

Quantitative Hochdurchsatzanalyse von Schlüsselgeruchstoffen in Lebensmitteln mittels UHPLC-MS/MS

Markus Bösl

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Life Sciences der Technischen Universität München zur Erlangung eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Mirjana Minceva

Prüfer*innen der Dissertation:

1. Prof. Dr. Thomas F. Hofmann
2. Prof. Dr. Michael Rychlik

Die Dissertation wurde am 07.06.2023 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die TUM School of Life Sciences am 17.10.2023 angenommen.

I. Vorbemerkungen

Der praktische Teil dieser Arbeit wurde von August 2016 bis Dezember 2021 am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie und molekulare Sensorik der TUM School of Life Sciences an der Technischen Universität München unter der Leitung von Prof. Dr. Thomas Hofmann durchgeführt.

Die wissenschaftlichen Veröffentlichungen und Abbildungen wurden mit Genehmigung von Elsevier (Abbildung 1 links), Springer Nature (Abbildung 1 rechts), John Wiley and Sons (Abbildung 2), Taylor & Francis Group (Abbildung 12) und der American Chemical Society (Abbildung 18) übernommen. Abbildungen 23, 24 und 27 aus der wissenschaftlichen Veröffentlichung Bösl et al. (2023), sowie die Veröffentlichung selbst wurden mit Genehmigung der American Chemical Society (Copyright 2023) übernommen. Die wissenschaftliche Veröffentlichung Bösl et al. (2021) wurde mit Genehmigung der American Chemical Society (Copyright 2021) abgedruckt.

II. Danksagung

Zu dem Erfolg dieser Arbeit haben mehrere Menschen beigetragen, denen ich hiermit ausdrücklich danken möchte.

Meinem Doktorvater Prof. Thomas Hofmann danke ich herzlich für die Überlassung des spannenden Themas, seine wissenschaftlichen Ratschläge, die hervorragenden Arbeitsbedingungen und das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Ein besonders großer Dank gilt auch den Arbeitsgruppenleitern, die mich während meiner Promotion unterstützten. Andreas Dunkel, Prof. Corinna Dawid und Dr. Timo Stark danke ich für ihre sehr gute Betreuung und die wissenschaftliche Unterstützung. Besonderer Dank geht auch an Dr. Timo Stark für das sorgfältige und gleichsam schnelle Korrekturlesen von Publikationen und dieser Arbeit.

Für die praktische Unterstützung bedanke ich mich ausdrücklich bei meinen fleißigen Masteranden Daniela Hartl und Anja Dollinger.

Für die Überlassung einiger sehr wertvoller isotopen markierter Standards möchte ich mich beim Leibniz-Institut für Lebensmittel-Systembiologie und im Besonderen bei Dr. Stephanie Frank und Dr. Johanna Kreißl bedanken.

Für all die schönen Erlebnisse inner- und außerhalb des Lehrstuhls und das gute Arbeitsklima möchte ich mich bei allen Mitarbeitenden bedanken. Die Hilfsbereitschaft bei wissenschaftlichen so wie menschlichen Themen war im Arbeitskreis riesig. Ich bin sehr froh über die Erfahrungen, die ich am Institut gemacht habe und werde sie in guter Erinnerung behalten.

Großer dank geht auch an alle NMR-Operatoren für die Messungen von Proben.

Den Laboren 1 und 2, von denen ich während meiner Zeit am Institut Teil sein durfte, möchte ich für die gute Zusammenarbeit und die lustigen Gespräche danken. Die Kaffeepausen im Labor 1 Nebenraum werden mir in besonderer Erinnerung bleiben.

Ein großer Dank geht an meine Familie und meinen Patenonkel Rudolf Fischl, für ihre stetige Unterstützung. Ebenso möchte ich allen meinen FreundInnen für ihre psychische Unterstützung danken.

III. Kurzfassung

Die Analyse von Aromastoffen mittels Flüssigchromatographie (LC) anstelle der Gaschromatographie (GC) ermöglicht die simultane Analyse von Aromastoffen und Geschmacksstoffen auf einer einzigen Analyseplattform. Durch die schnelle Probenvorbereitung und kurzen Messzeiten können Proben dabei im Hochdurchsatz analysiert werden. Wegen der hohen Flüchtigkeit und schlechten Ionisierbarkeit bei der „Electrospray Ionization“ (ESI) werden die Aromastoffe vor der Analyse mittels Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) einer Derivatisierung unterzogen. Für die Analyse von Aromastoffen mit einer Carbonylgruppe konnte dabei die Derivatisierung mit 3-Nitrophenylhydrazin (3NPH) etabliert werden.

Der Ansatz der simultanen Quantifizierung von Aroma- und Geschmacksstoffen bzw. die Analyse von Aromastoffen mittels LC-MS/MS im Allgemeinen konnte bisher nur auf eine kleine Auswahl von Lebensmitteln und Analyten angewandt werden. Das Ziel dieser Studie war es deshalb, die breite Anwendbarkeit der Methode von Aromastoff-Analytik mittels LC-MS zu belegen. Dazu wurde eine schnelle Hochdurchsatzmethode für die Quantifizierung der in Lebensmitteln am häufigsten vorkommenden Aromastoffen, den sogenannten Generalisten, entwickelt.

Da die Gruppe der Generalisten sowohl Alkohole als auch Thiole enthält, die sich nicht mit 3NPH umsetzen lassen, wurde eine neue Derivatisierungsmethode entwickelt. Daher wurde Dimethyl-tolyl-glycidyl ammonium (DGTA) synthetisiert, welches eine reaktive Epoxidgruppe, sowie eine ähnliche Polarität wie 3NPH und eine gute Ionisierbarkeit bei der ESI aufwies. Nach Optimierung der Derivatisierungsparameter wurde eine effiziente Methode zur Analyse flüchtiger Alkohole, Phenole und Thiole mittels LC-MS/MS entwickelt.

Mit der Kombination der neu entwickelten DGTA-Derivatisierung sowie der etablierten 3NPH-Derivatisierung für Carbonylgruppen war es möglich, zu zeigen, dass 23 der 27 Generalisten akkurat mittels LC-MS/MS quantifiziert werden können. Die Quantifizierung der untersuchten Analyten wurde erfolgreich in verschiedenen Matrices validiert und in diversen Lebensmitteln durchgeführt.

Diese Methode ist für die Hochdurchsatzanalyse besonders geeignet, da sie hohe Genauigkeit aufgrund der Verwendung von stabilisotopenmarkierten internen Standards aufweist und weil die Probenextraktion durch Bead-Beater-Homogenisierung, schnell und vielseitig ist und nur geringe Probenmengen benötigt (0,5 g). Außerdem sind die verwendeten Derivatisierungen effizient und die LC-MS/MS Analysenzeiten sind gering (12 min).

IV. Abstract

Liquid chromatography (LC) enables the unified analysis of aroma and flavor compounds on a single analysis platform. Due to the fast sample preparation and short measuring times, samples can be analyzed in high throughput. Because of their high volatility and poor ionizability in Electrospray Ionization (ESI), flavor compounds must undergo derivatization prior to analysis by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). For the analysis of aroma compounds with a carbonyl group, derivatization with 3-nitrophenylhydrazine (3NPH) has become established.

However, the approach of simultaneous quantification of aroma and flavor compounds, or the analysis of aroma compounds by LC-MS in general, has so far only been applied to a small selection of foods and analytes. The aim of this study was therefore to demonstrate the broad applicability of the analysis of aroma compounds by LC-MS/MS. For this purpose, a rapid high-throughput method was developed for the quantification of the most abundant aroma compounds, the so-called generalists.

Since the group of generalists contains both alcohols and thiols that cannot be derivatized with 3NPH, a new derivatization method had to be developed. Therefore, the synthesis of dimethyl-tolyl-glycidyl ammonium (DGTA) was carried out, which has a reactive epoxide group, similar polarity to 3NPH, and good ionizability in ESI. After optimizing the derivatization parameters, an efficient method was developed for the analysis of volatile alcohols, phenols and thiols by LC-MS/MS.

With the combination of the newly developed DGTA derivatization as well as the established 3NPH derivatization for carbonyl groups, it was possible to highlight that 23 of the 27 generalists could be accurately quantified by LC-MS/MS. The quantification of the studied analytes was successfully validated in different matrices and performed in various foods.

The high accuracy due to the use of stable isotope labeled internal standards, the rapid and versatile extraction by bead beater homogenization requiring only small sample volumes (0.5 g), the efficient derivatizations and the fast LC-MS/MS analyses (12 min) make this method particularly suitable for high throughput demands.

V. Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden in international anerkannten Zeitschriften sowie als Fachvorträge auf Tagungen vorgestellt:

Rapid, High-Throughput Quantitation of Odor-Active 2-Acetyl Azaheterocycles in Food Products by UHPLC–MS/MS

Markus Bösl, Andreas Dunkel und Thomas F. Hofmann

Journal of Agricultural and Food Chemistry **2021** 69 (4), 1405–1412

DOI: 10.1021/acs.jafc.0c07144

Toward High-Throughput Analysis of Aroma Compounds Using Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry: Screening of Key Food Odorants in Various Foods

Markus Bösl, Andreas Dunkel, Daniela Hartl, Anja Dollinger, Andrea Spaccasassi, Timo D. Stark, Thomas F. Hofmann, Corinna Dawid

Journal of Agricultural and Food Chemistry

DOI: 10.1021/acs.jafc.3c00935

Unified quantitation of flavor-active compounds and precursors by means of LC-MS

Forschungsseminar der Lebensmittelchemie in Freising am 27. Mai 2019 (Fachvortrag)

Hochdurchsatz-Quantifizierung von geruchsaktiven 2-Acetyl Azaheterozyklen in Lebensmitteln mittels UHPLC-MS/MS

Arbeitstagung des Regionalverbandes der lebensmittelchemischen Gesellschaft Bayern am 9. März 2021 (Fachvortrag)

DOI:10.1002/lemi.202151009

VI. Abkürzungsverzeichnis

2ACPY	2-Acetyl-1-pyrroline
OR	Olfaktorische Rezeptoren
2AP	2-Acetylpyrazine
2AT	2-Acetylthiazoline
2ATHP	2-Acetyl-1,4,5,6-tetrahydropyridine
3NPH	3-Nitrophenylhydrazine
AEDA	Aromaextraktverdünnungsanalyse
AP	2-Acetyl-1-pyrroline
APCI	Atmospheric-pressure chemical ionization
BM	Bead Mill
C18	Octadecyl
CI	Chemical Ionization
DGTA	Dimethyl-glycidyl-tolyl-ammonium
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EI	Electron Ionization
ESI	Electrospray Ionization
FD	Flavor dilution Factor
FID	Flammenionisationsdetektor
GC	Gaschromatographie
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
GC-O	Gaschromatographie-Olfaktometrie
GTMA	Glycidyltrimethyl Ammonium
HPL	Hydroperoxid-Lyasen
HS	Headspace
IS	Stabilisotopenmarkierte interne Standards

KFO	Schlüsselaromastoffe
LC-MS	Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie
LoQ	Bestimmungsgrenze
LOX	Lipoxygenasen
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältniss
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MS	Massenspektrometrie
OAV	Odor activity value
Q	Quadrupol
qNMR	Quantitative Kernspinresonanz
RPLC	Reversed Phase Flüssigchromatographie
SAFE	Solvent Assisted Flavor Evaporation
SBSE	Stir-Bar Sorptive Extraction
SIVA	Stabilisotopenverdünnungsanalyse
SPE	Solid-Phase Extraction
SPME	Solid-Phase Microextraction
TQMS	Triple Quadrupol Massenspektrometer
UHPLC-MS/MS	Ultra-Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie mit Fast-Scanning-Tandem-Massenspektrometern

VII. Inhaltsverzeichnis

I.	Vorbemerkungen.....	b
II.	Danksagung.....	c
III.	Kurzfassung.....	d
IV.	Abstract	e
V.	Publikationen.....	f
VI.	Abkürzungsverzeichnis	g
VII.	Inhaltsverzeichnis	i
1	Einleitung	1
1.1	Aromastoffe in Lebensmitteln	1
1.2	Menschliche Wahrnehmung der Aromastoffe	1
1.2.1	Geruchsrezeptoren und olfaktorisches System	1
1.2.2	Olfaktorische Signaltransduktion auf Rezeptorebene	2
1.2.3	Wechselwirkung zwischen olfaktorischen Rezeptoren und Aromastoffen.....	3
1.2.4	Kombinatorischer Code der Geruchswahrnehmung	4
1.3	Entstehung von Aromastoffen	8
1.3.1	Maillard-Reaktion	8
1.3.2	Ehrlich-Abbau.....	10
1.3.3	Lipidoxidation	11
1.4	Analytik von Aromastoffen.....	15
1.4.1	Gaschromatographie.....	15
1.4.2	Aktivitätsorientierte Analyse von Aromastoffen und SENSOMICS-Konzept.....	19
1.5	Motivation und Zielsetzung.....	21
2	Eingebundene Publikationen	23
2.1	<i>Rapid, High-Throughput Quantitation of Odor-Active 2-Acetyl-Azaheterocycles in Food Products by UHPLC-MS/MS (Publikation I)</i>	23

2.2	<i>Toward High-Throughput Analysis of Aroma Compounds Using Ultra-High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry: Quantitation of Key Food Odorants in Various Foods (Publikation II)</i>	24
3	Angewandte Methoden und Instrumente	26
3.1	UHPLC-MS/MS-System	26
3.2	LC-MS-Aromastoffanalytik.....	28
3.3	Derivatisierungen in der LC-MS-Aromastoffanalytik	29
4	Ergebnisse	31
4.1	Entwicklung einer Derivatisierung für flüchtige Alkohole, Thiole und Amine	31
4.1.1	Diskussion.....	33
4.2	Homogenisierung und Extraktion.....	34
4.2.1	Diskussion.....	35
4.3	Hochdurchsatzanalyse der Aromastoffgeneralisten mittels UHPLC-MS/MS	36
4.3.1	Neueinteilung der Schlüsselaromastoffe	36
4.3.2	Methodenentwicklung zur Quantifizierung der Generalisten mittels LC-MS/MS	40
4.3.3	Diskussion.....	44
5	Diskussion und Zusammenfassung	51
5.1	Aromastoffanalytik mittels LC-MS.....	51
5.2	Zusammenfassung und Ausblick.....	54
6	Literaturverzeichnis	55
7	Publikationen.....	66

1 Einleitung

1.1 Aromastoffe in Lebensmitteln

Die Präferenz von Lebensmitteln ist maßgeblich von deren Aroma und vom individuellen Geruchssinn der Konsumenten abhängig. Der wahrgenommene Geruchseindruck von Lebensmitteln wird durch eine distinkte, oft komplexe Mischung mehrerer geruchsaktiver Substanzen, den sogenannten Aromastoffen ausgelöst (Berger 1995). Aromastoffe, deren Wahrnehmung in der Nase stattfindet, sind per Definition flüchtige Substanzen. Dabei handelt es sich um meist hydrophobe, kleine Moleküle, die verschiedenen chemischen Stoffgruppen angehören, zum Beispiel den Aldehyden, Alkoholen, Carbonsäuren, Ketonen oder Thiolen (Berger 1995).

Die moderne Lebensweise hat zu einer veränderten Ernährungsweise und neuen Erwartungshaltung der Konsumenten geführt. So erwarten Konsumenten unabhängig von der Saison bestimmter Früchte die ganzjährige Verfügbarkeit von Fruchtsäften an jedem Ort der Welt. Außerdem hat der Verzehr von Fertiggerichten zugenommen, die bequem und schnell zuzubereiten sind, aber eine lange Haltbarkeit erfordern. Aufgrund des Größenmaßstabs und der erwünschten langen Haltbarkeit unterscheidet sich die industrielle Produktion von Lebensmitteln gravierend von der traditionellen Zubereitung im Haushalt. Es gilt zu bedenken, dass Aromastoffe oft aus geruchlosen Präkursoren entstehen, deren Umwandlung in die wertgebenden Aromastoffe beeinflusst ist von den Prozessen in der Erzeugung (Schieberle und Hofmann 2011). Die damit einhergehenden Änderungen im Aromaprofil von traditionell und industriell hergestellten Lebensmitteln sind meist unerwünscht und aufgrund der Abneigung der Konsumenten gegenüber dem Zusatz synthetischer Aromen zum Teil schwer zu kompensieren. Zur Optimierung der Prozesse in der Lebensmittelindustrie ist es erforderlich, die aromagebenden Verbindungen eines frischen Lebensmittels genau zu bestimmen, zu quantifizieren und deren Entstehung zu verstehen. Erst wenn die wertgebenden Aromastoffe und deren Präkursoren bekannt sind, können Prozessparameter wie Temperatur oder pH-Wert gezielt gesteuert werden.

1.2 Menschliche Wahrnehmung der Aromastoffe

1.2.1 Geruchsrezeptoren und olfaktorisches System

Die olfaktorische Wahrnehmung der geruchsaktiven Verbindungen findet über die auf dem Riechepithel (*Regio olfactoria*) in der Nase befindlichen olfaktorischen Neuronen statt. Aromastoffe gelangen entweder direkt durch die eingeatmete Luft (orthonasal) oder beim

Verzehr von Speisen und Getränken aus der Mundhöhle über den Rachen (retronasal) an das Riechepithel (Buettner et al. 2001). Am Riechepithel angelangt, können Aromastoffe nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip an die Rezeptoren der dort befindlichen spezialisierten Sinneszellen andocken und ein Signal auslösen.

1.2.2 Olfaktorische Signaltransduktion auf Rezeptorebene

Beim Menschen gibt es rund 400 unterschiedliche molekulare Geruchsrezeptoren, wobei eine bestimmte Rezeptorzelle meist nur jeweils einen Rezeptortyp trägt. Die Proteinstruktur der olfaktorischen Rezeptoren (OR) sorgt für eine Spezifität auf bestimmte Aromastoffe nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip, wobei es möglich ist, dass ein Aromastoff an mehrere OR binden kann und mehrere Aromastoffe an denselben OR andocken können (Malnic et al. 1999). Die OR sind mit einem heterotrimeren G-Protein gekoppelt, das aus einer α -, β - und γ -Untereinheit besteht (siehe Abbildung 1 rechts). Wenn ein Aromastoff mit passender Spezifität an einen OR andockt, ändert sich dessen Konformation und das gekoppelte G-Protein wird aktiviert (Jones und Reed 1989). Die Aktivierung, die aus der Umwandlung von Guanosindiphosphat (GDP) zu Guanosintriphosphat (GTP) folgt, führt zur Dissoziation der Untereinheiten des G-Proteins in die α -Untereinheit und den $\beta\gamma$ -Komplex und es kommt zur Entkopplung des OR (Schild und Restrepo 1998; Stryer und Bourne 1986). Die nun freie, GTP-bindende α -Untereinheit bindet an eine membrangebundene Adenylcyclase, die cAMP aus ATP synthetisiert und in das Zytosol freisetzt (Pfeuffer et al. 1989). cAMP, das hier als sekundärer Botenstoff fungiert, bindet an membrangebundene Kationenkanäle, die dann Calcium- und Natriumionen in das Zellinnere einströmen lassen (Nakamura und Gold 1987). Vermittelt durch die Calcium Ionen wird zusätzlich ein Chlorid Ionenkanal aktiviert, der negativ geladene Chlorid Ionen ins Zelläußere strömen lässt (Kleene und Gesteland 1991). Durch das Einströmen von Kationen bei gleichzeitigem Ausströmen von Anionen kommt es zur Depolarisation der Membran der olfaktorischen Neuronen Zelle.

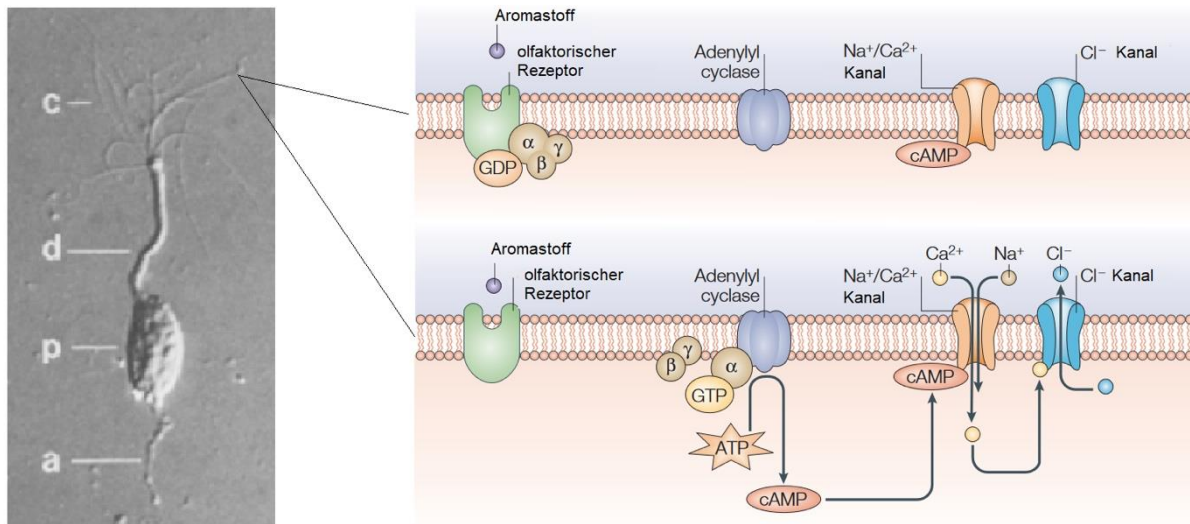


Abbildung 1: (links) Mikroskopie eines olfaktorischen Rezeptorneurons eines Frosches; a: Axon, p: Soma, d: Dendrit, c: Zilien; aus Kleene und Gesteland (1981); (rechts) Schematisches Diagramm der cAMP-vermittelten Transduktionskaskade einer Riechzelle, oben vor Aktivierung, unten nach Aktivierung; verändert aus Mombaerts (2004).

Durch die Depolarisation kommt es zur Entstehung von elektrischen Potenzialen, auch Aktionspotenziale genannt, die das Signal über Axone (*Nervus olfactorius*) (siehe Abbildung 1 links) von der Riechschleimhaut an Neuronen im Riechkolben (*Bulbus olfactorius*), der sich in der Schädelhöhle befindet, weiterleiten. Von dort gelangen die Sinnesmeldungen über die Riechbahn (*Tractus olfactorius*) zu den höheren Verarbeitungszentren im Endhirn (*Telencephalon*) (Munger et al. 2009).

1.2.3 Wechselwirkung zwischen olfaktorischen Rezeptoren und Aromastoffen

Die einzelnen OR besitzen Spezifitäten für bestimmte Aromastoffe. Dabei spielt vor allem die Molekülstruktur eine entscheidende Rolle. So unterscheidet sich die olfaktorische Wahrnehmung der beiden Enantiomere *S*-Carvon und *R*-Carvon grundlegend. Obwohl die beiden Moleküle sich nur an der sterischen Ausrichtung am C-4-Atom unterscheiden, duftet *S*-Carvon nach Dill, während *R*-Carvon nach Minze riecht (Decarvalho und Dafonseca M. 2006; Schieberle und Hofmann 2011). Nicht nur die Spezifität, sondern auch die Sensitivität, mit der ein Aromastoff an einen OR andocken kann, ist von geringen Veränderungen in der Molekülstruktur stark betroffen. So ist die Geruchsschwelle, die die Konzentration eines Aromastoffs darstellt, ab der dieser wahrgenommen werden kann, um ein 50 000-faches geringer, wenn in der Molekülstruktur von 2,3,5-Trimethylpyrazine die Methylgruppe an Position 2 durch eine Ethylgruppe ausgetauscht wird (Schieberle und Hofmann 2011; Wagner et al. 1999). Die beiden Merkmale Geruchsqualität und Geruchsschwelle, die der

Charakterisierung eines Aromastoffs dienen, können also bereits durch kleine Änderungen in der Molekülstruktur stark beeinflusst werden.

Ein weiterer Faktor bei der Wahrnehmung von Aromastoffen auf Rezeptorebene kann ein Antagonismus oder Synergismus verschiedener Verbindungen sein, die sich dadurch gegenseitig beeinflussen. Zum Beispiel stellten Oka et al. (2004) fest, dass Methylisoeugenol einen kompetitiven Antagonisten für Eugenol darstellt.

1.2.4 Kombinatorischer Code der Geruchswahrnehmung

Der menschliche Geruchssinn ist dauerhaft einer komplexen Mischung aus flüchtigen Molekülen ausgesetzt, die sowohl in ihrer Struktur als auch Konzentration mannigfaltige Unterschiede zeigen. Die olfaktorische Wahrnehmung chemischer Informationsmuster basiert nicht auf ein rein additives Verhalten der einzelnen Duftstoffe, sondern wird vielmehr als kombinatorischer Code verarbeitet (Dunkel et al. 2014; Laing 1994; Gottfried 2010). Dies ergibt sich aus der Tatsache, dass ein Aromastoff mehrere OR aktivieren kann und umgekehrt ein OR von verschiedenen Aromastoffen getriggert werden kann (Malnic et al. 1999). Als Beispiel lassen sich psychophysische Tests am Menschen anführen, anhand derer bewiesen werden konnte, dass in Mischungen von mehr als vier geruchsaktiven Verbindungen die Individualität der einzelnen Aromastoffe verloren geht. Stattdessen bildet sich durch Aromastoffmischungen eine neue einzigartige Geruchsentsität, die es selbst Menschen mit trainiertem Geruchssinn nicht mehr ermöglicht, die Einzelsubstanzen zu erkennen (Laing 1994; Berglund et al. 1976). Die folgenden Beispiele zeigen, dass dies bereits bei Mischungen aus zwei bzw. drei Aromastoffen der Fall sein kann: die Kombination aus nach Geranien riechendem Z-1,5-Octadienon und nach gekochten Kartoffeln riechendem Methional verströmt einen Fischgeruch (Milo und Grosch 1997) während eine Mischung aus Ethylisobutyrat, Ethylmaltol und Allyl- α -Ionon einen Ananasgeruch erzeugt. Diese psychophysischen Beobachtungen konnten in der Vergangenheit außerdem durch neurophysiologische Experimente bestätigt werden. Es konnte gezeigt werden, dass selektierte kortikale Neuronen auf binäre Aromastoffmischungen reagierten, nicht jedoch auf die jeweiligen Einzelsubstanzen (Grossman et al. 2008; Howard et al. 2009; Dunkel et al. 2014). Daraus lässt sich schließen, dass die olfaktorischen Eigenschaften eines Lebensmittels nicht allein aus der Molekülstruktur vorhergesagt werden können. Vielmehr werden die chemischen Reize, die durch Aromastoffe ausgelöst werden, durch das Gehirn als kombinatorische Codes verarbeitet, die wir so als einzigartige Geruchswahrnehmungen empfinden. Nicht also einzelne Verbindungen, sondern der kombinatorische Code mehrerer an den OR detektierten Aromastoffe führt dazu, dass der individuelle Geruch eines Lebensmittels bzw. einer Mischung von Aromastoffen (engl. *odor object*) im Gehirn erkannt wird (Schieberle und Hofmann 2011). Dadurch erklärt sich auch,

dass der Mensch zwar geringe Konzentrationsunterschiede innerhalb einer Aromastoffmischung unterscheiden kann (Le Berre et al. 2008), jedoch nicht in der Lage ist zu erkennen, aus welchen Einzelaromen komplexe Mischungen bestehen. Metaphorisch bietet sich der Vergleich mit einem Klavierspieler an, dessen Akkord sich aus einem Zusammenspiel unterschiedlicher Töne ergibt, wobei die einzelnen Töne für das Gehör nicht trennbar sind.

1.2.4.1 Schlüsselaromastoffe

Lange wurde angenommen, dass alle in Lebensmitteln vorkommenden flüchtigen Substanzen einen Aromabeitrag leisten würden, weshalb in früheren Studien versucht wurde, möglichst viele dieser Substanzen zu identifizieren. So wurden bis ins Jahr 2013 ca. 8000 flüchtige Substanzen identifiziert. Es wurde vermutet, dass ungefähr 10 000 von ihnen in Lebensmitteln identifizierbar sind (Dunkel et al. 2014). Bei dieser Annahme wurde jedoch vernachlässigt, dass nur Aromastoffe die in ihrer Konzentration über ihrer jeweiligen Geruchsschwelle liegen einen Aromabeitrag leisten. Die tatsächliche Anzahl der flüchtigen Verbindungen, die das Aroma von Lebensmitteln abbilden, ist daher wie im Folgenden beschrieben deutlich geringer.

Durch die individuelle Geruchsschwelle eines Aromastoffs, kann der Aromabeitrag eines einzelnen Duftstoffs aus einer Mischung näherungsweise über den *odor activity value* (OAV) ermittelt werden. Der OAV berechnet sich aus dem Quotienten der Konzentration und dem individuellen Geruchsschwellenwert einer Verbindung (Guth 1997). So ergibt sich, dass einer Verbindung, die in ihrer Konzentration über ihrem Geruchsschwellenwert liegt, ein $OAV > 1$ und somit ein wahrscheinlicher Beitrag zum Gesamtaroma zugeordnet wird. Die Einbeziehung solcher Dosis-Aktivität-Erwägungen führten dahingehend zu Zweifeln an der Theorie, dass alle 10 000 flüchtigen Verbindungen, die in Lebensmitteln detektiert wurden, zum Aroma beitragen (Grosch 2001; Rothe et al. 1972). Daraus kann gefolgert werden, dass bei der Analyse aller flüchtigen Substanzen eines Lebensmittels zahlreiche detektierte Substanzen unter ihrer Geruchsschwelle liegen und daher abgesehen von synergistischen Effekten keinen Beitrag zum Gesamtaroma liefern. Um die aufwendige Identifizierung von Substanzen ohne Aromabeitrag zu umgehen, wurden aktivitätsorientierte Strategien wie die Gaschromatographie-Olfaktometrie (GC-O) und Aromaextraktverdünnungsanalyse (AEDA) entwickelt.

Zur Hervorhebung des Anteils identifizierter flüchtigen Verbindungen, die einen tatsächlichen Aromabeitrag in mindestens einem Lebensmittel leisten, führten Dunkel et al. (2014) eine umfassende Metaanalyse der bekannten Fachliteratur unter Anwendung der Schlagwörter *aroma analysis* und *flavor analysis* durch. Die vorhandenen Publikationen wurden durch verschiedene Qualitätskriterien weiter eingegrenzt. Einbezogen wurden ausschließlich Literaturstellen, die eine auf die Bioaktivität bezogene Identifizierung der intensivsten

Aromastoffe mittels GC-O und einer seriellen Verdünnungsanalyse wie AEDA einschließen, sowie eine eindeutige Identifizierung (Retentionszeit, Massenspektrometrie und/oder sensorischer Abgleich mit Referenzsubstanz) und Quantifizierung mittels SIVA oder anderer robuster Techniken zuließen. Nach Ausschluss aller Publikationen, die den Qualitätskriterien nicht standhielten, wurden 119 Publikationen mit Informationen zu den relevantesten Aromastoffen in 227 verschiedenen Lebensmitteln ausgewählt. Diese entstammen einer Vielzahl von Lebensmittelkategorien, die die typische westliche Ernährung größtenteils abdecken. Von den in diesen Lebensmitteln enthaltenen Aromastoffen hatten 226 einen OAV ≥ 1 und somit einen voraussichtlichen Beitrag zum Aroma bei mindestens einem der untersuchten Lebensmittel. Diese Aromastoffe wurden als Schlüsselaromastoffe (engl. *key food odorants*, KFO) bezeichnet und in einer Heatmap im Vergleich zu den Lebensmitteln angezeigt (siehe Abbildung 2). Die im Rahmen der Metaanalyse identifizierten rund 230 KFO entsprechen weniger als 3 % der 10 000 in Lebensmitteln erwarteten flüchtigen Stoffe. Dies bestätigt die Vermutung, dass nur ein geringer Teil der in Lebensmitteln vorhandenen flüchtigen Verbindungen zu deren authentischem Geruch beiträgt (Dunkel et al. 2014).

Die KFO können in zwei Gruppen von Aromastoffen eingeteilt werden. Zum einen sind dies Verbindungen mit einem niedrigen Geruchsschwellenwert wie 1-*p*-Menthen-8-thiol (0.0001 $\mu\text{g/l}$) (Demole et al. 1982), das bereits in geringen Spuren wahrgenommen werden kann. Zum Anderen handelt es sich um Substanzen wie Maltol (35 mg/L) (Pittet et al. 1970), die ihre vergleichsweise hohen Geruchsschwellen durch ihre natürlichen hohen Konzentrationen kompensieren. Durch das Einordnen der KFO in eine Rangfolge nach der Häufigkeit, in der sie mit einem OAV ≥ 1 in den untersuchten Lebensmitteln vorkommen (siehe Abbildung 2 rechts), ergibt sich die Möglichkeit einer weiteren Kategorisierung der KFO. So werden Aromastoffe, die mit einer Häufigkeit von über 25 % breit gestreut in verschiedenen Lebensmitteln vorkommen, als Generalisten (engl. *generalists*) bezeichnet und jene, die mit unter 5 % Häufigkeit vorkommen als Spezialisten (engl. *individualists*). Die Gruppe dazwischen mit 5–25 % Häufigkeit in den untersuchten Lebensmitteln ist die sogenannte Mittelgruppe (engl. *intermediaries*). Die Verbindungen aus der häufig vorkommenden Gruppe der Generalisten werden vorwiegend von allgegenwärtigen Reaktionen wie der Maillard- oder Strecker-Reaktion beim Erhitzen, von enzymatischen Reaktionen während der Fermentation oder durch Lipidoxidation freigesetzt (Dunkel et al. 2014). Beispiele hierfür sind Methional, das aus der Aminosäure Methionin durch den Ehrlich-Abbau in fermentierten Produkten entstehen kann und einen Aromabeitrag in über 50 % der Lebensmittel zeigte, und 2-Acetyl-1-pyrroline, das in zahlreichen gerösteten Produkten vorkommt und ein Produkt der Maillard-Reaktion aus dem Vorläufer Prolin ist (Hofmann und Schieberle 1998). Auch *E*-2-Nonenal, das aus der Lipidoxidation entstehen kann (Tressl et al. 1997), gehört zu den Generalisten.

