

# Bestimmung von Begleitstoffen alkoholischer Getränke mittels Headspace-Trap Technik

Katja Schulz, Jan Dreßler, Eva-Maria Sohnius, Dirk W. Lachenmeier

## Abstract

The use of headspace adsorbent traps in combination with gas chromatography was evaluated for the determination of volatile constituents (e.g. higher alcohols and other congeners of alcoholic fermentation) in spirits. The headspace trap technology comprises of an enhanced static headspace system that allows enrichment and focusing of analytes on adsorbent traps prior to gas chromatographic separation. In contrast to SPME and SPDE that apply small fibres or coated capillaries with sorbent volumina of 0.94 mm<sup>3</sup> or 5.99 mm<sup>3</sup>, respectively, the headspace traps used in this study are tubes packed with a solid sorbent with a significantly greater volume of 160 mm<sup>3</sup>. In the first step, the traps are loaded by pressurizing the sample vials and allowing the pressure to decay through the cooled adsorbent trap. Then, they are dried by passing carrier gas through the trap to remove moisture from the sample. Finally, the analytes are thermally desorbed and transported by the carrier gas into the GC column for separation. The headspace analysis was performed with the PerkinElmer TurboMatrix HS-110 trap automatic headspace sampler with trap enrichment and flame ionization detector (PerkinElmer, Shelton, USA). A capillary column Rtx 1701 (60 m x 0.530 mm I.D.; 1.5 µm film thickness) with a phenylcyanopropyl phase from Restek was used. It was determined that the air toxic phase material, which is also the standard material provided by the manufacturer, was best suited for the analytes under investigation.

In comparison to static headspace sampling, 35-55 times higher peak areas were achieved. For the purpose of spirit analysis, using this one cycle provided adequate sensitivity. If a higher sensitivity is required, e.g. in the case of blood analysis of drinkers of alcoholic beverages to substantiate claims of drinking, up to four trap enrichment cycles (so-called pulsed headspace extraction and trap) can be used to achieve even lower detection limits.

An excellent agreement of analysis results in comparison to the European reference procedure was found ( $R > 0.98$ ,  $p < 0.0001$ ). The fully automated headspace trap procedure requires only minimal sample preparation and is easy to apply.

