

Synthese und Charakterisierung ausgewählter isotopenmarkierter Verbindungen (Standards) in der SPME-Analytik von off-flavour Verbindungen

Teil 1: Ethylphenole

Walter Brandes und Sezer Sari

Höhere Bundeslehranstalt und Bundesamt für Wein- und Obstbau
A-3400 Klosterneuburg, Wiener Straße 74
E-Mail: Walter.Brandes@weinobst.at

Zur Reduktion von in der SPME-Analytik häufig auftretenden Matrixeffekten ist die Verwendung von isotopenmarkierten Verbindungen als interner Standard in Verbindung mit einer massenspektrometrischen Detektion häufig unverzichtbar. Die kommerziell verfügbare Anzahl solcher Substanzen ist im Vergleich zu der großen Zahl an analytisch relevanten Verbindungen allerdings gering. In einigen Fällen kann diese Lücke durch die Eigensynthese der benötigten Substanzen verkleinert oder sogar geschlossen werden. Im ersten Teil dieser Arbeit wurden zur Verbesserung der SPME-Analytik des Weinfehlers „Brettanomyceston“ die dafür benötigten Substanzen 4-Ethylphenol, 4-Ethylguajacol und 4-Ethylcatechol in teilweise deuterierter Form hergestellt und gereinigt. Die Verwendung dieser Verbindungen als interne Standards in einer von uns entwickelten SPME-Methode erbrachte gute Reproduzierbarkeiten, hohe Empfindlichkeiten und keinen Hinweis auf einen signifikanten Matrixeffekt.

Schlagwörter: Brettanomyces, Synthese deuterierter Standards, Clemmensen Reduktion

In order to reduce matrix effects that frequently occur in SPME analysis, the use of isotope-labeled compounds as an internal standard in conjunction with mass spectrometric detection is often indispensable. However, the commercially available number of such substances is small compared to the large number of analytically relevant compounds. In some cases, this gap can be reduced or even closed by in-house-synthesis of the required substances.

In the first part of this work, the substances 4-ethylphenol, 4-ethylguaiacol and 4-ethylcatechol required for the improvement of the SPME analysis of Brettanomyces off-flavor were prepared and purified in a partially deuterated form. The use of these compounds as internal standards in an SPME method developed by us resulted in good reproducibility, high sensitivity and no evidence of a significant matrix effect.

Keywords: Brettanomyces, synthesis of deuterated compounds, Clemmensen Reduction

Einleitung

Die Festphasen Mikroextraktion (SPME) hat sich seit ihrer Erfindung und kommerzieller Verfügbarkeit auf Grund zahlreicher Vorteile als eines der vielseitigsten Anreicherungs- und Selektionsverfahren in der gaschromatographischen Analytik etabliert. Vor allem sind hier hohe Anreicherungen, geringe Probenvolumen und große Variabilität durch den Einsatz verschiedener Faserbeschichtungen und Applikationstechniken zu nennen. Auch das dafür benötigte Probenaufgabesystem ist im Vergleich zu anderen Anreicherungsverfahren sowohl in der Anschaffung als auch im Betrieb relativ kostengünstig. Diesen zahlreichen Vorteilen steht als gravierender Nachteil der ausgeprägte Matrixeffekt der meisten SPME-Applikationen gegenüber. Bedingt durch das sehr ungünstige Phasenverhältnis zwischen Probenvolumen und Volumen des auf die Extraktionsphase aufgebrauchten Extraktionsmaterials treten bei unterschiedlichen Proben teilweise so hohe Schwankungen der Messergebnisse auf, dass die Verfahren für die quantitative Analytik häufig nur mit Einschränkungen brauchbar sind. Selbst die Verwendung von strukturell sehr ähnlichen Verbindungen als interne Standards lösen dieses Problem meist nur unbefriedigend. Standardadditionen umgehen zwar diese Schwierigkeit, erfordern aber einen erheblichen Mehraufwand.

Die einzig befriedigende Lösung besteht in der Verwendung von isotoopenmarkierten Analyten als interner Standard in Verbindung mit einer massenspektrometrischen Detektion. Aus Kostengründen und wegen besserer Verfügbarkeit spielen hier voll- oder teildeuterierte Verbindungen die größte Rolle. Trotz des jährlich steigenden Angebotes an kommerziell erhältlichen deuterierten Substanzen ist ihre Zahl, gemessen an jener der für die Analytik benötigten Verbindungen, noch immer sehr gering.

In einigen Fällen kann das käufliche Angebot durch die gezielte Eigensynthese ergänzt werden. Die Planung dieser Synthesen muss neben der Verfügbarkeit entsprechender Ausgangsprodukte dabei noch folgenden Überlegungen Rechnung tragen:

1. Der Massenshift der detektierten Ionen bei deuterierter und nicht deuterierter

Substanz muss auf Grund des in jeder organischen Verbindung vorhandenen C-13 Anteils mindestens 2 betragen. Da bei üblichen massenspektrometrischen Detektionsverfahren neben dem Target-Ion mindestens ein Qualifier-Ion zur Absicherung der Richtigkeit verlangt wird, betrifft diese Anforderung zumindest 2 Ionen.

2. Das Target-Ion sollte für die Erreichung großer Empfindlichkeiten der Methodik eine hohe Intensität aufweisen.
3. Die Deuterierung muss bei den angewandten Probenaufarbeitungs- und Messbedingungen hinreichend stabil sein.

Obwohl für die Verwendung als interner Standard meist sehr kleine Substanzmengen notwendig sind, ist die Verwendung größerer Mengen an Ausgangsverbindungen aus den folgenden Gründen häufig notwendig:

1. Die entsprechenden Reaktionsgefäße gewährleisten nur bei gewissen Mindestmengen definierte und kontrollierbare Synthesebedingungen.
2. Die Ausbeuten einzelner Reaktionen sind teilweise sehr gering.
3. Viele Aufreinigungsmethoden wie etwa Destillation oder Kristallisation sind nur bei gewissen Mindestmengen an Substanz möglich.

Aus den oben genannten Gründen sollten die für die vollständige Synthese benötigten Chemikalien relativ kostengünstig erhältlich sein.