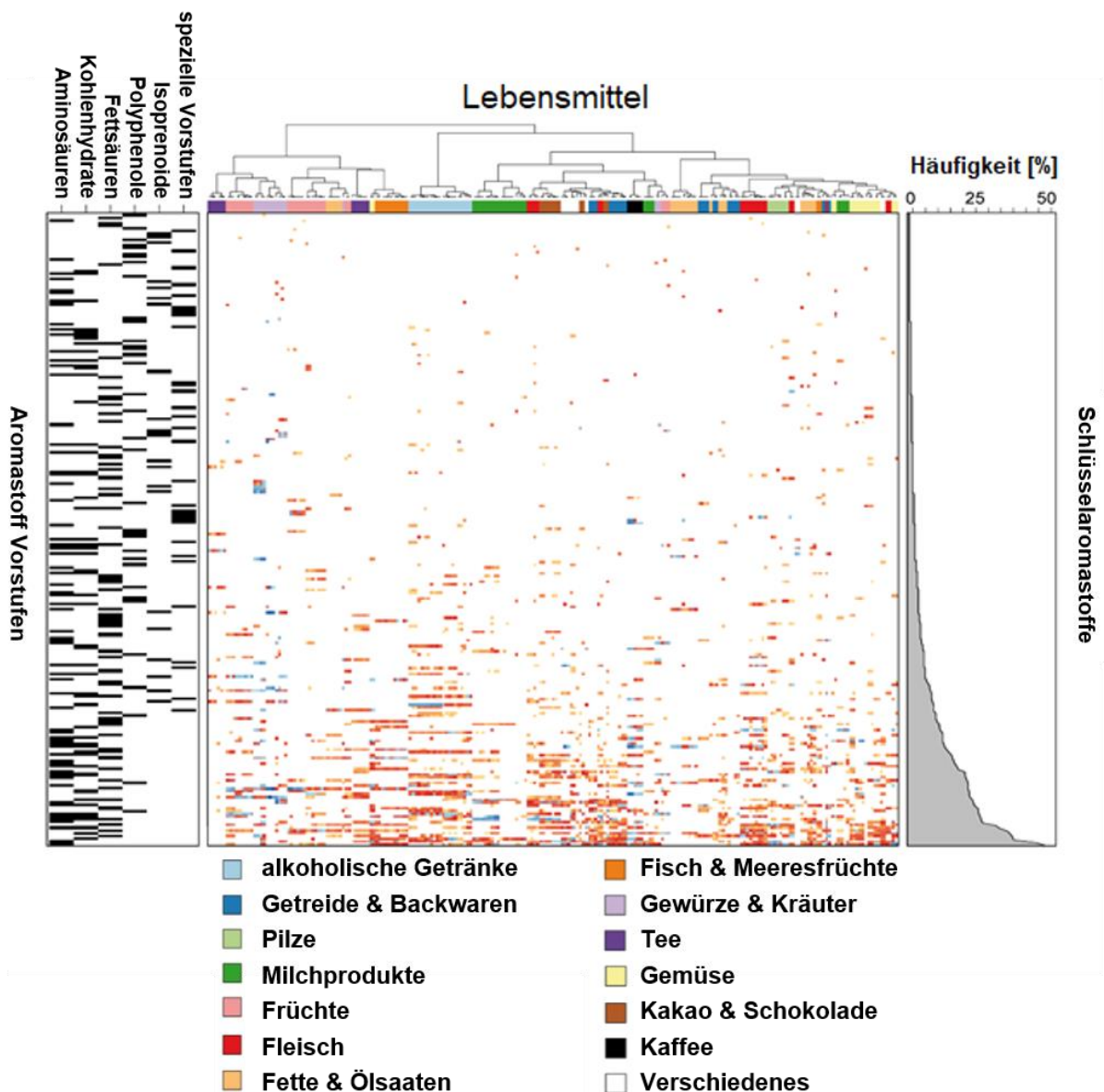


Abbildung 2: Heatmap mit Darstellung der OAV und relativer Häufigkeit der 226 Schlüsselaromastoffe (KFO) in 227 Lebensmitteln, verändert aus Dunkel et al. (2014).

In der Gruppe der Spezialisten befinden sich Geruchsstoffe, die zur typischen Geruchssignatur von nur einem oder einer stark eingeschränkten Zahl von Lebensmitteln einen Beitrag leisten. So gehören zu den Spezialisten zahlreiche Aromastoffe, die eine niedrige Geruchsschwelle haben wie das bereits genannte grapefruitartig riechende 1-*p*-Menthen-8-thiol mit einer Schwelle von nur 0.0001 µg/l in Wasser (Demole et al. 1982). Im Gegensatz zu den Generalisten, die aus ubiquitär vorkommenden Vorläufern hervorgehen, entstehen die Spezialisten meist aus charakteristischen, selten vorkommenden Präkursoren (Dunkel et al. 2014). Dargestellt ist dies in Abbildung 2 links: während für die im unteren Bereich der

Heatmap befindlichen Generalisten vor allem Aminosäuren, Kohlenhydrate oder Fettsäuren als Vorstufen angegeben sind, finden sich unter den weiter oben angegebenen KFO größtenteils Polyphenole, Isoprenoide oder andere spezielle Vorstufen.

1.3 Entstehung von Aromastoffen

In diesem Kapitel werden drei der bedeutendsten Quellen von Aromastoffen genauer beleuchtet. Aus diesen Quellen entstammen zudem die meisten Generalisten.

1.3.1 Maillard-Reaktion

Die Maillard-Reaktion hat großen Einfluss auf Aroma, Geschmack und Bräunung in erhitzten Lebensmitteln (Hodge 1953). Bei ihr handelt es sich um ein komplexes Netzwerk von Reaktionen mit einer breiten Produktpalette (Martins et al. 2000). Im Allgemeinen ist die nichtenzymatische Maillard-Reaktion eine Reaktion zwischen Aminosäuren und Zuckern, die unter anderem zur Bildung von braunen Pigmenten (Melanoidinen) und einer großen Zahl flüchtiger Verbindungen wie Pyrazinen, Pyrrolen, Pyrrolinen, Oxazolinen und Furanderivaten führt (Martins et al. 2000). Eine der bedeutendsten Stufen des Maillard-Prozesses ist der Strecker-Abbau (siehe Abbildung 3), bei dem Aminosäuren mit Dehydroreduktionen (Maillard-Abbauprodukte von Kohlenhydraten) reagieren und Aldehyde mit der entsprechenden Struktur der ursprünglichen Aminosäure bilden (Ellis 1959). So entsteht Glyoxal aus Serin, 2-Hydroxypropanal aus Threonin und Methional aus Methionin, die jeweils reaktive Partner in weiteren Maillard-Reaktionen oder selbst aromaaktive Substanzen sind (Hofmann 1999).

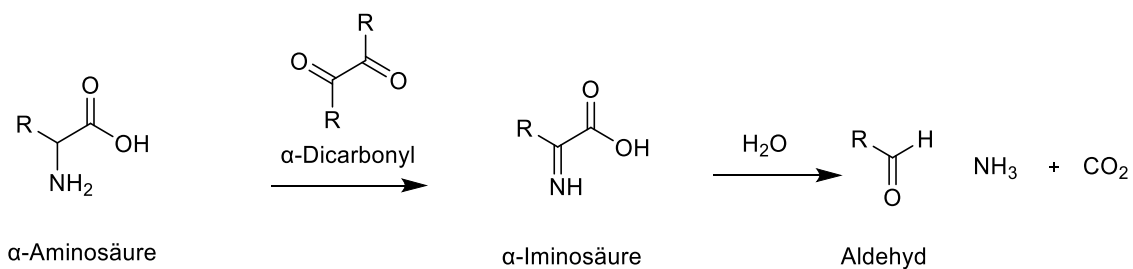


Abbildung 3: Ablauf des Strecker-Abbaus, nach Schönberg und Moubacher (1952).

Im Folgenden soll beispielhaft an der Verbindung 2-Acetyl-1-pyrrolin (2ACPY) aufgezeigt werden, wie durch Erhitzung aus den Abbauprodukten von Aminosäuren und Kohlenhydraten potente Aromastoffe entstehen können. 2ACPY ist ein typischer Generalist, der in zahlreichen gebackenen oder gerösteten Lebensmitteln vorkommt und aufgrund seiner niedrigen Geruchsschwelle (0,1 µg/l) (Buttery und Ling 1995) bereits in minimalen Konzentrationen einen Beitrag zum Gesamtaroma leistet. 2ACPY hat einen röstigen, popkornartigen Geruch, der in verschiedenen Produkten wie Basmatireis qualitätsbestimmend ist (Wakte et al. 2017). Hofmann und Schieberle (1998) konnten mittels ¹³C-Markierungsexperimenten bestätigen,

dass 1-Pyrrolin und 2-Oxopropanal die hauptsächlichen Zwischenprodukte für die Entstehung von 2ACPY sind. Ein möglicher Entstehungsweg für 1-Pyrrolin und 2-Oxopropanal ist der in Abbildung 4 gezeigte Weg über Prolin und dem Dehydroreduktion 1-Deoxyglucoson. Dabei wird 1-Pyrrolin gebildet durch den Strecker-Abbau von Prolin, der katalysiert wird durch α -Dicarbonylverbindungen wie das 1-Deoxyglucoson (Schieberle 1995). Die Reaktion beginnt, indem das Dicarbonyl mit dem Stickstoff des Prolins ein Iminiumion bildet mit anschließender Decarboxylierung und Wasserabspaltung. Nach Abspaltung von 2,3-Dihydroxypropanal, aus dem durch Wasserabspaltung 2-Oxopropanal gebildet werden kann, entsteht ein Iminiumion, aus dem durch Hydrolyse 1-Pyrrolin erzeugt werden kann (Hofmann und Schieberle 1998; Adams und Kimpe 2006).

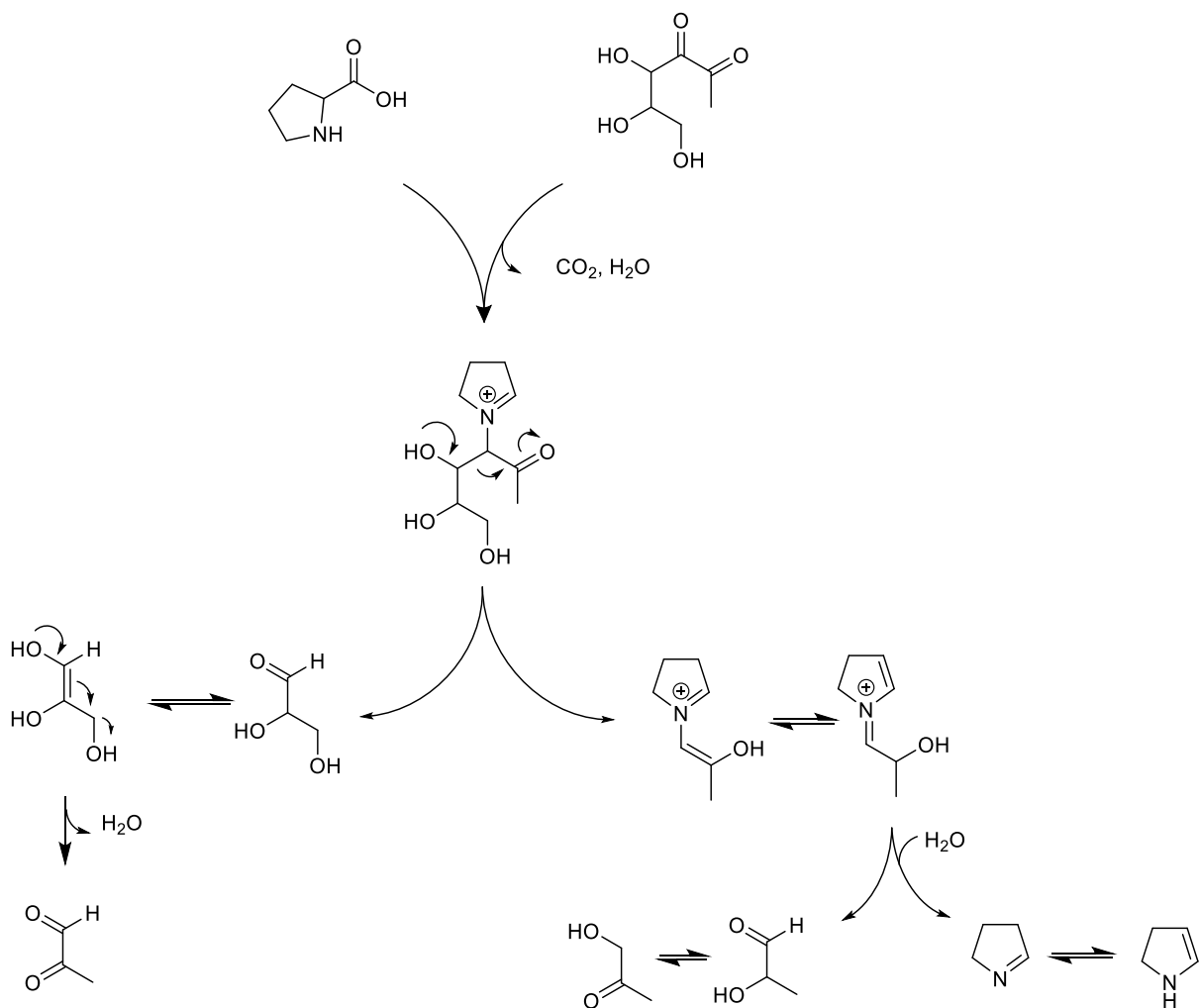


Abbildung 4: Entstehung von 1-Pyrrolin, Glycerinaldehyd, 2-Oxopropanal und Hydroxyl-2-propanon aus Prolin und 1-Deoxyglucoson, nach Hofmann und Schieberle (1998).

Für die Entstehung von 2ACPY aus 2-Oxopropanal und 1-Pyrrolin postulierten Hofmann und Schieberle (1998) den in Abbildung 5 gezeigten Reaktionsweg aus hydratisiertem 2-Oxopropanal als den primären Bildungsweg. 1-Pyrrolin kondensiert dabei mit hydratisiertem

2-Oxopropanal unter Bildung von 2-(1,2-Dioxopropyl)-pyrrolidin, das spontan mit Luftsauerstoff zum entsprechenden 1-Pyrrolin oxidiert, wobei letzteres eine Addition von Wasser und eine anschließende Umlagerungsreaktion erfährt. Die so gebildete β -Ketosäure decarboxyliert zum Schlüsselzwischenprodukt 2-Acetylpyrrolidin, das nach spontaner Oxidation das 2-Acetyl-1-pyrrolin ergibt (Hofmann und Schieberle 1998; Adams und Kimpe 2006).

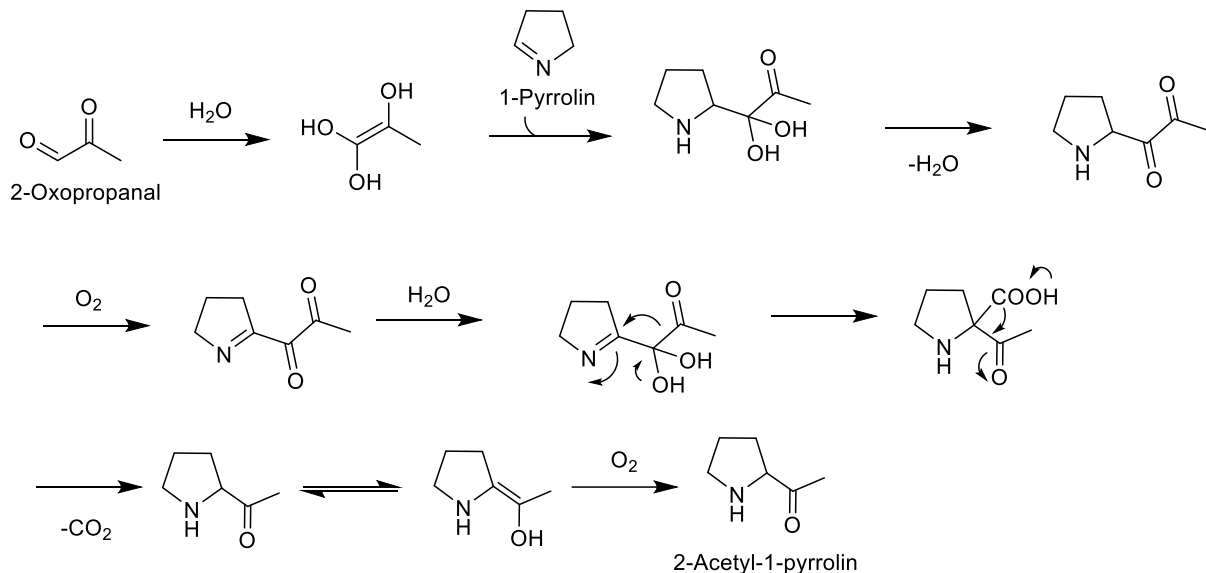


Abbildung 5: Entstehung von 2-Acetyl-1-pyrrolin aus 2-Oxopropanal und 1-Pyrrolin, nach Hofmann und Schieberle (1998).

1.3.2 Ehrlich-Abbau

Der enzymatische Aminosäureabbau, auch Ehrlich-Abbau, läuft während der mikrobiellen Fermentation ab, zum Beispiel beim Brauprozess durch Bierhefe (*Saccharomyces cerevisiae*). Aminosäuren durchlaufen zunächst einen Transaminierungsschritt und die entstehende α -Ketosäure wird dann zu einem Aldehyd decarboxyliert. Dieser Aldehyd kann zu seiner Carbonsäure oxidiert oder zu einem Alkohol reduziert werden. In Abbildung 6 ist der Reaktionsweg am Beispiel von Phenylalanin dargestellt (Hazelwood et al. 2008).

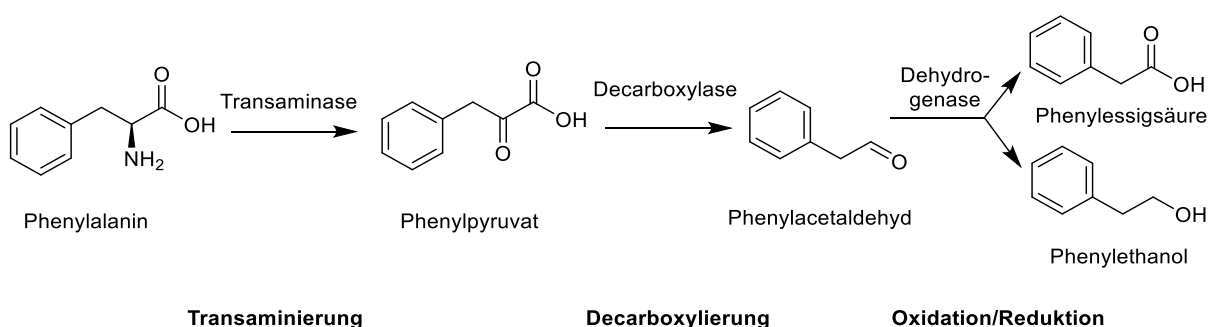


Abbildung 6: Ehrlich-Abbau am Beispiel von Phenylalanin, nach Hazelwood et al. (2008).

Andere Aminosäuren, die beispielsweise durch diesen enzymatischen Reaktionsweg abgebaut werden und zu signifikanten Aromastoffen führen, sind Leucin (3-Methylbutanol, 3-Methylbutanal, 3-Methylbutansäure), Isoleucin (2-Methylbutanol, 2-Methylbutanal, 2-Methylbutansäure) und Methionin (3-Methylthio-1-propanol, Methional) (Hazelwood et al. 2008).

1.3.3 Lipidoxidation

In Lebensmitteln enthaltene ungesättigte Fettsäuren wie Linol- und Linolensäure sind instabil gegenüber Oxidationsreaktionen. Die ablaufenden Reaktionen und die Abbauprodukte, die zum Teil Aromastoffe mit niedrigen Geruchsschwellen beinhalten, sind vielfältig. Als Beispiele für solche geruchsaktiven Substanzen, die auch als Generalisten kategorisiert sind, gelten 1-Octen-3-on (Geruchsschwelle in H₂O: 0.03 µg/l) (Dijkstra und Wikén 1976), Hexanal (23 µg/l) (Moore et al. 1976) und *E,E*-2,4-Decadienal (0.07 µg/l) (Buttery et al. 1971). Die in der Lipidperoxidation entstehenden Aromastoffe können sowohl gewünschte wie auch unerwünschte Beiträge zum Aroma von Produkten liefern. Zum Beispiel ist 1-Octen-3-on ein bedeutender Bestandteil des pilzartigen Aromas von Champignons (Dijkstra und Wikén 1976). Wenn 1-Octen-3-on allerdings in Produkten wie Butter (Widder und Grosch 1994) oder Wein (Behr et al. 2013) in zu hohen Konzentrationen vorkommt, kann dies einen unerwünschten pilzartigen *off-flavor* bewirken.

Die Lipidoxidation lässt sich grundsätzlich in die über Radikale gestartete Autoxidation und enzymatisch ablaufende Reaktionen einteilen. Beide Varianten werden im Folgenden im besonderen Hinblick auf ihre aromastoffgenerierenden Eigenschaften beschrieben.

1.3.3.1 Autoxidation von ungesättigten Fettsäuren

Bei der Autoxidation handelt es sich um eine vielschichtige Reaktion, der alle ungesättigten Fettsäuren unterliegen können. Die Autoxidation ist eine Radikalkettenreaktion, die entsprechend der Darstellung in Abbildung 7 in vier Elementarschritte eingeteilt werden kann (Belitz et al. 2008). Für den Start der Reaktion muss es zunächst zur Bildung eines Radikals kommen. Die Entstehung von Peroxyalkyl- oder Alkoxyradikalen (siehe Abbildung 7) wird durch die Anwesenheit von Initiatoren wie Schwermetallionen (Schaich 1992), Licht oder Hitze, die die Abstraktion von α -Methylenprotonen aus Lipiden begünstigen, initiiert. Da die notwendige Energie zur Abstraktion bei Protonen mit benachbarten Doppelbindungen verringert ist (zum Beispiel Position 11 bei Linolsäure, vgl. Abbildung 9), autoxidieren mehrfach ungesättigte Fettsäuren schneller (Belitz et al. 2008). Beim Kettenwachstum reagieren die entstandenen Alkylradikale mit molekularem Sauerstoff, wodurch Alkoxyradikale gebildet werden (Reaktion 1 in Abbildung 7). Des Weiteren abstrahieren die erzeugten Peroxy- und

Alkoxyradikale erneut Methylenprotonen der Lipide (Reaktionen 2 und 3 in Abbildung 7). Eine Kettenverzweigung findet statt, wenn die Radikale durch einen unimolekularen Zerfall (Reaktion 4 in Abbildung 7) der Hydroperoxide entstehen. Ist die Konzentration der Hydroperoxide hoch genug, findet der Zerfall auch bimolekular statt (Reaktion 5 in Abbildung 7). Zum Kettenabbruch kommt es dann, wenn die radikalischen Verbindungen untereinander zu stabilen Produkten abreagieren (Reaktionen 6 bis 8 in Abbildung 7). Mit zunehmender Reaktionszeit wird der Prozess komplexer, da neben den Hydroperoxiden auch Sekundärprodukte entstehen, die teilweise weiter zu Tertiärprodukten autoxidieren (Belitz et al. 2008). So entstehen während der Autoxidation eine Vielzahl von flüchtigen, aromaaktiven Substanzen wie Aldehyde (zum Beispiel Hexanal und *E,E*-2,4-Decadienal), Ketone (zum Beispiel 1-Octen-3-on, *Z*-1,5-Octadien-3-on) oder Epoxide (zum Beispiel *E*-4,5-Epoxy-*E*-2-decenal) (Belitz et al. 2008; Silwood und Grootveld 1999; Frankel et al. 1990; Frankel 1991; Frankel 1983).

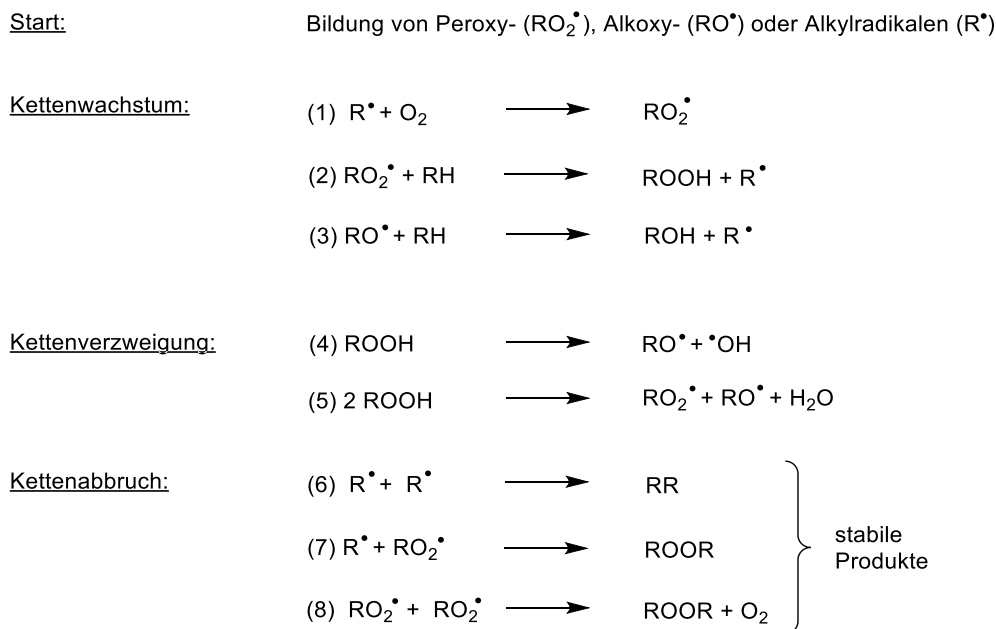


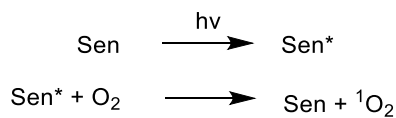
Abbildung 7: Teilschritte der Radikalkette der Autoxidation von Olefinen, nach Belitz et al. (2008) und Porter et al. (1995).

1.3.3.2 Fotooxygenierung

Auch die Radikale der Fotooxygenierung können in die Autoxidation eingreifen. In diesem Unterkapitel soll daher die in Lebensmitteln vorzugsweise vorkommende Fotooxygenierung Typ-2 erläutert werden.

Sensibilisatoren, die in Lebensmitteln zum Beispiel als Chlorophyll a und b, oder Riboflavin vorkommen, können durch Licht in einen angeregten Zustand gebracht werden (siehe Abbildung 8). Die angeregten Sensibilisatoren wiederum können molekularen Sauerstoff in den ersten Singulettzustand überführen. Das Sauerstoffmolekül kann in diesem Zustand durch eine Cycloaddition direkt an ungesättigte Fettsäuren addieren (siehe Abbildung 8). Durch die Fotooxygenierung Typ-2 entstehen aus einer Fettsäure doppelt so viele Hydroxyperoxide wie sie Doppelbindungen enthält. So können aus der zweifach ungesättigten Linolsäure vier Hydroxyperoxide (an den Positionen 9, 10, 12 und 13) gebildet werden (Frankel 1984; Belitz et al. 2008).

Überführung des Sauerstoffs in den 1. Singulett-Zustand:



Addition von ${}^1\text{O}_2$ an eine ungesättigte Fettsäure:

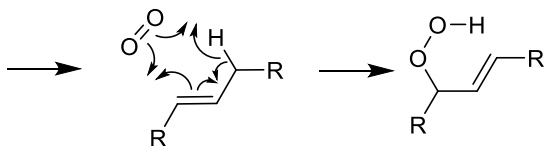


Abbildung 8: Ablauf der Fotooxygenierung Typ-2, nach Belitz et al. (2008) und Frankel (1984).

In Abbildung 9 ist der Abbau einer durch Fotooxygenierung entstandenen 13-Hydroperoxylinolsäure zu Hexanal dargestellt. Ein möglicher Reaktionsweg hierfür ist die protonenkatalysierte Spaltung. Diese beginnt mit einer Protonierung der Hydroperoxygruppe und anschließendem Verlust von Wasser. Das gebildete Oxa-Kation geht dann eine Insertionsreaktion ein, aus der ein Carboniumion hervorgeht. Nach Reaktion mit einem Hydroxidion zerfällt das Molekül in eine Oxosäure und in Hexanal (Belitz et al. 2008; Frankel 1983, 1984).

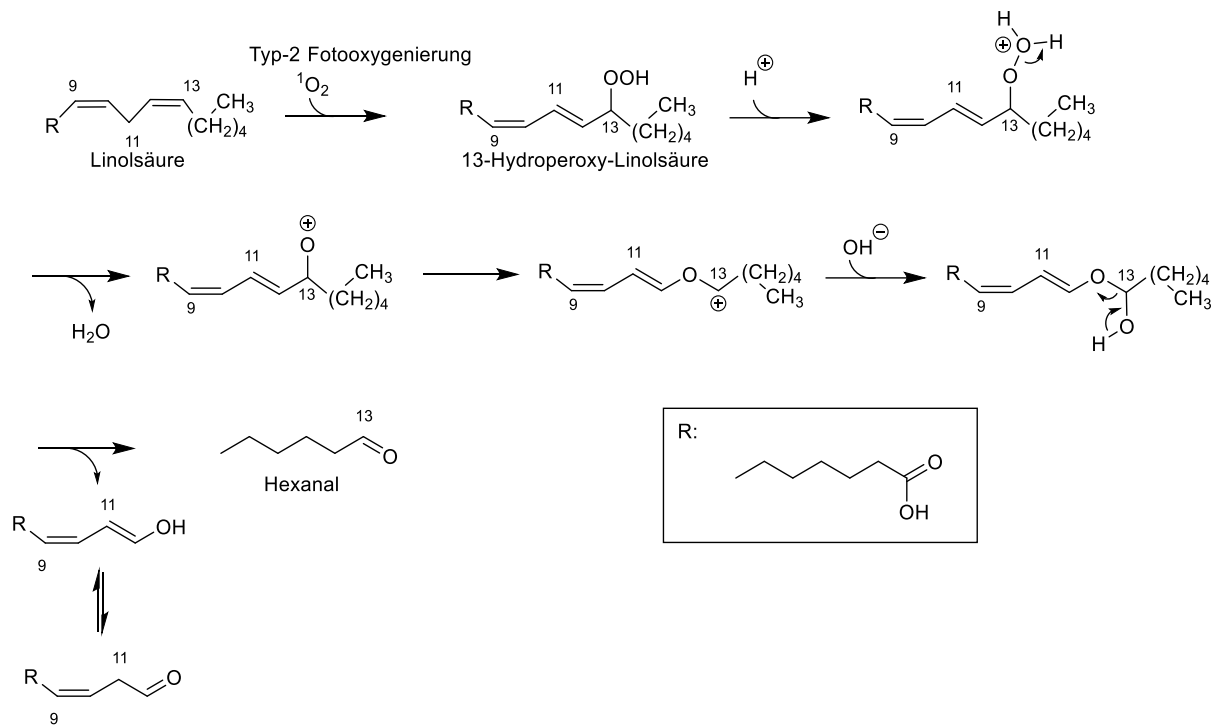


Abbildung 9: Bildung von Hexanal aus Linolsäure, durch Typ-2 Fotooxygenierung mit anschließender protonenkatalysierter Spaltung nach Belitz et al.(2008), Frankel (1983) und Frankel (1984).

1.3.3.3 Enzymatische Oxygenierung

Die Fettsäurehydroperoxide aus der Autoxidation können ebenfalls durch verschiedene Lipoxygenasen (LOX) gebildet werden, die in pflanzlichen und seltener auch in tierischen Geweben vorkommen (Grosch 1972). Im Gegensatz zur Autoxidation können die durch LOX katalysierten Reaktionen zielgerichtet ablaufen, da die LOX teilweise substratspezifisch sowie regio- und stereospezifisch reagieren. So ist es möglich, dass eine in der Sojabohne vorkommende LOX die Umwandlung von Linolsäure in ein bestimmtes Fettsäurehydroperoxid, die 13-(S)-Hydroperoxylinolsäure, katalysieren kann (Gardner 1991; Matoba et al. 1985) (siehe Abbildung 10). Die entstandenen Fettsäurehydroperoxide können dann durch verschiedene Enzyme abgebaut werden. Für die Bildung von Aromastoffen sind dabei vor allem die Hydroperoxidlyasen (HPL) von Interesse, da sie die Bildung von flüchtigen geruchsaktiven Verbindungen katalysieren. Durch die Anwesenheit verschiedener HPL in unterschiedlichen Lebensmitteln, können auf diese Weise distinkte Aromaprofile entstehen. So wird von den in zahlreichen Pilzen enthaltenen HPL, der Abbau der Fettsäurehydroperoxide vor allem zu C-8-Körpern wie 1-Octen-3-ol oder Z-Oct-2-enal katalysiert (Fraatz und Zorn 2011). In Äpfeln, Tomaten, Gurken, Sojabohnen und Weintrauben finden sich dagegen HPL, die den Abbau von 13-(S)-Hydroperoxylinolsäure zu Hexanal (siehe Abbildung 10) katalysieren (Belitz et al. 2008).

