

# Gaschromatographie Versuch mittels GC-MS

Modulverantwortlicher: Prof. Spittler  
Betreuer: Patrick Swieca  
Arne Helmers  
Lennart Schmiedeken  
Raum: C1120

**Erster Versuchsteil:** Qualitative Analyse von einem Alkan Gemisch C7-C30 in Cyclohexan

**Zweiter Versuchsteil:** Qualitative Aromaanalyse von einer Weinprobe

**Die Weinprobe ist von den Studierenden mitzubringen.**

**(Für eine parallele Auswertung wäre ein Laptop von Vorteil)!!!**

## Lernziele

- Stofftrennung von komplexen Stoffgemischen mittels Gaschromatographie
- Unterschiede zwischen isothermen Messungen und Temperaturgradient-Messungen
- Anwendung und Bedeutung von Kovats-Indices
- Herstellung eines Weinextrakts
- Identifizierung einer Verbindung aus einem unbekanntem, komplexen Stoffgemisch
- Einfluss einer Derivatisierung auf Trennung und Sichtbarkeit
- Spektren-Auswertung und -Interpretation
- Einblick in die Aromavielfalt des Weines

## Versuchsvorbereitung

- Aufbau eines Gaschromatographen
- Säulenmaterialien, Eigenschaften von GC-Säulen und mögliche Trägergase
- Welche Detektoren können mit einem GC gekoppelt werden?
- Wie sind diese Detektoren aufgebaut?
- Was sind Kovats-Indices und wie werden sie berechnet? (Formeln können!)
- Interpretation von Massenspektren
- Siedepunkte von Kohlenwasserstoffen (C7-C30)
- Vorüberlegungen zur Extraktion von der Weinprobe (Vorgehensweise, Lösungsmittel, etc.)
- Welche Verbindungen und Substanzklassen sind in Wein enthalten?
- Mechanismus einer Derivatisierung mittels MSTFA

### Kurze theoretische Einleitung in Weinaromen:

Anwendungsgebiet gaschromatographischer Verfahren sind Aufgabenfelder der quantitativen und qualitativen Analytik sowie der Spurenanalytik. So werden Gaschromatographen, häufig auch gekoppelt mit einem Massenspektrometer, beispielsweise in der Lebensmittelindustrie zur Bestimmung von Inhaltsstoffen, bei Dopingkontrollen zur Untersuchung von Harn- und Blutwerten, sowie zur Duftstoffbestimmung in der Sensorik eingesetzt.<sup>[1]</sup>

Für Letzteres ist die Aromaanalyse von Weinen ein interessantes Beispiel mit breitem Anwendungsbereich in der Qualitätssicherung, Sortenerkennung und -weiterentwicklung sowie Früherkennung von Missernten. Hierbei wird die sensorische Prüfung der Weine bei genormten Prüfbedingungen und durch geschultes Personal mit chemisch maschinellen Analysemethoden kombiniert, um ein möglichst objektives und differenziertes Ergebnis zu erhalten.<sup>[2]</sup>

Quantitativ betrachtet, stellen die Aromastoffe im Wein mit einem Anteil von 0,05% eine untergeordnete Rolle dar – Hauptbestandteile sind Wasser und Alkohol. Doch trotz ihres mengenmäßig geringen Vorkommens sind sie es, die den Charakter einer Rebsorte prägen und die Qualität des Weines wesentlich beeinflussen. Zusammengefasst werden die Weinaromen durch das Charakteristikum ihrer Flüchtigkeit. Demgegenüber existiert in dieser Gruppe eine große strukturelle Vielfalt von mehr als 800 Verbindungen, die sich in die Substanzklassen der Alkohole, Ester, Organischen Säuren, Phenole, Thiole, Monoterpene sowie Norisoprenoide gliedern.<sup>[2,3]</sup>

Da viele der Duftstoffe nur in ihrer Vorstufe als Präkursoren in der Traube enthalten sind, und erst während der einzelnen Bearbeitungsprozesse synthetisiert werden, kann eine Einteilung der Weinaromen anhand ihres zeitlichen Auftretens erfolgen. So unterscheidet man sortentypische Aromastoffe, die in den unverletzten Zellen der Weintrauben enthalten sind von denen, die während den Vorgängen der Vinifikation wie Mahlen, Maischen, Pressen durch chemische, enzymatisch-chemische und thermische Reaktionen entstehen. Ebenso erfolgt die Bildung spezifischer Aromen während der alkoholischen Gärung sowie die Ausbildung eines Alterungsbouquets, welches auf die chemischen Prozesse während der Lagerung zurückzuführen ist.

Zwar enthalten alle Traubensorten ein Kompendium an nahezu identischen Aromastoffen, entscheidend für die Herausbildung eines charakteristischen Aromaprofils der einzelnen Rebsorten sind allerdings die auftretenden Konzentrationsunterschiede. Die Ursachen hierfür liegen zum einen in der genetisch fixierten Art der Genexpression aber auch in äußeren Einflüssen, wie beispielsweise der Bodenbeschaffenheit, dem vorherrschenden Klima sowie der Art der Bewirtschaftung.