## 1. Einleitung

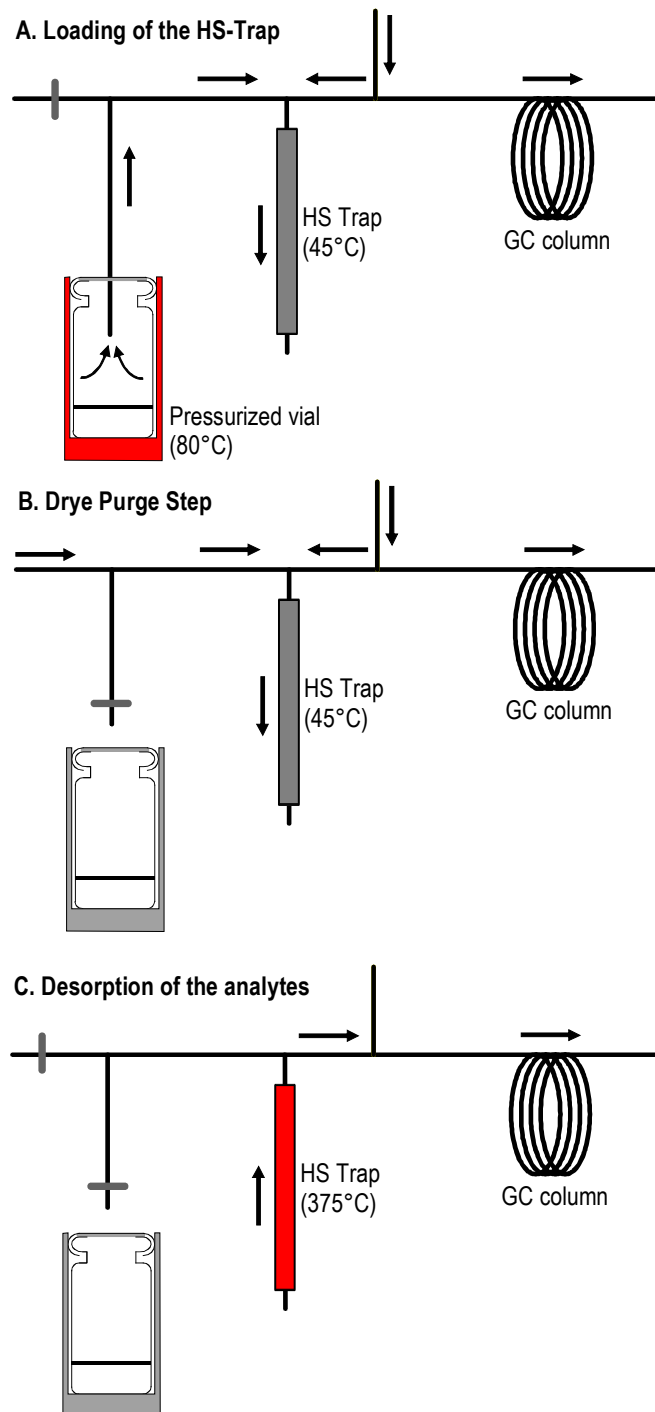
Zur Analyse von flüchtigen Substanzen in alkoholischen Getränken wird von der EU eine Europäische Referenzmethode vorgeschrieben [1]. Diese beinhaltet, die Getränke direkt in den Gaschromatographen zu injizieren. Die Referenzmethode ist ungeeignet bei Getränken mit hohem Trockenextrakt (Polyphenolgehalt in gelagerten Getränken z. B. Whisky, Sherry), bei Getränken mit hohem Zuckergehalt (z. B. Liköre) sowie kritisch bei Getränken mit hohem Volumina Wasser (Getränke mit geringen Ethanolgehalten). Die Lösung bestand bisher darin, die Getränke vor der Injektion in den GC zu destillieren. Diese

aufwändige Probenvorbereitung sollte durch eine einfache und schnelle Probenvorbereitung ersetzt werden.

Innerhalb der letzten Jahre wurden verschiedene Headspace-Extraktions- und -Anreicherungstechniken, wie z. B. die Festphasenmikroextraktion (solid phase micro extraction, SPME), die dynamische Festphasenextraktion (solid phase dynamic extraction, SPDE) und die Extraktion mit „Twister“ (stir bar sorptive extraction, SBSE) für die effiziente Analyse u.a. von alkoholischen Getränken entwickelt [2-6]. Im Gegensatz zur Destillation sind diese modernen Extraktionstechniken voll automatisierbar und deshalb schneller und effizienter.

In dieser Studie wurde die Headspace-Trap-Technik [7-11] zur Untersuchung alkoholischer Getränke verwendet. Das Prinzip der Methode ist in Abb.1 dargestellt.

Abb. 1: Prinzip der Probenvorbereitung mit Headspace-Trap; A: Beladung der Trap durch Entspannen des Überdruckes aus dem Probenvial; B: Trocknen der Trap mit Trägergas; C: Thermodesorption der Analyten von der Trap und Injektion in den GC.



## 2. Material und Methoden

Insgesamt wurden 30 Getränkeproben (11 deutsche Obstbrände und 19 mexikanische Tequilas) mittels Referenzmethode und mittels Headspace-Trap-Technik untersucht.