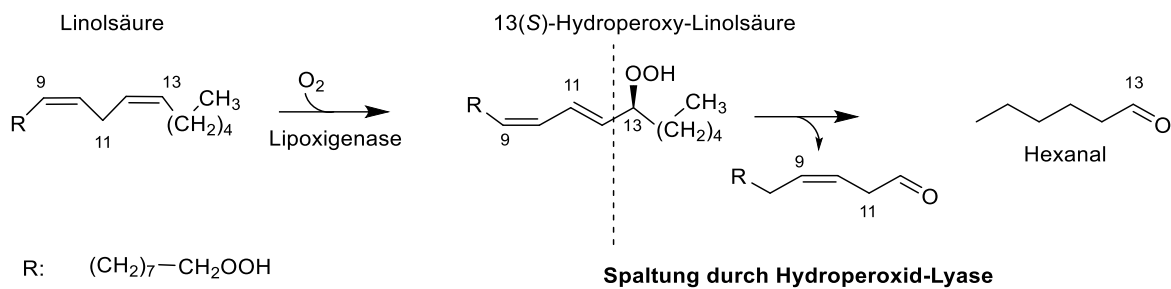


Abbildung 10: Enzymatische Bildung von Hexanal aus Linolsäure, nach Belitz et al. (2008).

Somit zeigt sich, dass trotz der unterschiedlichen Bildungswege über Autoxidation, Fotooxygenierung oder enzymatischer Oxygenierung die gleichen Fettsäurehydroperoxide und damit die gleichen Aromastoffe entstehen können. Dadurch erklärt sich auch das ubiquitäre Vorkommen der durch die Lipidoxidation gebildeten Aromastoffe wie Hexanal oder *E,E*-2,4-Decadienal, die laut der Metastudie von Dunkel et al. (2014) in ca. 40 % der untersuchten Lebensmittel einen Aromabeitrag leisten.

1.4 Analytik von Aromastoffen

Die Analytik der Aromastoffe stellt aus vielfältigen Gründen eine Herausforderung für die Methoden und Instrumente dar. Die Unterschiede im chemischen Aufbau und die damit einhergehenden Unterschiede in der Flüchtigkeit und Polarität können zur Diskriminierung einzelner Substanzen bei der Probenaufarbeitung oder Messung führen. Außerdem liegen Aromastoffe häufig in hohen Konzentrationsunterschieden vor, was für die Detektoren und deren Linearität eine Herausforderung darstellt. Die Analysemethoden, die sich bei der Bewältigung dieser Anforderungen bewährt haben, sollen in diesem Kapitel auszugsweise behandelt werden.

1.4.1 Gaschromatographie

Die Gaschromatographie (GC) ist seit den frühen 60er Jahren, als ihre Popularität durch Innovationen wie dem Flammenionisationsdetektor (FID) zunahm (McWilliam und Dewar 1958), das Mittel der Wahl für die Analytik von Aromastoffen. Durch GC können in einem Gemisch befindliche flüchtige Verbindungen aufgetrennt werden. Dazu wird die gasförmige oder flüssige Probe über einen Injektionsport (siehe Abbildung 11) in eine mobile Phase, das Trägergas, eingespritzt und das Gas durch eine stationäre Phase geleitet. Bei der mobilen Phase handelt es sich zumeist um ein inertes oder nichtreaktives Gas wie Helium, Argon, Stickstoff oder Wasserstoff. Die stationäre Phase ist in der Regel eine mikroskopisch dünne Schicht einer viskosen Flüssigkeit auf einer Oberfläche von Feststoffpartikeln auf einem

inerten festen Träger in einem Glas- oder Metallrohr, das als Säule bezeichnet wird. Die Glas- oder Metallsäule, durch die die Gasphase strömt, befindet sich in einem Ofen, in dem die Temperatur des Gases geregelt werden kann (Abbildung 11). Die Trennung des Stoffgemisches erfolgt durch die unterschiedlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften der Einzelsubstanzen, durch die sie eine charakteristische Mobilität in der Trennsäule besitzen. Die Mobilität eines Analyten hängt neben anderen Effekten vor allem von dessen Verteilungskoeffizienten zwischen mobiler und stationärer Phase ab. Der aus der Säule austretende Gasstrom mit den separierten Analyten wird von einem computergesteuerten Detektor wie zum Beispiel einem Massenspektrometer überwacht. Durch die Auswahl verschiedener stationärer Phasen unterschiedlicher Polarität und Trennleistung und außerdem durch Anpassungen des Temperaturgradienten des Säulenofens stehen dem Anwender verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung, um das Instrument für die Separation bestimmter Gemische individuell anzupassen (Cram und Juvet 1976; Dal Nogare 1960; Juvet und Cram 1974).

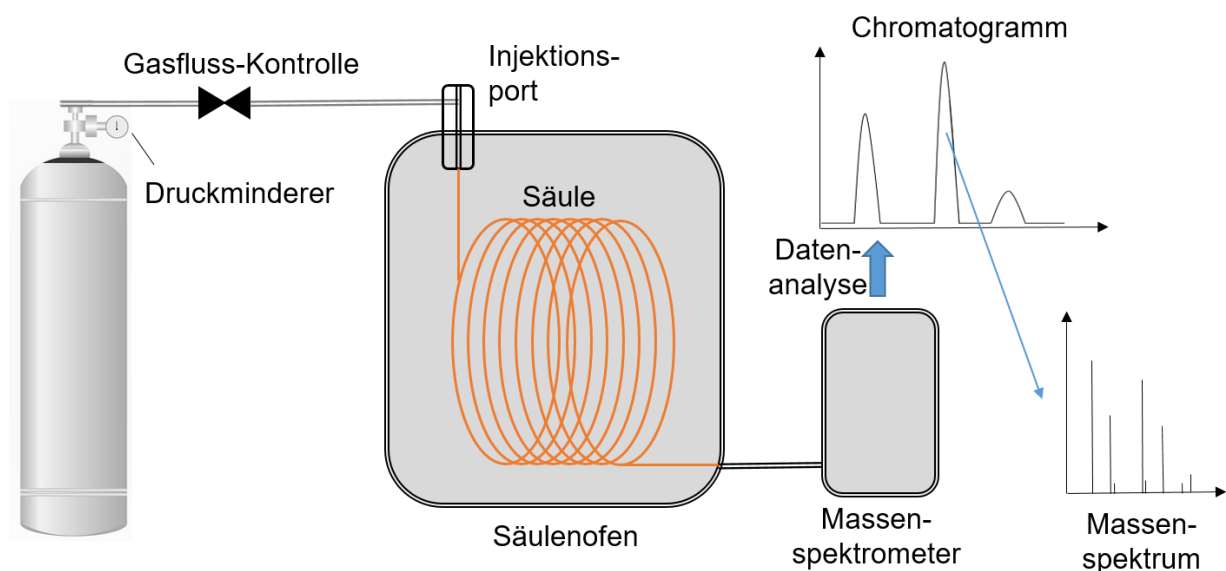


Abbildung 11: Schematische Darstellung eines Gaschromatographen gekoppelt mit einem Massenspektrometer (GC-MS).

Ebenso steht eine Vielzahl von Detektoren zur Auswahl, die passend zu den untersuchten Analyten und der benötigten Sensitivität der Analyse eingesetzt werden können. Häufige Anwendung finden zum Beispiel der Flammenionisationsdetektor oder die Elektronenstoßionisation in Kombination mit einem Massenspektrometer.

1.4.1.1 Probenaufarbeitung

Für die Analyse von Aromastoffen mittels GC und besonders für deren akkurate Quantifizierung ist die Probenaufarbeitung ein äußerst entscheidender Arbeitsschritt. Die

aromaaktiven Substanzen können bei unsachgemäßer Behandlung des Probenmaterials substanziellen qualitativen und quantitativen Veränderungen unterliegen. So könnten zum Beispiel in Lebensmittel enthaltene Enzyme wie LOX durch die Zerstörung der Zellwände aktiv werden und die in Kapitel 1.3.3 beschriebenen Aromastoffe durch Lipidoxidation freisetzen. Da aber für die GC-Analyse zum Schutz des Systems die Abtrennung der nichtflüchtigen Substanzen vor der Injektion in das System gewährleistet werden muss, ist eine Probenaufarbeitung zwingend notwendig. Eine optimale Verfahrensweise muss dabei verhindern, dass Analyten gegenüber anderen Analyten weder durch ihre Polarität noch ihre Flüchtigkeit diskriminiert werden, Analyten nicht chemisch verändert werden und, wie anhand des LOX-Beispiels erläutert, keine aromaaktiven Artefakte gebildet werden (Steinhaus 2019).

Für die Vermeidung der Artefaktbildung durch enzymatische Reaktionen kann zum Beispiel CaCl_2 zur Deaktivierung der Enzyme verwendet werden (Steinhaus et al. 2009). Doch auch hohe Temperaturen können zur Formierung potenter geruchsaktiver Artefakte führen. Daher gilt es generell, bei der Probenaufarbeitung für GC hohe Temperaturen zu meiden. Hierfür kann zum Beispiel zur Homogenisierung der Proben eine mit Stickstoff gekühlte Mühle verwendet werden. Zu hohe Temperaturen sind zudem ein Grund dafür, dass die Dampfdestillation heute zur Extraktion von Aromastoffen in der GC kaum noch Anwendung findet und stattdessen schonendere Varianten wie *solvent assisted flavor evaporation* (SAFE) zum Einsatz kommen (Steinhaus 2019). Hierbei wird mit leicht flüchtigen Lösungsmitteln wie Diethylether oder Dichlormethan ein Lösungsmittel-extrakt der Probe hergestellt. Der erstellte Extrakt wird dann unter Vakuum bei 20–40 °C verdampft und die entstehenden Gase werden in einer mit Stickstoff gekühlten Falle aufgesammelt (Engel et al. 1999). Da der Extrakt dabei nur schrittweise zugegeben wird, um hochsiedende Verbindungen weniger zu diskriminieren, handelt es sich um eine zeit- und arbeitsintensive Methode. Bei Verwendung der SAFE muss außerdem darauf geachtet werden, dass durch die Wahl des Lösungsmittels keine Analyten aufgrund ihrer Polarität diskriminiert werden. Zusätzlich können leicht flüchtige Verbindungen, besonders wenn sie flüchtiger als das verwendete Lösungsmittel sind, bei der vor der Injektion notwendigen Einengung des in der Kühlfalle gesammelten Destillats verloren gehen (Steinhaus 2019).

Eine weitere Variante, die ohne Nutzung von Lösungsmitteln auskommt, ist die *Headspace*-Methode (HS). Bei der statischen HS wird die Probe in einen hermetisch abgedichteten Container eingebracht, in dessen Gasphase sich ein Gleichgewicht der verdampften Aromastoffe bildet. Diese Gasphase wird dann zur Messung in einen GC injiziert. Durch statische HS-Techniken finden zwar Flüchtigkeits- und Matrixeffekte Berücksichtigung, doch werden hochsiedende Verbindungen aufgrund von Adsorptionsphänomenen diskriminiert. Adsorption könnte nur durch Erhitzung vermieden werden, die jedoch das Risiko des Abbaus

thermolabiler Verbindungen und die Bildung geruchsaktiver Artefakte birgt (Steinhaus 2019; Wang et al. 2008; Seto 1994). Darüber hinaus gibt es dynamische Verfahren, bei denen zum Beispiel ein Gasstrom über die Probe geleitet wird, der anschließend durch eine Falle läuft, in der die Aromastoffe adsorbiert werden. Durch Erhitzung der Falle werden die Aromastoffe freigesetzt und in den GC geleitet (Wang et al. 2008; Seto 1994). Eine weitere, in der Anwendung besonders schnelle und einfache Variante ist die *solid-phase microextraction* (SPME). Bei der SPME kommt eine Faser zum Einsatz, die mit einer extrahierenden Phase beschichtet ist, bei der es sich um ein Polymer handelt. Durch die Auswahl einer passenden extrahierenden Phase kann eine gewisse Selektivität für die zu untersuchenden Analyten erreicht werden. Die Desorption der Analyten im Injektor wird ebenfalls durch Erhitzung erreicht (Yang und Peppard 1994; Zhang et al. 1994; Arthur und Pawliszyn 1990).

Da keine der genannten Methoden vollständig verhindern kann, dass einzelne Aromastoffe durch ihre Flüchtigkeit oder Polarität diskriminiert werden, kommt bei der Analyse von Aromastoffen mittels GC-MS oft die Stabilisotopenverdünnungsanalyse (SIVA) zum Einsatz. Dafür werden vor der Probenaufarbeitung identische, aber stabilisotopenmarkierte interne Standards (IS) zugegeben. Solche IS liegen ab diesem Zeitpunkt in einem bestimmten Verhältnis zu den untersuchten Analyten vor, das auch zum Beispiel bei Verlust eines Anteils der Probe oder anderen Einflüssen gleichbleibt (siehe Abbildung 12). Oft handelt es sich dabei um deuterierte Verbindungen. So kann zur SIVA von Phenylethanol am Phenylring fünffach deuteriertes d_5 -Phenylethanol verwendet werden. Da durch die GC-MS-Analyse die gleichzeitig eluierenden Verbindungen und ihre IS getrennt gemessen werden, lässt sich der Quotient aus Analyt und IS berechnen. Durch eine Kalibriergerade kann aus diesem Quotienten dann die Menge des Analyten in der ursprünglichen Probe bestimmt werden. Zwar wird durch Verwendung der SIVA jeglicher Analytverlust während der Probenaufarbeitung kompensiert, jedoch wird die Entstehung von Aromastoffen durch Artefaktbildung während der Probenaufarbeitung nicht ausgeglichen. Ein weiterer Nachteil der SIVA ist die Kostenintensivität der IS bzw. der hohe Aufwand für deren Synthese (Clifford et al. 1990; Steinhaus 2019).

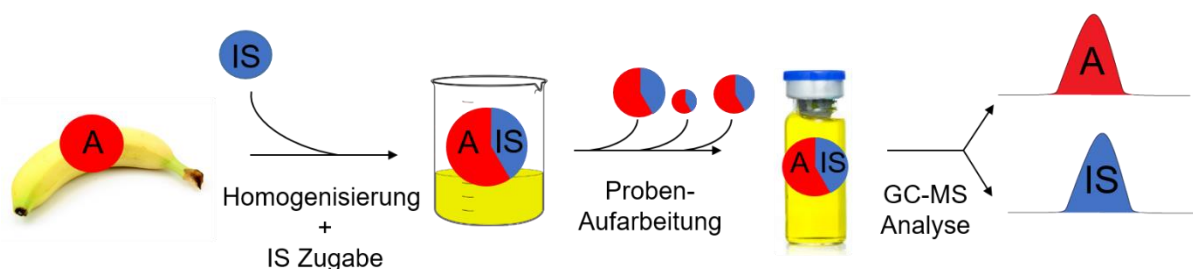


Abbildung 12: Prinzip der SIVA.

1.4.1.2 Derivatisierungen

Die GC-Analytik ist auf flüchtige Verbindungen beschränkt. Um nicht oder schwerflüchtige Analyten zu messen ist es daher notwendig, diese Substanzen durch chemische Veränderung, auch Derivatisierung genannt, in flüchtige Substanzen umzuwandeln, um sie der Analyse per GC zugänglich zu machen. Weitere Vorteile einer der Analyse vorangehende Derivatisierung kann die Verbesserung der chromatographischen Trennung, der Detektion oder der Identifizierbarkeit durch GC-MS sein. Durch das gezielte Derivatisieren von Analyten mit bestimmten funktionellen Gruppen kann außerdem die Selektivität einer Analysemethode erhöht werden. Die Wahl der Derivatisierungsmethode wird dabei auf die Zielsubstanzen, die Matrix, in der sie vorliegen, und die verwendete Analysemethode abgestimmt (Halket et al. 2005; Lin et al. 2008). Beispiele für Derivatisierungen in der GC-Analytik sind die Alkylierung (zum Beispiel Methylierung), Syllierung (zum Beispiel Bildung von Trimethylsilylderivaten) und Acylierung (zum Beispiel Reaktion mit Carbonsäurechloriden), wie in Abbildung 13 dargestellt.

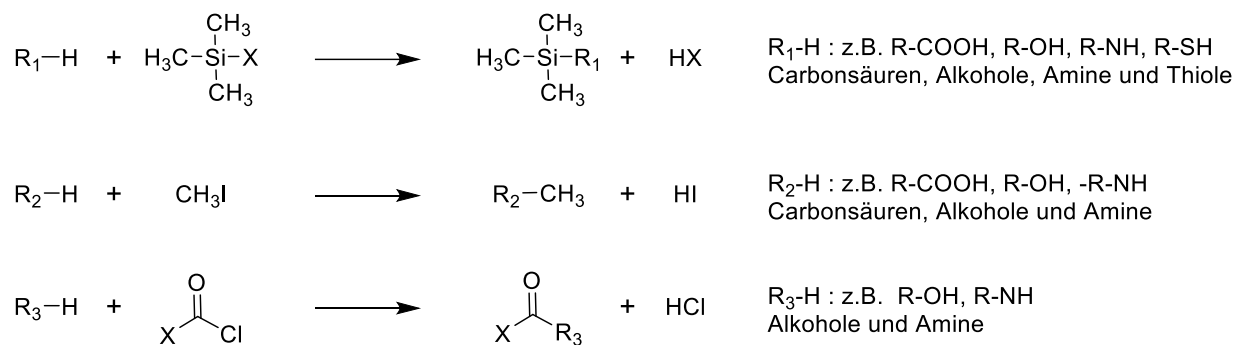


Abbildung 13: Beispiele von Derivatisierungsmethoden in der GC.

1.4.2 Aktivitätsorientierte Analyse von Aromastoffen und SENSOMICS-Konzept

Wie bereits in Kapitel 1.2.4.1 erläutert, ist der Großteil der flüchtigen Verbindungen in Lebensmitteln nicht geruchsaktiv, weshalb die Analyse auf jene Substanzen beschränkt werden sollte, die einen Aromabeitrag leisten. Der Versuch, zunächst eine möglichst große Anzahl flüchtiger Stoffe in einem bestimmten Lebensmittel zu bestimmen und dann in einem zweiten Schritt zwischen den geruchsaktiven und geruchlosen Stoffen zu unterscheiden, ist zu aufwendig und daher nicht sinnvoll (Steinhaus 2019; Grosch 1993). Vielmehr ist es effizienter, die rund 390 verschiedenen Geruchsrezeptoren, die sich in der menschlichen Nase befinden, als sensitive und selektive Detektoren in die Analytik miteinzubeziehen. Aus diesem Grund wurde die GC-Olfaktometrie (GC-O) entwickelt, bei der durch einen Split ein Teil des Säuleneffluats mit den Analyten aus der GC zu einem *sniffing port* geleitet wird, an dem der Anwender riechen kann (siehe Abbildung 14). Der andere Teil wird weiterhin in einen Detektor

wie den FID oder ein MS geleitet. Durch die Anwendung der GC-O kann den Signalen eines instrumentellen Detektors ein Geruchswert zugeordnet werden (Song und Liu 2018).

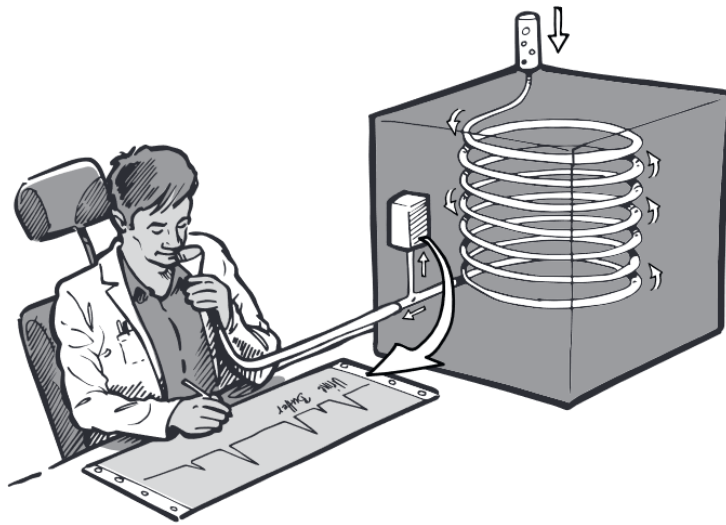


Abbildung 14: Prinzip der GC-O, aus Hall et al. (2017).

Eine mögliche Anwendung der GC-O ist zur Aromaextraktverdünnungsanalyse (engl.: *aroma extract dilution analysis*; AEDA), bei der ein Aromaextrakt in schrittweisen Verdünnungen in das System injiziert wird, bis keine der Aromastoffe mehr wahrgenommen werden. Den Aromastoffen wird entsprechend der Verdünnungsschritte, nach denen sie noch zu riechen sind, ein *Flavor-dilution*-Faktor (FD) zugeordnet. Durch diese Methode lassen sich die Aromastoffe nach ihrem Aromabeitrag ordnen (Grosch 1993). Ein Vorteil der Methode besteht darin, dass Substanzen, die zwar in niedrigen Konzentrationen vorliegen, aber wegen ihrer niedrigen Geruchsschwellen trotzdem geruchsaktiv sind, vom Anwender der GC-O erkannt werden, auch wenn die Sensitivität des instrumentellen Detektors nicht ausreichend ist. Im Anschluss werden dann die OAV (siehe Kapitel 1.2.4.1) der bei der GC-O als signifikant eingestuften Verbindungen berechnet, um deren tatsächlichen Aromabeitrag abschätzen zu können, denn bei der Analyse durch GC-O werden mögliche Verluste oder Veränderungen der flüchtigen Fraktion durch die Probenaufarbeitung nicht berücksichtigt. Auch nach Berechnung der OAV können einige der Schlüsselaromastoffe des untersuchten Lebensmittels unentdeckt und über- oder unterbewertet sein. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass während der GC-O oder bei Betrachtung der OAV nur einzelne Verbindungen bewertet werden, obwohl die Aromastoffe beim Verzehr eines Lebensmittels als Mischung wahrgenommen werden. In Mischungen von Aromastoffen kommt es jedoch zu suppressiven und additiven Effekten, die die relative Bedeutung einzelner Aromastoffe stark beeinflussen können (Steinhaus 2019). Um diesem Problem entgegenzutreten, kann das SENSOMICS-Konzept (Schieberle und Hofmann 2011) angewendet werden. Dabei werden zur vorangehend

erläuterten aktivitätsorientierten Analyse mittels GC-O und AEDA in einem zusätzlichen Schritt Rekombinations- und Omissionsexperimente durchgeführt. Beim Zusammenstellen eines Rekombinats wird eine Mischung aus Aromastoff-standards hergestellt, die den im Lebensmittel quantifizierten Konzentrationen gleicht. Durch den sensorischen Vergleich dieses Rekombinats mit dem untersuchten Lebensmittel, ist es möglich, festzustellen, wenn bedeutende Aromastoffe in der Analyse unentdeckt bleiben. Sollten bei der Sensorischen Analyse Unterschiede auftreten, wäre eine Möglichkeit, mit der aktivitätsorientierten Analyse von vorne zu beginnen. Andererseits, lassen sich durch gezieltes Weglassen einzelner Aromastoffe aus dem Rekombinat, dem sogenannten Omissionsexperiment, Aromastoffe feststellen, die zum Beispiel aufgrund suppressiver Effekte in ihrer Bedeutung überbewertet wurden und tatsächlich nicht zu den Schlüsselaromastoffen des untersuchten Lebensmittels gehören (Langos et al. 2013; Franitza et al. 2016; Utz et al. 2021).

1.5 Motivation und Zielsetzung

Wie im vorherigen Kapitel beschrieben, werden flüchtige Aromastoffe standardmäßig mittels GC analysiert. Allerdings sind Extraktion, Probenvorbereitung und Laufzeiten in der GC-Analyse oft umfangreich und zeitaufwendig, zum Beispiel die Extraktion durch SAFE (vergleiche Kapitel 1.4.1.1). Eine echte „Industrialisierung“ der Geruchsstoffanalyse in Lebensmitteln und deren Vorstufen ist deshalb heute kaum möglich. Aufgrund der bereits erwähnten großen Schwankungsbreite der Geruchsschwellen für verschiedene Aromastoffe, die von pg/kg- bis mg/kg-Konzentrationen reichen, und der daraus folgenden Unterschiede in der Konzentration dieser Verbindungen in Lebensmitteln, kann es zu Schwierigkeiten bei der GC-MS-Messung kommen. Infolge des engen linearen Bereichs von Standard-GC-MS-Systemen von bis zu vier Größenordnungen kann die Verwendung mehrerer Injektionen in unterschiedlichen Verdünnungen erforderlich sein. Im Vergleich dazu wird die Analyse nichtflüchtiger Geschmacksstoffe in der Regel mit Flüssigchromatographie in Verbindung mit einem MS durchgeführt. Genauso wie bei den Aromastoffen zeigen die Geschmacksschwellenwerte verschiedener Substanzen eine hohe Varianz. Sie liegen im $\mu\text{mol/kg}$ -Bereich für adstringierende oder bittere Polyphenole und Terpenoide (Haseleu et al. 2009) sowie bestimmte Geschmacksverstärker (Mittermeier et al. 2018; Hillmann et al. 2016) und im mmol/kg -Bereich für grundlegende Geschmacksstoffe wie Aminosäuren, organische Säuren und Kohlenhydrate. Die moderne Ultra-Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie mit Fast-Scanning-Tandem-Massenspektrometern (UHPLC-MS/MS) ermöglicht aktuell eine hochpräzise und empfindliche Quantifizierung über einen großen dynamischen Bereich von bis zu sechs Größenordnungen. Zudem sind UHPLC-MS/MS-Methoden mit kurzen Analysenzeiten und effizienter Probenaufarbeitung gut für die schnelle Hochdurchsatzanalytik geeignet, wie es beispielsweise in der Qualitätskontrolle am Wareneingang oder zur

Überwachung der Produktion erforderlich ist. Da Lebensmittel außerdem durch eine Kombination von Geschmacks- und Geruchseindruck wahrgenommen werden, wäre eine einheitliche Quantifizierung beider Stoffklassen im Hochdurchsatz mit demselben Instrumentarium von großem Vorteil. Um die leicht flüchtigen, meist schwer zu ionisierenden und schlecht durch Flüssigchromatographie trennbaren Aromastoffe mittels UHPLC-MS/MS analysieren zu können, ist eine vorangehende Derivatisierung notwendig. Erfolge wurden hier bereits mittels Derivatisierungsreagenzien wie 3-Nitrophenylhydrazine (3NPH) (Han et al. 2013) erzielt. Die einheitliche Quantifizierung von Geschmacks- und Aromastoffen wurde bisher für einzelne Lebensmittel wie Apfelsaft (Hofstetter et al. 2019), Minze (Peters et al. 2021) oder Joghurt (Utz et al. 2021) und für einzelne Aromastoffklassen wie Carbonsäuren (Han et al. 2015), Aldehyde (Hofstetter et al. 2019) oder Pyrazine (Yan et al. 2020) durchgeführt. Der Nachweis, dass verschiedenste Aromastoffe in den unterschiedlichsten Lebensmitteln durch UHPLC-MS/MS analysiert werden können, steht jedoch weiterhin aus. Daher ist das Ziel dieser Arbeit, eine Methodik zu entwickeln, um die als Generalisten definierten Aromastoffe mittels UHPLC-MS/MS in verschiedensten Lebensmittelmatrizes analysierbar zu machen und damit den Weg zu einer einheitlichen Quantifizierung von Geruchs- und Geschmacksstoffen im Hochdurchsatz mit demselben Instrumentarium zu bereiten.

2 Eingebundene Publikationen

2.1 *Rapid, High-Throughput Quantitation of Odor-Active 2-Acetyl-Azaheterocycles in Food Products by UHPLC-MS/MS* (Publikation I)

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine schnelle und effiziente Hochdurchsatzmethode zur Quantifizierung der geruchsaktiven 2-Acetylazaheterocyclen 2-Acetyl-1-pyrrolin, 2-Acetyl-1,4,5,6-tetrahydropyridin, 2-Acetylpyrazin und 2-Acetyl-2-thiazolin in verschiedenen Lebensmittelmatrizes mittels UHPLC-MS/MS entwickelt. Für die Analyse mittels UHPLC-MS/MS wurde eine Derivatisierung mit 3NPH eingesetzt. Die 3NPH-Reaktion kann für verschiedene Analyten mit einer Carbonylgruppe durchgeführt werden und wurde bereits von mehreren Forschungsgruppen für die Derivatisierung und anschließende LC-MS Messung verwendet (Han et al. 2013; Hofstetter et al. 2019). Die in dieser Arbeit entwickelte Methode zeigt die Anwendbarkeit der 3NPH-Derivatisierungstechnik für verschiedene Lebensmittel und für die für Standard-GC-MS-Methoden herausfordernde Quantifizierung von geruchsaktiven 2-Acetylazaheterozyklen.

Unter Verwendung von stabilisotopenmarkierten internen Standards konnte eine hohe Präzision erreicht werden. Dabei wurden die Wiederfindungen im Bereich von 81,1–115,2 % ermittelt. Für 2-Acetyl-1-pyrrolin, 2-Acetyl-1,4,5,6-tetrahydropyridin, 2-Acetylpyrazin und 2-Acetyl-2-thiazolin wurden Bestimmungsgrenzen von jeweils 0,6; 0,5; 0,6 und 1,0 µg/kg ermittelt. So konnten die Analyten im Bereich ihrer Geruchsschwellen quantifiziert werden. Aufgrund der schnellen Extraktion durch *Bead-Mill*-Homogenisierung, die nur geringe Probenmengen (0,5 g) erfordert, sowie der schnellen Derivatisierung durch 3NPH (40 °C, 2 h) und kurzer UHPLC-MS/MS-Laufzeiten (15 min) eignet sich diese Methode für die Hochdurchsatzanalytik besonders.

Individuelle Beiträge von Markus Bösl sowie den Coautoren sind im Folgenden aufgeführt: Markus Bösl entwickelte die vorgestellte Methode, führte die praktischen Arbeiten durch und beschaffte das Probenmaterial. Zudem entwickelte er den Aufbau des Papers, entwarf alle Tabellen und Abbildungen, schrieb den ersten Entwurf des Manuskripts mit Unterstützung und führte die Revision durch. Andreas Dunkel und Thomas Hofmann wirkten bei der Erstellung des Konzepts der Methode mit. Weiterhin lektorierte Andreas Dunkel die Erstfassung dieses Manuskripts.

(vollständiger Abdruck der original-Publikation befindet sich unter Kapitel 7)

2.2 *Toward High-Throughput Analysis of Aroma Compounds Using Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry: Screening of Key Food Odorants in Various Foods* (Publikation II)

Da der Ansatz der einheitlichen Quantifizierung von Aroma und Geschmack sowie die Analyse von Aromastoffen mittels LC im Allgemeinen bisher ausschließlich auf eine kleine Auswahl von Lebensmitteln und Analyten angewandt wurde, war es das Ziel dieser Studie, die Analyse von Aromastoffen mittels UHPLC-MS/MS breiter anzuwenden. Dazu wurde eine schnelle Hochdurchsatzmethode für die Quantifizierung der sogenannten Generalisten – Aromastoffe, die in mehr als einem Viertel der Lebensmittel vorkommen (Dunkel et al. 2014) – entwickelt. Da die Gruppe der Generalisten sowohl Alkohole als auch Thiole enthält, die sich nicht mit etablierten Derivatisierungsreagenzien wie 3NPH umsetzen lassen, wurde eine neue Derivatisierungsmethode entwickelt. Daher wurde die Synthese von DGTA durchgeführt, das eine reaktive Epoxidgruppe, eine für die Umkehrphasen-LC geeignete Polarität und eine hohe Empfindlichkeit bei der ESI aufweist. Nach Optimierung der Derivatisierungsparameter wurde eine effiziente Methode zur Analyse flüchtiger Alkohole, Phenole und Thiole mittels UHPLC-MS/MS entwickelt.

Mit der Kombination der neu entwickelten DGTA-Derivatisierung und der etablierten 3NPH-Derivatisierung für Carbonylgruppen war es möglich, zu zeigen, dass 23 der 27 Generalisten mittels UHPLC-MS/MS-Methode genau quantifiziert werden können. Die Analysen wurden in 30 verschiedenen Lebensmitteln analysiert um die Anwendbarkeit in verschiedenen Matrices aufzuzeigen.

Die hohe Genauigkeit aufgrund der Verwendung von stabil Isotopen markierten internen Standards, die schnelle und vielseitige Extraktion durch *Bead-Mill*-Homogenisierung, die nur geringe Probenmengen (0,5 g) erfordert, die effiziente Derivatisierung und die schnellen UHPLC-MS/MS-Läufe (12 min) machen diese Methode für die Hochdurchsatzanalyse besonders geeignet.

Da die ursprüngliche Definition von Generalisten nur die Häufigkeit der in den untersuchten Lebensmittelproben vorhandenen Verbindungen berücksichtigt, nicht aber deren Geruchsaktivität in den einzelnen Lebensmitteln, wurde eine alternative Metrik zur Quantifizierung ihrer Bedeutung entwickelt. Bei Anwendung der neuen Definition, die eine Sortierung nach Rangfolge auf der Grundlage der OAV vornimmt, erhöhte sich die Zahl der Generalisten von 17 auf 27. Dabei blieb der Großteil der durch die vorherige Methodik als Generalist ermittelten Verbindungen in dieser Gruppe oder erreichte zumindest einen hohen Rang.

Individuelle Beiträge von Markus Bösl sowie den Coautoren sind im Folgenden aufgeführt: Markus Bösl entwickelte die vorgestellte Methode, führte praktische Arbeiten durch und beschaffte Teile des Probenmaterials. Zudem entwickelte er den Aufbau des Papers, entwarf alle Tabellen und die Abbildungen 1, 2, 3 und 5 und Abbildung 4 gemeinsam mit Andreas Dunkel. Markus Bösl, schrieb außerdem den ersten Entwurf des Manuskripts und führte die Revision durch. Andreas Dunkel, Corinna Dawid, Timo Stark und Thomas Hofmann wirkten mit bei der Erstellung des Konzepts der Methode. Timo Stark lektorierte die Erstfassung des Manuskripts. Andreas Dunkel und Andrea Spaccasassi führten statistische Auswertungen durch und letzterer erstellte außerdem Abbildungen 6 und S7. Anja Dollinger und Daniela Hartl führten praktische Arbeiten durch und beschafften Teile des Probenmaterials.