Die Konzentration einzelner Duftstoffe im Wein kann zwischen  $10^{-2}$ – $10^{-12}$  g pro Liter betragen – wichtig für aromarelevante Verbindungen ist vielmehr, dass sie im Bereich der sensorischen Wahrnehmungsschwelle liegt.<sup>[4]</sup>

Die größte Substanzklasse aromarelevanter Verbindungen bilden die Organischen Säuren aus; die wohl am häufigsten vorkommende geruchsaktive Säure im Wein ist die Essigsäure. Liegt ihr Gehalt nahe der Geruchsschwelle (300 mg/L), wird der Probe eine gewisse Komplexität zugesprochen. Ist die Konzentration jedoch stark erhöht, so wird ihr essigartiger Geruch als eher störend empfunden. Daneben können auch Ameisensäure, Propansäure oder Butansäure im Wein vorkommen, wobei die beiden ersteren zu einer beißenden bzw. fettartigen Note führen, während der Geruch Letzterer an ranzige Butter erinnert. Ein ziegenartiger Eindruck resultiert aus dem Vorhandensein der Organischen

Säuren C6 – C10. Obwohl Wein-, Äpfel-, und Milchsäure zu den nicht-flüchtigen Säuren gehören, sind sie für ein fruchtiges Aroma von Relevanz, da es während der Weinalterung zu einer langsamen Bildung von Estern kommt.

Obwohl Ethanol einen quantitativ wichtigen Bestandteil von Wein darstellt und zudem eine geruchsaktive Substanz ist, sind es höhere Alkohole, die den Geruchseindruck dominieren. So sind die Verbindungen 1-Propanol, Isobutylalkohol, 2-Methyl-1-butanol und Isoamylalkohol unter dem Begriff Fuselalkohol bekannt.

Eine würzig-harzige Note entsteht durch Hexanol, demgegenüber 2-Phenylethanol einen rosenartigen Duft besitzt. Das Auftreten von 1-Octen-3-ol deutet auf die für den Weinbau bedeutende Edelfäule (*Botrytis cinerea*) hin und besitzt einen signifikant pilzartigen Ton. Der Befall der Traube durch den Pilz führt zu einer Konzentrationserhöhung der Aromastoffe in der Frucht und damit zu einer Steigerung der Qualität.

Aus den Substanzklassen der Aldehyde und Ketone ist Acetaldehyd die am häufigsten detektierbare Verbindung und für einen Sherry- oder Luftton verantwortlich. Die Ursache hierfür ist das Auftreten von Kahlhefen, welche wilden Wein befallen können. Ist eine Luftblase während der Lagerung im Weinfass, so kommt es zur Vermehrung, wobei Alkohol zu Acetaldehyd, Essigsäure und Ethylacetat umgesetzt wird. Furfural und Hydroxymethylfurfural führen dagegen zu einer karamellartigen Note. Diacetyl wird während der Fermentation gebildet und ist für ein leicht buttrig-nussiges Aroma verantwortlich. Bei höheren Konzentrationen oberhalb der Wahrnehmungsgrenze entstehen unangenehme milchsaure Fehlgerüche, welche durch Milchsäurebakterien verursacht werden. Die Lagerung und Reifung in Eichenfässern führt zu einer Anreicherung phenolischer Produkte, wie etwa Vanillin.

Die Anwesenheit von Estern dominiert durch ihre fruchtigen Noten wesentlich das Bouquet eines Weines. Hierzu gehören beispielsweise die Ester höherer Alkohole und kurzkettiger Fettsäuren, wie Ethylacetat, welches für einen ananasartigen Ton verantwortlich ist, Isoamylacetat, der einen bananenartigen Charakter besitzt, oder Benzylacetat, der dem Wein eine apfelartige Note verleiht. Mit zunehmender Kohlenwasserstoffkettenlänge verändern sich die Geruchseindrücke bei den Estern von fruchtig über seifenartig hin zu einem schweineschmalzartigem Aroma bei der Veresterung der Palmitin- und Stearinsäure.

Vor allem in Weißweinsorten wie Muskat oder Gewürztraminer sind bestimmte Monoterpene für ein sortentypisch süßlich-blumiges Bouquet verantwortlich. Hierbei sind die häufigsten Vertreter azyklische Alkohole und Polyole sowie zyklische Ether und Lactone, welche aus Isopren bzw. Isopentyleneinheiten zusammengesetzt sind.