Bei der Referenzmethode wurde das Getränk mit innerem Standard (*n*-Amylalkohol) versehen und direkt in den Gaschromatographen injiziert. Im Injektor wurde die Probe auf zwei Trennsäulen gesplittet und anschließend parallel am FID detektiert. Als Trennsäulen wurden verwendet: CP-WAX 52CB (60 m x 0,32 mm x 0,5 µm) und CP-SIL 5CB (60 m x 0,32 mm x 5 µm). Die Trennung erfolgte mittels folgendem Ofenprogramm: 40 °C, 15 Minuten halten, 4 °C/min auf 200 °C, 10 Minuten halten und 15 °C/min bis 230 °C, 10 Minuten halten.

Die Messung der Getränke erfolgte für die im Rahmen der Begleitstoffanalytik untersuchten Substanzen mittels traditioneller statischer Headspace-Technik und für die schwerer flüchtigen Analyten (1-Hexanol, Ethyllactat, Benzaldehyd und Ethyloctanoat) mittels Headspace-Trap-Technik.

Bei der Headspace-Trap-Methode wurden 200 µl des 1:20 verdünnten Getränkes, 200 µl innerer Standard (*tert*-Butanol 1 mg/l) und 0,4 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (wasserfrei) in ein 20 ml Headspacevial gegeben. Als Trennsäule wurde eine mittelpolare Säule der Firma Restek, Rtx 1701 (60 m x 0,53 mm x 1,5 µm), verwendet. Die Gerätebedingungen des PerkinElmer TurboMatrix HS-110 trap sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Die Methodenvalidierung wurde mit beiden Headspace-Techniken durchgeführt. Eine ausführlichere Beschreibung der Methode ist in der Literatur [12] verfügbar.

Tab.1: Gerätebedingungen statische Headspace-Trap-Technik

Parameter	Wert	Parameter	Wert
Ofentemperatur	70 °C*/80 °C	Druckaufbauzeit	3,0 min
Nadel-Temperatur	90 °C	Dosierzeit (Abklingzeit)*	1,2 min
Transferline-Temperatur	95 °C	Trapzyklen*	1
Trap-low-Temperatur*	45 °C	Split*	ohne
Trap-high-Temperatur*	375 °C	Säulendruck	90 kPa
Dry-purge-Zeit*	7,5 min	Vial-Druck	180 kPa
Trap-hold-Zeit*	10 min	Desorptionsdruck*	100 kPa
Desorptionszeit*	10 min	Trapmaterial*	Air toxic
Thermostatisierzeit	20 min		

\* Parameter ausschließlich Headspace-Trap-Technik

### 3. Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse der Methodvalidierung wurden entsprechend DIN 32645 ermittelt und sind in Tabelle 2 dargestellt. Mittels Trap-Anreicherung konnten deutlich bessere statistische Daten ermittelt werden. Mit dieser Technik wurden 30 – 55fach größere Peakflächen ermittelt. Ein Vergleich beider Chromatogramme eines wässrigen Standardgemisches ist aus Abbildung 2 ersichtlich.

