

Bestimmung von α - und β -Thujon in Spirituosen mittels Festphasenmikroextraktion (HS-SPME) und Vergleich mit konventionellen Extraktionsmethoden

Norbert Schäfer¹, Dirk W. Lachenmeier²

¹Landesuntersuchungsanstalt (LUA) für das Gesundheits- und Veterinärwesen Sachsen, Reichenbachstr. 71-73, 01217 Dresden

²Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt (CVUA) Karlsruhe, Weißenburger Str. 3, 76187 Karlsruhe

Einleitung:

Als Alternative zu konventionellen Probenvorbereitungsmethoden wie Destillation, Flüssig-Flüssig-Extraktion (FFE) oder Festphasenextraktion (SPE) wird in dieser Arbeit eine Festphasenmikroextraktionsmethode (Solid Phase Micro Extraction, SPME) zur Bestimmung von Aromastoffen in Spirituosen vorgestellt.

In Fortführung der Arbeiten von Kröner et al. wurde an der LUA Sachsen im Rahmen einer Praktikumsarbeit eine einfache, routineteugliche Methodenkombination aus Headspace (HS)-SPME und Gaschromatographie (GC) zur Bestimmung von Aromastoffen entwickelt. Als Ziel sollte eine möglichst große Anzahl an Aromastoffen simultan bestimmt werden, insbesondere die in der Aromenverordnung durch Höchstmengen beschränkten Stoffe.

Die Methode wurde für die Aromastoffe α - und β -Thujon, Pulegon, Safröl, Isosafrol und β -Asaron in Spirituosen und weinhaltenen Getränken erfolgreich validiert.

Materialien und Methoden:

HS-SPME

100 μ l der Probe, 1,9 ml SÖRENSEN Phosphatpufferlösung (pH 7) und 10 μ l Dicyclohexylmethanol (ISTD, $c = 20 \mu\text{g/ml}$) wurden in ein 4 ml Screw-Top-Vial pipettiert, in welchem sich ein Magnetrührstab befand. Nach Verschließen des Vials wurde es auf den schon auf Expositionstemperatur von 60°C erwärmten Vial-Puck gestellt und 5 Minuten thermisch equilibriert. Dabei wurde mit einer Geschwindigkeit von 750 U/min gerührt. Die Extraktion erfolgte durch fünfminütiges Exponieren der 100 μm PDMS-Faser im Headspace der Probe. Danach wurden die Analyten umgehend im Injektor des GC-Systems bei 220°C thermisch von der Faser desorbiert (Dauer 10 min).

In gleicher Art und Weise wurde eine Mehrpunktkalibrierung nach der Internen Standardmethode durchgeführt. Die Probenauswertung erfolgte auf der Grundlage dieser Kalibrierung.

Geräte und Hilfsmittel

GC/FID. Zum Einsatz kam ein Agilent 5890 Serie II GC (split/splitless) mit Flammenionisationsdetektor (FID). Die Probenaufgabe erfolgte simultan mittels Graphpack Verteiler auf Säulen unterschiedlicher Polarität: DB WAXetr (60 m; ID 0,32 mm; Filmdicke 0,5 μm) und DB 5 (60 m; ID 0,32 mm; Filmdicke 1,0 μm). Splitless-Injektion (nach 2 min Umschalten auf Split), Injektor-Temperatur: 220°C, Detektor-Temperatur: 250°C, Temperaturprogramm: 60°C (2 min), 7°C/min auf 220°C (15 min), Flow (He): 1,5 ml/min (94 kPa (60°C)).

GC/MS. Verwendet wurde ein GC/MS-System der Fa. Agilent (GC 5890 Serie II mit MSD 5972A Kapillargaschromatograph mit Elektronenionisationsdetektor (EID)). Säule: DB Wax (50 m; ID 0,32 mm; Filmdicke 0,5 μm), Splitless-Injektion (nach 2 min Umschalten auf Split), Injektor-Temperatur: 220°C, Detektor-Temperatur: 280°C, Temperaturprogramm: 60°C (2 min), 7°C/min auf 220°C (8 min), 50°C/min auf 250°C (5 min), Flow (He): 1,5 ml/min (51 kPa (60°C)) mit Pressure pulse: 122 kPa (1 min). Die Quantifizierung erfolgte im SIM-Mode. Für α - und β -Thujon wurde das Target-Ion m/z 81 sowie die Qualifier-Ionen m/z 110 und 95 ausgewählt.