(vollständiger Abdruck der original-Publikation befindet sich unter Kapitel 7)

3 Angewandte Methoden und Instrumente

3.1 UHPLC-MS/MS-System

Die UHPLC ist die modernste Form der Flüssigchromatographie und erreicht durch die verwendeten Säulen, die mit Partikel $< 2 \mu\text{m}$ gepackt sind und Drücken von bis zu 1200 bar, eine hohe Trenneffizienz bei niedrigen Flussraten (Wu und Thompson 2006). Für alle Messungen dieser Arbeit wurden ein UHPLC-MS/MS-System mit Grundeinstellungen verwendet, die standardmäßig auch in den meisten Laboren verwendet werden. Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden ausschließlich mit Säulen mit an Silica gebundenen Octadecylgruppen (C18) als stationäre Phase und Acetonitril/Wasser als mobile Phase verwendet (*Reversed-Phase*-Flüssigchromatographie - RPLC). Bei dieser Technik wird die Retention durch die Verteilung der gelösten Stoffe zwischen der mobilen und der stationären Phase auf dem Weg durch die chromatographische Säule bestimmt (Wu und Thompson 2006). Ähnlich wie durch den Temperaturgradienten bei der GC kann bei der RPLC die Verteilung der Analyten zwischen mobiler und stationärer Phase durch einen Gradienten der verwendeten Lösungsmittel beeinflusst werden.

Die in der modernen UHPLC-MS/MS-Analytik am häufigsten verwendete Ionenquelle, die auch in dieser Arbeit verwendet wurde, ist die *electrospray ionization* (ESI). Als weiche Ionenquelle ist sie für die MS/MS-Analytik besonders geeignet. Diese ist am Effektivsten, wenn die Analytmoleküle ohne (*in-source*) Fragmentierung ionisiert werden. In Abbildung 15 ist das Funktionsprinzip der ESI schematisch dargestellt: Das Fließmittel, in dem die Analyten gelöst sind, wird durch eine Metallkapillare in die Quelle geleitet und durch ein Elektrospray in feines Aerosol dispergiert. Zur Verdampfung des Fließmittels und damit Verkleinerung der Tröpfchen wird die Quelle in der Regel beheizt und es wird der Luftstrom eines Inertgases wie Stickstoff verwendet. Das Lösungsmittel verdampft aus den geladenen Tröpfchen, bis die elektrostatische Abstoßung gleichartiger Ladungen in dem immer kleiner werdenden Tröpfchen stärker wird als die Oberflächenspannung, die das Tröpfchen zusammenhält. Ist dieser Punkt erreicht, entstehen durch die Coulomb-Spaltung viele kleinere, stabilere Tröpfchen. Die neu entstandenen Tröpfchen werden ebenso durch Verdampfung des Lösungsmittels verkleinert und können wieder gespalten werden, bis es zur eigentlichen Ionisierung der Moleküle in der Gasphase kommt (Wilm 2011; Konermann et al. 2013).

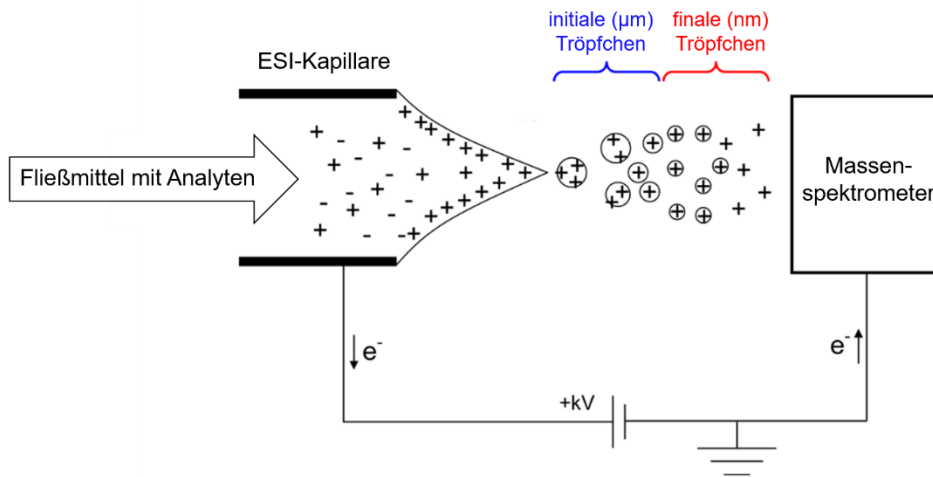


Abbildung 15: Schematische Abbildung einer ESI-Ionenquelle, operiert im positiven Modus, verändert aus Konermann et al. (2013).

Zur Erhöhung der chromatographischen Auflösung der RPLC und zur Verbesserung der Ionisierung in der Quelle und damit der Empfindlichkeit der Messung werden den Fließmitteln in der LC-MS-Analyse häufig *modifier* zugegeben. Eine wichtige Anforderung an diese Komponenten ist ausreichende Flüchtigkeit, damit sie in der ESI-Quelle effizient verdampft werden können. Weiterhin darf die Empfindlichkeit der MS-Detektion nicht durch Verunreinigungen oder Adduktbildung gemindert werden. Typische *modifier* für mobile Phasen, sind Ammoniumformiat- und Ammoniumacetatpuffer, sowie Ameisen-, Essig- und Trifluoressigsäure. Da diese Verbindungen den pH-Wert des Fließmittels stabilisieren, verbessern sie die Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten und können gleichermaßen die chromatographische Auflösung verbessern. Außerdem erhöhen sie die Leitfähigkeit und stellen eine Protonenquelle dar, wodurch sie den Ionisierungsprozess beeinflussen können. Da der Einfluss auf die Ionisierung abhängig von den Analyten und dem Ionisierungsmodus sowohl positiv als auch negativ sein kann, sollte der gewählte *modifier* auf die Anwendung abgestimmt sein (Li et al. 2012). In dieser Arbeit wurden den Fließmitteln ausschließlich 0.1 % Ameisensäure als *modifier* zugesetzt.

Bei dem verwendeten MS/MS-System handelt es sich um ein Triple-Quadrupol-MS (TQMS). Dieses besteht aus drei hintereinander geschalteten Quadrupol-Massenfiltern Q_1 , Q_2 und Q_3 (Abbildung 16). Von diesen dient Q_2 als Reaktionskammer, um die Molekülionen aus Q_1 zu fragmentieren. Die Fragmentionen werden wiederum von Q_3 gefiltert und zum Detektor geführt. Durch die schnelle Durchlaufzeit der Ionen und die schnelle Umschaltzeit der Quadrupole ist es möglich, innerhalb von weniger als einer Sekunde mehrere Molekülionen zu filtern, zu fragmentieren und die Fragmente zu detektieren. Dabei wird vom *multiple reaction monitoring* (MRM) gesprochen und beim Messen der Fragmentionen auch vom Detektieren

von Massenübergängen. Die Massenübergänge der gesuchten Analyten müssen für die Analyse mittels TQMS jedoch vorher bekannt sein. Dazu wird eine Verdünnung des Analyten hergestellt und dem System injiziert. Durch das automatische, schrittweise Erhöhen der verschiedenen elektrischen Potenziale in der Ionenquelle und dem TQMS, werden die intensivsten Massenübergänge erkannt und die elektrischen Potenziale für eine maximal sensitive Detektion optimiert. Dies betrifft zum Beispiel die *collision energy*, die in q_2 die notwendige Energie zur Fragmentierung liefert. Je größer diese Energie ist desto kleiner sind die entstehenden Fragmente.

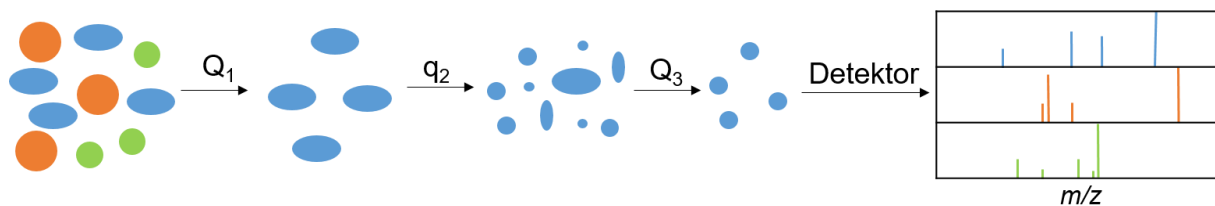


Abbildung 16: Schema der Tandem-Massenspektrometrie mittels TQMS.

3.2 LC-MS-Aromastoffanalytik

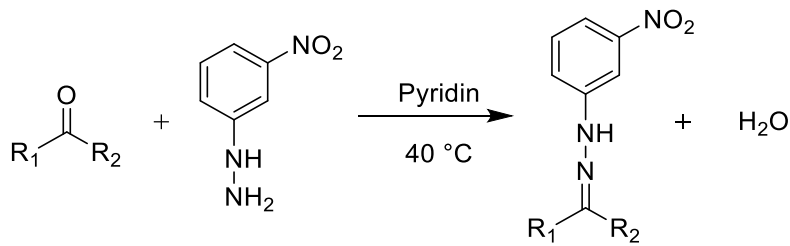
Die Analyse der flüchtigen Aromastoffe mittels LC-MS ist ein neues Forschungsgebiet, das sich gerade erst entwickelt. Das liegt daran, dass LC-MS-Geräte nicht für die Analyse kleiner, flüchtiger Moleküle wie Aromastoffe konzipiert sind und die verwendeten Ionenquellen wie ESI zumeist weiche Ionisierungsformen darstellen. Diese können die kleinen Moleküle nur schwer ionisieren. Durch Verwendung härterer Ionisierungsquellen wie *atmospheric-pressure chemical ionization* (APCI) können jedoch ausreichend Molekülionen erzeugt werden und Analyten wie die in Minze (Peters et al. 2021) oder Cannabis (Hyland et al. 2016) enthaltenen geruchsaktiven Terpenoide und Terpene mittels UHPLC-MS/MS quantifiziert werden. Außerdem können bestimmte Aromastoffe nach Anreicherung auch durch LC-ESI-MS/MS analysiert werden, wie von Hofstetter et al. (2019) an Estern und β -Damascenon nach Anreicherung aus Apfelsaft durch *stir-bar sorptive extraction* (SBSE) oder von Pereira et al. (2018) an Sotolon nach Anreicherung aus Wein durch flüssig/flüssig-Extraktion gezeigt. Für Analyten wie Pyrazine, die sich durch die enthaltenen Stickstoffatome einfach ionisieren lassen, ist die Analyse mittels LC-ESI-MS/MS in einfachen Matrices wie einem destilliertem alkoholischen Getränk auch ohne Probenaufarbeitung möglich (Yan et al. 2020).

Diese in den genannten Fällen gut funktionierenden Methoden stoßen bei der Analyse komplexer Lebensmittelmatrices und kleiner oder schwer zu ionisierender Analyten jedoch an ihre Grenzen. Bei der LC-MS-Analytik werden, ohne vorangehende langwierige Isolierung der flüchtigen Verbindungen, ebenso nichtflüchtige, niedermolekulare Verbindungen wie etwa organische Säuren mit den Aromastoffen coeluieren, die dann aufgrund der geringen

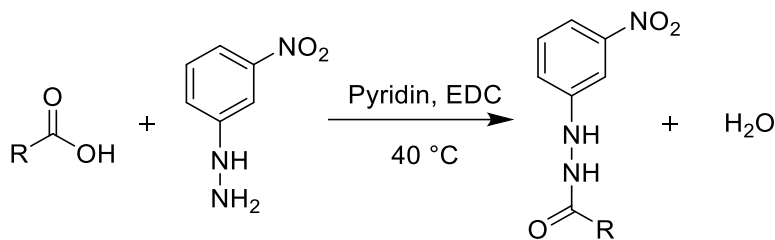
Molekülgröße kaum in der MS/MS-Analyse fragmentieren und daher von den Aromastoffen nur schwer zu unterscheiden sind. Allgemein ist bei der massenspektrometrischen Analyse im niedrigen Massenbereich von einem hohen Hintergrundrauschen durch niedermolekulare Metaboliten auszugehen, wodurch die Detektion von niedrig konzentrierten Analyten behindert wird. Um das Molekulargewicht der Aromastoffe zu erhöhen, ihre Flüchtigkeit zu verringern und außerdem die Ionisierung und Fragmentierung der Analyten zu optimieren, ist also eine Derivatisierung der Aromastoffe vor der LC-MS-Analyse notwendig. Außerdem sollte die Retention bei der LC verbessert und damit eine effizientere Separation erreicht werden. Durch die Derivatisierung wird es erleichtert, Analyten, die in ihrer Polarität stark unterschiedlich sind, auf einer einzigen stationären Phase zu trennen.

3.3 Derivatisierungen in der LC-MS-Aromastoffanalytik

Ein Beispiel für eine Derivatisierungsmethode, die der Analyse von Aromastoffen mittels LC-MS vorangeht, ist die Reaktion zu Hydrazonen mit 3NPH. Dieses Reagenz wurde bereits seit längerer Zeit für die LC-MS-Analyse verwendet, um verschiedene Verbindungen mit Carbonylgruppen zu analysieren. 3NPH wurde beispielsweise von Han et al. (2013) zur Messung von Carbonsäuremetaboliten wie Brenztrauben- oder Milchsäure in Mäuseherzen genutzt. Die in Abbildung 17 dargestellte Reaktion findet unter milden Bedingungen von nur 40 °C im Basischen (Pyridin) statt. Die Kopplung des 3NPH über dessen primäre Amingruppe mit Aldehyden und Ketonen findet spontan statt, während Carbonsäuren nur unter Verwendung eines Kopplungsreagenzes wie 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) mit 3NPH reagieren.



R₂: -H - **Aldehyde**
 -Alkyl / Aryl - **Ketone**



Carbonsäuren

Abbildung 17: Derivatisierung von Aldehyden, Ketonen und Carbonsäuren mittels 3NPH, nach Hofstetter et al. (2019).

Die gezielte Analyse von Aromastoffen mittels UHPLC-MS/MS als 3NPH-Derivate wurde als erstes von Hofstetter et al. (2019) beschrieben, die damit in einer einzigen Messung extrem flüchtige Aldehyde wie das geruchsaktive Acetaldehyd, aber auch geschmacksaktive Verbindungen wie Glucose und Zitronensäure in Apfelsaft mit einer SIVA-Methode akkurat quantifizieren konnten. Durch die zusätzliche Messung underivatisierter Ester und β -Damascenon nach einem Anreicherungsschritt konnte das gesamte Sensometabolom von Apfelsaft auf einer Plattform analysiert werden. Peters et al. (2021) analysierten zusätzlich zu Aldehyden auch geruchsaktive Ketone wie Menthon in Minze. Durch die sequentielle Analyse der chemisch unveränderten Terpene mittels LC-APCI-MS und der Alkohole durch Derivatisierung mit Glycidyltrimethylammonium (GTMA) gelang die Bestimmung von 59 Verbindungen, die das Aroma von Minze beeinflussen. Utz et al. (2021) gelang es außerdem, eine SIVA-Methode zur Quantifizierung des gesamten Sensometaboloms eines Milchdesserts mittels einer Kombination aus UHPLC-MS/MS, quantitativer Kernspinresonanz (qNMR) und HS-SPME-GC-MS zu entwickeln. Geruchs- und geschmacksaktive Carbonyle wurden dafür vor der UHPLC-MS/MS-Analyse mit 3NPH derivatisiert, während die leicht flüchtigen Schwefelverbindungen Methanthiol und Dimethylsulfid mittels HS-SPME-GC-MS bestimmt wurden. Methanthiol wurde hierbei zusätzlich *in fiber* (in der SPME-Faser) durch *N*-Ethylmaleimide und Triethylamine derivatisiert, um die Flüchtigkeit zu verringern und die Detektorsensitivität zu erhöhen (Frerot et al. 2014). Die in höheren Konzentrationen vorliegenden Verbindungen wie Zucker konnten mittels qNMR bestimmt werden.

Weitere Arbeiten, bei denen Aromastoffe nach Derivatisierung mittels LC-MS quantifiziert wurden, beziehen sich auf die gleichzeitige Bestimmung von Vanillin und Vanillinsäure nach Derivatisierung mit Dansylchlorid (Bhutani et al. 2018), das zur Derivatisierung der Phenolgruppe diente, sowie auf die Quantifizierung von 2-Acetylpyrroline (2-AP) nach Derivatisierung mit einem Diamin (Jost et al. 2019).

4 Ergebnisse

4.1 Entwicklung einer Derivatisierung für flüchtige Alkohole, Thiole und Amine

Für die Analyse von geruchsaktiven Alkoholen in Lebensmitteln mittels UHPLC-MS/MS findet sich in der Literatur nach derzeitigem Kenntnisstand lediglich die Derivatisierung mit GTMA. Da jedoch mit GTMA derivatisierte Aromastoffe für eine chromatographische Trennung mittels RPLC zu polar sind, wurde nach einem alternativen Reagenz gesucht. Da eine Verbindung, die die gleiche Reaktivität wie GTMA besitzt, dabei aber unpolarer ist, nicht kommerziell erhältlich war, wurde die Synthese von Dimethyl-glycidyl-tolyl-ammonium (DGTA) durchgeführt. DGTA besitzt wie GTMA ein Epoxid mit Kohlenstoffbrücke zu quartärem Stickstoff, verfügt dabei aber über eine Toly-Gruppe (siehe Abbildung 18).

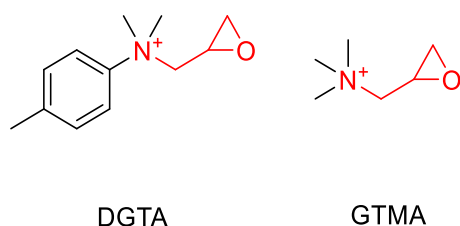
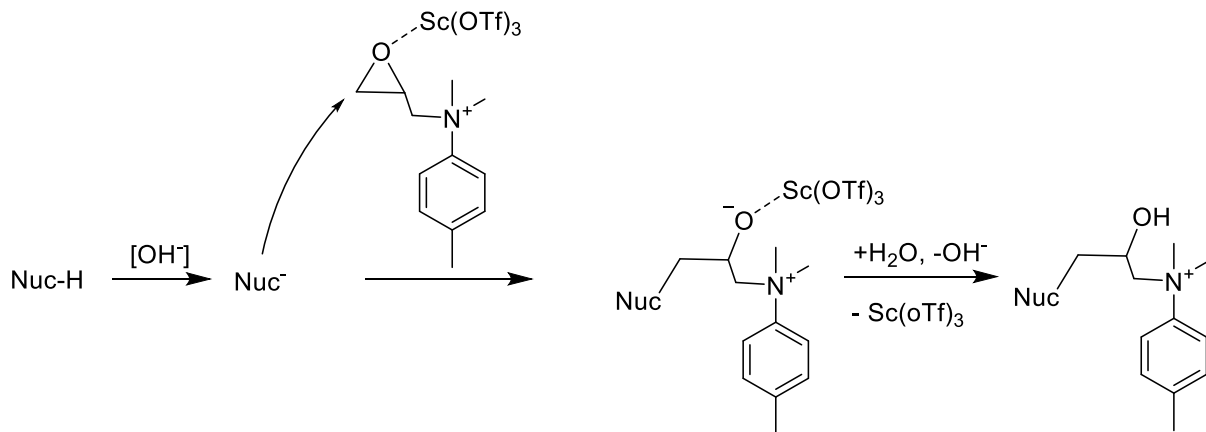


Abbildung 18: Strukturen von DGTA und GTMA im Vergleich; die reaktive Gruppe ist rot markiert.

Für die Synthese wurden die Edukte Toluol und Epichlorhydrin in drei Schritten zu DGTA umgesetzt und dessen erfolgreiche Synthese durch NMR-Experimente und die Bestimmung des akkuraten m/z bestätigt (Publikation II).

Durch Experimente mit verschiedenen Standards, konnte nachgewiesen werden, dass DGTA mit Alkoholen, Thiolen und Aminen ebenso wie GTMA gekoppelt werden kann. Es wird jedoch vermutet, dass die Reaktivität für sterisch gehinderte Analyten wie sekundäre Alkohole für DGTA geringer als für GTMA ist, während für Analyten mit Benzylring wie Phenole durch π - π -Wechselwirkungen eine erhöhte Reaktivität zu erwarten ist. Als optimale Bedingung für die Derivatisierung mit DGTA wurden experimentell Raumtemperatur, 24 h-Inkubationszeit und das Einstellen eines basischen pH-Werts durch Zugabe einer einmolaren Natronlauge bestimmt (Publikation II). Außerdem wurde wie von Peters et al. (2021) für die Derivatisierung von Terpenoiden mittels GTMA die Lewis-Säure $Sc(OTf)_3$ als Katalysator verwendet.

Lanthanidtrifluormethansulfonate besitzen im Unterschied zu anderen Lewis-Säuren den Vorteil, auch im wässrigen Milieu stabil zu sein (Kobayashi und Hachiya 1994). Der postulierte Reaktionsmechanismus der DGTA-Derivatisierung mit $\text{Sc}(\text{OTf})_3$ als Katalysator ist in Abbildung 19 dargestellt. Das Epoxid des DGTA reagiert in der Derivatisierungsreaktion im Basischen mit Nucleophilen wie Alkoholen, Thiolen, Carbonsäuren und Aminen unter einer Ringöffnung.



Nuc-H: Nucleophile:

R-OH (Alkohole, Phenole und Carbonsäuren)

R-SH (Thiole)

R-NH (primäre und sekundäre Amine)

Abbildung 19: Postulierter Reaktionsmechanismus der DGTA-Derivatisierung.

Zur Überprüfung der Reaktivität des DGTA und der RPLC-Retentionseigenschaften der mit DGTA derivatisierten Analyten wurden verschiedene Standards derivatisiert und auf einer C18-Säule injiziert (für die UHPLC-MS/MS-Methode siehe Publikation II). In Abbildung 20 ist zu erkennen, dass selbst kleine und polare Analyten wie Isopropylamin und Methanthiol von der unpolaren C18-Säule retardiert wurden (Totzeit $\sim 0,5$ min). Somit ist es durch die Einführung einer Toluolgruppe in die Struktur des GTMA möglich, Aromastoffe mittels Standard-RPLC-Methoden zu separieren und sensitiv mittels ESI-MS/MS zu detektieren.

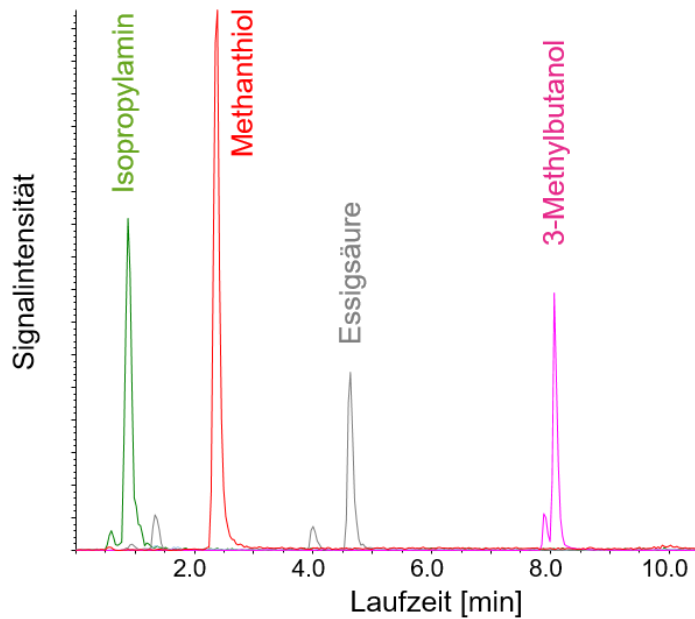


Abbildung 20: Chromatographie der mit DGTA derivatisierten Standards: Isopropylamin, Methanthiol, Essigsäure und 3-Methylbutanol.

4.1.1 Diskussion

Eine wichtige Eigenschaft des neuen Derivatisierungsreagenzes ist die Anwendbarkeit in wässriger Lösung. Wegen der elektronenziehenden Wirkung der Ammoniumgruppe ist die Reaktivität des Epoxids in ausreichendem Maße erhöht, um primäre und sekundäre Alkohole zwar effektiv zu derivatisieren, jedoch für die Bildung eines Diols nicht bzw. nur in geringem Maße mit Wasser zu reagieren. Für die Analyse von wässrigen Lebensmittelextrakten ist dies von entscheidender Bedeutung und ein Unterscheidungsmerkmal zu anderen Alkohol-Derivatisierungen wie der Bildung von Estern mit Carbonsäurechloriden. Ein weiterer Vorteil der quartären Ammoniumgruppe des GTMA bzw. DGTA ist, dass sie eine positive Ladung in die untersuchten Moleküle einbringt und somit die Sensitivität der LC-ESI-MS-Analyse verbessert. Für die Trennung der Analyten mittels RPLC ist die statische Ladung allerdings von Nachteil, da sie die Polarität der Moleküle stark erhöht und damit eine Retention auf RP-stationären Phasen stark mindert. Für unpolare Aromastoffe mit großer Molmasse wie die von Peters et al. (2021) untersuchten Terpenoide ist eine Trennung von GTMA-Derivaten mittels RPLC zwar möglich, doch polarere Aromastoffe wie 3-Methylbutanol, Sotolon oder Ethanol werden nicht ausreichend retardiert. Durch die hier durchgeführte Einführung einer Toly-Gruppe in das Derivatisierungsreagenz ist jedoch eine ausreichende Retardierung auf RPLC-Phasen gegeben.

Während zahlreiche in der Literatur beschriebene Derivatisierungsreagenzien für nur eine oder wenige funktionelle Gruppen genutzt werden können und dies für die Selektivität der Methode nützlich ist (Quirke et al. 1994), ist für das Ziel der Derivatisierung von Aromastoffen ein breit einsetzbares Reagenz nützlich. Da Aromastoffe eine große Anzahl unterschiedlicher funktioneller Gruppen besitzen können, wären gezielte Derivatisierungen für jede einzelne funktionelle Gruppe mit hohem Arbeitsaufwand verbunden. Durch die Verwendung von ausschließlich zwei Derivatisierungsreagenzien – dem zuvor erwähnten 3NPH und dem synthetisierten DGTA – konnten in dieser Arbeit flüchtige Carbonsäuren, Aldehyde und Ketone mittels 3NPH und Alkohole, Thiole und Amine mittels DGTA derivatisiert und durch ein UHPLC-MS/MS-System analysiert werden. Durch die strukturelle Ähnlichkeit der beiden Reagenzien (siehe Abbildung 21) war es außerdem möglich, das System für beide Derivatisierungen mit identischer mobiler und stationärer Phase zu nutzen, wodurch die Effizienz und damit die Hochdurchsatzkapazität der Methodik weiter erhöht wurde (Publikation II).

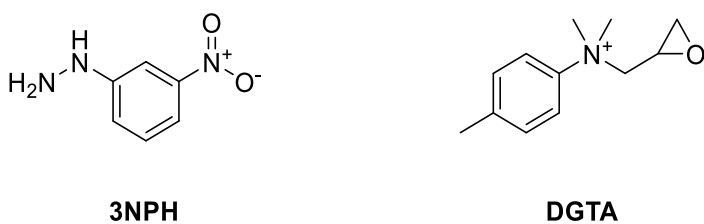


Abbildung 21: Strukturen von 3NPH und DGTA im Vergleich.

4.2 Homogenisierung und Extraktion

Zur effizienten Hochdurchsatzhomogenisierung der Lebensmittelproben wurde eine sogenannte *Bead Mill* (BM) verwendet. Dabei werden Proben in einem stabilen und hermetisch geschlossenen Behälter zusammen mit Kügelchen von unterschiedlichem Material wie Metall oder Keramik durch Schütteln starken G-Kräften ausgesetzt. Durch die entstehenden Scherkräfte werden die Proben aufgeschlossen. In Abbildung 22 ist der gesamte Probenaufarbeitungsprozess schematisch dargestellt: Das feste Probenmaterial wird zusammen mit der Extraktionslösung (Methanol/Wasser, Publikation I; Acetonitril/Wasser, Publikation II) und den IS in ein BM-Gefäß gegeben und homogenisiert. Zur Einstellung eines Gleichgewichts zwischen Analyten und IS im Probenhomogenisat wird das Gemisch zunächst equilibriert. Nach Zentrifugation und Filtration kann der Probenextrakt anschließend derivatisiert und für die UHPLC-MS/MS-Analyse verwendet werden.

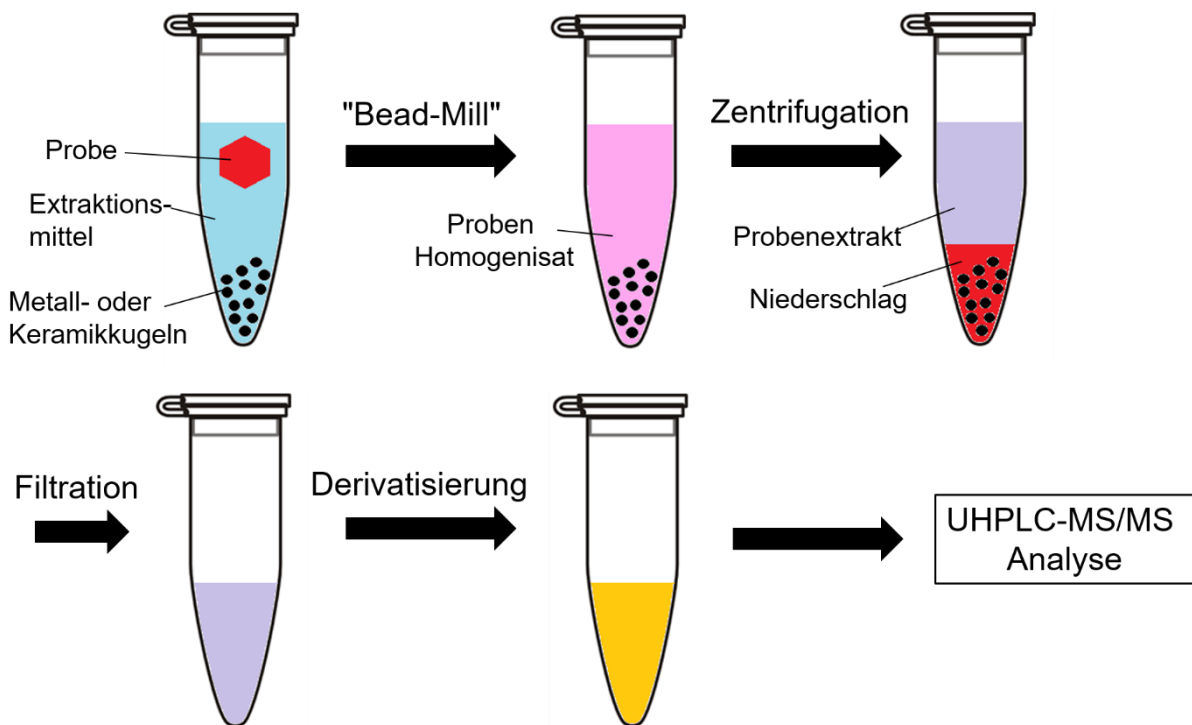


Abbildung 22: Schematische Darstellung der Probenaufarbeitung.

Flüssige Proben bzw. Getränke können nach Zugabe der internen Standards und Membranfiltration direkt derivatisiert werden. Parallel zur Derivatisierung kann für die Analyse fetthaltiger Lebensmittel wie Nüsse eine flüssig/flüssig-Extraktion mit Pentan durchgeführt werden (Publikation I).

4.2.1 Diskussion

Ein Vorteil der Homogenisierung mit einer BM im Vergleich zu herkömmlichen Mühlen ist, dass Extraktionsmittel und interne Standards direkt als erster Arbeitsschritt zugegeben werden können. Durch das zugegebene Extraktionsmittel wird auch die Erhitzung der Probe durch die Reibungskräfte während der Homogenisierung hinausgezögert, was zusätzlich durch vorherige Inkubation im Kühlschrank verstärkt werden kann. Darüber hinaus können BM mit externer Stickstoffkühlung ausgestattet werden. Durch die Homogenisierung in einem geschlossenen Behälter entfällt außerdem der Reinigungsschritt nach Benutzung einer herkömmlichen Mühle. Durch die Möglichkeit der Anwendung verschiedener Kugelgrößen und Materialien ist die Methode besonders breit einsetzbar und kann zum Aufschluss von harten Probenmaterialien wie Kakaobohnen bis hin zur Homogenisierung von Zellorganismen genutzt werden (Kauz et al. 2021; Dunn und Wobbe 2001). Ein weiterer Vorteil ist, dass für die Homogenisierung mittels BM geringe Probenmengen wie in dieser Arbeit (0,5 g) ausreichend sind.

Die Equilibrierungszeit ist ein wichtiger Einflussfaktor der Probenaufarbeitung in der Analyse mit IS. Diese muss zur Gleichgewichtseinstellung mit den IS ausreichend lange andauern, jedoch nicht zu lang, um Veränderungen in der Probe wie Artefaktbildung zu vermeiden. Denn falls während der Probenaufarbeitung Aromastoffe wie Hexanal durch Lipidoxidation entstehen, wird das Ergebnis verfälscht. Als Kompromiss eignen sich für die Equilibrierungszeit daher 2 h (Publikation I und II). Als weitere Einflussfaktoren während der Equilibrierung kommen enzymatische Reaktionen infrage. Enzyme wie LOX oder HPL könnten die Lipidoxidation nach Zerstörung der Zellen durch Homogenisierung stark beschleunigen. Jedoch ist davon auszugehen, dass durch die Zugabe organischer Lösungsmittel wie Acetonitril oder Methanol in hohen Konzentrationen (hier 70 %) eine Denaturierung der Proteine und damit eine Inaktivierung der Enzyme stattfindet. Durch wasserlösliche organische Lösungsmittel können Proteine partiell entfaltet werden, indem sie mit ihren unpolaren Gruppen intramolekulare hydrophobe Wechselwirkungen im Protein beeinträchtigen. Im Gegensatz zu Extraktionsverfahren mittels wasserunlöslicher Lösungsmittel wie Dichlormethan, bei denen CaCl_2 zur Inaktivierung der Enzyme verwendet wird, ist ein Arbeitsschritt zur Inaktivierung der Enzyme hier nicht notwendig (Steinhaus et al. 2009).