Ziel dieser Arbeit war eine Verbesserung der Messmethodik für die SPME-Analytik des Weinfehlers *Brettanomyces*-Ton (auch „Pferdeschweißton“ genannt) durch die Synthese der nicht oder nur schwer kommerziell erhältlichen Verbindungen 4-Ethylphenol (4-EP), 4-Ethylguajacol (4-EG) und 4-Ethylcatechol (4-EC) in voll- oder teildeuterierter Form. 4-Ethylguajacol wird mittlerweile von einigen Anbietern wie US Biological Life Science Shop, Toronto Research Chemicals und Clear Synth verkauft, wobei nur die Produkte der ersten beiden Unternehmen die Deuterierung in der Ethylgruppe besitzen. Für 4-Ethylphenol und 4-Ethylcatechol in deuterierter Form konnte von den Autoren keine Bezugsquelle gefunden werden, jedoch wurde ein 4-Ethylphenol-d4 von Pollnitz et al. als interner Standard für die Bestimmung von 4-Ethylphenol und 4-

Ethylguajacol in Wein hergestellt und angewendet.

Diese drei Verbindungen stellen in nicht deutlicher Form die Leitsubstanzen des als Brettanomyceston (auch „Pferdeschweißton“) bezeichneten Weinfehlers dar. Ihre Bildung erfolgt in zwei Stufen aus den Precursoren p-Hydroxycumarsäure, Ferulasäure und Kaffeesäure. In der ersten Stufe werden diese Verbindungen zu den entsprechenden Vinylphenolen decarboxyliert. Zu diesem Schritt sind eine Reihe von Hefen und Milchsäurebakterien befähigt (Dugelay et al. 1993, Shinohara et al. 2000, Couto et al. 2006). Die zweite Stufe, die Hydrierung der Vinylphenole zu den entsprechenden Ethylphenolen, wird dagegen fast ausschließlich von Hefen der Gattung Brettanomyces durchgeführt (Chatonnet et al. 1992, Chatonnet et al. 1995, Suarez et al. 2007, Milheiro et al. 2019). Die in Wein gefundenen Konzentrationen reichen von wenigen µg/l bis über 1 mg/l. Der Schwellenwert für die Klassifikation als fehlerhaft ist von dem betreffenden Wein abhängig und wird für 4-Ethylphenol mit 230-450 µg/l, für 4-Ethylguajacol mit 33-135 µg/l und für 4-EC mit 60-775 µg/l angegeben (Lattey et al. 2010, Francis et al. 2005, Nikfardjam et al. 2009, Petrozziello et al. 2014; Wedral et al. 2010). Alle drei Substanzen können nach vorheriger Acylierung mittels SPME-Analytik mit hoher Empfindlichkeit detektiert werden (Carillo et al. 2007). 4-EP und 4-EG sind auch ohne Derivatisierung der SPME-Analytik zugänglich (Matorell et al. 2002, Pizarro et al. 2007).

Material und Methoden

Chemikalien und Reagenzien

4-Hydroxyacetophenon 99 % (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
 4-Hydroxy-3-methoxyacetophenon 98 % (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
 Deuteriumoxid 99,9 Atom % (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
 Deuteriumchlorid 35 % in D₂O 99 Atom % (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
 Methanol Rotisolv 99,9 % (Roth, Karlsruhe, BRD)
 Methanol-OD 99 Atom % (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
 Natriumchlorid (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
 Zinkpulver (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)

tert-Butylmethylether 99,5 % (Roth, Karlsruhe, BRD)
 Natriumsulfat wasserfrei gekörnt 99,5 % (Roth, Karlsruhe, BRD)
 Salzsäure 35 % (Roth, Karlsruhe, BRD)
 Natriumhydroxid 98 % (Roth, Karlsruhe, BRD)
 Dichlormethan 99,5 % (Roth, Karlsruhe, BRD)
 Bortribromid 99 % (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
 Methanol Rotisolv (Roth, Karlsruhe, BRD)
 Essigsäure p. A. 100 % (Roth, Karlsruhe, BRD)
 Ameisensäure 98 % (Roth, Karlsruhe, BRD)
 Natriumacetat p. A. 99 % (Roth, Karlsruhe, BRD)
 Propionsäureanhydrid 98,5 % (Roth, Karlsruhe, BRD)
 Molekularsieb 4A (Roth, Karlsruhe, BRD)
 Hypophosphorige Säure 50 % in Wasser (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)

Messgeräte und -bedingungen

Flüssigchromatograph: 1200 HPLC mit 1200 Diolen Arraydetektor (beides Fa. Agilent, St. Clara, USA)
 Trennsäule: InfinityLab Poroshell 120 SB-C18, 2,1x150 mm, 2,7 µm (Fa. Agilent, St. Clara, USA)
 Säulentemperatur: 40° C
 Laufmittel A: 0,5 % Ameisensäure in Deionat
 Laufmittel B: Methanol
 Fluss: 0,24 ml/min
 Gradientenprogramm: 0–10 min 70 % A/30 % B
 15 min 50 % A/50 % B
 15–30 min 50 % A/50 % B
 30–35 min 70 % A/30 % B

Die Detektion der einzelnen Verbindungen erfolgte bei 270 nm.

Gaschromatograph: 6890N Gaschromatograph mit 5975 massenspektrometrischem Detektor (beide Fa. Agilent, St. Clara, USA) und Combi PAL-Probengeber (Fa. CTC-Analytics, Zwingen, Schweiz)
 Trennsäule: ZB-WAX 60 m Länge, 0,25 mm Innendurchmesser, 0,25 µm Filmdicke (Fa. Phenomenex, Aschaffenburg, BRD)
 Fluss: 1,2 ml/min, konstant
 Injektor-Temperatur: 250° C
 Transferline-Temperatur: 250° C
 Temperaturprogramm:
 Initialtemperatur: 50° C, 3 min
 Level 1: 10° C/min. → 100° C, 0 min
 Level 2: 6° C/min. → 250° C, 7 min

Für die Detektion und Quantifizierung der einzelnen Verbindungen wurden folgende Ionen aufgenommen:

4-Ethylphenol (4-EP)	Targetion	107, Qualifierion 122
4-Ethylphenol-d5 (4-EP-d5)	Targetion	109, Qualifierion 127
4-Ethylguajacol (4-EG)	Targetion	152, Qualifierion 137
4-Ethylguajacol-d5 (4-EG-d5)	Targetion	157, Qualifierion 139
4-Ethylcatechol (4-EC)	Targetion	138, Qualifierion 123
4-Ethylcatechol-d5 (4-EC-d5)	Targetion	143, Qualifierion 125