Ergebnisse und Diskussion:

Validierungsergebnisse

Ergebnisse der Methodenoptimierung sind in Abb. 1 dargestellt. Die Quantifizierung erfolgte anhand von Mehrpunktkalibrierung mit Internem Standard (Matrixkalibrierung). Über die gewählten Konzentrationsbereiche (0,24-23,6 mg α -Thujon/l und 0,04-4,2 mg β -Thujon/l) wurde sowohl auf dem FID als auch auf dem MS eine sehr gute Korrelation ($R > 0,99$) gefunden.

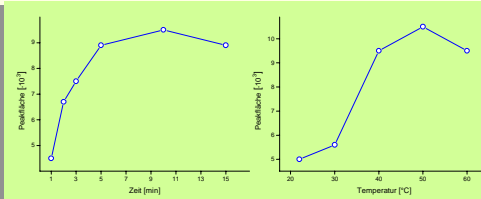


Abb. 1 Einfluss der Expositionszeit (links) und der Expositionstemperatur (rechts) auf die Ausbeute von α -Thujon bei der HS-SPME-Extraktion

Auch die übrigen Analyten zeigen ausreichende Linearität über den Kalibrierbereich (Korrelationskoeffizient $> 0,98$). Lediglich β -Asaron bildete bei der FID-Messung eine Ausnahme. Grund ist die geringe Messempfindlichkeit des β -Asaron. Demgegenüber wurde am MS eine wieder zufriedenstellende Korrelation erzielt.

Die Validierung umfasste die Ermittlung von Nachweis- und Bestimmungsgrenzen (NG/BG) und der Wiederholbarkeit sowie Wiederfindungsraten. Durch Mehrfachanalyse derselben Probe (Absinthe, Liköre), welche zusätzlich „aufgestockt“ wurde, konnte die laborinterne Wiederholbarkeit ermittelt werden. Exemplarisch sind in den Tab. 1 Validierungsergebnisse für einen Absinth aufgelistet. Die restlichen Analyten besaßen ähnliche Präzisionen (Variationskoeffizient: 1,5 bis 9,0%).

Tab. 1 Validierungsergebnisse für Absinth mit GC/FID und GC/MS (n=10)

Analyt	Mittelwert x (mg/l)	Standardabweichung	Variationskoeffizient	Vertrauensbereich Δx	Wiederholbarkeit r
GC/FID	α -Thujon	5,19	0,29	5,74	0,21
	β -Thujon	1,27	0,12	9,91	0,06
GC/MS	α -Thujon	5,25	0,29	5,55	0,21
	β -Thujon	1,24	0,06	5,27	0,03

Wiederfindungsmessungen erfolgten an mehreren Spirituosen (Absinthe, Liköre, Bittere) mit unterschiedlichen Dotierungskonzentrationen. Sowohl bei der Messung mittels GC/FID als auch bei der Messung mittels GC/MS wurden Wiederfindungsraten von 80-120% aller Analyten vorgefunden. Speziell für α - und β -Thujon lagen die Wiederfindungsraten bei 95-107%. Damit wird die sehr gute Extraktionsausbeute deutlich.

Die Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen erfolgte für die GC/MS-Messung nach DIN 32645. Damit wurde für α -Thujon eine NG von 6 $\mu\text{g/l}$ und eine BG von 21 $\mu\text{g/l}$ und für β -Thujon eine NG von 5 $\mu\text{g/l}$ und eine BG von 19 $\mu\text{g/l}$ ermittelt. Dies entspricht etwa einem Signal/Rauschverhältnis (s/r) von 4 für die NG und ein s/r von 10 für die BG.

Am GC/FID erfolgte eine vereinfachte Abschätzung über das Signal/ Rauschverhältnis. Hierbei wurden NG (4·s/r) von 0,1 mg α -Thujon/l und 0,05 mg β -Thujon/l bzw. BG (10·s/r) von 0,3 mg α -Thujon/l und 0,1 mg β -Thujon/l ermittelt. Die Empfindlichkeit der Methode übertrifft damit deutlich die Anforderungen für die Kontrolle der Höchstmengen beider Stoffe gemäß Aromenverordnung.