Durch die schnellen, effizienten Arbeitsschritte der BM-Homogenisierung können viele Proben gleichzeitig und ohne hohen Arbeitsaufwand im Hochdurchsatz vorbereitet werden.

4.3 Hochdurchsatzanalyse der Aromastoffgeneralisten mittels UHPLC-MS/MS

4.3.1 Neueinteilung der Schlüsselaromastoffe

Bislang wurden einige wenige Methoden beschrieben, mit denen in einzelnen Lebensmitteln sowohl Geschmacks- als auch Aromastoffe im Hochdurchsatz mittels eines einzigen UHPLC-MS/MS-Instruments analysiert werden können. Um eine generelle Anwendbarkeit der Methodik zu zeigen, wurde in dieser Arbeit das Ziel verfolgt, die Generalisten der KFO (siehe Kapitel 1.2.4.1) in verschiedenen Lebensmitteln mittels UHPLC-MS/MS und SIVA zu quantifizieren.

Die Einteilung der Aromastoffe in Generalisten, Mittelgruppe und Spezialisten in der Metaanalyse von Dunkel et al. (2014) ist erweiterbar. Sie berücksichtigt ausschließlich die Häufigkeit der in den 227 Lebensmittelproben vorhandenen KFO (siehe Abbildung 23, Grafik A), nicht aber deren Geruchsaktivität in den einzelnen Lebensmitteln. Daher wurde eine alternative Metrik zur Ermessung der KFO-Bedeutung entwickelt (Publikation II). Zur Verringerung des Risikos einer Überschätzung der Bedeutung einzelner Verbindungen aufgrund der unterschiedlichen Häufigkeit des Vorkommens einiger Lebensmittel wurde ein zusätzlicher Schritt durchgeführt, bei dem die Durchschnittswerte der einzelnen

Geruchsaktivitätswerte für jede Lebensmittelgruppe berücksichtigt wurden. Beispielsweise fanden sich für Orangensaft acht Einträge in der ursprünglichen Datenbank mit marginalem Unterschied in der Verarbeitungstechnologie oder Pflanzensorte, während Olivenöl mit drei Proben unterschiedlicher Herkunft vertreten war. Diese Reduzierung führte zu einer endgültigen Anzahl von 69 Lebensmittelgruppen, die alle bedeutenden Elemente einer durchschnittlichen westlichen Ernährung abdeckten. Innerhalb dieser Lebensmittelgruppen wurden die KFOs jeweils nach ihrem OAV in eine Rangordnung gebracht. Der KFO mit dem höchsten OAV erhielt dabei Rang 1, der mit dem zweit höchsten Rang 2 usw. Mittels statistischer Auswertung wurden alle Rangordnungen in eine einzige zusammengeführt, bzw. wurde jedem KFO ein spezifischer Wert zugeordnet, der als „relative KFO Bedeutung“ betitelt wurde. Je niedriger dieser Wert eines KFOs ist, desto höher seine Bedeutung in Hinsicht auf Häufigkeit und durchschnittliche Höhe des OAVs in den verschiedenen Lebensmittelgruppen. Abbildung 23, Grafik B zeigt die sich daraus ergebende Verteilung als *density plot* mit den KFO-Positionen entlang der Abszisse. Die sich daraus ergebende bimodale Verteilung deutet erneut auf die Existenz von Generalisten und Individualisten hin, wenngleich diesmal nicht nur durch einen manuell gewählten Schwellenwert unterschieden wird und eine größere Gruppe von KFO mit mittlerer Häufigkeit bzw. Bedeutung fehlt. Der Vergleich der beiden Generalistengruppen ergab in Bezug auf abundanz- zu rangbasierter Auswertung eine Erweiterung der Generalisten von 17 auf 27. Außerdem wurden alle Generalisten des ursprünglichen Ansatzes immer noch hoch bewertet. Dadurch konnten zwei Gruppen gebildet werden, die sich größtenteils überschneiden, wie im Venn-Diagramm in Abbildung 23 dargestellt.

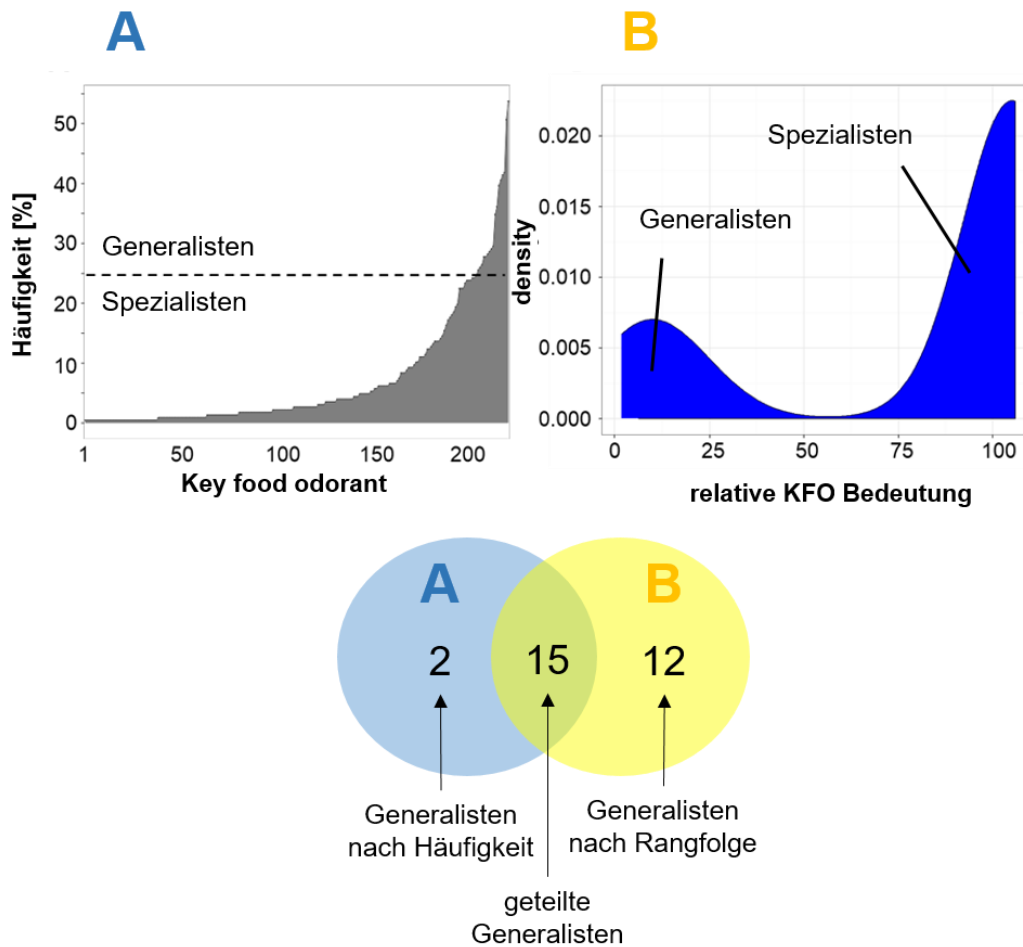


Abbildung 23: Häufigkeit der 226 KFO in 227 untersuchten Lebensmitteln (Grafik A) und *density plot* der KFOs nach relativer KFO-Bedeutung (Rangfolge) basierend auf Häufigkeit und Rang der Geruchsaktivität (OAV-Rang) (Grafik B), mit Venn-Diagramm zur Veranschaulichung der Überschneidungen, verändert aus Publikation II.

Abbildung 24 zeigt die genauen Unterschiede zwischen Abundanz (A) und rangbasierter Bewertung (B), indem die Verbindungen mit abnehmender Relevanz von unten nach oben sortiert wurden. Aromastoffe die von A zu B bzw. B zu A in ihrer Bedeutung abnehmen, sind mit einer schwarzen bzw. roten Linie verbunden. Das Ziel dieser Arbeit war es zu zeigen, dass die so bestimmten 27 Generalisten (in Abbildung 24 auf der rechten Seite grün dargestellten Aromastoffe) mittels UHPLC-MS/MS analysiert werden können. Nach Ausschluss der KFO, für die bereits UHPLC-MS/MS-Quantifizierungsmethoden entwickelt wurden, und von Dimethylsulfid, das aufgrund fehlender funktioneller Gruppen weder von DGTA noch von 3NPH derivatisiert werden kann, verbleiben 17 KFO, die in Abbildung 24 rechts in Fettschrift dargestellt sind.

Generalisten

A: Häufigkeit

KFO

Methanthiol *
 Dimethylsulfid *
 Z-2-Nonenal *
 E,Z-2,6-Nonadienal *
 Z-1,5-Octadien-3-on *
 Ethyl-2-methylpropanoat *
 E-4,5-Epoxydecenal *
 Z-3-Hexenal *
 2-Methylpropanal *
 β-Damascenon *
 Ethyl-butanoat *
 Linalool *
 Buttersäure *
 3- und 2-Methylbuttersäure *
 2-Acetylpyrroline *
 Vanillin *
 E-2-Nonenal *
 Ethyl- 2- und 3-methylbutanoat *
 Acetaldehyd *
 Essigsäure *
 2-Methylbutanal *
 1-Octen-3-on *
 Sotolon *
 Hexanal *
 Furaneol *
 E,E-2,4-decadienal *
 2,3-Butanedion *
 3-Methylbutanal *
 Methional *

B: Rangfolge

KFO

Lit.

Vanillin
 E-2-Nonenal
 Hexanal
 E,Z-2,6-nonadienal
 Sotolon
 Buttersäure b, c
 Ethyl-Butanoat a
 E-4,5-Epoxydecenal
 Linalool
 Dimethylsulfid
 3- und 2-methylbuttersäure c
 2-Acetylpyrroline
 E,E-2,4-Decadienal
 1-Octen-3-on
 Ethyl-2-methylpropanoat a
 Essigsäure b, c
 2-Methylpropanal
 Z-2-Nonenal
 Z-1,5-Octadien-3-on
 2-Methylbutanal
 2,3-Butanedion b
 Furaneol
 Z-3-Hexenal
 Ethyl- 2- und 3- methylbutanoat a
 β-Damascenon a
 Acetaldehyd a, b
 Methional
 Methanthiol
 3-Methylbutanal

Abbildung 24: (A) Bedeutendste KFO nach Häufigkeit sortiert (von unten nach oben) (B) nach Rangfolge der Bedeutung geordnet (von unten nach oben); Generalisten sind entsprechend der jeweiligen Methode grün hervorgehoben; Generalisten, für die bereits UHPLC-MS/MS-Analysenmethoden entwickelt wurden, sind mit Literaturangaben versehen: a: Hofstetter et al. (2019), b: Utz et al. (2021), c: Han et al. (2015); alle in dieser Arbeit analysierten Generalisten sind in Fettschrift hervorgehoben. Verändert aus Publikation II.

4.3.2 Methodenentwicklung zur Quantifizierung der Generalisten mittels LC-MS/MS

4.3.2.1 2-Acetylazaheterozyklen

Neben dem Generalisten 2-Acetyl-1-pyrroline (2ACPY), wurden in Publikation I auch drei weitere geruchsaktive 2-Acetylazaheterozyklen untersucht. 2-Acetyl-1,4,5,6-tetrahydropyridine (2ATHP), 2-Acetylpyrazine (2AP) und 2-Acetylthiazoline (2AT) besitzen ebenso wie 2ACPY niedrige Geruchsschwellen (1,0; 62; 1,0 bzw. 0,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$) und sind in der Gruppe der KFO, jedoch sind sie keine Generalisten. Sie wurden ebenfalls in der Methode analysiert, um die breite Anwendbarkeit der Methodik aufzuzeigen.

Für die Analyse der vier 2-Acetylazaheterozyklen mittels UHPLC-MS/MS wurde 3NPH als Derivatisierungsreagenz gewählt. Entgegen der Erwartung wurde experimentell festgestellt, dass 2ACPY und 2ATHP nicht nur mit einem 3NPH an der Acetylgruppe reagieren, sondern auch mit einem weiteren 3NPH durch Ringöffnung (siehe Abbildung 25). Beide Reaktionen laufen parallel ab, wobei durch die Ringöffnungsreaktion ein m/z von 153 und für die Reaktion mit der Acetylgruppe ein m/z von 135 zum Analytmolekül hinzuaddiert wird. 2-ACPY und 2-ATHP reagieren auf dieselbe Weise, während die stabileren Ringsysteme von 2-AP und 2-AT keiner Ringöffnung unterliegen und nur die Acetylgruppe mit 3NPH koppelt.

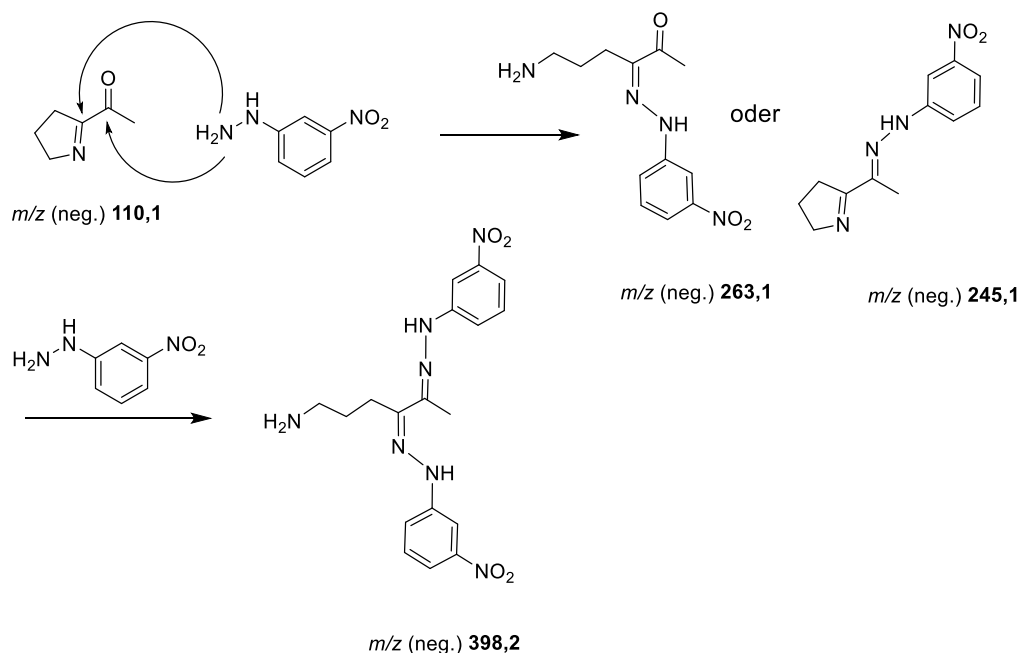


Abbildung 25: Reaktionsmechanismus der 3NPH-Derivatisierung von 2-Acetyl-1-pyrroline.

Da es nicht nur während der Extraktion, sondern auch während der Derivatisierung zu störender Artefaktbildung kommen kann, wurde außerdem ein Experiment durchgeführt, um die Bildung der vier Analyten aus deren bekannten Vorgängerverbindungen während der 3NPH-Derivatisierung zu überprüfen (Publikation I). In einer positiven Kontrolle wurden

α -Dicarbonyle und Aminosäuren als Vorgängerstufen zusammen mit Pyridin erhitzt, was zur Bildung der vier Analyten führte. Durch zusätzliche Zugabe von 3NPH neben Pyridin vor der Erhitzung konnten keine Analyten detektiert werden. Stattdessen wurde beobachtet, dass die Farbe des Reaktionsgemisches sich binnen zehn Sekunden von gelb zu orange änderte. Dies lässt sich darauf zurückführen, dass α -Dicarbonyle, wie in Abbildung 26 dargestellt, mit 3NPH zu Molekülen mit ausgedehnten π -Elektronensystemen reagieren. Da davon auszugehen ist, dass der Hauptteil der Carbonyle während der Derivatisierung mit dem im Überschuss vorhandenen 3NPH abreagiert, anstatt mit Aminosäuren zu reagieren, ist zu erwarten, dass es nicht zu nennenswerten Maillard-Reaktionen während der Derivatisierung kommt. Artefaktbildung durch die nichtenzymatische Lipidoxidation kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Daher empfiehlt es sich, für Methoden zur 3NPH-Derivatisierung von Lipidoxidationsprodukten wie Hexanal die Standard-Derivatisierungszeit von 30 min nicht zu überschreiten (Publikation II).

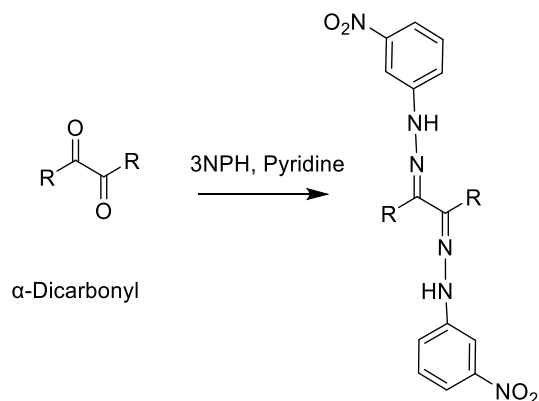


Abbildung 26: Bildung von 3NPH-Derivaten aus α -Dicarbonylen mit erweiterten π -Elektronensystemen.

So konnten durch die angewendete Extraktion mittels BM und Derivatisierung durch 3NPH die vier genannten Analyten mittels UHPLC-MS/MS im Konzentrationsbereich ihrer Geruchsschwellen in unterschiedlichen Lebensmittelmatrizes akkurat quantifiziert werden.

4.3.2.2 Carbonyle

Alle Zielverbindungen (siehe Abbildung 24, (B) Verbindungen in Fettschrift) wurden erfolgreich mit 3NPH derivatisiert. Ebenso konnte die akkurate Quantifizierung eines Großteils der KFO mittels UHPLC-MS/MS in verschiedenen Lebensmitteln durchgeführt werden. Einige der KFO konnten jedoch nicht mit ausreichender Sensitivität oder chromatographisch getrennt analysiert werden:

Die Reaktion von *Z*-1,5-Octadienon mit 3NPH lief nur träge ab, was zu einer nicht ausreichenden Empfindlichkeit bei der Analyse führte. Außerdem zeigten *E*-4,5-Epoxydecenal und 2,4-Nonadienal bei den Standardsubstanzläufen mehrere Peaks und damit auch eine

nicht ausreichende Sensitivität. Darüber hinaus wiesen die Standardläufe von *Z*-3-Hexenal, *Z*-2-Nonenal und *E*-2-Nonenal jeweils drei Peaks auf, was in diesem Fall die Empfindlichkeit nicht drastisch beeinträchtigte, aber *E*-2-Nonenal und *Z*-2-Nonenal chromatographisch untrennbar machte. Alle ungesättigten Aldehyde mit Ausnahme von *E,E*-2,4-Decadienal, das nur eine Peakschulter aufwies, zeigten bei den jeweiligen Standardläufen Mehrfachpeaks. Mehrfachpeaks können bei der Derivatisierung von Ketonen und Aldehyden mit 3NPH entstehen, da 3NPH in der *E*- oder *Z*-Konfiguration an einen Analyten binden kann.

Außerdem konnten 3- und 2-Methylbutanal chromatographisch nicht getrennt werden und wurden daher gemeinsam quantifiziert.

Zusammenfassend wurden aus den genannten Gründen *E*-2-Nonenal und *Z*-2-Nonenal sowie 3- und 2-Methylbutanal gemeinsam quantifiziert. Die Analyse von *Z*-1,5-Octadienon, *E*-4,5-Epoxydecenal und 2,4-Nonadienal wurde in dieser Arbeit aufgrund der schlechten Sensitivität nicht weiter untersucht. Es wird jedoch nicht ausgeschlossen, dass auch diese Verbindungen mit dieser Methode genau quantifiziert werden können, allerdings mit deutlich höheren LoQ-Konzentrationen, als sie in natürlichen Lebensmitteln vorkommen, bzw. deutlich über ihrer Geruchsschwelle. Die restlichen KFO mit Carbonyl-Gruppe konnten im Bereich ihrer Geruchsschwellen quantifiziert werden oder zumindest im Konzentrationsbereich in dem sie in natürlichen Lebensmitteln vorliegen (siehe Tabelle 1). Alle der in Tabelle 1 genannten Verbindungen konnten in mindestens einem der 30 untersuchten Lebensmittel quantifiziert werden (Publikation II).

Tabelle 1: LoQ, LoD und Geruchsschwellen von 3NPH derivatisierten KFO (Publikation II)

	LoQ [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	LoD [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	Geruchsschwelle [$\mu\text{g}/\text{kg}$]
3-Methylbutanal	84.8	10.6	2.0 (Moore et al. 1976)
Methional	0.8	0.2	0.2 (Leffingwell und Leffingwell 1991)
(<i>Z</i>)-3-Hexenal	21.2	10.5	0.3 (Buttery et al. 1990)
Furaneol	128.9	32.2	0.04 (Leffingwell und Leffingwell 1991)
2-Methylbutanal	84.8	10.6	13.0 (Moore et al. 1976)
(<i>Z</i>)-2-Nonenal	34.9	17.5	4.5 (Gassenmeier und Schieberle 1994)
2-Methylpropanal	94.2	94.2	1.0 (Guadagni et al. 1972)
1-Octen-3-on	216.6	216.6	0.030 (Dijkstra und Wikén 1976)
(<i>E,E</i>)-2,4-Decadienal	2.1	0.3	0.1 (Leffingwell und Leffingwell 1991)
Hexanal	150.7	75.4	23.0 (Moore et al. 1976)
(<i>E</i>)-2-Nonenal	34.9	17.5	1.0 (Kosowska et al. 2018)

4.3.2.3 Alkohole, Thiole und Phenole

Neben den Generalisten Methanthiol, Linalool, und Sotolon wurden zur Verdeutlichung der breiten Anwendbarkeit der Methode auch die geruchsaktiven Phenole Guajacol, 4-Ethylphenol, 4-Vinylguajacol, Eugenol, der Alkohol 2-Phenylethanol und das Thiol Furfurylthiol analysiert. Abgesehen von Sotolon und Furfurylthiol, die beide sehr niedrige Geruchsschwellen von 1 bzw. 5 ng/kg (Leffingwell und Leffingwell 1991) besitzen, konnten alle mittels DGTA derivatisierten Analyten im Bereich ihrer Geruchsschwellen quantifiziert werden (siehe Tabelle 2). Alle der in Tabelle 2 genannten Verbindungen konnten in mindestens einem der 30 untersuchten Lebensmittel quantifiziert werden (Publikation II).

Tabelle 2: LoQ, LoD und Geruchsschwellen von DGTA derivatisierten KFO (Publikation II)

	LoQ [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	LoD [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	Geruchsschwelle [$\mu\text{g}/\text{kg}$]
Methanthiol	0.014	0.003	0.59 (Li et al. 2017)
Linalool	282.3	141.1	6.0 (Leffingwell und Leffingwell 1991)
Sotolon	44.4	22.2	0.001 (Leffingwell und Leffingwell 1991)
Guaiacol	51.8	51.8	1.0 (Kosowska et al. 2018)
4-Ethylphenol	20.6	5.2	21.0 (Kosowska et al. 2018)
4-Vinylguaiacol	15.0	3.8	5.0 (Kosowska et al. 2018)
Eugenol	47.4	23.7	100.0 (Kosowska et al. 2018)
2-Phenylethanol	37.7	18.8	0.4 (Kosowska et al. 2018)
Furfurylthiol	16.0	2.0	0.005 (Leffingwell und Leffingwell 1991)

4.3.2.4 Simultane Messung von DGTA- und 3NPH-Derivaten

Da die Polarität der mit DGTA und 3NPH derivatisierten Aromastoffe vergleichbar ist, war es möglich, beide Gruppen in einem LC-MS-Lauf zu analysieren, indem die jeweils einzeln derivatisierten Extrakte vor der Injektion vereinigt wurden. Die positiv ionisierten DGTA- und negativ ionisierten 3NPH-derivatisierten Verbindungen wurden in einem LC-MS/MS-Lauf mittels einer *polarity-switch*-Methode analysiert. Abbildung 27 zeigt beispielhaft die Analyse eines Extrakts von Räuchertofu. *Polarity-switch*-Methoden können durch schnelles Umschalten vom positiven zum negativen Ionisierungsmodus sowohl positive als auch negative Ionen erzeugen und detektieren. Aufgrund negativer Auswirkung auf die Sensitivität der Methode wurde jedoch für alle weitere Analysen dieser Arbeit die getrennte Analyse von 3NPH und DGTA Derivaten bevorzugt.

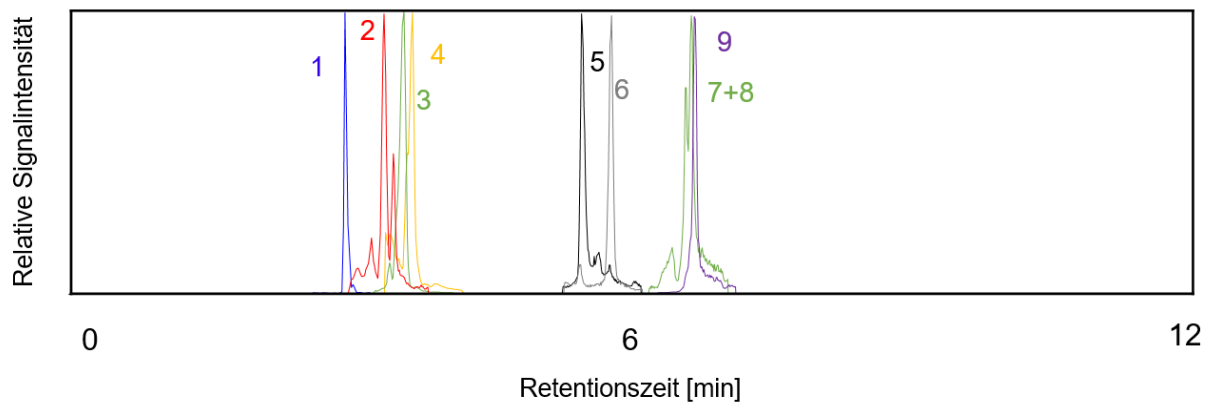


Abbildung 27: Analyse der mit DGTA und 3NPH derivatisierten Analyten in einem Probenlauf in einem Extrakt aus Räuchertofu: Guajacol (1), 4-Vinylguacol (2), Ethylphenol (3), Eugenol (4), Z-3-Hexenal (5), Hexenal (6), E+Z-Nonenal (7 + 8), E,E-2,4-Decadienal (9); verändert aus Publikation II.

4.3.3 Diskussion

3NPH derivatisierte KFO:

Der Generalist 2ACPY mit der niedrigsten Geruchsschwelle der vier analysierten 2-Acetylaheterozyklen (0.1 µg/kg) kommt in der Metaanalyse von Dunkel et al. (2014) mit einer Häufigkeit von 26 % als KFO in den untersuchten Lebensmitteln vor und ist auch aufgrund seines angenehm röstigen Aromas häufig Ziel analytischer Methoden. Aufgrund der oft niedrigen Konzentration, in der 2ACPY vorliegt, und der relativen Instabilität der Verbindung stellt die Quantifizierung von 2ACPY sowie der anderen 2-Acetylaheterozyklen die Analyse mittels GC vor Herausforderungen. Für die Quantifizierung von 2ACPY konnten Verma und Srivastav (2020) in einem Review über 70 verschiedene GC-Methoden aufzeigen. Diese Methoden sind zum Teil umfangreich und benötigen hohe Probenmengen von über 1 kg und unterschiedlichen Anreicherungs-schritten wie SAFE. Aber auch neue, effizientere Methoden wie die Quantifizierung mittels SPME-GC-MS/MS mit den in Kapitel 1.4.1.1 beschriebenen Vor- und Nachteilen sind anwendbar (Verma und Srivastav 2020).

Auch Jost et al. (2019) entwickelten eine Methode zur Quantifizierung von 2-ACPY mittels LC-MS/MS. Als Derivatisierungsreagenz verwendeten sie *o*-Phenylendiamin, das mit 2-ACPY zu einem Quinoxalin reagiert (siehe Abbildung 28). Durch diese effektive Derivatisierung war es trotz des deutlich unempfindlicheren LC-MS/MS-Systems (API-4000-QTrap-LC-MS/MS-System von Sciex, Darmstadt, Deutschland) als das in dieser Arbeit verwendeten ebenfalls gelungen, eine Bestimmungsgrenze (LoQ) von unter 1 µg/kg zu erreichen. Dies ist wahrscheinlich vor allem auf die Bildung des sehr stabilen Quinoxalin Derivates zurückzuführen. Jedoch lässt sich die Methode von Jost et al. (2019) im Gegensatz zur Derivatisierung mit 3NPH nicht für verschiedene Analyten anwenden. Ein weiterer Nachteil der

Methode ist die verhältnismäßig aufwendige Probenextraktion mittels wässrigen Phosphatpuffers. Hierdurch ist eine anschließende Carrez-Klärung erforderlich, weshalb die Methode für die Hochdurchsatzanalyse weniger geeignet ist. In Fällen, in denen eine lange Lagerfähigkeit der derivatisierten Proben oder ausschließlich die Quantifizierung von 2-ACPY mit möglichst niedriger Bestimmungsgrenze gefordert ist, ist die Methode nach Jost et al. (2019) der hier entwickelten Methode jedoch vorzuziehen.

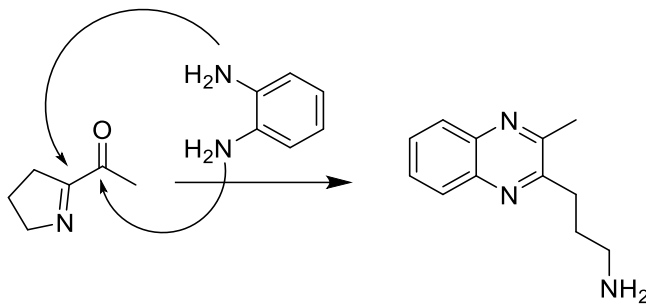


Abbildung 28: Derivatisierung von 2-Acetyl-1-pyrrolin durch o-Phenylendiamin nach Jost et al.(2019).

Zur Quantifizierung von 2-ATHP in Wein mittels LC-MS entwickelte Hayasaka (2019) eine Methode zur direkten Analyse ohne vorherige Derivatisierung. Die Analyse von 2-ATHP mittels GC oder LC wird jedoch dadurch erschwert, dass die Verbindung in einem tautomeren Gleichgewicht vorliegt (siehe Abbildung 29) und daher mehrere Peaks bzw. ein starkes *tailing* verursacht. Deshalb wurden die Weinproben sowie das Fließmittel in der Methode von Hayasaka (2019) basifiziert. Im basischen Milieu wird das tautomere Gleichgewicht zum Imin hin verschoben (siehe Abbildung 29 rechts) und es kann ein distinkter Peak detektiert werden. Durch diese Methode und die Verwendung des gleichen UHPLC-MS/MS-Systems wie in Publikation II (QTRAP 6500+ von AB Sciex), allerdings mit APCI- statt ESI-Ionenquelle, konnte Hayasaka (2019) eine Bestimmungsgrenze von 0,23 µg/l erreichen. Die Anwendbarkeit dieser schnellen Probenaufarbeitung wurde jedoch nur für Wein und keine weiteren Lebensmittel gezeigt. Außerdem ist die Verwendung einer APCI-Ionenquelle ungeeignet für die parallele Bestimmung von Geschmacksstoffen. Da durch die Derivatisierung des 2-ATHP durch 3NPH und die einhergehende Ringöffnung keine Tautomerie mehr stattfinden kann, hat die in Publikation II entwickelte Methode den Vorteil, vom pH-Wert während der chromatographischen Trennung unabhängig zu sein. Dadurch ist diese Methode besonders versatil. Wenn hingegen ausschließlich die Quantifizierung von

2-ATHP in einer Matrix wie Wein gefordert ist, ist die Methode von Hayasaka (2019) vorzuziehen.

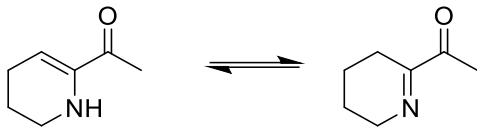


Abbildung 29: Tautomerie von 2-Acetyl-1,4,5,6-tetrahydropyridin.

Unter den neu definierten Generalisten (siehe Kapitel 4.3.1, Abbildung 24) befinden sich neben 2-ACPY weitere Carbonyle wie 3-Methylbutanal oder Furaneol, die erfolgreich mit 3NPH derivatisiert und mittels UHPLC-MS/MS akkurat in verschiedenen Lebensmitteln quantifiziert werden konnten (Publikation II). Eine Ausnahme bildeten die Aromastoffe *Z*-1,5-Octadienon, *E*-4,5-Epoxy-decenal und 2,4-Nonadienal, wie im Folgenden diskutiert.

Die Reaktivität der Alkenone 1-Octen-3-on (LoQ 217 µg/l) und *Z*-1,5-Octadienon (LoQ 218 µg/l) mit 3NPH ist gemessen an den ermittelten Nachweisgrenzen gering. Auch das Alkenon β -Damascenon wurde aufgrund der schlechten Reaktivität mit 3NPH von Hofstetter et al. (2019) underivatisiert bestimmt. Durch die niedrige Geruchsschwelle von *Z*-1,5-Octadienon von 0,005 µg/l ist eine Quantifizierung der Verbindung mittels 3NPH-Derivatisierung und UHPLC-MS/MS-Analyse im Bereich der natürlich in Lebensmitteln vorkommenden Konzentration daher ausgeschlossen. Für die Verbindung 1-Octen-3-on, für die eine Geruchsschwelle von 0,03 µg/l (Dijkstra und Wikén 1976) ermittelt wurde, kann in Lebensmitteln mit hohem Gehalt der Substanz wie Champignons, eine Quantifizierung mittels dieser Methode durchgeführt werden.