Arbeitsvorschriften Syntheseschritte

4-Ethylphenol-d5

2,04 g (10 mMol) 4-Hydroxyacetophenon werden in einem 100ml-Rundkolben mit Magnetührstab mit 3 ml CH₃OD, 3 ml Deuteriumoxid und 0,3 ml 35%iger Deuteriumchlorid-Lösung eine Stunde unter Rückfluss zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen wird das Lösungsmittel unter intensivem Rühren im Wasserbad bei ca. 80° C im Membranpumpenvakuum mit einer chemiefesten Membranpumpe weitgehend entfernt und der Rückstand 10 Minuten im Ölpumpenvakuum getrocknet. Die gesamte Prozedur wird wiederholt und der danach verbleibende Rückstand nach Zugabe von 3,4 g Zinkstaub mit 7,5 ml Deuteriumoxid und 7,5 ml 35%ige Deuteriumchlorid-Lösung 3 Stunden unter Rückfluss zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen wird die Lösung in ein 50ml-Zentrifugenröhrchen mit 3 g NaCl überführt und bis zur weitgehenden Auflösung des Kochsalzes gemischt. Die Lösung wird 2-mal mit je 10 ml t-Butylmethylether extrahiert. Die vereinigten Etherextrakte werden mit Natriumsulfat getrocknet und der Ether am Rotationsverdampfer weitgehend entfernt. Der Rückstand wird einer Wasserdampfdestillation unterworfen. Nach Übergang von ca. 70 ml Destillat wird die Destillation beendet, im Destillat 10 g NaCl gelöst und in einen Scheidetrichter überführt. Nach 3-maliger Extraktion mit je 10 ml Dichlormethan werden die vereinigten Extrakte mit Natriumsulfat getrocknet und anschließend das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer möglichst vollständig ent-

fernt. Der Rückstand wird mit 10 ml 20%iger Salzsäure und einer Spatelspitze Zinkstaub eine Stunde am Rückfluss gekocht. Nach Abkühlen der Lösung werden 3 ml 10molare Natronlauge zugegeben, die Lösung in ein 50ml-Zentrifugenröhrchen mit 3 g Kochsalz überführt und bis zur weitgehenden Auflösung des Kochsalzes gemischt. Die Lösung wird anschließend 2-mal mit je 10 ml t-Butylmethylether extrahiert und die vereinigten Etherextrakte mit Natriumsulfat getrocknet. Die Prozedur wird einmal wiederholt. Der danach erhaltene Rückstand wird im Vakuum einer Drehschieberpumpe bei ca. 1 mBar destilliert und das zu Beginn übergehende, nahezu farblose Destillat gesondert aufgefangen.

4-Ethylguajacol-d5

2,49 g 4-Hydroxy-3-methoxyacetophenon werden wie unter 4-Ethylphenol-d5 beschrieben behandelt.

4-Ethylcatechol-d5

2 ml 4-Ethylguajacol-d5 werden in 20 ml über Molekularsieb getrocknetem Dichlormethan gelöst und auf 0° C gekühlt. Anschließend wird unter Stickstoffatmosphäre und Rühren eine Lösung von 4 ml Bortribromid in 5 ml trockenem Dichlormethan tropfenweise zugegeben, danach 2 Stunden unter Rückfluss zum Sieden erhitzt und anschließend bei Raumtemperatur über Nacht stehen gelassen. Am nächsten Tag wird unter Rühren ein Gemisch von 80 ml Deionat und 0,5 ml 50%iger Hypophosphoriger Säure tropfenweise zugegeben und die Mischung noch ca. 10 Minuten intensiv gerührt. Nach Überführung in einen Scheidetrichter und Abtrennung der Dichlormethanphase wird noch 2-mal mit je 25 ml Dichlormethan extrahiert und die vereinigten Extrakte mit Natriumsulfat getrocknet. Das Dichlormethan wird am Rotationsverdampfer unter Stickstoffatmosphäre abgedampft. Das Rohprodukt wird bei ca. 0,2 mBar unter Stickstoffatmosphäre destilliert.

Die Gehaltsbestimmung aller drei Endprodukte erfolgte mittels HPLC durch Flächenvergleich der gemessenen Peaks mit gleichen molaren Konzentrationen der nicht deuterierten Substanzen und ergab für 4-Ethylphenol-d5 98,7 %, 4-Ethylguajacol-d5 99,3 % und 4-Ethylcatechol-d5 97,6 %. Die Massenspektren aller drei Endprodukte wurden nach Derivatisierung mit Propionsäureanhydrid auf einem Gaschromatographen mit massenspektrometrischem Detektor aufgenommen.

Analytik

Für die quantitative Bestimmung von 4-EP, 4-EG und 4-EC in Wein wurde folgendes Derivatisierungsschema entwickelt. 10 ml Probe wurden in einem 10 ml Messkolben mit 100 µl interner Standardlösung (4-EP-d5, 4-EG-d5, 4-EC-d5 je 50 mg/l in 40 % Ethanol) gemischt. Davon wurden 3 ml in einem Zentrifugenröhrchen mit 1 g di-Kaliumhydrogenphosphat versetzt und bis zur Auflösung des Salzes mit einem Vortexmischer egalisiert. Nach Zugabe von 200 µl Propionsäureanhydrid wurde erneut ca. 1 Minute mit einem Vortexmischer egalisiert und die Lösung anschließend in ein 15ml-Vial mit Magnetrührstab geleert und sofort mittels Schraubkappe und Teflondichtung verschlossen. Die Extraktion der Analyten erfolgte 50 Minuten im Gasraum mit einer 65 µm DVB-PDMS Faser (Fa. Sigma, St. Louis, USA) bei 40° C. Die Desorption erfolgte 3 Minuten im splitless mode des GC-Injektors.

