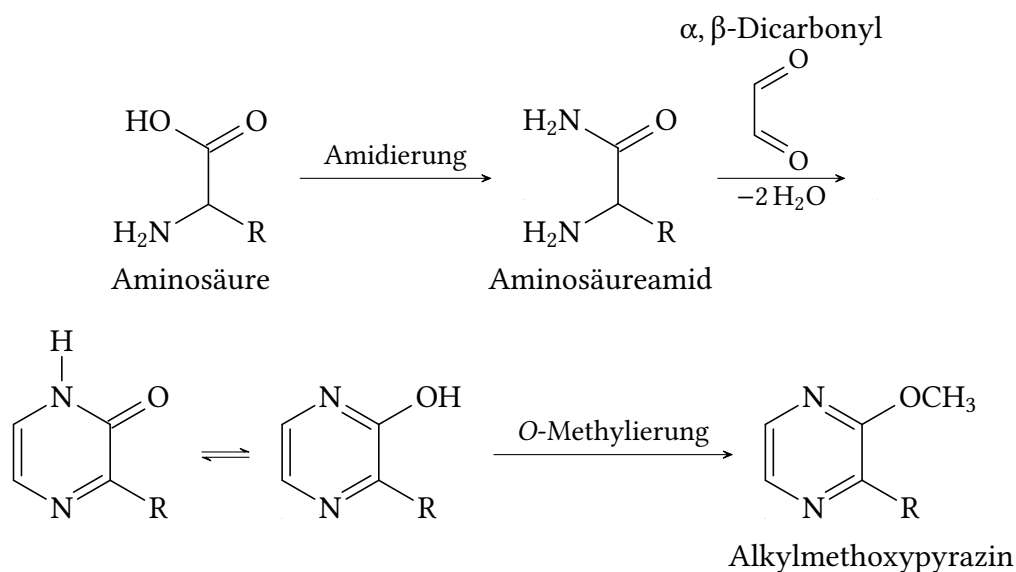


Abbildung 1.10: Bildung von Alkylmethoxypyrazinen durch Kondensation eines Aminosäureamids mit Glyoxal als α, β -Dicarbonyl (nach [8, 95])

Eine weitere Hypothese geht von der Kondensation zweier Aminosäuren zu 2,5-Dioxo-piperazin als Ausgangsschritt zur Generierung der Pyrazinstruktur aus (s. Abb. 1.11, Substituenten 'R' in Tabelle 1.1) [4, 95, 100].

Den Einbau zumindest einer Aminosäure (z. B. Valin bei der Biosynthese von IPMP [101]) bestätigten die meist in Bakterienkolonien durchgeführten Markierungsstudien.

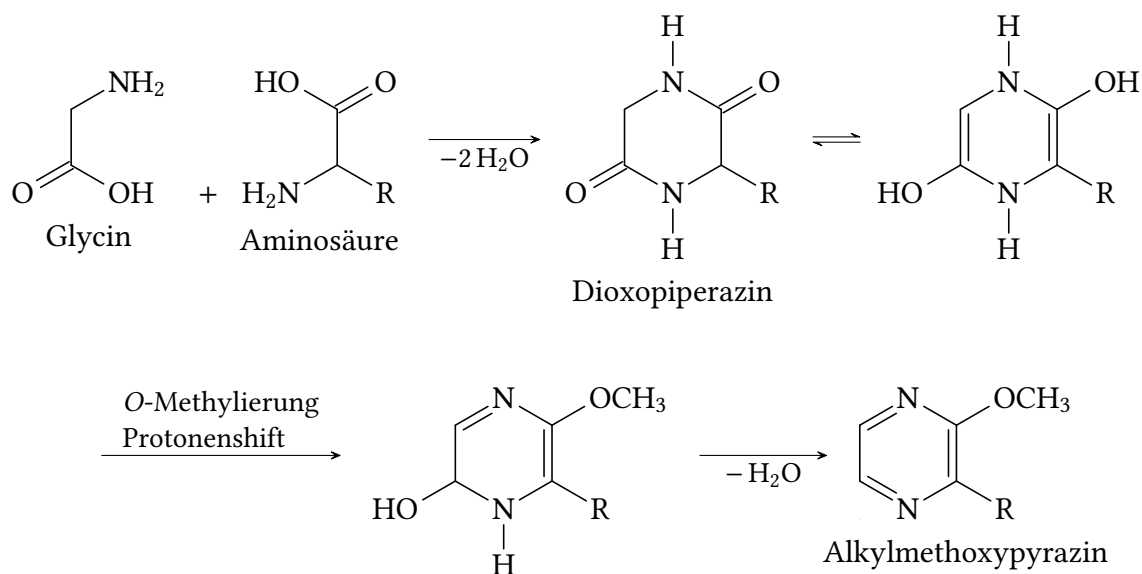


Abbildung 1.11: Bildung von Alkylmethoxypyrazinen durch Kondensation zweier Aminosäuren (nach [4, 95, 100])

Tabelle 1.1: Zuordnung der Substituenten 'R' zu Aminosäuren und den resultierenden Alkylmethoxypyrazinen (Produkte)

Rest 'R'	Aminosäure	Produkt
$-\text{CH}(-\text{CH}_3)_2$	Valin	IPMP
$-\text{CH}_2-\text{CH}(-\text{CH}_3)_2$	Leucin	IBMP
$-\text{CH}(-\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_3$	Isoleucin	SBMP

Hierbei wurden auch Fragen nach den weiteren Reaktionspartnern aufgeworfen [4, 101]. Die Markierungsstudien deuteten auf den Einbau von Stoffwechselprodukten der Brenztraubensäure (Pyruvat) hin (Abb. 1.12). Aus zwei Molekülen Brenztraubensäure wird enzymatisch das Acetolactat gebildet, welches eine Vorstufe von Valin ist und in dieser Form in die Biosynthese von MPs eingehen könnte. Ein anderer Stoffwechselweg führt von Acetolactat über eine Decarboxylierung zum Acetoin (3-Hydroxybutanon) [4].

Acetoin sowie weitere Homologe werden enzymatisch zu α -Amino-Ketonen transaminiert und oxidiert. Es wurde gezeigt, dass nach dieser Umsetzung zwei Moleküle durch Kondensation und Oxidation zur Ringausbildung von Alkylpyrazinen führen [102] (s. Abb. 1.13). Diese beiden Schritte sind prinzipiell auch ohne enzymatische Katalyse möglich [4].

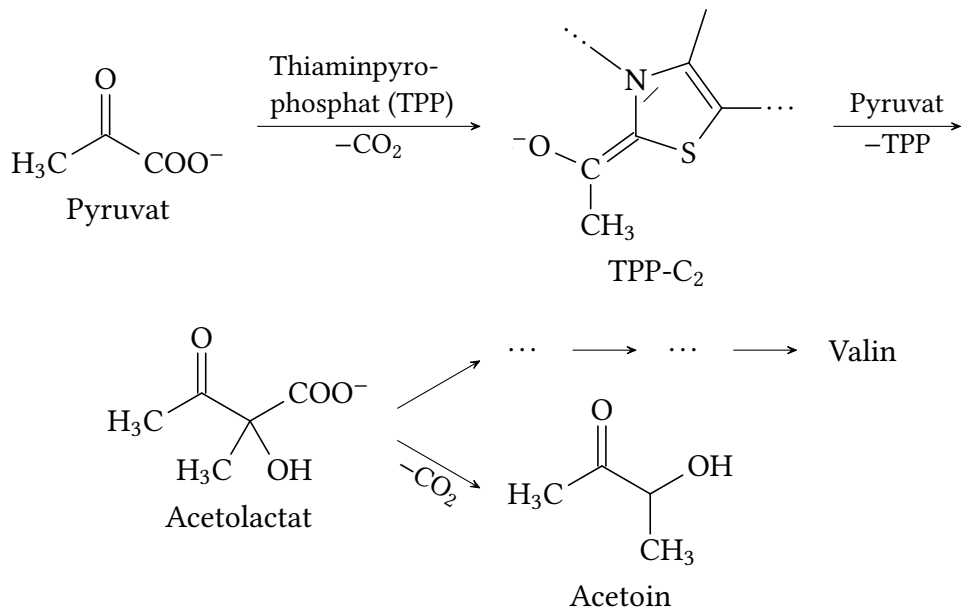


Abbildung 1.12: Bildung von Acetoin aus Pyruvat über die Acetolactat-Synthase (nach [4])

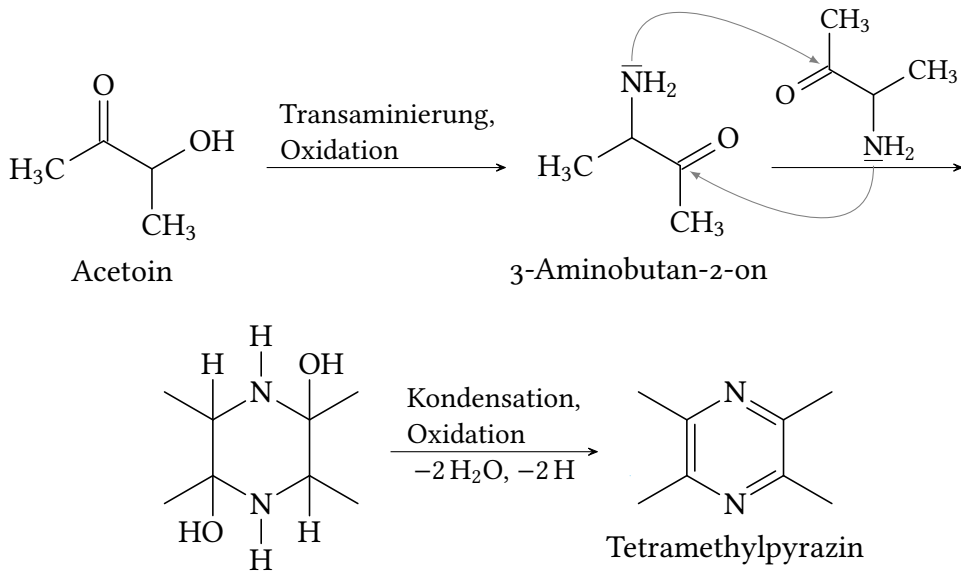


Abbildung 1.13: Bildung von Tetramethylpyrazin aus Acetoin (nach [4])

Ausgehend von der Hypothese, dass zwei Aminosäuren kondensieren (vgl. Abb. 1.11), wurden in weiteren Fütterungsstudien an Myxobakterien die postulierten Zwischenprodukte der cyclischen Dipeptide eingesetzt [96]. Hierbei zeigte sich, dass entgegen der Annahme lediglich eine Aminosäureeinheit in das Pyrazin eingebaut wird. Folglich

stellen die cyclischen Dipeptide keine direkte Vorstufe der Pyrazine dar. Stattdessen deutet dieses Ergebnis an, dass das Dipeptid gespalten, die resultierenden Aminosäuren z. B. zu instabilen Aldehyden reduziert werden und in dieser aktivierten Form mit anderen Reaktionspartnern reagieren und dimerisieren könnten [96].

Während alle vorgenannten Studien in Kulturen verschiedener Mikroorganismen (*Pseudomonas perolens*, *Pseudomonas tetrolens*, *Corynebacterium glutamicum*, *Halomonas venusta* etc.) durchgeführt wurden um möglichst einfache biologische Systeme hinsichtlich der ersten Biogeneseschritte zu analysieren, wurde der postulierte letzte Schritt, die Methylierung einer Hydroxygruppe am Pyrazinring, in *V. vinifera* direkt untersucht.

Dieser Schritt wurde durch die Identifizierung eines *S*-Adenosyl-L-methionin (SAM) abhängigen Enzyms für die *O*-Methylierung von 2-Hydroxy-3-alkylpyrazinen (HPs) in *Vitis vinifera* Beeren aufgeklärt (*O*-Methyltransferase (OMT)) [103, 104]. Später wurde die genetische Grundlage untersucht und verschiedene OMT-Gene identifiziert (*V. vinifera* OMTs, VvOMTs), die zu einer verschieden stark ausgeprägten katalytischen Aktivität gegenüber HPs führen [105, 106]. Der Zeitpunkt der Genexpression von VvOMTs korreliert mit dem Anstieg der MP-Konzentration in der Frucht [105]. Unterschiede in der katalytischen Aktivität der verschiedenen Enzyme sowie unterschiedliche Orte der Expression könnten erklären, warum es verschiedene MP-Muster innerhalb von Pflanzenteilen und unterschiedliche Verteilung z. B. zwischen Beeren und Wurzeln gibt. Bestimmte VvOMTs werden in manchen *V. vinifera* Sorten gar nicht exprimiert, wie an Pinot-Sorten gezeigt. Dies verdeutlicht, dass MPs nicht das Aroma aller *V. vinifera* Sorten prägen [107].

1.1.6.1 Stereochemie des SBMPs

Im Falle des SBMPs befindet sich im Alkylrest an der Methylverzweigungsstelle ein chirales Zentrum. Es existieren daher zwei mögliche Enantiomere, die sich wie Bild und Spiegelbild zueinander verhalten, (*R*)- und (*S*)-SBMP (s. Abb. 1.14).

Die Stereochemie der *sec*-Butyl-Gruppe im SBMP aus natürlichen Quellen wurde bisher lediglich in zwei Studien thematisiert. Mihara *et al.* extrahierten SBMP aus Galbanumöl und zeigten mittels ¹H-NMR-Spektroskopie nach vorangegangener Oxidation und mit chiralen Lanthaniden-Verschiebungsreagentien, dass die *sec*-Butylgruppe zu 100 % *S*-konfiguriert ist [108, 109]. Bungert *et al.* beschrieben die Enantiodifferenzierung von



Abbildung 1.14: Strukturformeln der Enantiomere des SBMP

SBMP aus dem marinen Bakterium *Halomonas venusta* mittels enantio-GC-MS und fanden ebenfalls eine *S*-Konfiguration in der Seitenkette [100, 110].

Entsprechend der Hypothesen, dass Aminosäuren in die Biogenese von MPs eingehen, stellt die *S*-Konfiguration der Seitenkette von SBMP eine Bestätigung dafür dar, dass das natürlich vorkommende L-Isoleucin mit gleicher Konfiguration in der Seitenkette Ausgangsmaterial ist und dass die Konfiguration im Verlauf der Biogenese nicht invertiert.

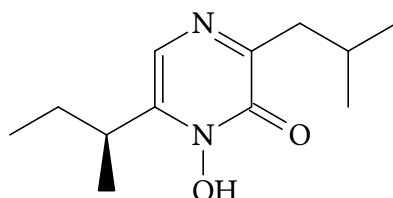


Abbildung 1.15: Strukturformel der Aspergillsäure mit N-Hydroxypyrazinon als Stammgerüst

Weiterhin wurde in einer Arbeit von MacDonald ein strukturell den MPs ähnliches N-Hydroxypyrazinon, die antibiotisch wirksame Aspergillsäure (s. Abb. 1.15) aus *Aspergillus flavus*, chemisch gespalten. Dies lieferte die Spaltungsprodukte D/L-Leucin und die in Abb. 1.16 gezeigten Diastereomere L-Isoleucin ((2*S*,3*S*)-2-Amino-3-methylpentansäure) und D-allo-Isoleucin ((2*R*,3*S*)-2-Amino-3-methylpentansäure). Da in den beiden letztgenannten Spaltungsprodukten die Stereochemie in der *sec*-Butyl-Seitenkette gleich ist (*S*-Konfiguration), schloss man, dass diese Konfiguration auch in der Aspergillsäure vorliegt [111].



Abbildung 1.16: Strukturformeln der Diastereomere L-Isoleucin und D-allo-Isoleucin

1.2 Analyseverfahren für Alkylmethoxy-pyrazine

Die meisten analytischen Methoden beruhen wegen der physikalisch-chemischen Eigenschaften der MPs auf einer gaschromatographischen Abtrennung von den übrigen Probenbestandteilen, gekoppelt mit massenspektrometrischer oder Stickstoff-Phosphor selektiver Detektion. Die Entwicklung der Methoden ging von höheren Konzentrationsbereichen der MPs aus (ppb oder höher) und strebt bis heute in Richtung des sub-ppt-Bereichs.

1.2.1 Probenvorbereitung

Die Ziele bei der Probenvorbereitung bestehen darin, die Zielverbindungen in Lösung, frei von störender Matrix und in einer angemessenen Konzentration für die nachfolgende Detektion bereit zu stellen. Häufig wird dazu die Verteilung einer Substanz zwischen zwei Phasen gemäß ihrer Gleichgewichtskonstanten zur Abtrennung der Zielverbindungen von anderen Komponenten der Probe genutzt [112]. Es sind alle möglichen Kombinationen denkbar, in denen zwei Phasen miteinander im Austausch stehen wovon eine das Extraktionsmittel ist. Die Gleichgewichtseinstellung der Konzentrationen einer Verbindung zwischen zwei nicht mischbaren Flüssigkeiten wird bei der Flüssig-flüssig-Extraktion, *liquid liquid extraction* (LLE) genutzt. Eine Verteilung zwischen flüssiger und gasförmiger Phase zur Trennung von Komponenten tritt dagegen bei diversen Destillationsarten auf (Wasserdampfdestillation, Hochvakuumdestillation). Eine Kombination der Verteilung zwischen flüssiger und gasförmiger Phase (Destillation) und zwischen zwei flüssigen Phasen (Extraktion) stellt die Simultane Destillation-Extraktion (SDE) dar. Die Verteilung zwischen fester und flüssiger Phase wird bei der Extraktion durch Lösungsmittel, wie z. B. bei der Soxhlet-Extraktion, bei der *accelerated solvent extraction* (ASE)

oder in gewisser Weise auch bei der *supercritical fluid extraction* (SFE) genutzt. Die feste Phase kann aber auch als Ad- oder Absorber für Zielverbindungen aus einer flüssigen Matrix eingesetzt werden, was für die Festphasenextraktion, *solid phase extraction* (SPE), Festphasenmikroextraktion, *solid phase micro extraction* (SPME) und *Stir Bar Sorptive Extraction* (SBSE) gilt. Ad- und absorptiven Materialien werden auch für die Extraktion von Zielverbindungen aus gasförmigen Proben genutzt wie bei *purge & trap*-Methoden oder der SPME aus dem Dampfraum, *headspace* (HS).

Die hier aufgeführten Techniken eignen sich alle für die Aromaextraktion aus verschiedenartigen Matrices. Bei Bedarf lassen sie sich miteinander kombinieren. Der Extraktion folgt je nach Anforderung noch eine Aufkonzentrierung, d. h. das Volumen des Lösungsmittels wird verringert und damit die Konzentration der Zielverbindung im Extrakt erhöht.

Die chromatographischen Trenntechniken (Säulenchromatographie, Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, *high performance liquid chromatography* (HPLC), Gaschromatographie (GC), Gegenstromchromatographie, *counter current chromatography* (CCC) etc.) werden (auch) präparativ zur Isolierung von Zielverbindungen verwendet, für diesen Einsatz hier aber nicht weiter behandelt. Die GC als Technik zur weiteren Auftrennung eines Probenextraktes und daher Herzstück vieler MP-Analysemethoden wird in einem eigenen Abschnitt behandelt.

1.2.2 Alkylmethoxypyrazine als Majorkomponenten

Die ersten Ansätze zur Bestimmung von Alkylmethoxypyrazinen kamen in den 70er Jahren auf, vor allem zur Ermittlung der aromaaktiven Komponenten verschiedener Pflanzenteile von Nutzpflanzen, die als Gemüse verzehrt werden. Zur Probenvorbereitung wurden Extraktionsverfahren wie die SDE [113, 114], Vakuum-Sublimation mit anschließender destillativer Fraktionierung [115], dynamische *headspace* Extraktion [116, 117] sowie *purge & trap*-Methoden [6] eingesetzt. Ältere Methoden, die ebenfalls auf klassischen destillativen Techniken und anschließender Fraktionierung nach Acidität bzw. Basizität beruhen, sind im Übersichtsartikel von Maga und Sizer aufgeführt [5]. Die analytische Auftrennung wurde in diesen Arbeiten mittels GC realisiert und zur Detektion kam neben der Flammenionisationsdetektion meist die Massenspektrometrie (MS) zum

Einsatz. Ergänzt wurde sie durch die Olfaktometrie zur Aufklärung von Aromaqualitäten. Die zu bestimmenden Konzentrationen reichten je nach eingesetzter Probenmenge, Aufkonzentrierung der Extrakte und Art der Probe vom Promille-Bereich (g kg^{-1}) bis in den ppt-Bereich (ng kg^{-1}).

1.2.3 Alkylmethoxypyrazine als Minorkomponenten

Für Matrices mit geringen MP-Gehalten im ppb- und ppt-Bereich, insbesondere Wein, Weinbeeren oder Most, wurden zunächst ebenfalls die klassischen Destillations- und Extraktionsmethoden verwendet, teilweise in Verbindung mit weiteren Methoden. Zum Beispiel wurde die Wasserdampf-Destillation kombiniert mit einer Extraktion der Analyten durch Bindung an einen Kationenaustauscher [15, 20, 21] genutzt. Kationenaustauscher kamen auch zum Binden der Analyten in *purge & trap*-Methoden zum Einsatz [15, 21]. Nach Ablösung (Elution) und Konzentrierung der Analyten wurden die Extrakte mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) analysiert und detektiert. Mit solchen Methoden und größerem Probeneinsatz von ca. 200 bis 300 ml Probe (Wein oder Most) konnten Gehalte bis hinunter zu 1 ng L^{-1} detektiert werden.

Die klassische LLE bzw. die SPE an Mischbett-Kationenaustauschern wurden für die Analyse von MPs in Wein oder Most mit anschließender eindimensionaler GC-MS kombiniert. Auch hier wurden größere Probevolumina von 25 bis 200 ml eingesetzt, mit resultierenden Nachweisgrenzen von etwa $0,5$ bis 2 ng L^{-1} [118–120]. Für eine Methode aus der Kombination von LLE, anschließender SPE und GC-MS für Studien von freien und glycosilierten Aromastoffen wurden Nachweisgrenzen von unter 1 ng L^{-1} für die MPs in verschiedenen Weinbeerenkompartimenten berichtet [121].

Die Wasserdampf-Destillation mit anschließender SPE oder LLE wurde zur Probenvorbereitung von Wein für HPLC-Methoden verwendet [122–124]. Beim Einsatz der UV-Detektion lag die Nachweisgrenze für IBMP im $\mu\text{g L}^{-1}$ -Bereich [122]. Die Detektion mittels Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) nach chemischer Ionisierung war mit Konzentrationen unter $0,1 \text{ ng L}^{-1}$ um Dekaden empfindlicher [123, 124].

Mit Entwicklung und Einzug der SPME in den 90er Jahren [125, 126] stand eine von der SPE abgeleitete, lösungsmittelfreie Extraktionsmethode zur Verfügung, die bald

für HS-Analysen [127] und für die automatisierte Probenvorbereitung [128] weiterentwickelt wurde. Seit 2000 wurde die HS-SPME vielfach als Probenvorbereitung in gaschromatographischen Analysemethoden für MPs in Beeren, Most und Wein verwendet. Studien zur Optimierung der HS-SPME ergaben, dass vor allem die zusammengesetzten Phasen aus zwei oder drei der Komponenten Polydimethylsiloxan, Carboxen und Divinylbenzol gute ab- und adsorptive Eigenschaften gegenüber MPs besitzen [44, 126, 129, 130]. Für qualitative Studien in verschiedenen Matrices wurden die MPs im Anschluss an die GC-Trennung mittels MS sowie Olfaktometrie detektiert [36, 37, 131]. Die Olfaktometrie ist als Detektionstechnik keinesfalls zu vernachlässigen, da sie nicht nur Auskunft über den geruchlichen Charakter von Substanzen gibt, sondern manchmal empfindlicher ist als andere instrumentelle Detektoren. Als Beispiel hierfür sei ein Beitrag zur Aufklärung des Aromas von Dornfelder zu nennen, in deren Rahmen IB- und IPMP nur anhand des charakteristischen Geruchs und der Retentionsindices identifiziert wurden. Auf Grund der geringen Konzentrationen konnten für diese Verbindungen keine Massenspektren aufgenommen werden [132]. Zusätzlich zu qualitativen Studien dienen die GC-MS-Methoden nach HS-SPME in vielen Fällen auch der quantitativen Bestimmung [31, 47, 49, 57, 78, 133, 134], wobei die MP-Gehalte über verschiedene Rebsorten hinweg meist unter 45 ng L^{-1} bei Wein und unter 300 ng kg^{-1} in Beeren lagen (Nachweisgrenzen ab 2 ng L^{-1} je nach Methode).

Die Nachweisgrenze, *level of detection* (LOD) Die niedrigen natürlich vorkommenden Konzentrationen an MPs in Wein oder Weinbeeren erfordern bis heute die Entwicklung von analytischen Methoden mit Nachweisgrenzen, die idealerweise unter diesen erwarteten Konzentrationen liegen. Die LOD entspricht der niedrigsten Konzentration eines Analyten in einer Probe, die detektiert, d. h. von Null unterschieden werden kann. Diese Konzentration muss dabei nicht unbedingt quantifiziert werden (unterschiedliche Definitionen der LOD existent, s. [135]). Es gibt verschiedene Ansätze zur Ermittlung der LOD, wobei nicht jeder für jede analytische Situation geeignet sein muss. Eine sehr geläufige Methode beruht auf dem Signal-Rausch-Verhältnis, welches die Peakhöhe der Zielkomponente innerhalb eines bestimmten Ausschnittes der Signalspur zur Höhe des Peak-zu-Peak-Rauschens ins Verhältnis setzt. Die Nachweisgrenze entspricht demnach einer Konzentration, bei der das resultierende Signal das 3-Fache des Hintergrundrauschens (Rauschen der Basislinie) beträgt. Diese Berechnung kann nur

erfolgen, wenn eine Detektionsart mit gewissem Grundrauschen zum Einsatz kommt. Eine bei wenig Hintergrundrauschen relevantere Methode nutzt die lineare Regression einer Kalibrierkurve der Form $y = a + bx$. Hierbei kommen speziell die Standardabweichung der Signalantwort S_a und die Steigung b der Kalibriergeraden zur Berechnung in Frage. Die Nachweisgrenze wird definiert als $LOD = 3 \cdot S_a / b$ [135]. Der Wert S_a wird aus einer der drei folgenden Größen ermittelt: Die Standardabweichung von Leerwertmessungen (Matrix ohne Analyt, vgl. die direkte bzw. Leerwertmethode nach DIN 32645 [136]), die Standardabweichung des y-Achsenabschnitts der Regressionsgeraden, oder die Reststandardabweichung der Regressionsgeraden [135, 137]. Bei der indirekten Methode (Kalibriergeradenmethode) nach DIN 32645 wird zur Berechnung das Vertrauensband um die Kalibriergerade herangezogen [136]. In diversen Übersichtsartikeln, Leitlinien und Normen sind weitere Details zur Berechnung von analytischen Kenngrößen wie Nachweis- und Bestimmungsgrenzen, sowie Definitionen bezüglich der Validierung von analytischen Methoden, zu finden [135–138].

Die in der Übersicht der Analysemethoden für MPs genannten Nachweisgrenzen wurden meist über das Signal-Rausch-Verhältnis bestimmt. Je nach analytischem Verfahren, Detektionsmethode und Kalibrierbereich können hiermit Nachweisgrenzen ermittelt werden, die unterhalb des niedrigsten Kalibrierpunkts liegen.

Zum Erreichen wirklich niedrigerer Nachweisgrenzen, die für die verwendete Matrix Bestand haben, sind Abwandlungen der analytischen Methode nötig. Dies kann der Einsatz größerer Probenmengen (wie in älteren Methoden der Fall, s. Abschnitt 23) bedeuten, aber auch Konzentrationsschritte während der Probenvorbereitung, bessere Abtrennung von Matrix und/oder spezifischere Detektion. Ausgehend von GC-MS-Methoden wurde als selektiverer Detektor die MS/MS im *selected reaction monitoring* (SRM)-Modus eingesetzt [46, 130, 139]. Die resultierenden Nachweisgrenzen sind, wie durch Godelmann *et al.* [130] gezeigt, aufgrund der höheren Detektorspezifität niedriger. Dabei zeigen die Autoren auch, wie groß der Einfluss der Art der Berechnung auf die Nachweisgrenze sein kann und stellen zwei Berechnungsarten gegenüber. Über das Signal-Rausch-Verhältnis von 3 berechnen sie hier für IBMP eine Nachweisgrenze von $0,4 \text{ ng L}^{-1}$, über die gewichtete lineare Regression (gemäß [140, 141]) dagegen um die 9 ng L^{-1} für IBMP. Da die zweite Berechnungsart die Unsicherheit einer Kalibrierung in einer Matrix berücksichtigt, liegen die so berechneten Werte zwar höher, aber auch näher an den realistischen Gegebenheiten der analysierten Proben.

Zur Steigerung der Selektivität bei der Detektion fand weiterhin der elementspezifische Stickstoff-Phosphor Detektor, *nitrogen-phosphorous selective detector* (NPD) Einsatz in HS-SPME GC-Methoden [44, 45, 129, 142], meist mit resultierenden Nachweisgrenzen der MPs von unter 1 ng L^{-1} in Most oder Wein (Signal-Rausch-Verhältnis).

Die Selektivität der MS lässt sich durch Umstellen von Elektronenstoßionisation (EI) auf Chemische Ionisation (CI) auf Grund der schonenden Ionisierung wesentlich steigern. Dadurch wird die Häufigkeit der Fragmentierungsreaktionen vermindert, was zu höheren Signalen besonders der größeren Fragmente und des Mutterions führt [21, 143]. Trotz dieses Vorteils findet die CI in den meisten neueren Methoden für die Bestimmung von MPs keine Anwendung.

Die im vorherigen Abschnitt numerisch genannten Nachweisgrenzen stecken den Rahmen der bisher erreichten Grenzen in den erwähnten HS-SPME GC-MS(/MS)-Methoden ab. Sie sollen aber keine uneingeschränkte Vergleichbarkeit vermitteln, da Unterschiede in den Extraktionsmethoden und der Probenvorbereitung (Art der SPME-Faser, eingesetzte Probenmengen etc.) existieren. Auch die Beschaffenheit der Probe hat einen erheblichen Einfluss auf die Extraktionsausbeute. Bei der Analyse von Weinbeeren oder Most sind die Nachweisgrenzen meist niedriger als im direkten Vergleich zu Wein. Dies ist auf die Abwesenheit von Ethanol und damit dem Ausbleiben einer Konkurrenzsituation zwischen Analyten und Ethanol an der adsorptiven SPME-Faser zurückzuführen, wodurch sich eine gesteigerte Extraktion der MPs aus dem Dampfraum der alkoholfreien Probe ergibt [47, 78, 129]. Die bisher genannten Nachweisgrenzen sind im Vergleich zu den Geruchsschwellenwerten der MPs von 1 bis 2 ng/L unter Umständen für die analytische Erfassung der MPs nicht ausreichend, insbesondere wenn auch die Nebenkomponenten SBMP und IPMP von Interesse sind.

1.2.4 Vorteil multidimensionaler Trenntechniken

Die wichtigste Voraussetzung für die Isolierung und Detektion einer Komponente aus einem Gemisch ist die Selektivität der verwendeten Techniken. Wie im vorherigen Abschnitt erwähnt, kann eine Steigerung der Selektivität durch Nutzung bestimmter Detektionstechniken erreicht werden. An Stelle des FID kommen die elementspezifischen

Detektoren wie der PND, (P)FPD oder ECD zur Kopplung an die GC in Frage. Bei Massenspektrometern wird die einfache Quadrupol-MS durch Tandem-MS (MS/MS), Flugzeit-MS (*time of flight*-, TOF-MS) oder hochauflösende MS für eine Steigerung der Selektivität abgelöst. Diese Techniken ermöglichen zusätzlich spezielle Messmodi (*selected ion monitoring* (SIM), *selected reaction monitoring* (SRM) etc.) oder Methoden zur Datenauswertung (insbesondere die Deconvolution bei überlagerten Peaks [144]) um das Signal der Zielkomponente effektiver vom Hintergrund zu befreien. Dennoch können je nach Detektionsart Situationen auftreten, die die sichere Zuordnung des Analytensignals erschweren. Eine solche Situation kann beispielsweise durch große Konzentrationsunterschiede in einer Probe entstehen. Diese Konzentrationsunterschiede können im ungünstigsten Fall bei Co-Elutionen bewirken, dass ein Analytensignal durch ein zeitgleiches hohes Signal einer Matrixkomponente am Detektor überlagert oder die Ionisierung des Analyten im Massenspektrometer unterdrückt wird. In der Spurenanalytik ist dies ein großes und häufig auftretendes Problem. Weiterhin sind in der Massenspektrometrie kleine, unspezifische Fragment-Ionen problematisch, da sie leicht im Hintergrundsignal aus anderen Substanzen untergehen. Dies trifft für relativ kleine Moleküle wie die MPs und viele andere Aromastoffe zu. Reicht in solchen Fällen die Detektorleistung nicht aus um den Analyten sicher vom Hintergrund zu unterscheiden, wird eine bessere Abtrennung von der Matrix in der vorangehenden GC-Trennung nötig.

Eine Möglichkeit zur deutlichen Steigerung der Selektivität besteht in der Kopplung zweier Trenntechniken. Im Anschluss an eine erste Trennung unterzieht man das Material einer zweiten mit abweichendem, komplementärem Trennmechanismus bezüglich Polarität und Wechselwirkungen mit funktionellen Gruppen der stationären Phasen. Diese Idee ist nicht auf chromatographische Trenntechniken beschränkt, wie aus dem grundlegenden Artikel von Giddings hervorgeht [145]. In der Gaschromatographie etabliert haben sich zwei Varianten: Die multidimensionale Gaschromatographie (MDGC) und die umfassende (*comprehensive*) zweidimensionale Gaschromatographie (GC×GC), von denen bisher meist eine zur Problemlösung gewählt wird. Der Übersichtsartikel von Marriott *et al.* bietet einen guten Überblick auf die Entwicklung und die technischen Aspekte beider Techniken mit Verweisen auf grundlegende Übersichtsartikel [146]. Den Ausblick richten die Autoren auf zukünftige Weiterentwicklungen die hauptsächlich in Kombinationen beider Techniken bestehen. Da diese sich immer weniger voneinander abgrenzen lassen, münden sie in sogenannte *multi-column*-Methoden [146].

Neben diversen Kopplungsmöglichkeiten zwischen GC-Trenntechniken wird auch die Flüssigkeitschromatographie, *liquid chromatography* (LC) mit der GC verbunden. Gerade für analytische Aufgabenstellungen im Grenzbereich zwischen Petro- und Lebensmittelchemie wie beispielsweise bei der Bestimmung gesättigter und aromatischer Mineralölkohlenwasserstoffe (MOSH/MOAH) oder anderer technischer Rückstände in Lebensmitteln, lassen sich diese Kombinationen erfolgreich einsetzen [147–150]. Die technischen Entwicklungen zur Kopplung von LC mit GC werden in Übersichtsartikeln [151, 152] beschrieben.

1.2.4.1 Multidimensionale Gaschromatographie

Die multidimensionale Gaschromatographie (MDGC) stellt eine diskontinuierliche zweidimensionale gaschromatographische Trenntechnik dar, die sich insbesondere zur zielgerichteten Analyse bestimmter Verbindungen aus einem komplexen Gemisch eignet. Damit findet sie Anwendung für Analysen von natürlichen Produkten und Lebensmitteln (ätherische Öle, Geschmacks- und Geruchsstoffe, Isomere und Enantiomere), in der Umwelt- und Petrochemie und in der Bearbeitung forensischer, biologischer und landwirtschaftlicher Aufgabenstellungen [153, 154].

Nach Durchlaufen einer ersten Trennstrecke wird eine limitierte Anzahl von Verbindungen über sogenannte *heart-cuts* (H/Cs) aus dem Eluat auf eine zweite Trennsäule mit andersartiger stationärer Phase geleitet (Übersicht über Techniken zum sogenannten *flow switching* in Übersichtsartikel [155]). An der zweiten Trennsäule erfolgt dank komplementärer Trennmechanismen die zweite Trennung mit dem Ziel, die in erster Dimension evt. noch nicht getrennten Zielverbindungen voneinander und von anderen Komponenten zu trennen. Durch das Transferieren von wenigen H/Cs wird eine deutliche und günstige Abnahme von potentiell interferierenden Matrixkomponenten auf der zweiten Trennsäule erreicht, was einen der Hauptgründe für den Einsatz der MDGC darstellt. Diese Minderung von Matrixkomponenten hat den Vorteil, dass Co-Elutionen auf der zweiten Trennstrecke wesentlich seltener auftreten und folglich sowohl qualitative als auch quantitative Aussagen über die Zielverbindung verlässlicher sind. Prinzipien, Entwicklungsgeschichte, technische Umsetzung insbesondere des Probentransfers und die Einsatzmöglichkeiten sind in diversen Übersichtsartikeln [146, 153, 154, 156–158]

behandelt und sollen hier nicht näher erläutert werden. In wenigen neueren Anwendungen wurde die H/C MDGC für die Analyse von MPs in Most, Wein oder Marienkäfern eingesetzt [36, 37, 159].

1.2.4.2 Umfassende zweidimensionale Gaschromatographie

Die Erweiterung der MDGC zum annähernd kontinuierlichen, simultanen Probentransfer von einer ersten Trennsäule auf eine zweite ist die Grundlage für die umfassende (*comprehensive*) zweidimensionale Gaschromatographie (GC×GC). Spezielle Modulationstechniken zwischen der ersten und zweiten Säule werden eingesetzt um das gesamte Eluat aus der ersten Trennstrecke portionsweise zu fokussieren und in die zweite deutlich kürzere und engere Säule mit sehr viel schneller ablaufender Trennung zu injizieren. So werden aus einer Probe alle chromatographischen Informationen über zwei Dimensionen lückenlos erfasst. Nähere Informationen zur Modulation – oft das Kernstück der GC×GC genannt – sowie zur technischen Realisierung werden in folgenden Arbeiten und Übersichtsartikeln gegeben ([160–163]). In der GC×GC wird die gesamte Probe über zwei chemisch differierende stationäre Phasen getrennt, deren Trennmechanismen möglichst unabhängig voneinander oder „orthogonal“ zueinander sind, um den theoretisch zur Verfügung stehenden zweidimensionalen Trennungsbereich (*separation space*) so weit wie möglich auszunutzen. Gegenüber der eindimensionalen GC bietet die GC×GC deutliche Vorteile – höhere Auflösung, höhere Peakkapazität, Signalschärfung (Erhöhung des Signal-Rausch-Verhältnisses) und die Generierung von strukturierten Chromatogrammen. In Kombination mit massenspektrometrischen Detektoren mit hoher Aufnahmezeit, insbesondere der TOF-MS, wird die komplette spektrale Information einer Probe zugänglich. Falls dabei Spektren überlagert vorliegen, können mathematische Verfahren wie die *Deconvolution* Anwendung finden, um die Quantifizierung auf einzigartigen Massen zu realisieren (spezielle Softwarelösungen zur Auswertung, z. B. ChromaTOF von LECO Instrumente GmbH). Die vorgenannten Eigenschaften begründen den Einsatz zur Analyse komplexer Proben und die Anwendung in der Petro-, Lebensmittel- und Aromachemie [154, 164]. Ein zusätzlicher Nutzen der GC×GC liegt in der Generierung mehrdimensionaler Datensätze, aus denen mittels chemometrischer Mustererkennung (Übersichtsartikel [165, 166]), Profiling [167] und statistischer Auswertung (z. B. die Hauptkomponentenanalyse) sonst verborgene Informationen erhalten werden können [168]. Die Entwicklungsgeschichte, technische Details und Anwendungsbereiche der

GC×GC sind in zahlreichen Übersichtsartikeln zusammengefasst, darunter [146, 169–175]. Trotz der immensen Vorteile für komplexe Matrices wurde die GC×GC bisher in wenigen Methoden zur Bestimmung der MPs aus Weinbeeren, Most oder Wein eingesetzt [176–178].

1.2.5 Enantiodifferenzierung

1.2.5.1 Chiralität

Bereits Anfang des 19. Jahrhunderts wurde entdeckt, dass bestimmte Materialien (als Feststoff [179] oder in Lösung [180]) die Schwingungsebene von linear polarisiertem Licht beim Durchtritt drehen. Für die aus Traubensaft isolierte Wein- und Traubensäure (historische Bezeichnung für racemische Weinsäure) formulierte Berzelius, dass Verbindungen mit gleicher Summenformel die eine unterschiedliche optische Aktivität aufweisen, Isomere sind [181]. Bei genauerem Studium des Natriumammoniumsalses der Traubensäure wurden zwei Kristallformen von spiegelbildlicher Struktur festgestellt. Pasteur separierte diese enantiomorphen Kristalle per Hand und fand heraus, dass sie getrennt voneinander in Lösung gebracht, entgegengesetzte, aber vom Betrag her gleich große Drehwinkel der Schwingungsebene linear polarisierten Lichts hervorrufen [182]. In der 1 : 1-Mischung, welche Racemat genannt wird, heben sich die Effekte gegenseitig genau auf. Die Entdeckung der Vierbindigkeit des Kohlenstoffs (Kekulé 1858 [183]) und die Annahme der tetraedischen Anordnung der vier möglichen Bindungspartner um das zentrale C-Atom (Le Bel 1874 [184], van't Hoff 1875 [185]), lieferten nun auf molekularer Ebene die Erklärung für das Vorkommen räumlich verschiedener Isomere. Bei vier tetraedisch an ein zentrales Kohlenstoffatom (dem Stereozentrum) gebundenen unterschiedlichen Substituenten kommen zwei mögliche räumliche Anordnungen vor, die sich wie Bild und Spiegelbild verhalten und nicht durch Rotation oder Translation zur Deckung gebracht werden können (s. Abb. 1.17). Diese Eigenschaft wurde mit dem Begriff „Chiralität“ benannt, welcher sich vom altgriechischen Wort für Hand, χεῖρ (cheír) ableitet [186]. Die Moleküle, die ein Stereozentrum besitzen und daher zwei spiegelbildliche räumliche Strukturen einnehmen können, werden Enantiomere genannt. Beim Vorkommen von mehr als nur einem Stereozentrum ergeben sich mehrere räumliche Strukturen, die

sich nicht mehr nur durch eine Spielgelebene unterscheiden. Solche Stereoisomere werden Diastereomere genannt wenn sie sich nicht wie Bild und Spiegelbild verhalten. Für die Zuordnung der absoluten Konfiguration gilt heute die von Cahn, Ingold und Prelog entwickelte Systematik [187, 188]. Hierzu werden die Substituenten am Stereozentrum nach Priorität geordnet, welche sich aus der Ordnungszahl der Elemente im Periodensystem ableitet. Die Tetraederspitze mit dem Substituenten der niedrigsten Priorität wird nach hinten projiziert und anschließend die Drehrichtung der verbleibenden drei Substituenten in der Reihenfolge der abnehmenden Priorität ermittelt. Die Drehrichtung im Uhrzeigersinn wird mit *R* (lat. *rectus* = rechts), gegen den Uhrzeigersinn mit *S* (lat. *sinister* = links) bezeichnet (s. Abb. 1.17).

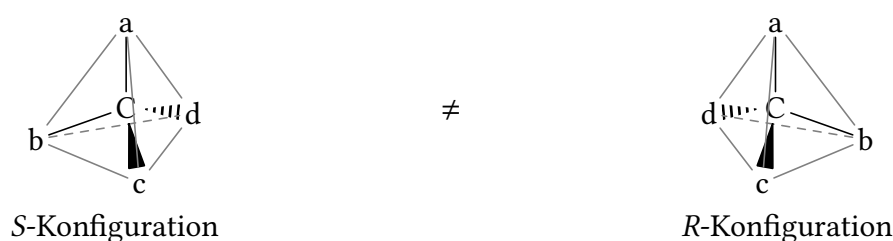


Abbildung 1.17: Zusammenhang der Vierbindigkeit des Kohlenstoffes (der tetraedischen Anordnung von vier Substituenten a bis d) und der Entstehung von Enantiomeren; Stereodeskriptoren nach Cahn-Ingold-Prelog, mit absteigenden Prioritäten von a nach d

Eine ältere Nomenklatur, die gerade für Zucker und Aminosäuren zur besseren Vergleichbarkeit noch heute verwendet wird, ist von Fischer speziell zur Beschreibung von Zuckermolekülen entwickelt worden [189, 190]. Demnach wird die Kohlenstoffkette eines Moleküls senkrecht notiert (Fischer-Projektion), wobei das Kohlenstoffatom mit der höchsten Oxidationszahl oben steht. Die zwei weiteren Substituenten an jedem Kohlenstoffatom des Rückgrats stehen rechts und links daneben, jeweils mit waagerechten Linien verbunden, die in dieser Projektion bedeuten, dass die Substituenten räumlich vor der Papierebene liegen (s. Abb. 1.18). Das am weitesten vom höchst oxidierten Kohlenstoff entfernte Stereozentrum dient nun der Ermittlung der Konfiguration: steht die funktionelle Gruppe ($-\text{OH}$ bei Zuckern oder $-\text{NH}_2$ bei Aminosäuren) rechts vom Grundgerüst, ist die Konfiguration D (von lat. *dexter* = rechts), steht sie links davon, ist die Konfiguration L (lat. *laevus* = links).

Chiralität begegnet uns überall in der Natur und tritt bei allen Molekülen auf, die wich-

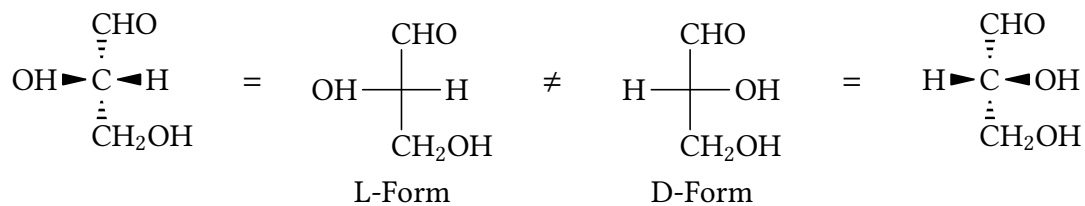


Abbildung 1.18: Enantiomere des Glycerinaldehyds in räumlicher (außen) und in Fischer-Projektion (innen)

tig für die Entstehung und den Erhalt des Lebens sind [191]. Proteine, die sämtliche Funktionen in Zellen steuern, sind fast ausschließlich aus den 20 proteinogenen Aminosäuren aufgebaut, die alle L-Konfiguration gemäß der Fischer-Projektion besitzen. Dieser Enantiomerenüberschuss bestimmt die dreidimensionale Anordnung der räumlichen Unterstrukturen wie α -Helix und β -Faltblatt und ist letztlich entscheidend für die biologische Aktivität der Proteine. Die Zuckerbausteine, die u. a. für den Aufbau von DNA und RNA und damit dem Speicher der Erbinformation wichtig sind, kommen bevorzugt in D-Konfiguration vor. Die Bevorzugung von L-Aminosäuren und D-Zuckern beim Aufbau von Makrobiomolekülen wird mit „Homochiralität“ bezeichnet [191]. Der Speicher von Stoffen von je nur einer Konfiguration, der für sämtliche biochemische Prozesse bereit steht, wird *chiral pool* genannt. Da die Chiralitätszentren der aus diesem Vorrat generierten Moleküle mehrheitlich beibehalten werden, stellen diese Moleküle (z. B. biologische Rezeptoren) eine chirale Matrix dar. Aus diesem Grund lassen sich Enantiomere in der sensorischen Wahrnehmung oder in der physiologischen Wirkung unterscheiden. Man spricht dabei von biologischer Diskriminierung. Im Geschmack unterscheiden sich beispielsweise die Enantiomere von Asparagin: Mit (*R*)-Konfiguration schmeckt es süß, während es in (*S*)-Konfiguration keinen Geschmack hat [192]. Bei geruchsaktiven Stoffen treten ebenfalls sehr häufig Unterschiede auf (s. Übersichtsartikel [191]). Das (*R*)-Limonen beispielsweise riecht nach Orange, das (*S*)-Limonen dagegen minzig bis terpenartig [192].

Bei Unterschieden in der physiologischen Wirkung erlangte Thalidomid traurige Berühmtheit. Die als Racemat vertriebene Substanz wurde als Schlafmittel um 1960 eingesetzt. Die Wirkung geht auf das (*R*)-Enantiomer zurück [193]. Das (*S*)-Enantiomer dagegen hat eine teratogene Wirkung, was die Ursache für tausende missgebildete Neugeborene war. Weitergehende Studien zeigten, dass die Gabe von reinem (*R*)-Thalidomid die teratogene Wirkung nicht verhindern kann, da in der physiologischen Umgebung eine

Racemisierung eintritt [192].

Die genannten Beispiele stehen stellvertretend für eine Vielzahl von bekannten Fällen der biologischen Diskriminierung und zeigen, wie wichtig die Kenntnis der Stereochemie und der Zusammensetzung von Enantiomergemischen ist.

1.2.5.2 Grundlagen der Enantiomerenanalytik

Um die biologische Diskriminierung richtig zu interpretieren sind genaue Aussagen über die Zusammensetzung eines Enantiomergemisches erforderlich. Diese Anforderung wird an eine Reihe von naturwissenschaftlichen Disziplinen gestellt und erfordert passgenaue Techniken für die Analyten.

Das Enantiomerenverhältnis wird entweder mit E_1/E_2 als Quotient² oder als Enantiomerenüberschuss (engl. *enantiomeric excess*) ausgedrückt [194]:

$$ee = \frac{E_1 - E_2}{E_1 + E_2} \quad \text{mit} \quad E_1 \geq E_2 \quad (1.1)$$

Das ee reicht von $ee = 0$ für die racemische Mischung bis $ee = 1$ für pures Enantiomer 1 und wird häufig als Prozentsatz angegeben (Multiplikation des Wertes mit 100).

Enantiomerenverhältnisse können mit optischen Methoden wie der Polarimetrie, oder mittels spektrometrischer Methoden wie dem Zirkulardichroismus oder Kernspinresonanz-Techniken (*nuclear magnetic resonance*, NMR) bestimmt werden. Da die NMR per se nicht enantioselektiv ist, bedürfen die Analyten der vorherigen chemischen Umsetzung mit einem enantiomerenreinen Auxiliar, sodass die entstandenen Diastereomere anhand ihrer unterschiedlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften analysiert werden. Eine andere Möglichkeit bietet der Einsatz chiraler Lösungsmittel oder chiraler Lanthanoid-Shift-Reagenzien, die zu Unterschieden der chemischen Verschiebung zwischen den Enantiomeren führen. Weiterhin sind chromatographische Trennungen an chiralen Phasen (GC oder LC) oder mit chiralen Additiven (LC) möglich. Eine Trennung setzt voraus, dass zwischen einem in die stationäre Phase eingebrachten chiralen Selektor und den Enantiomeren unterschiedliche diastereoselektive Wechselwirkungen auftreten.

²in der chromatographischen Trennung ist E_1 das zuerst eluierende Enantiomer

1.2.5.3 Cyclodextrine als chirale Selektoren

Auch wenn Cyclodextrine (CDs) nicht die einzige Quelle für chirale Selektoren darstellen (chirale Aminosäuren und Peptide waren die ersten Selektoren in der GC [195]), so haben sie sich aufgrund ihrer weiten technischen Einsatzmöglichkeit für gaschromatographische Anwendungen durchgesetzt. Erstmals beim Abbau von Stärke durch Villiers 1891 isoliert [196], wurden diese Verbindungen als cyclische Oligosaccharide beschrieben (Schardinger 1903 [197]). Eine vollständige Beschreibung der Struktur folgte 1948 durch Freudenberg und Cramer [198]. Die Gewinnung erfolgt durch enzymatischen Abbau der Stärke (Amylose), wobei die Cyclodextringlucosyltransferasen (eine Spezies der Amylasen) die Bildung der cyclischen Produkte mit unterschiedlich vielen Glucoseeinheiten katalysieren [199]. Am besten charakterisiert sind die α -, β - und γ -Formen, die aus 6, 7 und 8 D-(+)-Glucose-Einheiten in α -1,4-glycosidischer Verknüpfung bestehen (Übersichtsartikel [200, 201]). Die räumliche Struktur gleicht der Hülle eines Kegelstumpfes (toroidale Struktur mit zentralem Hohlraum), an dessen enger Seite die primären Hydroxylgruppen (Position 6 im Zuckermolekül) und an dessen weiter Öffnung die sekundären Hydroxylgruppen (Positionen 2 und 3) angeordnet sind. Hieraus resultiert eine polare Oberfläche der CDs, wogegen der Innenraum eher unpolar ist, da hier die Methingruppen und die glycosidischen Etherbrücken liegen. Die Struktur und Polarität der CDs ermöglicht die Bildung sogenannter Inklusionskomplexe mit lipophilen Molekülen. In wässrigen Systemen treten bereits beim Eintritt eines Moleküls in den Hohlraum der CDs Veränderungen bezüglich der jeweiligen Hydrathüllen auf, die den resultierenden Komplex energetisch begünstigen können. Weiterhin können zwischen dem CD und dem Gastmolekül van-der-Waals-, hydrophobe Wechselwirkungen, und/oder Wasserstoffbrückenbindungen stabilisierend auftreten [200].

Feste CDs mit relativ hohen Schmelzpunkten (z. B. permethylierte CDs) konnten in der Kapillar-GC nur in Lösung in geeigneten Polysiloxanen als stationäre Phasen aufgebracht werden [201]. Der Durchbruch für den Einsatz von CDs in der enantioselektiven Kapillar-GC gelang König *et al.* durch Einführen längerer Alkylreste (z. B. n-Pentyl) als Substituenten an den Hydroxygruppen [202]. Die Einführung solcher Gruppen lieferte hochviskose Derivate mit niedrigeren Schmelzpunkten und höherer thermischer Stabilität, die auch direkt (also nicht in Mischung mit Polysiloxanen) als stationäre Phase einsetzbar waren. Die neuen Derivate hatten durch weitere Selektivitäten das Potential

zur Enantiomerentrennung fast jeder Art leichtflüchtiger, GC-gängiger chiraler Substrate [203].

