

Entwicklung einer analytischen Methode zur Bestimmung niedrigsiedender polyfunktionaler Thiole in österreichischen Weiß- und Rotweinen

Sezer Sari , Phillip Eder , Walter Brandes, Christian Philipp* 

Höhere Bundeslehranstalt und Bundesamt für Wein- und Obstbau
Wiener Straße 74, A-3400 Klosterneuburg

*Korrespondierender Autor: christian.philipp@weinobst.at

Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine analytische Methode zur Bestimmung der flüchtigen Thiolverbindungen 4-Methyl-4-sulfanylpentan-2-on (4MSP), 3-Sulfanylhexasan-1-ol (3SH) und 3-Sulfanylhexasylacetat (3SHA) entwickelt und validiert. Anschließend erfolgte die Quantifizierung dieser Verbindungen in einer Auswahl unterschiedlicher Weine. Die Methode zeichnete sich durch eine hervorragende Linearität und eine gute Präzision aus. Die quantitativen Analysen zeigten eine ausgeprägte Rebsortenabhängigkeit des jeweiligen Thiolprofils. Bei den untersuchten Weißweinen wies insbesondere Sauvignon Blanc – erwartungsgemäß – erhöhte Konzentrationen von 4MSP auf. Sowohl 3SH als auch 3SHA konnten in nahezu allen Weißweinproben nachgewiesen werden, wobei vor allem 3SH im Vergleich zu den entsprechenden Blindproben durchgängig in hohen Konzentrationen vertreten war. Im Fall des Gemischten Satzes wurde eine starke Variabilität, insbesondere hinsichtlich der 3SH-Gehalte, beobachtet. Auch in den analysierten Rotweinen der Sorten Blaufränkisch und Zweigelt war 3SH deutlich präsent, während 3SHA nur in Einzelfällen oder gar nicht detektiert wurde. Die untersuchten Schilcher-Proben zeigten vereinzelt außergewöhnlich hohe Konzentrationen an 3SH. Im Vergleich zu NCI- bzw. PFB-basierten Derivatisierungsverfahren weist die entwickelte Methode höhere Nachweisgrenzen auf, kommt jedoch ohne halogenierte Reagenzien aus und entspricht somit den Prinzipien der Green Chemistry. Diese Ergebnisse verdeutlichen den maßgeblichen Einfluss der Rebsorte sowie vinifikatorischer Parameter auf das Thiolprofil und liefern wertvolle Erkenntnisse für ein gezieltes Aromamanagement im modernen Weinbau. Im Rahmen einer Folgestudie ist die Erweiterung der Methode um drei weitere relevante Thiolverbindungen sowie eine weiterführende Optimierung der Analyseverfahren geplant.

Schlagerwörter: Thiole, Sauvignon Blanc, 4-Methyl-4-sulfanylpentan-2-on, 3-Sulfanylhexasan-1-ol, 3-Sulfanylhexasylacetat, Quantifizierung

Abstract

Development of an analytical method for the determination of low-boiling polyfunctional thiols in Austrian white and red wines. In the present study, an analytical method was developed and validated for the determination of the volatile thiol compounds 4-methyl-4-sulfanylpentan-2-one (4MSP), 3-sulfanylhexasan-1-ol (3SH), and 3-sulfanylhexasyl acetate (3SHA). This method was subsequently applied to quantify these compounds in a selection of Austrian white and red wines. The method demonstrated excellent linearity and a good precision. Quantitative analyses revealed a pronounced varietal

dependence of the thiol profiles. Among the white wines examined, Sauvignon Blanc – unsurprisingly – exhibited particularly high concentrations of 4MSP. Both 3SH and 3SHA were detected in nearly all white wine samples, with 3SH consistently present at elevated levels compared to corresponding blank matrix samples. In the case of Gemischter Satz (field blend), substantial variability was observed, particularly in 3SH concentrations. In the red wine varieties, Blaufränkisch and Zweigelt, 3SH was also clearly present, whereas 3SHA was only sporadically or not at all detectable. Some Schilcher samples showed exceptionally high concentrations of 3SH. Compared to NICI- or PFB-based derivatization methods, the developed method has higher detection limits, but does not require halogenated reagents and thus complies with the principles of green chemistry. These findings highlight the significant influence of grape variety and vinification parameters on thiol composition and provide valuable insights for targeted aroma management in modern viticulture. As part of a forthcoming study, the method will be expanded to include three additional thiol compounds, alongside further optimisation of the analytical protocol.

Keywords: thiols, Sauvignon Blanc, 4-methyl-4-sulfanyl-pentan-2-one (4MSP), 3-sulfanylhexan-1-ol (3SH), 3-sulfanylhexyl acetate (3SHA), quantification

Einleitung

Polyfunktionale Thiole zählen zu den zentralen flüchtigen Aromakomponenten in Wein und anderen fermentierten Fruchtprodukten. Sie tragen maßgeblich zum Bukett bestimmter Rebsorten bei und prägen insbesondere das aromatische Profil von Sauvignon Blanc. Zu den bedeutendsten Vertretern zählen 4-Methyl-4-sulfanyl-pentan-2-on (4MSP, vormals 4-MMP), 3-Sulfanylhexan-1-ol (3SH, vormals 3-MH) und 3-Sulfanylhexylacetat (3SHA, vormals 3-MHA), die mit charakteristischen Noten von schwarzer Johannisbeere, Grapefruit und Passionsfrucht assoziiert werden (Tominaga et al., 1998; Roland et al., 2011).

Diese geruchsintensiven Verbindungen liegen in den Trauben jedoch nicht in freier, aromawirksamer Form vor, sondern primär als geruchslose, gebundene Vorstufen (Precursors), insbesondere als S-Cystein- bzw. S-Glutathion-Konjugate (Peyrot des Gachons et al., 2002). Während 4MSP sowohl im Mesokarp als auch im Exokarp vorkommt, findet sich 3SH überwiegend im Exokarp von Sauvignon Blanc. Die Umwandlung dieser Konjugate in freie Thiole erfolgt enzymatisch während der alkoholischen Gärung durch β -Lyase-Aktivität. Dabei wird jedoch nur ein Bruchteil – etwa 10 % – der verfügbaren Vorstufen tatsächlich in ihre aromawirksame Form überführt (Ribéreau-Gayon et al.,

2000; Swiegers et al., 2007). Diese geringe Umsetzungseffizienz unterstreicht die analytische und technologische Relevanz einer exakten Erfassung sowohl der freien als auch der potenziellen Thiolefraktionen.

Auch wenn polyfunktionale Thiole zunächst vor allem mit Sauvignon Blanc assoziiert wurden, konnten sie mittlerweile in einer Vielzahl anderer Rebsorten – sowohl in Weiß- als auch in Rotweinen – in unterschiedlich hoher Konzentration nachgewiesen werden (Rodríguez-Bencomo et al., 2009). Aufgrund ihrer niedrigen Geruchsschwellen im ng/L-Bereich und ihrer hohen sensorischen Relevanz erfordert ihre analytische Bestimmung besonders empfindliche und selektive Methoden. In den vergangenen zwei Jahrzehnten wurden verschiedene Verfahren zur Quantifizierung dieser Verbindungen entwickelt, darunter Derivatisierungstechniken gekoppelt mit Festphasenmikroextraktion (SPME) oder flüssig-flüssige Extraktionsansätze mit anschließender GC-MS-Analyse (Mateo-Vivaracho et al., 2006; Ferreira et al., 2009). Trotz dieser Fortschritte bestehen weiterhin Einschränkungen hinsichtlich der Nachweisgrenzen, Wiederholbarkeit und der Robustheit gegenüber Matrixeffekten (Wardencki, 1998; Mateo-Vivaracho et al., 2007).