Da der nucleophile Rückseitenangriff des primärenamins des 3NPH, durch den es zur Bildung des Hydrazonderivats kommt, eine S_N2 -Reaktion ist, ist davon auszugehen, dass vor allem die Sterik einen entscheidenden Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit hat. Der Einfluss des π -Elektronensystems in Alkenonen ist als gering einzuschätzen. Generell beschleunigen π -Systeme in Nachbarschaft zum Reaktionszentrum, S_N2 -Reaktionen durch einen stabilisierenden Effekt im Übergangszustand. Dies konnte auch durch die ermittelten LoQ von Peters et al. (2021) bestätigt werden. Deren LoQ fallen für das Alkenon Pulegon deutlich niedriger aus als für das Alkanon Isomenthon. Dieselbe Tendenz zeigte sich bei Menthon und Carvon, wobei die niedrigsten LoQ für jene Ionone ermittelt wurden, bei denen die Carbonylgruppen die geringste sterische Hinderung aufwiesen (siehe Abbildung 30).

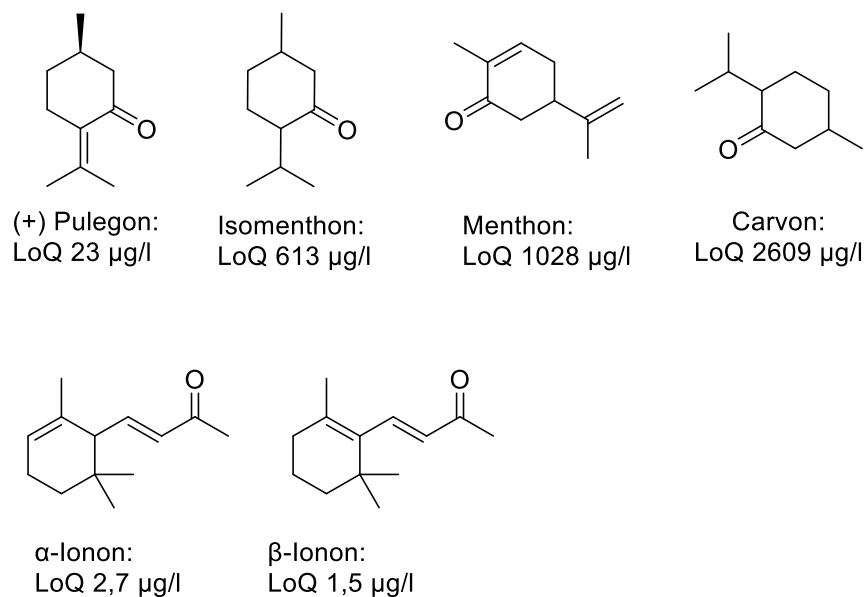


Abbildung 30: Bestimmungsgrenzen ausgewählter, mit 3NPH derivatisierter Ketone, wie von Peters et al. (2021) ermittelt.

Daraus lässt sich für die Effizienz der 3NPH-Derivatisierung für Ketone das in Abbildung 31 gezeigte Schema postulieren.

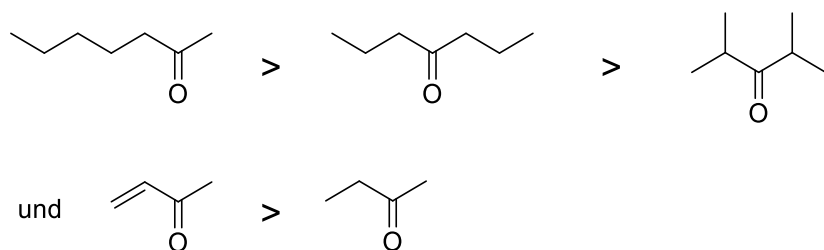


Abbildung 31: Postulierte Reaktivität von Ketonen mit 3NPH.

Allgemein lässt sich aus diesen Beobachtungen schließen, dass bei der Frage nach der Umsetzbarkeit eines Aromastoffs mit 3NPH besonders auf eine geringe sterische Hinderung der Carbonylgruppe zu achten ist.

Eine weitere Eigenschaft der Reaktion mit 3NPH ist, dass sich durch die Stickstoff-Kohlenstoff-Doppelbindungen in den Hydrazonderivaten cis- und trans-Isomere bilden können (siehe Abbildung 32), die sich chromatographisch trennen lassen. Zwar gilt dies für die 3NPH-Derivate von Aldehyden und Ketonen, jedoch nicht von Carbonsäuren wie in Abbildung 17 (Seite 30) veranschaulicht. Han et al. (2013) stellten bei der Analyse der zweifach mit 3NPH gekoppelten Brenztraubensäure und der dreifach gekoppelten Oxalessigsäure bereits fest, dass sich je zwei voneinander getrennte Peaks in der LC-MS-Analyse bildeten. Indessen zeigten andere untersuchte ein-, zwei- oder dreifach gekoppelte Verbindungen wie Glycolsäure, Bernsteinsäure oder Ketoglutarsäure lediglich einen Peak. Auch Verbindungen,

die nur mit je einem 3NPH-Molekül reagierten, zum Beispiel das in dieser Arbeit untersuchte *Z*-2-Nonenal, können chromatographisch in mehrere Peaks getrennt werden. Ein Rückschluss von der Struktur der analysierten Verbindungen auf das Vorkommen einer oder mehrerer Peaks ist demnach nicht möglich. Dazu trägt möglicherweise bei, dass in einigen Fällen die *trans*- oder *cis*-Form der jeweiligen Hydrazone durch ihre Sterik energetisch begünstigt ist und nur eine der beiden gebildet wird. Außerdem kann es vorkommen, dass zwar beide Formen gebildet, chromatographisch aber nicht getrennt werden, wie von Han et al. (2013) für die Trennung von 3NPH-derivatisiertem α -Ketoglutarat beobachtet. Dieses zeigte unter Verwendung von Methanol als Fließmittel einen und unter Verwendung von Acetonitril zwei Peaks.

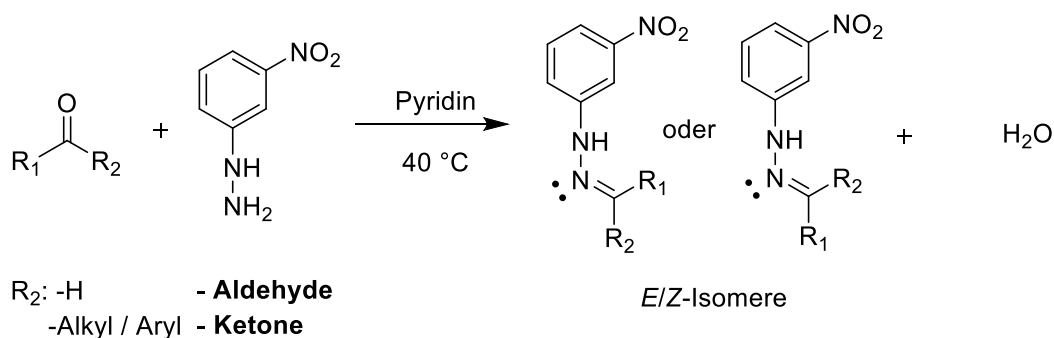


Abbildung 32: Bildung von *Z*- und *E*-Isomeren durch Reaktion mit 3NPH.

In den Experimenten in Publikation II wurden ausschließlich einfach mit 3NPH gekoppelte Analyten untersucht, von denen jedoch sechs Verbindungen Mehrfachpeaks oder Peakschultern in der Chromatographie zeigten. Davon betroffen waren die ungesättigten Aldehyde *E*-4,5-Epoxydecenal, *E*- bzw. *Z*-2-Nonenal, *E,Z*-2,6-Nonadienal, *E,E*-2,4-Decadienal und *Z*-3-Hexenal. Da für *E*- bzw. *Z*-2-Nonenal und *Z*-3-Hexenal (siehe Abbildung 33) nicht die erwarteten zwei, sondern drei Peaks detektiert wurden, musste davon ausgegangen werden, dass hierbei ein weiterer Effekt eine Rolle spielt. Eine mögliche Erklärung ist, dass die *Z*- bzw. *E*-Formen der Aldehyde unter den basischen Bedingungen (Pyridin) der Derivatisierung teilweise ineinander umgewandelt werden können. Dies bestätigt auch die Untersuchung der Referenzen von *E*- bzw. *Z*-2-Nonenal, die jeweils einen Dreifachpeak mit derselben Retentionszeit, aber unterschiedlichen Intensitäten zeigten (siehe Abbildung 33).

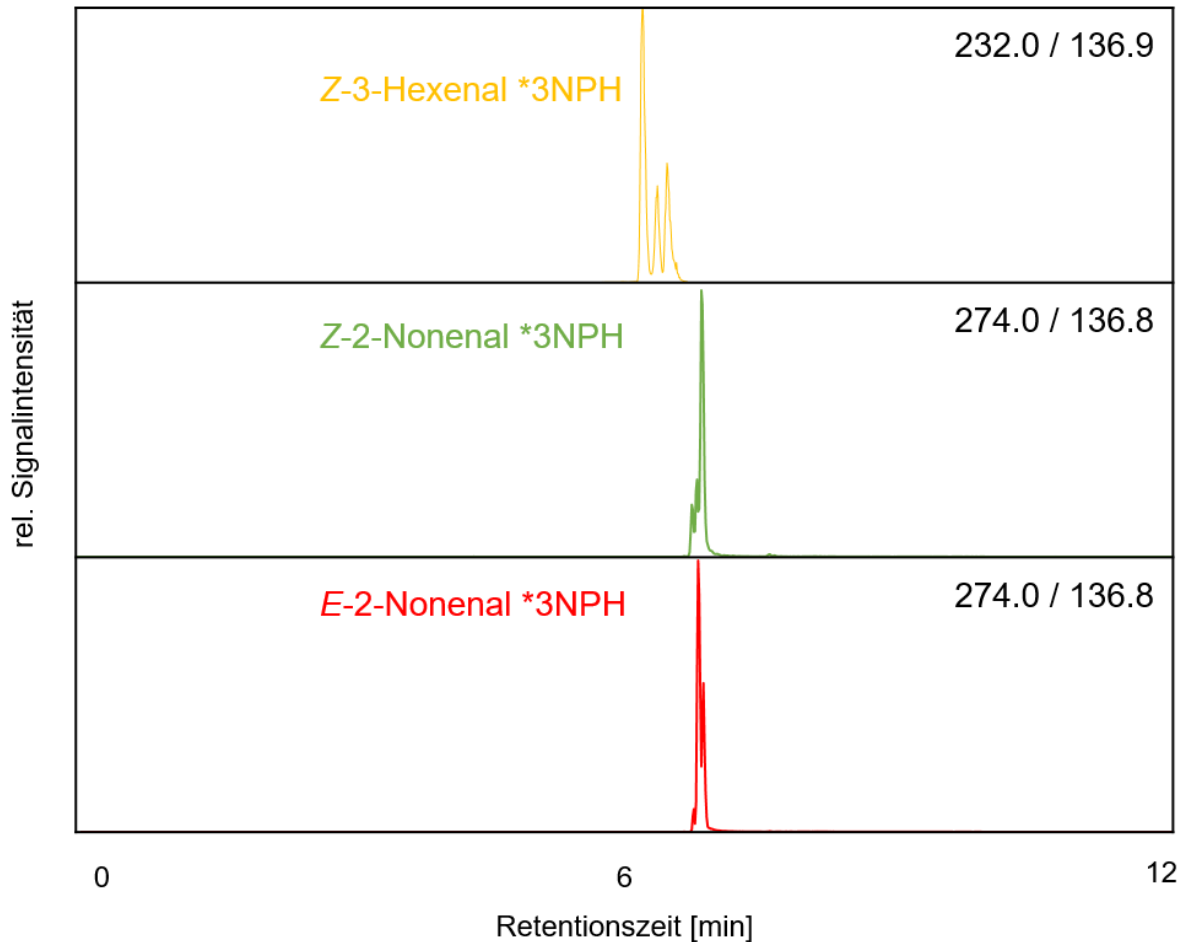


Abbildung 33: Chromatographische Trennung von 3-Nitrophenylhydrazin-derivatisiertem *Z*-3-Hexenal, *Z*-2-Nonenal und *E*-2-Nonenal.

Die Bildung der Mehrfachpeaks führte dazu, dass die Nachweisgrenzen von *E*-4,5-Epoxydecenal und *E,Z*-2,6-Nonadienal zu hoch für die Quantifizierung in ihrer natürlichen Konzentration in Lebensmitteln bestimmt wurden. Außerdem konnten *E*- und *Z*-2-Nonenal nur gemeinsam quantifiziert werden, da die stereoisomeren 3NPH-Derivate chromatographisch nicht trennbar waren.

Der hier erkannten Problematik könnte durch eine Erniedrigung des pH-Wertes entgegengewirkt werden. Dies würde jedoch voraussichtlich zu einer Verringerung der Effizienz der Derivatisierung führen. Andererseits könnte versucht werden kritische Analyten wie die hier genannten Aldehyde durch eine andere Derivatisierungsmethode zu bestimmen.

Zusammengefasst konnten mit der für die Hochdurchsatzanalyse geeigneten 3NPH-Derivatisierung – abgesehen von *E*-4,5-Epoxydecenal, *E,Z*-2,6-Nonadienal und *Z*-1,5-Octadienon – alle in dieser Arbeit dafür untersuchten Aromastoffe in ihrer in Lebensmitteln natürlich vorkommenden Konzentration quantifiziert werden.

DGTA derivatisierte Analyten:

Die Quantifizierung von Sotolon ist wegen der niedrigen Konzentration, in der der Aromastoff in Lebensmitteln vorkommt, wegen des hohen Siedepunkts (184 °C) und wegen der hohen Polarität der Verbindung besonders herausfordernd. Das erschwert besonders die Bestimmung mittels Headspace-Methoden wie SPME. Publierte GC-Methoden zur Bestimmung von Sotolon sind daher in der Regel aufwendig und beinhalten vorangehende Anreicherungsschritte wie *solid-phase extraction* (SPE) (Ferreira et al. 2003). Eine effiziente Quantifizierungsmethode mittels LC-MS, wie jene von Pereira et al. (2018) mittels flüssig/flüssig-Extraktion und anschließender Einengung sowie die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Methode mit vorhergehender Derivatisierung, sind erstrebenswert. Die erreichten LOQ von 0.04 µg/L (Pereira et al. 2018) und 44 µg/L (Publikation II) sind allerdings nur für Proben im Konzentrationsbereich deutlich über der Geruchsschwelle anwendbar.

Die ermittelte LoQ des mit DGTA derivatisierten Methanthiols fiel mit 14 ng/kg (Publikation II) als niedrig aus und ist damit deutlich niedriger als die Geruchsschwelle von 590 ng/kg (Li et al. 2017). Auch Methanthiol stellt die Analyse mittels GC vor Herausforderungen, da die hohe Flüchtigkeit und Reaktivität des Aromastoffs mit einem Siedepunkt von 6 °C langwierigen Probenvorbereitungen entgegensteht. Ein weiteres Problem für die GC-MS-Analytik ergibt sich durch das geringe Molekulargewicht des Methanthiols, denn in niedrigen *m/z*-bereichen ist das Detektorrauschen (*noise*) erhöht. Um Methanthiol für die GC-Analyse in eine stabile und weniger flüchtige Verbindung zu überführen, werden häufig Derivatisierungen vorgenommen. Beispiele dafür sind die Reaktion mit 3-Buten-2-on (Li et al. 2017) oder, mit N-Ethylmaleinimid für die Analyse mittels GC-MS-SPME (Frerot et al. 2014). Die Analyse mittels LC-MS nach vorangehender Derivatisierung mit DGTA stellt daher eine effiziente Alternative dar.

Simultane Bestimmung von 3NPH und DGTA Derivaten:

Die simultane Bestimmung von 3NPH und DGTA Derivaten mittels einer *polarity-switch*-Methode beinhaltet den Vorteil, dass durch die zwei in eins Analyse 50 % Messzeit gespart werden können. Allerdings wird beim Einsatz dieser Methode auch Sensitivität eingebüßt. Da die 3NPH Derivate bei der Analyse negativ und die DGTA Derivate positiv ionisiert gemessen werden, muss das Massenspektrometer schnell zwischen positivem und negativem Ionisierungsmodus wechseln. Für diese Umstellung wird eine *settling time* benötigt, die in der Regel 50–100 ms beträgt und zur *cycling time* (für die Analyse aller Massenübergänge benötigte Zeit) hinzuaddiert wird. Die *cycling time* ist bei dieser Methode jedoch ohnehin bereits verlängert, da mehr Analyten in der gleichen Zeit analysiert werden. Eine zu lange *cycling time* führt dazu, dass zu wenige Messpunkte pro Sekunde je Analyt gemessen werden, was zu einer ungenauen Quantifizierung führt. Um die *cycling time* zu verkürzen kann die Zeit

die pro gemessenem Massenübergang aufgewendet wird verkürzt werden, was sich allerdings negativ auf die Sensitivität der Methode auswirkt. Aus diesen Gründen wurde es für diese Studie vorgezogen, die Gruppen in zwei getrennten LC-MS/MS-Methoden zu analysieren. In Fällen in denen eine geringere Zahl an KFO analysiert werden soll, kann eine simultane Bestimmung beider Derivat-Gruppen aber sinnvoll erscheinen.

Anstatt der Verwendung einer *polarity-switch*-Methode ist es außerdem denkbar, die 3NPH-Derivate im positiven ESI-Ionisierungsmodus zu analysieren. Derartige Versuche zeigten jedoch, dass die Selektivität der Messmethode dadurch deutlich sank, da sich im positiven Ionisierungsmodus mehr störende Matrixeffekte im Chromatogramm zeigten. Je nach Matrix kann dies aber eine gute Alternative darstellen.

5 Diskussion und Zusammenfassung

5.1 Aromastoffanalytik mittels LC-MS

Im folgenden Abschnitt sollen die Vor- und Nachteile der Analyse von Aromastoffen mittels LC-MS/MS diskutiert werden.

Ein Vorteil der hier angewandten Methode der Aromastoffanalytik mittels LC-MS/MS mit SIVA und vorangehender Derivatisierung besteht darin, dass weder hohe noch geringe Flüchtigkeiten der Analyten zu Problemen führen. Wie bereits gezeigt, können flüchtige Analyten wie Methanthiol oder Acetaldehyd ohne zusätzlichen Aufwand akkurat quantifiziert werden. Die Bestimmung von Acetaldehyd und Methanthiol mittels GC ist aufgrund ihrer im Vergleich zu den verwendeten Lösungsmitteln höheren Flüchtigkeit für wenig diskriminierende Extraktionsverfahren wie SAFE schwierig. Weshalb für die Bestimmung mittels GC SPME-Verfahren, beispielsweise mit *in-fiber*-Derivatisierung, verwendet werden. Die simultane Bestimmung schwerflüchtiger Aromen bzw. nichtflüchtiger Geschmacksstoffe sowie leicht flüchtiger Verbindungen stellt für die in dieser Arbeit neu entwickelte Methodik kein Hindernis dar.

Bei der Analyse unbekannter Proben, für die in der Literatur die KFO nicht bereits ermittelt wurden, ist aufgrund der in der Regel hohen Anzahl der flüchtigen Verbindungen, von denen jedoch nur ein Bruchteil für das Aroma bestimmend ist, eine Analyse mittels GC-O das Mittel der Wahl. Letztlich ist die menschliche Nase bestens dazu geeignet zu erkennen, welche flüchtigen Verbindungen für das Gesamtaroma von Bedeutung sind und welche nicht. So konnten Utz et al. (2021) am Beispiel eines Milchprodukts zeigen, dass in bestimmten Fällen die Analyse von Aromastoffen mittels LC-MS/MS auch in der Lage ist, alle Verbindungen zu

bestimmen und zu quantifizieren, die das Gesamtaroma ausmachen. Mittels sensorischer Rekonstitutionsexperimente konnte nachgewiesen werden, dass alle KFO ermittelt wurden. Für die meisten Lebensmittel ist das Sensometabolom jedoch ohnehin bereits vollständig aufgeklärt. In Fällen, in denen nicht Lebensmittel, sondern Materialien auf beispielsweise geruchsaktive Ausdünstungen untersucht werden sollen, ist eine Analyse mittels HS-GC-MS unabdingbar.

Ein Vorteil der Bestimmung von Aromastoffen mittels LC-MS/MS, bei der Analyten nicht verdampft werden müssen, ist die deutlich geringere Hitzebelastung als bei der GC, bei der Injektorblocks meist auf über 200 °C beheizt werden. Dies stellt einen Vorteil bei hitzelabilen Analyten dar, besonders bei solchen, die aufgrund ihres hohen Siedepunkts bei der GC Analyse stark erhitzt werden müssen. Jedoch ist die Analyse geruchsaktiver ungesättigter Aldehyde mittels LC-MS/MS und 3NPH Derivatisierung problematisch, weil in den basischen Bedingungen der Reaktion vermutlich Umlagerungen stattfinden können und sich *E*- und *Z*-Isomere bilden die zu Mehrfachpeaks führen. Zur Lösung des Problems könnte ein alternatives Derivatisierungsreagenz für die Bestimmung dieser Analyten beitragen.

Als Nachteil der neu entwickelten Methode sind die höheren Nachweisgrenzen im Vergleich zu verschiedenen GC-MS-Methoden zu benennen. Diese Probleme könnten jedoch durch Neuentwicklungen künftiger LC-MS-Generationen oder durch die Verwendung effektiverer Derivatisierungsreagenzien aufgehoben werden.

Durch die Analyse von Aromastoffen mittels LC-MS/MS lassen sich flüchtige und nichtflüchtige Verbindungen auf einem Gerät und häufig in einem Lauf analysieren. So können nicht nur Geschmack und Geruchsstoffe simultan bestimmt werden, wie durch Hofstetter et al. (2019) gezeigt, sondern es können auch Pestizide oder Herbizide neben Aromastoffen analysiert werden. Beispielsweise entwickelten Hyland et al. (2016) eine APCI-LC-MS/MS-Methode für die Bestimmung von geruchsaktiven Terpenen in Cannabis, die künftig zur Analyse von Herbiziden und Pestiziden erweiterbar ist. Weiterhin denkbar ist die Analyse zur Korrelation von Aromastoffen und deren nichtflüchtigen Prekursoren in einer Methode. So könnten Arbeiten wie die von Ghaste et al. (2015) vereinfacht werden. Diese quantifizierten die Aromastoffe und deren Glykosidprekursoren in Wein mittels GC-MS und LC-MS getrennt.

Die Vielseitigkeit der Methode ließ sich zudem durch Anwendung in verschiedensten Lebensmitteln nachweisen. Es wurden gute Validierungsergebnisse erzielt, obwohl die untersuchten Proben auch stärke- und fettreiche Lebensmittel enthielten wie Kartoffeln oder Erdnüsse, aber auch Kaffee, der eine komplexe hochmolekulare Fraktion besitzt. Die 2-Acetylahetrozyklen wurden in 20 und die übrigen Analyten in 30 verschiedenen Lebensmitteln untersucht.

Die neue Methode zeichnet sich zudem durch ihre Hochdurchsatzkapazitäten aus, wonach eine einzelne Person in einer Woche schätzungsweise bis zu 50 Proben aufarbeiten, messen und auswerten kann (Publikation II). Wenn mehrere Personen gleichzeitig mit einem Projekt beschäftigt sind, kann durch die geringen LC-MS-Messzeiten (12 min pro Lauf) zusätzlich ein Vielfaches an Proben mit nur einem Gerät gemessen werden.

Zu nennen ist außerdem der breite Bereich an Analyten, der bereits mit nur zwei Derivatisierungen abgedeckt wird. Durch den Einsatz beider Derivatisierungen lassen sich flüchtige Carbonsäuren, Aldehyde, Ketone, Thiole, Alkohole, Phenole und Amine mittels LC-MS/MS bestimmen. Wenn ergänzend weitere Methoden, zum Beispiel die Anreicherung von Estern mittels SBSE (Hofstetter et al. 2019) oder die Verwendung einer APCI Ionenquelle zur Analyse von Terpenen (Peters et al. 2021) zum Einsatz kommen, erweitert sich das Einsatzgebiet der Methodik zusätzlich. Außerdem können Pyrazine durch ESI-Ionisierung ohne Derivatisierung per LC-MS bestimmt werden (Yan et al. 2020). Abgesehen von den genannten Ausnahmen wie Dimethylsulfid oder Z-1,5-Octadienon ist der Großteil der KFO durch LC-MS/MS analysierbar und ein Großteil davon wiederum mittels C18-Säule, ESI-Ionisationsquelle und nur zwei Derivatisierungsreagenzien (3NPH und DGTA). Bezogen auf GC bleibt anzumerken, dass zwar alle KFO mittels GC analysierbar sind, jedoch können dafür unterschiedliche Extraktionsverfahren, Detektorsysteme, Derivatisierungen und Trennsäulen erforderlich sein.

5.2 Zusammenfassung und Ausblick

Durch die Analyse von Aromastoffen mittels LC anstelle von GC ist es möglich, sowohl Aromastoffe als auch Geschmacksstoffe auf einer einzigen Analyseplattform mit hohem Durchsatz zu quantifizieren. Dies birgt einen Vorteil gegenüber der herkömmlichen zeitaufwendigen, getrennten Analyse von einerseits Aromastoffen mittels GC und andererseits Geschmack mittels LC. Da der Ansatz der einheitlichen Quantifizierung von Aroma- und Geschmacksstoffen bzw. die Analyse von Aromastoffen mittels LC-MS im Allgemeinen bisher nur für eine kleine Auswahl von Lebensmitteln und Analyten erforscht wurde, war es das Ziel dieser Studie, die breite Anwendbarkeit der Analyse von Aromastoffen mittels LC-MS zu belegen. Dazu wurde eine schnelle Hochdurchsatzmethode für die Quantifizierung der sogenannten Generalisten-Aromastoffe entwickelt, die in mehr als einem Viertel der Lebensmittel vorkommen (Dunkel et al. 2014). Da die von Dunkel et al. (2014) eingeführte Definition der Generalisten lediglich die Häufigkeit der in den untersuchten Lebensmittelproben vorhandenen Verbindungen berücksichtigt, nicht aber deren Geruchsaktivität in den einzelnen Lebensmitteln, wurde eine alternative Metrik zur Quantifizierung ihrer Bedeutung entwickelt. Bei Anwendung der neuen Definition, die eine Rangfolge auf der Grundlage der Geruchsaktivitätswerte (OAV) festlegt, erhöhte sich die Zahl der Generalisten von 17 auf 27. Dabei blieben die ursprünglich in der Definition enthaltenen Generalisten zum größten Teil in dieser Gruppe enthalten oder erreichten zumindest einen hohen Rang.

Für die Analyse von Aromastoffen mittels UHPLC-MS/MS mit ESI wurde eine Derivatisierung vorgeschaltet, um die Flüchtigkeit der Analyten zu senken und sie besser zu ionisieren. Für die Derivatisierung aromaaktiver Carbonyle wurde die bereits etablierte 3NPH-Derivatisierung verwendet. Da die Gruppe der Generalisten aber auch Alkohole und Thiole enthält, die sich nicht mit 3NPH derivatisieren lassen, wurde eine neue Derivatisierungsmethode entwickelt. Auf dieser Grundlage wurde die Synthese von DGTA durchgeführt. Dieses enthält eine reaktive Epoxidgruppe und weist eine ähnliche Polarität wie 3NPH und eine gute Ionisierbarkeit in der ESI auf. Nach Optimierung der Derivatisierungsparameter wurde eine effiziente Methode zur Analyse flüchtiger Alkohole, Phenole und Thiole mittels UHPLC-MS/MS entwickelt.

Mit der Kombination der neu entwickelten DGTA- sowie der etablierten 3NPH-Derivatisierung für Carbonylgruppen war es möglich zu zeigen, dass 23 der 27 Generalisten akkurat mittels UHPLC-MS/MS quantifiziert werden können. Darunter befanden sich auch Verbindungen, die generell als schwierig mittels GC zu analysieren gelten, zum Beispiel das im tautomeren Gleichgewicht vorliegende 2-ATHP oder das stark flüchtige Methanthiol. Die Quantifizierung

der untersuchten Analyten wurde erfolgreich in verschiedenen Matrices validiert und in unterschiedlichen Lebensmitteln durchgeführt.

Folgende Eigenschaften tragen besonders zur Eignung der Methode für die Hochdurchsatzanalyse bei: aufgrund der Verwendung von stabilisotopenmarkierten internen Standards weist die Methode eine hohe Genauigkeit auf, die Extraktion durch *Bead-Mill*-Homogenisierung ist schnell, vielseitig und erfordert nur geringe Probenmengen (0,5 g) und die Derivatisierung (30 min bzw. 24 h) und die UHPLC-MS/MS-Läufe (12 min) sind schnell und effizient.

Die Methode kann in Zukunft zum Einsatz kommen, um den Arbeitsaufwand in der Aromastoff- bzw. Flavouranalytik zu verringern und den Probendurchsatz zu erhöhen. Zudem können dadurch Einsparungen im Instrumentarium für die Qualitätskontrolle von Lebensmitteln erzielt werden. Zum Beispiel, wenn durch eine einzige analytische Plattform simultan Geschmacksstoffe, Aromastoffe, aber auch Pestizide oder andere Kontaminanten bestimmt werden können.

6 Literaturverzeichnis

Adams, Ann; Kimpe, Norbert de (2006): Chemistry of 2-acetyl-1-pyrroline, 6-acetyl-1,2,3,4-tetrahydropyridine, 2-acetyl-2-thiazoline, and 5-acetyl-2,3-dihydro-4H-thiazine: extraordinary Maillard flavor compounds. In: *Chemical Reviews* 106 (6), S. 2299–2319. DOI: 10.1021/cr040097y.

Arthur, Catherine L.; Pawliszyn, Janusz. (1990): Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. In: *Anal. Chem.* 62 (19), S. 2145–2148. DOI: 10.1021/ac00218a019.

Behr, M.; Cocco, E.; Lenouvel, A.; Guignard, C.; Evers, D. (2013): Earthy and Fresh Mushroom Off-Flavors in Wine: Optimized Remedial Treatments. In: *American Journal of Enology and Viticulture* 64 (4), S. 545–549. DOI: 10.5344/ajev.2013.13061.

Belitz, Hans-Dieter; Grosch, Werner; Schieberle, Peter (2008): Lehrbuch der Lebensmittelchemie. Lipide. 6. Auflage: Springer Berlin Heidelberg.

Berger, Ralf G. (1995): Aroma Compounds in Food. In: Ralf G. Berger (Hg.): Aroma Biotechnology. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, S. 1–10.

- Berglund, Birgitta; Berglund, Ulf; Lindvall, Thomas (1976): Psychological processing of odor mixtures. In: *Psychological Review* 83 (6), S. 432–441. DOI: 10.1037/0033-295X.83.6.432.
- Bhutani, Priyadeep; Murugesan, Senthilkumar; Kumar, Anoop; Subramanian, Murali; Prabhakar, Koiram Rajanna (2018): Offline derivatization LC-MS/MS method for simultaneous estimation of vanillin and vanillic acid in guinea pig plasma. In: *Bioanalysis* 10 (3), S. 131–142. DOI: 10.4155/bio-2017-0213.
- Bösl, Markus; Dunkel, Andreas; Hofmann, Thomas F. (2021): Rapid, High-Throughput Quantitation of Odor-Active 2-Acetyl Azaheterocycles in Food Products by UHPLC-MS/MS. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 69 (4), S. 1405–1412. DOI: 10.1021/acs.jafc.0c07144.
- Buettner, A.; Beer, A.; Hannig, C.; Settles, M. (2001): Observation of the swallowing process by application of videofluoroscopy and real-time magnetic resonance imaging-consequences for retronasal aroma stimulation. In: *Chemical senses* 26 (9), S. 1211–1219. DOI: 10.1093/chemse/26.9.1211.
- Buttery, R. G.; Seifert, R. M.; Guadagni, D. G.; Ling, L. C. (1971): Characterization of additional volatile components of tomato. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 19 (3), S. 524–529. DOI: 10.1021/jf60175a011.
- Buttery, Ron G.; Ling, Louisa C. (1995): Volatile flavor components of corn tortillas and related products. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43 (7), S. 1878–1882.
- Buttery, Ron G.; Teranishi, Roy; Ling, Louisa C.; Turnbaugh, Jean G. (1990): Quantitative and sensory studies on tomato paste volatiles. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38 (1), S. 336–340. DOI: 10.1021/jf00091a074.
- Clifford, Andrew J.; Daniel Jones, A.; Furr, Harold C. (1990): [9] Stable isotope dilution mass spectrometry to assess vitamin a status. In: *Retinoids Part A*, Bd. 189: Elsevier (Methods in Enzymology), S. 94–104.
- Cram, Stuart P.; Juvet, Richard S. (1976): Gas chromatography. In: *Anal. Chem.* 48 (5), S. 411–442. DOI: 10.1021/ac60369a028.
- Dal Nogare, Stephen. (1960): Gas Chromatography. In: *Anal. Chem.* 32 (5), S. 19–25. DOI: 10.1021/ac60161a602.
- Decarvalho, C.; Dafonseca M. (2006): Carvone: Why and how should one bother to produce this terpene. In: *Food Chemistry* 95 (3), S. 413–422. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.01.003.