In dieser Arbeit wurden zwei Cyclodextrine als chirale Selektoren verwendet, zu denen in der Literatur die Trennfaktoren einer ganzen Reihe von flüchtigen enantiomeren Verbindungen zusammengestellt wurden [204, 205]. Diese CDs sind einerseits das Oktakis(2,3-di-*O*-pentyl-6-*O*-methyl)- γ -cyclodextrin und andererseits das Heptakis(2,3-di-*O*-methyl-6-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl)- β -cyclodextrin.

1.2.5.4 Thermodynamik in der chromatographischen Enantiomerentrennung

Analog zur Beschreibung der Trennung zweier Komponenten in einem chromatographischen System wird der Trennfaktor α für Enantiomerenpaare genutzt und lautet

$$\alpha = \frac{t_{R'2}}{t_{R'1}}, \quad (1.2)$$

wobei $t_{R'1,2}$ die Nettoretentionszeiten des zuerst eluierenden Enantiomers 1 und des als zweites eluierenden Enantiomers 2 auf der stationären Phase sind.

In der Gaschromatographie wird die Enantioselektivität von der Thermodynamik beherrscht und definiert als die Differenz der freien Enthalpie, $-\Delta_{2,1}(\Delta G)$, zwischen den diastereomeren Assoziationskomplexen aus Selektor und Enantiomeren. Für temperaturabhängige Betrachtungen gilt die Gibbs-Helmholtz Gleichung:

$$-\Delta_{2,1}(\Delta G) = -\Delta_{2,1}(\Delta H) + T \cdot \Delta_{2,1}(\Delta S) = R \cdot T \cdot \ln \frac{K_2}{K_1} \quad (1.3)$$

Diese Gibbs-Energie setzt sich also aus zwei gegeneinander gerichteten Anteilen, der Enthalpie und dem Produkt aus Entropie und Temperatur zusammen. K_2 und K_1 sind die Bildungskonstanten der Assoziationskomplexe aus chiraalem Selektor und Enantiomer 2 bzw. Enantiomer 1. In erster Näherung kann $\frac{K_2}{K_1}$ durch α ersetzt werden, so dass folgt:

$$-\Delta_{2,1}(\Delta G) = -\Delta_{2,1}(\Delta H) + T \cdot \Delta_{2,1}(\Delta S) = R \cdot T \cdot \ln \alpha \quad (1.4)$$

Diese Gleichung kann umgeformt werden (Division durch T), um sie als Gerade im van't-Hoff-Plot darzustellen:

$$\frac{-\Delta_{2,1}(\Delta G)}{T} = \frac{-\Delta_{2,1}(\Delta H)}{T} + \Delta_{2,1}(\Delta S) = R \cdot \ln \alpha \quad (1.5)$$

$\Delta_{2,1}(\Delta H)$ und $\Delta_{2,1}(\Delta S)$ können durch die Messung von α bei unterschiedlichen Temperaturen und der Auftragung von $R \cdot \ln \alpha$ gegen $\frac{1}{T}$ berechnet werden³. Die Steigung der Geraden in dieser Auftragung entspricht $-\Delta_{2,1}(\Delta H)$ und der Achsenabschnitt ist $\Delta_{2,1}(\Delta S)$. Weiterhin existiert die sogenannte isoenantioselektive Temperatur, bei der $-\Delta_{2,1}(\Delta G)$ gleich null ist und folglich beide Enantiomere co-eluierten:

$$T_{\text{isoeenan}} = \frac{\Delta_{2,1}(\Delta H)}{\Delta_{2,1}(\Delta S)} \quad \text{für} \quad -\Delta_{2,1}(\Delta G) = 0 \quad (1.6)$$

Unterhalb dieser Temperatur ist die Enantiomerentrennung enthalpiekontrolliert und Enantiomer 1 eluiert vor Enantiomer 2. Oberhalb der T_{isoeenan} wird die Trennung durch die Entropie kontrolliert und die Elutionsreihenfolge ist umgekehrt [194]. Außer der isoenantioselektiven Temperatur gibt es einige andere Szenarien, die eine Co-Elution von Enantiomeren zur Folge haben. Für deren Erklärung wird auf eine grundlegenden Arbeit von Schurig zu Phänomenen in der enantioselektiven Chromatographie verwiesen [207].

1.2.5.5 Kombination von multidimensionalen mit enantioselektiven Trenntechniken

Mitte der 1960er Jahre erfolgte die direkte Enantiomerentrennung mittels GC an derivatisierten Aminosäuren und Dipeptiden [195]. In weiteren Entwicklungsschritten wurden derivatisierte Aminosäuren chemisch an Polysiloxane, achirale stationäre Phasen, gebunden [208] oder man nutzte metallorganische Verbindungen zur Komplexierung [209]. Seit der ersten erfolgreichen Enantiomerentrennung an Cyclodextrinen auf gepackten Säulen in 1983 [210] wurden die CDs durch die stetigen Fortschritte in der Synthese zur chiralen stationären Phase der Wahl (s. Abschnitt 1.2.5.2, S. 33). Zuerst noch in Polysiloxanphasen eingebettet (gelöst), wurden bald darauf CDs verfügbar, die entweder in Reinform selbst oder chemisch an ein Polysiloxan-Rückgrat gebunden als stationäre Phase eingesetzt

³Mit der allgemeinen Gaskonstante $R = 8,3145 \frac{\text{J}}{\text{mol} \cdot \text{K}}$ [206]

werden konnten. Heute sind mindestens 50 verschiedene chirale stationäre Phasen mit modifizierten CDs für die GC bekannt. Für eine ausführliche Übersicht über die Entwicklungen in der chiralen Analytik sowie für die detailliertere Erklärung der folgenden Inhalte wird auf spezialisierte Literatur verwiesen [194, 211].

- Dimension: Kommerzielle chirale Säulen haben häufig eine Länge von 10 bis 30 m, einen Innendurchmesser von 0,25 mm und Filmdicken von 0,25 μm .
- Temperaturlimit: Meist liegt die maximal anwendbare Temperatur zwischen 220 und 250 $^{\circ}\text{C}$ und damit relativ niedrig im Vergleich zu den meisten achiralen Trennsäulen.
- Die CD-Phasen haben oft niedrigere Kapazitäten bezüglich der Säulenbeladung als achirale Phasen mit vergleichbarer Filmdicke.
- Bei der Injektion größerer Lösungsmittelmengen als Flüssigkeit kann es zum Herauslösen von eingebetteten CDs auf nicht-gebundenen CD-Phasen kommen, was zu einem partiellen Verlust des chiralen Selektors führt.
- Reine, niederviskose CD-Filme neigen auf Grund der Rayleigh-Instabilität zum sogenannten Verträpfeln (Tröpfchenbildung), was die Trenneffizienz und Säulenstabilität negativ beeinflusst [212].

Nach Optimierung der Betriebsparameter im Bezug auf die vorgenannten kritischen Eigenschaften und nach erfolgreicher Enantiomerentrennung kann es zu Schwierigkeiten bei der Auswertung kommen. Durch die Trennung von Enantiomerenpaaren wird die Anzahl der Peaks im Chromatogramm im Vergleich zu einer achiralen Trennung erhöht [194, 211]. Das heißt auch, dass Co-Elutionen mit anderen Komponenten der Probe häufiger auftreten können. Gleichzeitig hat man durch den für die Enantiomerentrennung eingeschränkten, meist niedrigeren Temperaturbereich weniger Spielraum, die Trennung von potentiellen Interferenzen über das Temperaturprogramm zu optimieren [194, 211].

In solchen Situationen sind also weitere Schritte zur besseren Isolierung der Analyten nötig. Vor der GC-Trennung kann dies in der Probenvorbereitung eine gezieltere Extraktion oder Anreicherung bedeuten, nach der Trennung ein hochselektives Detektorsystem. Aber selbst beim Einsatz dieser Maßnahmen sind Co-Elutionen und daraus resultierende

Fehler nicht ausgeschlossen. In solchen Fällen muss die analytische Trenntechnik verbessert werden, was durch die Einführung einer zweiten Dimension in der GC gelingt. Hierzu bieten sich die multidimensionalen Trenntechniken MDGC und GC×GC an (vgl. Abschnitt 1.2.4, S. 26), die mit enantioselektiven Trennsäulen modifiziert werden.

Die H/C MDGC wird durch den Einsatz einer enantioselektiven Trennsäule in der zweiten Dimension zur enantioselektiven MDGC (eMDGC), die erstmals 1984 beschrieben wurde [213]. Optimal ist die Verwendung von zwei Öfen für die beiden Trennsäulen, so dass individuelle und unabhängige Temperaturprogramme genutzt werden können. Die achirale Säule in der ersten Dimension dient vor allem der Abtrennung von Matrixbestandteilen. Nur die interessierenden Bereiche mit den Enantiomerenpaaren werden auf die zweite Säule transferiert, auf der nun die Enantiomerentrennung bei stark gemindertem Risiko von Co-Elutionen erfolgt. Die eMDGC findet ihren Einsatz vor allem für chirale Trennaufgaben in komplexeren Gemischen wie ätherischen Ölen, Pflanzenextrakten oder Lebensmitteln und dient vor allem Authentizitäts- und Biogenesestudien in den genannten Proben [214].

In der GC×GC gibt es zwei Herangehensweisen um die Enantiomerentrennung zu realisieren. Bei der ersten Variante wird eine kurze enantioselektive Trennsäule in der zweiten Dimension eingesetzt, GC×enantio-GC genannt. Dies erfordert eine genaue Optimierung, damit die Trennung in der zweiten Dimension (²D) ausreichend schnell ist und dabei auch alle gewünschten Enantiomerenpaare getrennt werden [215]. Für die zweite Variante, enantio-GC×GC genannt, wird eine enantioselektive Trennsäule mit gewöhnlichen Säulendimensionen in der ersten Dimension eingesetzt [164]. Dieses Setup ist technisch weniger anspruchsvoll, verlangt aber dem Analytiker eine Optimierung der Enantiomerentrennung in der ersten Dimension sowie der Modulation (vgl. Abschnitt 1.2.4.2, S. 29) ab. Die erreichte chirale Auflösung nach der ¹D-Trennung darf durch die Modulation nicht aufgehoben werden, da die Enantiomere in der zweiten achiralen Säule aufgrund identischer Wechselwirkungen mit der stationären Phase keine weitere Trennung voneinander erfahren.

Die Anwendungsbereiche der beiden oben genannten enantioselektiven GC×GC-Techniken sind ähnlich wie bei der eMDGC, wobei als klarer Vorteil die potentielle Zeitersparnis, insbesondere bei mehreren chiralen Zielverbindungen, gesehen wird [164, 216].

1.2.6 Quantifizierung mittels Stabilisotopenverdünnungsassay

Wichtige Grundlage für eine verlässliche Quantifizierung, insbesondere in der Spurenanalyse, ist der Einsatz von internen Standards, die durch Zugabe zur Probe mit den Analyten in Relation gesetzt werden. Als interne Standards sollten Substanzen verwendet werden, die strukturell den Analyten möglichst ähnlich sind, also Homologe oder besser noch stabile Isotopologe (z. B. mit den stabilen Isotopen ^2H , ^{13}C oder ^{15}N markierte Analoga) [217]. Werden stabile Isotopologe als interne Standards eingesetzt, spricht man vom Stabilisotopenverdünnungsassay, *stable isotope dilution assay* (SIDA). Im Vergleich zu strukturell unterschiedlichen Standards bietet der SIDA den Vorteil, dass Verluste der Analyten während der Probenvorbereitung durch identische Verluste des isotopologen Standards kompensiert werden [218, 219]. Das Verhältnis der Isotopologen bleibt aufgrund der annähernd identischen chemischen und physikalischen Eigenschaften während der Probenvorbereitungsschritte und ggf. Derivatisierung gleich (s. Abb. 1.19). Der Isotopeneffekt dagegen, also die Diskriminierung von Isotopologen aufgrund unterschiedlichen chemischen oder physikalischen Verhaltens, das durch die Massendifferenz hervorgerufen wird, sollte bereits bei der Markierung bedacht werden und idealerweise für analytische Zwecke unmerklich sein [218]. Ziel ist es erst bei der (massenspektrometrischen) Detektion zwischen den Isotopologen zu differenzieren und anhand der bekannten Menge des zugegebenen Standards den Gehalt des Analyten in der Probe zu berechnen. Als weiterer Vorteil gilt die Kompensierung von Ionensuppression durch Matrixbestandteile während der Ionisierung in der MS [218].

Aus den oben genannten Gründen eignet sich der SIDA besonders für die Bestimmung von Spurenkomponenten aus komplexer Matrix wie beispielsweise in der Lebensmittelanalytik für Aromastoffe, Pestizide, Kontaminanten und Vitamine [218] und wurde schon 1987 für die Quantifizierung der MPs in Sauvignon blanc Wein verwendet [21]. Eine wichtige Voraussetzung des SIDA ist, dass sich das Stoffmengenverhältnis von isotopologem Standard zum Analyten nicht verändern darf. Dies beginnt bei der Zugabe des Standards mit einer ausreichenden Dauer zur Äquilibrierung von Standard und Analyt in den Kompartimenten der Matrix vor Beginn der Probenvorbereitung [218].

Für die Markierung mit stabilen Isotopen ist entscheidend, dass diese unter den Bedingungen (pH-Wert, Temperatur etc.) in der Probe und während der Probenvorbereitung irreversibel gebunden sein sollten. Die größte Fehlerquelle bei deuterierten Standards

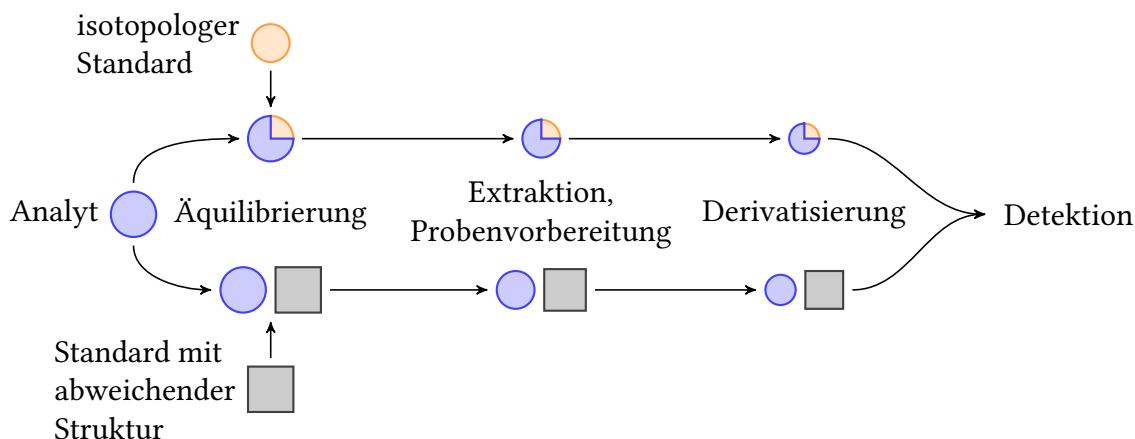


Abbildung 1.19: Prinzip des Stabilisotopenverdünnungsassays nach [218]: Nach Zugabe eines isotopologen Standards zum Analyten und Äquilibrierung bleibt das Verhältnis bis zur Detektion konstant. Wird ein strukturell abweichender interner Standard verwendet, kann sich das Verhältnis zwischen Standard und Analyt verändern und ein falsches Analysenergebnis verursachen.

ist der Austausch zwischen Protium (^1H) und Deuterium (^2H). Bei der Markierung muss also bereits beachtet werden, dass das Deuterium nicht in acide Positionen im Molekül eingebaut wird, an denen es in protischen Lösungsmitteln später leicht ausgetauscht wird. Sehr stabil sind dagegen die mit ^{13}C und ^{15}N markierten Verbindungen [218].

Sind die bisher genannten Kriterien für einen isotopologen Standard erfüllt, ist für die Detektion eine weitere Voraussetzung, dass sich der Standard vom Analyten eindeutig unterscheiden lässt und Fehler durch eine spektrale Überlappung möglichst klein gehalten werden. Bezogen auf die MS müssen im Massenspektrum des Isotopologen also Molekül- oder Fragmentationen vorkommen, die die Markierung noch enthalten und keine Isobaren zu natürlichen Fragmenten darstellen. Bei der MS/MS kann man den Vorteil spezifischer Übergänge, z. B. die Abspaltung eines markierten Fragments, zur Minimierung möglicher Fehler nutzen [218].

Auf Grund der überwiegenden Vorteile wird der SIDA in diversen analytischen Disziplinen eingesetzt (klinische Chemie, Umweltanalytik, Pestizid-Analytik, Analytik von Kontaminanten und Rückständen), darunter auch in der Analytik von Minor Komponenten oder Spuren in Lebensmitteln. Verbreitet ist der Einsatz des SIDA auch in der

Aromaanalytik, da das Problem der hohen Flüchtigkeit der Analyten gut kompensiert wird [218].

1.3 Bisherige Arbeiten des Arbeitskreises

Ein Schwerpunkt des Arbeitskreises Fischer/Schmarr am Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum Rheinpfalz (DLR) liegt in der Entwicklung von Analysemethoden zur zielgerichteten und nicht-zielgerichteten Bestimmung von GC-gängigen Weinhaltstoffen (z. B. [168, 220–224]). Für die in niedrigen Konzentrationen aromaintensiven MPs in Wein oder Most besteht die Herausforderung, aber auch die Notwendigkeit in der Entwicklung einer verlässlichen analytischen Methode für die Quantifizierung im Spurenbereich (wenige ng/L).

Ein wichtiger Schritt in diese Richtung war die Synthese von deuterierten Isotopologen der MPs als Standards für den späteren Einsatz im SIDA. Die Synthese ist wegen der verschiedenen möglichen Syntheseprodukte aufgrund der regiokritischen Methylierung im letzten Schritt eingehend untersucht wurden [225]. Durch die Reaktionsbedingungen bzw. Reagenzien lässt sich die Methylierung im letzten Schritt kontrollieren, so dass entweder wie gewünscht die OH-Gruppe oder aber der aromatische Stickstoff methyliert werden [225]. Eine strukturelle Gleichheit zu den Analyten ist die Grundlage zur Verwendung interner Standards im SIDA.

Bezüglich deuterierter Alkylmethoxy-pyrazine zeigte Gracia-Moreno anhand der Synthese des dreifach in der Methoxygruppe deuterierten IBMPs, dass während der Synthese auf die Bedingungen und Reaktanden geachtet werden muss um ungewollte Austauschreaktionen (^1H zu ^2H) zu verhindern. Solche Nebenreaktionen können im späteren Einsatz als interne Standards zu den gleichen ungewollten Austauschreaktionen (Rücktausch von ^2H zu ^1H) führen und gerade in der Massenspektrometrie die Detektion gezielter Ionen reduzieren. Konkret bewirkte der Einsatz von vierfach deuteriertem Ethanol ($\text{CD}_3\text{-OD}$) im letzten Syntheseschritt von IBMP- d_3 einen ungewünschten zusätzlichen Einbau von Deuterium in der Isobutyl-Seitenkette. Hier kam es zum Austausch von leicht aciden Protonen mit Deuterium-Ionen aus der OD-Gruppe des Alkohols. Der Wechsel zum nur dreifach deuterierten Ethanol ($\text{CD}_3\text{-OH}$) konnte diesen ungewollten Einbau von Deuterium in der Seitenkette verhindern [226].

In der Weiterentwicklung der instrumentellen Analysemethoden für MPs in der hoch komplexen Weinmatrix traten immer wieder Probleme mit Co-Elutionen auf. Solche Probleme wurden sowohl bei einer wenig aufwändigen HS-SPME GC-MS Methode als auch bei der leistungsfähigen HS-SPME GC×GC-MS festgestellt [176]. Selbst die apparativ wesentlich aufwändigere SPE // On-line LC-MDGC-MS konnte erst nach optimierter Probenextraktion durch Verwendung eines Sorbens mit Kationenaustauschern zur ungestörten Quantifizierung von MPs genutzt werden. Diese Methode hatte Nachweisgrenzen von 0,2 ng/L IPMP, 0,4 ng/L SBMP und 1,6 ng/L IBMP in Standardmischungen [176], ein Nachteil liegt allerdings im hohen Zeit- und Probenvorbereitungsaufwand.

Aus der Expertise zu analytischen Trenntechniken und den bisher realisierten Etappen ergibt sich die im folgenden erörterte Aufgabenstellung und Zielsetzung dieser Arbeit.

1.4 Zielsetzung

1.4.1 Etablierung von Methoden zur Spurenanalyse von Alkylmethoxypyrazinen

Wie in Abschnitt 1.2, S. 21 erläutert, stellt die quantitative Bestimmung der Alkylmethoxypyrazine in Wein bis heute eine analytische Herausforderung dar. Ausgehend von etablierten MDGC-Methoden (s. Abschnitt 1.3) war das Ziel die Entwicklung einer routinetauglichen, automatisierbaren quantitativen analytischen Methode für die Bestimmung von MPs im niedrigen Konzentrationsbereich von wenigen ng/L.

Bessere Signal-Rausch-Verhältnisse und folglich tiefere Nachweisgrenzen werden durch den Einsatz von Tandem-MS in selektiven massenspektrometrischen Detektionsmodi erwartet. Daher stand für diese Detektionsmethode eine Optimierung für die Zielsubstanzen im Vordergrund.

Die Probenvorbereitung als wichtiger Ausgangspunkt des Analyseverfahrens sollte durch Weiterentwicklung von SPE-Methoden oder Umstellung auf HS-SPME die nötige Konzentrierung und Extraktion der Analyten liefern, aber auch den Arbeitsaufwand und die Analysenzeit berücksichtigen.

Für eine verlässliche Quantifizierung sollten die Isotopologen der zu analysierenden MPs im SIDA eingesetzt werden. Im Hinblick auf die Anwendung des SIDA in MDGC-Methoden waren Studien zur Optimierung von Schnittfenstern für den vollständigen Transfer von Analyten und Standards bei möglichst effektiver Abtrennung der Matrixbestandteile relevant.

Insgesamt wurde ein analytischer Ansatz mit dem Ziel der Spurenanalytik gewählt, welcher nach Umsetzung in automatisierbare Methoden zur Erfassung einer breiten Datenbasis dienen kann.

1.4.2 Enantiodifferenzierung von SBMP

Neben der Quantifizierung der MPs in verschiedenen Matrices ist die Enantiodifferenzierung von SBMP für die Unterstützung der Hypothesen zur Biogenese der MPs (s. Abschnitt

1.1.6) von Interesse. Hierzu ist die Kenntnis beider möglicher Enantiomere sowie ihr Verhalten auf enantioselektiven stationären CG-Phasen nötig. Ziel war es, geeignete Trennphasen in multidimensionalen GC-Methoden so einzusetzen, dass Systeme zur Enantiomerentrennung aus unterschiedlichen Matrices zugänglich sind.

1.4.3 Anwendung der analytischen Verfahren in der Praxis

Im Vordergrund der Anwendung stand die Quantifizierung von MPs in verschiedenen Matrices im Bereich der zu erwartenden Konzentrationen. Im Hinblick auf ein MP-Management in der Weinwirtschaft können quantitative Daten zu IPMP, SBMP und IBMP aus Wein die Interpretation der Auswirkungen von weinbaulichen und oenologischen Maßnahmen bei der Weinherstellung unterstützen.

Ein weiteres Ziel war die Enantiodifferenzierung von SBMP in verschiedenen Matrices und Spezies. Das Enantiomerenverhältnis von SBMP kann Rückschlüsse auf die Biogenese erlauben. Auch sollte geprüft werden ob durch die Gärung von Most zu Wein eine Veränderung der Enantiomerenverteilung auftritt. Falls Unterschiede zwischen Matrices oder Spezies auftreten, könnte das Enantiomerenverhältnis von SBMP auch als Indiz für Authentizität dienen.

Mit quantitativen und enantioselektiven Methoden sollten weiterhin die MPs aus verschiedenen Marienkäferspezies bestimmt werden um den sogenannten Marienkäferton in Wein zu analysieren. Die Untersuchung weiterer Methoxypyrazine wie die Dimethylmethoxypyrazine wurde angestrebt um zur Aufklärung von Fehltonen z. B. durch Marienkäfer oder Kork beizutragen.

Die folgende Tabelle 1.2 enthält eine Zusammenstellung der behandelten drei Hauptthemen dieser Arbeit. Diese sind den Abschnitten dieser Arbeit sowie den vier Publikationen zugeordnet.

Tabelle 1.2: Behandelte Themen mit Zuordnung zu den Publikationen in Reihenfolge der Einbindung. Abschnitt und Seitenzahl beziehen sich auf die vorliegenden Arbeit.

Thema	Publikation			
	P1	P2	P3	P4
Methodenentwicklung Enantiodifferenzierung	2.1.1, S. 49	2.1.2, S. 71	2.1.3, S. 86, 2.1.3.5, S. 114	2.1.4, S. 116
Anwendung in Praxis	2.2.2, S. 143		2.2.1, S. 141, 2.2.3, S. 144	2.2.4, S. 145

2 Ergebnisse und Diskussion

2.1 Entwicklung quantitativer und enantioselektiver Analysemethoden für Alkylmethoxypyrazine

Bevor grundlegende biochemische, weinbauliche oder oenologische Fragestellungen bezüglich MP-Entstehung und -Beeinflussung bearbeitet werden können, muss eine für die jeweilige Anforderung genügende analytische Methode existieren. Die Entwicklung leistungsfähiger Methoden für die Quantifizierung von MPs aus komplexen Matrices beschäftigt Forscher gerade im Hinblick auf Automatisierung und reduzierten Aufwand bei der Probenvorbereitung bis heute. Der wichtigste Teil dieser Arbeit bestand daher aus der Methodenentwicklung und -optimierung zur Quantifizierung von MPs in je nach Matrix variierenden Konzentrationen (ppb- oder ppt-Bereich) sowie zur Enantiodifferenzierung von SBMP aus verschiedenen Matrices, in denen SBMP ebenfalls vom niedrigen ppt-Bereich bis in den höheren ppb-Bereich vorliegen kann. Erkenntnisse aus früheren Arbeiten und Literaturlauswertung legten nahe, multidimensionale GC-Methoden als Ausgangspunkt zu nutzen und diese hinsichtlich des Anwendungsbereichs weiterzuentwickeln und zu optimieren.

Die Stationen der Methodenentwicklung und Optimierung sowie die Anwendung auf Proben werden anhand vierer Publikationen (P₁ bis P₄) beschrieben. In P₁ werden zwei Methoden auf Grundlage der SPE zur Probenvorbereitung, multidimensionaler GC als Trenntechnik und verschiedener Massenspektrometer (und Messmodi) verglichen. Die MDGC-Systeme waren ähnlich, die gekoppelten Massenspektrometer waren ein Quadrupol-MS und ein Triple-Quadrupol-MS, die in den Detektionsmodi SIM und SRM betrieben wurden. Mit beiden Systemen wurden Weine, die mit verschiedenen weinbaulichen und oenologischen Verfahren hergestellt wurden, auf ihre Methoxypyrazin-Gehalte hin analysiert. Beide Techniken lieferten für gleiche Proben ähnliche Resultate, aber in

speziellen Fällen wurden Unterschiede beobachtet, die besonders auf Probleme mit Co-Elutionen hindeuten. Da die Probenvorbereitung und Trenntechnik gleich oder ähnlich waren, zeigte sich dass die Tandem-MS im SRM-Modus die selektivere Detektionstechnik mit folglich plausibleren Ergebnissen ist.

In P₂ geht es um die Optimierung der *heart-cut* MDGC im Hinblick auf Schnittfensterlängen und den Einsatz des SIDA. Hierzu wurde der Isotopeneffekt bei deuterierten Analoga der Analyten auf verschiedenen polaren Säulenbelegungen berücksichtigt und Trennphasen mit geringem oder keinem Isotopeneffekt für die erste Dimension (¹D) ausgewählt. Das erlaubt folglich kurze Schnittfenster für den Transfer von Analyten und Isotopologen auf die zweite Dimension (²D), so dass möglichst wenige der sonstigen Matrixbestandteile mit transferiert werden. Es werden sowohl die Vorteile als auch die Grenzen der Minimierung von Schnittfensterlängen für die Quantifizierung in der MDGC mittels SIDA diskutiert.

P₃ beschreibt die Entwicklung der enantioselektiven multidimensionalen und umfassenden zweidimensionalen GC-Methoden zur Enantiodifferenzierung des SBMPs aus Proben diverser Spezies und in verschiedenen Konzentrationsbereichen. Die Enantiodifferenzierung von SBMP konnte in Proben mit Gehalten im ppb-Bereich (einige Gemüsesorten, Marienkäferspezies) über die eMDGC mit MS (SIM) oder MS/MS (SRM) erreicht werden. Insbesondere für die niedrigeren Konzentrationsbereiche in Wein oder Weinbeeren war die Anwendung der in ¹D enantioselektiven umfassenden zweidimensionalen Gaschromatographie zielführend, da das größere Auflösungsvermögen zur Abtrennung von Co-Elutionen und folglich zur eindeutigen Identifizierung der Analyten verhalf.

In P₄ wird die Weiterentwicklung der H/C eMDGC-MS/MS für die Analyse weiterer Alkylmethoxy-pyrazine beschrieben. Das Hauptaugenmerk lag auf der Trennung der drei möglichen Isomere des Dimethylmethoxy-pyrazins, die aufgrund der ähnlichen Massenspektren nicht ohne weiteres über die Detektion mittels MS unterschieden werden können. Insbesondere die zwei Vertreter DMMP und MDMP werden bei Anwendungen auf gebräuchlichen apolaren oder polaren stationären Phasen in der GC gar nicht oder nur unmerklich getrennt. Anhand von Referenzsubstanzen der Isomere, die über gekoppelte NMR-Techniken zugeordnet wurden, konnte eine GC-Trennung an der ²D-Säule im o. g. eMDGC-MS/MS-System erreicht werden. Mittels der etablierten Methode wurden Marienkäfer, Kork und Weine auf native Gehalte der Dimethylmethoxy-pyrazin-Isomere hin untersucht.

Vor jeder eingefügten Publikation steht jeweils eine kurze Einleitung, danach je eine kurze Zusammenfassung sowie Diskussion der wichtigsten Inhalte. Die folgende Tabelle 2.1 enthält eine Zusammenstellung, in welchen Abschnitten dieser Arbeit die in den vier Publikationen veröffentlichten Themenbereiche diskutiert werden.

Tabelle 2.1: Diskutierte Themen mit Zuordnung zu den Publikationen in Reihenfolge der Einbindung. Abschnitt und Seitenzahl beziehen sich auf die vorliegenden Arbeit.

Thema	Publikation			
	P1	P2	P3	P4
Methodenentwicklung	2.1.1.3, S. 70	2.1.2.3, S. 83 2.1.2.4, S. 84	2.1.3.4, S. 113, 2.1.3.6, S. 115	2.1.4.4, S. 139
Enantiodifferenzierung			2.2.3.1– 2.2.3.3, S. 144 f	
Anwendung in Praxis	2.2.2.1, 2.2.2.2, S. 143		2.2.1, S. 141	2.2.4.1– 2.2.4.3, S. 145

2.1.1 P1: Methodenvergleich SPE//MDGC-MS (SIM) gegenüber SPE//MDGC-MS/MS (SRM)

2.1.1.1 Einführung und Methodisches

Auf Grund der starken Neigung zu Co-Elutionen der GC-gängigen Weininhaltsstoffe, die frühere Arbeiten gezeigt haben (siehe Abschnitt 1.3), sollte die Methodenentwicklung zur Bestimmung von MPs auf der MDGC basieren. Zur Probenvorbereitung wurde eine bereits früher verwendete SPE-Methode eingesetzt [118, 176]. Hierbei werden die MPs durch Ansäuerung der Matrix protoniert und an einem Sorbens mit gemischten Adsorptionsmodi (Kationenaustausch und van-der-Waals-/hydrophobe Wechselwirkungen; Bond Elut Plexa™ PCX von Varian) konzentriert und extrahiert. Von den gewonnenen Extrakten wurden jeweils 20 µL an beiden analytischen Systemen (MDGC-MS und MDGC-MS/MS) injiziert (Injektionstechnik großvolumige Injektion, *large volume injection* (LVI)).

Während die Probenvorbereitung für beide Methoden gleich war, unterscheiden sich die gegenübergestellten analytischen Systeme, deren relevante Systemparameter in Tabelle

2 Ergebnisse und Diskussion

2.2 geführt sind. Die detaillierten Beschreibungen der genutzten Analysensysteme sind in der Publikation P1 (s. Abschnitt 2.1.1.2) zu finden.

Tabelle 2.2: Systemparameter für MDGC-MS und MDGC-MS/MS

	MDGC-MS	MDGC-MS/MS
Ofen-Anzahl	2	1
¹ D	polar, 30 m Polyethylenglycol	mittelpolar, 15 m Trifluorpropylmethyl-Polysiloxan
² D	apolar, 15 m 35 % Phenyl-Dimethylpolysiloxan	apolar, 30 m Silarylen-Phase (ähnlich 5 % Phenyl-Dimethylpolysiloxan)
i. D.	0,25 mm (beide Dimensionen)	0,25 mm (beide Dimensionen)
d _f	0,5 µm (beide Dimensionen)	0,25 µm (beide Dimensionen)
Detektor	Quadrupol-MS im SIM-Modus	Triple-Quadrupol-MS (s. Abb. 2.1) im SRM-Modus

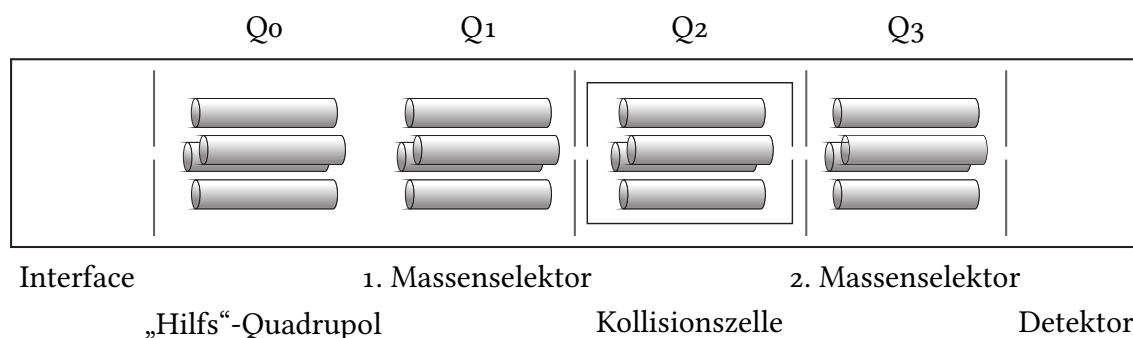


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Komponenten eines Triple-Quadrupol-Massenspektrometers: Im Interface erfolgt der Probeneinlass, die Ionisierung der Substanzen sowie die Beschleunigung und Fokussierung des entstandenen Ionenstroms; Q₀ dient als Pre-Filter, Q₁ wird im Scan-Modus oder als Massenfilter verwendet, in Q₂ erfolgt die zweite Fragmentierung mittels Kollisionsgas, Q₃ wird wieder im Scan-Modus oder als Massenfilter verwendet und entlässt die verbleibenden Fragmentionen in Richtung Detektor. Bei der MS an nur einem Quadrupol entfallen Q₂ und Q₃.

2.1.1.2 Manuskript P1 zum Vergleich zweier MDGC-MS-Methoden

Titel: Quantitative analysis of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in German Sauvignon blanc wines by MDGC-MS or MDGC-MS/MS for viticultural and enological studies

Autoren: Charlotte Legrum, Elisa Gracia-Moreno, Ricardo Lopez, Theodoros Potouridis, Johannes Langen, Petra Slabizki, Jörg Weiland, Hans-Georg Schmarr

Publiziert in: European Food Research and Technology, 2014, 239(4): S. 549–558
Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

DOI: 10.1007/s00217-014-2250-8

Hyperlink: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00217-014-2250-8>

Manuskript reproduziert mit Erlaubnis von Springer Nature, Lizenz Nummer 4467210536518 vom 13.11.2018.

Quantitative analysis of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in German Sauvignon blanc wines by MDGC–MS or MDGC–MS/MS for viticultural and enological studies

Abstract

A method for trace-level analysis of 3-alkyl-2-methoxypyrazines (MPs) based on mixed-bed cation-exchange solid phase extraction followed by heart-cut multidimensional gas chromatographic analysis was applied in a trial on viticultural and enological treatments of Sauvignon blanc wines produced in Germany. The quantification was based on a stable isotope dilution assay using deuterated MPs. For method comparison, detection was either with selected ion monitoring with a quadrupole mass spectrometer (MS) or after selected reaction monitoring using a triple quadrupole MS. Comparable performance for MP detection in the lower ng L^{-1} concentration range was found for both detection methods; however, in some cases, matrix problems could only be solved with MS/MS detection. It could be shown that MP levels varied considerably between the investigated vintages, with concentrations often well below 10 ng L^{-1} . Leaf removal as a viticultural trial was a measure to decrease MP concentrations; however, the effects observed were low in the vintages studied here. Cold maceration and stem addition to the must were found as valuable enological means for increasing the MP concentration and improving the green sensory notes typical for cold climate Sauvignon blanc wines.

Introduction

3-Alkyl-2-methoxypyrazines (MPs) have early been identified in foodstuffs of plant origin as potent and aroma relevant compounds, contributing significantly to the characteristic sensory impression of the raw material or the final products made thereof [1, 2]. Three MPs, 3-isobutyl-2-methoxypyrazine (IBMP), 3-isopropyl-2-methoxypyrazine (IPMP) and 3-*sec*-butyl-2-methoxypyrazine (SBMP), are of particular interest to analytical studies in such foodstuffs. In some *Vitis vinifera* grape varieties or wines made thereof, IBMP is the major MP [3], while SBMP dominates in beetroot or carrot, and IPMP in peas and cucumber [2].

In *Vitis vinifera* variety Sauvignon blanc, sensory attributes of the corresponding wines are often described by green, grassy and herbaceous notes, resembling green bell pepper or green asparagus. In Sauvignon blanc wines, IBMP represents approximately 80 % of the total MP content, with lesser amounts of SBMP and IPMP [4–6]. MPs are important and characteristic wine flavor compounds as they have extremely low sensory detection thresholds, which are described to be in the low ng L^{-1} range (1–2 ng L^{-1} of IBMP in a white wine [6], or about 15 ng L^{-1} in red wine [7]). Since wine quality is strongly influenced by its MP concentration, it is not surprising that studies on the influence of viticultural and enological parameters on final MP concentrations in wine have a long history [8–22].

Fundamental for all such studies is the valid determination of MP concentrations in grape juice or during the winemaking process. Besides these wine industry interests, MPs have also been in the focus of food control authorities [23] due to the potential for adulteration [24].

The low ng L^{-1} concentrations of MPs and the complexity of wine matrix triggered many researchers to publish methods for MP analysis in this field. Early reports used a complex sample pretreatment, based on distillation, extraction onto a strong cation-exchange (SCX) resin, elution with alkaline buffer, liquid–liquid extraction (LLE) and finally quantification by GC–MS [5, 25, 26]. The tedious distillation and SCX step were later replaced with RP-18 solid phase extraction (SPE) [27, 28] or LiChrolut® EN; the latter also used in a dynamic headspace-SPE approach [29]. Others [30, 31] used LLE and concentration steps for sample preparation. Solventless extraction and concentration methods, particularly headspace solid phase microextraction (HS–SPME), were used in many recent approaches by various groups [12, 23, 32–37], but also stir bar sorptive extraction was described [38]. A recent approach using SPE sample preparation with a cation-exchange mode and HS–SPME–GC–MS was described by Bindon et al. [39]. Besides extraction and enrichment steps, quantification by the approach of a stable isotope dilution assay (SIDA) using deuterated MPs as internal standards had early been described for quantitative MP analysis in wine [26] and was applied since then by many others thereafter.

Considering the necessary trace-level analysis and the complexity of wine matrix, one-dimensional gas chromatographic (GC) separations can be critical due to coelution of matrix compounds. In the case of MP analysis, such a situation was previously described

[40]. The latter work described the advantages of using a multidimensional (MD) heart-cut technique as a powerful option to separate the target MP analytes from matrix compounds [40]. However, even the MDGC-based MP analysis clearly benefited from a mixed-mode cation-exchange sorbent used for sample preparation [29, 40, 41], together with an online normal phase liquid chromatography cleanup step prior to MDGC analysis. Again, the advantage in using a cation-exchange sorbent is based on the basic nature of the nitrogen in the MPs, allowing for a more selective sample preparation as was applied in the early methods for MP analysis.

In our work described here, sample preparation and extraction of MPs was performed with an earlier developed SPE extraction method using a mixed-mode cation exchanger as sorbent [40, 41]. The obtained liquid extracts were further analyzed with two independent analytical systems, basically to compare their suitability for trace-level analysis of MPs. In this respect, a large-volume on-column injection and MDGC-based analysis with selected ion monitoring mass spectrometric detection (SIM-MS) was compared with large-volume programmed temperature vaporizing (PTV) injector-type on-column injection and MDGC-based analysis with selected reaction monitoring (SRM) using a triple-stage quadrupole MS (MS/MS). Deuterated MPs were incorporated for robust SIDA-based quantification.

Besides our interest in the before mentioned method comparison, we analyzed wine samples that were part of a viticultural and enological trial, in which the evaluation of green aroma attributes in German Sauvignon blanc wines had been targeted. These green sensory notes (associated with MPs) are usually considered typical for a cool to cold climate Sauvignon blanc wine style. At present, the available database on MP concentration levels in Sauvignon blanc wines produced under German wine-making conditions is limited. Since it is well known that MP concentrations vary over the ripening period and can be influenced by a variety of both viticultural and enological activities, we wanted to evaluate known measures like leaf removal and harvest time as well as new aspects, such as cold maceration (addition of dry ice pellets) and stem addition.

Materials and methods

Chemicals Methanol and sulfuric acid were from AppliChem (Darmstadt, Germany). Ethanol and dichloromethane were from Carl Roth (Karlsruhe, Germany). Triethylamine and L-(+)-tartaric acid were from Fluka (Buchs, Switzerland). Sodium hydroxide was

from KMP optichem (Lohmar, Germany). IPMP, 3-(1-methylpropyl)-2-methoxypyrazine (3-*sec*-butyl-2-methoxypyrazine; SBMP) and IBMP were from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). All commercial chemicals were of analytical grade or equivalent. Purified water was obtained from a Purelab purification system (ELGA, UK). Bond Elut Plexa™ PCX SPE cartridges (60 mg, 1 mL) were from Varian (Darmstadt, Germany). A 20-port vacuum manifold (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) was used for SPE preparation. Deuterated standards of MPs (3-alkyl-2-[²H₃]methoxypyrazines; MPs-d₃) had been synthesized in-house as described elsewhere [42].

Wine samples Wines made of *Vitis vinifera* grapes variety Sauvignon blanc (clones Inra 161 and Inra 241) and variety Cabernet blanc (a *Vitis vinifera* spp. from interspecific crossing) were obtained from the Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum Rheinhessen-Nahe-Hunsrück, Oppenheim, Germany. Viticultural variants were the conduction of leaf removal on both sides of the grape zones at two different stages (before bloom and at veraison). Grape harvest was done at three harvesting dates (HD1-HD3; early or middle of September to end of September or beginning of October) and in different vintages (2007, 2008, 2009 and 2011) that led to musts with a density of 82 up to 103 °Oe (1,082–1,103 g L⁻¹). After pressing, musts were sulfurized (50 mg L⁻¹ SO₂) and clarified with flotation, using nitrogen as flotation gas and yielding turbidity below 100 nephelometric turbidity units. Fermentation was conducted under controlled temperature conditions at 18–20 °C in 100 L stainless steel tanks. The fermentation period was between 16 and 22 days and was controlled by daily measurement of temperature and density. A *Saccaromyces cerevisiae* yeast strain (Uvaferm SVG) was used for all fermentations. For these, active dry yeast (dosage 20 g hL⁻¹) was rehydrated according to the manufacturer's recommendations at 30 °C and inoculated after stepwise temperature adaption.

In addition to normal wine-making procedures, portions of the grapes were macerated at 4 °C applying dry ice for 4 days without sulphiting or addition of pectolytic enzymes. After pressing, these musts were warmed up to 18 °C before fermentation. As another enological variant, we conducted trials with addition of stems for two vintages. In these trials, stems were collected after destemming and immediately added to the must in a concentration of 4 kg 100 L⁻¹ before yeast inoculation. The stems were later removed at decanting (vintage 2009) or after 7 days of fermentation (vintage 2011).

Sample preparation The sample preparation procedure was based on the method proposed by López et al. [41]. Using 60 mg of Bond Elut Plexa™ PCX sorbent (1 mL cartridge), conditioning was with 2.5 mL dichloromethane, 2.5 mL methanol and 4 mL deionized water with flow control done by gravity suction. Then, 25 mL of the sample (wine, previously spiked with deuterated MPs as internal standards) was adjusted to $\text{pH } 2 \pm 0.1$ using sulfuric acid (about 1 mL, 1 M, depending on the wine) and loaded onto the sorbent. Sample application was done under moderate vacuum providing a small flow only (in total percolation took between 1 and 2 h, depending on sample). Polar components were rinsed using 1 mL of a mixture of deionized water and methanol (70 + 30, v + v), adjusted to pH 2 with sulfuric acid. The sorbent was then dried for about 15 min applying positive pressure argon flow onto the SPE cartridges. A second rinsing step with 0.5 mL dichloromethane was then performed. Elution of MPs was done with triethylamine in dichloromethane (10 g L^{-1}) that was carried out in two phases: First, 600 μL were added discarding the eluate; then, 200 μL of eluent were added collecting the eluate in a centrifuge tube. The eluate was washed with 1 mL aqueous buffer of tartaric acid at pH 3, and the organic phase was transferred into a GC vial and stored in a refrigerator until analysis.

Method calibration Calibration was done with dichloromethane solutions containing known amounts of the internal standards IPMP- d_3 (359 pg mL^{-1}), SBMP- d_3 (404 pg mL^{-1}) and IBMP- d_3 (4244 pg mL^{-1}) and analytes IPMP, SBMP and IBMP in varying concentrations yielding ratios from 0.1 to 2 (IPMP/IPMP- d_3), 0.25 to 2 (SBMP/SBMP- d_3) and 0.05 to 2 (IBMP/IBMP- d_3). Calibration ranged from 0.4 to 7.3 ng L^{-1} for IPMP, 1.0 to 8.0 ng L^{-1} for SBMP and 2.0 to 75.9 ng L^{-1} for IBMP. Detection limits (LODs) and quantification limits (LOQs) were calculated with DINTTEST, version. 2005 DE software (Georg Schmitt, Inst. F. Rechtsmedizin, Universitätsklinikum Heidelberg, Germany; www.analytiksoft.de) according to DIN 32645.

MDGC-SIM-MS The system for heart-cut MDGC consisted of two GC instruments (both model 8560, Mega II series from C.E. instruments, today ThermoFisher Scientific, Dreieich, Germany) connected by a heated transfer line. The first dimension GC was equipped with a “Moving Column Stream Switching” (MCSS) device [43, 44] allowing heart cutting of GC fractions and was described in detail earlier [40, 45]. The ^1D column

system consisted of a 3.5 m × 0.53 mm i.d. uncoated deactivated precolumn (phenylmethyl silylated) (PheSil, BGB-Analytik, Adliswil, Switzerland) connected via a press-fit piece (BGB-Analytik) to a 30 m × 0.25 mm i.d. fused silica capillary coated with polyethylene glycol (ZB-Wax, Phenomenex, Aschaffenburg, Germany) of 0.5 µm film thickness. Temperature was programmed from 55 °C (8 min isothermal) at 8 °C/min to 250 °C (10 min isothermal). Injection (20 µL) was done with an autosampler (AS800, ThermoFisher) suited for cold on-column operation. The flame ionization detector (FID) was set to 255 °C and operated with 30 mL min⁻¹ hydrogen and 300 mL min⁻¹ air as fuel gases. Helium was used as carrier gas at a constant inlet pressure of 125 kPa (P1; for details, see [45]) and 40 kPa (P2). An uncoated fused silica capillary (1.5 m × 0.25 mm i.d., PheSil deactivated) connected the ¹D column system via MCSS to the ²D column. This capillary was guided through a heated transfer line set at 200 °C. Under the described conditions, elution of internal standards and MPs was between some 19 and 21 min, so cut windows were set at 19.15–19.45 min for IPMP, 20.47–20.71 min for SBMP and 20.89–21.12 min for IBMP. The ²D column consisted of a fused silica capillary (15 m × 0.25 mm i.d.) coated with 0.5 µm of 35 % phenyl 65 % dimethylpolysiloxane (ZB-35, Phenomenex). The ²D GC oven was triggered with a start signal 13 min after the start of the first GC. During this time and for additional 9 min (total 22 min), a standby temperature of 70 °C was held, allowing focusing of the transferred MPs. Temperature was then programmed at 10 °C min⁻¹ to 250 °C (10 min isothermal). The inlet pressure for the ²D column was the MCSS dome pressure and was at 25 kPa. MS acquisition (quadrupole MS, MD800, Fisons Instruments, today ThermoFisher) was operated in the selected ion monitoring mode and started simultaneously to the GC start. Positive electron ionization (EI +) mode at 70 eV was used, and ion dwell times were set to 200 ms. The temperature of the ion source was 230 °C. Quantifier ions were m/z 137, 138 and 124 for IPMP, SBMP and IBMP, respectively (140, 141 and 127 for the corresponding d₃-isotopologues), while qualifier ions were 152 and 124 m/z for IPMP, 151 and 124 for SBMP and 151 and 94 for IBMP (155 and 127; 154 and 127; 154 and 97 for the corresponding isotopologues). Acquisition and data analysis were done using Xcalibur version 1.2. (ThermoFisher).

MDGC-MS/MS The GC–MS system (Fig. 1) was equipped with a microfluidic Deans switch (SGE Analytical Science, Victoria, Australia) for heart-cut MDGC (installation and optimization by S + H Analytik (Mönchengladbach, Germany). The GC (Trace GC Ultra,

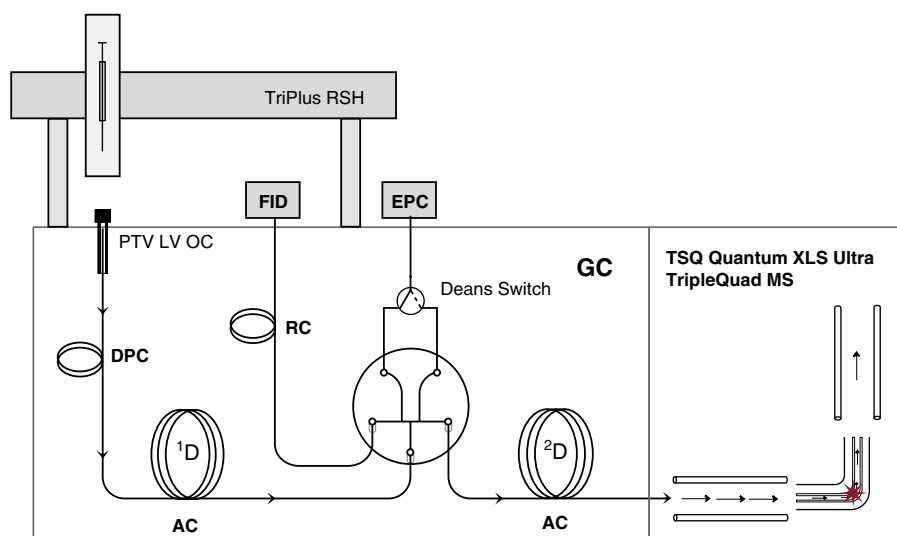


Figure 1: Schematic diagram of the MDGC–MS/MS system used. *DPC* uncoated, deactivated precolumn; *AC* analytical column, *RC* restrictor column, *FID* flame ionization detector; *EPC* electronic pressure regulator. Details are described in the text

ThermoFisher) was equipped with a programmable temperature vaporizing injector (PTV), a split/splitless injector (SSL) with a pneumatics control module, serving pneumatic gas for the Deans switch and a FID used as monitoring detector for ^1D separation. The oven temperature was programmed from $70\text{ }^\circ\text{C}$ (8 min isothermal) at $10\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ to $95\text{ }^\circ\text{C}$ (1 min isothermal), then at $10\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ to $135\text{ }^\circ\text{C}$ and finally at $50\text{ }^\circ\text{C}$ to $270\text{ }^\circ\text{C}$ (5 min isothermal). Injection of $20\text{ }\mu\text{L}$ was done using an autosampler (TriPlus RSH, ThermoFisher) programmed for cold on-column operation. The FID was set to $250\text{ }^\circ\text{C}$ and supplied with 35 mL min^{-1} hydrogen, 340 mL min^{-1} air and 30 mL min^{-1} makeup gas (nitrogen). Helium was used as carrier gas at a constant inlet pressure of 270 kPa . The SSL was set at a constant inlet pressure of 225 kPa helium. A restriction capillary of $0.7\text{ m} \times 0.10\text{ mm i.d.}$ (phenylmethyl silylated, SGE) led to the FID. A $3\text{ m} \times 0.53\text{ mm i.d.}$ deactivated precolumn (PheSil, BGB-Analytik) was connected via a press-fit connector to $15\text{ m} \times 0.25\text{ mm i.d.}$ of a fused silica capillary coated with a $0.25\text{-}\mu\text{m}$ film of a trifluoropropylmethyl polysiloxane (RTX 200MS, Restek, Bad Homburg, Germany). Cut windows were from 7.85 to 8.25 min for IPMP and 9.35 to 10.25 min for SBMP and IBMP, transferring the targeted MPs and their deuterated isotopologues to the ^2D column. The latter consisted of a $30\text{ m} \times 0.25\text{ mm i.d.}$ fused silica capillary coated with a $0.25\text{-}\mu\text{m}$ film of a silarylene phase with a polarity similar to 5 %

diphenyl and 95 % dimethylpolysiloxane (TR-5MS SQC, ThermoFisher). The temperature program was the same as for ¹D, as both columns were in the same GC oven. Detection was with a triple-stage quadrupole MS (QqQ-MS; TSQ Quantum Ultra, ThermoFisher) operated in SRM. The parent and product ion scans used for quantifier and qualifier SRMs are summarized in Fig. 2. Collision gas used was argon at a pressure of 1.0 mTorr with collision energies ranging from 9 to 12 V and a resolution of 0.7 amu at Q1 and Q3. Scan time was set to 0.01 s with a scan width of 0.002 m/z, and the chrom filter peak width was set to 5 s. The ion source temperature was set to 230 °C, and emission current was at 50 μA. Data acquisition and control of the Deans switch device was achieved by Xcalibur software version 2.1 (ThermoFisher).