Gasfluss: 1 ml/min

Splitless Zeit: 3 min

Injektortemperatur: 250° C

Transferlinientemperatur: 250° C

Temperaturprogramm:

Oven 50° C, Holdtime: 3 min

Level 1: 10° C/min → 100° C, 0 min

Level 2: 6° C/min → 250° C, 7 min

Laufzeit: 40 min

Für die Detektion und Quantifizierung der einzelnen Verbindungen wurden folgende Ionen aufgenommen:

4-EP Target Ion 107, Qualifier Ion 122

4-EP d5 Target Ion 109, Qualifier Ion 127

4-EG Target Ion 152, Qualifier Ion 137

4-EG-d5 Target Ion 157, Qualifier Ion 139

4-EC Target Ion 138, Qualifier Ion 123

4-EC-d5 Target Ion 143, Qualifier Ion 125

Die Kalibration erfolgte durch Zugabe von Konzentrationen der einzelnen Verbindungen im Bereich von 25 bis 1000 µg/l zu einem Rotwein, dessen ursprünglicher Gehalt an den Analyten rechnerisch ermittelt wurde.

Für die Bestimmung der Wiederfindungsrate wurden zu 2 Weiß- und 2 Rotweinen durch Zusatz die Konzentration der Analyten um 100, 250 und 500 µg/l erhöht und danach sowohl die Ursprungsweine als auch die Additionen analysiert. Die Bestimmung der Wiederholbarkeit erfolgte durch 4-fache Analyse von 2 Weiß- und 2 Rotweinen.

Ergebnisse und Diskussion

Alle drei Verbindungen besitzen 5 Wasserstoffatome in der Ethylgruppe, 4 bzw. 3 weitere an den aromatischen Kern gebundene und 1 bzw. 2 an den Hydroxygruppen. Lediglich 4-EG besitzt darüber hinaus noch die 3 Wasserstoffatome der Methoxygruppe. Die aciden Wasserstoffatome der Hydroxygruppen unterliegen in wässriger Lösung sehr schnell einem Austausch und sind daher für eine Substitution durch Deuterium ungeeignet. Für die Synthese der deuterierten Derivate kommt daher entweder ein teilweiser oder vollständiger Ersatz der Wasserstoffatome der Ethylgruppe durch Deuterium oder die entsprechende Substitution der am aromatischen Kern gebundenen Wasserstoffatome in Frage. Auf Grund der größeren Stabilität von aliphatisch gebundenem Deuterium gegenüber Austauschreaktionen wurde der Ethylgruppe der Vorzug gegeben. Dies gilt umso mehr, als es sich bei allen drei Verbindungen um π -elektronenreiche Aromaten handelt, die elektrophilen Austauschreaktionen im Kern und damit verbundenen Deuteriumverlust besonders leicht zugänglich sind.

Als Ausgangsverbindungen wurden ursprünglich für alle drei Substanzen die entsprechenden Acetophenonderivate gewählt. Die Umwandlung der Ketogruppe dieser Verbindungen in eine volldeuterierte Methylengruppe ist mit einer Reihe von Reaktionen möglich. Da alle drei Verbindungen ausreichende Säurestabilität besitzen und darüber hinaus die deuterierten Reagenzien für die Umwandlung kommerziell leicht zugänglich sind, erschien die Clemmensen Reduktion mit Zink und Deuteriumchlorid als die geeignetste Methode (Buklavka 2004).

Eine direkte Clemmenson Reduktion der Ausgangsverbindungen ist nicht möglich, da die durch Keto-Enol-Tautomerie aciden Wasserstoffatome der Acetylgruppe während der Reaktion teilweise durch Deuterium ersetzt werden und in Bezug auf die Isotopenverteilung uneinheitliche Produkte erhalten werden. Aus diesem Grund wurden vor der Clemmensen Reduktion die Wasserstoffatome der Acetylgruppe weitgehend durch Deuterium ersetzt. Zur schnellen Einstellung des Austauschgleichgewichtes wurde Deuteriumchlorid als Katalysator verwendet. Die Synthese verläuft mit Ausbeuten zwischen ca. 60 % bei 4-EG und ca. 80 % bei 4-EP. Die Hauptverluste treten beim Ersatz der drei Wasserstoffatome der

Acetylgruppe gegen Deuterium auf, da hierbei in größerem Ausmaß Aldolreaktionen unter Bildung harziger Nebenprodukte stattfinden. Die Clemmensen Reduktion selbst verläuft dagegen mit sehr hohen Ausbeuten. Das primäre Endprodukt weist allerdings einen Massenshift von 7 bei 4-EP bzw. 8 bei 4-EG auf, da unter den gewählten Reaktionsbedingungen die am Kern gebundenen Wasserstoffatome ebenfalls teilweise oder vollständig durch Deuterium ersetzt werden. Der Rücktausch dieser Deuteriumatome durch Wasserstoffatome erfolgte unter den Bedingungen der Clemmensen Reduktion mit nicht deuterierten Reagenzien wobei hier nur geringe Mengen Zinkstaub als Oxidationsschutz benötigt werden. Die 5 aliphatisch gebundenen Deuteriumatome der Ethylgruppe werden hierbei nicht ausgetauscht.

Die Massenspektren von 4-EP und 4-EG (Abb. 1 und 2.) nach der Derivatisierung mit Propionsäureanhydrid weisen eine Reihe von Gemeinsamkeiten auf. Vom Molekölion ausgehend wird zuerst der Propionsäurerest abgespalten und daraus durch weitere Elimination der Methylgruppe der Ethylgruppe die für Alkylaromaten charakteristische Tropyliumstruktur gebildet. Bei 4-EP ist die Tropyliumstruktur Basispeak, bei 4-EG dagegen die Struktur nach Abspaltung des Propionsäurerestes. Der Massenshift bei den deuterierten Produkten gegenüber den nicht deuterierten Verbindungen beträgt beim Molekölion und beim ersten Spaltprodukt 5, bei der Tropyliumstruktur aber nur 2 (Abb. 3 und 4).