In den vergangenen zwei Jahrzehnten wurden verschiedene Ansätze zur Bestimmung niedrigsiedender polyfunktionaler Thiole entwickelt. In der nachfolgenden Tabelle (Tab. 1) wird eine Übersicht der gängigsten Verfahren mit deren Nachweisgrenzen und Limitierungen angeführt. Viele dieser Methoden zeigen Einschränkungen in Bezug auf Matrixeffekte und Wiederholbarkeit, wodurch die Entwicklung einer robusteren Methode notwendig war.

Zielsetzung der vorliegenden Studie war die Entwicklung und Validierung einer empfindlichen und reproduzierbaren Methode zur gleichzeitigen Bestimmung der drei wichtigsten flüchtigen

Thiolverbindungen (4MSP, 3SH, 3SHA) in österreichischen Weiß- und Rotweinen. Besonderes Augenmerk galt dabei der Verbesserung der Nachweisgrenzen, der Linearität und der Wiederholbarkeit der Methode unter realen Probenbedingungen. Darüber hinaus wurde untersucht, inwieweit das Thiolprofil rebsortenabhängig variiert und welche weinbaulichen oder vinifikatorischen Rückschlüsse sich daraus ableiten lassen. In einer Folgestudie ist die Erweiterung des Analysetargets um drei zusätzliche Thiolverbindungen sowie eine methodische Optimierung vorgesehen. Diese Verbindungen sind nicht nur für österreichische Weine von Bedeutung, sondern auch für aromatische Weine weltweit charakteristisch.

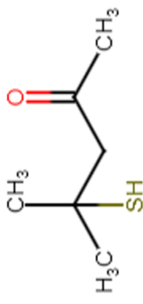
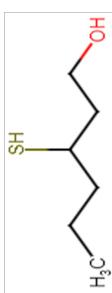
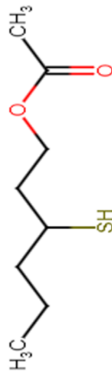
Tab. 1: Verfahren zur Bestimmung niedrigsiedender polyfunktionaler Thiole

Studie / Plattform	Probenvorbereitung / Derivatisierung	Detektion	LOD (ng/L)
Sari et al. 2025	SPE-Extraktion, Derivatisierung mit 1-Iodhexan und Cs ₂ CO ₃ , LVI-Injektion	GC-MS/MS (MRM)	6,8 / 9,3 / 5,9
Mateo-Vivaracho et al. (2007)	LLE + PFBBR-Derivatisierung	GC-NICI-MS	0,1 / 7 / 0,6
Rodríguez-Bencomo et al. (2009)	HS-SPME + PFBBR-Derivatisierung	GC-MS	< Geruchsschwelle
Musumeci et al. (2015)	Extractive Alkylation + HS-SPME	GC-EI-MS	0,9 / 1 / 17
Ochiai & Kishimoto (2015)	der-SBSE (ETP)	TD-GC-MS/MS	0,20 / 27 / 0,19

Strukturen, Geruchseigenschaften und Geruchsschwellenwerte

In Tab. 2 sind die unterschiedlichen Eigenschaften der untersuchten Thiolverbindungen ersichtlich.

Tab. 2: Struktur, Geruchseigenschaften und -schwellenwerte der untersuchten Thiole im Wein

Verbindung	Abkürzung	Struktur	Typische Geruchseigenschaften	Wahrnehmungsschwelle im Wein [ng/l]	Literatur
4-Methyl-4-sulfanyl-pentan-2-on	4-MSP (4-MMP)		grün-vegetabil (Buchsbaum) schwarze Johannisbeerknospe Ginster tropisch-fruchtig (Passionsfrucht)	0,8	Tominaga et al., 1998 Coetze et al., 2015
3-Sulfanylhexan-1-ol	3-SH (3-MH)		tropisch-fruchtig (Passionsfrucht, Guave) zitrusartig (Grapefruit) Stachelbeere	60	Tominaga et al., 1998 Coetze et al., 2015
3-Sulfanylhexylacetat	3-SHA (3-MHA)		intensiv tropisch-fruchtig (Passionsfrucht, Guave) zitrusartig (Grapefruit) Stachelbeere leicht grünlich (Buchsbaum)	4,2	Tominaga et al., 1998 Coetze et al., 2015

Materialien & Methoden

Probenmaterial

Für die Anwendung und Validierung der entwickelten Methode wurden insgesamt 160 Weinproben unterschiedlicher Rebsorten und Herkunft herangezogen. Das Probenmaterial umfasste 17 Sauvignon Blanc-Weine, 42 Grüner Veltliner-Weine, 22 Gemischter Satz-Weine, 26 Blaufränkisch-Weine, 13 Zweigelt-Weine sowie 40 Schilcher-Weine. Sämtliche Proben stammten von verschiedenen Herstellern und Weinbaulagen, um eine möglichst breite repräsentative Abdeckung sortentypischer und herkunftsbedingter Unterschiede zu gewährleisten. Die detaillierten Angaben zu Rebsorte, Jahrgang und Herkunft sind in Tab. 3 zu finden.

Tab. 3: Rebsorte, Jahrgang und Herkunft der untersuchten Weine

Rebsorte	Anzahl	Jahrgang	Herkunft
Sauvignon Blanc	17	2022	Steiermark
	11	2022	Deutschland
Grüner Veltliner	8	2018	Niederösterreich
	23	2022	Niederösterreich
Gemischter Satz	10	2022	Wien
	11	2022	Niederösterreich
Blaufränkisch	26	2022	Burgenland
Zweigelt	13	2021	Niederösterreich
Schilcher	40	2022	Steiermark

Chemikalien und Lösungen:

Die in dieser Studie verwendeten Chemikalien wiesen eine Reinheit von mindestens 95 % auf und wurden, sofern nicht anders angegeben, in analytischer Qualität eingesetzt. Die Referenzsubstanzen 4-Methyl-4-sulfanylpentan-2-on (4-Mercapto-4-methyl-2-pentanon, 98 %) und 3-Sulfanylhexas-1-ol (3-Mercapto-1-hexanol, 96 %) wurden von Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, USA) bezogen. 3-Sulfanylhexylacetat (3-Mercaptohexylacetat, ≥ 98 %) stammte von Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA).

Weitere eingesetzte Chemikalien waren tert-Butylmethylether ($\geq 99,5$ %, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), Methanol ($\geq 99,9$ %, Chem Lab, Zedelgem, Belgien), Acetonitril ($\geq 99,95$ %, Chem Lab), Ethanol ($\geq 99,8$ %, Riedel-de-Haën, Seelze, Deutschland), Dimethylsulfoxid Rotipuran ($\geq 99,8$ %, p.a., Carl Roth), Isohexan (≥ 99 %, Carl Roth), sowie Natriumsulfat (≥ 99 %, p.a., Carl Roth).