Vergleich mit konventionellen Extraktionsmethoden

Nach erfolgreicher Erstellung und Validierung der Methode wurden verschiedene Spirituosen mittels HS-SPME untersucht und vergleichende Untersuchungen mit herkömmlichen Methoden (SPE, FFE, Destillative Methode) durchgeführt. So wurden 19 Proben (Absinthe) aus dem Untersuchungsgut des CVUA Karlsruhe für vergleichende Messungen herangezogen.

Die Proben mittels SPE, mittels FFE sowie dem hier vorgestellten HS-SPME-Verfahren analysiert.

Es bleibt festzustellen, dass zwischen den verwendeten Aufarbeitungsmethoden (FFE/SPE/SPME) eine hochsignifikante lineare Korrelation mit Korrelationskoeffizienten von mehr als 0,989 erzielt werden konnte (Tab. 2). Hervorragende Übereinstimmung lieferten auch die mittels GC/FID bzw. GC/MS ermittelten Daten der SPME bei den Einzelkomponenten α - und β -Thujon.

Tab. 2 Lineare Korrelation der Analyseergebnisse verschiedener Methodenkombinationen zur Bestimmung von Thujon in Spirituosen (* $P \leq 0,0001$)

Methodenkombination	R
FFE-MS/SPME-MS	0,994*
FFE-MS/SPME-MS	0,999*
FFE-MS/SPME-FID	0,998*
SPE-MS/SPME-FID	0,989*
SPME-MS/SPME-FID	0,997*
SPME-MS/SPME-FID	0,993*
Destillation-FID/SPME-MS	0,999*

Außerdem wurden vergleichende Untersuchungen zwischen dem einfachen destillativen Verfahren (validierte Standardmethode der LUA Sachsen) und der SPME angestellt. Dazu wurden Spirituosen aus dem Untersuchungsgut der LUA Sachsen parallel vermessen. Auch hier wurde eine hohe Übereinstimmung der ermittelten Gehalte nach beiden Verfahren festgestellt ($R=0,999$). Darüber hinaus hat sich die HS-SPME-Methode bei einer Laborvergleichsuntersuchung der "Arbeitsgruppe Spirituosen" der Lebensmittelchemischen Gesellschaft bewährt und lieferte vergleichbare Ergebnisse.

Zusammenfassung:

Die SPME-Methodik stellt eine sinnvolle Alternative zu klassischen Aufbereitungsverfahren dar. Ihre Vorzüge - einfach und schnell, billig und lösungsmittelfrei - lassen einen breiten Anwendungsrahmen zu. Mittels der vorgestellten Methode lassen sich die Aromastoffe α -Thujon, β -Thujon, Pulegon, Safröl, Isosafrol und mit MS-Detektion auch β -Asaron in Spirituosen und weinhaltenen Getränken sicher bestimmen. Die Untersuchungen zeigten, dass präzise und reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden können. Anhand authentischer Spirituosen wurden vergleichende Messungen mit herkömmlichen Untersuchungsverfahren (FFE, SPE, Destillative Abtrennung) durchgeführt, welche die Eignung der SPME-Methode dokumentieren. Beide von uns verwendete Messsysteme (GC/FID und GC/MS) können zur Bestimmung der Analyten herangezogen werden. Eine Anwendung der Methode auf andere Stoffsysteme scheint ebenso wie eine weitere Steigerung der Präzision durch Automatisierung nahe liegend und möglich.

Literatur:

- Kröner L.U., Padosch S.A., Brückner M.S., Lachenmeier D.W., Mußhoff F., Madea B., Lebensmittelchem. 57, 78 (2003).
 Kröner L.U., Padosch S.A., Lachenmeier D.W., Madea B., Blutalkohol 42, 263-271 (2005).
 Lachenmeier D.W., Frank W., Athanasakis C., Padosch S.A., Madea B., Rothschild M.A., Kröner L.U., Dtsch. Lebensm.-Rundsch. 100, 117-129 (2004).
 Lachenmeier D.W., Emmert J., Sartor G., Dtsch. Lebensm.-Rundsch. 101, 100-104 (2005).
 Lachenmeier D.W., Emmert J., Kuballa T., Sartor G., Forensic Sci. Int. 158, 1-8 (2006).
 Schäfer N., Lachenmeier D.W., Dtsch. Lebensm.-Rundsch. 101, 534-539 (2005).