Abb. 1: Massenspektrum von 4-Ethylphenol nach Derivatisierung mit Propionsäureanhydrid

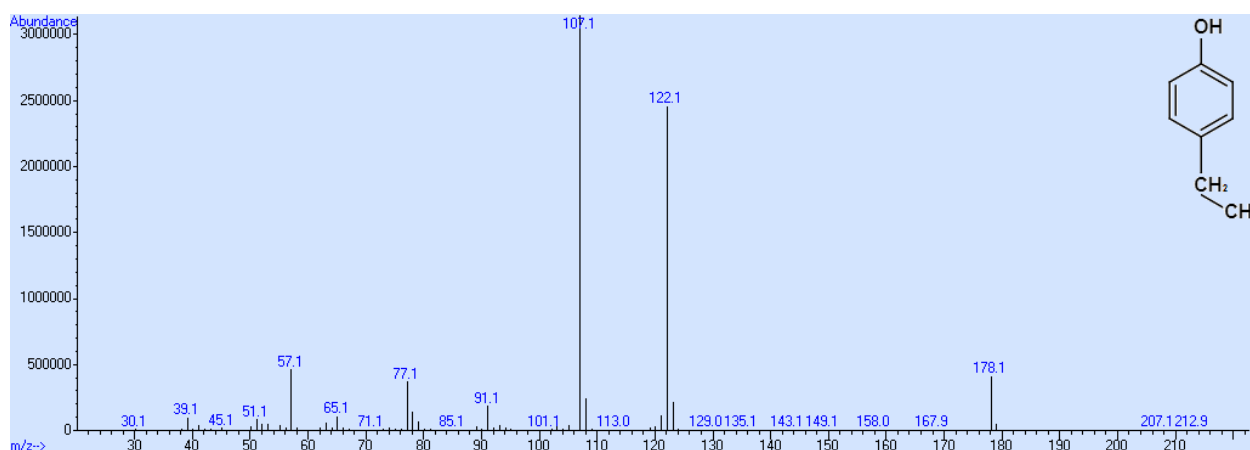


Abb. 2: Massenspektrum von 4-Ethylguajacol nach Derivatisierung mit Propionsäureanhydrid

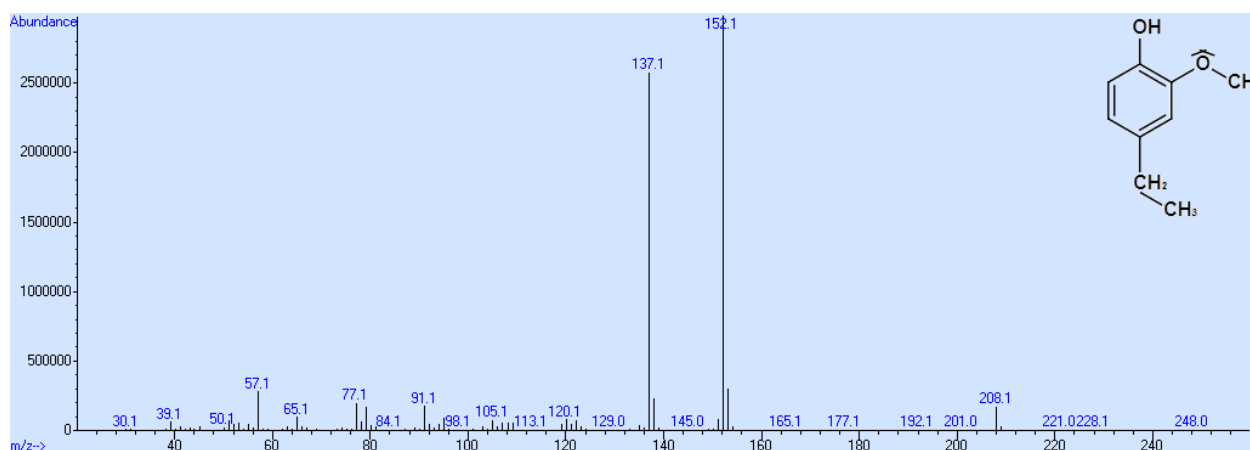


Abb. 3: Massenspektrum von 4-Ethylphenol-d5 nach Derivatisierung mit Propionsäureanhydrid

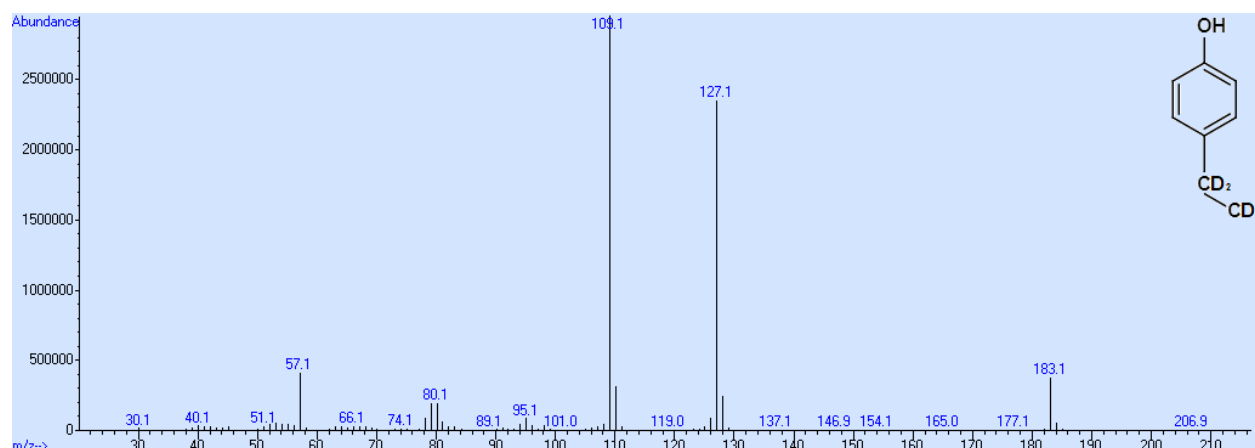
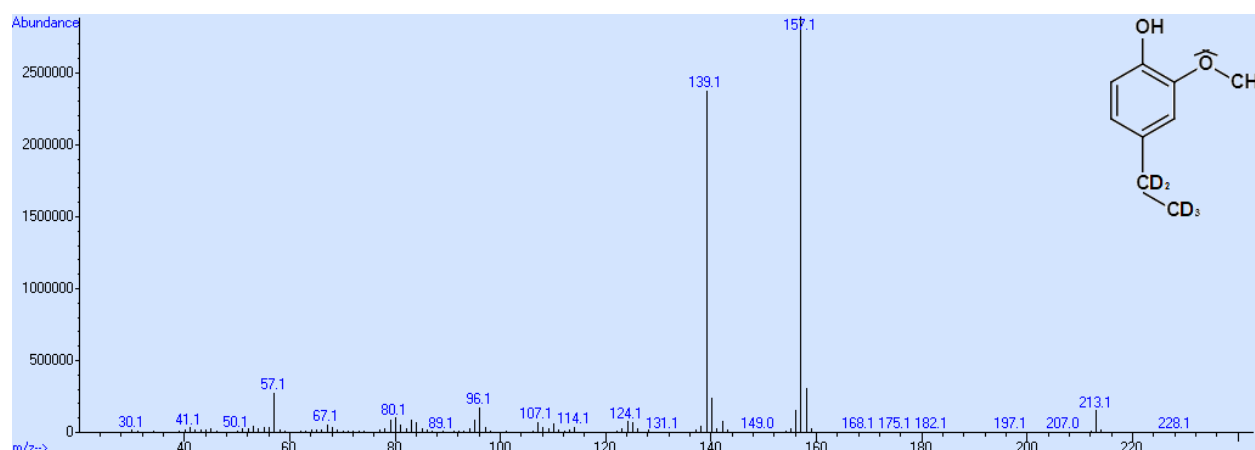