Die Derivatisierungsreagenzien umfassten 1-Iodhexan (≥ 98 %, Sigma-Aldrich), Cäsiumcarbonat ($\geq 99,9$ %, p.a., Carl Roth) und Natriumborhydrid (98 %, Sigma-Aldrich). Zur Stabilisierung und Reaktionsführung wurden 4-(Hydroxymercuri)benzoesäure-Natriumsalz (≥ 95 %, Sigma-Aldrich), N-Acetyl-L-Cystein (≥ 98 %, Carl Roth), Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (p.a., Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), Natriumhydroxid (Pellets, Merck), Natriumhydrogencarbonat ($\geq 99,5$ %, Carl Roth), EDTA (≥ 99 %, USP, Carl Roth) und Borsäure ($\geq 99,8$ %, Carl Roth) eingesetzt. Als Säurekomponente wurde L(+)-Weinsäure für Analysezwecke ($\geq 99,5$ %, Merck KGaA) verwendet.

Für die Festphasenextraktion kam Lichrolut EN (Merck KGaA) zum Einsatz.

Die folgenden Pufferlösungen wurden im Labor gemäß den analytischen Anforderungen hergestellt:

- Tris-Puffer (0,1 M), mit NaOH auf pH 7,2 eingestellt
- PHMB-Lösung (2 mM in 0,1 M Tris-Puffer, pH 7,2)
- EDTA-Lösung (50 g/L)
- Weinsäurepuffer (5 g/L), mit NaOH auf pH 3,0 eingestellt
- Boratpuffer (0,2 M), mit NaOH auf pH 10,0 eingestellt
- Kunstwein (4 g/L Weinsäure, 12 % EtOH), mit NaOH auf pH 3,2 eingestellt

Alle Lösungen wurden frisch zubereitet oder unter lichtgeschützten Bedingungen bei 4 °C gelagert, sofern erforderlich.

Interne Standardlösungen:

Zur quantitativen Bestimmung der Thiolverbindungen wurden isotope markierte interne Standards verwendet. Dabei kamen 4MSP-d₁₀ (≥98 %), 3SH-d₅ (≥98 %) und 3SHA-d₅ (≥98 %) zum Einsatz, jeweils bezogen von Eptes Sàrl (Vevey, Schweiz). Die Standards wurden in Methanol gelöst und in geeigneten Konzentrationen von je 100 ng/l als Arbeitsstandards aliquotiert und unter Stickstoff lichtgeschützt bei –20 °C gelagert. Die tatsächlichen Konzentrationen der Standards wurden wöchentlich durch Vergleichsmessungen über einen 7820A GC-FID durchgeführt (Agilent Technologies, Santa Clara, USA).

Analytische Geräte und Messbedingungen

Die quantitative Bestimmung der Thiolverbindungen 4MSP, 3SH und 3SHA erfolgte mittels Gaschromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie (GC-MS/MS). Die Analysen wurden auf einem 7890B-Gaschromatographen in Kombination mit einem 7010B Triple Quadrupole Massenspektrometer (beide Agilent Technologies, Santa Clara, USA) durchgeführt. Für die Probeninjektion kam ein Programmed Temperature Vaporisation (PTV)-Injektor zum Einsatz, ausgestattet mit einem PAL-Autosampler (Agilent Technologies).

Die Detektion und Quantifizierung erfolgte im Multiple Reaction Monitoring (MRM)-Modus. Die spezifischen Ionenübergänge für die Zielanalyten sowie die verwendeten internen Standards sind in Tab. 4 dargestellt.

Tab. 4: Detektierte Ionen am Gaschromatograph–Triple-Quadrupol-Massenspektrometer während der MRM-Phase

Verbindung	Vorläuferion [m/z]	Produktion [m/z]
4MSP-d10	228	46
4MSP-d10	110	46
4MSP	218	43
4MSP	100	43
3SHA-d5	265	73
3SHA-d5	205	59
3SHA	260	55
3SHA	200	59
3SH-d5	223	57
3SH-d5	178	55
3SH	218	67
3SH	173	61

Probenvorbereitung und Kalibrierung

Für die Festphasenextraktion (SPE) wurden 1-mL-Kartuschen mit 30 mg Lichrolut EN befüllt. Die Konditionierung der Säulen erfolgte schrittweise mit jeweils 1 mL tert-Butylmethylether, Methanol, deionisiertem Wasser, Tris-Puffer (0,1 M, pH 7,2) sowie 2 mL PHMB-Lösung (2 mM in 0,1 M Tris-Puffer, pH 7,2). Im Anschluss wurden 50 mL Weinproben, versetzt mit 50 µL eines internen Standard-Mixes (Konzentration: 1 mg/L je Verbindung) und 2 mL gesättigter EDTA-Lösung (bei Raumtemperatur), langsam über die SPE-Säulen appliziert.

Die Säulen wurden anschließend mit 1 mL deionisiertem Wasser, 5 mL eines Methanol-Weinsäurepuffer-Gemisches (60:40, v/v; Puffer: 5 g/L, pH 3,0) sowie nochmals mit 1 mL deionisiertem Wasser gewaschen. Nach dem Trockensaugen wurde die Matrix mit 4 mL n-Pentan eluiert und erneut getrocknet.

Die Elution der gebundenen Thiole erfolgte in drei Schritten à 0,8 mL mittels einer Lösung von 7 mg/mL N-Acetylcystein in einem Lösungsgemisch aus Dimethylsulfoxid und tert-Butylmethylether (20:80, v/v). Das Eluat wurde in einem 20 mL Vial mit Schraubverschluss aufgefangen und mit 3,5 mL einer 1 %igen Natriumhydrogencarbonatlösung versetzt, intensiv gemischt (Vortex) und

zwischendurch belüftet. Nach Phasentrennung wurde die Etherphase abgehoben und dieser Schritt einmal wiederholt. Die kombinierten Etherphasen wurden 2 Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert und anschließend über Natriumsulfat getrocknet.

Für die Derivatisierung wurde das getrocknete Extrakt in ein frisches Schraubverschluss-Vial mit 0,6 mL eines 1:1-Gemisches aus Dimethylsulfoxid und Acetonitril überführt. Danach wurden 50 µL einer 10 %igen 1-Iodhexan-Lösung in tert-Butylmethylether sowie ca. 50 mg Cäsiumcarbonat zugegeben und durchmischt. Die Ansätze wurden 30 Minuten bei 60 °C im Heizblock inkubiert, anschließend kurz abgekühlt und ca. 10 mg Natriumborhydrid hinzugefügt. Nach erneutem Schütteln erfolgte eine zweite Inkubation bei 60 °C für weitere 30 Minuten.

Die Reaktionsansätze wurden nach dem Abkühlen mit 0,6 mL Isohexan versetzt, mit 3 mL deionisiertem Wasser gewaschen und 2 Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert. Die obere organische Phase wurde abgenommen, dieser Waschvorgang wiederholt und die vereinigte organische Phase mit Natriumsulfat getrocknet. Anschließend wurde das Lösungsmittel in graduierten Glasröhrchen unter leichtem Stickstoffstrom bei 35 °C im Wasserbad bis auf ein Volumen von ca. 0,3 mL eingedampft. Die aufkonzentrierten Proben wurden in Mikrovials überführt und für die GC-MS/MS-Analyse bereitgestellt.