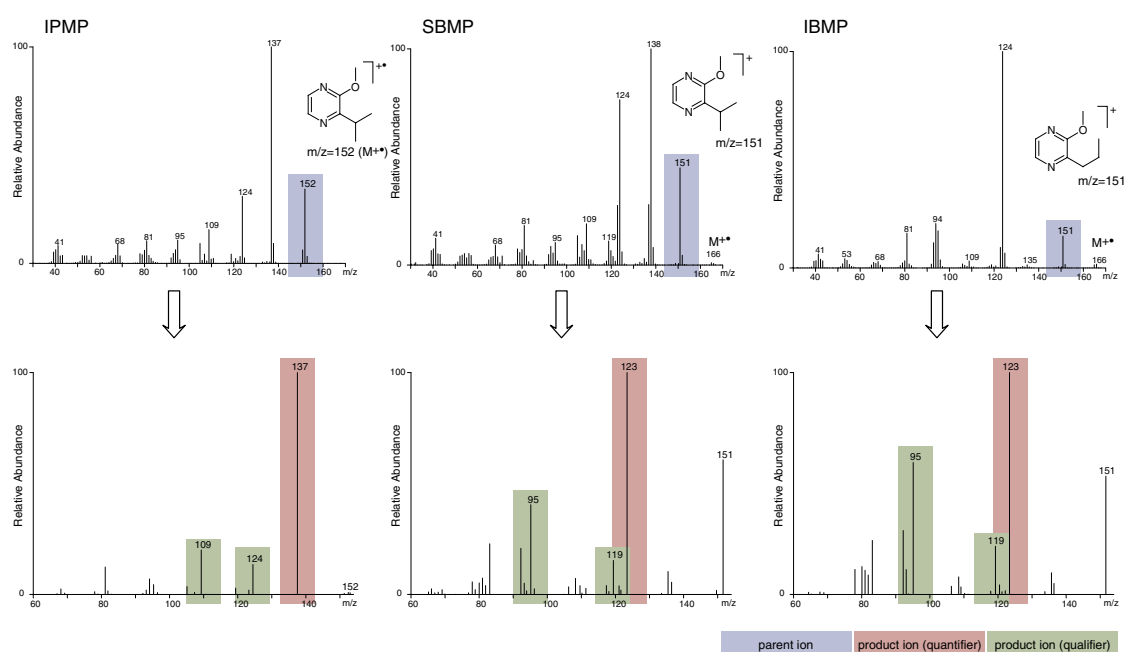


Figure 2: Mass spectra (EI+) of targeted MPs and their corresponding MS/MS product ion scans with highlighted SRMs used for identification

Method validation The recovery was evaluated on a wine sample spiked with two different spiking levels, each in triplicate. The spiking levels were 1.8 (3.7), 2.0 (4.0) and 19.0 (38.0) ng L⁻¹ for IPMP, SBMP and IBMP, respectively. Deuterated MPs were added to the final extract obtained after sample preparation by SPE. For repeatability studies, a Sauvignon blanc wine that contained detectable amounts of the three MPs was analyzed in five repetitions. These experiments were evaluated by MDGC-MS/MS.

Results and discussion

Calibration graphs for both methods expressed good linearity in the targeted concentration ranges (e.g., for MS–MS: IPMP, $y = 0.279x + 0.051$ $R^2 = 0.999$; SBMP, $y = 0.329x + 0.065$ $R^2 = 0.997$; IBMP, $y = 0.050x + 0.003$ $R^2 = 0.999$) with LODs and LOQs given in Table 1. Recoveries ($n = 3$) were 71 ± 26 % (IPMP), 78 ± 19 % (SBMP) and 72 ± 21 % (IBMP) on the lower spiking level and 87 ± 5 % (IPMP), 101 ± 11 % (SBMP) and 87 ± 2 % (IBMP) on the upper spiking level. Repeatability ($n = 5$) determined for native MP concentrations of a wine sample was 0.8 ± 0.3 (37 %), 2.7 ± 0.4 (16 %) and 8.3 ± 0.7 (8 %) for IPMP, SBMP and IBMP, respectively. The MS experiments for quantifier and qualifier SRMs had been chosen based on their mass fragmentation patterns (Fig. 2). Interestingly, the MS/MS method did not necessarily provide lower detection limits as SIM–MS. Obviously, the advantage of the higher selectivity is paid for by a general loss in ion intensity, due to the second fragmentation step. As can be seen in Fig. 3, the sensitivity for IBMP (tenfold concentration) does not match that for SBMP. However, this was not considered critical, as IBMP is generally the most abundant MP in Sauvignon blanc wines. The detection limits achieved here are lower than those described by others using a triple-stage quadrupole MS for MP detection [23].

Table 1: Detection and quantification limits (ng L^{-1}) of the two MS methods

	LOD		LOQ	
	SIM-MS	SRM-MS-MS	SIM-MS	SRM-MS-MS
IPMP	0.1	0.4	0.5	1.5
SBMP	0.4	0.7	1.5	2.6
IBMP	1.1	1.3	4.3	5.0

Applying the developed method for the analysis of viticultural trials investigating the influence of leaf removal on the final MP concentrations (results summarized in Table 2), we found some discrepancies between the SIM–MS and MS/MS results. In some samples (highlighted data), SBMP was considerably high (higher than IPMP), a result that is not in accordance with its usually being the least abundant of the three investigated MPs in Sauvignon blanc. A possible explanation could be the more selective analysis (of the same extract) by MS/MS revealing lower and more plausible data, particularly for SBMP. However, one has to consider the different chromatographic systems involved in the

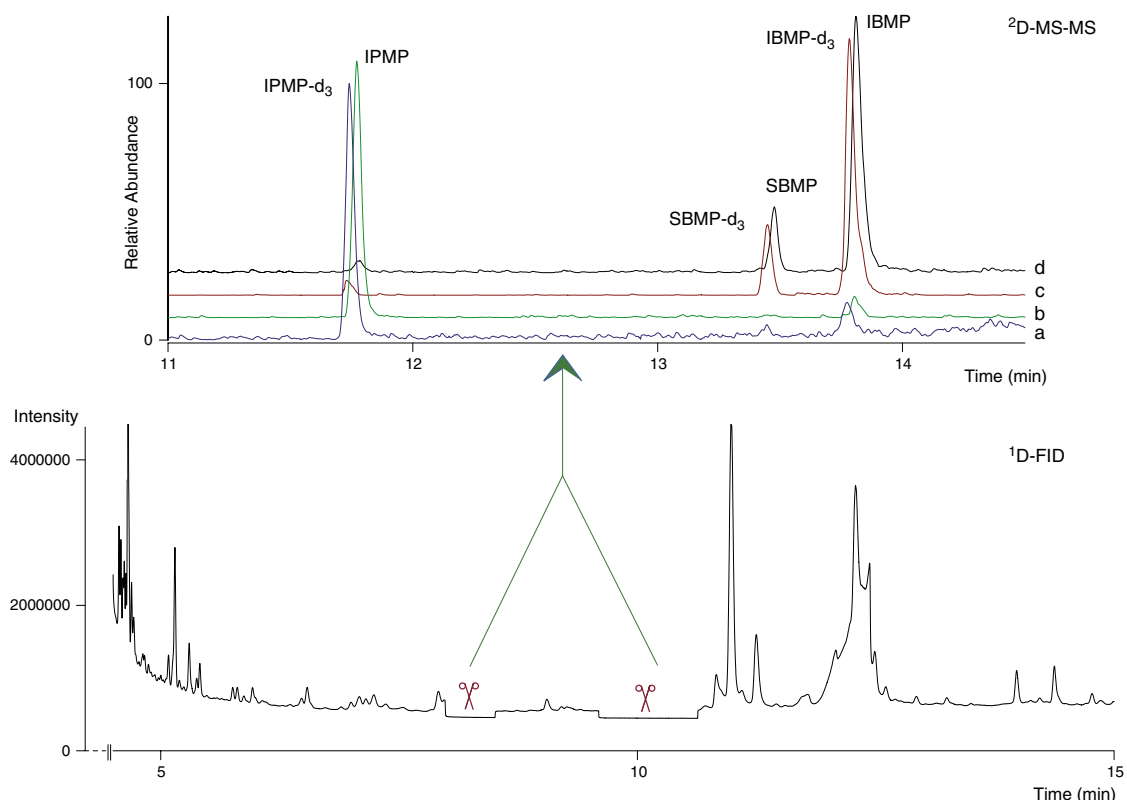


Figure 3: ^1D GC separation (FID) with indicated heart-cut regions of a wine aroma extract spiked with 4 ng L^{-1} (IPMP, SBMP) and 40 ng L^{-1} (IBMP) and the respective deuterated MPs (lower window). Upper window shows ^2D quantifier ion traces for MPs: *a* 140 (IPMP- d_3), *b* 137 (IPMP), *c* 126 (SBMP- d_3 , IBMP- d_3), *d* 123 (SBMP, IBMP)

MDGC–SIM–MS and MDGC–MS/MS applications, impeding an explanation solely by a better selectivity of the detection system. Still, even after the selective sample preparation and GC separation (here by MDGC), SBMP (or others) can be disturbed by co-eluting matrix compounds in some wine samples. Therefore, analytical data on trace-level determination of MPs should be considered carefully, always keeping their plausibility in mind. Such data had been found earlier in other studies and were considered valid on a first assumption, as there were no hints found in the raw data [46, 47]. In this respect, MS/MS provides another dimension of selectivity and therefore a better chance for valid data. Other groups described the application of comprehensive two-dimensional GC (GC×GC) for MP analysis [36]—a technique that can provide high separation efficiencies. Still, co-elutions cannot be ruled out as such, as had been described for GC×GC–SIM–MS

[40]. At present, GC×GC coupled to a time-of-flight MS (Tof-MS) seems to be the most promising technique as it combines high separation efficiency and also allows spectral deconvolution algorithms applied on (full scan) Tof-MS data [34]. The latter allows quantification on undisturbed (unique) ion traces and also allows postrun verification of potentially co-eluting compounds on full scan level. Such information is not available due to the more restricted spectral information obtained by SIM-MS or MS/MS experiments.

Table 2: Influence of leaf removal on MP concentrations (ng L⁻¹)

Leaf removal	Vintage/clone	IPMP		SBMP		IBMP	
		SIM-MS	MS-MS	SIM-MS	MS-MS	SIM-MS	MS-MS
Before anthesis	2009/Inra 241	0.9	0.5	<LOD ^a	1.0	<LOD	<LOD
None		0.8	0.6	1.0	<LOD	<LOD	1.9
Before anthesis	2011/Inra 241	0.4	0.4	nd	nd	1.5	1.6
None		0.8	0.8	nd	nd	3.9	3.9
At veraison	2009/Inra 161	0.7	0.5	<LOD	0.8	<LOD	<LOD
None		0.7	0.6	0.7	0.9	<LOD	<LOD
At veraison	2011/Inra 161	2.9	0.7	3.9	nd	4.8	2.2
None		2.1	0.6	2.2	nd	5.6	5.4

Bold values represent results with atypical SBMP concentration levels (as discussed in text)

nd not determined (due to interferences on ion traces)

^a limit of detection

Despite the analytical issues, data determined for the leaf removal experiments (Table 2) show a tendency toward higher MP concentration (particularly IBMP) when no leaves were removed. Such results are in agreement with previous work [17, 22], but for the vintages investigated here, no clear tendency should be interpreted as concentration levels were generally very low. Considering the data for the clone varieties investigated, one might see a tentative difference between clone varieties. The clone variety as such is an important aspect with respect to its viticultural performance, but to the best of the authors' knowledge, only few studies considered clone or genotype variety with respect to MP concentrations at the harvesting stage [31, 37]. However, the data available so far are only limited, and our interpretation should further be supported by future studies, allowing a statistical coverage. In general, it can be concluded that MP concentrations decline over the ripening period, a fact that has been studied in more detail particularly by Sacks and coworkers [48]. In our situation, there had been almost no analytically detectable levels of MPs to observe such differences over time. Besides the viticultural

options available to the winemaker, there seems to be a general climatic influence as well, meaning that MPs are considerably lower in some years than in others. The most promising results for the winemaker were found with the investigation of the enological variants “cold maceration” and “stem addition.”

From earlier studies, it is well known that localization of the MPs is primarily within the skin and stem rather than in the flesh of the grape berry, a fact that had been studied in detail for Cabernet Sauvignon grapes (a red variety that also has high MP concentrations) [20]. Therefore, treatments that allow better pulping and extraction of the berry skins may yield higher extraction and MP concentrations in the final wine. Cold maceration realized by the addition of dry ice as pellets acting upon the pulp for some hours, proved to be a good means to increase MP concentration (Table 3). The process, however, is more costly than standard procedures for winemaking. On the other hand, it provides an antioxidative environment that can be considered beneficial also in other enological respects [49]. Compared with the normal treatment (control wines), cold macerated samples showed about a threefold increase in MP (again, particularly IBMP) concentration (Table 3). Again, the data indicate a considerable difference between vintages, as MPs that are very low in some years still remain on low levels as was the case in vintages 2008 and 2009. Since the majority of MPs is located in the stems, a prolonged fermentation on the stems was able to considerably increase MP levels even in such a year (2009). However, this practice has its drawback for the final wine quality, as other compounds will be co-extracted as well. In this respect, overdoing co-extraction, particularly of phenolic compounds, is not desirable for a delicate white wine aroma such as a Sauvignon blanc [50]. Phenolic compounds may cause astringency, bitterness and an increase in color—characteristics that will not be accepted on a higher level by the white wine consumer. A compromise might be found in a shortened stem addition as was tested in vintage 2011. Here, a co-fermentation period of only 7 days (rather than the 14 days in 2009) yielded MP concentrations comparable with what was achieved by cold maceration. The vintage 2011 obviously was a year in Germany that allowed for higher MP levels in the Sauvignon blanc wines, as already the control wine had a decent IBMP concentration well above its sensory threshold value. Sensory analysis for these wines therefore revealed a pronounced “green” note, typical for such a Sauvignon blanc wine, whereas in other years, this “green” attribute was less pronounced, and correspondingly, the “typicity” of these wines was low [51]. A more detailed report on the sensory analysis and discussion

on the overall viticultural and enological aspects would widen the analytical scope of this discussion too much. The reader is thus referred to such results published elsewhere [51, 52]. In addition to our studies with Sauvignon blanc, we included in 2011 the new hybride Cabernet blanc [53]. This new grape variety is known for intense green sensory notes that correspond well with an increased expression of MPs (Table 3). For the German climatic conditions, Cabernet blanc would most probably allow the production of wines with high MP contents (and the corresponding green notes) as such, or to be used in a blend (*cuvée*) with a Sauvignon blanc wine. However, as Cabernet blanc is not a fully classified grape variety yet, legal regulations apply and have to be carefully considered [54]. Furthermore, considering the use of Cabernet blanc in *cuvées*, legal regulations also apply to the maximum percentage allowed in a blend when labeled as a Sauvignon blanc wine. The latter is interesting particularly for winemakers in Germany, as up to 15 % in volume might in certain cases be added without the need for declaration [55]. Since legal regulations are subtle and may also vary within the states of a European country or with respect to the international background, a careful study of the underlying regulatory documents is highly suggested.

Conclusions

Based on a selective extraction and enrichment method via a mixed-bed cation-exchange SPE, followed by MDGC–MS analysis, trace-level quantification of MPs in the lower ng L^{-1} concentration range was achieved. Comparing SIM–MS and MS/MS detection revealed for some wines, the presence of interfering co-eluting compounds that could be suppressed by the more selective MS/MS detection mode. Still, matrix effects were severe for some samples, rendering reliable quantification impossible on the low ng L^{-1} level. Applying the proposed analytical method to German Sauvignon blanc wines revealed only low MP concentration levels for most of the investigated vintages. Still, higher MP concentration could be achieved in the final wines when applying cold maceration or stem addition as enological variations. The latter options are particularly promising with the new hybride Cabernet blanc, which seems to possess a higher potential for MP generation than Sauvignon blanc. From the winemakers point of view, the “green” sensory notes that are normally associated with a high typicality of Sauvignon blanc wines can be enhanced by applying cold maceration or stem addition during vinification [51, 52]. However, for the assumptions derived from this work, one should further pursue

Table 3: Influence of cold maceration (CM) and stem addition (SA) on MP concentrations (ng L⁻¹)

Variants	Vintage	IPMP		SBMP		IBMP	
		SIM-MS	MS-MS	SIM-MS	MS-MS	SIM-MS	MS-MS
HD1 control	2007	0.3	<LOD ^a	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
HD2, 3 control	2007	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
HD2 CM	2007	2.8	2.9	0.4	<LOD	8.0	8.4
HD1 control	2008	0.4	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	1.6
HD2 control	2008	0.3	<LOD	<LOD	<LOD	1.1	2.2
HD3 control	2008	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
HD2 CM	2008	0.8	0.7	<LOD	<LOD	1.8	3.0
HD1 control	2009	0.5	0.5	nd	<LOD	<LOD	<LOD
HD1 CM	2009	2.0	1.4	0.9	0.7	4.1	4.6
HD2 CM	2009	1.7	1.4	0.4	<LOD	3.7	4.7
HD2 SA (14 days)	2009	2.3	2.2	0.7	0.7	8.6	9.4
HD1 control	2011	0.9	0.8	<LOD	<LOD	4.6	5.0
HD1 CM	2011	3.4	3.6	0.7	0.8	16.4	15.0
HD1 SA (7 days)	2011	3.6	3.6	0.8	0.8	14.1	14.1
HD1 control CB*	2011	0.6	0.4	0.6	<LOD	9.9	9.9
HD1 CM CB*	2011	0.7	0.5	<LOD	<LOD	14.6	14.7
HD2 control CB*	2011	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	6.8	7.2
HD2 CM CB*	2011	1.0	1.0	0.4	<LOD	20.9	20.3

nd not determined

CB* Cabernet blanc

^a limit of detection

such trials since the underlying database is at present limited, and climatic variations between vintages considerably influence the overall potential for the MP concentrations to be found in the grapes and the wines made thereof.

Acknowledgments E. Gracia-Moreno gratefully acknowledges a grant of the FPU program from the Spanish Government. C. Legrum is grateful to the “Graduiertenförderung des Landes Rheinland-Pfalz” for a PhD scholarship. Furthermore, we are thankful for financial support from the Ministerium für Umwelt, Landwirtschaft, Ernährung, Weinbau und Forsten (MULEWF; Rheinland-Pfalz, Germany). The authors are also thankful for the advice and fruitful discussions on stem addition to Oliver Schmidt, Staatliche Lehr-

und Versuchsanstalt für Wein- und Obstbau, Weinsberg, Germany

Charlotte Legrum, Elisa Gracia-Moreno, Petra Slabizki and Jörg Weiland have contributed equally to this work.

References

1. Maga JA, Sizer CE (1973) Pyrazines in foods. Review. *J Agric Food Chem* 21:22–30
2. Murray KE, Whitfield FB (1975) Occurrence of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in raw vegetables. *J Sci Food Agric* 26:973–986
3. Allen MS, Lacey MJ (1998) Methoxypyrazines of grapes and wines. In: ACS Symposium Series, vol 714. *Chemistry of Wine Flavor*. pp 31–38
4. Harris RLN, Lacey MJ, Brown WV, Allen MS (1987) Methoxypyrazines and wine: Australia V New Zealand Sauvignon blanc. *Aust Grapegrow Winemak* 279:24
5. Lacey MJ, Allen MS, Harris RLN, Brown WV (1991) Methoxypyrazines in Sauvignon blanc grapes and wines. *Am J Enol Viticult* 42:103–108
6. Augustyn OPH, Rapp A, Van Wyk CJ (1982) Some volatile aroma components of *Vitis vinifera* cv. Sauvignon blanc. *S Afr J Enol Vitic* 3:53–60
7. Roujou de Boubee D, Van Leeuwen C, Dubourdiou D (2000) Organoleptic impact of 2-methoxy-3-isobutylpyrazine on red bordeaux and Loire wines. Effect of environmental conditions on concentrations in grapes during ripening. *J Agric Food Chem* 48:4830–4834
8. Allen MS, Lacey MJ (1993) Methoxypyrazine grape flavor: influence of climate, cultivar and viticulture. *Wein-Wiss* 48:211–213
9. Hashizume K, Samuta T (1999) Grape maturity and light exposure affect berry methoxypyrazine concentration. *Am J Enol Viticult* 50:194–198
10. Marais J, Hunter JJ, Haasbroek PD (1999) Effect of canopy microclimate, season and region on Sauvignon blanc grape composition and wine quality. *S Afr J Enol Vitic* 20:19–30
11. Marais J, Calitz F, Haasbroek PD (2001) Relationship between microclimatic data, aroma component concentrations and wine quality parameters in the prediction of Sauvignon blanc wine quality. *S Afr J Enol Vitic* 22:22–26
12. Chapman DM, Thorngate JH, Matthews MA, Guinard J-X, Ebeler SE (2004) Yield effects on 2-methoxy-3-isobutylpyrazine concentration in Cabernet Sauvignon using a solid phase microextraction gas chromatography/mass spectrometry method. *J Agric Food Chem* 52:5431–5435
13. Hunter JJ, Volschenk CG, Marais J, Fouche GW (2004) Composition of sauvignon blanc grapes as affected by pre-veraison canopy manipulation and ripeness level. *S Afr J Enol Vitic* 25:13–18
14. Wheeler SJ, Black AS, Pickering GJ (2005) Vineyard floor management improves wine quality

in highly vigorous *Vitis vinifera* Cabernet Sauvignon in New Zealand. *N Z J Crop Hortic Sci* 33:317–328

15. Pickering GJ, Spink M, Kotseridis Y, Inglis D, Brindle ID, Sears M, Beh AL (2008) Yeast strain affects 3-isopropyl-2-methoxypyrazine concentration and sensory profile in Cabernet Sauvignon wine. *Aus J Grape Wine Res* 14:230–237

16. Diago MP, Vilanova M, Tardaguila J (2010) Effect of timing of manual and mechanical early defoliation on the aroma of *Vitis vinifera* L. tempranillo wine. *Am J Enol Viticult* 61:382–400

17. Scheiner JJ, Sacks GL, Pan B, Ennahli S, Tarlton L, Wise A, Lerch SD, Vanden Heuvel JE (2010) Impact of severity and timing basal leaf removal on 3-isobutyl-2-methoxypyrazine concentration in red winegrapes. *Am J Enol Viticult* 61:358–364

18. Gregan SM, Wargent JJ, Liu L, Shinkle J, Hofmann R, Winefield C, Trought M, Jordan B (2012) Effects of solar ultraviolet radiation and canopy manipulation on the biochemical composition of Sauvignon blanc grapes. *Aus J Grape Wine Res* 18:227–238

19. Scheiner JJ, Vanden Heuvel JE, Pan B, Sacks GL (2012) Modeling impacts of viticultural and environmental factors on 3-isobutyl-2-methoxypyrazine in cabernet franc grapes. *Am J Enol Viticult* 63:94–105

20. Roujou de Boubée D, Cumsille AM, Pons M, Dubourdieu D (2002) Location of 2-methoxy-3-isobutylpyrazine in cabernet Sauvignon grape bunches and its extractability during vinification. *Am J Enol Viticult* 53:1–5

21. Sala C, Busto O, Guasch J, Zamora F (2004) Influence of vine training and sunlight exposure on the 3-alkyl-2-methoxypyrazines content in musts and wines from the *Vitis vinifera* variety cabernet Sauvignon. *J Agric Food Chem* 52:3492–3497

22. Renner W, Leitner E, Eder R (2011) Effect of canopy management and harvest date on soundness of grapes, essential grape contents, and the style of Sauvignon blanc wines. *Mitt Klosterneuburg* 61:65–75

23. Godelmann R, Limmert S, Kuballa T (2008) Implementation of headspace solid-phase-micro-extraction-GC-MS/MS methodology for determination of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in wine. *Eur Food Res Technol* 227:449–461

24. Rajchl A, Cizkova H, Voldrich M, Lukesova D, Panovska Z (2009) Methoxypyrazines in Sauvignon blanc wines, detection of addition of artificial aroma. *Czech J Food Sci* 27:259–266

25. Allen MS, Lacey MJ, Boyd S (1994) Determination of methoxypyrazines in red wines by stable isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 42:1734–1738

26. Harris RLN, Lacey MJ, Brown WV, Allen MS (1987) Determination of 2-methoxy-3-alkylpyrazines in wine by gas chromatography/mass spectrometry. *Vitis* 26:201–207

27. Pickering G, Lin J, Reynolds A, Soleas G, Riesen R (2006) The evaluation of remedial treatments for wine affected by *Harmonia axyridis*. *Int J Food Sci Technol* 41:77–86

28. Pickering GJ, Lin Y, Reynolds A, Soleas G, Riesen R, Brindle I (2005) The influence of *harmonia axyridis* on wine composition and aging. *J Food Sci* 70:S128–S135
29. Cullere L, Escudero A, Campo E, Cacho J, Ferreira V (2009) Multidimensional gas chromatography-mass spectrometry determination of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in wine and must. A comparison of solid-phase extraction and headspace solid-phase extraction methods. *J Chromatogr A* 1216:4040–4045
30. Kotseridis Y, Baumes RL, Bertrand A, Skouroumounis GK (1999) Quantitative determination of 2-methoxy-3-isobutylpyrazine in red wines and grapes of bordeaux using a stable isotope dilution assay. *J Chromatogr A* 841:229–237
31. Kotseridis Y, Beloqui AA, Bertrand A, Doazan JP (1998) An analytical method for studying the volatile compounds of merlot noir clone wines. *Am J Enol Viticult* 49:44–48
32. Hartmann PJ, McNair HM, Zoecklein BW (2002) Measurement of 3-alkyl-2-methoxypyrazine by headspace solid-phase microextraction in spiked model wines. *Am J Enol Viticult* 53:285–288
33. Galvan TL, Kells S, Hutchison WD (2008) Determination of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in lady beetle-infested wine by solid-phase microextraction headspace sampling. *J Agric Food Chem* 56:1065–1071
34. Ryona I, Pan BS, Sacks GL (2009) Rapid measurement of 3-alkyl-2-methoxypyrazine content of winegrapes to predict levels in resultant wines. *J Agric Food Chem* 57:8250–8257
35. Sala C, Mestres M, Marti MP, Busto O, Guasch J (2000) Headspace solid-phase microextraction method for determining 3-alkyl-2-methoxypyrazines in musts by means of polydimethylsiloxane-divinylbenzene fibers. *J Chromatogr A* 880:93–99
36. Ryan D, Watkins P, Smith J, Allen M, Marriott P (2005) Analysis of methoxypyrazines in wine using headspace solid phase microextraction with isotope dilution and comprehensive two-dimensional gas chromatography. *J Sep Sci* 28:1075–1082
37. Koch A, Doyle CL, Matthews MA, Williams LE, Ebeler SE (2010) 2-Methoxy-3-isobutylpyrazine in grape berries and its dependence on genotype. *Phytochemistry* 71:2190–2198
38. Franc C, David F, de Revel G (2009) Multi-residue off-flavour profiling in wine using stir bar sorptive extraction-thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1216:3318–3327
39. Bindon K, Varela C, Kennedy J, Holt H, Herderich M (2013) Relationships between harvest time and wine composition in *Vitis vinifera* L. cv. cabernet Sauvignon 1 grape and wine chemistry. *Food Chem* 138:1696–1705
40. Schmarr H-G, Ganß S, Koschinski S, Fischer U, Riehle C, Kinnart J, Potouridis T, Kutyrev M (2010) Pitfalls encountered during quantitative determination of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in grape must and wine using gas chromatography-mass spectrometry with stable isotope dilution analysis. *Comprehensive two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry and on-line*

liquid chromatography-multidimensional gas chromatography-mass spectrometry as potential loopholes. *J Chromatogr A* 1217:6769–6777

41. Lopez R, Gracia-Moreno E, Cacho J, Ferreira V (2011) Development of a mixed-mode solid phase extraction method and further gas chromatography mass spectrometry for the analysis of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in wine. *J Chromatogr A* 1218:842–848

42. Schmarr H-G, Sang W, Ganß S, Koschinski S, Meusinger R (2011) New insights into the synthesis and characterization of 2-methoxy-3-alkylpyrazines and their deuterated isotopologues. *J Labelled Compd Radiopharm* 54:438–440

43. Sulzbach H (1996) "Il Duomo" Multidimensionale Kapillarsäulen-Gaschromatographie. Ein neuer Weg zur Lösung eines alten Problems. *GIT Fachz Lab* 40:131

44. Marriott PJ, Chin S-T, Maikhunthod B, Schmarr H-G, Bieri S (2012) Multidimensional gas chromatography. *TrAC, Trends Anal Chem* 34:1–21

45. Schmarr H-G, Ganß S, Sang W, Potouridis T (2007) Analysis of 2-aminoacetophenone in wine using a stable isotope dilution assay and multidimensional gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1150:78–84

46. Gracia-Moreno E, Lopez R, Cacho J, Ferreira V (2011) Importance of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in red wines from Spain. Poster presentation, XIII Weurman Flavour Research Symposium, 27–30 Sept 2011, Zaragoza, Spain

47. Kutyrev M (2010) Bestimmung von Methoxypyrazinen in Most und Wein mittels on-line LC-MDGC und Quantifizierung mittels SIDA. Diploma thesis, Technische Universität Kaiserslautern, Germany

48. Ryona I, Leclerc S, Sacks GL (2010) Correlation of 3-isobutyl-2-methoxypyrazine to 3-isobutyl-2-hydroxypyrazine during maturation of bell pepper (*Capsicum annuum*) and wine grapes (*Vitis vinifera*). *J Agric Food Chem* 58:9723–9730

49. Pour Nikfardjam M, Patz CD, Dietrich H (2000) Polyphenolgehalt und antioxidative Kapazität von Weißweinmosten: Einfluss von Mostklärverfahren. *Der Dtsch Weinbau* 20:24–29

50. Wörthmann M (2013) Sauvignon blanc. *Das Dtsch Weinmagazin*:38–39

51. Weiand J, Schmarr H-G (2012) Sauvignon blanc: Grün oder nicht grün, was bestimmt die Aromatik? *Das Dtsch Weinmagazin* (30.06.2013):31–34

52. Weiand J, Schmarr H-G (2013) Sauvignon blanc: grün oder nicht grün? *Der Dtsch Weinbau* (19.04.2013):106–110

53. Wein-Plus.eu (2013) Cabernet Blanc. http://www.wein-plus.eu/de/Cabernet+Blanc_3.0.6816.html. Accessed 11 Oct 2013

54. Commission Regulation, 1234/2009, L 299/1, Off J Eur Union

55. Commission Regulation, 607/2009, L 193/60, Off J Eur Union

2.1.1.3 Diskussion der Unterschiede beider Methoden

Für beide Methoden, die auf der gleichen Trenntechnik beruhen, ergaben sich ähnliche Nachweisgrenzen für die Analyten. Bei der MDGC-Methode mit spezifischerer MS/MS-Detektion (SRM-Modus, s. Abb. 2.2) wären niedrigere Nachweisgrenzen zu erwarten gewesen als bei der MDGC-MS-Methode (SIM-Modus). Der höheren Selektivität der MS/MS steht durch die zweite Fragmentierungsreaktion der Analyten eine Verminderung der Ionenintensität entgegen. Außerdem bietet die Auswahl der Mutterionen auf Grundlage ihrer Fragmentgröße, hier der Molpeak – und nicht auf Grund der höchsten Intensität im Massenspektrum oder des größten Signal-Rausch-Verhältnisses – eine Erklärung für die geringere Empfindlichkeit bei IBMP verglichen mit den anderen beiden MPs in der MS/MS, sowie aller drei MPs gegenüber der SIM-MS-Methode. Dennoch liegen die Nachweisgrenzen beider Methoden hier mit höchstens 1,3 ng/L für IBMP in einer akzeptablen Größenordnung für die Bestimmung von nativen MP-Gehalten aus der Matrix Wein.

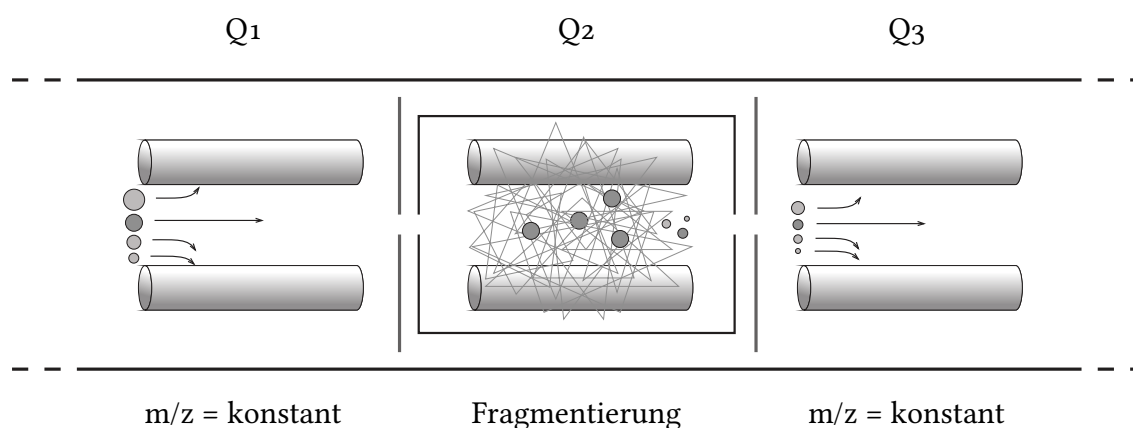


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der Vorgänge beim Selected Reaction Monitoring (SRM) nach [227]: Fragmentationen werden in Q1 selektiv durchgelassen, in der Kollisionszelle Q2 kommt es durch Stöße mit zugeleitetem Kollisionsgas zur weiteren Fragmentierung und aus diesen Fragmenten werden erneut selektiv Fragmente (m/z -Verhältnisse) zum Detektor durchgelassen. Im Gegensatz dazu entfällt bei der SIM-MS an einem Quadrupol die zweite Fragmentierung.

Bei der Anwendung beider Methoden auf die gleichen Wein-Proben sind teilweise deutliche Diskrepanzen aufgetreten, so z. B. ungewöhnlich hohe SBMP und IPMP-Gehalte nach MDGC-MS in einzelnen Proben. Mittels MDGC-MS/MS dagegen wurden meist

niedrigere und, verglichen mit dem Verteilungsmuster der MPs in Wein, auch plausible Gehalte festgestellt (insbesondere SBMP als MinorKomponente [15]). Da allerdings die chromatographischen Systeme beider Methoden nicht identisch sind, können diese Unterschiede nicht unbedingt allein durch die gesteigerte Selektivität der MS/MS-Detektion erklärt werden, sondern auch durch möglicherweise interferierende Co-Elutionen mit den MPs im MDGC-MS-System. Insgesamt bietet die MS/MS-Detektion (im SRM-Modus) gegenüber der SIM-MS eine höhere Selektivität und daher plausible Ergebnisse.

Die Ergebnisse der in dieser Studie untersuchten weinbaulichen und oenologischen Einflüsse sind in Abschnitt 2.2.2, S. 143, und in der Veröffentlichung P1 selbst diskutiert.

2.1.2 P2: Optimierung der MDGC bei Quantifizierung mittels SIDA

2.1.2.1 Schnittfensterlänge und Isotopeneffekt

Die H/C-MDGC eignet sich sowohl zur Spurenanalytik als auch zur Enantiodifferenzierung chiraler Verbindungen aus Substanzgemischen. Für eine verlässliche Quantifizierung in beiden Anwendungsbereichen empfiehlt sich der SIDA. Obwohl durch H/C-MDGC die Komplexität der Probe durch den Transfer ausgewählter Bereiche stark verringert wird, können Co-Elutionen in der zweiten Dimension auftreten und die quantitative Bestimmung der Analyten stören (siehe Abschnitt 2.1.1 und [176]). Um das Risiko für Co-Elutionen in ^2D und damit das Störpotential für die Quantifizierung zu minimieren, sollte außer den Zielkomponenten ein möglichst geringer Proben transfer aus ^1D stattfinden. Der Proben transfer erfolgt zeitlich gesehen in sogenannten Schnittfenstern, die alle zur Quantifizierung nötigen Substanzpeaks vollständig erfassen sollten. Bei Anwendung des SIDA kann eine Minimierung der zeitlichen Ausdehnung dieses *heart-cuts* zur Reduktion von Matrix in ^2D von Vorteil sein. Ein Anschneiden der Peaks von Analyten und internen Standards, also ein partieller Transfer, sollte in jedem Falle vermieden werden, da das Mengenverhältnis beider Substanzen dann nicht mehr repräsentativ für die Probe und damit ungeeignet für eine Quantifizierung ist. Zur Vermeidung eines Anschchnitts werden gezielte Sicherheitsabstände um die Substanzpeaks vorgeschlagen.

Vorraussetzung für eine Optimierung der Schnittfenster bei gleichzeitiger Anwendung des SIDA ist das Wissen über den Isotopeneffekt der Analyten und isotopologen Analoga auf chemisch verschiedenen stationären Phasen. Auf apolaren Silikonphasen und besonders bei deuterierten Analoga tritt häufig der inverse Isotopeneffekt auf, was bedeutet, dass das mit Deuterium markierte Molekül mit höherer Molekülmasse *vor* dem nicht-markierten eluiert [228, 229]. Ändert sich die Polarität der stationären Phase und damit auch die möglichen Wechselwirkungen mit den Analyten, so kann der Isotopeneffekt von invers (auf apolaren Phasen) bis hin zu normal (auf stark polaren Phasen) umschlagen. Seit Einführung der sogenannten ionischen Flüssigkeiten als stationäre Phasen in der GC ist eine große Bandbreite an sehr polaren Trennphasen verfügbar, die sich hinsichtlich des Isotopeneffekts teilweise unvorhersehbar verhalten. Der Isotopeneffekt auf ionischen Flüssigkeiten wurde für ausgewählte Wein-relevante Analyten untersucht [230].

Für Studien zur Optimierung von Schnittfensterlängen wurde ein MDGC-System mit zwei Öfen verwendet. Als stationäre Phase in ^1D kam eine mittel-polare ionische Flüssigkeit (1,12-Di(triäthylphosphonium)dodecan-bis(trifluoromethylsulfonyl)imid) zum Einsatz (SLB-IL60, Sigma-Aldrich, s. Abb. 2.3), die in früheren Versuchen ([230]) für IPMP eine Co-Elution mit dem dreifach deuterierten Analogon bewirkte. Für die weiteren MPs mit ihren ebenfalls in der Methoxygruppe dreifach deuterierten Analoga ist ein identischer Isotopeneffekt zu erwarten, was sich durch die Co-Elution aller drei MPs mit ihren Isotopologen instrumentell bestätigen ließ.

In ^2D wurde die enantioselektive Trennsäule auf Grundlage des chiralen Selektors Oktakis(2,3-di-*O*-pentyl-6-*O*-methyl)- γ -cyclodextrin (Lipodex G[®]) eingesetzt. Zur Detektion wurde ein Quadrupol-MS mit EI+ und 70 eV wahlweise im Scan- oder im SIM-Modus genutzt.

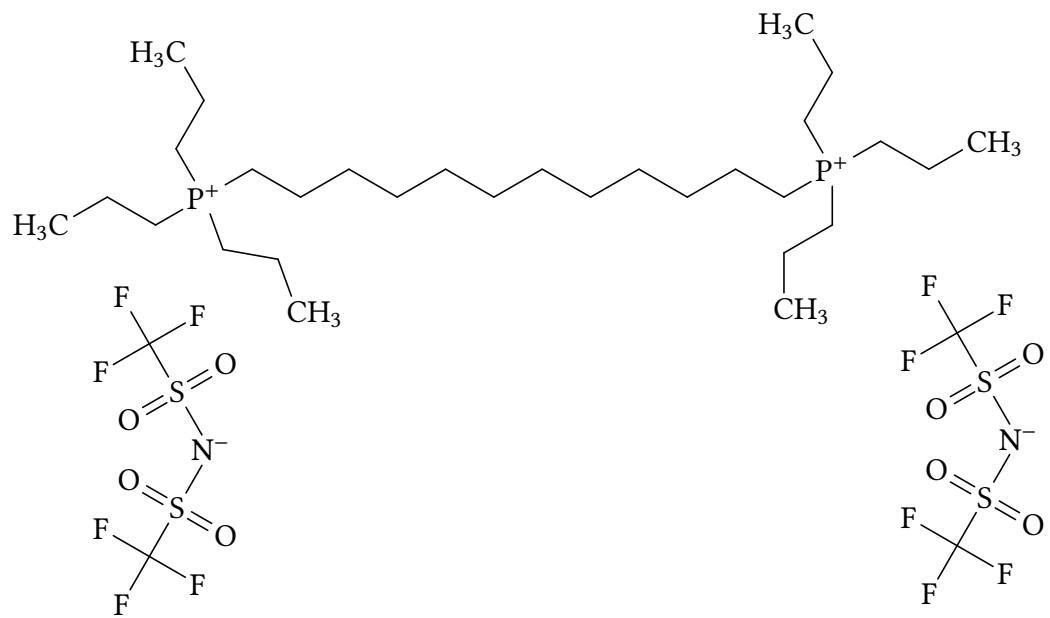


Abbildung 2.3: Strukturformel von SLB-IL60

2.1.2.2 Manuskript P2 zur Optimierung der MDGC

Titel: Optimization in multidimensional gas chromatography
applying quantitative analysis via a stable isotope
dilution assay

Autoren: Hans-Georg Schmarr, Petra Slabizki, Charlotte Legrum

Publiziert in: Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2013. 405(20): S. 6589–6593
Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

DOI: 10.1007/s00216-013-7072-1

Hyperlink: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00216-013-7072-1>

Manuskript reproduziert mit Erlaubnis von Springer Nature, Lizenz Nummer 4467220602599 vom
13.11.2018.

Optimization in multidimensional gas chromatography applying quantitative analysis via a stable isotope dilution assay

Abstract

Trace level analyses in complex matrices benefit from heart-cut multidimensional gas chromatographic (MDGC) separations and quantification via a stable isotope dilution assay. Minimization of the potential transfer of coeluting matrix compounds from the first dimension (¹D) separation into the second dimension separation requests narrow cut-windows. Knowledge about the nature of the isotope effect in the separation of labeled and unlabeled compounds allows choosing conditions resulting in at best a co-elution situation in the ¹D separation. Since the isotope effect strongly depends on the interactions of the analytes with the stationary phase, an appropriate separation column polarity is mandatory for an isotopic co-elution. With 3-alkyl-2-methoxypyrazines and an ionic liquid stationary phase as an example, optimization of the MDGC method is demonstrated and critical aspects of narrow cut-window definition are discussed.

Introduction

Complex matrices are a core application field for multidimensional capillary gas chromatography (MDGC) particularly in trace level analysis. MDGC is an established and important tool, as it selectively allows the transfer of the targeted analytes with eventually co-eluting matrix compounds from a first dimension (¹D) separation into a second dimension (²D) separation, then choosing a column of different (preferably orthogonal) polarity. Compared to comprehensive two-dimensional chromatographic techniques, MDGC involves only a limited number of often called heart-cut transfers into ²D; thus, it belongs to the hyphenated techniques and can occasionally be found as GC-GC in literature. Furthermore, enantiodifferentiation of chiral compounds is usually done via MDGC methods, hyphenating an enantioselective (²D) separation column with an achiral pre-separation column in ¹D. Such an achiral pre-separation allows the selective transfer (cut) of the chiral compound of interest to be further analyzed in ²D. Both heart-cut and comprehensive multidimensional techniques have recently been reviewed [1].

For quantitative analysis in GC, the idea of using internal standards based on stable isotope-labeled compounds is not new and represents the method of choice in many of today's applications. It is found particularly in food and flavor analysis, but also in environmental and other trace level applications. This approach is often called stable isotope dilution assay (SIDA) in literature. Its principle, application fields, and the historical background have been summarized [2]. In the course of MDGC method development, particularly with respect to optimizing the fraction to be transferred from the ^1D to the ^2D separation column, the chromatographic behavior of labeled and unlabeled compounds has to be considered. Using conventional apolar silicone stationary phases, one often realizes an elution pattern in which the labeled compound elutes earlier than the unlabeled compound. This is particularly pronounced when deuterium is used for labeling the standards. Such deuterated compounds are often used in SIDA, as they are accessible and relatively inexpensive compared to, e.g., ^{13}C -labeled compounds. The before described elution order in which the isotopic labeled compound elutes earlier is referred to as the *inverse* isotope effect. The opposite elution order is referred to as the *normal* isotope effect. Depending on the amount of isotopic labeling and molecular structure, even a baseline resolved separation of labeled and unlabeled compounds is not unusual. However, such behavior is not preferred when a ^1D cut-window has to be optimized with respect to a minimal transfer of eventually co-eluting and thus potentially disturbing (in ^2D) matrix compounds. With the introduction of ionic liquids (ILs) as separation columns in GC, a large and very polar range of new stationary phases has been made available lately. The nature of the isotope effect as such and on IL stationary phases in particular has recently been discussed [3]. It could be shown that careful choice and optimization of an appropriate combination of deuterium-labeled compound and stationary phase polarity allow shifting the isotope effect from inverse (on an apolar column) to normal (on a very polar column). Besides the above-cited study on ionic liquid stationary phases, an according shift of the nature of the isotope effect may be observed on other (polar) stationary phases as well, depending on the individual molecular interactions. In the work described here, we would like to discuss the optimization of a cut-window (in the pre-separating ^1D column) using an ionic liquid stationary phase and 3-alkyl-2-methoxypyrazines as example for both targeted trace level as well as enantioselective GC analysis.

Materials and methods

A solid phase microextraction (SPME) fiber (50/30 μm divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane), galbanum oil, 3-iso-propyl-2-methoxypyrazine (IPMP; > 97 %), 3-sec-butyl-2-methoxypyrazine (SBMP; > 97 %), and 3-isobutyl-2-methoxypyrazine (IBMP; > 97 %) were obtained from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). [$^2\text{H}_3$]-IPMP (d_3 -IPMP), [$^2\text{H}_3$]-SBMP (d_3 -SBMP) and [$^2\text{H}_3$]-IBMP (d_3 -IBMP; deuterium in methoxy group for d_3 -MPs) had been synthesized in-house as described earlier [4].

MDGC analysis

A “Moving Capillary (Column) Stream Switching” system was used for heart-cut MDGC as described previously [5]. Basically, two C.E. Instruments 8000 series GC systems (today ThermoFisher Scientific, Dreieich, Germany) were coupled with a heated transfer line, which was set to 200 °C. The achiral ^1D column consisted of a 30 m \times 0.25-mm i.d. fused silica capillary, coated with a mid-range polarity ionic liquid stationary phase (SLB-IL60, Sigma-Aldrich) of 0.2- μm film thickness. Carrier gas used was helium at a constant inlet pressure of 165 kPa (P1; for details see [5]) and 110 kPa (P2). Temperature for ^1D column was programmed from 40 °C (2 min hold) with 4 °C min^{-1} to 122 °C, then with 15 °C min^{-1} to 200 °C (5 min hold). Detection was via a flame ionization detector (FID) set to 220 °C and injection was in splitless mode (120 s) at 230 °C. A phenylmethyl-deactivated fused silica capillary (1 m \times 0.25 mm i.d.) connected the ^1D column with the column in the ^2D oven. This ^2D column consisted of a 25 m \times 0.25-mm i.d. fused silica capillary, coated with Lipodex G[®], based on octakis(2,3-di-*O*-pentyl-6-*O*-methyl)- γ -cyclodextrin as the chiral selector (Macherey-Nagel, Düren, Germany). Temperature was programmed from 40 °C (22 min hold) with 30 °C min^{-1} to 60 °C (5 min hold), then with 1 °C min^{-1} to 80 °C, finally heated with 30 °C min^{-1} to 200 °C (5 min hold). The actual inlet pressure was given at the read-out on the pressure gauge P2* and was at 85 kPa. Detection at the end of the ^2D separation was with a quadrupole mass spectrometer (TraceMS, ThermoFisher Scientific). Positive electron ionization mode was used at 70 eV. The MS scan range was set at m/z 29–250 or for trace level analysis using selected ion monitoring of the base peaks of the MPs. Data acquisition was performed via Xcalibur software, version 1.2 (ThermoFisher Scientific). A CombiPAL system (CTC, Zwingen, Switzerland), suiting

automated headspace SPME (HS-SPME), was used for extraction which was done for 10 min at 50 °C and sample injection (2 min desorption period).

Results and discussion

Polarity tuning in ¹D allows minimization of MDGC cut-windows

In a classical method development for MDGC, one has to consider the peak profile, particularly the peak width at base for defining the beginning and the end of the peak transfer window in time (cut-window). A complete transfer of a peak relies on the peak width also including peak tailing. Taking a peak width of about 6 s, a cut-window should be set with some respect to retention time drifts or changes in the peak profile with a minimum of an additional safety margin of the same peak width. Here, another 6 s at the front and 6 s at the end of the peak profile are advised. In this example, we end up in a total of 18 s as cut-window. Reasons for changes of the peak profile or minor retention time drifts can be manifold, but concentration-dependent peak broadening, injection-related effects, co-eluting components of various concentrations, and chemical nature (particularly seen in real samples) are the important ones to mention here. With respect to deuterated internal standards used in SIDA, the additional peak width and its elution in relation to the target analyte have to be considered carefully. In a previous study, we have shown baseline separation for IPMP and d₅-IPMP on an apolar phenylmethyl silicone (ZB5) stationary phase revealing a strong inverse isotope effect [3]. Such a baseline separation would add another 6 s to a cut-window in our above-mentioned example, which simply increases the risk of transferring co-eluting compounds in an MDGC application. For the extremely polar SLB-IL₁₁₁ stationary phase, a pronounced normal isotope effect had even been encountered. Although not baseline separated, this is not desirable either. Interestingly, a mid-range polarity ionic liquid stationary phase like SLB-IL₅₉ or SLB-IL₆₀, the latter applied in this work, showed co-elution of the isotopic compounds. Thus, no isotope effect was observed. This allows narrowing the cut-window for the transfer of such a pair of target compounds to the minimum of 18 s.

Advantages and disadvantages of narrow cut-windows in ¹D

The analysis of the IPMP, SBMP, and IBMP fraction from a galbanum essential oil via HS-SPME-MDGC is presented in Fig. 1. Comparing a wide and narrow cut-window (Fig. 1b)

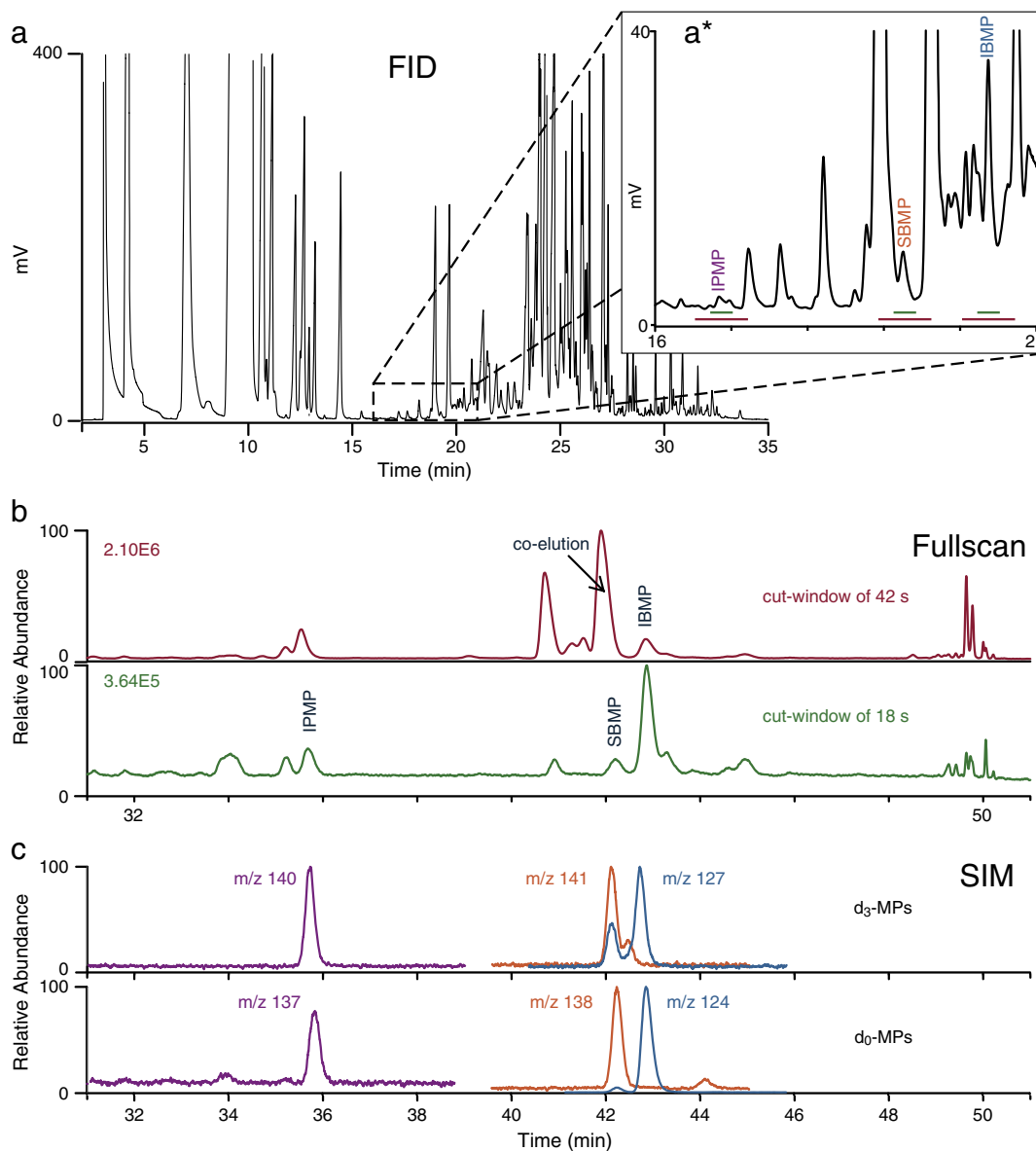


Figure 1: Enantioselective MDGC analysis of MPs in galbanum oil via HS-SPME. **a** ¹D Separation on SLB-IL60 as pre-column; **a*** cut-windows. **b** Separation on enantioselective ²D column (Lipodex G[®]), upper trace with 42 s cut-windows (each) or 18 s (lower trace); absolute scaling intensities given for estimation of real peak size. **c** Quantification on narrow, 18 s cut-windows via quantifier ions: m/z 137 (140), 138 (141), and 124 (127) for IPMP (d₃-IPMP), SBMP (d₃-SBMP), and IBMP (d₃-IBMP), respectively. Conditions as described in “Materials and methods” section

demonstrates the increase in selectivity with narrow cutwindows. With a transfer of 42 s, a major co-eluting peak is seen at the retention of SBMP, which is not transferred with a transfer period of only 18 s. The latter situation is best suited for SIDA quantification as shown in Fig. 1c. However, considering a SIDA application, one also has to question as to how far cut-windows can be narrowed. In Fig. 2, results are presented for peak area ratios of unlabeled and labeled MPs. The area ratios for a complete transfer differ from those cutting at the front or rear of the co-eluting peaks (Fig. 2a, b). Obviously, a higher amount of the deuterated (d_3 -MP) was transferred with the front cut, reducing the area ratio. Starting the transfer (cut) at the rear of the 1D peak yields higher area ratios. These results imply a non-perfect co-elution in 1D , although the peak profile had not shown any shoulder (with FID as detector). This tells us to strictly avoid such partial cuts in a quantitative MDGC analysis based on the SIDA approach. Otherwise, erroneous quantitative data may be the outcome of such a situation. With the chiral compound SBMP, the peak area ratio for (*S*)/(*R*)-enantiomers is not significantly changed (Fig. 2c). The latter reveals that only the 2D separation occurs with enantioselective specificity.