- Demole, Edouard; Enggist, Paul; Ohloff, Gnther (1982): 1-p-Menthene-8-thiol: A powerful flavor impact constituent of grapefruit juice (*Citrus paradisi* MACFAYDEN). In: *Helv. Chim. Acta* 65 (6), S. 1785–1794. DOI: 10.1002/hlca.19820650614.
- Dijkstra, F. Y.; Wikén, T. O. (1976): Studien über Pilzaromastoffe 1. Die organoleptische Bedeutung der Bestandteile des Kulturchampignons, *Agaricus bisporus*. In: *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* 160 (3), S. 255–262. DOI: 10.1007/BF01132289.
- Dunkel, Andreas; Steinhaus, Martin; Kotthoff, Matthias; Nowak, Bettina; Krautwurst, Dietmar; Schieberle, Peter; Hofmann, Thomas (2014): Nature's chemical signatures in human olfaction: a foodborne perspective for future biotechnology. In: *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 53 (28), S. 7124–7143. DOI: 10.1002/anie.201309508.
- Dunn, B.; Wobbe, C. R. (2001): Preparation of protein extracts from yeast. In: *Current protocols in molecular biology* Chapter 13, Unit13.13. DOI: 10.1002/0471142727.mb1313s23.
- Ellis, G. P. (1959): The Maillard Reaction. In:., Bd. 14: Elsevier (*Advances in Carbohydrate Chemistry*), S. 63–134.
- Engel, Wolfgang; Bahr, Wolfgang; Schieberle, P. (1999): Solvent assisted flavour evaporation - a new and versatile technique for the careful and direct isolation of aroma compounds from complex food matrices. In: *European Food Research and Technology* 209 (3-4), S. 237–241. DOI: 10.1007/s002170050486.
- Ferreira, Vicente; Jarauta, Idoia; López, Ricardo; Cacho, Juan (2003): Quantitative determination of sotolon, maltol and free fureneol in wine by solid-phase extraction and gas chromatography–ion-trap mass spectrometry. In: *Journal of Chromatography A* 1010 (1), S. 95–103. DOI: 10.1016/S0021-9673(03)00963-4.
- Fraatz, Marco A.; Zorn, Holger (2011): Fungal Flavours. In: Martin Hofrichter (Hg.): *Industrial Applications*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, S. 249–268.
- Franitza, Laura; Granvogl, Michael; Schieberle, Peter (2016): Characterization of the Key Aroma Compounds in Two Commercial Rums by Means of the Sensomics Approach. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64 (3), S. 637–645. DOI: 10.1021/acs.jafc.5b05426.
- Frankel, E. N. (1983): Volatile lipid oxidation products. In: *Progress in Lipid Research* 22 (1), S. 1–33. DOI: 10.1016/0163-7827(83)90002-4.
- Frankel, E. N. (1984): Lipid oxidation: Mechanisms, products and biological significance. In: *J Am Oil Chem Soc* 61 (12), S. 1908–1917. DOI: 10.1007/bf02540830.

Frankel, E. N.; Neff, W. E.; Weisleder, D. (1990): [39] Determination of methyl linoleate hydroperoxides by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. In: *Oxygen Radicals in Biological Systems Part B: Oxygen Radicals and Antioxidants*, Bd. 186: Elsevier (Methods in Enzymology), S. 380–387.

Frankel, Edwin N. (1991): Review. Recent advances in lipid oxidation. In: *J. Sci. Food Agric.* 54 (4), S. 495–511. DOI: 10.1002/jsfa.2740540402.

Frerot, Eric; Bagnoud, Alain; Cicchetti, Esmeralda (2014): Quantification of Hydrogen Sulfide and Methanethiol and the Study of Their Scavenging by Biocides of the Isothiazolone Family. In: *ChemPlusChem* 79 (1), S. 77–82. DOI: 10.1002/cplu.201300234.

Gardner, Harold W. (1991): Recent investigations into the lipoxygenase pathway of plants. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 1084 (3), S. 221–239. DOI: 10.1016/0005-2760(91)90063-N.

Gassenmeier, Klaus; Schieberle, Peter (1994): Comparison of Important Odorants in Puff-pastries Prepared with Butter or Margarine. In: *LWT* 27 (3), S. 282–288. DOI: 10.1006/fstl.1994.1056.

Ghaste, Manoj; Narduzzi, Luca; Carlin, Silvia; Vrhovsek, Urska; Shulaev, Vladimir; Mattivi, Fulvio (2015): Chemical composition of volatile aroma metabolites and their glycosylated precursors that can uniquely differentiate individual grape cultivars. In: *Food Chemistry* 188, S. 309–319. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.04.056.

Gottfried, Jay A. (2010): Central mechanisms of odour object perception. In: *Nature Reviews Neuroscience* 11 (9), S. 628–641.

Grosch, W. (1972): Das Enzym Lipoxygenase Eigenschaften und Wirkung in Lebensmitteln. In: *Fette, Seifen, Anstrichm.* 74 (6), S. 375–381. DOI: 10.1002/lipi.19720740614.

Grosch, W. (2001): Evaluation of the key odorants of foods by dilution experiments, aroma models and omission. In: *Chemical senses* 26 (5), S. 533–545. DOI: 10.1093/chemse/26.5.533.

Grosch, Werner (1993): Detection of potent odorants in foods by aroma extract dilution analysis. In: *Trends in Food Science & Technology* 4 (3), S. 68–73. DOI: 10.1016/0924-2244(93)90187-F.

Grossman, Kimberly J.; Mallik, Atul K.; Ross, Jessica; Kay, Leslie M.; Issa, Naoum P. (2008): Glomerular activation patterns and the perception of odor mixtures. In: *The European journal of neuroscience* 27 (10), S. 2676–2685. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2008.06213.x.

Guadagni, D. G.; Buttery, R. G.; Turnbaugh, Jean G. (1972): Odour thresholds and similarity ratings of some potato chip components. In: *J. Sci. Food Agric.* 23 (12), S. 1435–1444. DOI: 10.1002/jsfa.2740231207.

Guth, H. (1997): Quantitation and Sensory Studies of Character Impact Odorants of Different White Wine Varieties. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45 (8), S. 3027–3032. DOI: 10.1021/jf970280a.

Halket, John M.; Waterman, Daniel; Przyborowska, Anna M.; Patel, Raj K. P.; Fraser, Paul D.; Bramley, Peter M. (2005): Chemical derivatization and mass spectral libraries in metabolic profiling by GC/MS and LC/MS/MS. In: *Journal of experimental botany* 56 (410), S. 219–243. DOI: 10.1093/jxb/eri069.

Hall, Gunnar; Alenljung, Susanne; Forsgren-Brusk, Ulla (2017): Identification of Key Odorants in Used Disposable Absorbent Incontinence Products. In: *Journal of wound, ostomy, and continence nursing : official publication of The Wound, Ostomy and Continence Nurses Society* 44 (3), S. 269–276. DOI: 10.1097/WON.0000000000000325.

Han, Jun; Gagnon, Susannah; Eckle, Tobias; Borchers, Christoph H. (2013): Metabolomic analysis of key central carbon metabolism carboxylic acids as their 3-nitrophenylhydrazones by UPLC/ESI-MS. In: *Electrophoresis* 34 (19), S. 2891–2900. DOI: 10.1002/elps.201200601.

Han, Jun; Lin, Karen; Sequeira, Carita; Borchers, Christoph H. (2015): An isotope-labeled chemical derivatization method for the quantitation of short-chain fatty acids in human feces by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. In: *Analytica chimica acta* 854, S. 86–94. DOI: 10.1016/j.aca.2014.11.015.

Haseleu, Gesa; Intelmann, Daniel; Hofmann, Thomas (2009): Identification and RP-HPLC-ESI-MS/MS quantitation of bitter-tasting beta-acid transformation products in beer. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (16), S. 7480–7489. DOI: 10.1021/jf901759y.

Hayasaka, Y. (2019): Quantitative analysis of mousy off-flavour compound 2-acetyl tetrahydropyridine in wine using liquid chromatography tandem mass spectrometry interfaced with atmospheric chemical ionisation. In: *Journal of chromatography. A* 1588, S. 108–114. DOI: 10.1016/j.chroma.2018.12.047.

Hazelwood, Lucie A.; Daran, Jean-Marc; van Maris, Antonius J. A.; Pronk, Jack T.; Dickinson, J. Richard (2008): The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. In: *Applied and environmental microbiology* 74 (8), S. 2259–2266. DOI: 10.1128/AEM.02625-07.

Hillmann, Hedda; Behr, Jürgen; Ehrmann, Matthias A.; Vogel, Rudi F.; Hofmann, Thomas (2016): Formation of Kokumi-Enhancing γ -Glutamyl Dipeptides in Parmesan Cheese by

Means of γ -Glutamyltransferase Activity and Stable Isotope Double-Labeling Studies. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64 (8), S. 1784–1793. DOI: 10.1021/acs.jafc.6b00113.

Hodge, J. E. (1953): Dehydrated Foods, Chemistry of Browning Reactions in Model Systems. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1 (15), S. 928–943. DOI: 10.1021/jf60015a004.

Hofmann, T. (1999): Quantitative studies on the role of browning precursors in the Maillard reaction of pentoses and hexoses with L-alanine. In: *European Food Research and Technology* 209 (2), S. 113–121. DOI: 10.1007/s002170050468.

Hofmann, Thomas; Schieberle, Peter (1998): 2-Oxopropanal, Hydroxy-2-propanone, and 1-Pyrroline Important Intermediates in the Generation of the Roast-Smelling Food Flavor Compounds 2-Acetyl-1-pyrroline and 2-Acetyltetrahydropyridine. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46 (6), S. 2270–2277. DOI: 10.1021/jf970990g.

Hofstetter, Christoph Konrad; Dunkel, Andreas; Hofmann, Thomas (2019): Unified Flavor Quantitation: Toward High-Throughput Analysis of Key Food Odorants and Tastants by Means of Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 67 (31), S. 8599–8608. DOI: 10.1021/acs.jafc.9b03466.

Howard, James D.; Plailly, Jane; Grueschow, Marcus; Haynes, John-Dylan; Gottfried, Jay A. (2009): Odor quality coding and categorization in human posterior piriform cortex. In: *Nature neuroscience* 12 (7), S. 932–938. DOI: 10.1038/nn.2324.

Hyland, K. C.; Borton, Christopher; Winkler, Paul; Roberts, Simon; Noestheden, Matthew (2016): Quantitation of Terpenes in Cannabis Products Using the Triple Quad™ 3500 LC-MS/MS System.

Jones, D. T.; Reed, R. R. (1989): Golf: an olfactory neuron specific-G protein involved in odorant signal transduction. In: *Science (New York, N.Y.)* 244 (4906), S. 790–795. DOI: 10.1126/science.2499043.

Jost, Tobias; Heymann, Thomas; Glomb, Marcus A. (2019): Efficient Analysis of 2-Acetyl-1-pyrroline in Foods Using a Novel Derivatization Strategy and LC-MS/MS. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 67 (10), S. 3046–3054. DOI: 10.1021/acs.jafc.9b00220.

Juvel, Richard S.; Cram, Stuart P. (1974): Gas chromatography. In: *Anal. Chem.* 46 (5), S. 101–124. DOI: 10.1021/ac60341a014.

Kauz, Thomas; Dunkel, Andreas; Hofmann, Thomas (2021): High-Throughput Quantitation of Key Cocoa Tastants by Means of Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Tandem

Mass Spectrometry and Application to a Global Sample Set. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 69 (29), S. 8200–8212. DOI: 10.1021/acs.jafc.1c01987.

Kleene, S. J.; Gesteland, R. C. (1991): Calcium-activated chloride conductance in frog olfactory cilia. In: *J. Neurosci.* 11 (11), S. 3624–3629. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.11-11-03624.1991.

Kleene, Steven J.; Gesteland, Robert C. (1981): Dissociation of frog olfactory epithelium with N-ethylmaleimide. In: *Brain Research* 229 (2), S. 536–540. DOI: 10.1016/0006-8993(81)91018-0.

Kobayashi, Shu; Hachiya, Iwao (1994): Lanthanide Triflates as Water-Tolerant Lewis Acids. Activation of Commercial Formaldehyde Solution and Use in the Aldol Reaction of Silyl Enol Ethers with Aldehydes in Aqueous Media. In: *J. Org. Chem.* 59 (13), S. 3590–3596. DOI: 10.1021/jo00092a017.

Konermann, Lars; Ahadi, Elias; Rodriguez, Antony D.; Vahidi, Siavash (2013): Unraveling the mechanism of electrospray ionization. In: *Anal. Chem.* 85 (1), S. 2–9. DOI: 10.1021/ac302789c.

Kosowska, Monika; Majcher, Małgorzata A.; Jeleń, Henryk H.; Fortuna, Teresa (2018): Key Aroma Compounds in Smoked Cooked Loin. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66 (14), S. 3683–3690. DOI: 10.1021/acs.jafc.7b05996.

Laing, D. G. (1994): Perceptual odour interactions and objective mixture analysis. In: *Food Quality and Preference* 5 (1-2), S. 75–80. DOI: 10.1016/0950-3293(94)90010-8.

Langos, Daniel; Granvogl, Michael; Schieberle, Peter (2013): Characterization of the key aroma compounds in two bavarian wheat beers by means of the sensomics approach. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61 (47), S. 11303–11311. DOI: 10.1021/jf403912j.

Le Berre, E.; Béno, N.; Ishii, A.; Chabanet, C.; Etiévant, P.; Thomas-Danguin, T. (2008): Just noticeable differences in component concentrations modify the odor quality of a blending mixture. In: *Chemical senses* 33 (4), S. 389–395. DOI: 10.1093/chemse/bjn006.

Leffingwell, John C.; Leffingwell, Diane (1991): GRAS flavor chemicals-detection thresholds. In: *Perfumer Flavorist* 16 (1), S. 1–19.

Li, Jia-Xiao; Schieberle, Peter; Steinhaus, Martin (2017): Development of stable isotope dilution assays for the quantitation of the food odorants hydrogen sulphide, methanethiol, ethanethiol, and propane-1-thiol and application to durian (*Durio zibethinus* L.) pulp. In: *European Food Research and Technology* 243 (1), S. 69–79. DOI: 10.1007/s00217-016-2723-z.

- Li, Li; Tian, Dandan; Chen, Feng; Yang, Junling; Yu, Ke; Sun, Yan (2012): Strategies for improving the quantitative bioanalytical performance of LC-MS in pharmacokinetic studies. In: *Current drug metabolism* 13 (9), S. 1206–1212. DOI: 10.2174/138920012803341320.
- Lin, D.-L.; Wang, S.-M.; Wu, C.-H.; Chen, B.-G.; Liu, R. H. (2008): Chemical derivatization for the analysis of drugs by GC-MS - A conceptual review. In: *Journal of Food and Drug Analysis* 16 (1). DOI: 10.38212/2224-6614.2373.
- Malnic, Bettina; Hirono, Junzo; Sato, Takaaki; Buck, Linda B. (1999): Combinatorial Receptor Codes for Odors. In: *Cell* 96 (5), S. 713–723. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80581-4.
- Martins, Sara I.F.S; Jongen, Wim M.F; van Boekel, Martinus A.J.S (2000): A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling. In: *Trends in Food Science & Technology* 11 (9-10), S. 364–373. DOI: 10.1016/S0924-2244(01)00022-X.
- Matoba, Teruyoshi; Hidaka, Hiroshi; Kitamura, Keisuke; Kaizuma, Norihiko; Kito, Makoto (1985): Contribution of hydroperoxide lyase activity to n-hexanal formation in soybean. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 33 (5), S. 856–858.
- McWilliam, I. G.; Dewar, R. A. (1958): Flame Ionization Detector for Gas Chromatography. In: *Nature* 181 (4611), S. 760. DOI: 10.1038/181760a0.
- Milo, C.; Grosch, W. (1997): Potent Odorants in Boiled Cod as Affected by the Storage of Raw Material. In: Fereidoon Shahidi und Keith R. Cadwallader (Hg.): *Flavor and Lipid Chemistry of Seafoods*, Bd. 674. Washington, DC: American Chemical Society (ACS Symposium Series), S. 110–119.
- Mittermeier, Verena Karolin; Dunkel, Andreas; Hofmann, Thomas (2018): Discovery of taste modulating octadecadien-12-ynoic acids in golden chanterelles (*Cantharellus cibarius*). In: *Food Chemistry* 269, S. 53–62. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.06.123.
- Mombaerts, Peter (2004): Genes and ligands for odorant, vomeronasal and taste receptors. In: *Nature reviews. Neuroscience* 5 (4), S. 263–278. DOI: 10.1038/nrn1365.
- Moore, John E. A.; Forrester, L. Janet; Pelosi, Paolo (1976): Specific anosmia to isobutyraldehyde: The malty primary odor. In: *Chemical senses* 2 (1), S. 17–25. DOI: 10.1093/chemse/2.1.17.
- Munger, Steven D.; Leinders-Zufall, Trese; Zufall, Frank (2009): Subsystem organization of the mammalian sense of smell. In: *Annual review of physiology* 71, S. 115–140. DOI: 10.1146/annurev.physiol.70.113006.100608.
- Nakamura, T.; Gold, G. H. (1987): A cyclic nucleotide-gated conductance in olfactory receptor cilia. In: *Nature* 325 (6103), S. 442–444. DOI: 10.1038/325442a0.

- Oka, Yuki; Omura, Masayo; Kataoka, Hiroshi; Touhara, Kazushige (2004): Olfactory receptor antagonism between odorants. In: *The EMBO journal* 23 (1), S. 120–126. DOI: 10.1038/sj.emboj.7600032.
- Pereira, Vanda; Leça, João M.; Gaspar, João M.; Pereira, Ana C.; Marques, José C. (2018): Rapid Determination of Sotolon in Fortified Wines Using a Miniaturized Liquid-Liquid Extraction Followed by LC-MS/MS Analysis. In: *Journal of analytical methods in chemistry* 2018, S. 4393040. DOI: 10.1155/2018/4393040.
- Peters, Verena Christina Tabea; Dunkel, Andreas; Frank, Oliver; McCormack, Brian; Dowd, Eric; Didzbalis, John et al. (2021): A high throughput toolbox for comprehensive flavor compound mapping in mint. In: *Food Chemistry* 365, S. 130522. DOI: 10.1016/j.foodchem.2021.130522.
- Pfeuffer, E.; Mollner, S.; Lancet, D.; Pfeuffer, T. (1989): Olfactory adenylyl cyclase. In: *Journal of Biological Chemistry* 264 (31), S. 18803–18807. DOI: 10.1016/S0021-9258(18)51538-6.
- Pittet, Alan O.; Rittersbacher, Philip; Muralidhara, Ranya (1970): Flavor properties of compounds related to maltol and isomaltol. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 18 (5), S. 929–933.
- Porter, N. A.; Caldwell, S. E.; Mills, K. A. (1995): Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids. In: *Lipids* 30 (4), S. 277–290. DOI: 10.1007/BF02536034.
- Quirke, J. Martin E.; Adams, Christopher L.; van Berkel, Gary J. (1994): Chemical Derivatization for Electrospray Ionization Mass Spectrometry. 1. Alkyl Halides, Alcohols, Phenols, Thiols, and Amines. In: *Anal. Chem.* 66 (8), S. 1302–1315. DOI: 10.1021/ac00080a016.
- Rothe, M.; Wölm, G.; Tunger, L.; Siebert, H. J. (1972): Schwellenkonzentrationen von Aromastoffen und ihre Nutzung zur Auswertung von Aromaanalysen. In: *Die Nahrung* 16 (5), S. 483–495. DOI: 10.1002/food.19720160509.
- Schaich, K. M. (1992): Metals and lipid oxidation. Contemporary issues. In: *Lipids* 27 (3), S. 209–218. DOI: 10.1007/BF02536181.
- Schieberle, Peter (1995): Quantitation of important roast-smelling odorants in popcorn by stable isotope dilution assays and model studies on flavor formation during popping. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43 (9), S. 2442–2448.
- Schieberle, Peter; Hofmann, Thomas (2011): Mapping the combinatorial code of food flavors by means of molecular sensory science approach.

- Schild, D.; Restrepo, D. (1998): Transduction mechanisms in vertebrate olfactory receptor cells. In: *Physiological reviews* 78 (2), S. 429–466. DOI: 10.1152/physrev.1998.78.2.429.
- Schönberg, Alexander; Moubacher, Radwan (1952): The Strecker degradation of α -amino acids. In: *Chemical Reviews* 50 (2), S. 261–277.
- Seto, Yasuo (1994): Determination of volatile substances in biological samples by headspace gas chromatography. In: *Journal of Chromatography A* 674 (1-2), S. 25–62. DOI: 10.1016/0021-9673(94)85216-2.
- Silwood, C. J.; Grootveld, M. (1999): Application of high-resolution, two-dimensional ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance techniques to the characterization of lipid oxidation products in autoxidized linoleoyl/linolenoylglycerols. In: *Lipids* 34 (7), S. 741–756. DOI: 10.1007/s11745-999-0421-5.
- Song, Huanlu; Liu, Jianbin (2018): GC-O-MS technique and its applications in food flavor analysis. In: *Food research international (Ottawa, Ont.)* 114, S. 187–198. DOI: 10.1016/j.foodres.2018.07.037.
- Steinhaus, M. (2019): Chapter 9. Gas Chromatography–Olfactometry: Principles, Practical Aspects and Applications in Food Analysis. In: Peter Q. Tranchida (Hg.): *Advanced Gas Chromatography in Food Analysis*. Cambridge: Royal Society of Chemistry (Food Chemistry, Function and Analysis), S. 337–399.
- Steinhaus, Martin; Sinuco, Diana; Polster, Johannes; Osorio, Coralia; Schieberle, Peter (2009): Characterization of the key aroma compounds in pink guava (*Psidium guajava* L.) by means of aroma re-engineering experiments and omission tests. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (7), S. 2882–2888. DOI: 10.1021/jf803728n.
- Stryer, L.; Bourne, H. R. (1986): G proteins: a family of signal transducers. In: *Annual review of cell biology* 2, S. 391–419. DOI: 10.1146/annurev.cb.02.110186.002135.
- Tressl, Roland; Bahri, Daoud; Engel, Karl-Heinz (1997): Lipid Oxidation in Fruits and Vegetables. In: Fereidoon Shahidi und Keith R. Cadwallader (Hg.): *Flavor and Lipid Chemistry of Seafoods*, Bd. 170. Washington, DC: American Chemical Society (ACS Symposium Series), S. 213–232.
- Utz, Florian; Kreissl, Johanna; Stark, Timo D.; Schmid, Christian; Tanger, Caren; Kulozik, Ulrich et al. (2021): Sensomics-Assisted Flavor Decoding of Dairy Model Systems and Flavor Reconstitution Experiments. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 69 (23), S. 6588–6600. DOI: 10.1021/acs.jafc.1c02165.

- Verma, Deepak Kumar; Srivastav, Prem Prakash (2020): Extraction, Identification and Quantification Methods of Rice Aroma Compounds with Emphasis on 2-Acetyl-1-Pyrroline (2-AP) and Its Relationship with Rice Quality: A Comprehensive Review. In: *Food Reviews International*, S. 1–52. DOI: 10.1080/87559129.2020.1720231.
- Wagner, R.; Czerny, M.; Bielohradsky, J.; Grosch, W. (1999): Structure-odour-activity relationships of alkylpyrazines. In: *Zeitschrift fr Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A* 208 (5-6), S. 308–316. DOI: 10.1007/s002170050422.
- Wakte, Kantilal; Zanan, Rahul; Hinge, Vidya; Khandagale, Kiran; Nadaf, Altafhusain; Henry, Robert (2017): Thirty-three years of 2-acetyl-1-pyrroline, a principal basmati aroma compound in scented rice (*Oryza sativa* L.): a status review. In: *Journal of the science of food and agriculture* 97 (2), S. 384–395. DOI: 10.1002/jsfa.7875.
- Wang, Yuwen; McCaffrey, John; Norwood, Daniel L. (2008): Recent Advances in Headspace Gas Chromatography. In: *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 31 (11-12), S. 1823–1851. DOI: 10.1080/10826070802129092.
- Widder, Sabine; Grosch, Werner (1994): Study on the cardboard off-flavour formed in butter oil. In: *European Food Research and Technology* 198 (4), S. 297–301. DOI: 10.1007/BF01193178.
- Wilm, Matthias (2011): Principles of electrospray ionization. In: *Molecular & cellular proteomics : MCP* 10 (7), M111.009407. DOI: 10.1074/mcp.M111.009407.
- Wu, Naijun; Thompson, Richard (2006): Fast and Efficient Separations Using Reversed Phase Liquid Chromatography. In: *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 29 (7-8), S. 949–988. DOI: 10.1080/10826070600574903.
- Yan, Yan; Chen, Shuang; He, Yingxia; Nie, Yao; Xu, Yan (2020): Quantitation of pyrazines in Baijiu and during production process by a rapid and sensitive direct injection UPLC-MS/MS approach. In: *LWT* 128, S. 109371. DOI: 10.1016/j.lwt.2020.109371.
- Yang, Xiaogen; Peppard, Terry (1994): Solid-Phase Microextraction for Flavor Analysis. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42 (9), S. 1925–1930. DOI: 10.1021/jf00045a018.
- Zhang, Zhouyao; Yang, Min J.; Pawliszyn, Janusz (1994): Solid-Phase Microextraction. A Solvent-Free Alternative for Sample Preparation. In: *Anal. Chem.* 66 (17), 844A-853A. DOI: 10.1021/ac00089a001.

7 Publikationen

Rapid, High-Throughput Quantitation of Odor-Active 2-Acetyl Azaheterocycles in Food Products by UHPLC–MS/MS

Markus Bösl, Andreas Dunkel, and Thomas F. Hofmann*



Cite This: *J. Agric. Food Chem.* 2021, 69, 1405–1412



Read Online

ACCESS |



Metrics & More



Article Recommendations



Supporting Information

ABSTRACT: A rapid, high-throughput method for the quantitation of the 2-acetyl azaheterocycles, 2-acetyl-1-pyrroline, 2-acetyl-1,4,5,6-tetrahydropyridine, 2-acetylpyrazine, and 2-acetyl-2-thiazoline, in different food products, by liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS), was developed. The quick extraction by bead beater homogenization, fast derivatization by 3-nitrophenylhydrazine (40 °C, 2 h), and efficient LC separation make this method suitable for high-throughput analysis. As established in this study, the highly precise LC–MS/MS method applies to different food products or beverages without requiring further adjustment. The analysis was performed with sample amounts of 0.2–0.5 g, and limit of quantitation values of 0.6, 0.5, 0.6, and 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ were obtained for 2-acetyl-1-pyrroline, 2-acetyl-1,4,5,6-tetrahydropyridine, 2-acetylpyrazine, and 2-acetyl-2-thiazoline, respectively. Thus, it was possible to quantitate the analytes in the range of their odor thresholds.

KEYWORDS: *aroma, 3-NPH, LC–MS, 2-acetyl-1-pyrroline, 2-acetyl-1,4,5,6-tetrahydropyridine, 2-acetyl-2-thiazoline, 2-acetylpyrazine, azaheterocycles*

INTRODUCTION

The 2-acetyl azaheterocycles, 2-acetyl-1-pyrroline (**1**), 2-acetyl-1,4,5,6-tetrahydropyridine (**2**) (which occurs in a tautomeric equilibrium; Figure 1), 2-acetylpyrazine (**3**), and 2-acetyl-2-thiazoline (**4**), are potent Maillard reaction products with low odor thresholds, ranging from 0.1 to 62 ng/kg (Table 1). Products **1** and **2** are detected in various thermally treated cereal products, including wheat bread crust; however, they can also be found in popcorn or roasted sesame and are described as having a desirably roasted odor.¹ Besides thermal formation via the Maillard reaction, **1** and **2** can also be formed at room temperature from precursors built enzymatically by plants or microorganisms, which accounts for their presence in rice,² *Bassia latifolia*,³ or as an off-flavor in wine, prospectively.^{4–6} Despite their low odor thresholds and low abundance, these compounds determine the quality of some foods, such as rice⁷ or popcorn.⁸ Therefore, **1**, being the most important aroma contributor of fragrant rice, is a subject of extensive research. The biosynthetic production pathways of **1** in rice, the influential genes, and the possibility of pre- and postharvest effects are under observation.⁷ A recent review by Wakte et al.⁷ listed 49 food products containing **1**, and other researchers recently detected **1** in new food products, including the Nam-Hom coconut⁹ and Celtuce.¹⁰ Compound **3** is known as a flavor compound in coffee¹¹ and popcorn.⁸ The sulfur-containing analog of **1**, compound **4** is found in various heated meat products, such as beef broth,¹² as well as in roasted sesame.¹³ Compounds **3** and **4** are also described as having a roasted, popcorn-like odor. The quantitation of these compounds is an analytical challenge because of their low abundance; moreover, the quantitation of **2** is particularly difficult because it occurs naturally in tautomeric equilibrium (Figure 1). Nevertheless, there are different published methods

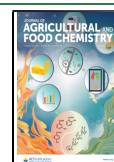
for analyzing these compounds. For the quantitation of **1** in rice and bread crust, there are several established gas chromatography (GC) methods, including extensive methods (using >1 kg of cooked rice for a Tenax trap isolation method¹⁴) and more recent ones (using just one rice kernel for headspace solid-phase microextraction with gas chromatography–tandem mass spectrometry (HS-SPME–GC–MS/MS)).¹⁵ Most of the latest quantitation methods for **1**, **2**, **3**, and **4** are either HS-SPME–GC–MS/MS or solvent-assisted flavor evaporation (SAFE) combined with GC–MS methods.^{16–19} Although the analysis of odorants by GC–MS is highly accurate and sensitive, the volatile and nonvolatile compounds must be separated before the GC analysis. Therefore, usually, a time-consuming extraction process is required, e.g., solvent extraction or SAFE distillation. For compounds **1** and **2**, several recently published LC–MS quantitation methods are available. Compound **1** was quantified in rice, bread, and popcorn using a novel derivatization method involving *o*-phenylenediamine (1 g of the sample, Carrez clarification, 24 h derivatization at room temperature), resulting in a limit of quantitation (LoQ) of 0.79 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and a recovery of 92%.²⁰ Additionally, an LC–MS–atmospheric pressure chemical ionization method was established for the quantitation of **2** in wine without derivatization and requiring only filtration and basification (LoQ: 0.23 $\mu\text{g}/\text{L}$, recovery: 91.5–104.0%).²¹ Generally, for

Received: November 11, 2020

Revised: January 8, 2021

Accepted: January 12, 2021

Published: January 20, 2021



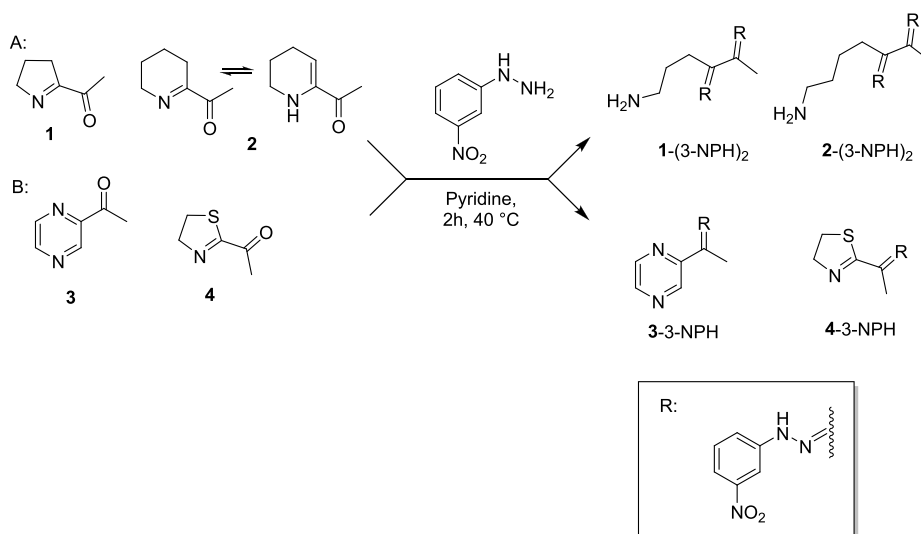


Figure 1. Derivatization reaction of 2-acetylazaheterocycles with 3-nitrophenylhydrazine under basic conditions: (A) 2-acetyl-1-pyrroline (1) and 2-acetyl-1,4,5,6-tetrahydropyridine (2) reacting twice; (B) 2-acetylpyrazine (3) and 2-acetyl-2-thiazoline (4) reacting once with the derivatization agent.

Table 1. Limits of Detection (LoD), Limits of Quantitation (LoQ) in Acetonitrile/Water (50:50; v/v), and Odor Thresholds of the Analytes in Water^{46–48}

analyte (no.)	2-ACPY (1)	2-ATHP (2)	2-AP (3)	2-AT (4)
LoD [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0.3	0.2	0.3	0.2
LoQ [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	0.6	0.5	0.6	1.0
odor thresholds [$\mu\text{g}/\text{L}$]	0.1	1.0	62	1

the LC–MS analysis of rather-small and hard-to-ionize aroma compounds, derivatization is required prior to the measurement to guarantee efficient LC separation on the widely used reversed phases (RP) and good ionization. Different derivatization agents for this purpose are conceivable, e.g., the above-mentioned *o*-phenyldiamin²⁰ or 3-nitrophenylhydrazine (3-NPH) (Figure 1), which has already been proven to successfully derivatize short-chain fatty acids,²² sugars,²³ and aldehydes, as well as ketones,²⁴ for LC–MS analysis. Furthermore, this derivatization method is capable of derivatizing nonvolatile and volatile odor-/taste-active compounds, as demonstrated by Hofstetter et al., who quantitated aroma-active carbonyls next to sugars, organic acids, and polyphenols in apple juice, exploiting 3-NPH derivatization. Therefore, the goal of this study was to investigate the possibilities of the 3-NPH derivatization for the challenging quantitation of 2-acetyl azaheterocycles, containing a carbonyl group. Due to the high applicability of 3-NPH on all sorts of carbonyls, this method promises to be expandable for the analysis of a broad range of volatile and nonvolatile analytes in one LC–MS run.²⁵ In contrast to the earlier published LC–MS and GC–MS-based quantitation methods for 2-acetyl azaheterocycles, this method can be used for fast quality-control analysis of goods upon receipt because of its high versatility, expandability, rapid process, and high-throughput efficiency. The present study, therefore, examines the use of ultrahigh performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry (UHPLC–MS/MS) for stable isotope dilution analysis (SIDA) quantitation of 2-acetyl azaheterocycles in different food samples. A derivatization method suitable for the high-throughput analysis will be employed to achieve an

effective LC separation and high sensitivity using electrospray ionization (ESI).