Die Kalibration erfolgte in Modellwein („Kunstwein“: 4 g/L Weinsäure, 12 % Ethanol, pH 3,2), in den definierte Konzentrationen der Zielanalyten eingearbeitet wurden. Der Kunstwein wurde aus deionisiertem Wasser hergestellt. Die Kalibrierstandards wurden identisch zu den Proben extrahiert und derivatisiert. Zur Bestimmung der Wiederfindungsraten wurden fünf unterschiedliche Weine mit 10 ng/L und 50 ng/L 4MSP bzw. mit 50 ng/L und 500 ng/L 3SHA und 3SH versetzt. Die Reproduzierbarkeit der Methode wurde anhand von vier verschiedenen Weinen in fünffacher Wiederholung überprüft.

Analytische Bedingungen

Die Analyse der Zielverbindungen erfolgte mittels Gaschromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie (GC-MS/MS) im Large Volume Injection-Modus (LVI). Das Injektionsvolumen betrug 60,0 µL (Solvent-Split-Modus). Der Purge Flow zum Splitventil wurde nach 1 Minute auf 50 mL/min eingestellt.

Als Trennsäule kam eine ZB-FFAP-Säule mit einer Länge von 30 m, einem Innendurchmesser von 0,25 mm und einer Filmdicke von 0,25 µm zum Einsatz (Phenomenex Inc., California, USA). Helium diente als Trägergas mit konstantem Fluss bei 1,2 mL/min.

Das Temperaturprogramm des PTV-Injektors war wie folgt eingestellt: initial 45 °C für 12 Sekunden, anschließend Aufheizung auf 250 °C mit einer Rate von 500 °C/min; keine Haltezeit am Endpunkt.

Das Ofentemperaturprogramm gliederte sich wie folgt:

- Initiale Temperatur: 45 °C (5 min Haltezeit)
- Aufheizung auf 110 °C mit 5 °C/min (keine Haltezeit)
- Weiterer Temperaturanstieg auf 230 °C mit 9 °C/min (keine Haltezeit)
- Endtemperatur: 250 °C mit 15 °C/min und einer Haltezeit von 7 Minuten

Die Quantifizierung erfolgte anhand der Peakflächen unter Verwendung eines internen Standards: 4MSP-d₁₀, 3SH-d₅ und 3SHA-d₅ wurden als isoto-penmarkierter Mixstandard eingesetzt.

Ergebnisse & Diskussion

Die entwickelte Analysemethode erwies sich als hochleistungsfähig und zuverlässig für die Quantifizierung der drei Zielverbindungen 4MSP, 3SH und 3SHA im Konzentrationsbereich von 10 bis 500 ng/L. Die Kalibrierkurven zeigten durchgehend eine exzellente Linearität ($R^2 > 0,99$), wie in den Abb. 1 bis 3 dargestellt. Die Wiederfindungsraten von 87,8 % bis 126,7 % (Tab. 5) liegen im akzeptablen Bereich für Methoden mit komplexer

mehrstufiger Probenvorbereitung. Abweichungen von über 120 % können durch Matrixeffekte oder geringe Variationen im Derivatisierungsschritt erklärt werden. Die geringen relativen Standardabweichungen (RSD: 0,88 %–6,64 %, Tab. 6) belegen die hohe Präzision und analytische Genauigkeit der Methode. Diese Werte decken sich mit der Literatur (vgl. Coetzee et al., 2018).

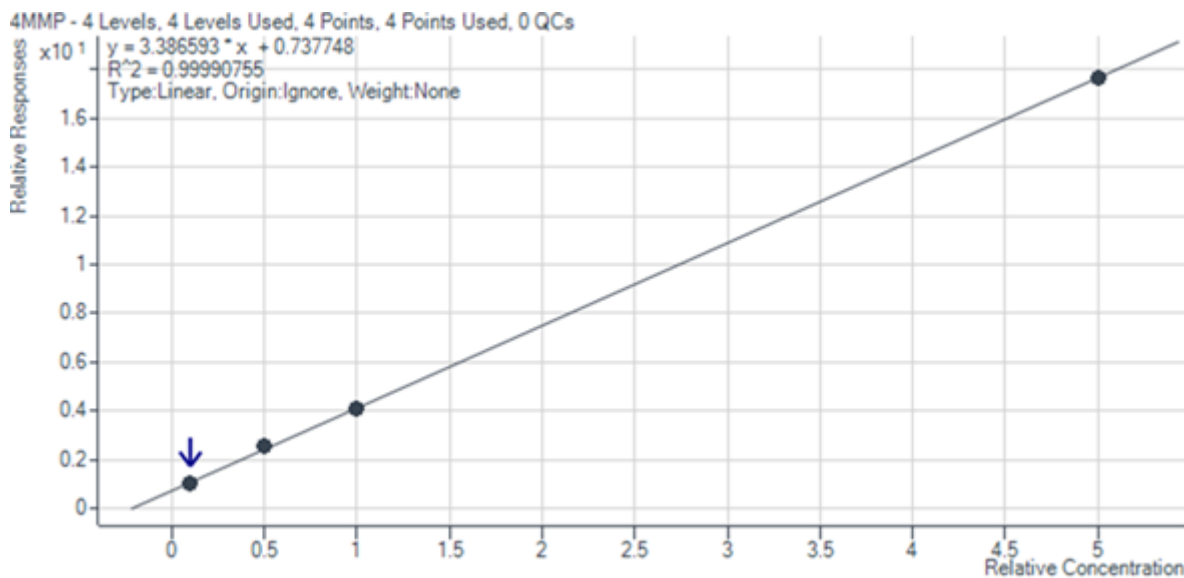


Abb. 1: Kalibrierungskurve 4-Methyl-4-sulfanyl-pentan-2-on im Bereich von 10 bis 500 ng/l