Conclusion

Optimization in quantitative MDGC applications based on a SIDA approach may be done with respect to the nature of the isotope effect. This effect is particularly pronounced with deuterated isotopic standards and ranges from inverse to normal, depending on the polarity of the stationary phases used. The ideal optimization with respect to a narrow cut-window in 1D is a chromatographic pre-separation without a noticeable isotope effect. Such a co-elution situation of labeled and unlabeled compound can be realized with polarity tuning in the 1D separation, eventually considering the wide polarity range available with modern ionic liquid stationary phases. However, with samples in which analyte concentrations vary over a certain magnitude, one has to be aware of the concentration-dependent peak widths in general. In such situations, an excessively narrow cut-window in 1D has to be avoided. Particularly for SIDA-based quantitative MDGC analysis, one must not overdo narrowing of the cut-window, as a partial transfer of the labeled and unlabeled compound may result in erroneous quantitative data. As long as the 1D separation occurs with an achiral stationary phase, results obtained for an enantio- MDGC analysis (enantioselective 2D separation) are not influenced by a partial cut of the 1D peak.

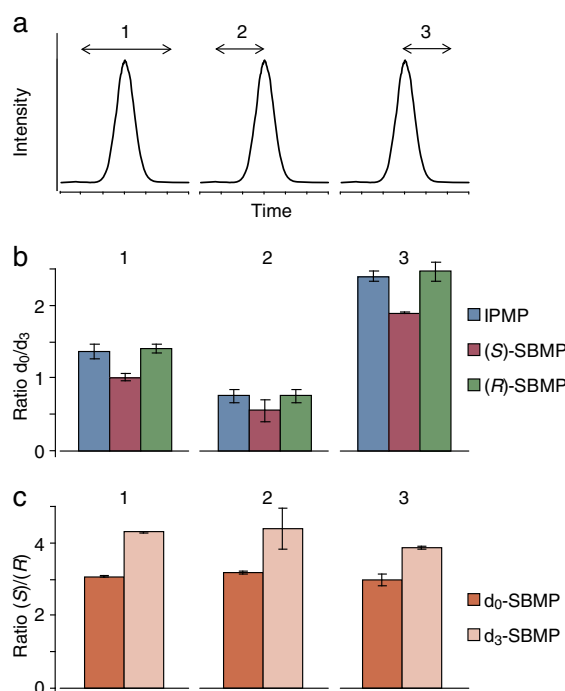


Figure 2: Consequences of complete or partial transfer in MDGC analysis. **a** Co-eluting isotopic MPs in ^1D allow narrow cut-windows, but complete or partial transfer conditions (as indicated by the arrows) must be considered. **b** Influence on peak area ratios of unlabeled/labeled MP ($n=2$). **c** Influence on peak area ratios for (S)/(R)-SBMP ($n=2$). Conditions as described in “Materials and methods” section

Acknowledgments The authors are particularly grateful to Supelco (Sigma-Aldrich; SILEP program) for the ionic liquid separation columns evaluated in this work. C. Legrum is grateful to the “Graduiertenförderung des Landes Rheinland-Pfalz” for a Ph.D. scholarship. Also, financial support from the Ministerium für Umwelt, Landwirtschaft, Ernährung, Weinbau und Forsten (Rheinland-Pfalz, Germany) is gratefully acknowledged.

Hans-Georg Schmarr and Charlotte Legrum contributed equally to this work.

References

1. Marriott PJ, Chin S-T, Maikhunthod B, Schmarr H-G, Bieri S (2012) Multidimensional gas chromatography. *TrAC, Trends Anal Chem* 34:1–21
2. Rychlik M, Asam S (2009) Stabilisotopenverdünnungsanalysen zur Quantifizierung organischer Spurenkomponenten in der Lebensmittelanalytik. *Umweltwiss Schadst-Forsch* 21(5):470–482
3. Schmarr H-G, Slabizki P, Müntnich S, Metzger C, Gracia-Moreno E (2012) Ionic liquids as novel stationary phases in gas liquid chromatography: inverse or normal isotope effect? *J Chromatogr A* 1270:310–317
4. Schmarr H-G, Sang W, Ganß S, Koschinski S, Meusinger R (2011) New insights into the synthesis and characterization of 2-methoxy-3-alkylpyrazines and their deuterated isotopologues. *J Labelled Compd Radiopharm* 54(8):438–440
5. Schmarr H-G, Ganß S, Sang W, Potouridis T (2007) Analysis of 2-aminoacetophenone in wine using a stable isotope dilution assay and multidimensional gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1150(1–2):78–84

2.1.2.3 Vorteile zeitlich kurzer Schnittfenster

Ausgehend von einer in der GC üblichen Peakbreite (Basispeakbreite, entsprechend der vierfachen Standardabweichung der Normalverteilung, 4σ [231]) von ca. 6 s wurden für das Setzen von Schnittfenstern (Dauer des Probentransfers) in der MDGC zusätzliche Sicherheitszeitfenster von jeweils 6 s vor und hinter dem Analytenpeak als sinnvoll erachtet (insgesamt also drei mal 6 s für den Transfer eines Substanzpeaks). Ein solcher Sicherheitsabstand soll Retentionszeitdrifts, z. B. durch Varianzen bei der Injektion oder durch Co-Elutionen, sowie Veränderungen im Peakprofil, insbesondere die konzentrationsabhängige Peakverbreiterung, abfangen und einen vollständigen Analytentransfer sicherstellen.

Für die isotopologen Standards sollten konsequenterweise die gleichen Sicherheitsabstände gelten. Bei einer Basislinien-Trennung von Analyten und Standards würde zum Schnittfenster von 18 s für einen Peak also noch einmal eine Peakbreite (hier 6 s) addiert. Um diese Verlängerung der Schnittfenster zu vermeiden, wäre also eine Co-Elution von Analyt und isotopologen Standard ideal. Im Fall der Co-Elution (wie für MPs und ihre Isotopologen auf den stationären Phasen SLB-IL60 und SLB-IL59 beobachtet) muss kein zusätzlicher Sicherheitsabstand addiert werden, es bleibt bei 18 s. Diese beiden beschriebenen Szenarien, die das Festlegen eines Schnittfensters beeinflussen, sind in Abb. 2.4 schematisch dargestellt.

Für die eigenen Studien wurden der kurzen Schnittfensterlänge von 18 s als *worst-case*-Szenario Schnittfenster von 42 s gegenübergestellt. Diese Länge ergibt sich aus der Annahme einer deutlichen Trennung von Analyt und Standard (es werden dafür drei Peakbreiten von je 6 s angenommen) plus je 12 s vor und hinter den Substanzpeaks (s. Abb. 2.5).

In einem Versuch wurden bei der HS-SPME MDGC-Analyse von Galbanumöl, welches IPMP, SBMP und IBMP nativ enthält, jeweils kurze (18 s) und lange (42 s) Schnittfenster im Vergleich angewendet (genauere Angaben und Chromatogramme s. Publikation P2 in Abschnitt 2.1.2.2). Bei den langen Schnittfenstern wurde aus Galbanumöl generell mehr Probenlast in ^2D und bei SBMP eine deutliche Co-Elution festgestellt. Diese bewirkte eine Verkürzung der Elutionszeit von SBMP um etwa 12 s und eine deutliche Überlagerung des Massenspektrums (im Scan Modus). Bei programmgestützter Peak-Erkennung und -Integration vermag eine so deutliche Retentionszeitverschiebung eines

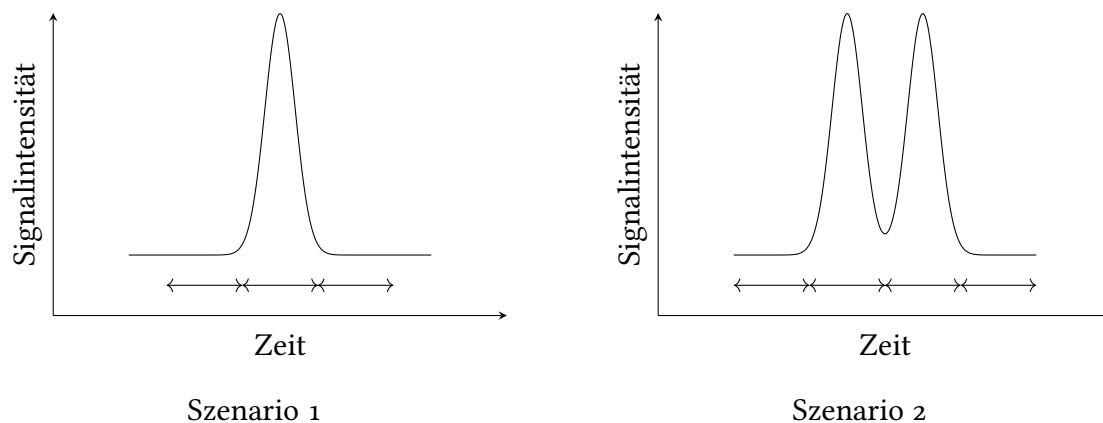


Abbildung 2.4: Zwei Szenarien bei der Ermittlung der Schnittfensterlänge in der MDGC aus den Peakbreiten und gleich langen Sicherheitsabständen davor und dahinter, durch Pfeile dargestellt: 1) Peak einer Substanz oder Co-Elution von Analyt und Standard, 2) Isotopeneffekt mit Basislinientrennung von Analyt und Standard

Substanzpeaks und die Veränderung der Fragmentionen-Verhältnisse falsch Negative oder Verwechslungen in der Zuordnung zu erzeugen. Je nach Fragmentierungseigenschaft und Mengenüberschuss der co-eluierenden Substanz kann eine Veränderung der Ionisierungsausbeute der Analyten im MS und auch dadurch eine mehr oder weniger große Störung der Massenspuren der Analyten eintreten. Kurze Transferfenster, die den Eintrag störender Komponenten in ^2D minimieren, wie an Galbanumöl mit 18 s Schnittfensterlänge zu sehen, steigern also die Freistellung der Analyten und bieten die Grundlage für eine verlässliche Quantifizierung mittels SIDA.

2.1.2.4 Grenzen der Minimierung von Schnittfensterlängen

Um die Grenzen der Schnittfensterverkürzung zu untersuchen wurden die co-eluierenden Analyten- und Standardpeaks von IPMP und SBMP gezielt angeschnitten. Beim Transfer des vorderen Peakteils (Anfang bis Mitte) wich das Peakflächenverhältnis Analyt/interner Standard im Vergleich zum vollständig transferierten Peak nach unten ab. Der hintere Peakteil (Mitte bis Ende) hatte folglich ein höheres Verhältnis. Hieraus lässt sich schließen, dass die Analyten mit ihren Isotopologen in ^1D nicht genau co-eluieren, sondern ein leichter inverser Isotopeneffekt auftritt, auch wenn dieser an der Peakform in ^1D nicht zu

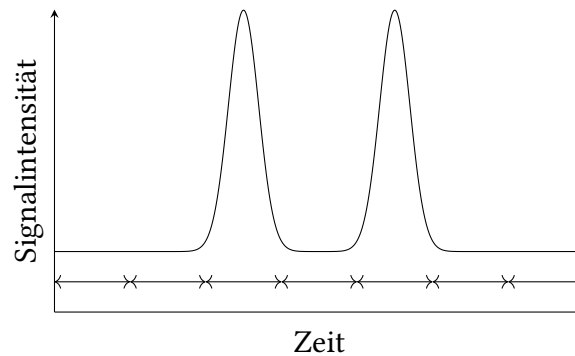


Abbildung 2.5: Theoretisches *worst case*-Szenario bei der Ermittlung von Schnittfensterlängen durch deutliche Trennung von Analyt und Standard und doppelte Sicherheitsabstände vor und hinter den Peaks

erkennen ist. Wie dieses Beispiel zeigt sollte bei Verwendung des SIDA gerade im Falle der nicht exakten Co-Elution von Analyt und Standard ein partieller Anschnitt beim Transferieren vermieden werden. Für die Minimierung der Schnittfensterlänge ist daher eine Berücksichtigung von Sicherheitsabständen unerlässlich.

Wird nach der Trennung in ²D das Verhältnis der Enantiomere des SBMPs zueinander betrachtet, so ergeben sich für die drei verschiedenen Szenarien des Transfers (ganzer Peak, vorderer Teil, hinterer Teil) keine Unterschiede. Dies verdeutlicht, dass in ¹D eine rein achirale Trennung stattfindet und ausschließlich die ²D-Trennphase enantioselektive Spezifität gegenüber SBMP besitzt. Für die Bestimmung von Enantiomerenverhältnissen sind Anschnitte der Analytenpeaks in ¹D zwar nicht verfälschend, sollten aufgrund anderer Nachteile wie reduzierte Substanzmengen in ²D dennoch vermieden werden.

2.1.3 P₃: Enantioselektive multidimensionale und umfassende zweidimensionale Methoden

Um eine abgesicherte Enantiodifferenzierung durchführen zu können, müssen Standards der Enantiomere vorliegen oder hergestellt werden und diese chemisch charakterisiert sein. Außerdem müssen geeignete chirale Selektoren für die stationären Trennphasen ermittelt werden, sowie die geeigneten Bedingungen für eine Auftrennung der Enantiomere in der GC. Im Rahmen dieser Arbeit war für diese Aufgabenstellung die Literaturrecherche zielführend. Im Jahr 1990 veröffentlichten Mihara *et al.*, dass SBMP in Galbanumöl ausschließlich in (*S*)-Konfiguration vorliegt, was über geeignete NMR-Techniken und den Vergleich mit den synthetisierten Enantiomeren zu belegen gelang [108]. In einer späteren Arbeit fanden Bungert *et al.* einen chiralen Selektor und Bedingungen, die zur gaschromatographischen Trennung von racemischem SBMP führten. Anhand geeigneter Referenzsubstanzen wurde die Elutionsreihenfolge als (*S*)- vor (*R*)-SBMP festgestellt [100, 110].

In der folgenden Publikation wird die Entwicklung von enantioselektiven gaschromatographischen Methoden unter Berücksichtigung der durch die Literatur gewonnenen Informationen beschrieben.

2.1.3.1 Manuskript P3 zu enantioselektiven multidimensionalen GC-Methoden

Titel: Enantiodifferentiation of 3-sec-butyl-2-methoxypyrazine in different species using multidimensional and comprehensive two-dimensional gas chromatographic approaches

Autoren: Charlotte Legrum, Petra Slabizki,
Hans-Georg Schmarr

Publiziert in: Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2015. 407(1): S. 253–263
Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

DOI: 10.1007/s00216-014-8061-8

Hyperlink: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00216-014-8061-8>

Manuskript reproduziert mit Erlaubnis von Springer Nature, Lizenz Nummer 4467220955501 vom 13.11.2018.

Enantiodifferentiation of 3-*sec*-butyl-2-methoxypyrazine in different species using multidimensional and comprehensive two-dimensional gas chromatographic approaches

Abstract

With respect to the current hypothesis that natural amino acids may serve as starting material for the biosynthesis of alkyl-methoxypyrazines, the enantiomeric distribution of the potent aroma compound 3-*sec*-butyl-2-methoxypyrazine (SBMP) was determined in various species using heart-cut multidimensional gas chromatography (H/C MDGC) or comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC×GC). Complementary to an earlier described separation on octakis-(6-*O*-methyl-2,3-di-*O*-pentyl)- γ -cyclodextrin used as chiral stationary phase, we found a reversal of the elution order of SBMP enantiomers on heptakis-(2,3-di-*O*-methyl-6-*O*-tert-butyl-dimethylsilyl)- β -cyclodextrin, providing further confirmation options for that type of analysis. Optimization of the enantioseparation of SBMP in a single-oven H/C enantio-MDGC system involved the use of a dual-jet cryo modulator for trapping of analytes transferred from the achiral ¹D column to the chiral ²D column before starting the ²D enantioseparation with an independent temperature ramp. For the enantiodifferentiation by enantio-GC×GC, the modulation period had to be significantly shortened to avoid loss of chiral resolution gained in ¹D. H/C MDGC with mass spectrometric detection (MS) using selected ion monitoring (SIM) was sufficient for parts per billion level analysis, whereas H/C MDGC-MS/MS or GC×GC time-of-flight (TOF) MS were necessary for parts per trillion level analysis. In various vegetables, lady beetles and *Vitis vinifera* species analyzed, only (*S*)-SBMP was detected, supporting the hypothesis of natural amino acids serving as starting material for the biosynthesis of alkyl-methoxypyrazines.

Introduction

3-Alkyl-2-methoxypyrazines (MPs) have early been identified in foodstuffs of plant origin as potent and aroma relevant compounds, contributing significantly to the characteristic sensory impression of products made thereof [1, 2]. Of particular interest are 3-isobutyl-2-methoxypyrazine (IBMP), 3-isopropyl-2-methoxypyrazine (IPMP), and 3-*sec*-butyl-2-methoxypyrazine (SBMP) as they are often the dominating and flavor relevant MPs.

In some *Vitis vinifera* grape varieties such as Cabernet sauvignon or Sauvignon blanc and accordingly the wines made from such varieties, IBMP is the major MP [3]. SBMP dominates in vegetables, such as beetroot or carrot, whereas IPMP dominates in peas and cucumber [2].

With respect to the wine industry or the wine consumer, the sensory attributes of wines made, e.g., from Sauvignon blanc are often described by green, grassy and herbaceous notes, resembling green bell pepper or green asparagus. The reason for MPs being that important and characteristic for a wine flavor originates from their low sensory detection thresholds. These had been described to be in the low nanogram per liter range (e.g., 1–2 ng L⁻¹ of IBMP in a white wine [4], or about 15 ng L⁻¹ in red wine [5]). In *V. vinifera* wines, IBMP represents approximately 80 % of the total MP content, with lesser amounts of IPMP or even SBMP [3, 4]. Depending on variety, viticultural, and enological treatments, MP concentrations found in wines range from low nanogram per liter to some 20 ng L⁻¹, with SBMP usually being at or below 1 ng L⁻¹ [6–8]. Whilst SBMP is the least abundant MP in *V. vinifera*, its concentration in vegetables can reach levels of hundreds of nanograms per kilogram [2, 9]. During the last decade, winemakers had to face an upcoming problem related to MPs originating from the multicolored Asian lady beetle *Harmonia axyridis* or from the seven-spot lady beetle *Coccinella septempunctata* [10]. Complex off-odors may be found in affected juice and wine that are related to the occurrence of various MPs originating from the bugs harvested together with the grapes. In literature, this off-flavor is described as “ladybug taint” [11].

The formerly putative last step in the proposed biosynthetic pathway(s) for the generation of MPs in nature was clarified with the identification of an *S*-adenosyl-L-methionine (SAM) dependent enzyme for *O*-methylation of 2-hydroxy-3-alkylpyrazine(s) in *V. vinifera* grapes (an *O*-methyl transferase; OMT) by Hashizume et al. [12, 13]. Later, Dunlevy et al. further investigated the genetic background for this enzymatic step [14–16] and identified OMT genes, subsequently named *V. vinifera* OMTs (*VvOMTs*), responsible for the final step in methoxypyrazine synthesis in grape berries. In the study of Dunlevy et al., different catalytic activity against individual 2-hydrox-3-alkylpyrazines were observed, that may explain varying patterns amongst the MPs found in nature [15]. In another study, the same group found that a particular *VvOMT* was not expressed in *V. vinifera* Pinot varieties, possibly explaining why MPs do not contribute to the aroma of all *V. vinifera* varieties [14]. Still, the initial step discussed for the biogenesis of pyrazines or MPs, that considers

naturally occurring amino acids as starting material [17–21] is not fully explored yet. With the before-mentioned hypothesis in mind, L-isoleucine should thus be the starting material for the SBMP biosynthesis, eventually resulting in (*S*)-configured SBMP. To the best of the authors knowledge there had been only few incidences described in literature that studied the enantiomeric distribution of SBMP in a natural product. Mihara et al. isolated SBMP from Galbanum oil and revealed that it was 100 % (+)-(*S*)-SBMP, using chiral lanthanide shift reagents and nuclear magnetic resonance spectroscopy (¹H-NMR) as analytical techniques [22, 23]. They also synthesized the individual enantiomers and performed a sensory evaluation of the individual (*R*)- and (*S*)-SBMP that did not show a significant difference for the odor quality of the two enantiomeric forms. However, they found a difference in their odor threshold (0.01 and 0.1 ppb in water for (*R*)- and (*S*)-SBMP, respectively) [23, 24]. Later, Bungert and co-workers described the enantiodifferentiation of SBMP from the marine bacterium *Halomonas venusta* by gas chromatography with mass spectrometric detection (enantio-GC-MS) using octakis-(6-*O*-methyl-2,3-di-*O*-pentyl)- γ -cyclodextrin as chiral stationary phase [21]. The elution order of the SBMP enantiomers had been described to be (*S*) before (*R*) [25].

Most analytical methods developed for the measurement of MPs use GC, either in conjunction with MS [26] or nitrogen-phosphorus selective detection (NPD) [27]. Sample preparation methods described in literature are manifold, but since the introduction of SPME, many authors developed methods based on this technique as, e.g., investigated by Hartmann et al. [28]. Whereas minimum detection levels often achieved vary between some 0.2 and 2 ng L⁻¹ for IBMP, the natural levels found for IPMP and particularly of SBMP are often below the described detection limits of many methods. Furthermore, interfering matrix compounds have led to the use of coupled chromatographic techniques for MP analysis, such as heart-cut multidimensional GC (H/C MDGC) [9,29, 30] or comprehensive two-dimensional GC (GC \times GC). Ryan et al. successfully described the application of HS-SPME-GC \times GC with either NPD or time-of-flight MS (TOF-MS) detection for trace-level MP analysis for the first time [31], followed recently by Ryona et al. [32] who investigated MPs in grape berries and wine. Both groups had used a stable isotope dilution assay (SIDA) approach for quantification that had already been described in one of the first applications for quantitative MP analysis in wine [26].

In our study described here, we wanted to evaluate the naturally occurring enantiomeric composition of SBMP in *V. vinifera* grape varieties, various vegetables, as well as in lady-

bug species (*H. axyridis* and *C. septempunctata*) in order to supply additional information with respect to the hypothesis of MPs originating from the natural amino acid pool. Based on previous experiences with co-elution problems we evaluated both H/C MDGC-MS and GC×GC-MS as analytical techniques for enantiodifferentiation of SBMP on parts per billion ($\mu\text{g kg}^{-1}$ in, e.g., vegetables) and parts per trillion (ng L^{-1} in grape juice) levels.

Materials and methods

Ethanol, dichloromethane, and sodium chloride were from Carl Roth (Karlsruhe, Germany). 3-(1'-Methylpropyl)-2-methoxy pyrazine (3-*sec*-butyl-2-methoxy pyrazine; SBMP), CAS no. [24168-70-5] was from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). All commercial chemicals were of analytical grade or equivalent. Deuterated SBMP (3-*sec*-butyl-2-[$^2\text{H}_3$]methoxy pyrazine; SBMP- d_3) was synthesized inhouse as described earlier [33].

Vegetable samples Raw vegetables (edible parts) were homogenized using an electric, hand-held blender (ESGE, Berlin, Germany). About 1 g (± 0.3 g) of the homogenate was weighed into a 20 ml HS vial (BGB Analytik, Bökten, Switzerland). Sodium chloride (1 g) and 5 mL of deionized water were added and the mixture was stirred before analysis.

Ladybug samples Individuals of ladybugs, *H. axyridis* and *C. septempunctata*, were collected in October 2013 in Neustadt an der Weinstraße, Germany and kept in a terrarium with a mesh cover. Bugs were supplied with nutrients (grapes, apples, and water) until analysis. For sampling, about 1 g of *H. axyridis* (ca. 30 individuals) or two individuals of *C. septempunctata* were weighed into 20 mL HS vials.

Grape samples Grapes from *V. vinifera* varieties Cabernet sauvignon, Cabernet franc, and Sauvignon blanc were harvested at the beginning of ripening (August 2013; about 9 % Brix) in the Palatinate region near Neustadt an der Weinstraße, Germany. Samples were homogenized as described for vegetables. After centrifugation, 10 mL of the supernatant liquid were filled into 20 mL HS vials. The pH was adjusted to 12–14 using 5 M sodium hydroxide solution.

Heart-cut enantio-MDGC-MS The H/C MDGC system consisted of two GC instruments (C.E. Instruments 8000 series, today ThermoFisher Scientific, Dreieich, Germany) connected by a heated transfer line that was set to 200 °C. A “Moving Capillary (Column) Stream Switching” (MCSS) system was used for H/C MDGC as described earlier [34]. The achiral ¹D (nomenclature according to [35, 36]) column consisted of a 30 m × 0.25 mm i.d. fused silica capillary, coated with a mid-range polarity ionic liquid stationary phase (SLB-IL60, Sigma-Aldrich) of 0.2 μm film thickness. Carrier gas used was helium at a constant inlet pressure of 165 kPa (P1) and 110 kPa (P2); for details see [34]). The oven temperature program for the ¹D separation was 40 °C (2 min hold), then programmed with 4 °C min⁻¹ to 132 °C, and finally with 15 °C min⁻¹ to 200 °C (5 min hold). Detection after the ¹D separation was via a flame ionization detector (FID) set to 220 °C. A phenylmethyl deactivated fused silica capillary (1 m × 0.25 mm i.d.; BGB Analytik) connected the MCSS device to the column in the ²D oven via a press-fit. The enantioselective ²D column consisted of a 25 m × 0.25 mm i.d. fused silica capillary coated with Lipodex G[®] that is based on octakis-(2,3-di-*O*-pentyl-6-*O*-methyl)-γ-cyclodextrin as the chiral selector (Macherey & Nagel, Düren, Germany). The oven temperature was programmed from 40 °C (22 min hold) with 30 °C min⁻¹ to 60 °C (5 min hold), then with 1 °C min⁻¹ to 80 °C, finally heated with 50 °C min⁻¹ to 200 °C (5 min hold). The actual inlet pressure (helium) was given at the read-out on the pressure gauge P2* and was at 85 kPa. Detection at the end of the ²D separation was with a quadrupole mass spectrometer (qMS; TraceMS, ThermoFisher Scientific) connected by a heated transfer line that was set to 200 °C. The ion source was held at 200 °C. Positive electron ionization (EI) mode was used at 70 eV. Recording of signals was done in selected ion monitoring mode (SIM) using three mass traces for each compound. These were *m/z* 151, 138, and 124 for SBMP and 154, 141, and 127 for the isotopic SBMP-d₃ (quantifier ions given in italics). MS data acquisition was performed via Xcalibur software, version 1.2, and instrument control for the H/C MDGC was done with ChromCard 32-bit A/D software version 2.4 (both ThermoFisher Scientific). A Combi-PAL system (CTC Analytics, Zwingen, Switzerland) suiting HS-SPME was used for extraction (30 min at 50 °C) and thermodesorption of the SPME fiber (1 cm, 50/30 μm divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS)) (Supelco; Sigma-Aldrich) was done in the ¹D-GC split/splitless injector (2 min splitless at 230 °C). For quantification of SBMP, isotopic SBMP-d₃ was used as internal standard and the enantiomeric ratios (*S*)/(*R*) of the reference compounds were taken into account (76/24 for SBMP and 82/18 for SBMP-d₃). An eight-point calibration curve targeting the parts per

billion level analysis of SBMP in vegetables ranged from 100 ng kg⁻¹ to 25 µg kg⁻¹ (sum of (S)/(R)-SBMP) with an internal standard addition kept at a constant level of 1 µg kg⁻¹. Standards were prepared in 5 mL deionized water with addition of 1 g sodium chloride.

Heart-cut enantio-MDGC-MS/MS A TraceGC ultra was coupled to a triple quadrupole mass spectrometer (Quantum Ultra; both ThermoFisher Scientific). The GC was upgraded (S+H Analytik GmbH, Mönchengladbach, Germany) with a Deans' switching device (SGE Analytical Science, Victoria, Australia) for H/C MDGC. Inspired by the work of Krumwiede et al. on "time controlled zone focusing" [37] we included in our single-oven MDGC system a cryo-trap made in-house using a dual-jet modulator used for GC×GC (ThermoFisher Scientific) and liquid CO₂ as cryogen, allowing trapping of material being transferred from ¹D into ²D. The ¹D analytical column used was a 15 m × 0.25 mm i.d. fused silica capillary coated with 0.25 µm of polyethylene glycol (TR-Wax-MS, ThermoFisher Scientific) and a ²D separation column consisting of a 25 m × 0.25 mm i.d. fused silica capillary coated with a derivatized cyclodextrin stationary phase (Lipodex G[®], Macherey-Nagel). A 0.5 m deactivated fused silica capillary of 0.25 mm i.d. (Z-Guard, Phenomenex) connected the ²D column to the Deans' switch via a press-fit (allowing easier column exchange if needed). A restriction capillary of 0.7 m × 0.10 mm i.d. (deactivated, SGE) connected the Deans' switch with the FID. Helium was used as carrier gas in constant pressure modes.

The ¹D separation column was connected to a programmed temperature vaporizing (PTV) injector that was set to an inlet pressure of 146 kPa. Using the second (split/splitless) injector as an auxiliary gas supply, this was set to 121 kPa. Flow diversion was achieved by redirecting the auxiliary gas using a three-port valve (Valco Instruments Co. Inc., Houston, TX, USA). Actuation of the switching (H/C) event(s) was achieved via the event and valve functions of the instrument and programmed in the instrument's software. Automated HS-SPME extraction (TriPlus RSH, ThermoFisher Scientific) used a 2 cm DVB/CAR/PDMS fiber (Supelco; Sigma-Aldrich) with an extraction time of 30 min at a temperature of 50 °C. Thermodesorption of the fiber was done in the PTV injector in splitless mode (2 min, 270 °C, 1 mm i.d. liner). The oven temperature was programmed from 40 °C (2 min isothermal) at 8 °C min⁻¹ to 137 °C (0.5 min isothermal). Then, a negative temperature program ramp was applied to cool to 60 °C at 30 °C min⁻¹ (5 min isothermal), before the ²D-GC separation started by raising the temperature to 75 °C

0.7 amu. The total cycle time was 300 ms. The optimized SRM transfers and collision energies are summarized in Table 1. Data acquisition, control of the Deans' switch device, and the cryo modulator were achieved by Xcalibur software (version 2.2, ThermoFisher Scientific).

Table 1: SRM experiments used for quantitative MS/MS analysis of SBMP (quantifier SRMs highlighted in italics)

Compound	Parent ion [m/z]	Product ion [m/z]	Collision energy [V]
SBMP	<i>138</i>	<i>123</i>	8
	138	119	8
	124	94	10
SBMP-d ₃	<i>141.1</i>	<i>123</i>	<i>10</i>
	141.1	95	20
	127	95	10

Enantio-GC×GC-MS (GC×GC-qMS or GC×GC-TOF-MS) A GC×GC system equipped with PTV injector and a dual-jet carbon dioxide modulator (Trace GC×GC Ultra, ThermoFisher Scientific) was coupled to either a qMS (DSQ, ThermoFisher Scientific) or a time-of-flight mass spectrometer (BenchTOF-Select, Markes, Llantrisant, UK). Data acquisition was done with Xcalibur software (version 2.2, ThermoFisher Scientific) or ProtoTOF software (version 1.1.1, Markes) and processing of two-dimensional data was done either with HyperChrom software version 2.5 (ThermoFisher Scientific) or GCImage version 2.2 (Lincoln, NE, USA). Whereas for method development, the slow scanning qMS was sufficient (scan rate approximately 15 Hz), analysis of samples was performed with a TOF-MS (50 Hz) in full scan mode. A TriPlus autosampler (ThermoFisher Scientific) was used for automated HS-SPME operation. The analytical column system consisted of a 1 m × 0.32 mm i.d. fused silica capillary column as uncoated deactivated precolumn (phenyldimethyl deactivated; BGB Analytik), coupled to an enantioselective ¹D column. The latter consisted of a 30 m × 0.25 mm i.d. fused silica capillary, coated in-house with heptakis (2,3-di-*O*-methyl-6-*O*-tertbutyldimethylsilyl)- β -cyclodextrin (25 % in SE 52; Riedel de Hæn, Seelze, Germany) as described earlier [38] and a ²D fused silica capillary column of 2 m × 0.15 mm i.d. coated with 0.25 μ m of a 5 % phenyl containing polydimethylsiloxane phase (BPX-5, SGE). The columns were connected via pressfit connectors (BGB Analytik). Modulation occurred on the last section of the ¹D column.

The transfer line guiding the ^2D column either to the TOF- or qMS was set to 200 °C. The samples were incubated for 2 min and extracted during 30 min at 50 °C by automated HS-SPME using the agitator. Thermodesorption of the SPME fiber (1 cm, 95 μm Carbon WR/PDMS (CTC Analytics)) was in the PTV injector in splitless condition (240 °C, 1 min; 1 mm i.d. liner). Helium was used as carrier gas at a constant flow of 1.3 mL min $^{-1}$. The initial GC oven temperature of 40 °C was held for 5 min before raising it by 15 °C min $^{-1}$ to 100 °C. This temperature was held for 1 min and subsequently raised by 0.5 °C min $^{-1}$ to 108 °C. Then, the oven temperature was increased with 20 °C min $^{-1}$ to a final temperature of 190 °C. Cryo modulation with varying modulation periods was applied after a delay time of 10 min. MS data acquisition (m/z 40–250) also started with a delay of 10 min. The ion source was held at 200 °C, electron ionization (EI+) was at 70 eV.

Results and discussion

In order to determine the enantiomeric composition of SBMP, usually at least one enantiomer should be available as a defined reference substance. However, as (*S*)- or (*R*)-SBMP are not commercially available, the results obtained by other groups were beneficial in this respect. In the pioneering work of Mihara et al. [22], SBMP was isolated from Galbanum oil and characterized by NMR, revealing that only the (*S*)-enantiomer was present. Bungert described the successful enantioseparation of a commercial racemic SBMP and the determination of its elution order by GC on octakis-(2,3-di-*O*-pentyl-6-*O*-methyl)- γ -cyclodextrin as stationary phase [25]. Based on these previous findings, we were able to confirm the elution order of SBMP being (*S*) before (*R*) in a partly racemic reference standard (Fig. 2a) using Galbanum oil as a natural (*S*)-SBMP standard (data not shown).

Interestingly, on another cyclodextrin derivative (heptakis-(2,3-di-*O*-methyl-6-*O*-tert-butyl-dimethylsilyl)- β -cyclodextrin) used as stationary phase, a reversal of this elution order was observed (Fig. 2b). Such a complementary separation behavior can be of importance for future identification of SBMP enantiomers in other situations, e.g., when dealing with matrix problems, extreme ratios of the enantiomers or simply for verification purposes. In principle, such a complementary separation adds another confirmational aspect, that could be compared to using different retention indices for identification purposes often seen with non-MS detection.

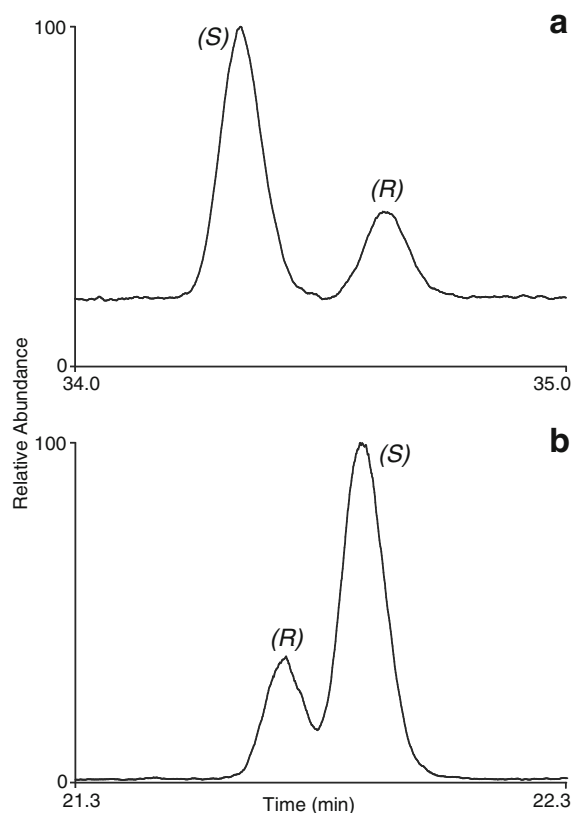


Figure 2: Comparison of the elution order of SBMP enantiomers on different chiral stationary phases: **a** octakis-(6-*O*-methyl-2,3-di-*O*-pentyl)- γ -cyclodextrin ; **b** heptakis-(2,3-di-*O*-methyl-6-*O*-tert-butyl-dimethylsilyl)- β -cyclodextrin; conditions as described in the H/C MDGC-MS/MS (**a**) or in the GC \times GC-qMS (without modulation (**b**)) section; all in full scan mode (m/z 40–250)

For the enantiodifferentiation of SBMP in various species we focused on two-dimensional chromatographic separations (H/C MDGC or GC \times GC) due to previous experiences with co-elution problems [30]. Based on optimization strategies with H/C MDGC and SIDA-based quantification, we chose rather polar achiral stationary phases for ^1D separation, as both isotopologues of SBMP co-elute (no or marginal isotope effect) on SLB-IL60 or the polyethylene glycol phase. This permitted to use a single and narrow cut-window for the transfer of all four species of SBMP ((*S*)- and (*R*)-; deuterated and non-deuterated), reducing the risk of transferring matrix compounds onto the ^2D column that otherwise could be the case using a wider cut-window [39].

Data obtained by H/C MDGC-MS (SIM) for vegetable varieties revealed SBMP concentrations in the parts per billion range from $0.3 \mu\text{g kg}^{-1}$ (red bell pepper) or below (tomato) to

more than $1.5 \mu\text{g kg}^{-1}$ (sugar pea), values that correspond approximately to data published earlier [2]. In general, a comparison of such concentration values is critical and should consider species, fruit-to-fruit variation, and maturity stages. Altogether, in all vegetable samples analyzed, the prevailing enantiomer was (*S*)-SBMP as summarized in Table 2. The limit of detection (LOD) with this method was at some 150 ng kg^{-1} for (*S*)- and (*R*)-SBMP estimated from a signal-to-noise ratio (*S/N*) of about three. Standard deviations calculated for various samples were between 1 and 15 % and recovery of an added amount was at 65 % ((*S*)-SBMP; $n = 3$). For trace-level analysis however, detection limits were insufficient. Furthermore, reliable determination of (*S*)-SBMP was not always possible due to matrix problems (co-elutions) seen, e.g., with parsnip or tomato samples.

Table 2: Enantiodifferentiation of SBMP in vegetables after HS-SPME and H/C MDGC-MS (SIM) analysis

Vegetable	Botanical name	Family	Part	SBMP	
				(<i>S</i>)	(<i>R</i>)
				[$\mu\text{g kg}^{-1}$] ^a	
Green bell pepper	<i>Capsicum annuum</i>	Solanaceae	Fruit	0.95 ± 0.01	<LOD
Red bell pepper	var. <i>grossum</i>	Solanaceae	Fruit	0.35 ± 0.03	<LOD
Yellow bell pepper		Solanaceae	Fruit	nd	<LOD
Carrot	<i>Daucus carota sativa</i>	Apiaceae	Root	0.83 ± 0.11	<LOD
Beetroot	<i>Beta vulgaris</i>	Amaranthaceae	Root	0.64 ± 0.13	<LOD
Sugar pea	<i>Pisum sativum</i>	Fabaceae	Pod	1.54 ± 0.19	<LOD
	var. <i>macrocarpon</i>				
Pea	<i>Pisum sativum</i>	Fabaceae	Seeds	0.72 ± 0.03	<LOD
Common bean	<i>Vicia faba</i>	Fabaceae	Pod	0.38 ± 0.12	<LOD
Parsnip	<i>Pastinaca sativa</i>	Apiaceae	Root	nd	<LOD
Parsley root	<i>Petroselinum crispum</i>	Apiaceae	Root	0.62 ± 0.07	<LOD
Potato	<i>Solanum tuberosum</i>	Solanaceae	Tuber	0.46^b	<LOD
Tomato	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Solanaceae	Fruit	nd	<LOD

nd not determined due to co-elution

^a $n = 2$

^b $n = 1$ (second sample could not be determined due to co-elution)

As an alternative option with a higher selectivity for detection, H/C enantio-MDGC-MS/MS with a triple quadrupole MS was considered, since trace-level analysis of SBMP occasionally benefits from the higher selectivity of MS/MS detection [8]. Also, estimated LODs being in the lower nano-grams per kilogram (based on a *S/N* of three) could be

achieved using MS/MS detection. Critical samples where matrix problems had been encountered with SIM-MS (e.g., those annotated with “nd” in Table 2) now yielded plausible results (Fig. 3), comparable to data published earlier [2]. Interestingly, even the high amount of SBMP detected in parsnip with MS/MS could not be quantified with SIM-MS. Noteworthy is also the tomato sample, where the quantifier trace produced a signal at approximately the same retention time of (*R*)-SBMP that could easily be misinterpreted (Fig. 3d). However, this signal could not be verified as (*R*)-SBMP on the two qualifier SRM ion traces.

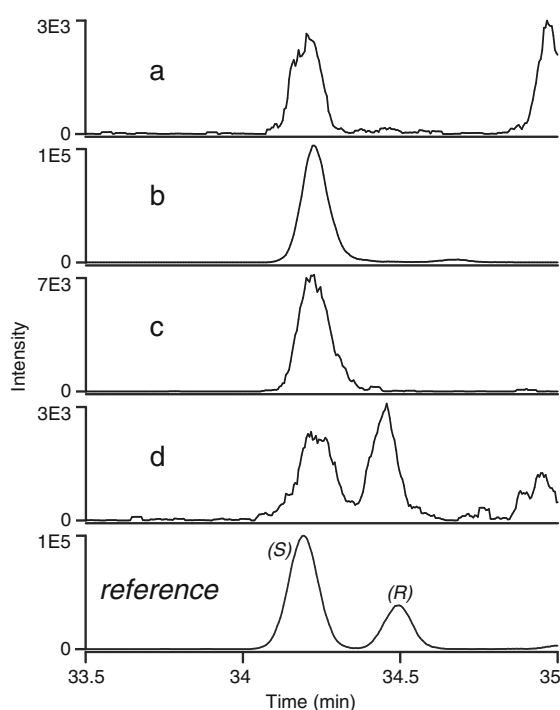


Figure 3: Native enantiomeric distribution of SBMP: **a** yellow bell pepper ($0.07 \mu\text{g kg}^{-1}$); **b** parsnip ($5.2 \mu\text{g kg}^{-1}$); **c** potato ($0.1 \mu\text{g kg}^{-1}$); **d** tomato ($0.04 \mu\text{g kg}^{-1}$); and the reference (*bottom*) with a ratio of 76/24 (*S*)/(*R*); conditions as described in “H/C enantio-MDGC-MS/MS”; ion traces given on quantifier SRM

Considering the importance of MPs as off-flavor compounds related to “ladybug taint”, we further determined the enantiomeric composition of SBMP in *H. axyridis* and *C. septempunctata* species and found exclusively the (*S*)-SBMP enantiomer (Fig. 4). The quantification yielded some 20 ng g^{-1} of (*S*)-SBMP in *H. axyridis*, and about 2 ng g^{-1} in *C. septempunctata* samples. Figure 4 also shows the (SRM) ion traces of the added isotopic SBMP standard, revealing a minor *inverse* isotopic effect on this cyclodextrin-derivative

stationary phase. Depending on chemical nature of both stationary phase and analyte, an *inverse* isotope effect (heavier (deuterated) isotopic compounds (isotopologues) elute earlier) is usually encountered in gas liquid partitioning chromatography (GLC) with an apolar stationary phase, whereas on a very polar phase a *normal* isotope effect can be observed [40]. Unfortunately, as a proprietary commercial column, the information on the genesis of the Lipodex G[®] column is incomplete, providing only the nature of the chiral selector, here octakis-(2,3-di-*O*-pentyl-6-*O*-methyl)- γ -cyclodextrin. Although this derivative should behave as a rather apolar substance compared to similar derivatives [41], further information as, e.g., on a potential dilution in an optional (silicone) stationary phase (with yet unknown polarity) is not available.

A fundamental drawback of the single-oven GC system used for H/C MDGC-MS/MS was encountered during method development. Since the H/C occurred at an elevated oven temperature, optimization of the enantioseparation on the chiral stationary phase in ²D was critical. Sufficient enantioseparation was achieved only when using a low starting temperature and a slow temperature ramp on this ²D column. The mismatch between elution temperature of SBMP in ¹D and the necessary starting temperature in ²D was overcome by implementing a modulator (GC×GC modulator obtained as spare part, ThermoFisher Scientific) as a cryogenic focusing device and applying a negative oven temperature ramp after the H/C (Fig. 1). A similar approach had recently been described, e.g., by Bugey et al., implementing the longitudinally moving cryogenic modulator (LMCS) as trapping device [42]. Overall, a dual-oven GC system as was used with SIM-MS would be preferable since additional hardware costs invested in the second oven gives a good return when considering cryo-hardware and maintenance costs.

Complementary to H/C MDGC-MS/MS we also looked into the development of a GC×GC-MS method for the enantioselective analysis of SBMP as successful applications on trace-level MP analysis had been described by others [31,32]. An important aspect of using GC×GC is the general increase in signal-to-noise due to themodulation of a ¹D-peak, beneficial for detectability. Previous enantioseparations in the field of flavor analysis using GC×GC were done by, e.g., Shellie et al. [43] using a ¹D column with a chiral selector and an achiral ²D column. However, the opposite alignment had also been described and one should thus differentiate enantio-GC×GC from GC×enantio-GC as outlined by Shellie and Marriott [44]. These authors also discussed the necessary optimization for either configuration. In their conclusion, enantio-GC×GC was less technically de-

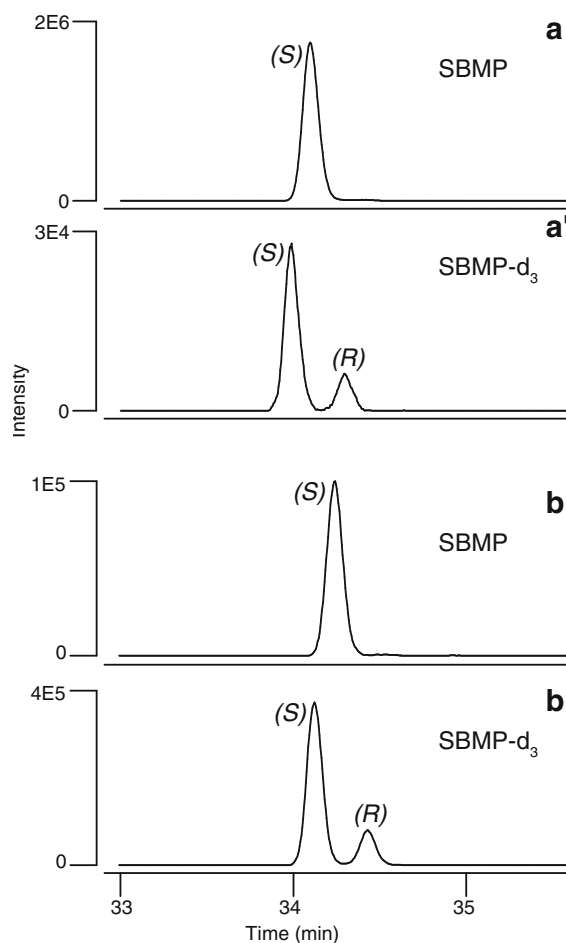


Figure 4: Native enantiomeric distribution of SBMP in ladybugs: **a** *Harmonia axyridis*; **b** *Coccinella septempunctata*. The isotopic internal standard SBMP- d_3 (**a'**, **b'**) had a ratio of 82/18 (S)/(R); conditions as described in “H/C enantio-MDGC-MS/MS”; ion traces given on quantifier SRMs

manding, as a very fast enantioseparation on the 2D column in GC \times enantio-GC would be needed that is not as easy to achieve as with a chiral 1D column [45]. However, the necessary fast separation of enantiomers on short capillary columns is possible and had been described earlier [46]. Such enantioseparations may benefit from lower elution temperatures obtained at high gas velocities often applied for 2D separation [47]. This is valid unless an excessive loss of plate numbers is realized, since lowered elution temperatures favor selectivity (as long as the separation is enthalpy-driven). In our application, we successfully applied the enantio-GC \times GC approach, using a conventional diameter separation column with a chiral cyclodextrin-derivative stationary phase. Furthermore,

it is noteworthy to mention that small-bore columns with enantioselective stationary phases are more critical to manufacture. Depending on phase chemistry and coating techniques, particularly non-bonded cyclodextrin-based stationary phases may exhibit problems with respect to film stability due to the Rayleigh instability [48].

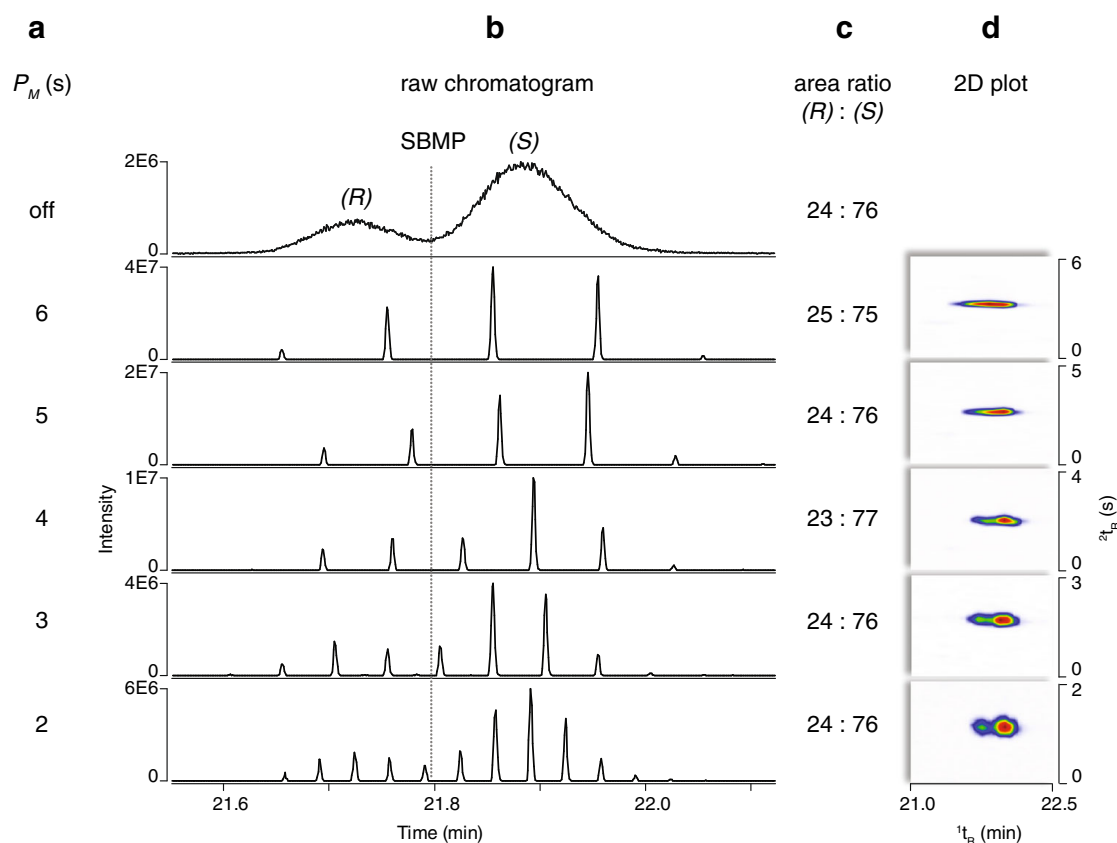


Figure 5: Influence of modulation time in enantio-GC×GC on SBMP separation: **a** modulation time; **b** raw chromatogram, the dashed line indicates allocation to (R)- or (S)-SBMP for peak integration; **c** ratio of the sum of peak areas of (R)- and (S)-SBMP calculated from the raw chromatogram; **d** 2D color plots. Conditions as described in “Enantio-GC×GC-MS (GC×GC-qMS or GC×GC-TOF-MS)”

During the method development of the GC×GC-MS approach, we had to carefully optimize the modulation period, since multiple injections of a 1D peak into 2D should be performed as was outlined earlier [49, 50]. Such optimization has to consider both 1D peak width as well as the modulation period. With a chiral resolution (cRs) for SBMP being just about baseline separation (Fig. 5; depicted with the non-modulated chromatogram on top), a modulation period maintaining sufficient chiral resolution gained in 1D was found with 3 or 2 s, the latter then used for our further applications.