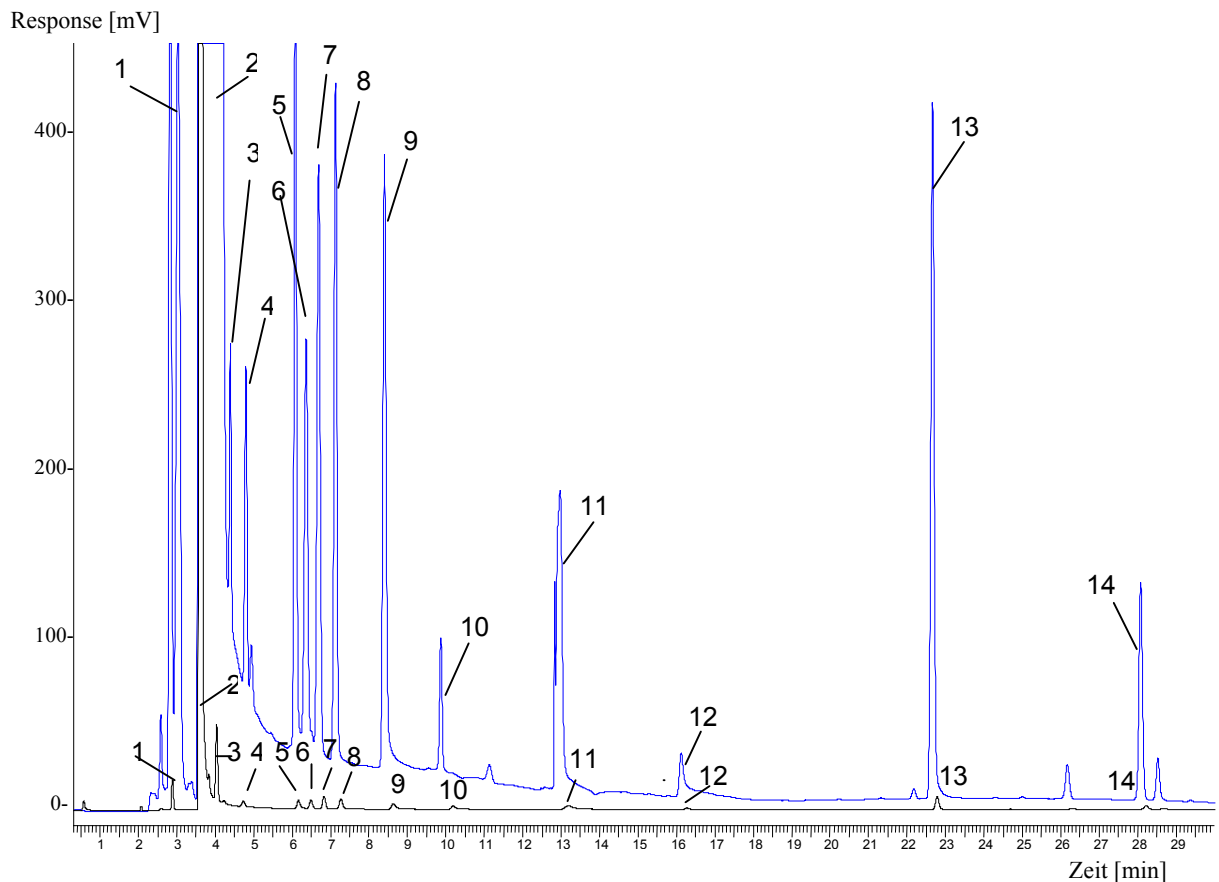


Abb. 2. Vergleich zweier Chromatogramme eines Standardgemisches mittels statischer Headspace (unteres Chromatogramm) und Headspace-Trap (oberes Chromatogramm). (1 = Methanol, 2 = Ethanol, 3 = Aceton, 4 = innerer Standard *tert*-butanol, 5 = 1-Propanol, 6 = Ethylacetat, 7 = 2-Butanon, 8 = 2-Butanol, 9 = Isobutanol, 10 = 1-Butanol, 11 = 2- und 3-Methyl-1-butanol, 12 = Ethyllactat, 13 = Benzaldehyd, 14 = Ethyloctanoat)

Für Getränkeanalysen ist eine Anreicherung mit einem Trapzyklus ausreichend. Diese ist wiederum nur für in niedrigen Konzentrationen im Getränk enthaltenen Analyten, wie z. B. für Ethyllactat, 1-Hexanol, Benzaldehyd und Ethyloctanoat, erforderlich. Die Begleitstoffe Methanol, 1-Propanol, 2-Butanol, Isobutanol, 1-Butanol und die Methylbutanole können zur Analyse von alkoholi-

schen Getränken mittels traditioneller statischer Headspace-Gaschromatographie analysiert werden. Soll eine höhere Empfindlichkeit erzielt werden - z. B. bei Begleitstoffanalysen aus Blutproben - könnte ein viermaliges Anreichern auf der Trap erforderlich werden.