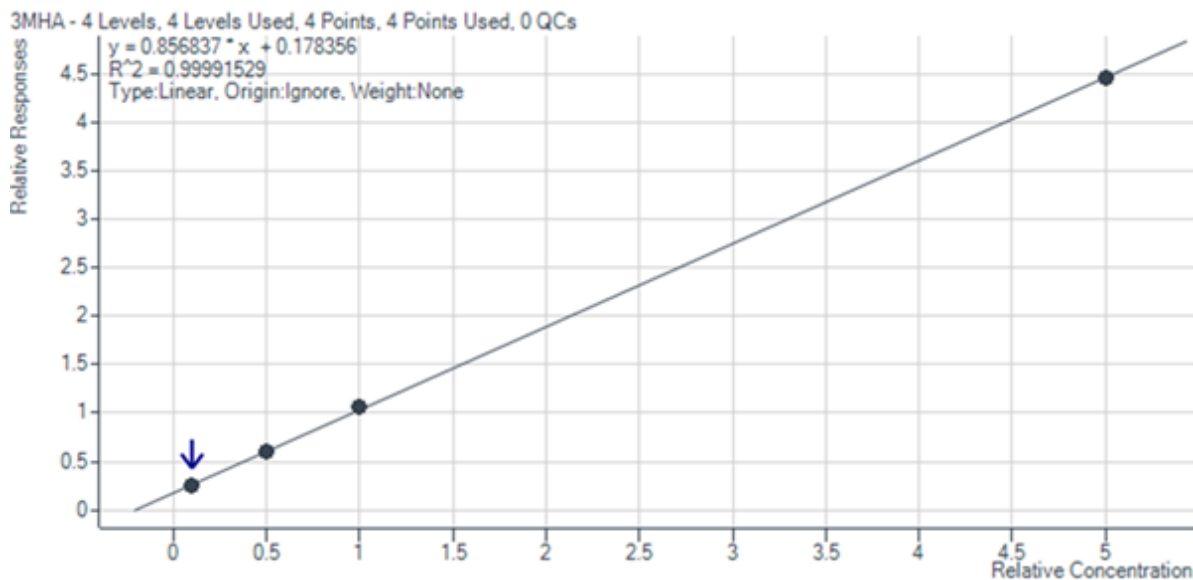


Abb. 2: Kalibrierungskurve 3-Sulfanylhexylacetat im Bereich von 10 bis 500 ng/l

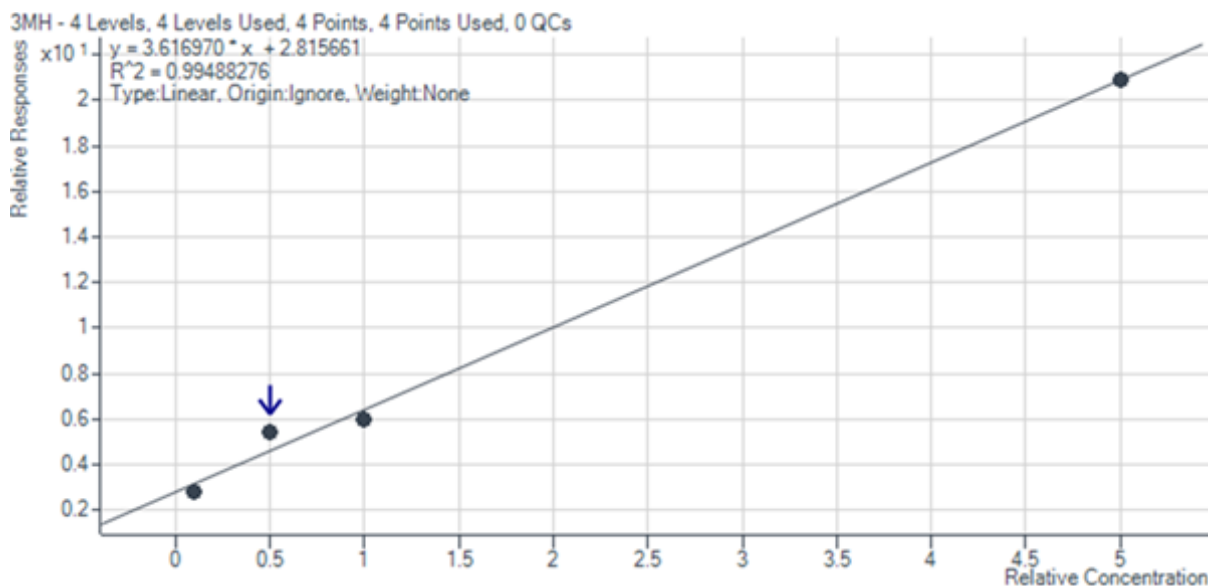


Abb. 3: Kalibrationskurve 3-Sulfanylhexan-1-ol im Bereich von 10 bis 500 ng/l

Tab. 5: Wiederfindungsrate in unterschiedlichen Weinen

4MSP	0-Probe [ng/l]	Zusatz von 10 ng/l [ng/l]	Wiederfindung %	Zusatz von 50 ng/l [ng/l]	Wiederfindung %
Probe 1	n.d.	12,1	121,0	48,2	96,5
Probe 2	n.d.	9,8	98,1	50,0	100,1
Probe 3	n.d.	12,7	126,7	47,1	94,2
Probe 4	n.d.	9,9	99,0	48,5	96,9
Probe 5	n.d.	8,8	87,8	46,8	93,5
3SHA	0-Probe [ng/l]	Zusatz von 50 ng/l [ng/l]	Wiederfindung %	Zusatz von 500 ng/l [ng/l]	Wiederfindung %
Probe 1	3,4	53,3	99,9	517,6	102,8
Probe 2	n.d.	52,0	104,1	503,2	100,6
Probe 3	n.d.	53,4	106,8	512,6	102,5
Probe 4	3,4	55,7	104,6	486,8	96,7
Probe 5	2,6	53,4	101,6	489,1	97,3
3SH	0-Probe [ng/l]	Zusatz von 50 ng/l [ng/l]	Wiederfindung %	Zusatz von 500 ng/l [ng/l]	Wiederfindung %
Probe 1	n.d.	50,3	100,6	504,3	100,9
Probe 2	n.d.	54,8	109,6	482,9	96,6
Probe 3	n.d.	55,1	110,2	518,0	103,6
Probe 4	n.d.	47,7	95,4	503,3	100,7
Probe 5	n.d.	56,3	112,6	506,6	101,3

Tab. 6: Reproduzierbarkeit in unterschiedlichen Weinen

		Wf1%	Wf2%	Wf3%	Wf4%	Wf5%	Rel.StdAbw %
WW 1	4MSP Results [ng/l]	14	15	13	13	14	6,64
	3SHA Results [ng/l]	41	44	43	40	40	4,53
	3SH Results [ng/l]	278	271	285	281	288	2,34
WW 2	4MSP Results [ng/l]	22	19	20	20	20	6,21
	3SHA Results [ng/l]	134	138	129	136	128	3,24
	3SH Results [ng/l]	117	126	120	123	119	3,03
RW 1	4MSP Results [ng/l]	14	14	13	14	12	5,09
	3SHA Results [ng/l]	121	123	120	118	121	1,42
	3SH Results [ng/l]	167	172	158	165	164	3,01
RW 2	4MSP Results [ng/l]	50	52	53	52	55	3,47
	3SHA Results [ng/l]	208	206	206	205	203	0,88
	3SH Results [ng/l]	205	207	198	204	201	1,74

Bereits während der Methodenetablierung wurde ersichtlich, dass existierende Ansätze aus der Fachliteratur – insbesondere PFB- bzw. Propionat-Derivatisierungen nach Mateo-Vivaracho et al. (2007), Rodríguez-Bencomo et al. (2009) und Musumeci et al. (2015) – nicht ohne Weiteres auf die in dieser Untersuchung betrachteten Matrices, Konzentrationsbereiche und Geräteeinstellungen übertragbar waren. Somit wurden mehrere zentrale Prozessschritte gezielt weiterentwickelt. Dazu gehörte unter anderem die Auswahl und Vorbehandlung der SPE-Kartuschen sowie die Optimierung der Elutionsbedingungen, bei welcher sich eine Lösung von N-Acetylcystein in DMSO/MTBE als wirkungsvoll erwies. Außerdem wurden die Bedingungen der Iod-Derivatisierung systematisch untersucht und angepasst, da die in der Literatur beschriebenen Parameter (u. a. Musumeci et al., 2015) in Weinmatrix nicht die erforderliche Reproduzierbarkeit zeigten. Darüber hinaus wurde ein reduktiver Nachbehandlungsschritt mit Natriumborhydrid implementiert, welcher die Signalstabilität und Peakform im MRM-Modus signifikant verbesserte. Darüber hinaus mussten die LVI- und Solvent-Vent-Parameter des Injektors sowie der MRM-Übergang im Triple-Quadrupol-MS optimiert werden, um ein maximales Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu erzielen. Diese Prozessschritte ermöglichen den wesentlichen methodischen Fortschritt der vorliegenden Arbeit und bilden die Grundlage für die analytischen Kennzahlen.