In grape berries of the red variety Cabernet sauvignon, we found exclusively the (*S*)-enantiomer of SBMP using the GC×GC-TOF-MS system (Fig. 6b). Extracted ion color plots for the individual base peaks of SBMP (*m/z* 138) and the added isotopic standard (*m/z* 141) ease the compound identification, as isotopic SBMP (and its enantiomeric forms) partially overlap with the enantiomers of the non-deuterated SBMP (Fig. 6a, c). In another red grape berry variety such as Cabernet franc (Fig. 7c), as well as in a white grape berry variety, here Sauvignon blanc (Fig. 7d), we also found exclusively the (*S*)-enantiomer of SBMP. In the latter situation, only the resolving power of the image-based algorithms in the GCImage software allowed for a visualization of this minor compound. Obviously, the concentration in this sample was very low but visible against the background level (we did not quantify as only the enantiomeric distribution had been of interest to us). Finally, in the ladybug samples of the two species often discussed with respect to the related wine off-flavor (*H. axyridis* and *C. septempunctata*) we could only detect the (*S*)-enantiomer of SBMP as well (Fig. 7a, b). An advantage of using GC×GC-TOF-MS is its high resolving power, as is represented in Fig. 7a, c d, with the signals marked as “unknown” that would co-elute in a ¹D application with either (*S*)- or (*R*)-SBMP.

Conclusion

Based on H/C MDGC-MS (and -MS/MS) or GC×GC-TOF-MS as analytical methods, we could successfully determine the enantiomeric distribution of SBMP in various species. Matrix co-elutions could be minimized using the described multidimensional analytical methods. H/C MDGC eventually benefitted from the gain in selectivity seen with MS/MS detection and GC×GC benefitted from the higher separation efficiency. Depending on the samples, H/C MDGC-MS with SIM detection mode was in most cases sufficient for parts per billion level analysis, whereas H/C MDGC-MS/MS or GC×GC time-of-flight (TOF) MS were necessary for parts per trillion level analysis. With the latter technique, the modulation period is an important aspect when developing an enantio-GC×GC application. In our situation, it had to be at 2 or 3 s to avoid loss of chiral resolution gained in ¹D.

Complementary to an earlier described separation on octakis-(6-*O*-methyl-2,3-di-*O*-pentyl)- γ -cyclodextrin used as chiral stationary phase for the GC separation, we found

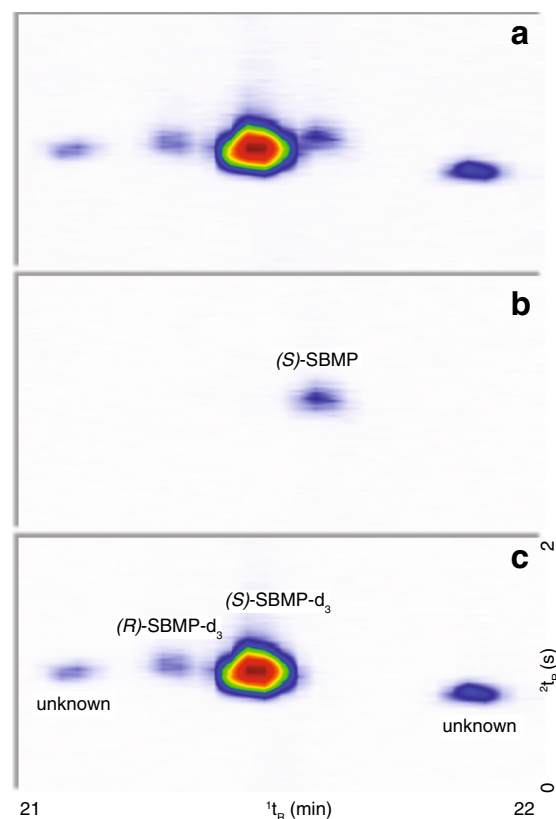


Figure 6: Extracted ion enantio-GC×GC color plots of a Cabernet sauvignon (homogenized grape berries) sample with added SBMP- d_3 having a ratio of 82/18 (*S*)/(*R*): **a** m/z 138 and 141, representing base peaks of SBMP and SBMP- d_3 , respectively; **b** m/z 138 (native SBMP); **c** m/z 141 (SBMP- d_3); conditions as described in “Enantio-GC×GC-MS (GC×GC-qMS or GC×GC-TOF-MS)”

a reversal of the elution order of SBMP enantiomers on heptakis-(2,3-di-*O*-methyl-6-*O*-tertbutyldimethylsilyl)- β -cyclodextrin, which is an important aspect for confirmational issues.

In all samples analyzed in this study, (*S*)-SBMP was the predominant enantiomer of SBMP. As the stereochemistry in the side chain of the naturally occurring L-isoleucine is retained, this finding further supports the hypothesis that naturally occurring amino acids are the starting material for the biosynthesis of MPs [18, 19]. However, further investigations are still needed and experiments with labeled precursors should be incorporated to fully elucidate the biosynthesis of such an important class of aroma compounds.

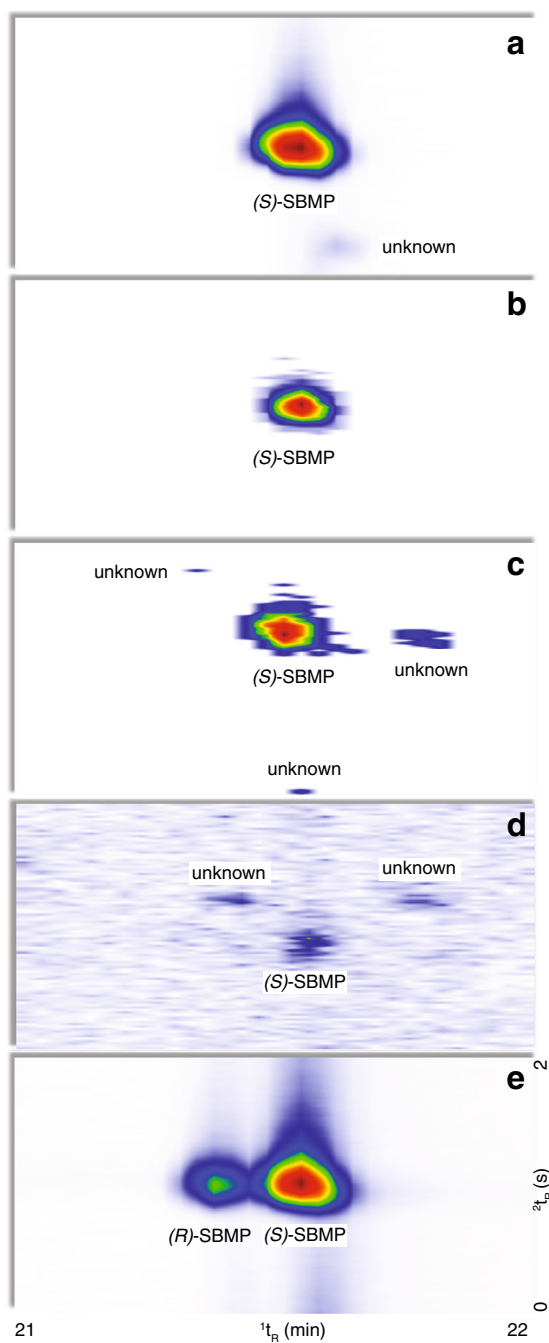


Figure 7: Extracted ion enantio-GC×GC color plots (m/z 138) of various species: **a** *Harmoinia axyridis*; **b** *Coccinella septempunctata*; **c** Cabernet franc (homogenized grape berries); **d** Sauvignon blanc (homogenized grape berries); **e** reference of SBMP with a ratio of 24/76 (S)/(R). Conditions as described in “Enantio-GC×GC-MS (GC×GC-qMS or GC×GC-TOF-MS)”

Acknowledgments The authors are particularly thankful to Supelco (Sigma-Aldrich) and CTC Analytics for the supply of SPME fibers as well as the ionic liquid GC column (Supelco). C. Legrum is grateful for the Ph.D. scholarship of the “Graduiertenförderung des Landes Rheinland Pfalz”. Furthermore, financial support from the Ministerium für Umwelt, Landwirtschaft, Ernährung, Weinbau und Forsten (Rheinland-Pfalz, Germany) is gratefully acknowledged.

Charlotte Legrum and Hans-Georg Schmarr contributed equally to this work.

References

1. Maga JA, Sizer CE (1973) Pyrazines in foods. Review. *J Agric Food Chem* 21(1):22–30
2. Murray KE, Whitfield FB (1975) Occurrence of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in raw vegetables. *J Sci Food Agric* 26(7):973–986
3. Allen MS, Lacey MJ (1998) Methoxypyrazines of grapes and wines. In: ACS Symposium Series, vol 714. Chemistry of wine flavor. pp 31–38
4. Augustyn OPH, Rapp A, Van Wyk CJ (1982) Some volatile aroma components of *Vitis vinifera* cv. Sauvignon blanc. *S Afr J Enol Vitic* 3(2):53–60
5. Roujou de Boubée D, Van Leeuwen C, Dubourdieu D (2000) Organoleptic impact of 2-methoxy-3-isobutylpyrazine on Red Bordeaux and Loire wines. Effect of environmental conditions on concentrations in grapes during ripening. *J Agric Food Chem* 48(10):4830–4834
6. Hashizume K, Umeda N (1996) Methoxypyrazine content of Japanese red wines. *Biosci Biotechnol Biochem* 60(5):802–805
7. Lopez R, Gracia-Moreno E, Cacho J, Ferreira V (2011) Development of a mixed-mode solid phase extraction method and further gas chromatography mass spectrometry for the analysis of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in wine. *J Chromatogr A* 1218(6):842–848
8. Legrum C, Gracia Moreno E, Lopez R, Potouridis T, Langen J, Slabizki P, Weiland J, Schmarr H-G (2014) Quantitative analysis of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in German Sauvignon blanc wines by MDGC-MS or MDGC-MS/MS for viticultural and enological studies. *Eur Food Res Technol* doi:10.1007/s00217-014-2250-8
9. Legrum C, Schmarr H-G (2013) Enantioselektive Analyse von 2-Methoxy-3-*sec*-Butylpyrazin mittels multidimensionaler Gaschromatographie und Massenspektrometrie. *Lebensmittelchemie* 67(4):98–99
10. Koegel S, Gross J, Hoffmann C, Ulrich D (2012) Diversity and frequencies of methoxypyrazines in hemolymph of *Harmonia axyridis* and *Coccinella septempunctata* and their influence on the taste of wine. *Eur Food Res Technol* 234(3):399–404

11. Pickering GJ, Spink M, Kotseridis Y, Brindle ID, Sears M, Inglis D (2008) Morbidity of *Harmonia axyridis* mediates ladybug taint in red wine. *J Food Agric Environ* 6(3 & 4):133–137
12. Hashizume K, Tozawa K, Endo M, Aramaki I (2001) *S*-adenosyl-L-methionine-dependent *O*-methylation of 2-hydroxy-3-alkylpyrazine in wine grapes: a putative final step of methoxypyrazine biosynthesis. *Biosci Biotechnol Biochem* 65(4):795–801
13. Hashizume K, Tozawa K, Hiraga Y, Aramaki I (2001) Purification and characterization of a *O*-methyltransferase capable of methylating 2-hydroxy-3-alkylpyrazine from *Vitis vinifera* L. (cv. Cabernet Sauvignon). *Biosci Biotechnol Biochem* 65(10):2213–2219
14. Dunlevy JD, Dennis EG, Soole KL, PerkinsMV, Davies C, Boss PK (2013) A methyltransferase essential for the methoxypyrazine-derived flavour of wine. *Plant J* 75(4):606–617
15. Dunlevy JD, Soole KL, PerkinsMV, Dennis EG, Keyzers RA, Kalua CM, Boss PK (2010) Two *O*-methyltransferases involved in the biosynthesis of methoxypyrazines: grape-derived aroma compounds important to wine flavour. *Plant Mol Biol* 74(1–2):77–89
16. Vallarino JG, Lopez-Cortes XA, Dunlevy JD, Boss PK, Gonzalez-Nilo FD, Moreno YM (2011) Biosynthesis of methoxypyrazines: elucidating the structural/functional relationship of two *vitis vinifera* *O*-methyltransferases capable of catalyzing the putative final step of the biosynthesis of 3-alkyl-2-methoxypyrazine. *J Agric Food Chem* 59(13):7310–7316
17. Cheng TB, Reineccius GA, Bjorklund JA, Leete E (1991) Biosynthesis of 2-methoxy-3-isopropylpyrazine in *Pseudomonas perolens*. *J Agric Food Chem* 39(5):1009–1012
18. Leete E, Bjorklund JA, Reineccius GA, Cheng TB (1992) Biosynthesis of 3-isopropyl-2-methoxypyrazine and other alkylpyrazines: widely distributed flavor compounds. *Spec Publ - R Soc Chem* 95 (Bioform. Flavours):75–95
19. Nawrath T, Dickschat JS, Kunze B, Schulz S (2010) The biosynthesis of branched dialkylpyrazines in myxobacteria. *Chem Biodivers* 7(9):2129–2144
20. Schulz S, Dickschat JS (2007) Bacterial volatiles: the smell of small organisms. *Nat Prod Rep* 24(4):814–842
21. Bungert M, Jahns T, Becker H (2001) 2-Methoxy-3-(1'-methylpropyl)pyrazine, pea odour, from the marine bacterium *Halomonas venusta*. *Flavour Fragr J* 16(5):329–333
22. Mihara S, Masuda H, Nishimura O (1989) Structure-odor relationship of pyrazines and determination of the enantiomeric composition of 2-methoxy-3-(1-methylpropyl)pyrazine from galbanum oil using achiral and chiral lanthanide shift reagents. *Proc - Int Congr Essent Oils, Fragrances Flavours*, 11th 5:23–29
23. Mihara S, Masuda H, Nishimura O, Tateba H (1990) Determination of the enantiomeric composition of 2-methoxy-3-(1'-methylpropyl)pyrazine from galbanum oil using achiral and chiral lanthanide shift reagents. *J Agric Food Chem* 38(2):465–467
24. Masuda H, Mihara S (1989) Preparation and odor evaluation of both enantiomers of alkoxy-

- pyrazines. *Agric Biol Chem* 53(12):3367–3368
25. Bungert M (1999) Das Sekundärstoffprofil von ausgesuchten marinen Bakterien unter besonderer Berücksichtigung des “Erbsengeruchs” von *Halomonas venusta*. Universität des Saarlandes, Saarbrücken, Germany
26. Harris RLN, Lacey MJ, Brown WV, Allen MS (1987) Determination of 2-methoxy-3-alkylpyrazines in wine by gas chromatography/mass spectrometry. *Vitis* 26(4):201–207
27. Sala C, Mestres M, Marti MP, Busto O, Guasch J (2002) Headspace solid-phase microextraction analysis of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in wines. *J Chromatogr A* 953(1–2):1–6
28. Hartmann PJ, McNair HM, Zoecklein BW (2002) Measurement of 3-alkyl-2-methoxypyrazine by headspace solid-phase microextraction in spiked model wines. *Am J Enol Viticult* 53(4):285–288
29. Cullere L, Escudero A, Campo E, Cacho J, Ferreira V (2009) Multidimensional gas chromatography-mass spectrometry determination of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in wine and must. A comparison of solid-phase extraction and headspace solid-phase extraction methods. *J Chromatogr A* 1216(18):4040–4045
30. Schmarr H-G, Ganß S, Koschinski S, Fischer U, Riehle C, Kinnart J, Potouridis T, Kutyrev M (2010) Pitfalls encountered during quantitative determination of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in grape must and wine using gas chromatography-mass spectrometry with stable isotope dilution analysis. *Comprehensive two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry and on-line liquid chromatography-multidimensional gas chromatography-mass spectrometry as potential loopholes*. *J Chromatogr A* 1217(43):6769–6777
31. Ryan D, Watkins P, Smith J, Allen M, Marriott P (2005) Analysis of methoxypyrazines in wine using headspace solid phase microextraction with isotope dilution and comprehensive two-dimensional gas chromatography. *J Sep Sci* 28(9–10):1075–1082
32. Ryona I, Pan BS, Sacks GL (2009) Rapid measurement of 3-alkyl-2-methoxypyrazine content of winegrapes to predict levels in resultant wines. *J Agric Food Chem* 57(18):8250–8257
33. Schmarr H-G, Sang W, Ganß S, Koschinski S, Meusinger R (2011) New insights into the synthesis and characterization of 2-methoxy-3-alkylpyrazines and their deuterated isotopologues. *J Label Compd Radiopharm* 54(8):438–440
34. Schmarr H-G, Ganß S, Sang W, Potouridis T (2007) Analysis of 2-aminoacetophenone in wine using a stable isotope dilution assay and multidimensional gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1150(1–2):78–84
35. Marriott PJ, Schoenmakers P, Wu Z-Y (2012) Nomenclature and conventions in comprehensive multidimensional chromatography – an update. *LC-GC Eur* 25(5):266, 268, 270, 272–275
36. Schoenmakers P, Marriott P, Beens J (2003) Nomenclature and conventions in comprehensive multidimensional chromatography. *LC-GC Europe* 16(6):335–336, 338–339
37. Krumwiede D, Mehlmann H, D’Silva K (2012) Time controlled cryogenic zone compression

- (T-CZC): a novel gas chromatographic tool for increasing sensitivity. *Chromatogr Today* 19–23
38. Schmarr H-G, Mosandl A, Kaunzinger A (1991) Influence of derivatization on the chiral selectivity of cyclodextrins: alkylated/acylated cyclodextrins and γ - δ -lactones as an example. *J Microcolumn Sep* 3(5):395–402
39. Schmarr H-G, Slabizki P, Legrum C (2013) Optimization in multidimensional gas chromatography applying quantitative analysis via a stable isotope dilution assay. *Anal Bioanal Chem* 405(20):6589–6593
40. Schmarr H-G, Slabizki P, Müntnich S, Metzger C, Gracia-Moreno E (2012) Ionic liquids as novel stationary phases in gas liquid chromatography: inverse or normal isotope effect? *J Chromatogr A* 1270:310–317
41. Schmarr H-G (1992) Beiträge zur on-line LC-GC Kopplung und modifizierte Cyclodextrine als chirale stationäre Phasen in der Kapillar-GC. Dissertation, Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt am Main, Germany
42. Bugey A, Janin Y, Edder P, Bieri S (2013) Targeted multidimensional gas chromatography using a heart-cutting device and cryogenic focusing for the determination of benzophenone derivatives in foodstuffs. *Anal Bioanal Chem* 405(12):4177–4185
43. Shellie R, Marriott P, Cornwell C (2001) Application of comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC \times GC) to the enantioselective analysis of essential oils. *J Sep Sci* 24(10/11):823–830
44. Shellie R, Marriott PJ (2002) Comprehensive two-dimensional gas chromatography with fast enantioseparation. *Anal Chem* 74(20):5426–5430
45. Shellie R, Marriott P (2003) Opportunities for ultra-high resolution analysis of essential oils using comprehensive two-dimensional gas chromatography: a review. *Flavour Fragr J* 18(3):179–191
46. Lindström M (1991) Improved enantiomer separation using very short capillary columns coated with permethylated β -cyclodextrin. *J High Resolut Chromatogr* 14(11):765–767
47. Grob K, Neukom H-P, Schmarr H-G, Mosandl A (1990) Separation efficiency versus resolution: chiral separation of gamma lactones by capillary GC on derivatized cyclodextrin. *J High Resolut Chromatogr* 13(6):433–436
48. Bartle KD, Woolley CL, Markides KE, Lee ML, Hansen RS (1987) Rayleigh instability of stationary phase films in capillary column chromatography. *J High Resolut Chromatogr Chromatogr Commun* 10(3):128–136
49. Murphy RE, Schure MR, Foley JP (1998) Effect of sampling rate on resolution in comprehensive two-dimensional liquid chromatography. *Anal Chem* 70(8):1585–1594
50. Khummueng W, Harynuk J, Marriott PJ (2006) Modulation ratio in comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Anal Chem* 78(13):4578–4587

2.1.3.2 Enantiomerenverteilung in SBMP-Referenzsubstanzen

Bungert *et al.* identifizierten den chiralen Selektor Oktakis(2,3-di-*O*-pentyl-6-*O*-methyl)- γ -cyclodextrin (Strukturformel in Abb. 2.6) als geeignet für die Trennung der Enantiomere des SBMPs [110]. Heute ist dieser Selektor auf Trennsäulen aufgebracht kommerziell als Lipodex G[®] verfügbar. Eine solche enantioselektive Trennsäule wurde zu Beginn dieser Arbeit eingesetzt, um die kommerziell erworbenen oder im Falle der deuterierten Analoga die im Hause selbst synthetisierten Referenzen (s. Abschnitt 1.3) auf ihre Enantiomerenverteilung hin zu untersuchen. Zur Kontrolle wurde das in Galbanumöl enthaltene enantiomerenreine (*S*)-SBMP genutzt, abgesichert durch Referenzen und Massenspektren. Außerdem wurde der Temperaturbereich, in dem eine Trennung der Enantiomere auftritt, auf das Vorkommen einer möglichen isoenantioselektiven Temperatur und Inversion der Elutionsreihenfolge hin überprüft (vgl. Abschnitt 1.2.5.4). Hierzu wurde der Trennfaktor α aus verschiedenen isothermen Läufen bestimmt und im van't-Hoff-Plot dargestellt und bewertet (s. Anhang, Abschnitt A.2). Die isoenantioselektive Temperatur liegt erwartungsgemäß für beide Enantiomerenpaare, also (*R*)- und (*S*)-SBMP sowie (*R*)- und (*S*)-SBMP-d₃, oberhalb der hier angewendeten Temperaturen bei ca. 96 °C. Die Elutionsreihenfolge der Enantiomere stimmt mit der in der Literatur beschriebenen überein und bleibt im Zieltemperaturbereich gleich.

Folgende Zusammensetzungen der Referenzsubstanzen wurden ermittelt: Im kommerziell erworbenen SBMP (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) wurden in der vorliegenden Charge Anteile von 76 % (*S*)- und 24 % (*R*)-SBMP festgestellt. Im synthetisierten 2-[²H₃]Methoxy-3-*sec*-butylpyrazin (2-[²H₃]Methoxy-3-(1-methylpropyl)pyrazin) (SBMP-d₃), das im SIDA eingesetzt werden sollte, waren 82 % (*S*)- und 18 % (*R*)-SBMP enthalten. Damit lagen für die folgenden Methodenentwicklungsarbeiten alle vier SBMP-Spezies als Referenzen vor und eine erneute eigene Synthese war nicht notwendig.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde ein zusätzlicher chiraler Selektor zur gaschromatographischen Trennung der SBMP-Enantiomere identifiziert. Dieser war das Heptakis(2,3-di-*O*-methyl-6-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl)- β -cyclodextrin (Strukturformel in Abb. 2.7), welches im ähnlichen Temperaturbereich eine Trennung mit umgekehrter Elutionsreihenfolge bewirkt, also (*R*)- vor (*S*)-SBMP. Eine solche invertierte Elutionsreihenfolge kann unter Umständen zu einer zusätzlichen Absicherung der Bestimmung eines Enantiomerenverhältnisses dienen, z. B. bei sehr großem Überschuss eines Enantiomers mit ein-

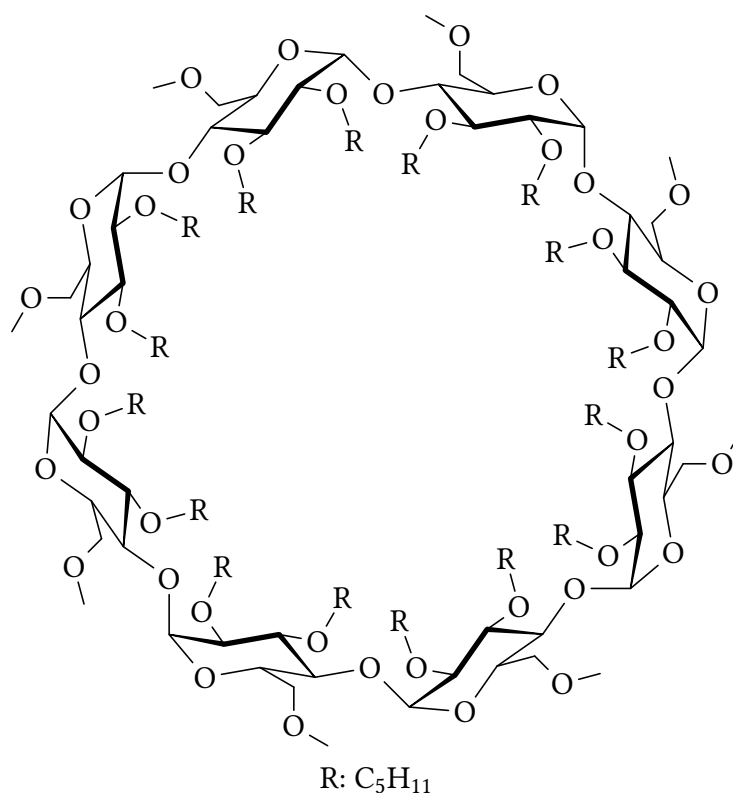


Abbildung 2.6: Strukturformel von Oktakis(2,3-di-*O*-pentyl-6-*O*-methyl)- γ -cyclodextrin (kommerziell als Lipodex G[®])

hergehender Peakverbreiterung oder bei starken Co-Elutionen von Matrix-Komponenten. Da aus vorherigen Studien bereits der große Überschuss des (*S*)-SBMPs aus natürlichen Quellen bekannt war und exzessive Peakverbreiterung nicht ausgeschlossen werden kann, war die invertierte Elutionsreihenfolge in den folgenden GC×GC-Anwendungen für den definitiven Ausschluss von Spuren des (*R*)-SBMPs wichtig (s. Abschnitt 2.1.3.5).

2.1.3.3 Methodenvergleich eMDGC-MS (SIM) gegenüber eMDGC-MS/MS (SRM)

Für die Enantiodifferenzierung von SBMP aus realen Proben wurden aufgrund der früheren Erfahrungen mit Co-Elutionen multidimensionale Techniken eingesetzt. Diese sollten auch für den höheren Konzentrationsbereich von $\mu\text{g}/\text{kg}$, relevant für einige Gemüsesorten, Anwendung finden. Die eMDGC wurde in zwei Methoden realisiert, einerseits mit

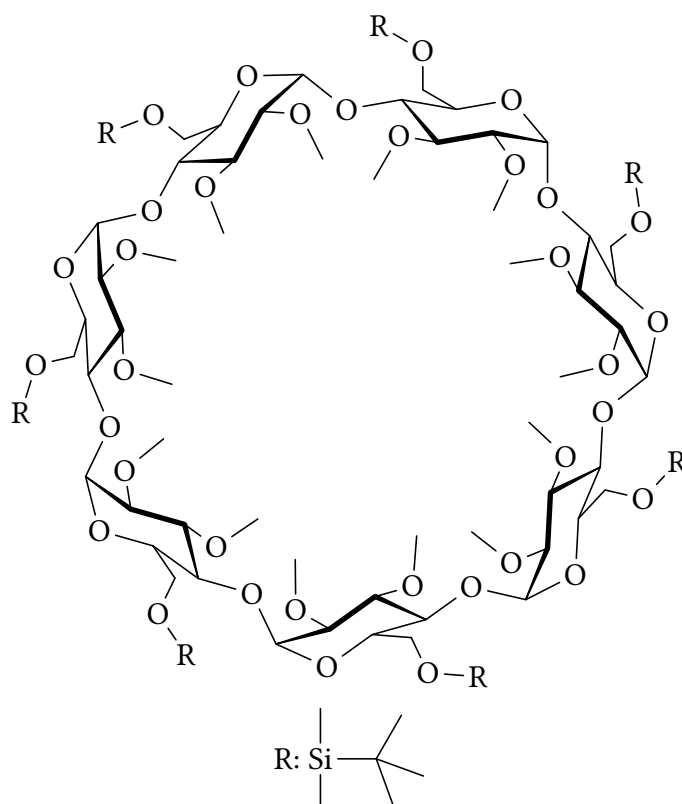


Abbildung 2.7: Strukturformel von Heptakis(2,3-di-*O*-methyl-6-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl)- β -cyclodextrin

MS-Detektion im SIM-Modus, andererseits mit MS/MS-Detektion im SRM-Modus. Diese wurden anschließend miteinander verglichen.

Das bereits in Abschnitt 2.1.2 genannte MDGC-System mit SIM-MS mit der Lipodex G[®]-Säule in ²D wurde auch für die enantioselektive Analyse von Gemüseproben verwendet. In Ergänzung dazu und insbesondere für einen Vergleich zwischen zwei verschiedenen MS-Detektionsmodi bei kritischen Analysen wurde eine weitere eMDGC-Methode, diesmal mit Tandem-MS-Detektion im SRM-Modus, etabliert.

Das analytische System hierzu bestand aus einer polaren ¹D-Säule mit Polyethylenglykol als stationärer Phase, die hinsichtlich des Isotopeneffekts ähnliche Eigenschaften hatte wie die SLB-IL60, so dass auch hier ein einziges, kurzes Schnittfenster für den Transfer der SBMP-Spezies genutzt werden konnte. In ²D war wie zuvor die Lipodex G[®]-Säule im Einsatz (Säulendimensionen s. Publikation P3). Da das eMDGC-MS/MS-System in einem Ofen installiert war, wurde eine spezielle Methodenoptimierung bezüglich der

Starttemperatur für die ²D-Trennung benötigt. Die ²D-Starttemperatur musste für die Trennung der SBMP-Enantiomere niedriger sein als die ¹D-Elutionstemperatur. Um den transferierten Bereich aus ¹D auf der ²D-Säule zu fixieren, bis der Ofen auf die neue Starttemperatur abgekühlt war, wurde ein kurzer Bereich der ²D-Kapillare über ein zusätzlich installiertes Kryo-Ventil (Thermo Kryo-Modulator) durch Anblasen mit flüssigem Kohlenstoffdioxid gekühlt.

Die Probenvorbereitung war für beide Analysemethoden gleich und erfolgte mittels automatisierter SPME aus dem Dampfraum der homogenisierten und verdünnten Probe oder aus dem Dampfraum über lebenden Marienkäfern. Die adsorptive Faser im zweiten System hatte eine doppelte Länge und damit eine höhere Kapazität, Analyten aber auch andere flüchtige Substanzen aus dem Dampfraum der Probe zu adsorbieren. Die Art der Faser und die Extraktionsbedingungen waren in beiden Methoden gleich.

2.1.3.4 Diskussion der Unterschiede beider Methoden

Mittels HS-SPME eMDGC-MS (SIM) wurden in unterschiedlichen Gemüsesorten SBMP-Gehalte von 0,3 µg/kg oder weniger bis über 1,5 µg/kg ermittelt. (*R*)-SBMP wurde in keiner Probe oberhalb der Nachweisgrenze von ca. 150 ng/kg detektiert. Diese Analyse-methode ist also für den ppb-Bereich ausreichend empfindlich. In Konzentrationsbereichen darunter (aber nicht ausschließlich in diesem Falle, siehe Spezialfälle wie Pastinak oder Tomate im folgenden Absatz) nehmen die Störungen durch co-eluierende Matrixbestandteile zu, was teilweise erst durch den Vergleich mit der selektiveren eMDGC-MS/MS Methode erkennbar wurde.

Die gleichen Proben wurden mittels HS-SPME eMDGC-MS/MS im SRM-Modus nochmals analysiert und brachten für vorher unplausible Ergebnisse, z. B. nicht detektierbares SBMP wie im Falle von Tomate oder Pastinak, nun plausiblere Gehalte. Allerdings ist selbst nach MDGC und der selektiveren MS/MS-Detektion auf diesem System im Falle der Tomate eine Co-Elution auf der Quantifier-Massenspur des SBMPs erkennbar. Erst die weiteren, zur zusätzlichen Absicherung aufgezeichneten Massenspuren (Qualifier-Massenspuren, ebenfalls Übergänge bestimmter Ionen in bestimmte andere Fragmentationen), konnten (*R*)-SBMP in dieser Probe ausschließen.

An beiden Systemen wurde deutlich, dass MDGC per se kein Garant für die vollständige Trennung der Analyten von Begleitstoffen aus einer komplexen Matrix ist. Generell lässt sich sagen, dass die Detektion höherer MP-Konzentrationen (≥ 500 ng/kg bei Gemüse) weniger kritisch durch Co-Elutionen beeinträchtigt wird. In der Marienkäfer-Matrix waren die Gehalte von SBMP vergleichsweise hoch, so dass hier keine Störungen der Enantiodifferenzierung gesehen wurden. Die Enantiomerentrennung zeigte auch in den Marienkäferproben lediglich das Vorkommen von (*S*)-SBMP auf.

2.1.3.5 Entwicklung einer HS-SPME enantio-GC×GC-MS-Methode

Für den Spurenbereich von weniger als 1 ppt, der realistisch für SBMP in Wein und Beeren ist und der mit den zuvor genannten zwei eMDGC-Systemen nicht erfassbar war, wurde eine wesentlich leistungsfähigere in ¹D enantioselektive umfassende zweidimensionale Gaschromatographie (enantio-GC×GC)-Methode etabliert. Diese erlaubt eine nahezu kontinuierliche Trennung der gesamten injizierten Probe an zwei unterschiedlichen stationären Phasen mit dem Resultat einer viel größeren Peakkapazität verglichen mit MDGC oder eindimensionaler GC. Außerdem resultiert aus der Modulation des ¹D-Peaks eine Fokussierung der Peaks und folglich eine Erhöhung des Signal-Rausch-Verhältnisses in ²D, was die Detektierbarkeit steigert.

Auf Grund der einfacheren technischen Realisierung wurde eine enantioselektive Trennsäule mit recht geläufigen Säulendimensionen von 30 m Länge und 0,25 mm Innendurchmesser (i. D.) in ¹D verwendet. Der chirale Selektor war Heptakis(2,3-di-*O*-methyl-6-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl)- β -cyclodextrin (25 % in SE 52), der unter den gegebenen chromatographischen Bedingungen die Elutionsreihenfolge mit (*R*)- vor (*S*)-SBMP ergab. Für die Modulation wurde ein Kryo-Modulator mit zwei Düsen für das Anblasen mit flüssigem Kohlenstoffdioxid auf dem hintersten Stück der ¹D-Säule angebracht. Die anschließende schnelle ²D-Trennung erfolgte an einer 2 m langen, mit 5 % Phenyl-polydimethylsiloxan beschichteten Kapillarsäule mit einem i. D. von 0,15 mm. Als Detektoren wurden für die Methodenentwicklung ein Quadrupol-Massenspektrometer mit dafür ausreichenden 15 Hz Scanrate und für die späteren Analysen ein Flugzeit-Massenspektrometer (*time of flight*- oder TOF-MS) mit 50 Hz verwendet. Weitere methodische Parameter sind der Publikation P₃ (Abschnitt 2.1.3.1) zu entnehmen.

2.1.3.6 Optimierung der enantio-GC×GC-Methode

Eine wichtige Voraussetzung in der GC×GC ist die Einhaltung des sogenannten Modulationskriteriums. Gemäß Seeley [232] ist die umfassende zweidimensionale GC ohne Verluste in der quantitativen Präzision und ohne relevanten Verlust der ¹D-Auflösung bei einer Modulationsperiode P_M von unter dem 1,5-Fachen der Standardabweichung $^1\sigma$ des Peaks in ¹D möglich:

$$P_M \leq 1,5 \cdot ^1\sigma \quad (2.1)$$

Das bedeutet, dass ein Peak aus der ¹D für den Erhalt einer guten Auflösung in mehreren (mindestens 3–4) Teilen moduliert, d. h. gesammelt und auf die ²D-Säule injiziert werden sollte [163, 233]. Dieser Punkt ist um so wichtiger für die enantio-GC×GC, da die chirale Auflösung in ¹D nicht durch eine falsch gewählte, zu lange Modulationszeit aufgehoben werden darf. Aus diesem Grund wurde zunächst die Modulationszeit so optimiert, dass beide SBMP-Enantiomere jeweils mindestens in drei Teilen auf die ²D-Säule injiziert werden. Bei der Basispeakbreite der unmodulierten Substanzpeaks in ¹D, die etwa 10 s betrug, würden 3 s Modulationszeit ausreichen, um das Modulationskriterium zu erfüllen. Dies zeigte sich in der Praxis (s. Fig. 5 in der Publikation P3). Mit einer Modulationszeit von 2 s ist die Auflösung der Enantiomere im resultierenden zweidimensionalen Plot noch höher als bei 3 s und gerade die Zuordnung im Grenzbereich zwischen beiden Enantiomeren deutlicher. Mit dieser Modulationszeit und unter Zuhilfenahme der dreifach deuterierten Analoga als interne Standards wurde die Enantiomerenverteilung von nativen SBMP-Vorkommen in unterschiedlichen Matrices analysiert (Ergebnisse s. Abschnitte 2.2.3.2 und 2.2.3.3). In drei der gezeigten Proben (Cabernet franc- und Sauvignon blanc-Berensaft, sowie *H. axyridis*) sind auf der Massenspur m/z 138 (Hauptfragment im Spektrum von SBMP) im 2D-Plot unbekannt Substanzen sichtbar, die nur durch die Trennstrecke in zweiter Dimension abgetrennt wurden und in einer ¹D-Applikation mit (*S*)- und/oder (*R*)-SBMP co-eluierten würden. Das größere Auflösungsvermögen der GC×GC stellt für die untersuchten Proben einen klaren Vorteil dar.

2.1.4 P4: eMDGC-MS/MS für die Analyse weiterer Alkylmethoxypyrazine

In Ergänzung zur Quantifizierung der drei Vertreter IPMP, SBMP und IBMP und zur Enantiodifferenzierung von SBMP wurde eine analytische Methode für die Trennung weiterer Alkylmethoxypyrazine angestrebt. Bei diesen handelt es sich um die Stellungs- bzw. Strukturisomere 3-Methoxy-2,5-dimethylpyrazin (DMMP), 2-Methoxy-3,5-dimethylpyrazin (MDMP), 2,3-Dimethyl-5-methoxypyrazin und 2-Ethyl-3-methoxypyrazin (EtMP), alle mit der Summenformel $C_7H_{10}N_2O$ (vgl. Abb. 1.5). Wie in der Einleitung unter 1.1.4.1 und 1.1.4.2 beschrieben, ist es denkbar dass Verbindungen wie DMMP und MDMP durch Marienkäfer oder Kork in Wein gelangen und dort zu Fehltonen führen können.

In der folgenden Publikation wird die Weiterentwicklung einer bestehenden H/C-MDGC-MS/MS-Methode zur Bestimmung und Quantifizierung der genannten weiteren Alkylmethoxypyrazine beschrieben.

2.1.4.1 Manuskript P4 zur Charakterisierung und Analytik von Dimethylmethoxypyrazinen

Titel: Characterization and analysis of structural isomers of dimethyl methoxypyrazines in cork stoppers and ladybugs (*Harmonia axyridis* and *Coccinella septempunctata*)

Autoren: Petra Slabizki, Charlotte Legrum, Reinhard Meusinger, Hans-Georg Schmarr

Publiziert in: Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2014. 406(25): S. 6429–6439
Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

DOI: 10.1007/s00216-014-8049-4

Hyperlink: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00216-014-8049-4>

Korrektur: Erratum to: Characterization and analysis of structural isomers of dimethyl methoxypyrazines in cork stoppers and ladybugs (*Harmonia axyridis* and *Coccinella septempunctata*)

Publiziert in: Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2014. 406(29): S. 7743–7744
Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

DOI: 10.1007/s00216-014-8164-2

Hyperlink: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00216-014-8164-2>

Manuskript reproduziert mit Erlaubnis von Springer Nature, Lizenz Nummern 4467221200572 (Artikel) und 4467221346686 (Erratum) vom 13.11.2018.

Characterization and analysis of structural isomers of dimethyl methoxypyrazines in cork stoppers and ladybugs (*Harmonia axyridis* and *Coccinella septempunctata*)

Abstract

The three constitutional isomers of dimethyl-substituted methoxypyrazines: 3,5-dimethyl-2-methoxypyrazine **1**; 2,5-dimethyl-3-methoxypyrazine **2**; and 2,3-dimethyl-5-methoxypyrazine **3** are potent flavor compounds with similar mass spectrometric, gas chromatographic, and nuclear magnetic resonance spectroscopic behavior. Therefore, unambiguous analytical determination is critical, particularly in complex matrices. The unequivocal identification of **1–3** could be achieved by homo- and heteronuclear NMR correlation experiments. The observed mass fragmentation for **1–3** is proposed and discussed, benefiting from synthesized partially deuterated **1** and **2**. On common polar and apolar stationary phases used in gas chromatography (GC) **1** and **2** show similar behavior whereas **3** can be separated. In our focus on off-flavor analysis with respect to wine aroma, **1** has been described as a “moldy” off-flavor compound in cork and **2** as a constituent in *Harmonia axyridis* contributing to the so-called “ladybug taint,” whereas **3** has not yet been described as a constituent of wine aroma. A successful separation of **1** and **2** could be achieved on octakis-(2,3-di-*O*-pentyl-6-*O*-methyl)- γ -cyclodextrin as stationary phase in GC. Applying heart-cut multidimensional GC analysis with tandem mass spectrometric detection we could confirm the presence of **1** as a “moldy” off-flavor compound in cork. However, in the case of *Harmonia axyridis*, a previous identification of **2** has to be reconsidered. In our experiments we identified the constitutional isomer **1**, which was also found in *Coccinella septempunctata*, another species discussed with respect to the “ladybug taint.” The analysis of such structurally related compounds is a demonstrative example for the importance of a chromatographic separation, as mass spectrometric data by itself could not guarantee the unequivocal identification.

Introduction

Alkyl methoxypyrazines have been identified in many foodstuffs of plant origin as aroma-relevant compounds [1] but can also be generated as Maillard reaction products [2]. Due to

their, in many cases, low odor thresholds they contribute significantly to the aroma of such foodstuffs or products made thereof. Well-known representatives are 3-alkyl-2-methoxypyrazines such as 3-isobutyl-2-methoxypyrazine, 3-isopropyl-2-methoxypyrazine, or 3-sec-butyl-2-methoxypyrazine which are responsible for characteristic aroma attributes as e.g. in bell peppers [3], peas [4], carrots [5] or some *Vitis vinifera* varieties like Sauvignon blanc [6].

Alkyl methoxypyrazines with two methyl groups have also been identified in a variety of matrices. 3,5-dimethyl-2-methoxypyrazine **1** was found as an obnoxious musty odor compound from the metabolism of Gram-negative bacteria [7] and was also detected in a machine cutting fluid emulsion with an off-odor [8]. Later, **1** was also described in raw hazelnuts [9], raw arabica coffee beans [10], or cooked brown rice [11]. Sensory attributes for **1** are described as “wet cardboard,” “musty,” “moldy,” “dusty,” and “earthy,” and in higher concentrations with attributes such as “chocolate,” “coffee,” and “nutty” [9, 10, 12–14]. Czerny and Grosch determined an odor threshold for **1** as low as 1 pg/L in air [10].

For dimethyl-substituted methoxypyrazines, three structural isomers **1–3** (Fig. 1) are possible. Changing the position of the methyl groups causes a drastic change in sensory properties of the individual compounds. A dramatic increase in odor intensity is found for compound **1** (1 pg/L in air) in comparison with 2,5-dimethyl-3-methoxypyrazine **2** (56 ng/L air) [10]. Such a structural dependent quantitative (and sometimes also qualitative) change of the sensory properties of substituted pyrazines is often found and has been described in extensive studies, e.g., by Mihara et al. [15, 16].

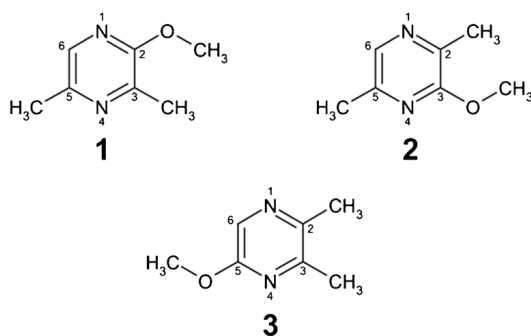


Figure 1: Structural isomers of dimethyl methoxypyrazines: 3,5-dimethyl-2-methoxypyrazine **1**; 2,5-dimethyl-3-methoxypyrazine **2**; and 2,3-dimethyl-5-methoxypyrazine **3**

Sensory properties for **2** described in literature are associated with attributes such as “earthy,” “musty,” “roasted peanuts,” or “dead leaves” [10, 17, 18]. In foodstuffs, **2** has been described in pepper (*Piper nigrum* L.) [19], cheese [20], peanuts [21], sesame paste, [22] and in *Mentha* species [23]. To the best of the authors’ knowledge, there has been no odor threshold described for 2,3-dimethyl-5-methoxypyrazine **3**, yet. Furthermore, only one incidence has been found in literature for the occurrence of **3** in nature. Recently, Poehlmann and Schieberle described it as one of the odor-active compounds in Styrian pumpkin seed oil [24]. The odor quality (determined by gas chromatography–olfactometry; GC-O) was given as “roasty, sweet;” however, no odor threshold had been determined. According to these authors, identification was based on mass spectral data, retention indices, and odor descriptions compared to reference substances. However, no spectral data was given.

In our ongoing research on the occurrence of alkyl methoxypyrazines in wine and related matrices [25, 26], we became interested in the investigation of dimethyl methoxypyrazines since they had been described as off-odor compounds. Simpson et al. identified compound **1** in cork stoppers causing a “fungal must” taint in wine. They determined the odor threshold for **1** in a white wine matrix with 2.1 ng/L [13]. **1** has also been found as a malodorous compound in water supplies [27] and seems to be generated by bacteria (as well as **2**) [28, 29]. This first incidence of **1** as off-flavor compound in cork was later confirmed by Chatonnet et al. who also described **1** in oak chips and further discussed the microbiological origin of **1** [14]. In recent years, the wine industry has been confronted with an off-odor problem associated with beetles that are harvested together with the grapes, leading to the so-called “ladybug taint” in wine [30]. In this respect, **2** has been described together with other 3-alkyl-2-methoxypyrazines as a constituent of *Harmonia axyridis* [17] and also in *Coccinella septempunctata* [18], the beetles that were eventually causing the “ladybug taint.”

Experimental

Chemicals Dichloromethane, methanol, and methyl *tert*-butyl ether were from Carl Roth (Karlsruhe, Germany); sodium, sodium sulfate, sodium carbonate (anhydrous), and calcium chloride hexahydrate were from Merck (Darmstadt, Germany); [²H₁]-chloroform

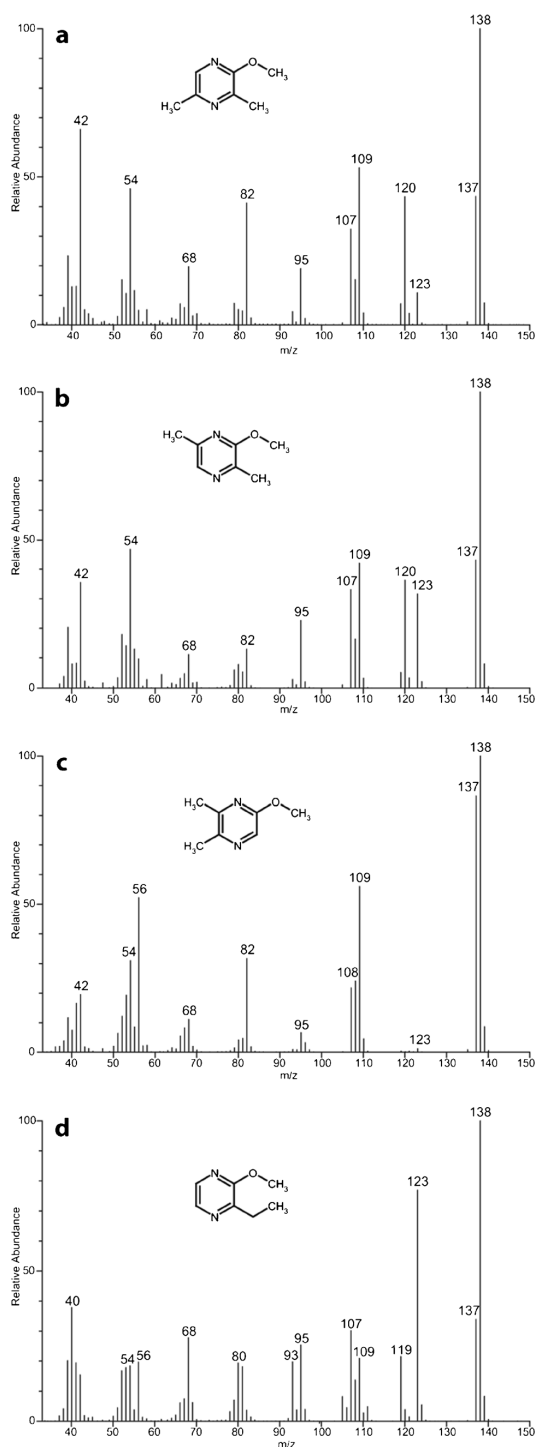


Figure 2: Mass spectra of constitutional isomers of methoxypyrazines with molecular formula $C_7H_{10}N_2O$ (compounds **1-4**); conditions as described in text

Abkürzungen **a: 1** = MDMP; **b: 2** = DMMP; **c: 3** = 2,3-Dimethyl-5-methoxypyrazin; **d: 4** = EtMP

and sodium hydroxide were from KMF Laborchemie (Lohmar, Germany). 3,5-dimethyl-2-chloropyrazine (CAS no. 38557-72-1) and methyl-deuterated [$^2\text{H}_3$]-methanol (CAS no. 1849-29-2) were from ABCR (Karlsruhe, Germany); 2,5-dimethyl-3-chloropyrazine (CAS no. 95-89-6) and trimethyloxonium tetrafluoroborate were from TCI Europe (Eschborn, Germany); butane-2,3-dione (CAS no. 431-03-8), 3-ethyl-2-methoxypyrazine **4** (CAS no. 25680-58-4) and 3-(1-methylethyl)-2-methoxypyrazine **5** (3-isopropyl-2-methoxypyrazine; CAS no. 25773-40-4) were from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany); glycineamide hydrochloride (CAS no. 1668-10-6) was from Alfa Aesar (Karlsruhe, Germany); and hydrochloric acid was from Riedel-de Haën (Seelze, Germany). The [$^2\text{H}_3$]-isotopologue of **5** (**d-5**) was synthesized as described earlier [25, 26]. Commercial chemicals were usually of analytical grade and used as such, except butane-2,3-dione which was freshly distilled. The reference substance **1** (CAS no. 92508-08-2) was purchased from Bellen Chemistry Co. Ltd. (Beijing, China).

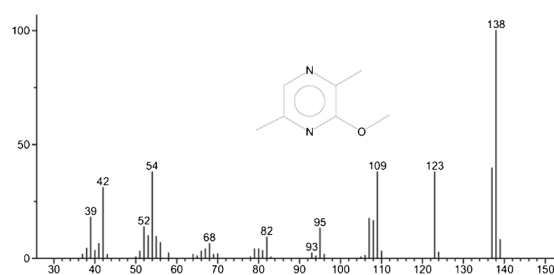


Figure 3: Mass spectrum of compound **2** published in NIST database (relative abundance over m/z)

Syntheses of other reference compounds

2,5-dimethyl-3-methoxypyrazine **2**

The synthesis of **2** was done according to the procedure described earlier by Czerny and Grosch [10]. 2,5-dimethyl-3-chloropyrazine (1.99 g, 14 mmol) was dissolved in methanol (5 mL) and freshly prepared sodium methoxide solution (~400 mg, ~17 mmol sodium in 7 mL methanol) was added and refluxed until completeness of the reaction (monitored by gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS)). After reaching room temperature, distilled water (20 mL) was added and the products were extracted with methyl tert-butyl ether (5×15 mL). The combined organic phases were dried with sodium sulfate and

concentrated using a micro distillation apparatus with a spinning band column. The residual solvent was purged with argon gas using a fused silica capillary. The obtained purity of **2** was 97 % (determined by GC-MS).

2,5-dimethyl-3-[²H₃]-methoxypyrazine **d-2**

d-2 was prepared as described for **2** but substituting methanol with [²H₃]-methanol. Purity was 95 % (determined by GCMS).

3,5-dimethyl-2-[²H₃]-methoxypyrazine **d-1**

d-1 was prepared as described for **d-2** but using 3,5-dimethyl-2-chloropyrazine as starting material. Purity was 99 % (determined by GC-MS).

2,3-dimethyl-5-hydroxypyrazine **6**

Synthesis of **3** followed a common approach for generation of the heterocyclic ring system described earlier [32, 33], condensing a vicinal dicarbonyl compound with hydrohalides of the appropriate amino acid amides. Here, glycine hydrochloride (9 mmol) was dissolved in methanol (15 mL) and freshly distilled butane-2,3-dione (9 mmol in 5 mL water) was added. With continuous stirring, 12 M sodium hydroxide solution (2 mL) was added dropwise at a temperature kept at -25 °C (ice-calcium chloride hexahydrate mixture). After 2 h stirring at room temperature, the reaction mixture was allowed to warm to 0 °C and then 12 M hydrochloric acid (2 mL) was added. After multiple extractions with dichloromethane, the organic extract was dried with sodium sulfate, filtered, and the solvent was evaporated, yielding 0.3 g of a yellow amorphous raw product that was characterized by GC-MS with **6** as the major product. qMS (EI+): 42 (100), 124 (78, M+), 95 (60), 96 (37), 81 (22), 54 (18), 41 (14), 32 (10), 52 (9), 43 (8); linear retention index (LRI, based on *n*-alkanes and determined as described earlier [34]): ZB-Wax 2366, ZB-5 1173 (fronting peak, retention taken at the front of the peak).