Abb. 4: Massenspektrum von 4-Ethylguajacol-d5 nach Derivatisierung mit Propionsäureanhydrid



Diese für 4-EP und 4-EG befriedigende Synthesevorschrift konnte aus den folgenden Gründen für 4-EC nicht erfolgreich angewendet werden.

1. Sowohl Ausgangs- als auch Endprodukt benötigen auf Grund ihrer Sauerstoffempfindlichkeit das Arbeiten unter Inertgasatmosphäre.
2. Das Abdampfen des Methanol-OD/Deuteriumoxid/Deuteriumchlorid-Gemisches vom 3,4-Dihydroxyacetophenon führt zu einer dunkel gefärbten, hochviskosen Flüssigkeit mit erheblichem Anteil an Lösungsmittel anstelle eines kristallinen Produktes.

3. Eine einfache Abtrennung des 4-Ethylcatechols nach der Clemmensen Reduktion von den Nebenprodukten durch Wasserdampfdestillation ist auf Grund der geringen Wasserdampflichkeit von 4-EC nicht möglich.

Die Demethylierung von 4-EG-d5 durch Bortribromid unter Stickstoff ist dagegen vergleichsweise unkompliziert und unter den gewählten Bedingungen praktisch quantitativ. Allerdings muss mit einem beträchtlichen Überschuss Bortribromid gearbeitet werden während theoretisch nur zwei Drittel Äquivalente der Verbindung notwendig wären (Kosak et al. 2015). Offenbar ist durch die

benachbarte Position der Hydroxy- und Methoxygruppe die Reaktion sterisch gehemmt. Das Massenspektrum von 4-EC nach Derivatisierung mit Propionsäureanhydrid weist einen Unterschied zu den entsprechenden Spektren von 4-EP und 4-EG auf (Abb. 5). Als „Molekülion“ tritt nur die einfach veresterte Verbindung auf, wobei sich hier nicht entscheiden lässt, ob nur eine der beiden Hydroxygruppen mit Propionsäureanhydrid reagiert oder im Fall einer doppelten Veresterung die Abspaltung eines Säurerestes unter den Standardbedingungen der Elektronenstoßionisation vollständig ist. Die weitere Fragmentierung erfolgt auch hier durch Abspaltung der Propionylgruppe zum Basispeak und danach durch Eliminierung einer Methylgruppe zur Bildung der Tropyliumstruktur. Der Massenshift zwischen deuteriertem und nicht deuteriertem Produkt beträgt auch hier für die ersten beiden Ionen 5 und

für das dritte Ion 2 (Abb. 6). Die chromatographische Trennung der deuterierten und nicht deuterierten Verbindungen ist unter den hier gewählten Bedingungen praktisch vollständig (Abb. 7). Die Kalibration ergab für alle 3 Verbindungen bis zu einer Konzentration von 1 mg/l sehr gute Linearität (Abb. 8 bis 10). Die Wiederfindungsraten schwankten zwischen 82,2 % und 123,4 %, der größte Teil der Ergebnisse wies aber keine größere Abweichung als 10 % vom theoretischen Wert auf (Tab. 1). Die größte relative Standardabweichung der Wiederholungen betrug maximal 11,8 % (Tab. 2). Die aus den Signal-Rausch-Verhältnissen errechneten Nachweisgrenzen liegen für 4-EP bei 0,06 µg/l, für 4-EG bei 0,25 µg/l und für 4-EC bei 0,4 µg/l. Die entsprechenden Bestimmungsgrenzen sind 0,2 µg/l, 0,80 µg/l und 1,2 µg/l.

Abb. 5: Massenspektrum von 4-Ethylcatechol nach Derivatisierung mit Propionsäureanhydrid

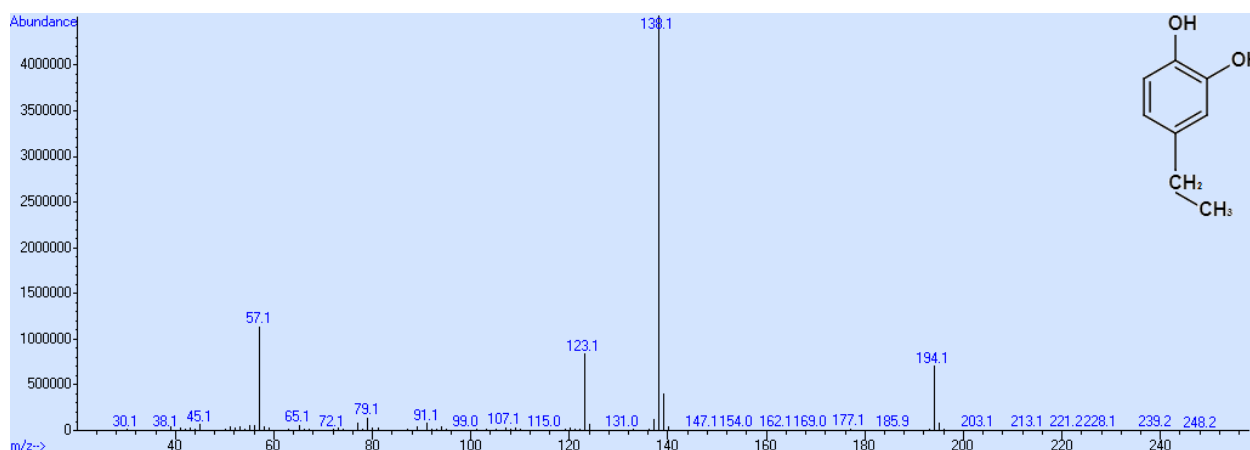


Abb. 6: Massenspektrum von 4-Ethylcatechol-d5 nach Derivatisierung mit Propionsäureanhydrid