Die Nachweisgrenzen (Limit of Detection, LOD) sowie die Quantifizierungsgrenzen (Limit of Quantification, LOQ) wurden gemäß dem Signal-Rausch-Verhältnis (S/N) bestimmt, wobei ein Verhältnis von 3:1 für die LOD und 10:1 für die LOQ zugrunde gelegt wurde. Die berechneten LODs lagen bei 6,8 ng/L für 4MSP, 5,9 ng/L für 3SHA und 9,3 ng/L für 3SH; die entsprechenden LOQs bei 22,7 ng/L (4MSP), 19,6 ng/L (3SHA) und 31,0 ng/L (3SH). Diese Ergebnisse unterstreichen die hohe Sensitivität der Methode für die Detektion flüchtiger schwefelhaltiger Aromakomponenten im niedrigen ng/L-Bereich. Musumeci et al. (2015) beschrieben die Nachweisgrenzen für 4-MSP von 0,9 ng/L, für 3-SH 1 ng/L bzw. 3-SHA 17 ng/L unter Verwendung einer HS-SPME-basierten Derivatisierung mit Propionat-Reagenzien. Mateo-Vivaracho et al. (2007) erreichten mit einer PFB-Derivatisierung und negativer chemischer Ionisation noch niedrigere Nachweisgrenzen von 0,1 ng/L für 4-MSP, 0,6 ng/L für 3-SHA und 7 ng/L für 3-SH, was jedoch mit dem Einsatz halogener Reagenzien und längeren Aufarbeitungszeiten verbunden war.

Zur besseren Einordnung wurde eine Tabelle mit detaillierten Ergebnissen zu den bisherigen Methoden der Analyse von varietalen Thiolen gegenübergestellt (siehe Tab. 7). Die in der Fachliteratur beschriebenen Methoden basieren in der Regel auf SPME-, SBSE- oder halogenierten Derivatisierungsreagenzien wie PFBB. Obwohl diese Reagenzien teilweise eine geringere LOD ermöglichen, sind sie mit einem höheren Materialaufwand,

empfindlichen Spezialkomponenten oder dem Umgang mit toxikologisch kritisch eingestuften Reagenzien verbunden. Die in dieser Arbeit eingesetzte Kombination aus Festphasenextraktion und Iod-Derivatisierung nutzt ausschließlich konventionelle Lösungsmittel und schließt somit halogenierte oder reaktive Reagenzien aus. Dies führt zu

einer verbesserten Arbeitssicherheit und ökologischen Bewertung. Gleichzeitig liegen die erzielten Nachweisgrenzen im Bereich anderer etablierter Verfahren, wodurch die Methode eine praxistaugliche und ressourcenschonende Alternative darstellt.

Tab. 7: Vergleich ausgewählter analytischer Methoden zur Bestimmung varietaler Thiole

Studie / Plattform	Probenvorbereitung / Derivatisierung	Detektion	LOD (ng/L)
Diese Arbeit	SPE-Extraktion; Derivatisierung mit 1-Iodhexan & Cs ₂ CO ₃ ; LVI-PTV	GC-MS/MS (MRM)	6,8 / 9,3 / 5,9
Mateo-Vivaracho et al. (2007)	LLE + PFBBR-Derivatisierung	GC-NICI-MS	0,1 / 7 / 0,6
Rodríguez-Bencomo et al. (2009)	HS-SPME + PFBBR-Derivatisierung	GC-MS	< Geruchsschwelle
Musumeci et al. (2015)	Extractive Alkylolation + HS-SPME	GC-EI-MS	0,9 / 1 / 17
Ochiai & Kishimoto (2015)	der-SBSE (Twister)	TD-GC-MS/MS	0,20 / 27 / 0,19

Das hier angewandte Verfahren zeichnet sich im Vergleich zu den in der Literatur beschriebenen Methoden, wo eine direkte Derivatisierung oder adsorptive Extraktionstechniken erfolgen, durch eine deutlich verbesserte Matrixreinigung mittels Festphasenextraktion und anschließender Iod-Derivatisierung aus, welches eine weitgehende Eliminierung von Matrixinterferenzen und eine sehr gute Reproduzierbarkeit erlaubt.

Zusätzlich weist die entwickelte Methode mehrere praktische und ökologische Vorteile gegenüber bestehenden Verfahren auf. Der Arbeitsablauf ist auf eine routinetaugliche Anwendung im weinanalytischen Labor ausgelegt und kommt ohne spezielle und besonders teure Materialien wie SPME-Fasern aus. Durch den Einsatz isotope markierter interner Standards lassen sich Matrixeffekte kompensieren, was zu hoher Reproduzierbarkeit der Messungen beiträgt. Auch in zeitlicher und apparativer Hinsicht erweist sich das Verfahren als effizient: Der Extraktions- und Derivatisierungsablauf nimmt weniger als zwei Stunden in Anspruch und kann weitgehend automatisiert werden. Da ausschließlich gängige Lösungsmittel wie DMSO und Acetonitril verwendet werden und vollständig auf halogenierte Reagenzien verzichtet wird, entspricht die Methode zudem in hohem Maß den Prinzipien der „Green Chemistry“. Durch den Wegfall von NICI- bzw. PFB-basierten Ansätzen entsteht kein Risiko durch toxische oder schwer

entsorgbare Chemikalien, welches das ökologische Profil der Methode wesentlich verbessert. Die im niedrigen ng/L-Bereich liegenden LOD- und LOQ-Werte zeigen, dass die erzielte Empfindlichkeit für die Routinebestimmung in Weinproben mehr als ausreichend ist, während der analytische Aufwand gleichzeitig moderat bleibt. In Summe steht somit eine praxistaugliche und nachhaltige Alternative zu anderen Verfahren zur Verfügung.

Obwohl die Geruchsschwelle von 4MSP bei etwa 0,8 ng/L liegt (Coetzee et al., 2018), können auch höhere Konzentrationen im zweistelligen ng/L-Bereich sensorisch und analytisch relevant sein. Im Vergleich zu früheren Verfahren mit ähnlicher Derivatisierungsstrategie (z. B. Herbst-Johnstone et al., 2013) bietet die hier eingesetzte GC-MS/MS-Methode eine gesteigerte Empfindlichkeit und verbesserte Nachweisleistung, insbesondere hinsichtlich der Robustheit gegenüber Matrixeffekten.