2,3-dimethyl-5-methoxypyrazine **3**

Selective *O*-methylation of **6** was achieved using a Meerwein salt (trimethyloxonium tetrafluoroborate, TMO) [35]. Raw product **6** was mixed with sodium carbonate (0.3 g) in water (6 mL) and TMO (0.3 g) was added in portions under stirring at room temperature. After 12 h of stirring, another portion of 0.2 g of TMO was added and stirred overnight. The dark red reaction mixture was transferred into a GC headspace vial with a silicone

septum cap and purged with argon by inserting a fused silica capillary through the septum and into the liquid mixture. The purged volatiles left the vial through another piece of fused silica capillary (5 cm × 0.53 mm i.d. capillary) and were trapped on a LiChrolut® EN solid phase extraction (SPE) cartridge (200 mg/3 mL; Merck) fitted via a press-fit connector and a piece of a polyethylene tube to the capillary. The total purge time was 3 h with a flow of some 25 mL/min. To avoid a potential breakthrough, every 45 min, the cartridge was replaced with a new one. Each of the (four) cartridges was eluted with 1 mL of [²H₁]-chloroform. After pooling and concentrating with a micro distillation apparatus [36], the residual solution was used for further characterization by GC-MS and nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR).

Gas chromatographic and mass spectrometric analysis

GC-MS was done on three different systems:

- (i) A Finnigan Trace GC Ultra (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Germany) was equipped with a programmed temperature vaporizing injector (PTV) and coupled to an ion trap PolarisQ mass spectrometer (Thermo Fischer Scientific). The analytical column used was a 30 m × 0.25 mm i.d. fused silica capillary coated with 0.25 μm of 5 % diphenyl 95 % dimethyl polysiloxane (ZB-5, Phenomenex, Aschaffenburg, Germany). Helium was used as carrier gas at a constant flow of 1.2 mL/min. Split injection was done at 240 °C (split ratio 1:10). Oven temperature was programmed from 40 °C (2 min isothermal) with 5 °C/min to 250 °C (5 min hold). MS detection was performed in positive electron ionization mode (EI) at 70 eV with a scan range of m/z 29-350. Ion source temperature was held at 230 °C and the transfer line was set at 250 °C.
- (ii) A 8000 series GC instrument (C. E. Instruments, now Thermo Fisher Scientific) was coupled to a MD 800 quadrupole mass spectrometer (Fisons Instruments, now Thermo Fisher Scientific). Separation was done with a fused silica capillary (30 m × 0.25 mm i.d.) coated with 0.5 μm polyethylene glycol (ZB-WAX, Phenomenex) which was connected to a 2 m × 0.32 mm i.d. phenylmethylsilylated fused silica capillary as a precolumn. The split/splitless injector base was at 210 °C and injection was done at a split ratio of about 1:50. Helium was used as carrier gas in constant

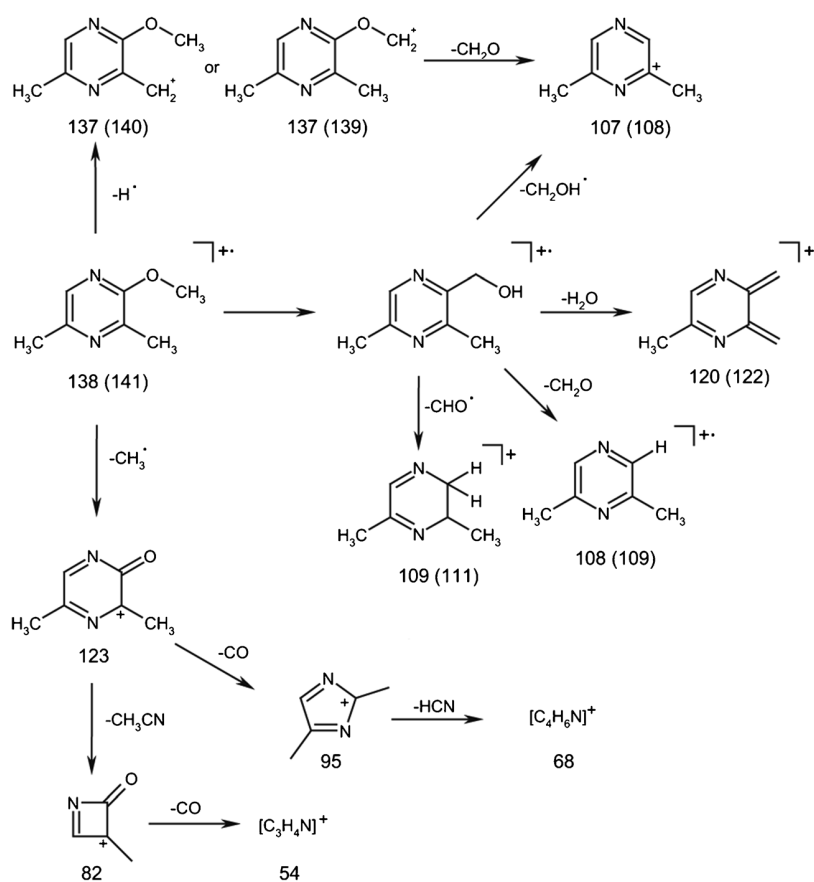


Figure 4: Proposed mass fragmentation of **1**. Fragments of **2** and **3** are concordant with a different methyl group arrangement, respectively. With compound **3** the fragment with m/z 120 is not observed (explanation described in text). Fragmentations with m/z values given in parenthesis represent isotopic (deuterated, $^2\text{H}_3$) compounds **d-1** and **d-2**

pressure mode at 75 kPa. Oven temperature was programmed from 40 °C (5 min isothermal) with 5 °C/min to 240 °C (10 min hold). MS acquisition was done in positive EI mode at 70 eV in full scan mode from m/z 29 to 350. Ion source and transfer line were heated at 230 and 200 °C, respectively.

- (iii) A Trace GC Ultra was coupled to a triple quadrupole mass spectrometer (Quantum Ultra; both Thermo Fisher Scientific). The GC was upgraded (S+H Analytik GmbH, Mönchengladbach, Germany) with a Deans' switching device (SGE, Victoria, Australia) for H/C MDGC and a cryo-trap made in-house using a dual cryo-jet GC×GC

modulator (Thermo Fisher Scientific) and liquid CO₂ as coolant, allowing trapping of material being transferred from ¹D into ²D. The ¹D analytical column used was a 15 m × 0.25 mm i.d. fused silica capillary coated with 0.25 μm of polyethylene glycol (ZB-WAX, Phenomenex) and a ²D separation column consisting of a 25 m × 0.25 mm i.d. fused silica capillary coated with a derivatized cyclodextrin stationary phase (LIPODEX G[®], Macherey-Nagel, Düren, Germany). Helium was used as carrier gas at constant pressure modes. A programmed temperature vaporizing (PTV) injector was connected to the ¹D separation column with pressure set to 146 kPa. Using the second (split/splitless) injector for auxiliary gas supply, this was set to 121 kPa. Flow diversion was achieved by redirecting the auxiliary gas using a three-port valve (Valco Instruments Co. Inc., Houston, TX, USA). Actuation of the switching (H/C) events was achieved via the event and valve functions of the instrument and programmed in the manufacturer's software. Headspace solid phase microextraction (HS-SPME) was done at the PTV injector in splitless mode (2 min, 270 °C, 1 mm i.d. liner). The oven temperature was programmed from 40 °C (2 min isothermal) at 8 °C/min to 137 °C (0.5 min isothermal). Then the temperature was lowered to 60 °C at 30 °C/min (5 min isothermal) before the ²D GC separation started by raising the temperature to 75 °C at 1 °C/min and finally, to 190 °C at 50 °C/min (5 min isothermal). The cryo-jet was actuated from 11.5 min (ca. 0.5 min before the first heart-cut) until 18 min (ca. 1 min after the oven temperature had reached 60 °C). MS detection was performed in positive EI mode at 70 eV. For selected reaction monitoring (SRM) argon (99.999 % purity) was used as collision gas with a collision cell pressure of 1.1 mTorr. Mass resolution in Q₁ and Q₃ were 0.7 amu. The total cycle time was 300 ms. The optimized SRM transfers and collision energies were (quantifier SRMs are marked with *): 137→107 (10 V), 138→109 (12 V), and 138→120 (8 V, *) for **1** and **2**; 123.1→95.1 (8 V), 138.1→119.1 (8 V), and 138.1→123.1 (10 V, *) for **4**; 137→109 (8 V), 152→124 (8 V), and 152→137 (8 V, *) for **5**; and 127.1→95 (8 V), 140→112.1 (8 V), and 155.1→140 (8 V, *) for **d-5**. Ion source temperature was held at 230 °C and the transfer line was set at 190 °C. Automated HS-SPME extraction (TriPlus RSH, Thermo Fisher Scientific) of ladybug samples used a 2 cm divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane fiber (Supelco, Sigma-Aldrich) with an extraction time of 30 min at a temperature of 50 °C. Life bugs were chilled and then weighted into 20 mL headspace vials with a teflon-lined screw cap. Approximate estimation of concentrations of dimethyl methoxypyrazines was based on rela-

tive response factors using **d-5** as an internal standard. Injection of cork extracts (soaks in 10 vol-% ethanol, previously purged and trapped onto LiChrolut® EN (Merck) SPE cartridges, then eluted with dichloromethane and concentrated to a small volume using micro methods [36]) was done in a PTV on-column mode (on-column liner from Thermo Fisher Scientific) after attaching a 1 m × 0.53 mm i.d. phenylmethyl silylated pre-column via a press-fit connector (BGB Analytik AG, Adliswil, Switzerland) and adjusting the chromatographic conditions accordingly.

Instrument control and MS data acquisition was performed via Xcalibur software, version 1.2 (ii), 2.0.7 (i), and 2.2 (iii) (all Thermo Fisher Scientific). NIST library version 2011 was available as mass spectral database (NIST, Gaithersburg, MD, USA). Linear retention indices (LRI) were calculated using a series of *n*-alkanes [34].

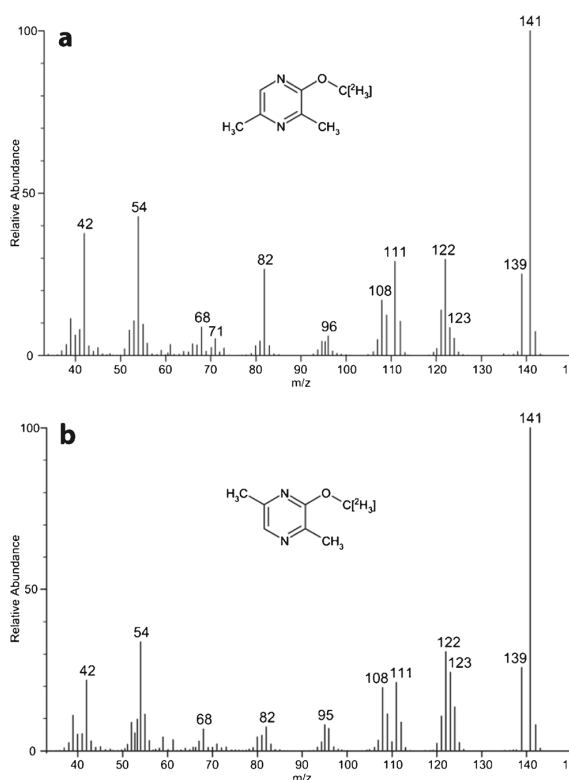


Figure 5: Mass spectra of deuterated isotopologues of **1** and **2**; conditions as described in text

Nuclear magnetic resonance spectroscopy

NMR spectroscopy was performed on Bruker Avance DRX 500 spectrometer (Bruker Biospin, Karlsruhe, Germany). All ^1H , ^{13}C , and ^{15}N -NMR measurements were performed with standard conditions, using [$^2\text{H}_1$]-chloroform as solvent. The chloroform signals were used as internal standard for ^1H - (7.20 ppm) and ^{13}C -NMR (77.20 ppm) spectra, whereas the ^{15}N -NMR spectra were referred to nitromethane (0.0 ppm). All ^{15}N -NMR shift values were determined by heteronuclear multiple bond correlation (HMBC) spectra. The convention of assigning negative values to signals occurring high field of the reference is used here also. The reliable assignment of all ^1H , ^{13}C and ^{15}N -signals were received by two-dimensional NMR measurements (COSY-, NOESY-, HSQC-, and HMBC-spectra). Raw data were processed with the MestReNova vers. 8.0 software (Mestrelab Research, Santiago de Compostela, Spain).

Table 1: 500 MHz ^1H -NMR, chemical shifts in parts per million (ppm) and couplings in Hertz (ref. $\text{CDCl}_3 = 7.2$ ppm)

Compound	H-6	2-CH ₃	3-CH ₃	5-CH ₃	OCH ₃	Couplings
1	7.7 Septet	–	2.38 Doublet	2.36 Doublet	3.88 Singlet	$^4J_{5\text{-Me},6} = 0.7$ $^6J_{3\text{-Me},6} = 0.8$
2	7.78 Multiplet	2.35 Doublet of quartets	–	2.33 Quintet	3.89 Singlet	$^4J_{5\text{-Me},6} = 0.8$ $^5J_{2\text{-Me},6} = 0.1$ $^7J_{2\text{-Me},5\text{-Me}} = 0.7$
3	7.89 Broad	2.45 Broad	2.52 Broad	–	3.93 Singlet	^a

^a Not determined

Results and discussion

Based on the reports of **1** as a potent musty compound in wine from cork stoppers [13] and of **2** as a constituent of *Harmonia axyridis* [17] or in *Coccinella septempunctata* [18], we started to evaluate chromatographic and mass spectrometric properties of these compounds for our future wine aroma research. Whereas **1** was commercially available, we had to synthesize **2** as a reference substance. Compounds **1** and **2** showed an almost identical mass spectrum (Fig. 2a, b). Also, on classical stationary phases often used in

GC analysis of aroma compounds (such as a 5 % diphenyl 95 % dimethyl polysiloxane, or a polyethylene glycol type stationary phase), retention indices for compounds **1** (ZB-5 1053, ZB-WAX 1439) and **2** (ZB-5 1058, ZB-WAX 1442) are very similar. This hampers an unambiguous identification by retention index-based GC analysis but also by GC with MS detection, particularly in the situation of real world matrix burdened samples. LRIs for **1** found in literature on a DB-5 are 1054 [9] or 1055 [10], data that compares well with our findings of 1053 on a ZB-5. In general, reliability of retention index information used for compound identification is dependent on a variety of conditions involved in their generation, such as the exact chemical nature of the stationary phase used, the temperature program rate involved, and others. This has been studied in more detail and has been summarized e.g. by Bicchi et al. [37]. Furthermore, when either compound **1** or **2** is analyzed by GC-MS and searching the resulting spectrum against one of the common commercial spectral databases (such as NIST 2011 in our case), the search result yields compound **2** as hit (Fig. 3). Compound **1** is not listed yet. Looking closer into the mass spectra of compound **2** from our experiment and into that included in the NIST database, there is an apparent difference that cannot be explained. The NIST spectrum does not show m/z 120. However, m/z 120 is presented in our spectrum generated with a quadrupole mass spectrometer (Fig. 2b) as well as in the mass spectrum produced with an ion trap mass spectrometer by Czerny [38]. The mass spectrum obtained for **1** in our situation is comparable to data published earlier [13, 14, 38]. To further complicate an identification solely based on a spectral library comparison is the fact that the constitutional isomer 3-ethyl-2-methoxypyrazine **4** generates an almost identical mass spectrum and is therefore listed among the search results of the spectral database (Fig. 2d). Interestingly, **4** also shows similar LRIs (ZB-5 1055, ZB-WAX 1439) as compound **1** or **2** on a phenyl dimethyl polysiloxane or a polyethylene glycol stationary phase, respectively. Thus, an unambiguous identification in a GC-MS analysis is critical and should require sufficient chromatographic separation and reference standards with a known chemical nature. This fundamental problem is not new to the analytical chemist but might be overseen occasionally. In fact, this issue had triggered others to publish a statement on how compound identification should be conducted, particularly in the complex field of aroma analysis [31].

Since a third constitutional isomer is possible, we also synthesized compound **3** for comparison studies. The LRIs of **3** (ZB-5 1079, ZB-WAX 1493) on the investigated stationary

Table 2: ^{13}C -NMR, chemical shifts in ppm (ref. $\text{CDCl}_3 = 77.2$ ppm)

Compound	C-2	C-3	C-5	C-6	2-CH ₃	3-CH ₃	5-CH ₃	OCH ₃
1	157.2	143.4	143.9	136.8	–	19.4	20.3	53.6
2	141.1	158.2	147.7	134.4	18.9	–	20.8	53.4
3	140.7	151.5	159.4	127.5	21.8	19.1	–	54.3

Table 3: ^{15}N -NMR, chemical shifts in ppm (ref. $\text{CH}_3\text{NO}_2 = 0.0$ ppm)

Compound	N-1	N-4
1	-102.6	-44.0
2	-45.2	-100.8
3	<i>a</i>	<i>a</i>

a Not determined

phases are different from those of compound **1** and **2**, providing enough separation on the commonly used apolar or polar stationary phases. This might be explained by a shielding effect of the oxygen by the neighboring methyl group in compounds **1** and **2**, which is not possible with structure **3**. Also, the mass spectrum of **3** is somewhat different and would ease differentiation from compounds **1**, **2**, or **4** (Fig. 2c) by MS detection. Mass fragmentation of dimethyl methoxypyrazines is proposed in Fig. 4 with the example of **1**. The major difference in the spectra of compound **3** is the missing fragment ion m/z 120, that can be explained by the loss of H_2O . Such a loss of H_2O is only possible if a methyl group is situated at the adjacent ring carbon bearing the methoxy group and is only compatible with compounds **1** and **2** [39]. Some of the proposed mass fragments given in Fig. 4 are supported by the study of the synthesized isotopic compounds with deuterium incorporation in the methoxy group ($-\text{OC}[^2\text{H}_3]$; **d-1** and **d-2**; Fig. 5). Particularly, those fragmentations with m/z values given also in parenthesis represent such instances. As deuteration is in the methoxy group, cleavage of the methoxy group would lead to the mass fragment m/z 107. This fragment is present, however, with minor intensity in comparison to m/z 108. The latter could be explained by a rearrangement forming the proposed alcohol and followed by loss of $\text{C}[^2\text{H}_2]\text{OH}\cdot$. Comparing dimethyl methoxypyrazines (**1–3**) with the ethyl methoxypyrazine **4**, a higher abundance for m/z 123 is observed. This can be explained by a favored expulsion of a $\text{CH}_3\cdot$ from the alkyl chain rather than from the methoxy group. Interestingly, in **4** a loss of H_2O is occurring with a slightly different mechanism, since we observe m/z 119 rather than the m/z 120 explained before.

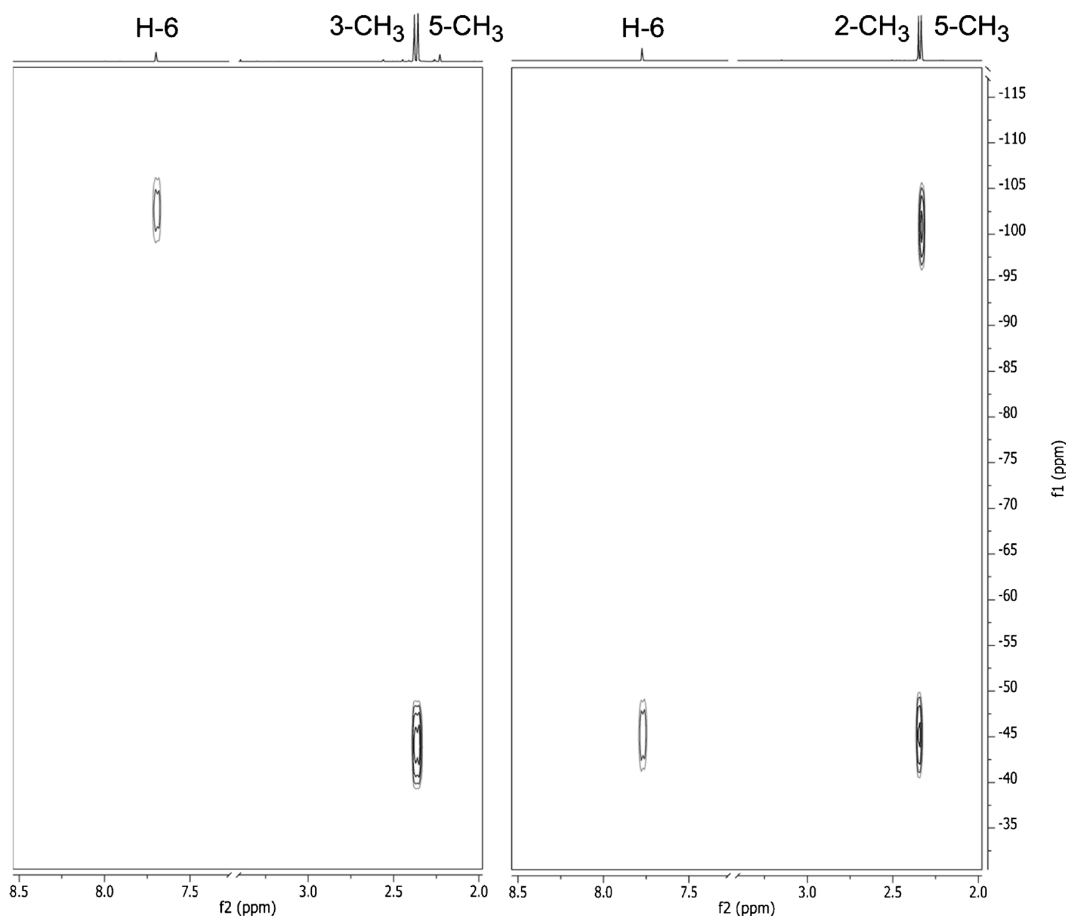


Figure 6: Part of ^1H - ^{15}N -HMBC spectra of compound **1** (6a, *left*) and **2** (6b, *right*)

The experimental results of the NMR measurements are summarized in Tables 1, 2, and 3. No significant differences of the chemical shifts were found in ^1H -NMR spectra of compounds **1** and **2**. In ^{13}C -NMR spectra, a small chemical shift difference of 3.8 ppm was observed only for the ring carbon C-5 that does not guarantee a reliable verification by a NMR database. The unambiguous assignment was achieved by ^1H - ^{15}N -HMBC measurements, finally (Fig. 6). In Fig. 6a, cross peaks were observed from both ^1H -NMR signals of methyl groups with the low field shifted nitrogen atom which is in accordance only with the structure of compound **1** where both methyl groups are arranged near N-4. Otherwise, in Fig. 6b, cross peaks of the methyl groups were observed to both nitrogen atoms. In the latter, this can be explained with the chemical structure of compound **2**, only. The unambiguous assignment of the different H-6 positions of the aromatic hydrogen atoms near 7.7 ppm is also seen here clearly in both compounds. Surprisingly, in ^1H -NMR

spectra of compounds **1** and **2**, multiple patterns were observed for the methyl proton signals. Long-range couplings across up to seven atomic bonds cause the signal splitting. The remarkable coupling constants up to 0.8 Hz were observed as early as 1968 by Cox and Bothner-By [40]. The unambiguous assignment of compound **3** was achieved by ^1H - ^{13}C -HSQC and HMBC measurements as presented in Fig. 7. In Fig. 7b, the methyl protons at 2.45 ppm in position 2 show in addition to the strong ^2J and ^3J couplings to C-2 and C-3 carbons a weak cross peak to carbon C-6 at 127.5 ppm, whereas the methyl protons in position 3 at 2.52 ppm show a weak ^4J long-range coupling to carbon C-5 at 159.4 ppm.

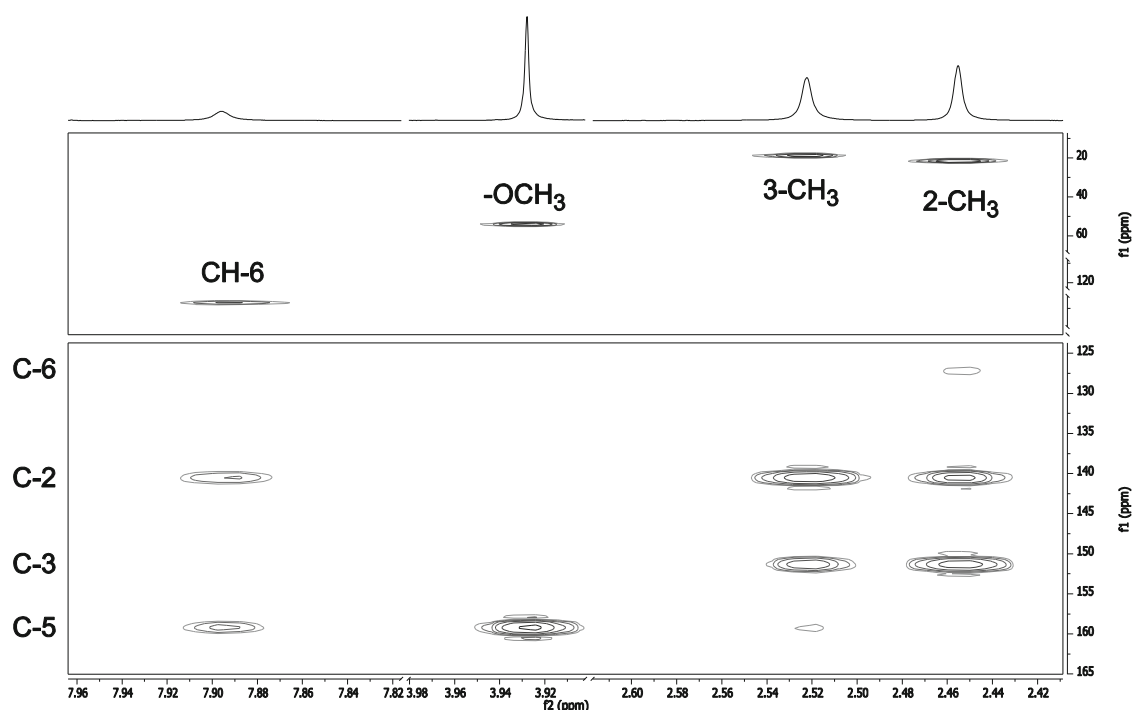


Figure 7: Part of ^1H - ^{13}C -HSQC (7a, top) and HMBC spectra (7b, bottom) of compound **3**

Our analytical approach using H/CMDGC-MS-MS finally allowed an unambiguous differentiation of the compounds under investigation. On octakis-(2,3-di-*O*-pentyl-6-*O*-methyl)- γ -cyclodextrin as stationary phase for the ^2D separation column (trade name LIPODEX G[®]), baseline separation of the critical dimethyl- (**1**, **2**) and also alkyl methoxypyrazines (**4**, **5**) could be achieved. An example for the analysis of dimethyl-substituted methoxypyrazines in ladybugs is given in Fig. 8. Interestingly, in ^1D on the polyethylene glycol stationary phase we observe a co-elution of **1**, **2**, **4** and **5** that allowed using a single H/C for all these compounds (Fig. 8a). As an important result, we could

not detect compound **2** that had previously been described as a constituent of *H. axyridis*. Instead, we clearly identified compound **1** (Fig. 8c) with an approximate concentration of some 1–2 ng/g bug. This could also be confirmed for another ladybug species investigated. In *C. septempunctata*, **2** was again absent and we could identify **1** (Fig. 8c) as seen for *H. axyridis* (however, on a lower concentration of about 0.01–0.1 ng/g bug). In other investigations on suspicious cork samples with moldy cork off-flavors, we could confirm the earlier identification of **1** by Simpson et al. and Chatonnet et al. [13, 14] (data not shown, [41]).

Conclusion

The unequivocal identification of structurally similar compounds by GC-MS is critical due to their similar spectrometric and often also chromatographic data. In the present analytical study this was shown with the example of alkyl methoxypyrazines **1** to **4**. Our work affirms an earlier statement by Molyneux and Schieberle [31] and renders some literature citations describing the occurrence of these compounds questionable. For example, **2** has first been described as a constituent of *H. axyridis*, however, with a tentative assumption dependent upon mass spectrometric identification based solely on comparison with commercial databases [17]. With respect to our findings and the earlier statement for a proper identification [31] such a workflow is not sufficient and should, at best, end with a tentative result. However, analysis of the dimethyl methoxypyrazine compounds described in this work is possible if based on a sufficient chromatographic separation and utilizing structurally verified reference substances. The analytical method proposed in our work (H/C MDGC-MS-MS using the LIPODEX G[®] column in ²D) provided the necessary separation and had also proven to be suitable for application to complex matrices. With the examples shown in the present study, we could confirm 3,5-dimethyl-2-methoxypyrazine **1** to be a constituent in cork samples with a moldy off-flavor. However, we could not confirm the presence of 2,5-dimethyl-3-methoxypyrazine **2** in either ladybug species *H. axyridis* or *C. septempunctata*. Instead, we identified 3,5-dimethyl-2-methoxypyrazine **1** for the first time in these ladybug species.

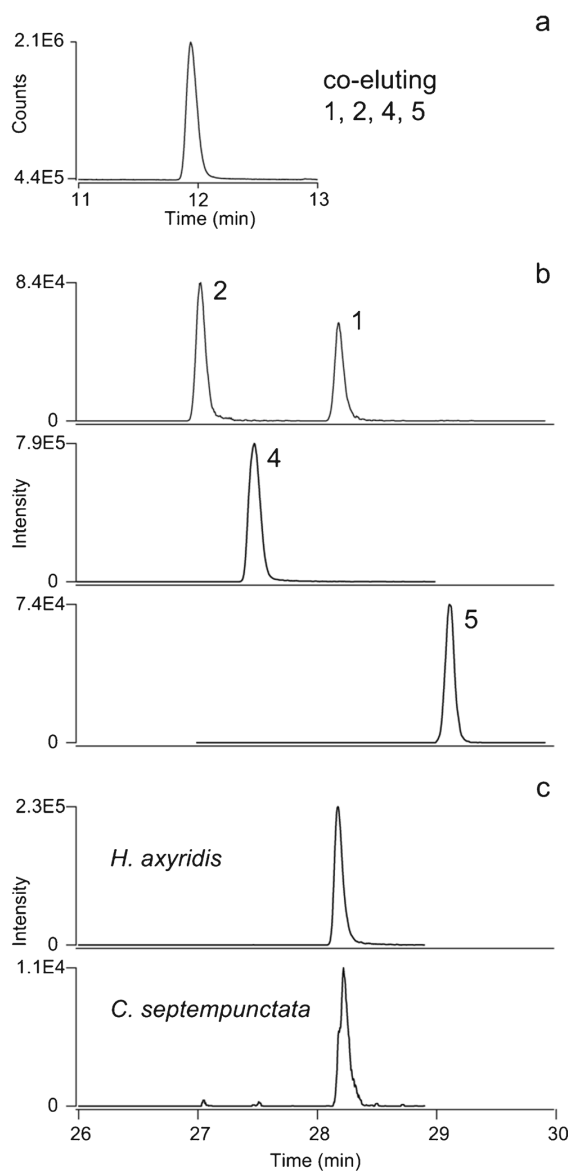


Figure 8: H/C MDGC chromatograms after ^1D (a; flame ionization detector) and ^2D (b; MS-MS) separation of a standard mixture of 3,5-dimethyl-2-methoxy pyrazine **1**; 2,5-dimethyl-3-methoxy pyrazine **2**; 3-ethyl-2-methoxy pyrazine **4**; and 3-isopropyl-2-methoxy pyrazine **5**; HS-SPME-H/C MDGC-MS-MS chromatograms of different ladybug species (c); illustrated ion traces represent quantifier SRMs; conditions as described in text

Acknowledgments We appreciate the financial support from the Ministerium für Umwelt, Landwirtschaft, Ernährung, Weinbau und Forsten (MULEWF; Rheinland-Pfalz, Germany). C. Legrum is grateful to the “Graduiertenförderung des Landes Rheinland-Pfalz” for a Ph.D. scholarship. We also like to thank Prof. Dr. Stefan Schulz (Institute for Organic Chemistry, Technical University of Braunschweig, Germany) for his suggestion on using a Meerwein salt for the selective *O*-alkylation of the intermediate compound **6**. The authors are thankful to Supelco (Sigma-Aldrich) for the supply of SPME fibers.

Petra Slabizki, Charlotte Legrum, and Reinhard Meusinger contributed equally to this work.

References

1. Maga JA, Sizer CE (1973) Pyrazines in foods. *Rev J Agric Food Chem* 21:22–30
2. Fors S (1983) Sensory properties of volatile maillard reaction products and related compounds. *ACS Symp Ser* 215:185–286
3. Buttery RG, Seifert RM, Guadagni DG, Ling LC (1969) Characterization of some volatile constituents of bell peppers. *J Agric Food Chem* 17:1322–1327
4. Murray KE, Shipton J, Whitfield FB (1970) 2-Methoxypyrazines and the flavor of green peas (*Pisum sativum*). *Chem Ind (London, UK)*:897-898
5. Cronin DA, Stanon P (1976) 2-Methoxy-3-sec-butylpyrazine. An important contributor to carrot aroma. *J Sci Food Agric* 27:145–151
6. Allen MS, Lacey MJ, Harris RLN, Brown WV (1991) Contribution of methoxypyrazines to Sauvignon blanc wine aroma. *Am J Enol Vitic* 42:109–112
7. Mottram DS, Patterson RLS, Warrilow E (1984) 2,6-Dimethyl-3-methoxypyrazine: a micro-biologically-produced compound with an obnoxious musty odor. *Chem Ind (London, UK)*:448-449
8. Yasuhara A, Yamanaka Y, Ogawa T (1986) Volatile compounds in machine cutting-fluid emulsion. *Agric Biol Chem* 50:1765–1770
9. Burdack-Freitag A, Schieberle P (2010) Changes in the key odorants of Italian hazelnuts (*Corylus avellana* L. Var. Tonda Romana) induced by roasting. *J Agric Food Chem* 58:6351–6359
10. Czerny M, Grosch W (2000) Potent odorants of raw arabica coffee. Their changes during roasting. *J Agric Food Chem* 48:868–872
11. Jezussek M, Juliano BO, Schieberle P (2002) Comparison of key aroma compounds in cooked brown rice varieties based on aroma extract dilution analyses. *J Agric Food Chem* 50:1101–1105
12. Ferreira V, San Juan F, Escudero A, Cullere L, Fernandez-Zurbano P, Saenz-Navajas MP, Cacho J (2009) Modeling quality of premium spanish red wines from gas chromatography-olfactometry data. *J Agric Food Chem* 57:7490–7498

13. Simpson RF, Capone DL, Sefton MA (2004) Isolation and identification of 2-methoxy-3,5-dimethylpyrazine, a potent musty compound from wine corks. *J Agric Food Chem* 52:5425–5430
14. Chatonnet P, Fleury A, Boutou S (2010) Origin and incidence of 2-methoxy-3,5-dimethylpyrazine, a compound with a “fungal” and “corky” aroma found in cork stoppers and oak chips in contact with wines. *J Agric Food Chem* 58:12481–12490
15. Mihara S, Masuda H, Tateba H, Tuda T (1991) Olfactive properties of 3-substituted 5-alkyl-2-methylpyrazines. *J Agric Food Chem* 39:1262–1264
16. Mihara S, Masuda H (1988) Structure-odor relationships for disubstituted pyrazines. *J Agric Food Chem* 36:1242–1247
17. Cai L, Koziel JA, O’Neal ME (2007) Determination of characteristic odorants from *Harmonia axyridis* beetles using in vivo solid-phase microextraction and multidimensional gas chromatography–mass spectrometry-olfactometry. *J Chromatogr A* 1147:66–78
18. Botezatu AI, Kotseridis Y, Inglis D, Pickering GJ (2013) Occurrence and contribution of alkyl methoxypyrazines in wine tainted by *Harmonia axyridis* and *Coccinella septempunctata*. *J Sci Food Agric* 93:803–810
19. Jagella T, Grosch W (1999) Flavour and off-flavour compounds of black and white pepper (*Piper nigrum* L.). Part 1. Evaluation of potent odorants of black pepper by dilution and concentration techniques. *Eur Food Res Technol* 209:16–21
20. Drake MA, Miracle RE, McMahon DJ (2010) Impact of fat reduction on flavor and flavor chemistry of Cheddar cheeses. *J Dairy Sci* 93:5069–5081
21. Schirack AV, Drake MA, Sanders TH, Sandeep KP (2006) Characterization of aroma-active compounds in microwave blanched peanuts. *J Food Sci* 71:C513–C520
22. Shahidi F, Aishima T, Abou-Gharbia HA, Youssef M, Shehata AAY (1997) Effect of processing on flavor precursor amino acids and volatiles of sesame paste (Tehina). *J Am Oil Chem Soc* 74:667–678
23. Silva CL, Camara JS (2013) Profiling of volatiles in the leaves of Lamiaceae species based on headspace solid phase microextraction and mass spectrometry. *Food Res Int* 51:378–387
24. Poehlmann S, Schieberle P (2013) Characterization of the aroma signature of styrian pumpkin seed oil (*Cucurbita pepo* subsp. *pepo* var. *Styriaca*) by molecular sensory science. *J Agric Food Chem* 61:2933–2942
25. Schmarr HG, Sang W, Ganß S, Koschinski S, Meusinger R (2011) New insights into the synthesis and characterization of 2-methoxy-3-alkylpyrazines and their deuterated isotopologues. *J Label Compd Radiopharm* 54:438–440
26. Schmarr H-G, Ganß S, Koschinski S, Fischer U, Riehle C, Kinnart J, Potouridis T, Kutryev M (2010) Pitfalls encountered during quantitative determination of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in grape must and wine using gas chromatography–mass spectrometry with stable isotope dilution

- analysis. Comprehensive two-dimensional gas chromatography–mass spectrometry and on-line liquid chromatography multidimensional gas chromatography–mass spectrometry as potential loopholes. *J Chromatogr A* 1217:6769–6777
27. Ventura F, Quintana J, Gomez M, Velo-Cid M (2010) Identification of alkyl-methoxypyrazines as the malodorous compounds in water supplies from northwest Spain. *Bull Environ Contam Toxicol* 85:160–164
28. Schulz S, Fuhlendorff J, Reichenbach H (2004) Identification and synthesis of volatiles released by the myxobacterium *Chondromyces crocatus*. *Tetrahedron* 60:3863–3872
29. Dickschat JS, Reichenbach H, Wagner-Doebler I, Schulz S (2005) Novel pyrazines from the myxobacterium *Chondromyces crocatus* and marine bacteria. *Eur J Org Chem*:4141–4153
30. Pickering G, Lin J, Riesen R, Reynolds A, Brindle I, Soleas G (2004) Influence of *Harmonia axyridis* on the sensory properties of white and red wine. *Am J Enol Vitic* 55:153–159
31. Molyneux RJ, Schieberle P (2007) Compound identification: a journal of agricultural and food chemistry perspective. *J Agric Food Chem* 55:4625–4629
32. Jones RG (1949) Pyrazines and related compounds. I. A new synthesis of hydroxypyrazines. *J Am Chem Soc* 71:78–81
33. Karmas G, Spoerri PE (1952) The preparation of hydroxypyrazines and derived chloropyrazines. *J Am Chem Soc* 74:1580–1584
34. van Den Dool H, Kratz PD (1963) A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas–liquid partition chromatography. *J Chromatogr A* 11:463–471
35. Liebich HM, Gesele E, Wöll J (1998) Urinary organic acid screening by solid-phase microextraction of the methyl esters. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 713:427–432
36. Bemelmans JMH (1979) Review of isolation and concentration techniques. In: Land DG, Nursten HE (eds) *Progress in Flavour Research*. Applied Science, London, pp 79–88
37. Bicchi C, Binello A, D’Amato A, Rubiolo P (1999) Reliability of van den Dool retention indices in the analysis of essential oils. *J Chromatogr Sci* 37:288–294
38. Czerny M (1999) Diss. Untersuchungen über den Beitrag von Carbonylverbindungen, Pyrazinen und Furanonen zum Aroma von Arabica-Kaffee. Einfluss der Provenienz und des Röstgrades, München, p 32
39. Kolor MG, Rizzo DJ (1971) Electron-impact induced skeletal rearrangement of 2-methoxy-3-methylpyrazine and 2-methylthio-3-methylpyrazine. *Org Mass Spectrom* 5:959–966
40. Cox RH, Bothner-By AA (1968) Proton nuclear magnetic resonance of di- and trisubstituted pyrazines and their cations. *J Phys Chem* 72:1642–1645
41. Slabizki P (2015) Diss. in prep. Duisburg/Essen

2.1.4.2 Beschaffung und Charakterisierung der Referenzsubstanzen

Für die Entwicklung einer Analyseverfahren für Isomere werden idealerweise alle Referenzsubstanzen mit abgesicherter chemischer Struktur benötigt. Für diesen Zweck wurden die Isomere des Dimethylmethoxy-pyrazins kommerziell erworben oder synthetisch hergestellt (darunter auch die in der Methoxygruppe dreifach deuterierten Analoga von DMMP und MDMP). Diese Referenzsubstanzen wurden gaschromatographisch auf zwei gebräuchlichen stationären Phasen (5 %-Diphenyl-95 %-dimethyl-polysiloxan und Polyethylenglykol) charakterisiert und wiesen für DMMP, MDMP und EtMP sehr ähnliche lineare Retentionsindizes (Retentionsindex s. folgenden Absatz) auf. Lediglich das 2,3-Dimethyl-5-methoxy-pyrazin wurde an den genannten geläufigen stationären Phasen deutlich von den anderen Isomeren getrennt.

Der Retentionsindex (RI) nach Kováts ist ein Term zur Charakterisierung von Substanzen bezogen auf Standardsubstanzen (z. B. Alkane unterschiedlicher Anzahl von C-Einheiten) in der isotherm betriebenen Gaschromatographie. Dieser ist primär von der stationären Phase und den auftretenden chromatographischen Wechselwirkungen abhängig und nicht von Säulengeometrie oder instrumenteller Ausstattung [234]. Bei der Anwendung von linearen Temperaturprogrammen zur Charakterisierung von Substanzen, wie hier der Fall war, trifft die Verallgemeinerung des RI-Systems durch Van den Dool und Kratz zu [235].

Für die gaschromatographisch auf gebräuchlichen Phasen kaum trennbaren Isomere DMMP, MDMP und EtMP wirkt der eindeutigen Zuordnung außerdem entgegen, dass sie massenspektrometrisch sehr ähnliche Fragmentierungsmuster und gleich große Fragmente aufweisen und daher kaum zu unterscheiden sind (s. Fig. 2 in Publikation P₄). Auch bei den üblichen NMR-Techniken ¹³C- und ¹H-NMR resultieren sehr ähnliche Spektren, die eine sichere Zuordnung erschweren (s. Tab. 1 in Publikation P₄). Die eindeutige Identifizierung der drei Stellungsisomere wurde schließlich mittels zweidimensionaler NMR-Korrelationsexperimente erzielt (¹H¹⁵N-*heteronuclear multiple bond correlation* (HMBC), ¹H¹³C-*heteronuclear single quantum coherence* (HSQC) und -HMBC; s. Fig. 6 und 7 in Publikation P₄).

2.1.4.3 Analysemethode für Dimethylmethoxypyrazin-Isomere

Im weiteren Verlauf stand die Entwicklung einer analytischen Methode im Fokus. Hierzu wurde die eMDGC-MS/MS Methode aus Abschnitt 2.1.3.3 als Ausgangspunkt genutzt. Bei Anwendung der bisherigen chromatographischen Bedingungen auf ^1D (Trennphase Polyethylenglycol) wurde eine Co-Elution der Isomere DMMP, MDMP und EtMP mit dem IPMP, welches eine zusätzliche C-Einheit im Alkylrest enthält, beobachtet. Die deuterierten Analoga von DMMP und MDMP wiesen wie die höher alkylierten Methoxy-pyrazine keinen merklichen Isotopeneffekt auf, was in ^1D wiederum die Optimierung hin zu schmalen Schnittfenstern begünstigt. Diese Co-Elution erlaubte es nun durch ein einziges Schnittfenster vier Substanzpeaks sowie die entsprechenden isotopologen Standards auf die ^2D -Säule (Lipodex G[®]) zu transferieren (s. Fig. 8a in Veröffentlichung P4).

In ^2D wurde von einer niedrigen Starttemperatur (60 °C) ausgehend und mit einem vergleichsweise langsamen Temperaturanstieg von 1 °C/min eine vollständige chromatographische Trennung aller vier MPs, die durch den Transfer auf die ^2D -Säule gelangten, erreicht (s. Fig. 8b in Veröffentlichung P4). Für eine selektive Detektion wurden für alle vier MPs (IPMP, EtMP, DMMP und MDMP) die SRM-Bedingungen des Tandem-MS optimiert. Für DMMP und MDMP bestanden hierbei wiederum kaum Unterschiede, so dass letztlich die gleichen Bedingungen für die Aufzeichnung der Signale beider Isomere verwendet wurden. Letztlich erlaubte die gaschromatographische Trennung in ^2D die eindeutige Zuordnung der Isomere, vor allem von DMMP und MDMP.

2.1.4.4 Relevanz eindeutiger chemischer Zuordnung von Isomeren

Am Beispiel der Dimethylmethoxypyrazine zeigt sich der Vorteil, beim potentiellen Vorkommen von Isomeren alle denkbaren Verbindungen als Referenzen zu beschaffen, diese eindeutig chemisch zu charakterisieren und sie für die Entwicklung einer geeigneten analytischen Methode einzusetzen. Auf diese Entwicklungsschritte folgte nun in der Praxis die Anwendung auf verschiedene Proben, in denen Dimethylmethoxypyrazine vorkommen können. Mittels HS-SPME wurden beispielsweise die Marienkäferspezies *H. axyridis* und *C. septempunctata* analysiert. In beiden Spezies konnte nur das MDMP, nicht aber DMMP, identifiziert werden (s. Fig. 8c in Veröffentlichung P4). Dieses Ergebnis

steht im Widerspruch zu Publikationen, in denen die Identifizierung lediglich auf den massenspektrometrischen Daten und deren Abgleich mit Datenbanken beruhte. Cai *et al.* formulierten ihre Zuordnung eines in *H. axyridis* gefundenen Dimethylmethoxy-pyrazins als DMMP hypothetisch auf Grundlage einer massenspektrometrischen Übereinstimmung von über 70 % mit entsprechenden Datenbankeinträgen [36]. Die Verwechslungsgefahr bei alleinigem massenspektrometrischen Vergleich ist allerdings sehr hoch, wie die Massenspektren verdeutlichen (s. Fig. 2 in Publikation P4). In einer Arbeit von Botezatu *et al.* fand die entsprechende Zuordnung aus Rot- und Weißweinen, die unter Zugabe von *H. axyridis* und *C. septempunctata* hergestellt waren, angelehnt an Cai *et al.* ebenfalls als DMMP statt, ohne die anderen möglichen Isomere erkennbar auszuschließen [37]. Ihre multidimensionale GC-Methode beruhte auf den stationären Phasen 5 %-Diphenyl-95 %-dimethyl-polysiloxan in ¹D und Polyethylenglykol in ²D, zwei stationäre Phasen, die in unseren eigenen Studien für DMMP, MDMP und EtMP Unterschiede in den linearen RIs von lediglich 2 bis 5 Einheiten aufzeigten. Sofern nicht alle Referenzen verfügbar sind, kann eine Zuordnung anhand der linearen RIs bei so nah gelegenen Werten leicht zu Fehlern führen, da der RI durch eine Reihe von Eigenschaften wie z. B. der genauen chemischen Natur der stationären Phase beeinflusst wird [236]. Ein wie bei Bicchi *et al.* festgelegtes Toleranzlimit von ± 3 Einheiten bedeutet im Falle der Dimethylmethoxy-pyrazine auf den genannten stationären Phasen, dass anhand des linearen RIs ohne die Referenzen keine sichere Zuordnung möglich ist.

In einer weiteren Anwendung der hier beschriebenen Analyse-methode wurde im Extrakt von auffälligen Flaschen-Korken mit schimmeligem Fehlton ebenfalls MDMP identifiziert, was in Übereinstimmung mit der früheren Identifikation durch Simpson *et al.* [39], Prat *et al.* [82] und Chatonnet *et al.* [40] ist. Die Identifizierung von Substanzen, die im Zusammenhang mit atypischen Kork-Fehlnoten stehen, darunter MDMP, IPMP und IBMP, wurden in einer Arbeit von Slabizki *et al.* veröffentlicht [42]. Quantitative Daten zu MDMP, IPMP und IBMP auf Grundlage der hier beschriebenen analytischen Methode für eine größere Bandbreite von Kork- und Wein-Proben sind in einer weiteren Veröffentlichung in Zusammenarbeit mit Slabizki *et al.* enthalten [237].

2.2 Analysenergebnisse von Alkylmethoxypyrazinen in verschiedenen Spezies

Im folgenden Teil werden die Erkenntnisse der gewonnenen Daten bezüglich der MPs in den verschiedenen untersuchten Matrices zusammengefasst. Die genauen Methodenbeschreibungen befinden sich in den zuvor genannten Publikationen.

2.2.1 MP-Gehalte in Gemüse

Die quantitative Bestimmung der drei Vertreter IPMP, SBMP und IBMP wurde mit der HS-SPME eMDGC-MS (SIM) (Methode s. P3, Abschnitt 2.1.3.1) durchgeführt und ergab Gehalte in einem Bereich von ca. 0,1 bis über 60 µg/kg (s. Tab. 2.3 und Poster A1 im Anhang, A.1). Besonders auffällig ist, dass IBMP, welches mit dem Geruchsattribut 'grüne Paprika' beschrieben wird, mit der höchsten Konzentration in grüner Paprika vorkommt und in den Paprikasorten generell – mit teilweise weit über 10 µg/kg – die Major Komponente ist. Ähnlich verhält es sich mit IPMP, welches mit dem Geruch nach Erbse in Verbindung gebracht wird und in Zuckererbsen und Erbsen mit über 1 µg/kg die Major Komponente darstellt. Die Quantifizierung von SBMP über die gleiche Methode ergab, dass die Zuckererbse in dieser Auswahl das SBMP-reichste Gemüse mit über 1,5 µg/kg (S)-SBMP ist (hier wie auch in allen weiteren Proben war kein (R)-SBMP detektierbar bei einer Nachweisgrenze von 0,15 µg/kg). Weitere SBMP-reiche Sorten waren grüne Paprika, Karotte, Erbse, rote Bete und Petersilienwurzel mit 0,5–1 µg/kg (s. Tab. 2.3). In einigen Proben wie Pastinak, gelbe Paprika und Tomate wurde kein SBMP detektiert, was zumindest im Falle des Pastinaks wenig plausibel ist, da dieser in den Analysen von Murray *et al.* [6] eine der SBMP-reichsten Gemüsesorten war. Solche Proben wurden mittels HS-SPME eMDGC-MS/MS (SRM) nochmals analysiert, und hier konnten Gehalte im Bereich von 0,04 bis 0,1 µg/kg in Tomate, gelber Paprika und Kartoffel und im Pastinak sogar von ca. 5 µg/kg ermittelt werden (vgl. Diskussion in Abschnitt 2.1.3.4). Diese Ergebnisse sind über die höhere Selektivität der Tandem-MS im SRM-Modus erklärbar und gerade im Hinblick auf den Pastinak verglichen zu Daten aus Literatur wesentlich plausibler.

Tabelle 2.3: Gehalte von Alkylmethoxy-pyrazinen in Gemüse, mittels HS-SPME eMDGC-MS (SIM) bestimmt

Spezies	Gewebe	µg/kg ^a			
		IPMP	S-SBMP	R-SBMP	IBMP
Paprika grün	Frucht	0,20	0,95	nd	63,03
Paprika rot	Frucht	0,12	0,35	nd	12,28
Paprika gelb	Frucht	0,12	nd	nd	24,53
Karotte	Wurzel	nd	0,83	nd	0,29
Rote Bete	Wurzel	0,34	0,64	nd	0,25
Zuckererbse	Schote	3,84	1,54	nd	1,05
Erbse	Samen	1,34	0,72	nd	0,14
Stangenbohne	Schote	0,13	0,38	nd	0,11
Pastinak	Wurzel	nd	nd	nd	1,02
Petersilienwurzel	Wurzel	nd	0,62	nd	0,37
Kartoffel	Knolle	nd	0,46 ^b	nd	0,17
Tomate	Frucht	0,12	nd	nd	0,50

nd nicht detektiert; unter den LOD von 0,1 µg/kg (IPMP und IBMP), 0,15 µg/kg (SBMP)

^a Gehalte aus Doppelbestimmungen, Abweichungen 1–10 % der Ergebnisse

^b Gehalt aus Einfachbestimmung, da bei weiteren Messungen Co-Elutionen störten

2.2.2 MP-Gehalte in *Vitis vinifera* Wein

Für die Bestimmung der MPs in Weinen, die unter Einsatz verschiedener weinbaulicher und oenologischer Verfahren hergestellt wurden, sind die in Abschnitt 2.1.1 vorgestellten multidimensionalen Analysemethoden angewendet worden (s. auch P1). Die in den folgenden beiden Abschnitten gezeigten Ergebnisse wurden von Weiland *et al.* mit sensorischen Daten korreliert, diskutiert und publiziert [28–30].

2.2.2.1 Weinbauliche Einflüsse

Die Ergebnisse zu den weinbaulichen Varianten *Entblätterung*, *Lesetermin* und *Klon* zeigen ähnliche Zusammenhänge wie frühere Studien in diesem Gebiet (vgl. Abschnitt 1.1.3). Das Auslassen der Entblätterung in der Traubenzone von Sauvignon blanc wirkte sich in einer leichten Erhöhung der MP-Gehalte aus. Dies stimmt mit ähnlichen Studien [59, 238] überein.