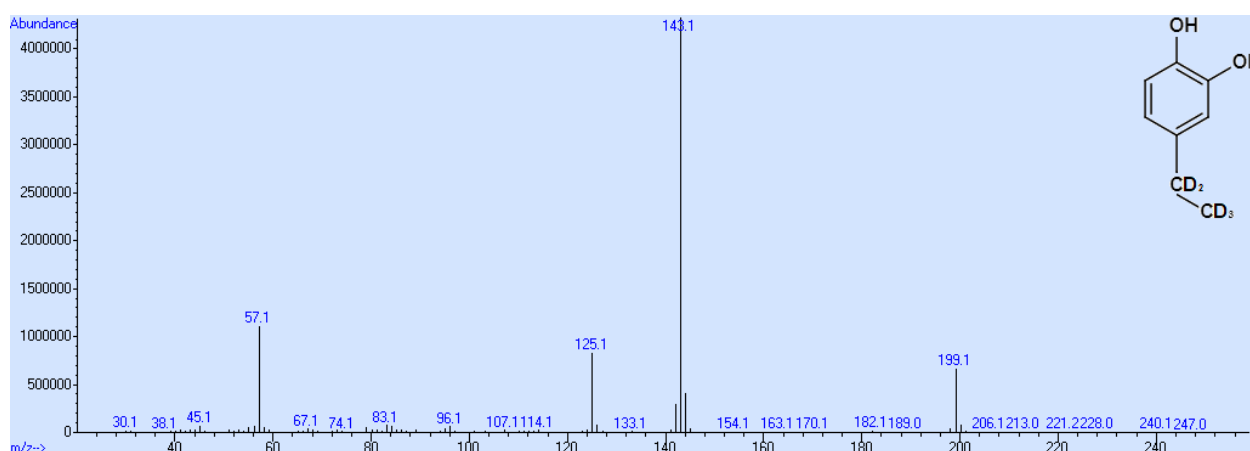
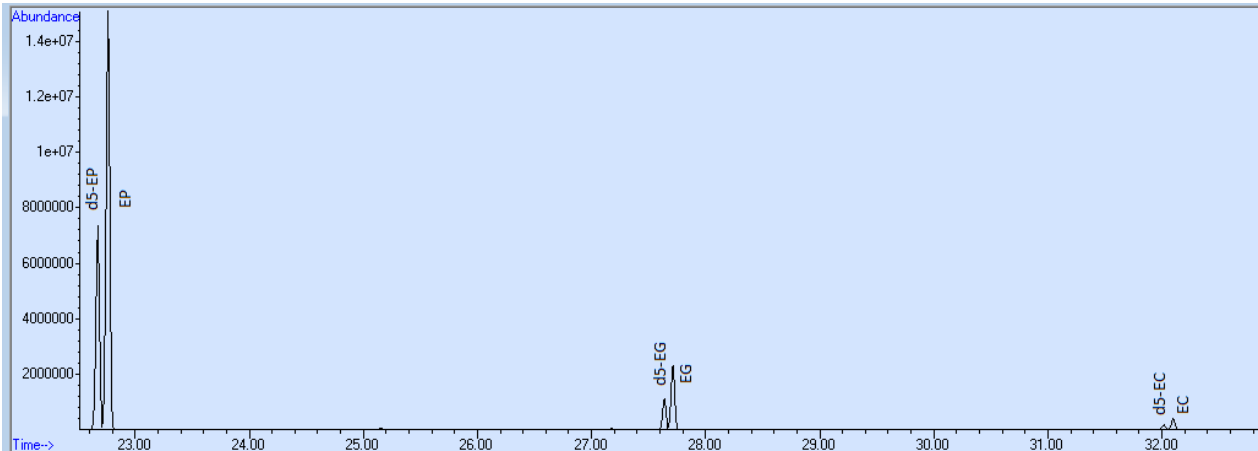


Abb. 7: Chromatogramm einer Standardlösung mit einer Konzentration von je 1 mg/l an 4-EP, 4-EG und 4-EC



Tab. 1: Wiederfindungsraten in 2 Weißweinen (WW1 und WW2) und 2 Rotweinen (RW1 und RW2) in % nach Zusatz von 100 (Wf1), 250 (Wf2) und 500 µg/l (Wf3) von 4-EP, 4-EG und 4-EC

	4-EP µg/l	4-EG µg/l	4-EC µg/l	4-EP	4-EG	4-EC	4-EP	4-EG	4-EC	4-EP	4-EG	4-EC
	ohne Zusatz	ohne Zusatz	ohne Zusatz	Wf1	Wf1	Wf1	Wf2	Wf2	Wf2	Wf3	Wf3	Wf3
WW1	0,48	0,20	0,69	91,3	82,4	84,2	123,4	115,0	115,0	105,7	103,3	106,5
WW2	0,68	0,14	0,91	104,9	98,5	100,0	113,9	106,6	109,7	101,8	98,1	99,8
RW1	0,42	0,91	0,56	88,4	82,2	84,0	100,4	93,2	95,6	103,7	99,8	102,4
RW2	45,16	13,29	13,19	94,1	94,0	96,6	99,7	94,0	95,5	96,1	92,6	95,3

Tab. 2: Relative Standardabweichung von 2 Weißweinen (WW1 und WW2) und 2 Rotweinen (RW1 und RW2) in % nach 4-maliger Analyse

	4-EP	4-EG	4-EC
WW1 Mittelwert µg/l	0,19	0,20	0,29
WW2 Mittelwert µg/l	0,19	0,17	0,35
RW1 Mittelwert µg/l	0,20	0,78	0,49
RW2 Mittelwert µg/l	49,02	14,91	14,35
WW1 StdAbw. µg/l	0,02	0,01	0,04
WW2 StdAbw. µg/l	0,01	0,01	0,03
RW1 StdAbw. µg/l	0,02	0,08	0,02
RW2 StdAbw. µg/l	0,14	0,67	0,31
WW1 Rel.StdAbw. %	11,80	4,10	12,20
WW2 Rel.StdAbw.%	2,70	7,80	8,90
RW1 Rel.StdAbw.%	10,20	10,00	4,20
RW2 Rel.StdAbw.%	0,28	4,50	2,20

Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Synthese der Verbindungen 4-Ethylphenol, 4-Ethylguajacol und 4-Ethylcatechol in voll- oder teildeuterierter Form als interner Standard für die Quantifizierung dieser drei Verbindungen in Wein mittels SPME-Technik. Um einerseits möglichst stabile Produkte bezüglich Deuteriumverlust im Zuge der Probenvorbereitung zu vermeiden und andererseits hohe Empfindlichkeiten für die Detektion durch massenspektrometrischen Detektor zu erreichen, wurde bei allen Verbindungen die Ethylgruppe als Zielort gewählt. Die Synthese für 4-Ethylphenol d5 und 4-Ethylguajacol d5 wurde mit befriedigenden Ausbeuten durch Austausch der aciden Wasserstoffatome der Acylgruppe durch Deuterium und anschließender Clemmensen Reaktion mit deuterierten Reagenzien der entsprechenden Arylketone durchgeführt. 4-Ethylcatechol d5 konnte auf Grund seiner hohen Reaktivität und Oxidierbarkeit des Ausgangsproduktes auf diesem Wege nicht synthetisiert werden. Diese Verbindung musste daher durch Demethylierung von 4-Ethylguajacol d5 mittels Bortribromid hergestellt werden. Alle drei Endprodukte hatten einen Gehalt von ca. 98 %. Die Adaptierung einer in der Abteilung etablierten SPME-Analytik unter Verwendung

der synthetisierten Produkte als interner Standard ergab hohe Empfindlichkeiten und bei den hier verwendeten Weinen keinen Hinweis auf Matrixeffekte.

Literatur

- Buklavka, V. N.** 2004: Reduction of alkylarylketones to alkylbenzenes with zinc dust and hydrochloric acid: Comparison with zinc amalgam reduction. 8th International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry. ECSOC-8.
- Carillo, J. D., Tena, M. T.** 2007: Determination of ethylphenols in wine by in situ derivatisation and headspace-solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* Vol 387: 2574–2558.
- Chatonnet, P., Dubourdieu, D., Boidron JN., Pons, M.** 1992: The origin of ethylphenols in wines. *J. Sci. Food Agric.* 60: 165–178.
- Chatonnet, P., Dubourdieu, D., Boidron, JN.** 1995: The influence of *Brettanomyces/Dekkera* sp. yeasts and lactic acid bacteria on the ethylphenol content of red wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 46: 463–468.

Couto, J. A., Campos, F. M., Figueiredo, A. R., Hogg, T. A. 2006: Ability of lactic acid bacteria to produce volatile phenols. *Am. J. Enol. Vitic.* 57: 166–171.

Dugelay, I., Gunata, Z., Sapis, J. C., Baumes, R., Bayonove, C. 1993: Role of cinnamoyl esterase activities from enzyme preparations on the formation of volatile phenols during winemaking. *J. Agric. Food Chem.* 41: 2092–2096.

Francis, I., Newton, J. 2005: Determining wine aroma from compositional data. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11: 114–126.

Grando, M. S., Versini, G., Nicolini, G., Mattivi, F. 1993: Selectivity of wine yeast strains having different volatile phenols production. *Vitis* 32: 43–50.

Houben-Weyl 2014: *Methods of Organic Chemistry Vol IV 2nd Edition* Thieme Verlag

Kosak, T. M., Conrad, H. A., Korich, A. L., Lord, R. L. 2015: Ether Cleavage Re-Investigated: Elucidating the Mechanism of BBr₃-Facilitated Demethylation of Aryl Methyl Ethers *European Journal of Organic Chemistry* Issue 34: 7460–7467.

Lattey, K. A., Bramley, B. R., Francis, I. L. 2010: Consumer acceptability, sensory properties and expert quality judgements of Australian Cabernet Sauvignon and Shiraz wines *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 16: 189–202.

Matorell, N., Marti, M. P., Mestress, M., Busto, O., Guasch, J. 2002: Determination of 4-Ethylguaiacol and 4-Ethylphenol in red wines using headspace-solid-phase microextraction-gas chromatography. *Journal of Chromatography Vol 975*: 349–354.

Nikfardjam, M. P., May, B., Tschiersch, C. 2009: 4-Ethylphenol and 4-ethylguaiacol contents in bottled wines from the German 'Württemberg' region. *European Food Research and Technology*, 230: 333–341.

Petrozziello, M., Asproudy, A., Guaitta, M., Borsa, D., Motta, S., Panero, L., Bosso, A. 2014: Influence of the matrix composition on the volatility and sensory perception of 4-

ethylphenol and 4-ethylguaiacol in model wine solutions. *Food Chemistry*, 149: 197–202.

Pizarro, C., Perez-del-Notario, N., Gonzalez-Saiz, J. M. 2007: Determination of Brett character responsible compounds in wines by using multiple headspace solid-phase microextraction. *Journal of Chromatography A Vol. 1143(1-2)*: 176–181.

Pollnitz, A. P., Pardon, K. H., Sefton, M. A. 2000: Quantitative analysis of 4-ethylphenol and 4-ethylguaiacol in red wine. *J. Chrom.* 871(1): 101–109.

Shinohara, T., Kubodera, S., Yanagida, F. 2000: Distribution of phenolic yeasts and production of phenolic off flavors in wine fermentation. *J. Biosci. Bioeng.* 90: 90–97.

Silva, P., Cardoso, H., Geros, H. 2004: Studies on the wine spoilage capacity of *Brettanomyces/Dekkera* spp. *Am. J. Enol. Vitic.* 55: 65–72.

Suarez, R., Suarez-Lepe, JA., Morata, A., Calderon, F. 2007: The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*: a review. *Food Chem.* 102: 10–21.

Wedral, D., Shewfelt, R., Frank, J. 2010: The challenge of *Brettanomyces* in wine. *LWT - Food Science and Technology*, 43: 1474–1479.

Whiton, R. S., Zoecklein, B. W. 2000: Optimization of Headspace Solid-Phase Microextraction for Analysis of Wine Aroma Compounds *Am. J. Enol. Vitic. Vol. 51, No. 4*: 379–282.