Tab.2: Ergebnisse Methodenvalidierung statische Headspace

	STATIC HEADSPACE					
	Linear range	R <sup>2</sup>	LOD <sup>a</sup>	LOQ <sup>a</sup>	Precision <sup>b</sup>	Precision <sup>b</sup>
	[µg/l]		[µg/l]	[µg/l]	Intraday [%]	interday [%]
Methanol	100 – 16 000	0,999	<b>574</b>	860	2.3	4.7
1-Propanol	30 – 10 000	0,999	<b>66.0</b>	98.0	2.0	3.1
2-Butanol	30 – 10 000	0,999	<b>114</b>	170	2.4	4.8
Isobutanol	30 – 10 000	0,999	<b>88.0</b>	132	4.6	3.2
1-Butanol	30 – 10 000	0,999	<b>129</b>	193	2.7	3.1
2-/3-Methyl-1-butanol	100 – 20 000	0,999	<b>161</b>	240	3.6	4.2
Ethyl acetate	150 – 10 000	0,999	<b>202</b>	302	3.3	5.6
Ethyl lactate	300 – 25 000	0,999	<b>645</b>	964	7.6	8.1
1-Hexanol	150 – 10 000	0,999	<b>350</b>	524	7.0	12.6
Benzaldehyde	100 – 10 000	0,999	<b>411</b>	615	4.3	5.9
Ethyl octanoate	600 – 10 000	0,997	<b>1761</b>	2617	2.0	4.7

Die Ergebnisse der Methodenvalidierung mittels statischer Headspace und Headspace-Trap sind in Tabelle 2 und Tabelle 3 ersichtlich.

Ein großer Vorteil dieser Methode gegenüber der SPME besteht darin, dass das Headspace-System mit und ohne Trap-Anreicherung benutzt werden kann, was zu einem großen linearen Arbeitsbereich führt.

Zur Prüfung der Praxistauglichkeit der Methode wurden 30 authentische Proben alkoholischer Getränke mit der neuen Headspace-Trap-Methode analysiert und mit den Ergebnissen der europäischen Referenzmethode verglichen. Die Korrelation beider Methoden ergab exzellente Übereinstimmungen ( $p < 0.0001$  für alle Analyten) mit Korrelationskoeffizienten größer als 0,98 (Tabelle 4). Nur 1-Hexanol zeigte eine geringere Korrelation, da mittels Headspace-Trap geringere Konzentrationen als mit der Referenzmethode quantifiziert werden konnten, bei der der Analyt in den meisten Fällen unterhalb der Bestimmungsgrenze lag. Für Ethyloctanoat wurden keine Korrelationskoeffizienten ermittelt, da dieser Analyt in den meisten Proben mit beiden Methoden nicht nachweisbar war.

Tab.3: Ergebnisse Methodvalidierung Headspace-Trap

	HEADSPACE TRAP					
	Linear range [µg/l]	R <sup>2</sup>	LOD <sup>a</sup> [µg/l]	LOQ <sup>a</sup> [µg/l]	Precision <sup>b</sup> Intraday [%]	Precision <sup>b</sup> interday [%]
Methanol	30 – 16 000	0,999	<b>110</b>	165	4.4	7.1
1-Propanol	10 – 4 000	0,998	<b>20.0</b>	30.0	2.0	3.3
2-Butanol	4 – 4 000	0,999	<b>8.0</b>	11.0	1.7	2.4
Isobutanol	4 – 4 000	0,999	<b>7.0</b>	11.0	4.9	5.0
1-Butanol	10 – 4 000	0,999	<b>22.0</b>	33.0	1.9	2.8
2-/3-Methyl-1-butanol	10 – 8 000	0,999	<b>28.0</b>	41.0	4.1	4.9
Ethyl acetate	10 – 10 000	0,999	<b>32.0</b>	48.0	3.6	5.2
Ethyl lactate	20 – 25 000	0,999	<b>149</b>	223	7.9	8.4
1-Hexanol	75 – 10 000	0,990	<b>1072</b>	1601	9.0	12.9
Benzaldehyde	150 – 10 000	0,999	<b>256</b>	383	2.2	4.9
Ethyl octanoate	150 – 10 000	0,997	<b>1119</b>	1672	3.6	5.7