Da die untersuchten Sauvignon blanc Jahrgänge 2007–2009 und 2011 alle recht MP-arm waren und die Probenzahl begrenzt war, konnten Einflüsse des Klons nur eingeschränkt und eine Abhängigkeit der MP-Gehalte vom Reifestadium, wie von Ryona *et al.* u. a. an *V. vinifera* gezeigt [51], kaum beobachtet werden.

2.2.2.2 Oenologische Einflüsse

Im Gegensatz zu den weinbaulichen Varianten wurden höhere MP-Gehalte und deutlichere Unterschiede zur Kontrolle durch die oenologischen Varianten *Kaltmaceration* und *Rappenzusatz* erreicht. Beide Verfahren begünstigen die MP-Extraktion aus den Beerenschalen oder den Rappen (vgl. Abb. 1.6 und 1.7, S. 8), in denen MPs hauptsächlich lokalisiert sind [52]. Die Kaltmaceration oder eine moderate Kontaktzeit der Rappen während der Gärung bewirkten etwa eine Verdreifachung der nativen MP-Gehalte, wobei das Potential stark vom Jahrgang abhängt. Bei dem mittlerweile zugelassenen neuen *V. vinifera*-Hybriden Cabernet blanc [239, 240] wurde die Steigerung der MP-Gehalte durch Kaltmaceration ebenfalls bestätigt, mit dem Unterschied, dass die nativen Gehalte bereits höher sind als bei den hier analysierten Sauvignon blanc Klonen.

Die hier untersuchten oenologischen Varianten *Kaltmaceration* und *Rappenzusatz* stellen zur Steigerung der MP-Gehalte in Sauvignon blanc (oder Cabernet blanc) für die Praxis legitime Mittel zur Betonung des grünen Charakters im Aroma und damit der Typizität von *cool-climate* Sauvignon blanc Weinen dar. Konkrete Vorschläge zur Variation der Stilstik von Sauvignon blanc finden sich in den Veröffentlichungen der Kooperationspartner Weiland *et al.* [28–30].

2.2.3 Enantiodifferenzierung von 2-Methoxy-3-sec-butylpyrazin

2.2.3.1 In einer Auswahl an Gemüsesorten

Das Enantiomerenverhältnis von SBMP wurde in diversen Gemüseproben mittels der in Abschnitt 2.1.3.3 (P3) behandelten HS-SPME eMDGC-MS (SIM) und HS-SPME eMDGC-MS/MS (SRM) Methoden ermittelt. Dabei zeigte sich bei der eMDGC-MS-Methode, dass unter Berücksichtigung der Nachweisgrenze von etwa 0,15 µg/kg kein (*R*)-SBMP vorkommt. Sofern in den Proben weniger als 0,15 µg/kg SBMP vorkam, wurde die wesentlich empfindlichere eMDGC-MS/MS-Methode mit Nachweisgrenzen im unteren ng/kg-Bereich verwendet. In einer Probe (Tomate) war die selektivere MS/MS-Detektion hilfreich, speziell die als Qualifier zusätzlich aufgezeichneten Spuren (Übergänge zwischen Mutter- und Tochterionen): Das scheinbare Signal von (*R*)-SBMP auf der Quantifizier-Massenspur stellte sich als Co-Elution heraus da es keine Signale auf den Qualifier-Spuren gab. Nicht nur der selektivere Detektor, sondern möglicherweise auch der Unterschied der ¹D-Trennphasen leistet einen Beitrag zu einer alternativen Absicherung der weniger plausiblen Ergebnisse nach eMDGC-MS (SIM).

2.2.3.2 In zwei Marienkäferspezies

Die Analyse der zwei Marienkäferspezies *H. axyridis* und *C. septempunctata* wurde sowohl mittels HS-SPME H/C-eMDGC-MS/MS (SRM) als auch mit der in Abschnitt 2.1.3.5 beschriebenen HS-SPME enantio-GC×GC (P3) durchgeführt und ergab, dass auch in den hier untersuchten Käfern lediglich (*S*)-SBMP vorkommt. Die Konzentrationen des (*S*)-SBMPs betragen für *H. axyridis* etwa 20 ng/g Käfer und für *C. septempunctata* etwa 2 ng/g Käfer (mittels Ein-Punkt-Kalibrierung und einem deuterierten internen Standard

berechnet). Durch die vorgegebene Elutionsreihenfolge an Heptakis(2,3-di-*O*-methyl-6-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl)- β -cyclodextrin ((*R*)- vor (*S*)-SBMP) konnten selbst Spuren von (*R*)-SBMP ausgeschlossen werden, die in der eMDGC-Methode mit Lipodex G[®] in ²D und damit umgekehrter Elutionsreihenfolge im Tailing der großen (*S*)-SBMP-Peaks hätten verdeckt werden können.

2.2.3.3 In *Vitis vinifera*-Spezies

Mit Hilfe der HS-SPME enantio-GC \times GC-TOF-MS wurde der Beerensaft von Cabernet sauvignon, Cabernet franc und Sauvignon blanc in Hinblick auf das Enantiomerenverhältnis von SBMP analysiert. Damit von der Minorkomponente SBMP möglichst hohe native Gehalte für die Detektion verfügbar waren, wurden die Beeren zu Beginn der Reifung gesammelt, da zu diesem Zeitpunkt die MP-Gehalte ihr Maximum durchlaufen (s. Abschnitt 1.1.3). In Cabernet sauvignon und Cabernet franc waren anhand der Massenspur m/z 138, dem häufigsten Fragment im Massenspektrum von SBMP, deutliche (*S*)-SBMP-Peaks im 2D-Plot sichtbar (s. Fig. 6 und 7 in P₃). Bei Sauvignon blanc war m/z 138 von (*S*)-SBMP gerade vom Grundrauschen unterscheidbar, was auf eine wesentlich niedrigere Konzentration in dieser Rebsorte und Probe schließen lässt (nicht quantifiziert). Sofern von der SBMP-Konzentration auf die Konzentration der Major Komponente IBMP geschlossen werden kann oder umgekehrt, so zeigten bereits Arbeiten von Allen und Lacey, dass IBMP-Gehalte in Beerensaft und Wein der Sorte Cabernet sauvignon höher reichen können als die in der Sorte Sauvignon blanc [23]. Die hier beschriebene Enantiodifferenzierung zeigt, dass auch in diesen Proben kein (*R*)-SBMP detektiert wurde.

2.2.4 Dimethylmethoxypyrazine

2.2.4.1 Marienkäfer

Für die Analytik von MPs inklusive der Isomere der Dimethylmethoxypyrazine war die eMDGC-MS/MS Methode aus Abschnitt 2.1.3.3, S. 111 (P₃) zielführend. Die Extraktion der Analyten aus den Marienkäferspezies *H. axyridis* und *C. septempunctata* wurde mittels HS-SPME vorgenommen. In beiden Spezies wurde neben der erwarteten MPs (IP-,

SB- und IBMP) erstmals das MDMP identifiziert, nicht aber DMMP, welches in anderen Studien genannt wurde [36, 37], vgl. Diskussion in Abschnitt 2.1.4.4, S. 139. Die MDMP-Konzentration war in *H. axyridis* mit etwa 1–2 ng/g Käfer wesentlich höher als die in *C. septempunctata* mit etwa 0,01–0,1 ng/g Käfer (mittels Ein-Punkt-Kalibrierung und einem deuterierten internen Standard berechnet). Insgesamt lagen diese Konzentrationen unter denen der drei anderen erfassten MPs, wobei das IPMP mit etwa 50 ng/g Käfer in *H. axyridis* und etwa 30 ng/g Käfer in *C. septempunctata* in beiden Spezies (entsprechend Daten aus Literatur [35, 36]) die Majorkomponente darstellt.

2.2.4.2 Kork

Extrakte von auffälligen Flaschen-Korken mit schimmeligem Fehlton wurden ebenfalls mittels eMDGC-MS/MS (s. Abschnitt 2.1.4) analysiert (Flüssig-Injektionen in den PTV mit on-column Liner und im on-column Modus, Details siehe Methodenteil in P4). In solchen Proben wurde MDMP identifiziert, was in Übereinstimmung mit der früheren Identifikation durch Simpson *et al.* [39], Prat *et al.* [82] und Chatonnet *et al.* [40] ist. Weitere Daten zu Korken und Wein mit Korkfehlnoten auf Grundlage dieser analytischen Methode sind in Zusammenarbeit mit Slabizki *et al.* entstanden [42, 237].

2.2.4.3 Wein

In der jüngsten Studie bezüglich Migration von Fehleraromastoffen aus Kork in Wein wurde in Zusammenarbeit mit Slabizki *et al.* [237] die HS-SPME eMDGC-MS/MS-Methode aus Abschnitt 2.1.3.3 nach weitergehender Optimierung zur Erfassung noch kleinerer Konzentrationen sowohl für Korkextrakte als auch für Weine eingesetzt (Nachweisgrenzen für IPMP, IBMP und MDMP kleiner oder gleich 0,3 ng/L, Bestimmungsgrenzen unter 1 ng/L). Die Analysen von Korken und Weinen konnten zeigen, dass insbesondere MDMP – unabhängig vom klassischen Korkton durch TCA – eine Rolle für den untypischen Fehlton in Kork und folglich auch in den damit verschlossenen und in Kontakt stehenden Weinen spielt. Die Bestimmung der MPs und der Dimethylmethoxypyrazine in Wein erlaubt daher über die teilweise nativ vorkommenden Gehalte hinaus auch Rückschlüsse auf andere Eintragswege, wie zum Beispiel durch Kork gezeigt.

3 Zusammenfassung

Alkylmethoxy-pyrazine stellen eine wichtige Stoffgruppe mit Aromarelevanz für vegetative, sogenannte grüne Noten in vielen Lebensmitteln dar. Die prominentesten Vertreter aus pflanzlichen Quellen sind IPMP, SBMP und IBMP, die endogen je nach Spezies in variierenden Konzentrationen und Relationen zueinander gebildet werden (Gemüse mit Konzentrationen im ppb-Bereich, *Vitis vinifera* Beeren und der daraus hergestellte Wein im ppt-Bereich). Diese und weitere MPs kommen auch in Insekten vor, z. B. in den Marienkäferspezies *Coccinella septempunctata* (Siebenpunkt Marienkäfer) und *Harmonia axyridis* (asiatischer Marienkäfer, *multicolored asian lady beetle*), die bei der ungewünschten Mitverarbeitung in der Weinherstellung Fehlnoten hervorbringen können. MPs werden auch durch einige Mikroorganismen gebildet, was einen direkten Eintrag in z. B. Trinkwasser zur Folge haben kann. Ein indirekter Eintrag beispielsweise in Wein ist durch die mikrobiologische Kontamination von Kontaktmaterialien wie Flaschenkorken, die als Verschlussmaterial mit dem Wein in Kontakt stehen, möglich.

Zu Beginn der Arbeiten war die Biogenese der MPs nicht vollständig aufgeklärt, wobei die bisherigen Studien andeuten, dass Aminosäuren als Ausgangsstoffe fungieren. Beim SBMP gibt es eine Seitenkette mit Stereozentrum, dessen Konformation Rückschlüsse auf den Einbau der Aminosäure Isoleucin mit entsprechender Seitenkette liefern kann.

Bei der Entwicklung früher Analysemethoden für MPs in den 70er Jahren stand die Aufklärung von grünen Aromaeindrücken in einigen Gemüsesorten im Vordergrund. Auf Grund der recht hohen Konzentrationen in diesen Matrices reichten für die häufig qualitativen Studien meist klassische Extraktionsverfahren wie die Flüssig-flüssig-Extraktion, eindimensionale gaschromatographische Trennungen und einfache massenspektrometrische oder olfaktorische Detektion aus. In Wein dagegen liegen wesentlich geringere Konzentrationen der MPs vor (von wenigen ng/L bis etwa 50 ng/L), so dass für diese Matrix Methoden mit niedrigeren Nachweisgrenzen benötigt werden. Außerdem gilt Wein mit der hohen Anzahl und Vielfalt seiner Inhaltsstoffe als besonders komplexe

Matrix. Dieser Umstand macht die Entwicklung von Analysemethoden nicht weniger anspruchsvoll im Hinblick auf die Störanfälligkeit bei der Detektion der Analyten gegenüber der Matrix. Viele der bisher veröffentlichten Analysemethoden für Wein liegen mit ihren Nachweisgrenzen noch oberhalb der Geruchsschwellenwerte der MPs, die ca. 1 bis 2 ng/L für Weißwein betragen.

Daher war das grundlegende Ziel dieser Arbeit die Entwicklung einer routinefähigen Spurenanalysemethode zur Quantifizierung von MPs unterhalb der Geruchsschwellenwerte in Wein. Für eine verlässliche Quantifizierung wurde der Stabilisotopenverdünnungsassay angewendet, mit den dreifach deuterierten Analoga der MPs als interne Standards. Ausgehend von einer früheren Methode mit SPE und H/C-MDGC-MS wurde eine Spurenanalysemethode auf Grundlage der HS-SPME MDGC-MS/MS entwickelt. Nur durch die Optimierung der zeitlichen Ausdehnung der Schnittfenster in der H/C-MDGC wurde eine gute Matrixabtrennung in der ersten Dimension bei vollständigem Transfer der Analyten und internen Standards in die zweite Dimension erreicht. Die Detektion mittels MS/MS ist für kleine m/z -Verhältnisse, wie sie aus kleinen Molekülen wie Aromastoffen entstehen, aufgrund der ubiquitären, kleinen Fragmentationen störanfällig und musste hinsichtlich der Signal-Rausch-Verhältnisse und der Intensitäten der möglichen Übergänge von Mutter- zu Tochterionen optimiert werden. Die so entwickelte Analysemethode lieferte Nachweisgrenzen bis unterhalb der Geruchsschwellen der Analyten, auch für die hochkomplexe Matrix Wein, wobei die Spurenanalytik in Wein kritisch bleibt und Daten nahe der Nachweisgrenzen immer auf Plausibilität geprüft werden müssen.

Zusätzlich zur quantitativen Bestimmung der MPs wurde auch eine Methode zur Enantiodifferenzierung von SBMP etabliert, um die Konformation des Stereozentrums in der Seitenkette zu ermitteln. Ergebnisse zu solchen Studien können eine Bestätigung der Hypothesen, dass die Biogenese der MPs aus natürlichen Aminosäuren erfolgt, liefern. Durch Verwendung einer stationären Phase mit einem modifizierten Cyclodextrin als chiralen Selektor in der zweiten Dimension wurden die genannten MDGC-MS(/MS)-Methoden für die Enantiodifferenzierung erweitert bei gleichzeitigem Erhalt der quantitativen Bestimmung (enantioselektive multidimensionale Gaschromatographie (eMDGC)-Methoden). Der verwendete chirale Selektor Oktakis(2,3-di-*O*-pentyl-6-*O*-methyl)- γ -cyclodextrin (kommerziell Lipodex G[®]) bewirkt, wie aus der Literatur bekannt, die Elutionsreihenfolge (*S*)- vor (*R*)-SBMP.

Die quantitative Bestimmung von MPs in Gemüseproben mittels HS-SPME eMDGC-MS oder -MS/MS lieferte MP-Gehalte von wenigen ng/kg bis in den µg/kg-Bereich. Bei der Enantiodifferenzierung wurde in allen analysierten Proben (unter Berücksichtigung der Nachweisgrenzen) ausschließlich das (*S*)-SBMP gefunden. Obwohl in diesen Proben die Konzentration der MPs relativ hoch ist (verglichen zu Wein) und die H/C-MDGC zur Trennung verwendet wurde, konnten Störungen bei der Detektion durch andere Matrixbestandteile festgestellt werden, die erst durch die selektivere MS/MS evident und als falsch-positiv erkannt wurden.

Für Wein und Most wurden zunächst Methoden auf Grundlage der SPE H/C-MDGC-MS oder -MS/MS genutzt, die Nachweisgrenzen bis in den Bereich der Geruchsschwellen der MPs in Wein erreichten. Dank der höheren Selektivität bewies sich die MS/MS im SRM-Modus besonders bei unplausiblen Ergebnissen nach einfacher MS-Detektion als verlässlicherer Detektor um potentielle Co-Elutionen auszublenden. Anhand der quantitativen Ergebnisse wurden oenologische und weinbauliche Einflüsse auf die MP-Gehalte in Sauvignon blanc-Wein festgestellt. Eine Entblätterung der Traubenzone fördert demnach den MP-Abbau und resultiert in niedrigeren MP-Gehalten bei der Lese, wobei die Gehalte umso niedriger sind je später die Trauben gelesen werden. Kaltmaceration und Rappenzusatz haben zu einer Steigerung der MP-Gehalte und damit einer sensorisch stärker wahrnehmbaren Grünnote geführt. Diese beiden oenologischen Prozesse begünstigen die Extraktion von MPs aus dem Gewebe (Beerenschalen, Rappen). Die in 2014 zugelassene Neuzüchtung Cabernet blanc verhält sich in allen vorgenannten Punkten ähnlich wie Sauvignon blanc, weist bei den hier analysierten Proben aber insgesamt höhere MP-Gehalte auf. Die Ergebnisse dieser Einflüsse und die Auswirkung auf die sensorische Wahrnehmung sind der Weinwirtschaft mit der Nennung von Möglichkeiten zum MP-Management präsentiert worden [28–30].

Aufgrund der für die Minor Komponente SBMP nicht ausreichenden Nachweisgrenzen bei der HS-SPME eMDGC-MS/MS-Methode war die Enantiodifferenzierung des SBMPs in *V. vinifera*-Beeren oder Wein nicht sinnvoll. Daher wurde eine enantioselektive GC×GC-Methode entwickelt. In der ersten Dimension wurde eine enantioselektive Trennsäule mit Heptakis(2,3-di-*O*-methyl-6-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl)-β-cyclodextrin als Selektor eingesetzt. Dieser Selektor wurde hier erstmals für die Trennung von SBMP-Enantiomeren beschrieben und bewirkt eine Elutionsreihenfolge von (*R*)- vor (*S*)-SBMP. Unabhängig von der verwendeten Methode ergab die Enantiodifferenzierung, dass lediglich (*S*)-SBMP

in den analysierten Gemüse-, Wein-, Most- und Käferproben gefunden wurde. Bisherige Daten aus der Literatur zeigen, dass in natürlichen Quellen wie Galbanumöl und dem marinen Bakterium *Halomonas venusta* ebenfalls nur das (*S*)-SBMP identifiziert wurde. Diese Ergebnisse stützen die Hypothese, dass die in der Natur vorkommenden Aminosäuren als Ausgangsstoffe in alle diesen Spezies fungieren können, vorausgesetzt dass im Verlauf der Biogenese keine Inversion oder Racemisierung des chiralen Zentrums der Seitenkette von L-Isoleucin stattfindet. Im Sinne einer Prüfung auf Authentizität einer Probe bedeutet nach heutigem Wissensstand ein Vorkommen von (*R*)-SBMP einen nicht natürlichen Eintrag, da bisher in keiner natürlichen Probe (*R*)-SBMP nachgewiesen wurde. (*R*)-SBMP ist allenfalls auf synthetisches SBMP zurückzuführen, in dem die Enantiomere bzw. Diastereomere des natürlich vorkommenden L-Isoleucins (also D-Isoleucin und L-allo-Isoleucin mit *R*-Konfiguration in der Seitenkette) als Ausgangsstoffe eingebaut sind.

Eine Ausweitung der HS-SPME eMDGC-MS/MS-Methode auf weitere alkylierte Methoxy-pyrazine wie die Isomere MDMP und DMMP erfolgte insbesondere für Kork und Marienkäfer (*H. axyridis* und *C. septempunctata*). Diese beiden Stoffe werden als eine mögliche Ursache beim Auftreten von Fehlnoten in Wein diskutiert. Die Analyse von DMMP, MDMP und EtMP aus zwei Marienkäferspezies ergab die erstmalige Identifizierung von MDMP in *H. axyridis* und *C. septempunctata*. Die anderen beiden Konstitutionsisomere DMMP und EtMP wurden nicht detektiert. Dank der chromatographischen Abtrennung von seinem Stellungsisomer wurde DMMP in diesen Proben klar ausgeschlossen, entgegen Berichten in der Literatur, wonach ein Vorkommen von DMMP durch den rein massenspektrometrischen Abgleich in Käfer- oder Weinproben angenommen wurde [36]. Anhand der hier verwendeten Methode wurde weiterhin das Vorkommen von MDMP in Korkmatrices mit der untypischen Kork-Fehlnote bestätigt und die MDMP-Gehalte in mehreren Kork- und Weinproben quantifiziert.

In dieser Arbeit wurden leistungsstarke Analysemethoden auf Grundlage multidimensionaler gaschromatographischer Trenntechniken zur Bestimmung von MPs bis in den Spurenbereich von unter 1 ng/L und zur Enantiodifferenzierung des chiralen Vertreters etabliert. Die Kopplung mit der Tandem-Massenspektrometrie im SRM-Modus erwies sich für die hier untersuchten Proben als notwendig für die Bestimmung der MPs aus komplexer Matrix und gerade in Fällen von Co-Elutionen. Für eine höhere Verlässlichkeit bei der Quantifizierung wurde der SIDA angewendet, um Schwankungen insbesondere bei der Ex-

traktion mittels HS-SPME zu kompensieren. Die enantio-GC×GC bot chromatographisch eine gute Abtrennung von Co-Elutionen. Außerdem wurde die Enantiodifferenzierung von SBMP durch den Einsatz der enantio-GC×GC gerade in solchen Proben ermöglicht, in denen die Konzentrationen für die Enantiodifferenzierung mittels SPE oder HS-SPME eMDGC-MS/MS zu gering waren.

Für zukünftige Anwendungen bieten sich die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten quantitativen Analysemethoden zur Beobachtung der MP-Gehalte im Reifeverlauf von Weinbeeren an, um die weinbaulichen und oenologischen Schritte in der Weinherstellung zu stützen (z. B. die Festlegung des Erntezeitpunkts). Ein weiterer wichtiger Anwendungsbereich wird in der Analytik von MPs in Korkextrakten oder Wein mit dem sogenannten untypischen Kork-Fehlton gesehen. Der Nachweis von MPs die normalerweise in *V. vinifera* nicht vorkommen, kann zur Erfassung von Fehltonen dienen (z. B. MDMP durch Korke oder Marienkäfer).

Um mehr Aussagekraft über die MP-Biogenese zu erhalten, steht der direkte Nachweis, z. B. anhand von geeigneten Markierungsstudien noch aus. Die größte Herausforderung liegt hier noch in der Auswahl und Umsetzbarkeit von geeigneten Modellen. Für die Analyse solcher Versuche sind die in dieser Arbeit entwickelten Analysemethoden zur Quantifizierung (und Enantiodifferenzierung) im Spurenbereich eine wichtige Grundlage.

A Anhang

A.1 Posterpräsentation [A1] zu Alkylmethoxypyrazin-Gehalten in Gemüse

Titel:	Enantioselektive Analyse von 2-Methoxy-3- <i>sec</i> -Butylpyrazin mit multidimensionaler Gaschromatographie und Massenspektrometrie
Autoren:	Charlotte Legrum, Hans-Georg Schmarr
Präsentation:	42. Deutschen Lebensmittelchemikertag 2013 16.-18. September 2013, Braunschweig, Deutschland
Posternummer:	ANA 016
Kurzzusammenfassung in:	Kurzreferate (ISBN: 978-3-936028-80-5), S. 122

Enantioselektive Analyse von 2-Methoxy-3-sec-Butylpyrazin mit multidimensionaler Gaschromatographie und Massenspektrometrie



Rheinland-Pfalz

DIENSTLEISTUNGSZENTRUM
LÄNDLICHER RAUM
RHEINLPFALZ

Charlotte Legrum, Hans-Georg Schmarr

Einleitung

2-Methoxy-3-alkylpyrazine, insbesondere *iso*-Propyl- (IPMP), *sec*-Butyl- (SBMP) oder *iso*-Butyl- (IBMP) Methoxypyrazine (MPs) sind potente Aromastoffe in vielen Lebensmitteln mit intensiv grünen Aromenoten. Man findet sie unter anderem in grünen Bohnen, grünem Spargel, Paprika, Erbsen aber auch in einigen *Vitis vinifera* Varianten, insbesondere den Cabernet-Typen (Rotwein) oder dem Sauvignon blanc (Weißwein). Die Geruchsschwellenwerte für die oben genannten Verbindungen sind extrem niedrig (1 - 2 ng/L in Weißwein [1]) und liegen in Konzentrationsbereichen von wenigen ng/L (Wein) aber auch mehreren hundert ng/kg bis in den µg/kg-Bereich (Gemüse) vor [2, 3]. Basierend auf einer gaschromatographischen Trennung mit *heart-cut* multidimensionaler Gaschromatographie (MDGC) und massenspektrometrischer Detektion (MS) wurde für eine verlässliche Quantifizierung das Stabilisotopenverdünnungsassay eingesetzt. Im Falle des SBMPs sind zwei enantiomere Formen existent, die in einer stereoselektiven Analytik zu berücksichtigen sind. Zur Enantiomerenverteilung des SBMPs in Lebensmitteln liegen bisher kaum Daten vor.

Methoden

Zur effektiven Abtrennung von störenden Matrixbestandteilen und um eine enantioselektive Trennung zu realisieren wurde die sogenannte *heart-cut* MDGC mit enantioselektiver Trennsäule in der 2. Dimension (²D) eingesetzt. Die Probenvorbereitung bestand aus der Aufschlammung des homogenisierten Probenmaterials (1 g in 5 mL entionisiertem Wasser), der Zugabe von 1 g NaCl und der internen Standards (*c* = 200 ng/kg). Anschließend erfolgte die Extraktion mittels HS-SPME an einer 1 cm DVB/Carboxen/PDMS-Faser (50/30 µm) für 30 min bei 50 °C. Zur verlässlichen Quantifizierung wurden deuterierte (*d*₅) Isotopologe als interne Standards eingesetzt. Für eine selektive Detektion wurde ein Quadrupol Massenspektrometer im SIM-Modus verwendet. Das System ist in **Abb. 1** schematisch dargestellt.

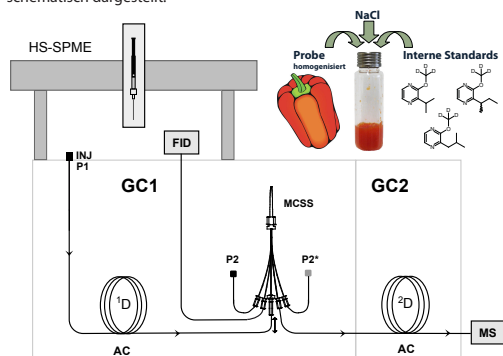


Abb. 1: Schema des HS-SPME-eMDGC-MS-System; oben rechts: Probenvorbereitung.

¹D SLB-IL60 30 m x 0.25 mm i.d., 0.2 µm

²D Lipodex G 25 m x 0.25 mm i.d. (Oktakis-(2,3-di-O-pentyl-6-O-methyl)- γ -Cyclodextrin)

AC: analytische Säule; MCSS: Moving Capillary Stream Switching device; INJ: Injektor; P1, P2: Druckkontrollen; P2': Manometer mit Druckanzeige des Glasdomes; FID: Flammenionisationsdetektor; MS: Massenspektrometer

Ergebnisse

Die ermittelten Methoxypyrazingehalte (siehe **Tab. 1**) zeigen, dass je nach Gemüsesorte ein anderes MP die Major Komponente ist. Meistens liegen sie zwischen 100 und 1000 ng/kg, können aber auch bis ca. 60 µg/kg reichen (Paprika). Unter Berücksichtigung der Nachweisgrenze von etwa 100 ng/kg wurde in allen Proben kein (*R*)-SBMP gefunden.

Zur Kalibrierung dienen wässrige Lösungen mit Konzentrationen von 0.1 - 25 µg/kg für IPMP und SBMP, 1 - 200 µg/kg für IBMP. Die Wiederfindung wurde in aufgestockter Matrix bestimmt und beträgt etwa 60 - 85 %. Die Wiederholbarkeit in verschiedenen Matrices beträgt in unterem bis mittlerem Kalibrierbereich zwischen 1 und 10 % Abweichung vom Messergebnis.

Tab. 1: Methoxypyrazingehalte in unterschiedlichen Gemüsesorten

Probe	Teil	Gehalt in ng/kg			
		IPMP	(<i>S</i>)-SBMP	(<i>R</i>)-SBMP	IBMP
Paprika grün	Frucht	202	827	nd	63028
Paprika rot	Frucht	119	350	nd	12282
Paprika gelb	Frucht	119	nd	nd	24529
Karotte	Wurzel	nd	825	nd	286
Rote Bete	Wurzel	339	635	nd	252
Zuckerschote	Schote	3838	1537	nd	1052
Erbsen	Samen	1340	699	nd	138
Stangenbohne	Schote	129	376	nd	111
Pastinake	Wurzel	nd	nd	nd	1015
Petersilienwurzel	Wurzel	nd	615	nd	368
Kartoffel	Knolle	nd	459	nd	170
Tomate	Frucht	118	nd	nd	496

Diskussion

Die Isolierung und Quantifizierung der Zielanalyten aus Matrix konnte durch die Anwendung von *heart-cut* MDGC mit SIM-MS erreicht werden (Beispiel-Chromatogramme in **Abb. 2**). Insbesondere für die Trennung und Quantifizierung der Enantiomere von SBMP ist es wichtig, frei von Co-Elutionen in der ²D Trennsäule zu sein. Die Schnittfenster in ¹D müssen einerseits einen ausreichenden Transfer der Zielanalyten und Standards

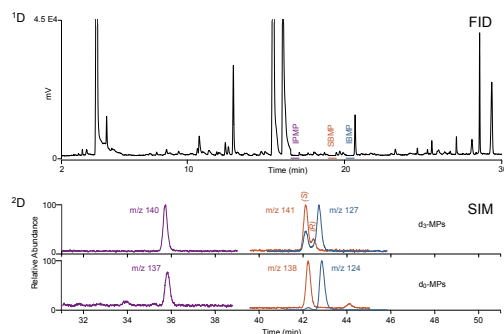


Abb. 2: oben: ¹D-Chromatogramm von grüner Paprika, Schnittfenster angedeutet; unten: ²D-Chromatogramm mit SIM-Massen für die Quantifizierung.

gewährleisten, andererseits sollten sie aber zeitlich nicht zu lang sein um weitere Komponenten, die potentiell zu Co-Elution führen, auf die ²D Säule gelangen zu lassen. Um möglichst enge Schnittfenster setzen zu können wurde eine Trennsäule für ¹D gewählt, auf der zwischen den Analyten und ihren Isotopologen kein Isotopeneffekt auftritt und diese daher gleichzeitig eluieren. Ergebnisse zu Untersuchungen der Auswirkungen von Länge und Position der Schnittfenster in ¹D auf die Trennleistung in ²D sind in einer gesonderten Publikation beschrieben [5].

Die mittels MDGC-SIM-MS ermittelten quantitativen Daten in Gemüseproben mit hohen MP-Gehalten bewegen sich in Größenordnungen die in der Literatur beschrieben sind [3]. Obwohl bisher noch nicht eindeutig geklärt, deutet das ausschließliche Vorkommen des (*S*)-SBMPs auf eine Biogenese aus dem vorhandenen Aminosäure-Pool hin [6].

Danksagung

Wir danken der Graduiertenförderung des Landes Rheinland-Pfalz für die finanzielle Unterstützung.

Literatur

- [1] M. Lacey et al., *Am. J. Enol. Vitic.* 42 (1991) 103
- [2] M. Lacey et al., *Am. J. Enol. Vitic.* 42 (1991) 109
- [3] K. Murray et al., *J. Sci. Food Agric.* 26 (1975) 973
- [4] H.-G. Schmarr et al., *J. Labelled. Compd. Radiopharm.* 54 (2011) 54
- [5] H.-G. Schmarr et al., *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 6589
- [6] Leete E. et al., *Spec. Publ. - R. Soc. Chem.* 95 (1992) 75

A.2 Van't-Hoff-Plots der Enantiomere des SBMP

Tabelle A.1: Berechnung des Trennfaktors α und $R \cdot \ln \alpha$

T	[°C]	60	65	70	75	80
T	[K]	333	338	343	348	353
$1/T$	[1/K]	0,003 00	0,002 96	0,002 92	0,002 87	0,002 83
t_0	[s]	58	58	57	57	57
<i>(S)</i> -SBMP-d ₃						
t'	[s]	2124	1447	1014	724	526
<i>(R)</i> -SBMP-d ₃						
t'	[s]	2217	1498	1044	741	536
$\alpha = t'_R/t'_S$		1,0438	1,0353	1,0294	1,0239	1,0185
$R \cdot \ln \alpha$	[J mol ⁻¹ K ⁻¹]	0,3563	0,2881	0,2413	0,1963	0,1521
<i>(S)</i> -SBMP						
t'	[s]	2149	1461	1026	733	532
<i>(R)</i> -SBMP						
t'	[s]	2242	1512	1054	749	542
$\alpha = t'_R/t'_S$		1,0435	1,0352	1,0279	1,0226	1,0191
$R \cdot \ln \alpha$	[J mol ⁻¹ K ⁻¹]	0,3544	0,2876	0,2284	0,1859	0,1570

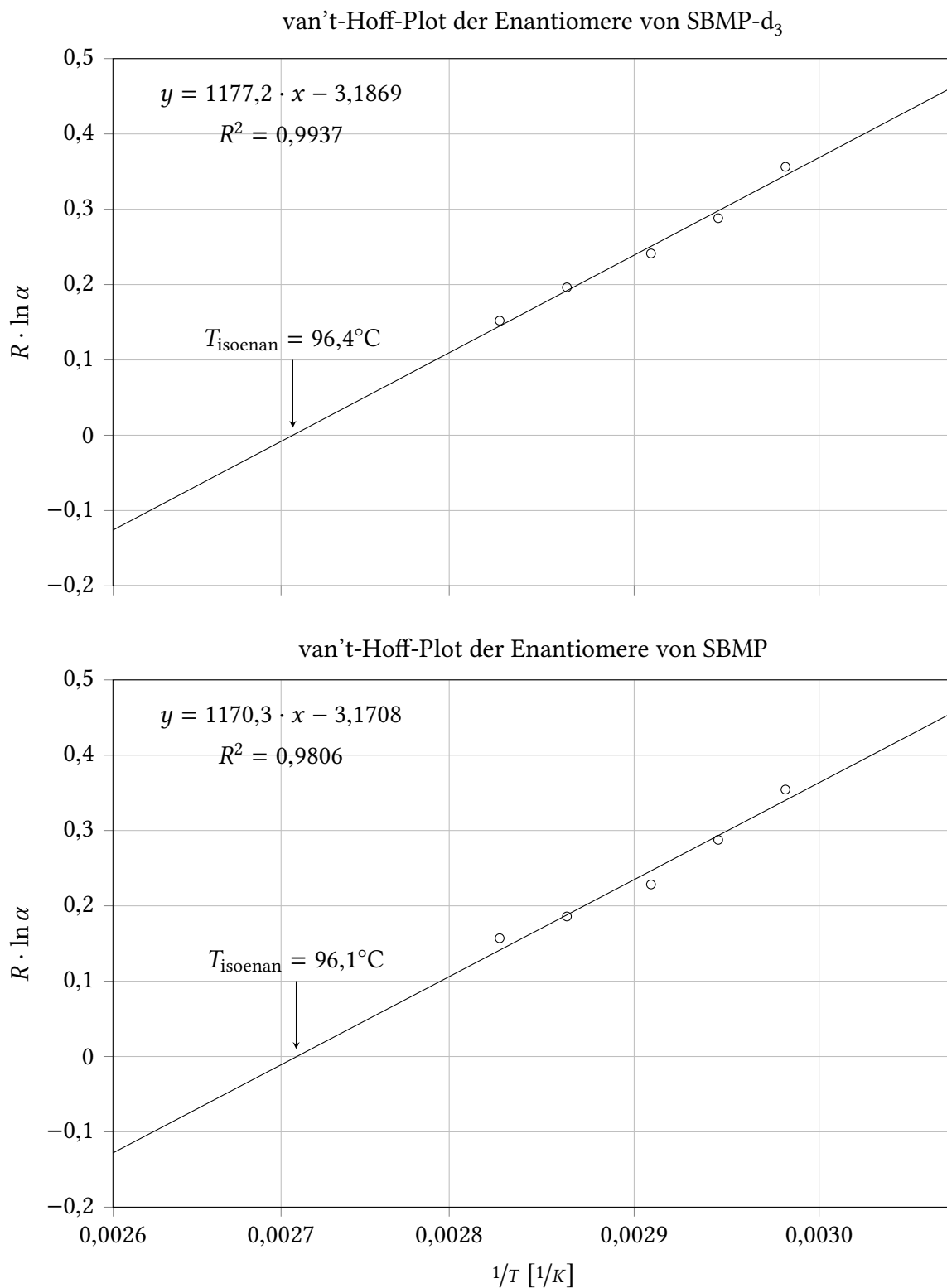


Abbildung A.1: Van't-Hoff-Plots der Enantiomere von SBMP-d₃ und SBMP aus experimentell bei unterschiedlichen Temperaturen bestimmten Werten von α auf Lipodex G[®] (Säulenlänge 25 m, Innendurchmesser 0,25 mm, Helium 1,2 ml/min)

Verzeichnisse

Abkürzungsverzeichnis

¹ D	erste Dimension
² D	zweite Dimension
ASE	<i>accelerated solvent extraction</i>
CD	Cyclodextrin
CCC	Gegenstromchromatographie, <i>counter current chromatography</i>
CI	Chemische Ionisation
<i>C. septempunctata</i>	<i>Coccinella septempunctata</i> (Siebenpunkt Marienkäfer)
² H	Deuterium
d _f	Filmdicke
DLR	Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum Rheinpfalz
DMMP	3-Methoxy-2,5-dimethylpyrazin
EI	Elektronenstoßionisation
eMDGC	enantioselektive multidimensionale Gaschromatographie
enantio-GC×GC	in ¹ D enantioselektive umfassende zweidimensionale Gaschromatographie
GC×enantio-GC	in ² D enantioselektive umfassende zweidimensionale Gaschromatographie
EtMP	2-Ethyl-3-methoxypyrazin
GC	Gaschromatographie

GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
GC×GC	umfassende (<i>comprehensive</i>) zweidimensionale Gaschromatographie
¹H	Protium
¹H-NMR	Protonen-Kernspinresonanz, <i>proton nuclear magnetic resonance</i>
<i>H. axyridis</i>	<i>Harmonia axyridis</i> (asiatischer Marienkäfer, <i>multicolored asian lady beetle</i>)
H/C	<i>heart-cut</i>
HMBC	<i>heteronuclear multiple bond correlation</i>
HP	2-Hydroxy-3-alkylpyrazin
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, <i>high performance liquid chromatography</i>
HS	Dampfraum, <i>headspace</i>
HSQC	<i>heteronuclear single quantum coherence</i>
IBMP	2-Isobutyl-3-methoxypyrazin (2-(2-Methylpropyl)-3-methoxypyrazin)
i. D.	Innendurchmesser
IPMP	2-Isopropyl-3-methoxypyrazin (2-(1-methylethyl)-3-methoxypyrazin)
LC	Flüssigkeitschromatographie, <i>liquid chromatography</i>
LLE	Flüssig-flüssig-Extraktion, <i>liquid liquid extraction</i>
LOD	Nachweisgrenze, <i>level of detection</i>
LVI	großvolumige Injektion, <i>large volume injection</i>
MS	Massenspektrometrie
MDGC	multidimensionale Gaschromatographie
MDMP	2-Methoxy-3,5-dimethylpyrazin
MOAH	aromatische Mineralöl-Kohlenwasserstoffe, <i>mineral oil aromatic hydrocarbons</i>

MOSH	gesättigte Mineralöl-Kohlenwasserstoffe, <i>mineral oil saturated hydrocarbons</i>
MP	Alkylmethoxypyrazin
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
NPD	Stickstoff-Phosphor Detektor, <i>nitrogen-phosphorous selective detector</i>
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
OMT	O-Methyltransferase
ppm	<i>parts per million</i> , 10^{-6}
ppt	<i>parts per trillion</i> , 10^{-12}
RI	Retentionsindex
SAM	S-Adenosyl-L-methionin
SBMP	2-Methoxy-3- <i>sec</i> -butylpyrazin (2-Methoxy-3-(1-methylpropyl)pyrazin)
SBMP-d₃	2-[² H ₃]Methoxy-3- <i>sec</i> -butylpyrazin (2-[² H ₃]Methoxy-3-(1-methylpropyl)pyrazin)
SBSE	<i>Stir Bar Sorptive Extraction</i>
SDE	Simultane Destillation-Extraktion
SFE	<i>supercritical fluid extraction</i>
SIDA	Stabilisotopenverdünnungsassay, <i>stable isotope dilution assay</i>
SIM	<i>selected ion monitoring</i>
SPE	Festphasenextraktion, <i>solid phase extraction</i>
SPME	Festphasenmikroextraktion, <i>solid phase micro extraction</i>
SRM	<i>selected reaction monitoring</i>
TOF	Flugzeit, <i>time of flight</i>
<i>V. vinifera</i>	<i>Vitis vinifera</i>

Abbildungsverzeichnis

1.1	Strukturformel von Pyrazin (1,4-Diazin)	1
1.2	Struktur- und Summenformeln der drei Alkylmethoxypyrazine IPMP, IBMP und SBMP	3
1.3	Überblick über die Verfahrensschritte bei der Weinherstellung	4
1.4	Konzentration verschiedener Alkylmethoxypyrazine in Cabernet sauvignon Most und Sauvignon blanc Wein	5
1.5	Strukturformeln der Stellungs- und Strukturisomere DMMP, MDMP und EtMP	7
1.6	IBMP-Verteilung in Cabernet sauvignon	8
1.7	Querschnitt der Weinbeere und Stielgerüst der Weintraube	8
1.8	Entwicklungsstadien der Weinbeere	9
1.9	Die Marienkäferspezies <i>Harmonia axyridis</i> und <i>Coccinella septempunctata</i>	11
1.10	Bildung von Alkylmethoxypyrazinen durch Kondensation eines Aminosäureamids mit einem α , β -Dicarbonyl	16
1.11	Bildung von Alkylmethoxypyrazinen durch Kondensation zweier Aminosäuren	17
1.12	Bildung von Acetoin aus Pyruvat über die Acetolactat-Synthase	18
1.13	Bildung von Tetramethylpyrazin aus Acetoin	18
1.14	Strukturformeln der Enantiomere des SBMP	20
1.15	Strukturformel der Aspergillsäure	20
1.16	Strukturformeln der Diastereomere L-Isoleucin und D-allo-Isoleucin	21
1.17	Vierbindigkeit des Kohlenstoffes und Entstehung von Enantiomeren	31
1.18	Enantiomere des Glycerinaldehyds in räumlicher und in Fischer-Projektion	32
1.19	Prinzip des Stabilisotopenverdünnungsassays	40
2.1	Schematische Darstellung der Komponenten eines Triple-Quadrupol-Massenspektrometers	50

2.2	Schematische Darstellung der Vorgänge beim Selected Reaction Monitoring (SRM)	70
2.3	Strukturformel von SLB-IL60	73
2.4	Zwei Szenarien bei der Ermittlung der Schnittfensterlänge in der MDGC	84
2.5	Theoretisches <i>worst case</i> -Szenario bei der Ermittlung von Schnittfensterlängen	85
2.6	Strukturformel von Oktakis(2,3-di- <i>O</i> -pentyl-6- <i>O</i> -methyl)- γ -cyclodextrin	111
2.7	Strukturformel von Heptakis(2,3-di- <i>O</i> -methyl-6- <i>O</i> - <i>tert</i> -butyldimethylsilyl)- β -cyclodextrin	112
A.1	Van't-Hoff-Plots der Enantiomere von SBMP- d_3 und SBMP aus experimentell bei unterschiedlichen Temperaturen bestimmten Werten von α auf Lipodex G [®] (Säulenlänge 25 m, Innendurchmesser 0,25 mm, Helium 1,2 ml/min)	156

Tabellenverzeichnis

1.1	Zuordnung der Substituenten 'R' zu Aminosäuren und den resultierenden Alkylmethoxy-pyrazinen (Produkte)	17
1.2	Behandelte Themen mit Zuordnung zu den Publikationen in Reihenfolge der Einbindung. Abschnitt und Seitenzahl beziehen sich auf die vorliegenden Arbeit.	45
2.1	Diskutierte Themen mit Zuordnung zu den Publikationen in Reihenfolge der Einbindung. Abschnitt und Seitenzahl beziehen sich auf die vorliegenden Arbeit.	49
2.2	Systemparameter für MDGC-MS und MDGC-MS/MS	50
2.3	Gehalte von Alkylmethoxy-pyrazinen in Gemüse	142
A.1	Berechnung des Trennfaktors α und $R \cdot \ln \alpha$	155

Literaturverzeichnis

- [1] Mihara, S. und Masuda, H.: *Structure-odor relationships for disubstituted pyrazines*. J. Agric. Food Chem., 36(6):1242-7, 1988.
- [2] Seifert, R. M., Buttery, R. G., Guadagni, D. G., Black, D. R. und Harris, J. G.: *Synthesis and odor properties of some additional compounds related to 2-isobutyl-3-methoxypyrazine*. J. Agric. Food Chem., 20(1):135-137, 1972.
- [3] Seifert, R. M., Buttery, R. G., Guadagni, D. G., Black, D. R. und Harris, J. G.: *Synthesis of some 2-methoxy-3-alkylpyrazines with strong bell pepper-like odors*. J. Agric. Food Chem., 18(2):246-249, 1970.
- [4] Leete, E., Bjorklund, J. A., Reineccius, G. A. und Cheng, T. B.: *Biosynthesis of 3-isopropyl-2-methoxypyrazine and other alkylpyrazines: widely distributed flavor compounds*. Spec. Publ. - R. Soc. Chem., 95(Bioform. Flavours):75-95, 1992.
- [5] Maga, J. A. und Sizer, C. E.: *Pyrazines in foods. Review*. J. Agric. Food Chem., 21(1):22-30, 1973.
- [6] Murray, K. E. und Whitfield, F. B.: *Occurrence of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in raw vegetables*. J. Sci. Food Agric., 26(7):973-986, 1975.
- [7] Buttery, R. G., Seifert, R. M., Guadagni, D. G. und Ling, L. C.: *Characterization of some volatile constituents of bell peppers*. J. Agric. Food Chem., 17(6):1322-1327, 1969.
- [8] Murray, K. E., Shipton, J. und Whitfield, F. B.: *2-Methoxypryazines and the flavor of green peas (Pisum sativum)*. Chem. Ind. (London, U. K.), (27):897-898, 1970.
- [9] Gallois, A.: *Pyrazines in food. Current knowledge. Review*. Sciences des Aliments, 4(2):145-166, 1984.
- [10] Schreier, P.: *Flavor composition of wines: a review*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 12(1):59-111, 1979.
- [11] Rapp, A. und Mandery, H.: *Wine aroma*. Experientia, 42(8):873-84, 1986.
- [12] Rapp, A.: *Compounds responsible for the bouquet of wines*. Chem. Unserer Zeit, 26(6):273-284, 1992.

- [13] Fischer, U.: *Wine Aroma*, Seiten 241–267. Springer, Berlin, Heidelberg, 2007, ISBN 978-3-540-49338-9.
- [14] Belitz, H.-D., Grosch, W. und Schieberle, P.: *Lebensmittelchemie*. Springer-Lehrbuch. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 6. Auflage, 2008, ISBN 978-3-540-73202-0.
- [15] Allen, M. S. und Lacey, M. J.: *Stable Isotope Dilution Gas Chromatography-Mass Spectrometry for Determination of Methoxypyrazines ("Green" Aroma) in Wine*, Band 19, Seiten 193–210. Springer, Berlin, Heidelberg, 1997, ISBN 3-540-61589-X 0937-8340.
- [16] Allen, M. S., Lacey, M. J. und Boyd, S.: *Determination of Methoxypyrazines in Red Wines by Stable Isotope Dilution Gas Chromatography-Mass Spectrometry*. J. Agric. Food Chem., 42(8):1734–1738, 1994.
- [17] Lacey, M. J., Allen, M. S., Harris, R. L. N. und Brown, W. V.: *Methoxypyrazines in Sauvignon blanc grapes and wines*. Am. J. Enol. Viticult., 42(2):103–108, 1991.
- [18] Allen, M. S., Lacey, M. J., Harris, R. L. N. und Brown, W. V.: *Contribution of methoxypyrazines to Sauvignon blanc wine aroma*. Am. J. Enol. Viticult., 42(2):109–112, 1991.
- [19] Allen, M. S. und Lacey, M. J.: *Methoxypyrazines of grapes and wines*, Band 714, Seiten 31–38. 1998, ISBN 0097-6156.
- [20] Roujou de Boubée, D., Van Leeuwen, C. und Dubourdieu, D.: *Organoleptic Impact of 2-Methoxy-3-isobutylpyrazine on Red Bordeaux and Loire Wines. Effect of Environmental Conditions on Concentrations in Grapes during Ripening*. J. Agric. Food Chem., 48(10):4830–4834, 2000.
- [21] Harris, R. L. N., Lacey, M. J., Brown, W. V. und Allen, M. S.: *Determination of 2-methoxy-3-alkylpyrazines in wine by gas chromatography/mass spectrometry*. Vitis, 26(4):201–207, 1987.
- [22] Allen, M. S., Lacey, M. J., Harris, R. L. N. und Brown, W. V.: *Sauvignon Blanc Varietal Aroma*. The Australian Grapegrower & Winemaker, 292:51–56, 1988.
- [23] Allen, M. S. und Lacey, M. J.: *Methoxypyrazine grape flavor: Influence of climate, cultivar and viticulture*. Wein-Wiss., 48(3-6):211–213, 1993.
- [24] Anderson, K. und Aryal, N. R.: *Wich Winegrape Varieties are Grown where? A Global Empirical Picture*. University of Adelaide Press, Adelaide, South Australia, 2013, ISBN (PAPERBACK) 978-1-922064-67-7, (EBOOK) 978-1-922064-68-4.
- [25] *Landwirtschaftliche Bodennutzung - Rebflächen - 2014*. Report, Statistisches Bundesamt, 5. März 2015.

- [26] *Landwirtschaftliche Bodennutzung - Rebflächen - 2017*. Report, Statistisches Bundesamt, 16. März 2018.
- [27] *Bestockte Rebfläche 2014*. Report, Deutscher Weinbauverband, 12. März 2015.
- [28] Weiland, J. und Schmarr, H.-G.: *Sauvignon blanc: grün oder nicht grün?* Der Dtsch. Weinbau, (8):106–110, 2013.
- [29] Weiland, J. und Schmarr, H.-G.: *Sauvignon blanc - Grün oder nicht grün, was bestimmt die Aromatik?* Das Dtsch. Weinmagazin, 13(30. Juni 2012):31–34, 2012.
- [30] Weiland, J. und Schmarr, H.-G.: *Was bestimmt die Aromatik beim Sauvignon Blanc? Grün oder nicht grün?* Der Winzer, 9:16–20, 2012.
- [31] Renner, W., Leitner, E. und Eder, R.: *Effect of canopy management and harvest date on soundness of grapes, essential grape contents, and the style of Sauvignon blanc wines*. Mitt. Klosterneuburg, 61(2):65–75, 2011.
- [32] Pickering, G. J., Lin, Y., Reynolds, A., Soleas, G., Riesen, R. und Brindle, I.: *The influence of Harmonia axyridis on wine composition and aging*. J. Food Sci., 70(2):S128–S135, 2005.
- [33] Al Abassi, S., Birkett, M. A., Pettersson, J., Pickett, J. A. und Woodcock, C. M.: *Ladybird beetle odor identified and found to be responsible for attraction between adults*. Cell. Mol. Life Sci., 54(8):876–879, 1998.
- [34] Kögel, S., Gross, J., Hoffmann, C. und Ulrich, D.: *Diversity and frequencies of methoxypyrazines in hemolymph of Harmonia axyridis and Coccinella septempunctata and their influence on the taste of wine*. Eur. Food Res. Technol., 234(3):399–404, 2012.
- [35] Cudjoe, E., Wiederkehr, T. B. und Brindle, I. D.: *Headspace gas chromatography-mass spectrometry: a fast approach to the identification and determination of 2-alkyl-3-methoxypyrazine pheromones in ladybugs*. Analyst (Cambridge, U. K.), 130(2):152–155, 2005.
- [36] Cai, L., Koziel, J. A. und O’Neal, M. E.: *Determination of characteristic odorants from Harmonia axyridis beetles using in vivo solid-phase microextraction and multidimensional gas chromatography-mass spectrometry-olfactometry*. J. Chromatogr. A, 1147(1):66–78, 2007.
- [37] Botezatu, A. I., Kotseridis, Y., Inglis, D. und Pickering, G. J.: *Occurrence and contribution of alkyl methoxypyrazines in wine tainted by Harmonia axyridis and Coccinella septempunctata*. J. Sci. Food Agric., 93(4):803–810, 2013.