Die Analyse der Weinproben ergab eine ausgeprägte rebsortenspezifische Verteilung der Thiolverbindungen. In Weinen der Rebsorte Grüner Veltliner wurden mit wenigen Ausnahmen nur geringe Mengen an 4MSP detektiert. 3SHA konnte hingegen in sämtlichen Proben nachgewiesen werden (19,2–310,9 ng/L), während 3SH durchgängig in vergleichsweise hohen Konzentrationen vorlag (85,0–385,3 ng/L). Diese Befunde weisen

auf ein grundsätzliches Potenzial zur Bildung thiolbasierter Aromen auch außerhalb der klassischen Sauvignon-Blanc-Typizität hin.

In Sauvignon Blanc-Weinen wurden erwartungsgemäß besonders hohe Konzentrationen von 4MSP gemessen (bis zu 24,4 ng/L), was das für diese Rebsorte charakteristische, vegetabil-tropische Aromaprofil bestätigt (vgl. Coetzee et al., 2012). Auch 3SHA (115,7–183,8 ng/L) und 3SH (89,3–194,7 ng/L) waren in sämtlichen Proben in signifikanten Mengen vorhanden.

Der Gemischte Satz, eine aus mehreren weißen Rebsorten zusammengestellte Kategorie, zeigte eine große intraindividuelle Variabilität. 4MSP wurde nur in einzelnen Proben über der Nachweisgrenze quantifiziert (bis 16,6 ng/L). 3SHA konnte – mit einer Ausnahme – in allen Proben detektiert werden (24,7–181,3 ng/L), während insbesondere vier Weine durch außergewöhnlich hohe 3SH-Gehalte (>300 ng/L) auffielen.

In Blaufränkisch-Weinen konnte 3SHA in keiner der untersuchten Proben nachgewiesen werden, während 4MSP in Spuren bis zu 32,0 ng/L vorkam. Bemerkenswert war die durchgängig hohe Präsenz von 3SH (220,8–379,1 ng/L), was auf die potenzielle Bedeutung dieser Verbindung für das Aromaprofil auch in Rotweinen hinweist.

Die Rebsorte Zweigelt zeigte konsistent nachweisbare Konzentrationen von 4MSP (2,5–27,9 ng/L) und 3SHA (117,3–185,8 ng/L). Die 3SH-Gehalte schwankten dagegen deutlich (86,8–258,1 ng/L), was auf vinifikatorische Einflüsse wie Reifegrad, Hefestamm oder Gärführung schließen lässt.

In den aus Blauer Wildbacher hergestellten Schilcher-Roséweinen wurden teilweise sehr hohe 3SH-Konzentrationen (>300 ng/L) gemessen. Die 4MSP-Werte lagen zwischen 0,0 und 10,9 ng/L, während 3SHA stark schwankte (0,0–217,4 ng/L).

Insgesamt belegen die Ergebnisse die ausgeprägte Rebsortenabhängigkeit flüchtiger Thiolverbindungen im Wein und unterstreichen zugleich die Bedeutung vinifikatorischer Strategien für die gezielte Steuerung des Aromapotenzials. Die hohe Sensitivität und Reproduzierbarkeit der Methode macht sie zu einem geeigneten Instrument für den Einsatz in der weinaromatischen Forschung und der qualitätsorientierten Kellerwirtschaft.

Zur Veranschaulichung der chromatographischen Trennung wurden exemplarisch zwei Chromatogramme ausgewählter Weine beigefügt (Abb. 4 und 5).