Der Hauptvorteil der Headspace-Trap zur Analyse von alkoholischen Getränken liegt darin, Analyten wie Ethyllactat, 1-Hexanol, Benzaldehyd und Ethyloctanoat in sehr geringen Konzentrationen nachzuweisen bzw. die herkömmlichen Begleitstoffe in Produkten nachzuweisen, in denen diese nur in sehr geringen Konzentrationen enthalten sind (z. B. Wodka).

Tab.4: Vergleich Ergebnisse Headspacemethode mit Referenzmethode

Analyt	R (n=30)
Methanol	0,996
1-Propanol	0,999
1-Butanol	0,981
2-Butanol	0,999
Isobutanol	0,994
2-/3-Methyl-1-butanol	0,990
Ethylacetat	0,979
1-Hexanol*	0,888
Ethyllactat*	0,988
Benzaldehyd*	0,983

\* Substanzen mit Trap-Anreicherung bestimmt

#### 4. Schlussfolgerungen

Die Headspace-Trap-Technik wertet die statische Headspace effizient auf, weil sie leicht anzuwenden und gut automatisierbar ist. Die Auswahl des Trap-Adsorbensmaterials erlaubt eine optimale Anreicherung bestimmter Substanzen oder Substanzklassen. Mit Trap-Anreicherung können signifikant größere Extraktionsausbeuten erzielt werden. Die Untersuchungsergebnisse zeigen, dass die Headspace-Trap-Technik sehr erfolgreich zur Analyse von flüchtigen Substanzen alkoholischer Getränke eingesetzt werden kann.

#### 5. Literatur

- [1] European Commission (2000) Off. J. Europ. Comm. L333: 20
- [2] Nonato EA, Carazza F, Silva FC, Carvalho CR (2001) J Agric. Food Chem. 49: 3533
- [3] Lachenmeier DW, Nerlich U, Kuballa T (2006) J Chromatogr. A 1108: 116
- [4] Lachenmeier K, Mußhoff F, Madea B, Sohnius EM, Frank W, Lachenmeier DW (2005) Deut. Lebensm-Rundsch. 101: 187
- [5] Schäfer N, Lachenmeier DW (2005) Deut. Lebensm-Rundsch. 101: 534
- [6] Jochmann MA, Kmiecik MP, Schmidt TC (2006) J Chromatogr. A: 1115 208
- [7] Tipler A, Mazza C (2006) US Patent Application No. US2006/0099718 A1
  
- [8] Griffith H, Marotta L, Tipler A, Grossner Z (2004) Symposium on air quality measurement methods and technology. Proceedings. Air & Waste Management Association, Pittsburgh, PA, USA, 2004, p. 267
- [9] Grecsek H (2005) LCGC Suppl. 47
- [10] Grecsek H (2005) LCGC Suppl. 45
- [11] Helms H, Felix U (2004) LaborPraxis 28: 46
- [12] Schulz K, Dreßler J, Sohnius EM, Lachenmeier DW (2007) J Chromatogr. A: 1145 204

Dr. rer. nat. Katja Schulz  
Prof. Dr. med. Jan Dreßler  
Institut für Rechtsmedizin  
der TU Dresden  
Fetscherstr. 74  
D-01307 Dresden  
E-Mail: katja.schulz@tu-dresden.de

Dr. rer. nat. Dirk W. Lachenmeier  
Eva-Maria Sohnius  
Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt  
(CVUA) Karlsruhe  
Weißburger Str. 3  
D- 76187 Karlsruhe  
E-Mail: Lachenmeier@web.de