- [38] Boutou, S. und Chatonnet, P.: *Rapid headspace solid-phase microextraction/gas chromatographic/mass spectrometric assay for the quantitative determination of some of the main odorants causing off-flavours in wine*. J. Chromatogr. A, 1141(1):1–9, 2007.
- [39] Simpson, R. F., Capone, D. L. und Sefton, M. A.: *Isolation and Identification of 2-Methoxy-3,5-dimethylpyrazine, a Potent Musty Compound from Wine Corks*. J. Agric. Food Chem., 52(17):5425–5430, 2004.
- [40] Chatonnet, P., Fleury, A. und Boutou, S.: *Origin and incidence of 2-methoxy-3,5-dimethylpyrazine, a compound with a “fungal” and “corky” aroma found in cork stoppers and oak chips in contact with wines*. J. Agric. Food Chem., 58(23):12481–12490, 2010.
- [41] Slabizki, P., Legrum, C., Meusinger, R. und Schmarr, H.-G.: *Characterization and analysis of structural isomers of dimethyl methoxypyrazines in cork stoppers and ladybugs (Harmonia axyridis and Coccinella septempunctata)*. Anal. Bioanal. Chem., 406(25):6429–6439, 2014.
- [42] Slabizki, P., Fischer, C., Legrum, C. und Schmarr, H.-G.: *Characterization of Atypical Off-Flavor Compounds in Natural Cork Stoppers by Multidimensional Gas Chromatographic Techniques*. J. Agric. Food Chem., 63(35):7840–7848, 2015.
- [43] Augustyn, O. P. H., Rapp, A. und Van Wyk, C. J.: *Some volatile aroma components of Vitis vinifera cv. Sauvignon blanc*. S. Afr. J. Enol. Vitic., 3(2):53–60, 1982.
- [44] Sala, C., Mestres, M., Marti, M. P., Busto, O. und Guasch, J.: *Headspace solid-phase microextraction method for determining 3-alkyl-2-methoxypyrazines in musts by means of polydimethylsiloxane-divinylbenzene fibers*. J. Chromatogr. A, 880(1+2):93–99, 2000.
- [45] Sala, C., Mestres, M., Marti, M. P., Busto, O. und Guasch, J.: *Headspace solid-phase microextraction analysis of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in wines*. J. Chromatogr. A, 953(1-2):1–6, 2002.
- [46] Panighel, A., Dalla Vedova, A., De Rosso, M., Gardiman, M. und Flamini, R.: *A solid-phase microextraction gas chromatography/ion trap tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of ‘foxy smelling compounds’ and 3-alkyl-2-methoxypyrazines in grape juice*. Rapid Commun. Mass Spectrom., 24(14):2023–2029, 2010.
- [47] Koch, A., Doyle, C. L., Matthews, M. A., Williams, L. E. und Ebeler, S. E.: *2-Methoxy-3-isobutylpyrazine in grape berries and its dependence on genotype*. Phytochemistry, 71(17-18):2190–2198, 2010.

- [48] Hashizume, K. und Samuta, T.: *Grape maturity and light exposure affect berry methoxyypyrazine concentration*. Am. J. Enol. Viticult., 50(2):194–198, 1999.
- [49] Belancic, A. und Agosin, E.: *Methoxyypyrazines in grapes and wines of Vitis vinifera cv. Carmenere*. Am. J. Enol. Viticult., 58(4):462–469, 2007.
- [50] Dominguez, A. M. und Agosin, E.: *Gas chromatography coupled with mass spectrometry detection for the volatile profiling of Vitis vinifera CV. Carmenere wines*. J. Chil. Chem. Soc., 55(3):385–391, 2010.
- [51] Ryona, I., Leclerc, S. und Sacks, G. L.: *Correlation of 3-Isobutyl-2-methoxyypyrazine to 3-Isobutyl-2-hydroxyypyrazine during Maturation of Bell Pepper (Capsicum annum) and Wine Grapes (Vitis vinifera)*. J. Agric. Food Chem., 58(17):9723–9730, 2010.
- [52] Roujou de Boubée, D., Cumsille, A. M., Pons, M. und Dubourdiu, D.: *Location of 2-methoxy-3-isobutylpyrazine in Cabernet Sauvignon grape bunches and its extractability during vinification*. Am. J. Enol. Viticult., 53(1):1–5, 2002.
- [53] Ribéreau-Gayon, P., Dubourdiu, D., Donèche, B. und Lonvaud, A.: *Handbook of Enology - The Microbiology of Wine and Vinifications*, Band 1. John Wiley & Sons Ltd, 2. Auflage, 2006, ISBN 0-470-01034-7.
- [54] Harris, S. A., Ryona, I. und Sacks, G. L.: *Behavior of 3-Isobutyl-2-hydroxyypyrazine (IBHP), a Key Intermediate in 3-Isobutyl-2-methoxyypyrazine (IBMP) Metabolism, in Ripening Wine Grapes*. J. Agric. Food Chem., 60(48):11901–11908, 2012.
- [55] Scheiner, J. J., Vanden Heuvel, J. E., Pan, B. und Sacks, G. L.: *Modeling impacts of viticultural and environmental factors on 3-isobutyl-2-methoxyypyrazine in Cabernet franc grapes*. Am. J. Enol. Viticult., 63(1):94–105, 2012.
- [56] Ryona, I., Pan, B. S., Intrigliolo, D. S., Lakso, A. N. und Sacks, G. L.: *Effects of cluster light exposure on 3-isobutyl-2-methoxyypyrazine accumulation and degradation patterns in red wine grapes (Vitis vinifera L. Cv. Cabernet Franc)*. J. Agric. Food Chem., 56(22):10838–10846, 2008.
- [57] Koch, A., Ebeler Susan, E., Williams Larry, E. und Matthews Mark, A.: *Fruit ripening in Vitis vinifera: light intensity before and not during ripening determines the concentration of 2-methoxy-3-isobutylpyrazine in Cabernet Sauvignon berries*. Physiol. Plant., 145(2):275–285, 2012.
- [58] Sala, C., Busto, O., Guasch, J. und Zamora, F.: *Contents of 3-alkyl-2-methoxyypyrazines in musts and wines from Vitis vinifera variety Cabernet Sauvignon: Influence of irrigation and plantation density*. J. Sci. Food Agric., 85(7):1131–1136, 2005.

- [59] Scheiner, J. J., Sacks, G. L., Pan, B., Ennahli, S., Tarlton, L., Wise, A., Lerch, S. D. und Vanden Heuvel, J. E.: *Impact of severity and timing basal leaf removal on 3-isobutyl-2-methoxy-pyrazine concentration in red winegrapes*. Am. J. Enol. Viticult., 61(3):358–364, 2010.
- [60] Marais, J., Hunter, J. J. und Haasbroek, P. D.: *Effect of canopy microclimate, season and region on Sauvignon blanc grape composition and wine quality*. S. Afr. J. Enol. Vitic., 20(1):19–30, 1999.
- [61] Kotseridis, Y., Beloqui, A. A., Bayonove, C. L., Baumes, R. L. und Bertrand, A.: *Effects of selected viticultural and enological factors on levels of 2-methoxy-3-isobutylpyrazine in wines*. J. Int. Sci. Vigne Vin, 33(1):19–23, 1999.
- [62] Hashizume, K.: *Methoxy-pyrazines in wine*. Nippon Jozo Kyokaiishi, 94(12):966–973, 1999.
- [63] Sidhu, D., Lund, J., Kotseridis, Y. und Saucier, C.: *Methoxy-pyrazine analysis and influence of viticultural and enological procedures on their levels in grapes, musts, and wines*. Critical reviews in food science and nutrition, 55(4):485–502, 2015.
- [64] Rajchl, A., Cizkova, H., Voldrich, M., Lukesova, D. und Panovska, Z.: *Methoxy-pyrazines in Sauvignon blanc wines, detection of addition of artificial aroma*. Czech J. Food Sci., 27(4):259–266, 2009.
- [65] Koch, R. L.: *The multicolored Asian lady beetle, Harmonia axyridis: a review of its biology, uses in biological control, and non-target impacts*. J. Insect Sci., 3:32, 2003.
- [66] Tedders, W. L. und Schaefer, P. W.: *Release and Establishment of Harmonia axyridis (Coleoptera: Coccinellidae) in the Southeastern United States*. Ent. News, 105(4):228–243, 1994.
- [67] Riesen, R.: *Der Asiatische Marienkäfer im Weinbau*. Schweiz. Z. Obst- Weinbau, (Nr. 22/08):6–9, 2008.
- [68] Carrillo, M. A., Koch, R. L., Venette, R. C., Cannon, C. A. und Hutchison, W. D.: *Response of the Multicolored Asian Lady Beetle (Coleoptera: Coccinellidae) to Low Temperatures: Implications for Winter Survival*. Am. Entomol., 50(3):157–158, 2004.
- [69] Galvan, T. L., Koch, R. L. und Hutchison, W. D.: *Impact of fruit feeding on overwintering survival of the multicolored Asian lady beetle, and the ability of this insect and paper wasps to injure wine grape berries*. Entomol. Exp. Appl., 128(3):429–436, 2008.
- [70] Holloway, G., Jong, P. de, Brakefield, P. und Vos, H. de: *Chemical defence in ladybird beetles (Coccinellidae). I. Distribution of coccinelline and individual variation in defence in 7-spot ladybirds (Coccinella septempunctata)*. Chemoecology, 2(1):7–14, 1991.

- [71] Moore, B. P., Brown, W. V. und Rothschild, M.: *Methylalkylpyrazines in aposematic insects, their hostplants and mimics*. Chemoecology, 1(2):43–51, 1990.
- [72] Bateman, P. W. und Fleming, P. A.: *There will be blood: autohaemorrhage behaviour as part of the defence repertoire of an insect*. J. Zool., 278(4):342–348, 2009.
- [73] Blum, M. S. und Sannasi, A.: *Reflex bleeding in the lampyrid *Photinus pyralis*: Defensive function*. J. Insect Physiol., 20(3):451–460, 1974.
- [74] Kögel, S., Gross, J. und Hoffmann, C.: *Sensory detection thresholds of 'ladybird taint' in 'Riesling' and 'Pinot Noir' under different fermentation and processing conditions*. Vitis, 51(1):27–32, 2012.
- [75] Linder, C., Lorenzini, F. und Kehrli, P.: *Potential impact of processed *Harmonia axyridis* on the taste of Chasselas and Pinot noir wines*. Vitis, 48(2):101–102, 2009.
- [76] Pickering, G. J., Ker, K. und Soleas, G. J.: *Determination of the critical stages of processing and tolerance limits for **Harmonia axyridis** for 'ladybug taint' in wine*. Vitis, 46(2):85–90, 2007.
- [77] Galvan, T. L., Burkness, E. C., Vickers, Z., Stenberg, P., Mansfield, A. K. und Hutchison, W. D.: *Sensory-based action threshold for multicolored Asian lady beetle-related taint in winegrapes*. Am. J. Enol. Viticult., 58(4):518–522, 2007.
- [78] Kotseridis, Y. S., Spink, M., Brindle, I. D., Blake, A. J., Sears, M., Chen, X., Soleas, G., Inglis, D. und Pickering, G. J.: *Quantitative analysis of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in juice and wine using stable isotope labelled internal standard assay*. J. Chromatogr. A, 1190(1-2):294–301, 2008.
- [79] Pickering, G. J., Spink, M., Kotseridis, Y., Brindle, I. D., Sears, M. und Inglis, D.: *Morbidity of *Harmonia axyridis* mediates ladybug taint in red wine*. J. Food, Agric. Environ., 6(3 & 4):133–137, 2008.
- [80] Jackson, R. S.: *Cork and Other Bottle Closures*, Book Section 8. Postfermentation Treatments and Related Topics, Seiten 418–519. Food Science and Technology International Series. Academic Press, 2. Auflage, 2000.
- [81] Prat, C., Ruiz-Rueda, O., Trias, R., Antico, E., Capone, D., Sefton, M. und Baneras, L.: *Molecular fingerprinting by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis reveals differences in the levels of microbial diversity for musty-earthly tainted corks*. Appl. Environ. Microbiol., 75(7):1922–1931, 2009.
- [82] Prat, C., Trias, R., Cullere, L., Escudero, A., Antico, E. und Baneras, L.: *Off-Odor Compounds Produced in Cork by Isolated Bacteria and Fungi: A Gas Chromatography-Mass Spectrometry and Gas Chromatography-Olfactometry Study*. J. Agric. Food Chem., 57(16):7473–7479, 2009.

- [83] Campo, E., Ferreira, V., Escudero, A. und Cacho, J.: *Prediction of the wine sensory properties related to grape variety from dynamic-headspace gas chromatography-olfactometry data*. J. Agric. Food Chem., 53(14):5682–5690, 2005.
- [84] Allen, M. S., Lacey, M. J. und Boyd, S. J.: *Methoxypyrazines in Red Wines: Occurrence of 2-Methoxy-3-(1-methylethyl)pyrazine*. J. Agric. Food Chem., 43(3):769–772, 1995.
- [85] Prat, C., Baneras, L. und Antico, E.: *Screening of musty-earthy compounds from tainted cork using water-based soaks followed by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry*. Eur. Food Res. Technol., 227(4):1085–1090, 2008.
- [86] Sefton, M. A. und Simpson, R. F.: *Compounds causing cork taint and the factors affecting their transfer from natural cork closures to wine - a review*. Aus. J. Grape Wine Res., 11:226–240, 2005.
- [87] Silva Pereira, C., Figueiredo Marques, J. J. und San Romao, M. V.: *Cork taint in wine: scientific knowledge and public perception: a critical review*. Crit. Rev. Microbiol., 26(3):147–162, 2000.
- [88] Dal Bo, A., Basei, A., Pellegrin, N. de und Polo, M.: *Cork and musty taint defects*. Ind. Bevande, 33(191):225–228, 2004.
- [89] Pickering, G., Lin, J., Reynolds, A., Soleas, G. und Riesen, R.: *The evaluation of remedial treatments for wine affected by Harmonia axyridis*. Int. J. Food Sci. Technol., 41(1):77–86, 2006.
- [90] Blake, A., Kotseridis, Y., Brindle, I. D., Inglis, D. und Pickering, G. J.: *Effect of light and temperature on 3-alkyl-2-methoxypyrazine concentration and other impact odourants of Riesling and Cabernet Franc wine during bottle ageing*. Food Chem., 119(3):935–944, 2010.
- [91] Ryona, I., Reinhardt, J. und Sacks, G. L.: *Treatment of grape juice or must with silicone reduces 3-alkyl-2-methoxypyrazine concentrations in resulting wines without altering fermentation volatiles*. Food Res. Int., 47(1):70–79, 2012.
- [92] *Verordnung (EG) Nr. 606/2009 der Kommission vom 10. Juli 2009 mit Durchführungsbestimmungen zur Verordnung (EG) Nr. 479/2008 des Rates hinsichtlich der Weinbauerzeugniskategorien, der önologischen Verfahren und der diesbezüglichen Einschränkungen*, 24.07.2009.
- [93] Internationale Organisation für Rebe und Wein: *International Oenological Codex*, 2016.
- [94] Internationale Organisation für Rebe und Wein: *International Code of Oenological Practices*. 2016.

- [95] Cheng, T. B., Reineccius, G. A., Bjorklund, J. A. und Leete, E.: *Biosynthesis of 2-methoxy-3-isopropylpyrazine in Pseudomonas perolens*. J. Agric. Food Chem., 39(5):1009–1012, 1991.
- [96] Nawrath, T., Dickschat, J. S., Kunze, B. und Schulz, S.: *The biosynthesis of branched dialkylpyrazines in myxobacteria*. Chem. Biodiversity, 7(9):2129–2144, 2010.
- [97] Schulz, S. und Dickschat, J. S.: *Bacterial volatiles: The smell of small organisms*. Nat. Prod. Rep., 24(4):814–842, 2007.
- [98] Jones, R. G.: *Pyrazines and related compounds. I. A new synthesis of hydroxypyrazines*. J. Am. Chem. Soc., 71:78–81, 1949.
- [99] Nursten, H. E. und Sheen, M. R.: *Volatile flavor components of cooked potato*. J. Sci. Food Agric., 25(6):643–663, 1974.
- [100] Bungert, M., Jahns, T. und Becker, H.: *2-Methoxy-3-(1'-methylpropyl)pyrazine, pea odour, from the marine bacterium Halomonas venusta*. Flavour Fragrance J., 16(5):329–333, 2001.
- [101] Gallois, A., Kergomard, A. und Adda, J.: *Study of the biosynthesis of 3-isopropyl-2-methoxypyrazine produced by Pseudomonas taetrolens*. Food Chem., 28(4):299–309, 1988.
- [102] Dickschat, J. S., Wickel, S., Bolten, C. J., Nawrath, T., Schulz, S. und Wittmann, C.: *Pyrazine Biosynthesis in Corynebacterium glutamicum*. Eur. J. Org. Chem., (14):2687–2695, 2010.
- [103] Hashizume, K., Tozawa, K., Hiraga, Y. und Aramaki, I.: *Purification and characterization of a O-methyltransferase capable of methylating 2-hydroxy-3-alkylpyrazine from Vitis vinifera L. (cv. Cabernet Sauvignon)*. Biosci., Biotechnol., Biochem., 65(10):2213–2219, 2001.
- [104] Hashizume, K., Tozawa, K., Endo, M. und Aramaki, I.: *S-adenosyl-L-methionine-dependent O-methylation of 2-hydroxy-3-alkylpyrazine in wine grapes: a putative final step of methoxypyrazine biosynthesis*. Biosci., Biotechnol., Biochem., 65(4):795–801, 2001.
- [105] Dunlevy, J. D., Soole, K. L., Perkins, M. V., Dennis, E. G., Keyzers, R. A., Kalua, C. M. und Boss, P. K.: *Two O-methyltransferases involved in the biosynthesis of methoxypyrazines: grape-derived aroma compounds important to wine flavour*. Plant Mol. Biol., 74(1-2):77–89, 2010.

- [106] Vallarino, J. G., Lopez-Cortes, X. A., Dunlevy, J. D., Boss, P. K., Gonzalez-Nilo, F. D. und Moreno, Y. M.: *Biosynthesis of Methoxy-pyrazines: Elucidating the Structural/Functional Relationship of Two Vitis vinifera O-Methyltransferases Capable of Catalyzing the Putative Final Step of the Biosynthesis of 3-Alkyl-2-Methoxy-pyrazine*. J. Agric. Food Chem., 59(13):7310–7316, 2011.
- [107] Dunlevy, J. D., Dennis, E. G., Soole, K. L., Perkins, M. V., Davies, C. und Boss, P. K.: *A methyltransferase essential for the methoxy-pyrazine-derived flavour of wine*. Plant J., 75(4):606–617, 2013.
- [108] Mihara, S., Masuda, H., Nishimura, O. und Tateba, H.: *Determination of the enantiomeric composition of 2-methoxy-3-(1'-methylpropyl)pyrazine from galbanum oil using achiral and chiral lanthanide shift reagents*. J. Agric. Food Chem., 38(2):465–467, 1990.
- [109] Mihara, S., Masuda, H. und Nishimura, O.: *Structure-odor relationship of pyrazines and determination of the enantiomeric composition of 2-methoxy-3-(1-methylpropyl)pyrazine from galbanum oil using achiral and chiral lanthanide shift reagents*. Proc. - Int. Congr. Essent. Oils, Fragrances Flavours, 11th, 5:23–29, 1989.
- [110] Bungert, M.: *Das Sekundärstoffprofil von ausgesuchten marinen Bakterien unter besonderer Berücksichtigung des „Erbsengeruchs“ von Halomonas venusta*. Thesis, 1999.
- [111] MacDonald, J. C.: *Biosynthesis of aspergilliacid*. J. Biol. Chem., 236:512–514, 1961.
- [112] Settle, F. A.: *Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry*. Prentice-Hall, 1997.
- [113] Cronin, D. A. und Stanon, P.: *2-Methoxy-3-sec-butylpyrazine. An important contributor to carrot aroma*. J. Sci. Food Agric., 27(2):145–151, 1976.
- [114] Parliment, T. H., Kolor, M. G. und Maing, I. Y.: *Identification of the major volatile components of cooked beets*. J. Food Sci., 42(6):1592–1593, 1977.
- [115] Murray, Keith, E., Shipton, J., Whitfield, F. B. und Last, J. H.: *The volatiles of off-flavored unblanched green peas (Pisum sativum)*. J. Sci. Food Agric., 27(12):1093–1107, 1976.
- [116] Luning, P. A., Rijk, T. de, Wichers, H. J. und Roozen, J. P.: *Gas Chromatography, Mass Spectrometry, and Sniffing Port Analyses of Volatile Compounds of Fresh Bell Peppers (Capsicum annum) at Different Ripening Stages*. J. Agric. Food Chem., 42(4):977–983, 1994.

- [117] Jakobsen, H. B., Hansen, M., Christensen, M. R., Brockhoff, P. B. und Olsen, C. E.: *Aroma Volatiles of Blanched Green Peas (Pisum sativum L.)*. J. Agric. Food Chem., 46(9):3727–3734, 1998.
- [118] Lopez, R., Gracia-Moreno, E., Cacho, J. und Ferreira, V.: *Development of a mixed-mode solid phase extraction method and further gas chromatography mass spectrometry for the analysis of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in wine*. J. Chromatogr. A, 1218(6):842–848, 2011.
- [119] Kotseridis, Y., Baumes, R. L., Bertrand, A. und Skouroumounis, G. K.: *Quantitative determination of 2-methoxy-3-isobutylpyrazine in red wines and grapes of Bordeaux using a stable isotope dilution assay*. J. Chromatogr. A, 841(2):229–237, 1999.
- [120] Kotseridis, Y., Beloqui, A. A., Bertrand, A. und Doazan, J. P.: *An analytical method for studying the volatile compounds of Merlot noir clone wines*. Am. J. Enol. Viticult., 49(1):44–48, 1998.
- [121] Genovese, A., Gambuti, A., Lamorte, S. A. und Moio, L.: *An extract procedure for studying the free and glycosylated aroma compounds in grapes*. Food Chem., 136(2):822–834, 2013.
- [122] Heymann, H., Noble, A. C. und Boulton, R. B.: *Analysis of methoxypyrazines in wines. 1. Development of a quantitative procedure*. J. Agric. Food Chem., 34(2):268–71, 1986.
- [123] Alberts, P., Stander, M. A., Paul, S. O. und Villiers, A. de: *Survey of 3-Alkyl-2-methoxypyrazine Content of South African Sauvignon Blanc Wines using a Novel LC-APCI-MS/MS Method*. J. Agric. Food Chem., 57(20):9347–9355, 2009.
- [124] Alberts, P., Kidd, M., Stander, M. A., Nieuwoudt, H. H., Tredoux, A. G. J. und Villiers, A. de: *Quantitative survey of 3-alkyl-2-methoxypyrazines and first confirmation of 3-ethyl-2-methoxypyrazine in south African Sauvignon blanc wines*. S. Afr. J. Enol. Vitic., 34(1):54–67, 2013.
- [125] Arthur, C. L. und Pawliszyn, J.: *Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers*. Anal. Chem., 62(19):2145–2148, 1990.
- [126] Pawliszyn, J.: *Theory of solid-phase microextraction*. J. Chromatogr. Sci., 38(7):270–278, 2000.
- [127] Zhang, Z. und Pawliszyn, J.: *Headspace solid-phase microextraction*. Anal. Chem., 65(14):1843–1852, 1993.
- [128] Arthur, C. L., Killam, L. M., Buchholz, K. D., Pawliszyn, J. und Berg, J. R.: *Automation and optimization of solid-phase microextraction*. Anal. Chem., 64(17):1960–1966, 1992.

- [129] Hartmann, P. J., McNair, H. M. und Zoecklein, B. W.: *Measurement of 3-alkyl-2-methoxypyrazine by headspace solid-phase microextraction in spiked model wines*. Am. J. Enol. Viticult., 53(4):285–288, 2002.
- [130] Godelmann, R., Limmert, S. und Kuballa, T.: *Implementation of headspace solid-phase-microextraction-GC-MS/MS methodology for determination of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in wine*. Eur. Food Res. Technol., 227(2):449–461, 2008.
- [131] Ross, C. F., Rosales, M. U. und Fernandez-Plotka, V. C.: *Aroma profile of Niagara grape juice contaminated with multicoloured Asian lady beetle taint using gas chromatography/mass spectrometry/olfactometry*. Int. J. Food Sci. Technol., 45(4):789–793, 2010.
- [132] Frank, S., Wollmann, N., Schieberle, P. und Hofmann, T.: *Reconstitution of the Flavor Signature of Dornfelder Red Wine on the Basis of the Natural Concentrations of Its Key Aroma and Taste Compounds*. J. Agric. Food Chem., 59(16):8866–8874, 2011.
- [133] Gregan, S. M., Wargent, J. J., Liu, L., Shinkle, J., Hofmann, R., Winefield, C., Trought, M. und Jordan, B.: *Effects of solar ultraviolet radiation and canopy manipulation on the biochemical composition of Sauvignon Blanc grapes*. Aus. J. Grape Wine Res., 18(2):227–238, 2012.
- [134] Chapman, D. M., Thorngate, J. H., Matthews, M. A., Guinard, J. X. und Ebeler, S. E.: *Yield Effects on 2-Methoxy-3-Isobutylpyrazine Concentration in Cabernet Sauvignon Using a Solid Phase Microextraction Gas Chromatography/Mass Spectrometry Method*. J. Agric. Food Chem., 52(17):5431–5435, 2004.
- [135] Shrivastava, A. und Gupta, V. B.: *Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods*. Chron. Young Sci., 2(1):21–25, 2011.
- [136] *DIN 32645:2008-11: Chemische Analytik - Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze unter Wiederholbedingungen - Begriffe, Verfahren, Auswertung*. Arbeitsausschuss NA 062-08-15 AA „Grundlagen der analytischen Atomspektroskopie“ des NMP, 2008.
- [137] *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Q2(R1) ICH Harmonised Tripartite Guideline, 2005.
- [138] *Validierung von Prüfverfahren im Geltungsbereich des Scopes des SK - Chemie*. Deutsches Akkreditierungssystem Prüfwesen GmbH (AK-TM 17 Merkblatt), 2002.

- [139] Prouteau, C., Schneider, R., Lucchese, Y., Nepveu, F., Renard, R. und Vaca-Garcia, C.: *Improving headspace-solid-phase microextraction of 3-isobutyl-2-methoxypyrazine by experimental design with regard to stable isotope dilution gas chromatography-mass spectrometric analysis of wine*. Anal. Chim. Acta, 513(1):223–227, 2004.
- [140] Zorn, M. E., Gibbons, R. D. und Sonzogni, W. C.: *Weighted least-squares approach to calculating limits of detection and quantification by modeling variability as a function of concentration*. Anal. Chem., 69(15):3069–3075, 1997.
- [141] Danzer, K. und Currie, L. A.: *Guidelines for calibration in analytical chemistry. Part I. Fundamentals and single component calibration (IUPAC Recommendations 1998)*. Pure Appl. Chem., 70(4):993–1014, 1998.
- [142] Galvan, T.L., Kells, S. und Hutchison, W.D.: *Determination of 3-Alkyl-2-methoxypyrazines in Lady Beetle-Infested Wine by Solid-Phase Microextraction Headspace Sampling*. J. Agric. Food Chem., 56(3):1065–1071, 2008.
- [143] Arnoldi, A., Baldi, O. und Griffini, A.: *Pulsed positive/negative chemical ionization mass spectrometry of pyrazines*. Heterocycles, 27(12):2875–82, 1988.
- [144] Lu, H., Liang, Y., Dunn, W. B., Shen, H. und Kell, D. B.: *Comparative evaluation of software for deconvolution of metabolomics data based on GC-TOF-MS*. TrAC, Trends Anal. Chem., 27(3):215–227, 2008.
- [145] Giddings, J. C.: *Two-dimensional separations: concept and promise*. Anal. Chem., 56(12):1258A–1270A, 1984.
- [146] Marriott, P. J., Chin, S.-T., Maikhunthod, B., Schmarr, H.-G. und Bieri, S.: *Multidimensional gas chromatography*. TrAC, Trends Anal. Chem., 34:1–21, 2012.
- [147] Fiselier, K. und Grob, K.: *Determination of mineral oil paraffins in foods by on-line HPLC-GC-FID: lowered detection limit; contamination of sunflower seeds and oils*. Eur. Food Res. Technol., 229(4):679–688, 2009.
- [148] Biedermann, M., Fiselier, K. und Grob, K.: *Aromatic Hydrocarbons of Mineral Oil Origin in Foods: Method for Determining the Total Concentration and First Results*. J. Agric. Food Chem., 57(19):8711–8721, 2009.
- [149] Biedermann, M. und Grob, K.: *Phenolic resins for can coatings: I. Phenol-based resole analyzed by GC-MS, GC × GC, NPLC-GC and SEC*. LWT - Food Science and Technology, 39(6):633–646, 2006.
- [150] Fankhauser-Noti, A., Fiselier, K., Biedermann, S., Biedermann, M., Grob, K., Armellini, F., Rieger, K. und Skjevrak, I.: *Epoxidized soy bean oil (ESBO) migrating from the gaskets of lids into food packed in glass jars*. Eur. Food Res. Technol., 221(3-4):416–422, 2005.

- [151] Grob, K.: *Efficiency through combining high-performance liquid chromatography and high resolution gas chromatography: progress 1995-1999*. J. Chromatogr. A, 892(1+2):407-420, 2000.
- [152] Biedermann, M. und Grob, K.: *On-line coupled high performance liquid chromatography-gas chromatography for the analysis of contamination by mineral oil. Part 1: Method of analysis*. J. Chromatogr. A, 1255:56-75, 2012.
- [153] Schomburg, G.: *Two-dimensional gas chromatography: principles, instrumentation, methods*. J. Chromatogr. A, 703(1 + 2):309-25, 1995.
- [154] Seeley, J. V. und Seeley, S. K.: *Multidimensional Gas Chromatography: Fundamental Advances and New Applications*. Anal. Chem. (Washington, DC, U. S.), 85(2):557-578, 2013.
- [155] Sharif, K. M., Chin, S. T., Kulsing, C. und Marriott, P. J.: *The microfluidic Deans switch: 50 years of progress, innovation and application*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 82:35-54, 2016.
- [156] Bertsch, W.: *Methods in high resolution gas chromatography. Two-dimensional techniques*. HRC CC, J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun., 1(2):85-90, 1978.
- [157] Giddings, J. C.: *Concepts and comparisons in multidimensional separation*. HRC CC, J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun., 10(5):319-23, 1987.
- [158] Chin, S.-T. und Marriott, P. J.: *Multidimensional gas chromatography beyond simple volatiles separation*. Chem. Commun. (Cambridge, U. K.), 50(64):8819-8833, 2014.
- [159] Cullere, L., Escudero, A., Campo, E., Cacho, J. und Ferreira, V.: *Multidimensional gas chromatography-mass spectrometry determination of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in wine and must. A comparison of solid-phase extraction and headspace solid-phase extraction methods*. J. Chromatogr. A, 1216(18):4040-4045, 2009.
- [160] Meinert, C. und Meierhenrich, U. J.: *A New Dimension in Separation Science: Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography*. Angew. Chem., Int. Ed., 51:10460-10470, 2012.
- [161] *Comprehensive Two Dimensional Gas Chromatography*, Band 55 der Reihe *Comprehensive Analytical Chemistry*. Elsevier, 2009, ISBN 978-0-444-53237-4.
- [162] Tranchida, P. Q., Purcaro, G., Dugo, P., Mondello, L. und Purcaro, G.: *Modulators for comprehensive two-dimensional gas chromatography*. TrAC, Trends Anal. Chem., 30(9):1437-1461, 2011.

- [163] Khummueng, W., Harynuk, J. und Marriott, P. J.: *Modulation ratio in comprehensive two-dimensional gas chromatography*. Anal. Chem., 78(13):4578–4587, 2006.
- [164] Shellie, R. und Marriott, P.: *Opportunities for ultra-high resolution analysis of essential oils using comprehensive two-dimensional gas chromatography: A review*. Flavour Fragrance J., 18(3):179–191, 2003.
- [165] Pierce, K. M., Kehimkar, B., Marney, L. C., Hoggard, J. C. und Synovec, R. E.: *Review of chemometric analysis techniques for comprehensive two dimensional separations data*. Journal of Chromatography A, 1255:3–11, 2012.
- [166] Zeng, Z., Li, J., Hugel, H. M., Xu, G. und Marriott, P. J.: *Interpretation of comprehensive two-dimensional gas chromatography data using advanced chemometrics*. TrAC, Trends Anal. Chem., 53:150–166, 2014.
- [167] Cordero, C., Liberto, E., Bicchi, C., Rubiolo, P., Reichenbach, S. E., Tian, X. und Tao, Q.: *Targeted and Non-Targeted Approaches for Complex Natural Sample Profiling by GCxGC-qMS*. J. Chromatogr. Sci., 48:251–261, 2010.
- [168] Schmarr, H.-G., Bernhardt, J., Fischer, U., Stephan, A., Mueller, P. und Durner, D.: *Two-dimensional gas chromatographic profiling as a tool for a rapid screening of the changes in volatile composition occurring due to microoxygenation of red wines*. Anal. Chim. Acta, 672(1-2):114–123, 2010.
- [169] Phillips, J. B. und Beens, J.: *Comprehensive two-dimensional gas chromatography: a hyphenated method with strong coupling between the two dimensions*. J. Chromatogr. A, 856(1 + 2):331–347, 1999.
- [170] Marriott, P. und Shellie, R.: *Principles and applications of comprehensive two-dimensional gas chromatography*. TrAC, Trends Anal. Chem., 21(9/10):573–583, 2002.
- [171] Gorecki, T., Harynuk, J. und Panic, O.: *The evolution of comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC × GC)*. J. Sep. Sci., 27(5-6):359–379, 2004.
- [172] Adahchour, M., Beens, J., Vreuls, R. J. J. und Brinkman, U. A. T.: *Recent developments in comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC × GC)*. TrAC, Trends Anal. Chem., 25(8):821–840, 2006.
- [173] Adahchour, M., Beens, J. und Brinkman, U. A. T.: *Recent developments in the application of comprehensive two-dimensional gas chromatography*. J. Chromatogr. A, 1186(1-2):67–108, 2008.
- [174] Wang, Y., Chen, Q., Norwood, D. L. und McCaffrey, J.: *Recent development in the application of comprehensive two-dimensional gas chromatograph*. J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol., 33(9-12):1082–1115, 2010.

- [175] Tranchida, P. Q., Purcaro, G., Maimone, M. und Mondello, L.: *Impact of comprehensive two-dimensional gas chromatography with mass spectrometry on food analysis*. J. Sep. Sci., 39(1):149–161, 2015.
- [176] Schmarr, H.-G., Ganß, S., Koschinski, S., Fischer, U., Riehle, C., Kinnart, J., Potouridis, T. und Kuttyrev, M.: *Pitfalls encountered during quantitative determination of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in grape must and wine using gas chromatography-mass spectrometry with stable isotope dilution analysis. Comprehensive two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry and on-line liquid chromatography-multidimensional gas chromatography-mass spectrometry as potential loopholes*. J. Chromatogr. A, 1217(43):6769–6777, 2010.
- [177] Ryan, D., Watkins, P., Smith, J., Allen, M. und Marriott, P.: *Analysis of methoxypyrazines in wine using headspace solid phase microextraction with isotope dilution and comprehensive two-dimensional gas chromatography*. J. Sep. Sci., 28(9-10):1075–1082, 2005.
- [178] Ryona, I., Pan, B.S. und Sacks, G.L.: *Rapid Measurement of 3-Alkyl-2-methoxypyrazine Content of Winegrapes To Predict Levels in Resultant Wines*. J. Agric. Food Chem., 57(18):8250–8257, 2009.
- [179] Arago, D.F. *Mém. Sci. Math. Phys. Inst. Imp.*, Seiten 93–134, 1811.
- [180] Biot, J.B. *Bull. Soc. Philomath. Paris*, Seite 190, 1815.
- [181] Berzelius, J.J.: *Über die Zusammensetzung der Weinsäure und Traubensäure, über das Atomgewicht des Bleioxyds, nebst allgemeinen Bemerkungen über solche Körper, die gleiche Zusammensetzung, aber ungleiche Eigenschaften besitzen*. Pogg. Annalen, 19:305, 1830.
- [182] Pasteur, L.: *Recherches sur les relations qui peuvent exister entre la forme cristalline, la composition chimique, et le sens de la polarisation rotatoire. [Research on the relationships between crystalline form, chemical composition, and the sense of rotatory polarization.]*. Annales de Chimie Chimie et Physique, 24:442–459, 1848.
- [183] Kekulé, A.: *Über die Constitution und die Metamorphosen der chemischen Verbindungen und über die chemische Natur des Kohlenstoffs*. Ann. Chem. Pharm., 106:129, 1858.
- [184] Le Bel, J. A.: *Sur les relations qui existent entre les formules atomiques des corps organiques et le pouvoir rotatoire de leurs dissolutions*. Bull. Soc. Chim. France, 22:337–347, 1874.
- [185] Van't Hoff, J. H.: *Sur les formules de structure dans l'espace*. Bull. Soc. Chim. France, 23:295–301, 1875.

- [186] Kelvin, L. Baltimore Lectures on Molecular Dynamics and the Wave Theory of Light. C. J. Clay & Sons, London, 1904.
- [187] Cahn, R. S., Ingold, S. C. und Prelog, V.: *Specification of molecular chirality*. Angew. Chem., Int. Ed. Engl., 5(4):385–415, 1966.
- [188] Prelog, V. und Helmchen, G.: *Basic Principles of the CIP-System and Proposals for a Revision*. Angewandte Chemie International Edition in English, 21(8):567–583, 1982.
- [189] Fischer, E.: *Ueber die Configuration des Traubenzuckers und seiner Isomeren*. Ber. Dtsch. Chem. Ges., 24(1):1836–1845, 1891.
- [190] Fischer, E.: *Ueber die Configuration des Traubenzuckers und seiner Isomeren. II*. Ber. Dtsch. Chem. Ges., 24(2):2683–2687, 1891.
- [191] Bentley, R.: *The nose as a stereochemist. Enantiomers and odor*. Chem. Rev. (Washington, DC, U. S.), 106(9):4099–4112, 2006.
- [192] Hellwich, K.-H.: *Stereochemie Grundbegriffe*. Springer, Berlin Heidelberg, 2. erweiterte auflage Auflage, 2007, ISBN 978-3-540-71707-2.
- [193] Eriksson, T., Björkman, S., Roth, B. und Höglund, P.: *Intravenous Formulations of the Enantiomers of Thalidomide: Pharmacokinetic and Initial Pharmacodynamic Characterization in Man*. J. Pharm. Pharmacol., 52(7):807–817, 2000.
- [194] Vetter, W. und Bester, K.: *CHAPTER 6 - Gas chromatographic enantioseparation of chiral pollutants—techniques and results; Chiral Analysis*, Seiten 131–213. Elsevier, Amsterdam, 2006, ISBN 978-0-444-51669-5.
- [195] Gil-Av, E., Feibush, B. und Charles-Sigler, R.: *Gas Chromatography 1966*. Institute of Petroleum, London, U.K., 1967.
- [196] Villiers, A.: *Gärung der Stärke durch das Buttersäureferment*. Chem. Centrbl., 62(3-1):830–831, 1891.
- [197] Schardinger, F.: *Über thermophile Bakterien aus verschiedenen Speisen und Milch*. Z. Unters. Nahr.- Genusssm. Gebrauchsgegenstände, 6(19):865–880, 1903.
- [198] Freudenberg, K. und Cramer, F.: *Die Konstitution der Schardinger-Dextrine α , β und γ* . Z. Naturforsch., B: Chem. Sci., 3b:464, 1948.
- [199] Pulley, A. O. und French, D.: *Studies on the Schardinger dextrans. XI. The isolation of new Schardinger dextrans*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 5(1):11–15, 1961.
- [200] Saenger, W.: *Cyclodextrin-Einschlußverbindungen in Forschung und Industrie*. Angew. Chem., 92(5):343–361, 1980.

- [201] Schurig, V. und Nowotny, H. P.: *Gaschromatographische Enantiomerentrennung an Cyclodextrinderivaten*. Angew. Chem., 102:969–986, 1990.
- [202] König, W. A., Lutz, S. und Wenz, G.: *Modifizierte Cyclodextrine - neue, hoehenantio-selektive Trennphasen für die Gaschromatographie*. Angew. Chem., 100(7):989–990, 1988.
- [203] König, W. A. und Hochmuth, D. H.: *Enantioselective Gas Chromatography in Flavor and Fragrance Analysis: Strategies for the Identification of Known and Unknown Plant Volatiles*. J. Chromatogr. Sci., 42(8):423–439, 2004.
- [204] N., N.: *Collection of enantiomer separation factors obtained by capillary gas chromatography on chiral stationary phases*. J. High Resolut. Chromatogr., 16(5):312–323, 1993.
- [205] Maas, B., Dietrich, A. und Mosandl, A.: *Collection of enantiomer separation factors obtained by capillary gas chromatography on chiral stationary phases*. J. High Resolut. Chromatogr., 17(2):109–115, 1994.
- [206] Foth, H.-J.: *Gaskonstante*. RÖMPP Stichwortanzeige online (letzte Aktualisierung: November 2005), Georg Thieme Verlag KG, 2017.
- [207] Schurig, V.: *Peak coalescence phenomena in enantioselective chromatography*. Chirality, 10(1-2):140–146, 1998.
- [208] Frank, H., Nicholson, G. J. und Bayer, E.: *Rapid Gas Chromatographic Separation of Amino Acid Enantiomers with a Novel Chiral Stationary Phase*. J. Chromatogr. Sci., 15(5):174–176, 1977.
- [209] Schurig, V. und Gil-Av, E.: *Complexation of olefins with planar rhodium(I) coordination compounds*. Journal of the Chemical Society D: Chemical Communications, (12):650–651, 1971.
- [210] Kościelski, T., Sybilska, D. und Jurczak, J.: *Separation of α - and β -pinene into enantiomers in gas-liquid chromatography systems via α -cyclodextrin inclusion complexes*. J. Chromatogr. A, 280:131–134, 1983.
- [211] Kollektiv: *Flavours and Fragrances Chemistry, Bioprocessing and Sustainability*. Springer, Berlin Heidelberg, 2007, ISBN 978-3-540-49338-9.
- [212] Bartle, K. D., Woolley, C. L., Markides, K. E., Lee, M. L. und Hansen, R. S.: *Rayleigh instability of stationary phase films in capillary column chromatography*. HRC CC, J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun., 10(3):128–36, 1987.

- [213] Schomburg, G., Husmann, H., Hübinger, E. und König, W. A.: *Multidimensional capillary gas chromatography - enantiomeric separations of selected cuts using a chiral second column*. HRC CC, J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun., 7(7):404–410, 1984.
- [214] Mosandl, A.: *Authenticity Assessment: A Permanent Challenge in Food Flavor and Essential Oil Analysis*. J. Chromatogr. Sci., 42(8):440–449, 2004.
- [215] Shellie, R. und Marriott, P. J.: *Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography with Fast Enantioseparation*. Anal. Chem., 74(20):5426–5430, 2002.
- [216] Shellie, R., Marriott, P. und Cornwell, C.: *Application of comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC × GC) to the enantioselective analysis of essential oils*. J. Sep. Sci., 24(10/11):823–830, 2001.
- [217] Mosandl, A., Hener, U. und Fuchs, S.: *Natürliche Duft- und Aromastoffe - Echtheitsbewertung mittels enantioselektiver Kapillar-GC und/oder Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie*, Band 21 der Reihe *Analytiker Taschenbuch*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2000, ISBN 978-3-642-52376-2.
- [218] Rychlik, M. und Asam, S.: *Stabilisotopenverdünnungsanalysen zur Quantifizierung organischer Spurenkomponenten in der Lebensmittelanalytik*. Umweltwiss. Schadst.-Forsch., 21(5):470–482, 2009.
- [219] Rychlik, M. und Asam, S.: *Stable isotope dilution assays in mycotoxin analysis*. Anal. Bioanal. Chem., 390(2):617–628, 2008.
- [220] Schmarr, H.-G., Ganß, S., Sang, W. und Potouridis, T.: *Analysis of 2-aminoacetophenone in wine using a stable isotope dilution assay and multidimensional gas chromatography-mass spectrometry*. J. Chromatogr. A, 1150(1-2):78–84, 2007.
- [221] Schmarr, H.-G., Sang, W., Ganß, S., Fischer, U., Koepp, B., Schulz, C. und Potouridis, T.: *Analysis of aldehydes via headspace SPME with on-fiber derivatization to their O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)oxime derivatives and comprehensive 2D-GC-MS*. J. Sep. Sci., 31(19):3458–3465, 2008.
- [222] Ganß, S., Kirsch, F., Winterhalter, P., Fischer, U. und Schmarr, H.-G.: *Aroma Changes due to Second Fermentation and Glycosylated Precursors in Chardonnay and Riesling Sparkling Wines*. J. Agric. Food Chem., 59(6):2524–2533, 2011.
- [223] Slabizki, P. und Schmarr, H.-G.: *Analysis of corky off-flavour compounds at ultra trace level with multidimensional gas chromatography-electron capture detection*. J. Chromatogr. A, 1271(1):181–184, 2013.

- [224] Langen, J., Wang, C. Y., Slabizki, P., Wall, K. und Schmarr, H.-G.: *Quantitative analysis of γ - and δ -lactones in wines using gas chromatography with selective tandem mass spectrometric detection*. Rapid Commun. Mass Spectrom., 27:2751–2759, 2013.
- [225] Schmarr, H.-G., Sang, W., Ganß, S., Koschinski, S. und Meusinger, R.: *New insights into the synthesis and characterization of 2-methoxy-3-alkylpyrazines and their deuterated isotopologues*. J. Labelled Compd. Radiopharm., 54(8):438–440, 2011.
- [226] Gracia-Moreno, E.: *PhD Dissertation: Nuevos métodos analíticos para la determinación selectiva de pirazinas, ácidos y otros compuestos de interés aromático presentes en cantidades traza. (Title in English: New analytical methods for the selective determination of pyrazines, acids and other relevant aroma compounds present at trace levels)*. Facultad de Ciencias, Universidad de Zaragoza, 2015.
- [227] Lottspeich und Engels: *Bioanalytik*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 3. Auflage, 2012.
- [228] Schomburg, G. und Henneberg, D.: *Zum Retentionsverhalten isotopenhaltiger Verbindungen, unter Verwendung einer Isotopen-scan-Methode in einer Kombination Kapillargas-Chromatographie-Massenspektrometrie*. Chromatographia, 1(1):23–31, 1968.
- [229] Matucha, M., Jockisch, W., Verner, P. und Anders, G.: *Isotope effect in gas-liquid chromatography of labeled compounds*. J. Chromatogr., 588(1-2):251–258, 1991.
- [230] Schmarr, H.-G., Slabizki, P., Müntnich, S., Metzger, C. und Gracia-Moreno, E.: *Ionic liquids as novel stationary phases in gas liquid chromatography: Inverse or normal isotope effect?* J. Chromatogr. A, 1270(0):310–317, 2012.
- [231] Stauffer, D.: *Kapitel 1. Das Chromatogramm; Chromatogramme richtig integrieren und bewerten: Ein Praxishandbuch für die HPLC und GC*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2008, ISBN 978-3-527-31774-5.
- [232] Seeley, J. V.: *Theoretical study of incomplete sampling of the first dimension in comprehensive two-dimensional chromatography*. J. Chromatogr. A, 962:21–27, 2002.
- [233] Adahchour, M., Beens, J., Vreuls, R. J. J. und Brinkman, U. A. T.: *Recent developments in comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC x GC) I. Introduction and instrumental set-up*. TrAC, Trends Anal. Chem., 25(5):438–454, 2006.
- [234] Kováts, E.: *Gas chromatographic characterization of organic compounds. I. Retention indexes of aliphatic halides, alcohols, aldehydes, and ketones*. Helv. Chim. Acta, 41:1915–1932, 1958.

-
- [235] Van Den Dool, H. und Kratz, P. D.: *A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas–liquid partition chromatography*. J. Chromatogr. A, 11:463–471, 1963.
- [236] Bicchi, C., Binello, A., D’Amato, A. und Rubiolo, P.: *Reliability of van den Dool retention indices in the analysis of essential oils*. J. Chromatogr. Sci., 37(8):288–294, 1999.
- [237] Slabizki, P., Legrum, C., Wegmann-Herr, P., Fischer, C. und Schmarr, H.-G.: *Quantification of cork off-flavor compounds in natural cork stoppers and wine by multidimensional gas chromatography mass spectrometry*. Eur. Food Res. Technol., 242(6):977–986, 2016.
- [238] Sala, C., Busto, O., Guasch, J. und Zamora, F.: *Influence of Vine Training and Sunlight Exposure on the 3-Alkyl-2-methoxypyrazines Content in Musts and Wines from the Vitis vinifera Variety Cabernet Sauvignon*. J. Agric. Food Chem., 52(11):3492–3497, 2004.
- [239] Bundessortenamt: *Neuzulassungen - Beschreibung der Merkmale und Eigenschaften*. Stand 2014.
- [240] Tischelmayer, N.: *Cabernet Blanc*. Glossar Wein-Plus, Stand 2015.

Lebenslauf

Name Charlotte Legrum
Nationalität Deutsch
Geburtsort Marburg an der Lahn

Beruflicher Werdegang

12/2015–heute Technische Sachbearbeiterin, WISAG Gebäudetechnik Süd-West GmbH & Co. KG, Saarbrücken und Kaiserslautern
12/2016–03/2017 Lehrauftrag für Fachsprache Chemie, Verein zur allgemeinen Förderung von Völkerverständigung, Kultur und Bildung an der TU Kaiserslautern e. V., Kaiserslautern
10/2011–04/2015 Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Institut für Weinbau und Oenologie am Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum (DLR) Rheinpfalz, Neustadt (Weinstraße)

Studium

10/2011–06/2019 Promotion „Enantiodifferenzierung von 2-Methoxy-3-sec-butylpyrazin und Quantifizierung weiterer Alkylmethoxypyrazine mittels multidimensionaler gaschromatographischer Methoden“, TU Kaiserslautern/Institut für Weinbau und Oenologie, DLR Rheinpfalz
11/2011–04/2012 Praktisches Jahr, Landesbetrieb Hessisches Landeslabor, Wiesbaden
Abschluss: 2. Staatsexamen der Lebensmittelchemie
04/2011–09/2011 Praktikum, DLR Rheinpfalz, Neustadt (Weinstraße)
10/2006–03/2011 Studium der Lebensmittelchemie, TU Kaiserslautern
Abschluss: Diplom und 1. Staatsexamen
Diplomarbeit: „Methodenentwicklung zur Bestimmung von aromarelevanten Thiolen in Wein mittels gaschromatographischer Analyse und schwefelselektiver Detektion“

Schule und Auslandsaufenthalte

09/2005–07/2006 Au-Pair-Tätigkeit, Lausanne, Schweiz
07/2000–07/2002 Westwood High School, Fort Pierce, Florida, USA
09/1996–06/2005 Gymnasium Philippinum, Marburg an der Lahn

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die in den vergangenen Jahren zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Vielen Dank!

Herrn Prof. Dr. Ulrich Fischer danke ich für die Übernahme des Erstgutachtens, für seine Unterstützung dieses Forschungsvorhabens und für das entgegengebrachte Vertrauen. Außerdem danke ich für die Finanzierung im dritten Jahr.

Bei Frau Prof. Dr. Elke Richling bedanke ich mich herzlich für die Unterstützung des Forschungsvorhabens und die Übernahme des Zweitgutachtens.

Danke auch an Herrn Prof. Dr. Werner R. Thiel für die freundliche Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission.

Ein ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. habil. Hans-Georg Schmarr für seine stetige und intensive Unterstützung und Betreuung von Anfang bis Ende dieser Arbeit und darüber hinaus. Vielen Dank für die wertvollen Denkanstöße, die Vermittlung deines umfangreichen Wissens, dein offenes Ohr bei Fragen oder Problemen, deine Begeisterungsfähigkeit und nicht zuletzt auch deine Freude bei gemeinsamen Erfolgen.

Für die finanzielle Förderung des Projekts in den ersten beiden Jahren danke ich der Graduiertenförderung des Landes Rheinland-Pfalz.

Weiterhin danke ich allen Kollegen, Doktoranden, Diplomanden und Praktikanten in der Abteilung Weinbau und Oenologie am Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum Rheinland-Pfalz für die schöne Zusammenarbeit. Ein großes Dankeschön gilt besonders Petra, meiner engsten Weggefährtin, Kollegin und Freundin in dieser Zeit. Danke für die intensive Zusammenarbeit und deine Bereitschaft, Probleme, Fehler, Ergebnisse und Erfolge, aber auch Dinge darüber hinaus zu besprechen und regelmäßig und vertrauensvoll auszutauschen. Ich danke auch den Kollegen Johannes, Maximilian, Patrick, Doreen, Hai-Linh, Engela, Anna, Michael, Susann, Jutta, Michaela und Claus für die angenehme

Zusammenarbeit, die guten fachlichen Diskussionen, aber auch für die gute Stimmung in Büro und Labor. Dankeschön auch an die für die Weinsensorik verantwortlichen Mitarbeiter für das entgegengebrachte Vertrauen und die freundliche Anleitung zur wissenschaftlichen Weinverkostung. Den ehemaligen Mitarbeitern Dr. Stefan Koschinski und Theodoros Potouridis danke ich für die gute Einarbeitung in die Gerätetechnik und -wartung, Labororganisation und Datenauswertung, die eine wichtige Grundlage für alles Weitere bildet. Danke auch an Dr. Elisa Gracia-Moreno für die hervorragende Einführung in die Methoxy-pyrazin-Analytik zu Beginn meiner Arbeiten. Ein Dankeschön gebührt auch den Kollegen Bernhard Schandelmeier für Marienkäfer-Photographien und Dr. Georg Binder für sein Vertrauen und seine Menschlichkeit. Außerdem danke ich den Praktikanten, Diplomanden und Gastwissenschaftlern für ihr großes Interesse und ihre Aufnahmebereitschaft für Neues, sowie für die geleisteten Zuarbeiten im Laborbetrieb.

Vielen Dank auch all meinen Freunden die mich unterstützt haben, besonders den Mitgliedern der Lateinformation der TU Kaiserslautern, die mich immer wieder auch zum nötigen sportlichen Ausgleich motiviert haben.

Ein großes Dankeschön geht an meine Familie, die mich immer ohne Einschränkung unterstützt hat. Ganz besonders danke ich meinem Vater für die fachlichen Anregungen und Korrekturen und meinem Bruder für die technische Hilfe beim Setzen der Arbeit.

Zum Schluss möchte ich mich bei Oliver bedanken. Du warst immer für mich da und hast mir in jeder Situation zur Seite gestanden. Ohne dich wäre das alles nicht möglich gewesen. Danke!