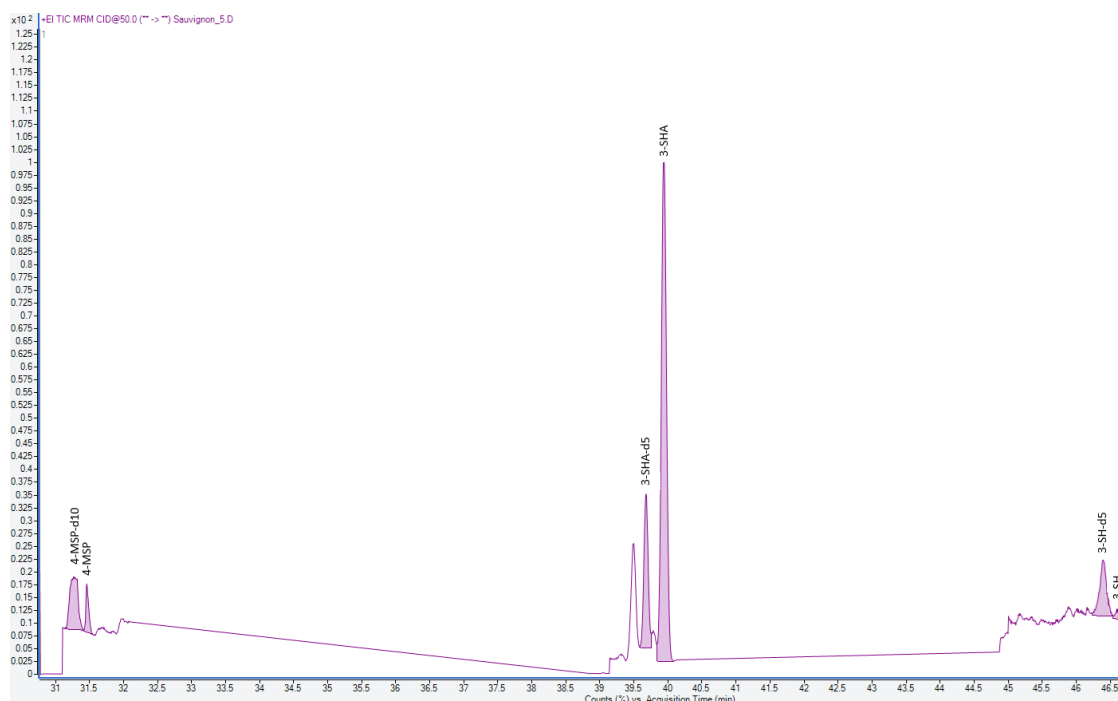


Abb. 4: Chromatogramm aus einem Sauvignon Blanc-Wein

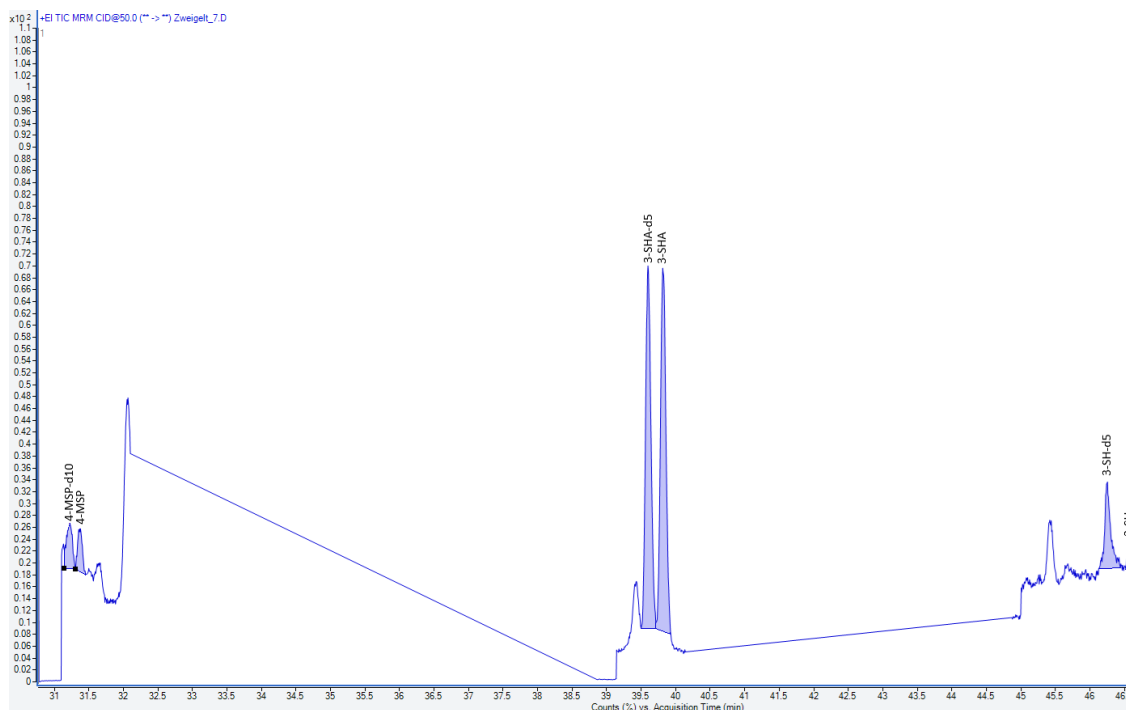


Abb. 5: Chromatogramm aus einem Zweigelt-Wein

Für die wertvollen Hinweise und die sorgfältige Durchsicht im Rahmen der finalen Manuskriptanpassung danke ich Herrn Nikolaus Schlögl, M.Sc. M.Ed., sehr herzlich.

Literatur

- Anfang, N., Brajkovich, M., Goddard, M. R.** 2009: Co-fermentation with *Pichia kluyveri* increases varietal thiol concentrations in Sauvignon Blanc. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 15: 1–8.
- Coetzee, C., du Toit, W. J.** 2012: A comprehensive review on Sauvignon blanc aroma with a focus on certain positive volatile thiols. *Food Research International* 45 (1): 287–298.
- Coetzee, C., du Toit, W. J.** 2015: Sauvignon Blanc Wine: Contribution of Ageing and Oxygen on Aromatic and Non-aromatic Compounds and Sensors Composition: A Review. *South African Journal of Enology and Viticulture* 36 (3): 347–365.
- Coetzee, C., Schulze, A., Mokwena, L., Du Toit, W. J., Buica, A.** 2018: Investigation of thiol levels in young commercial South African *Sauvignon Blanc* and *Chenin Blanc* wines using propiolate derivatization and GC-MS/MS. *South African Journal of Enology and Viticulture* 39 (2): 180–184.
- Herbst-Johnstone, M., Araújo, L. D., Allen, T. A., Logan, G., Nicolau, L., Kilmartin, P. A.** 2013: Effects of mechanical harvesting on ‘Sauvignon Blanc’ aroma. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 19 (3): 316–328.
- Mateo-Vivaracho, L., Cacho, J., Ferreira, V.** 2006: Automated analysis of 2-methyl-3-furanthiol and 3-mercaptohexyl acetate at ng L⁻¹ level by head-space solid-phase microextraction with on-fibre derivatisation and gas chromatography–negative chemical ionisation mass spectrometric determination. *Journal of Chromatography A* 1121 (4): 1–9.
- Mateo-Vivaracho, L., Cacho, J., Ferreira, V.** 2007: Quantitative determination of wine polyfunctional mercaptans at nanogram per liter level by gas chromatography–negative ion mass spectrometric analysis of their pentafluorobenzyl derivatives. *Journal of Chromatography A* 1146 (2): 242–250.

- Mateo-Vivaracho, L., Cacho, J., Ferreira, V.** 2008: Improved solid-phase extraction procedure for the isolation and in-sorbent pentafluorobenzyl alkylation of polyfunctional mercaptans: Optimised procedure and analytical applications. *Journal of Chromatography A* 1185 (1): 9–18.
- Mateo-Vivaracho, L., Cacho, J., Ferreira, V.** 2009: Selective preconcentration of volatile mercaptans in small SPE cartridges: Quantitative determination of trace odor-active polyfunctional mercaptans in wine. *Journal of Separation Science* 32 (21): 3845–3853.
- Musumeci, L. E., Ryona, I., Pan, B. S., Loscos, N., Feng, H., Cleary, M. T., Sacks, G. L.** 2015: Quantification of Polyfunctional Thiols in Wine by HS-SPME-GC-MS Following Extractive Alkylation. *Molecules* 20 (7): 12280-12299.
- Nicolau, L., Benkwitz, F., Tominaga, T.** 2006: Characterising the aroma of New Zealand Sauvignon Blanc. *The Australian & New Zealand Grapegrower & Winemaker* 509: 46-49.
- Ochiai, N., Sasamoto, K., Kishimoto, T.** 2015: Development of a Method for the Quantitation of Three Thiols in Beer, Hop, and Wort Samples by Stir Bar Sorptive Extraction with in Situ Derivatization and Thermal Desorption-Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 5;63(30): 6698-706.
- Peyrot des Gachons, C., Tominaga, T., Dubourdieu, D.** 2002: Localization of S-cysteine conjugates in the berry: Effect of skin contact on aromatic potential of *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc must. *American Journal of Enology and Viticulture* 53 (2): 144–146.
- Peyrot des Gachons, C., Tominaga, T., Dubourdieu, D.** 2002: Sulfur aroma precursor present in S-glutathione conjugate form: Identification of S-3-(Hexan-1-ol)-glutathione in must from *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon Blanc. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (14): 4076–4079.
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdieu, D.** 2000: The chemistry of wine. In: *Handbook of Enology, Volume 2: Stabilization and Treatments*. Chichester: Wiley, 1. Aufl.: S. 198.
- Rodríguez-Bencomo, J. J., Schneider, R., Lepoutre, J. P., Rigou, P.** 2009: Improved method to quantitatively determine powerful odorant volatile thiols in wine by headspace solid-phase microextraction after derivatisation. *Journal of Chromatography A* 1216 (30): 5640–5646.
- Roland, A., Schneider, R., Charrier, F., Cavelier, F., Rossignol, M., Razungles, A.** 2011: Distribution of varietal thiol precursors in the skin and the pulp of Melon B. and Sauvignon Blanc grapes. *Food Chemistry* 125: 139–144.
- Roland, A., Vialaret, J., Razungles, A., Schneider, R.** 2010: Evolution of S-cysteinylation and S-glutathionylation thiol precursors during oxidation of Melon B. and Sauvignon blanc musts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58 (7): 4406–4413.
- Tominaga, T., Murat, M. L., Dubourdieu, D.** 1998: Development of a method for analyzing the volatile thiols involved in the characteristic aroma of wines made from *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon Blanc. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46 (3): 1044–1048.
- Wardencki, W.** 1998: Problems with the determination of environmental sulphur compounds by gas chromatography. *Journal of Chromatography A* 793 (1): 1–19.
- Wüst, M.** 2003: Wein – Qualität entscheidet sich in Nanogramm: Zur Biochemie des sortentypischen Weinaromas. *Chemie in unserer Zeit* 37 (1): 8–17.

Eingelangt am 12. August 2025