Als „Off-Odor“ bezeichnet man bei der Weinherstellung auftretende Geruchsnoten, welche aufgrund ihres aufdringlichen, unangenehmen Charakters ein unerwünschtes Fehl aroma darstellen. Hierzu zählen unter anderen Schwefelwasserstoff und seine Derivate oder Merkaptane. Ethanliol beispielsweise besitzt ein Aroma, das an verrottete Zwiebel, verbrannter Gummi oder Fäkalien erinnert. Der Korkton in Weinen wird dagegen durch das Kohlenwasserstoffderivat Tetrahydronaphthalen hervorgerufen.<sup>[2,4]</sup>

## Versuchsdurchführung

- 1) Programmieren Sie zunächst die einzelnen Parameter (Starttemperatur, Temperaturänderung, Endtemperatur, Messzeit) des GC und starten Sie die Messungen des bereitgestellten Alkan Gemisches. Das Gemisch soll dreimal mit unterschiedlichen Programmen vermessen werden. Informieren Sie sich über die Parameter.
- 2) Während die ersten Messungen laufen sollen Sie zwei Weinextrakt-Proben anfertigen. Einer dieser beiden Proben wird im Anschluss für die Messung mit MSTFA derivatisiert. Überschichten Sie hierfür zunächst je 5 ml des Weins mit 2 ml Ethylacetat und schütteln Sie diese Mischung für 20 min. Anschließend wird das Zentrifugen-Röhrchen zentrifugiert und die organische Phase in einen Eppendorf Cup überführt und im Luftstrom eingengt. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und in ein Probengefäß überführt. Einer der Proben wird mit der Derivatisierungs-Reagenz MSTFA versetzt. Diese Probe wird bei 60 °C 15 min lang im Trockenschrank gelagert und im Anschluss gemessen.
- 3) Programmieren Sie die Parameter für die Messungen der Weinproben, sowie einer Referenzsubstanz (2-Phenylethanol). Notieren Sie sich die Parameter.
- 4) Machen Sie sich mit den Kovats-Indizes vertraut und berechnen Sie den Kovats-Index von 2-Phenylethanol in der Referenzprobe.
- 5) Bei welcher Retentionszeit ist 2-Phenylethanol in der Referenzprobe festzustellen? Vergleichen Sie diese Ergebnisse mit den Daten aus ihrer Probe. Ist ein Nachweis von 2-Phenylethanol in der Weinprobe möglich? Welche Parameter sind hierbei von Bedeutung?
- 6) Werten Sie das Massenspektrum von 2-Phenylethanol aus. Welche Fragmente sind zu identifizieren und wie lassen sich diese erklären? (auch ins Protokoll beachten)
- 7) Vergleichen Sie die derivatisierte Weinprobe mit der nicht-derivatisierten Weinprobe. Was fällt Ihnen auf? Welche Inhaltsstoffe lassen sich identifizieren. Hinterfragen Sie die Ergebnisse kritisch. (auch im Protokoll beachten)
- 8) Führen Sie ein Datenbankabgleich der Massenspektren der einzelnen Verbindungen aus dem Wein mit der NIST2008 Datenbank durch → Tabellen

→ Durch die Verwendung eines GC-MS-Geräts ausgestattet mit einem Autosampler können die Messungen nebenbei laufen. Zudem können die Messungen bereits während eines Laufes am PC ausgewertet werden.

## Protokoll

- 1) Stellen Sie kurz die wichtigsten Punkte in einer Einleitung dar und beschreiben Sie die generelle Versuchsdurchführung. (Sie dürfen in Versuchsteil eins und zwei unterteilen)
- 2) Erläutern Sie den Aufbau und das Messprinzip einer GC-Anlage
- 3) Stellen Sie ihre Ergebnisse der Messreihen des Alkan Gemischs tabellarisch dar. Jeder Wert soll logisch nachvollziehbar sein. (Beispielrechnung und Formel)
- 4) Berechnen Sie die *Kovats-Indizes* und tragen Sie diese graphisch auf. (*Kovats-Index* vs.  $R_t$  und *Kovats-Index* vs.  $\log(R_t)$ ) Sowohl für die Kohlenwasserstoffe wie auch des Phenylethanol.
- 5) Welche Schlüsse lassen sich aus den Graphiken ziehen? Ist der bestimmte Wert für 2-Phenylethanol plausibel?
- 6) Zeigen Sie die Chromatogramme der Weinanalyse und erläutern Sie diese. Stellen Sie ihre Ergebnisse in Grafiken dar und zeigen Sie den Vergleich der Proben untereinander und mit der Referenzprobe.
- 7) Stellen Sie tabellarisch die Ergebnisse des Datenbankabgleichs dar. Folgende Spalten sollten mindestens vorhanden sein:  $R_t$ , Strukturformel, Name, Stoffklasse, Eigenschaft/Wirkung.

Ihr Protokoll soll die generelle Struktur einer wissenschaftlichen Arbeit aufweisen: Abstract, Einleitung, Ergebnisse und Diskussion, Zusammenfassung, experimenteller Teil, Literatur.

### Literatur:

<sup>[1]</sup> Schomburg, G.: *Gaschromatographie: Grundlagen, Praxis, Kapillartechnik*; **1987**.

<sup>[2]</sup> Rapp, A.: *Aromastoffe des Weines*; *Chemie in unserer Zeit*, 26/2, **1992**, 273-284.

<sup>[3]</sup> Laubenbacher, S.; Hintz, B.; Leitner, E.: *Analytische Methoden zur Bestimmung flüchtiger Verbindungen in Wein*; Tagungsband LMCH-Tage, **2008**, 369-378.

<sup>[4]</sup> Wüst, M.: *Wein-Qualität entscheidet sich in Nanogramm – Zur Biochemie des sortentypischen Weinaromas*; *Chemie in unserer Zeit*, 37/1, **2003**, 8-17.