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and Samples. The following compounds were obtained commercially: 3-nitrophenylhydrazine hydrochloride, 2-acetyl-2-thiazoline, 2-acetyl pyrazine, water-soluble starch, L-cysteine, L-ornithine, L-citrulline, L-proline, glyoxal, methyl-glyoxal, 1-hydroxy-2-propanone (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), formic acid, pyridine (Merck, Darmstadt, Germany), *n*-pentane (VWR ProLabo Chemicals, AnalaR Normapur, France), 3-methyladenine (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, USA), and 2-acetyl-1-pyrroline (Alfa-Chemistry, New York, USA). The solvents used for the LC–MS/MS analysis were of LC–MS grade (Honeywell, Seelze, Germany). MeOD- d_3 , used for the quantitative nuclear magnetic resonance (qNMR) spectroscopy, was purchased from Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany. Water for chromatography was purified using a Milli-Q Water Advantage A 10 system (Millipore, Molsheim, France). All the food samples were purchased from local retailers (Freising, Germany). The three varieties of milled rice were cooked in tap water with a water-to-rice ratio of 2:1 (v/v) for 10 min. The rye bread sample contained 22% rye flour, while the spelt and mixed bread samples contained 30% spelt and 40% rye flour, respectively. Popcorn (100 g) was freshly prepared in a pot with 10 g of canola oil, and 100 g of sesame (whole seeds) was medium roasted in a pan with 10 g of canola oil as well. Peanuts were purchased roasted in shells, and the rice waffles contained 99% brown rice and 1% sesame. The whole-grain toast contained 48% whole-grain wheat. For the preparation of the roasted beef sauce, 300 g of the beef was roasted at 180 °C for 120 min in a casserole in an oven. At 30 min intervals, 50 mL of water was added.

The compounds 2-acetyl-1,4,5,6-tetrahydropyridine,²⁶ 2-acetyl-1-pyrroline- d_3 ,²⁷ 2-acetyl-2-thiazoline- d_4 ,²⁸ 2-acetylpyrazine- d_3 ,²⁷ and 2-acetyl-1,4,5,6-tetrahydropyridine- d_3 ²⁹ were synthesized.

Sample Preparation. Internal Standard Calibration. A stock solution of the compounds 2-acetylpyrroline (59.0 mg/L), 2-acetyl-1,4,5,6-tetrahydropyridine (48.6 mg/L), 2-acetylpyrazine (56.8 mg/L), and 2-acetyl-2-thiazoline (19.4 mg/L) was prepared in acetonitrile/water (50/50, v/v) with the exact concentration of each reference compound verified by qNMR.³⁰ The stock solution was diluted (1:10, 1:20, 1:50, 1:100, ..., 1:100000; 13 calibration points) with acetonitrile/water (50/50, v/v). To the diluted solutions, the corresponding internal standards were added to obtain end concentrations of 102, 200, 82, and 122 $\mu\text{g}/\text{L}$ for 2-acetylpyrroline- d_3

(1-d₃), 2-acetyl-1,4,5,6-tetrahydropyridine-d₃ (2-d₃), 2-acetylpyrazine-d₃ (3-d₃), and 2-acetyl-2-thiazoline-d₄ (4-d₄), respectively. Forty microliters of each standard solution was used for the derivatization according to the instructions above. The derivatized solutions were diluted and analyzed as technical triplicates by LC–MS/MS, as described later in this paper. The added internal standards resulted in end concentrations of 102, 200, 82, and 122 μg/kg for 1-d₃, 2-d₃, 3-d₃, and 4-d₄, respectively, in the samples.

Solid Food Samples. One milliliter of MeOH and the internal standard mixture were added to 0.5 g (0.2–0.3 g for rice waffles and popcorn) of the milled sample (GM 200-type mill, Retsch, Haan, Germany; 1000 rpm; 5 s; before milling, the samples were frozen with liquid nitrogen; biological triplicates). After extractive grinding using the bead beater (Precellys Evolution Homogenizer, Bertin Technologies, Montigny Le Bretonneux, France) with 2 mL extraction tubes (ceramic balls: ck mix 1.4/2.8 mm), at 6800 rpm for 3 × 30 and 20 s breaks, and after 2 h equilibration in a laboratory shaker, the suspension was centrifuged (2 min, 13400 rpm) using an Eppendorf Minispin Centrifuge (Eppendorf, Hamburg, Germany). The supernatant was membrane-filtered before the derivatization.

Liquid Samples. The internal standards (concentrations for the solid samples in μg/L) were added to 0.5 mL sample portions (biological triplicates) and equilibrated for 2 h in the laboratory shaker. Before derivatization, the samples were membrane-filtered. The roast-beef sauce was diluted (1:10) with methanol, and 100 μL portions, instead of 40 μL, of the diluted samples were derivatized after adding 5 μL of the internal standard mixture (conc. above).

Derivatization and Defatting. Following a modified method reported for the analysis of short- and branched-chain fatty acids,²² 40 μL of the membrane-filtered extract/sample, 20 μL of 6% pyridine in acetonitrile/water (50:50; v/v), 20 μL of 200 mM 3-nitrophenylhydrazine hydrochloride in acetonitrile/water (50:50; v/v), and 0.5 mL of pentane were put in a 1.5 mL safe-lock tube. After being heated in a thermo-shaker (40 °C, 700 rpm, 2 h; Thermo-mixer C, Eppendorf, Hamburg, Germany), a 50 μL aliquot of the lower phase in the safe-lock tube was withdrawn and diluted (1:2) with acetonitrile/water (50:50; v/v) for LC–MS analysis (2 μL injection).

Validation. Recovery Experiments and Repeatability. An amount of 5, 25, and 100 μL of the analyte stock solution mentioned above was spiked into 0.5 g/0.5 mL of the sample (each as biological triplicates). After the addition of the internal standard solutions, the samples were prepared using the instructions above. For the determination of the standard deviations, five biological replicates of nonspiked samples were analyzed.

Formation Experiments. A mixture of the amino acids, L-proline (1.2 mg/mL), L-ornithine (1.0 mg/mL), L-citrulline (1.5 mg/mL), and L-cysteine (0.8 mg/mL), as well as one of the dicarbonyls, glyoxal (0.5 μL/mL), methylglyoxal (0.5 μL/mL), and 1-hydroxy-2-propanone (0.5 μL/mL), were prepared in acetonitrile/water (50/50, v/v). Forty microliters of the two prepared standard solutions, mixed in equal parts, were derivatized as stated above at 40 °C and additionally at 80 °C for 2 h. Further, 60 μL of a 1:1:1 mixture of the amino acid and dicarbonyl standard mixture and 6% pyridine in acetonitrile/water (50/50, v/v) was heated for 2 h at 80 °C (700 rpm, 2 h; Thermo-mixer C, Eppendorf, Hamburg, Germany). After heating, this solution was derivatized by adding 20 μL of 3-NPH solution and proceeding as stated above.

Optimization of the Derivatization Time. A solution containing 2-acetyl-1-pyrroline (5.9 mg/L), 2-acetyl-1,4,5,6-tetrahydropyridine (4.9 mg/L), 2-acetylpyrazine (5.7 mg/L), and 2-acetyl-2-thiazoline (1.9 mg/L), as well as 3-methyladenine (1.0 mg/L) as a reference, was prepared in acetonitrile/water (50/50, v/v). Thereafter, 40 μL portions of the solution were derivatized in triplicates, as described above for 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 180, and 300 min. The relative yields were calculated as a quotient of the analyte peak and the 3-methyladenine peak areas.

UHPLC–MS/MS Analysis. The samples were separated using an ExionLC apparatus (Sciex, Darmstadt, Germany), consisting of two LC pump systems (ExionLC AD pump), an ExionLC degasser, an ExionLC AD autosampler, an ExionLC AC column oven, and an

ExionLC controller, equipped with a 100 × 2.1 mm, 1.7 μm, 100 Å Kinetex C18 column (Phenomenex, Aschaffenburg, Germany). A gradient of 0.1% formic acid in water (Solvent A) and 0.1% formic acid in acetonitrile (solvent B) was used (0.4 mL/min): 0 min, 30% B; 2 min, 30% B; 9 min, 57% B; 10 min, 100% B; 12 min, 100% B; 13 min, 30% B; 15 min, 30% B. The LC instrument was hyphenated with a QTRAP 6500+ mass spectrometer (Sciex, Darmstadt, Germany), controlled using the Analyst 1.6.3 software (Sciex) and operated in the multiple reaction monitoring (MRM) (low mass) mode (ion-spray voltage: –4500 V) using the following instrument settings: curtain gas (35 psi), temperature (450 °C), gas 1 (55 psi), gas 2 (65 psi), collision activated dissociation (–2 V), and entrance potential (–10 V). Data interpretation was performed using the MultiQuant software (ver. 3.0.2, Sciex, Darmstadt, Germany; peak model: MQ4) and Analyst 1.6.3 (Sciex, Darmstadt, Germany).

Determination of the Derivatization Pathways of 1 and 2. Solutions of 2-acetyl-1-pyrroline (0.59 mg/L) and 2-acetyl-tetrahydropyridine (0.61 mg/L) were derivatized as described above, except that the derivatization time was 20 min instead of 2 h. The resulting solutions were diluted (1:1000) and injected (flow: 7 μL/min) into the LC–MS system using a syringe pump. The mass spectrum was obtained using the MS system mentioned above, at an ion-spray voltage of –4500 V and a declustering potential of –80 V.

Determination of the Limit of Detection (LoD) and LoQ Values. The signal-to-noise ratios of the LoD and LoQ were set to 3 and 10, respectively. For the determination in food samples, a three-times higher LoD/LoQ was estimated.

¹H qNMR. The qNMR spectra were recorded on a 400 MHz Avance III spectrometer (Bruker, Rheinstetten, Germany), equipped with a Broadband Observe BBFO Plus Probe (Bruker, Rheinstetten, Germany). MeOD-d₃ (600 μL) was used as the solvent, and chemical shifts are reported in parts per million (ppm) relative to the MeOD-d₃ solvent signal. Data processing was performed using Topspin NMR software ver. 3.2 (Bruker). The q-NMR spectroscopy was performed as reported earlier; the spectrometer was calibrated with the ERETIC 2 tool using the PULCON methodology.³⁰

RESULTS AND DISCUSSION

The compound 3-NPH was used as the derivatization reagent to develop a new high-throughput LC–MS (SIDA) quantization technique for the analysis of the 2-acetyl azaheterocycles, 1, 2, 3, and 4 (Figure 1).

Method Development and Validation Experiments. Derivatization. To enhance chromatography, ionization, and fragmentation in the MS/MS analysis in the ESI mode, a modified variant of the 3-NPH derivatization, reported by Han et al., was utilized.²⁴ Since the addition of a carbodiimide, as a coupling agent, is only required for the derivatization of carboxylic acids, it was omitted in the present study. Additionally, the derivatization time was adjusted according to the 2-acetyl azaheterocycles. The analytes, 1–4, were subjected to 3-NPH derivatization, and compounds 1 and 2 were tagged two times by the derivatization agent (Figure 1A). This observation can be explained by a ring-opening reaction, in which the imine moiety of pyrrole or tetrahydro-pyridine reacts analogically to a carbonyl and 3-NPH. This leads to a total *m/z* value of +288, which comprises the 3-NPH *m/z* values of the reaction at the ketone moiety (+135) and the ring-opening reaction (+153). Therefore, *m/z* values of 398 and 412 are obtained for 1-(3-NPH)₂ and 2-(3-NPH)₂, respectively. The ring-opening reaction and the reaction at the ketone moiety are proposed to occur simultaneously and not successively since the reactant at both positions can react independently with the derivatization agent. For analytes 3 and 4, there was only one reaction of 3-NPH observed (Figure 1B). This can be attributed to the stability of the aromatic ring

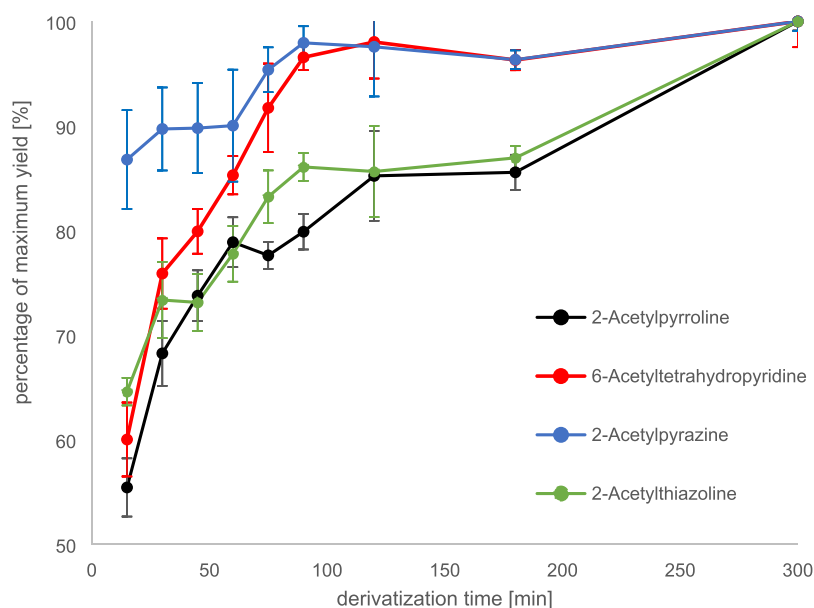


Figure 2. Optimization of the derivatization time; the analytes were derivatized under the stated conditions for different times (15–300 min).

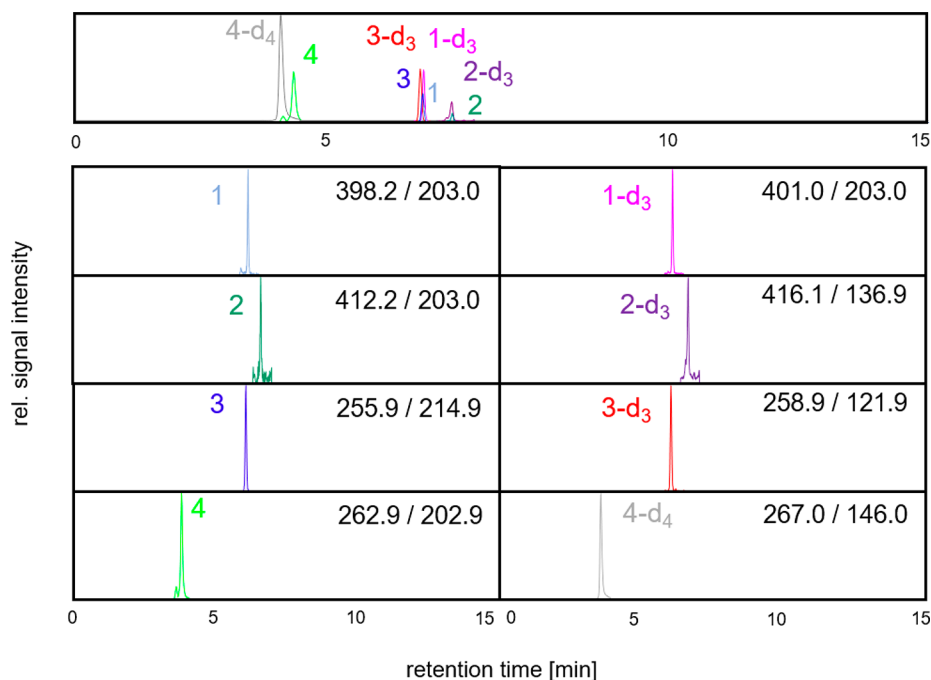


Figure 3. UHPLC–MS/MS spectra of the samples showing the mass transitions of 2-acetyl-1-pyrroline (1), 2-acetyl-1,4,5,6-tetrahydropyridine (2), 2-acetylpyrazine (3), and 2-acetyl-2-thiazoline (4), as well as their internal standards (3-NPH-derivatized). Signal intensity of each MRM transition normalized.

of 3 and the change in the reactivity of the imine in 4, caused by the presence of sulfur in the pyrrole ring. The ring-opening reaction at the imine moiety of 2 presents an additional advantage, i.e., the tautomeric conversion of this substance no longer occurs, leading to the appearance of a single characteristic signal for this substance in the LC–MS spectra. The yields of the 3-NPH derivatized analytes were measured over time, and a reaction time of 2 h was found to be sufficient (Figure 2). The yields increased almost linearly with the derivatization time up to 60 min, stagnated after 90 min, and further increased to over 80% (relative to the maximum yield at 300 min) after 120 min for all the analytes. These results

also show that, for all the analytes, the completion of the reaction with 3-NPH after 2 h cannot be assumed, and stable isotope-labeled standards are indispensable. Also, it can be assumed that, for samples containing high amounts of the analytes, a derivatization time of 30 min is sufficient.

Sample Workup. To receive more homogeneous samples, the solid foods were ground roughly prior to further analysis. Subsequently, a small amount of the sample (about 0.5 g) together with the isotopically labeled standards was homogenized and extracted using a bead beater. Methanol was selected as the extraction fluid since its high polarity is suitable for the effective extraction of the polar analytes. In addition to this,

extraction with methanol was preferred over that with water or using a buffer system, as utilized by Jost et al.,²⁰ because methanol extracts less starch and proteins; therefore, a Carrez clarification is unnecessary. After centrifugation and filtration, the extract was derivatized, diluted, and used for LC–MS. The liquid foods or beverages were directly used for derivatization after membrane filtration.

LC–MS Analysis. To optimize the MS/MS detection for high-sensitivity quantitation, standard solutions of these analytes were derivatized and syringe-infused into the MS ion source; thereafter, software-assisted ramping of the ion path parameters in the negative ESI mode was performed to maximize the fragment ion abundance. The analytes were identified by their MS/MS spectra and LC retention times. Their identities were confirmed by comparing the parameters with those of reference substances and by performing co-chromatography. LC separation of the analytes was performed in a 15 min run that could be applied for all 20 analyzed food samples. Quantitation was carried out by SIDA using 1-d₃, 2-d₃, 3-d₃, and 4-d₄ as internal standards, spiked to the food samples prior to workup. The quantifier MRM transitions of the analytes and their corresponding internal standards, as measured in a rice waffle sample, are depicted in Figure 3.

Validation. The range of the LoD values for the 2-acetyl azaheterocycles was 0.2–0.3 µg/kg, and the LoQ values ranged from 0.5 to 1.0 µg/kg (Table 1). Therefore, compounds 2–4 could be quantitated in amounts below their odor thresholds in water, except for 1, which has an odor threshold of 0.1 µg/kg and an LoQ of 0.6 µg/kg (Table 1). To determine the recoveries, methanol and starch were chosen as the analyte-free matrix, and additionally, peanut, medium roast coffee, espresso, and toast were chosen to determine the standard deviations and recoveries in actual food samples. As shown in Table 2, the recoveries are in a narrow range of 81.1–115.2%, excluding that of 4 in espresso, which is apparently subjected to strong matrix effects. The recoveries represent the mean value of three spiking levels. The espresso matrix disturbs the detection of 4, as evidenced by the broadening peak and the changing peak shape. This effect is limited to the quantitation of 4 in espresso,

and the recovery rates of 4 in methanol and starch are 115.2% and 103.4%, respectively. Further, despite 3 being clearly detectable in espresso, its quantitation in espresso was hindered by the matrix effects that interfered with the signal of the 3-d₃ internal standard. Once more, excluding the quantitation of 4 in espresso, the standard deviations range from 1.5% to 10.7% (Table 2). The calibration curve of 1 (Figure 4) demonstrates the high linearity of this method, which was tested for up to four orders of magnitude. To ensure that during the derivatization no analytes are formed out of precursors, additional experiments were conducted. Among the known precursors of the 2-acetyl azaheterocycles are the dicarbonyls, glyoxal, methylglyoxal, and 1-hydroxy-2-propanone, as well as the amino acids, cysteine, ornithine, citrulline, and proline, of which a mixture was prepared. This mixture was derivatized under the stated conditions (40 °C) and at 80 °C. Additionally, as a positive control, the mixture was, after the addition of pyridine, heated at 80 °C for 2 h and, subsequently, derivatized under standard conditions. While in the positive control all analytes (1: 1.5×10^5 counts s⁻¹; 2: 4.2×10^4 counts s⁻¹; 3: 6.1×10^4 counts s⁻¹; 4: 1.3×10^4 counts s⁻¹) could be detected; in the samples derivatized by 3-NPH at 40 and 80 °C, no analytes were detected. Instead, a very fast color change from yellow to orange could be noticed in the negative samples. This change in color is proposedly due to the reaction of two molecules of 3-NPH with the dicarbonyl compounds, leading to a molecule with a relatively large mesomeric stabilized π -system. This observation leads further to the hypothesis that the reaction of the precursors with the analyzed compounds under the given conditions can be excluded since the excessive 3-NPH reacts very effectively with the dicarbonyl precursors.

Quantitation of 2-Acetyl Azaheterocycles in Different Food Samples. The calibrations of compounds 1–4 were performed over a magnitude of 4, e.g., for 1 in a concentration range of 0.6–6000 µg/L, a calibration equation of $1.6086x^{0.9389}$ (R^2 : 0.9983) was obtained (Figure 4). In the Milano-style salami, 48.7 µg/kg of 1 was detected. As found by Stahnke, 1 is a key odorant in Mediterranean dried sausages fermented by mold;³¹ contrarily, 1 could not be detected in the other non-mold-covered salami samples. Although 18.0 and 11.3 µg/kg of 2 were quantitated in the salami samples analyzed in this study, which is above its odor threshold, no data of 2 in salami could be found in the literature. The quantitated amounts of 1 and 3 in roasted peanut and cashew samples (Table 3) are similar to each other and congruous to the amounts found by Chetschik et al. in a pan-roasted peanut meal (8.9 µg/kg of 1, 4.2 µg/kg of 3).³² However, the amounts of 2 found in two nut samples are higher than that (7.4 µg/kg) found by Chetschik et al. Compound 4, whose concentration was below the LoQ (1.0 µg/kg) in both nut samples, was detected in a concentration of 1.9 µg/kg in a study conducted in 2010.³² The amounts of 1 quantitated in rice can differ clearly even within one variant of rice, as shown by Bergman et al.,³³ who quantitated 1 in milled Basmati rice in concentrations ranging from 19 to 342 µg/kg. The concentrations of 1 in nonaromatic rice-cultivars, such as the long-grain rice in this study, are very low and are, therefore, usually not possible to quantitate.³⁴ Compounds 1 and 3 are literature-known components of roasted sesame volatiles, while 2 and 4 have not yet been determined in roasted sesame in the literature.^{35–37} Conversely, pyridines (2-pentylpyridine and pyridine), as well as thiazoles and thiazolines (e.g., 2-methylthiazoline, 2-methylthiazole), have been detected in

Table 2. Validation Results for the Quantitation of 2-Acetyl Azaheterocycles in Methanol, Starch, Peanut, Coffee (Medium Roast), Espresso, and Toast

analyte (no.)	2-ACPY (1)	2-ATHP (2)	2-AP (3)	2-AT (4)
MeOH				
recovery [%]	100.1	94.5	93.7	115.2
starch				
recovery [%]	95.5	88.6	88.2	103.4
peanut				
RSD [%]	2.8	3.4	4.9	n.d.
recovery [%]	91.8	87.9	92.2	n.d.
coffee (med. roast)				
RSD [%]	n.d.	n.d.	1.5	n.d.
recovery [%]	n.d.	n.d.	99.8	n.d.
espresso				
RSD [%]	10.7	n.d.	n.d.	27.8
recovery [%]	95.7	n.d.	n.d.	71.6
toast				
RSD [%]	8.4	4.4	6.6	n.d.
recovery [%]	81.1	86.2	95.4	n.d.

^an.d.: not detected.

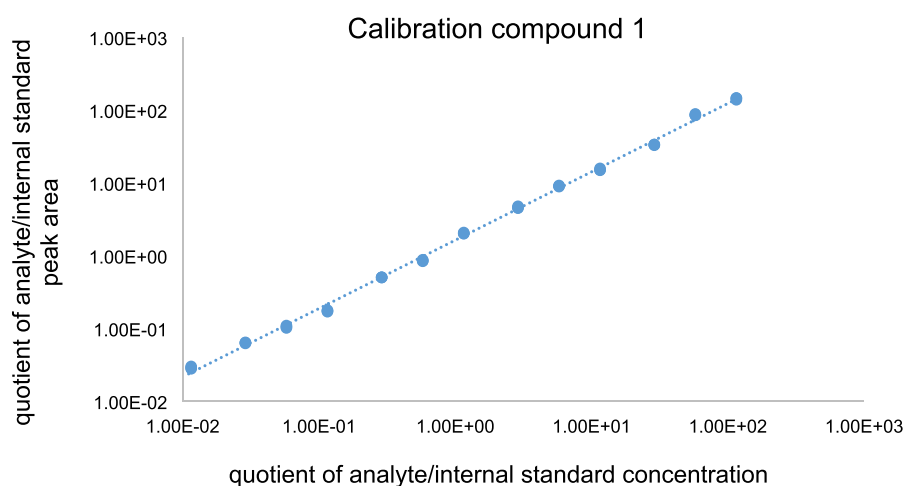


Figure 4. Calibration of 2-acetyl-1-pyrroline (1); analyte concentration from 0.6 to 6000 ng/mL, and internal standard concentration (2-acetyl-1-pyrroline- d_3) of 40 ng/mL.

Table 3. Concentrations of 2-Acetyl Azaheterocycles in Different Foods

analyte (no.)	analyte concentration ($\mu\text{g}/\text{kg}$; std. dev.)			
	2-ACPY (1)	2-ATHP (2)	2-AP (3)	2-AT (4)
salami (milano)	48.7 \pm 2.4	18.0 \pm 1.5	12.9 \pm 0.4	<LoD
salami (prepackaged)	<LoD	11.3 \pm 0.4	<LoQ	<LoD
peanut (roasted)	14.2 \pm 0.5	57.6 \pm 2	5.1 \pm 0.3	<LoQ
cashew (roasted)	9.6 \pm 0.4	66.8 \pm 3.1	8.4 \pm 0.3	<LoQ
basmati rice (cooked)	21.7 \pm 1.7	<LoD	<LoD	<LoD
jasmin rice (cooked)	42.0 \pm 3.1	<LoD	<LoD	<LoD
parboiled long-grain rice (cooked)	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD
rice waffles	21.2 \pm 2.4	24.7 \pm 3.0	67.0 \pm 4	19.1 \pm 1.7
sesame (pan-roasted)	<LoQ	16.2 \pm 0.3	17.3 \pm 6.8	3.9 \pm 0.3
rye/mixed bread crust	<LoQ	5.0 \pm 0.4	4.5 \pm 0.2	<LoQ
baguette	<LoQ	10.8 \pm 0.7	<LoD	<LoD
spelt/mixed bread crust	<LoQ	6.7 \pm 0.2	<LoQ	<LoD
toast	4.9 \pm 0.5	10.6 \pm 0.5	8.7 \pm 0.6	<LoQ
toast (whole grain)	<LoQ	9.4 \pm 0.6	7.4 \pm 0.5	<LoQ
popcorn	31.7 \pm 4.0	631 \pm 114	34.8 \pm 6.7	<LoQ
canned corn	<LoD	<LoQ	<LoD	<LoD
coffee (med. roast)	<LoQ	<LoD	107 \pm 2.0	<LoQ
espresso	7.7 \pm 0.9	<LoD	— ^a	11.0 \pm 3.1
roasted cocoa nibbs	<LoD	7.7 \pm 0.4	20.8 \pm 1.9	<LoQ
roast-beef sauce	<LoQ	<LoQ	9.3 \pm 1.4	13.8 \pm 1.7

^aDetected but not quantitated; / represents no quantitation data.

sesame oils.³⁸ For rice waffles, having sesame and brown rice as ingredients, the quantities of compounds 1–4 contained match the available quantitative data on rice and roasted sesame. The quantitative data of bread, toast, and baguette show that the amount of 1 contained is higher than the LoQ only in toast. As shown in the literature, the amounts of 1 are lower in whole-grain wheat³⁹ or rye products.⁴⁰ The amount of 1 in baguette crust is given at $\sim 10 \mu\text{g}/\text{kg}$ in the literature;⁴¹ however, since in this study the whole baguette was used for the analysis, the amount of 1 has to be noticeably lower. The concentration of compound 2 was determined by Rychlik et al.⁴² at $1.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ in toast; notably, this is one of the rare mentions in the literature. Therefore, the quantitation of 2 in all the bread, toast, and baguette samples, in a concentration range of $5.0\text{--}10.8 \mu\text{g}/\text{kg}$, is remarkable. The lack of information on compound 2 in bread or other foods, such as salami, as mentioned above, might be due to its challenging quantitation in low

concentrations, which is worsened by its existence in tautomeric equilibrium when it is not derivatized (Figure 1). Compounds 3 and 4, which are partly found in the bread samples in this study, have also been determined in bread crust³⁹ and baguette crust⁴¹ in the literature. The quantitative data of compounds 1–3 in popcorn (Table 3) are in accordance with the values found by Schieberle ($57 \mu\text{g}/\text{kg}$ of 1, $1207 \mu\text{g}/\text{kg}$ of 2, $7 \mu\text{g}/\text{kg}$ of 3),²⁹ whereas the deficiency of the analyzed compounds in canned corn proposedly is due to the relatively low thermal exposure and high availability of water during the food preparation, which leads to less extensive Maillard reactions. Despite 1 being detected in espresso in the present study, no information on compound 1 in coffee or espresso could be obtained, although some information on the detection of the structure-similar 2-acetylpyrrole compound in coffee headspace was found.⁴³ Contrarily, compound 4, which was detected in espresso in the present study, was analyzed in

coffee using aroma extraction dilution analysis and was found to be present with a flavor-dilution factor (FD) of 16^{44} or 27^{11} respectively. Compound 3 could be detected in espresso as well as in coffee, but as described above, the quantitation of 3 in espresso was hindered due to matrix effects. In this study, there was no positive detection of 1 in cocoa; however, it was possible to quantitate small amounts of 2 and 3 in cocoa. The absence of 1 in the analyzed not-freshly roasted cocoa, despite it having been detected in cocoa previously,⁴⁵ is probably due to the instability of the compound during storage.²⁹ The literature-known¹² odorant in heated meat, 4, was quantitated with an amount of $13.8 \mu\text{g}/\text{kg}$ in the analyzed roast-beef sauce.

Thus, a method for the quantitation of four different 2-acetyl azaheterocycles by UHPLC–MS/MS after derivatization via 3-NPH, using internal standards that compensate for the losses during the sample workup, was developed. With its quick sample workup, low sample amounts (0.5 g), and fast UHPLC–MS/MS runs (15 min), this method promises exceptional applicability for high-throughput analysis. The method is extendable to the analysis of other nonvolatile compounds or volatile carbonyls in one LC–MS/MS run to enable a more comprehensive analysis of food samples, as demonstrated by Hofstetter et al.,²⁵ who analyzed the aroma compounds and tastants in apple juice. For example, it is possible to monitor aroma compounds and their precursors, e.g., 2-acetyl-1-pyrroline and proline, in one LC–MS/MS measurement. The developed sample preparation is also applicable to a broad spectrum of food matrices and fatty foods, such as nuts. In particular, these advantages and the accessible extendibility of the method make it stand out among prior developed LC–MS/MS methods, such as those by Jost et al.²⁰ and Hayasaka et al.²¹

■ ASSOCIATED CONTENT

SI Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.0c07144>.

Chemical structures and the MRM parameters for mass spectrometric analysis of the analyzed compounds (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

Thomas F. Hofmann – Chair of Food Chemistry and Molecular and Sensory Science, Technical University of Munich, D-85354 Freising, Germany; orcid.org/0000-0003-4057-7165; Phone: +49-8161/71-2902; Email: thomas.hofmann@tum.de; Fax: +49-8161/71-2949

Authors

Markus Bösl – Chair of Food Chemistry and Molecular and Sensory Science, Technical University of Munich, D-85354 Freising, Germany; orcid.org/0000-0002-5878-1810
Andreas Dunkel – Leibniz-Institute for Food Systems Biology, Technical University of Munich, D-85354 Freising, Germany

Complete contact information is available at: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.0c07144>

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

Many thanks to the Leibniz Institute for Food Systems Biology at the Technical University of Munich for supplying some of the reference substances and internal standards.

■ REFERENCES

- (1) Hofmann, T.; Schieberle, P. 2-Oxopropanal, hydroxy-2-propanone, and 1-pyrroline-important intermediates in the generation of the roast-smelling food flavor compounds 2-acetyl-1-pyrroline and 2-acetyltetrahydropyridine. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 2270–2277.
- (2) Huang, T.-C.; Teng, C.-S.; Chang, J.-L.; Chuang, H.-S.; Ho, C.-T.; Wu, M.-L. Biosynthetic mechanism of 2-acetyl-1-pyrroline and its relationship with delta1-pyrroline-5-carboxylic acid and methylglyoxal in aromatic rice (*Oryza sativa* L.) callus. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 7399–7404.
- (3) Wakte, K. V.; Kad, T. D.; Zanan, R. L.; Nadaf, A. B. Mechanism of 2-acetyl-1-pyrroline biosynthesis in *Bassia latifolia* Roxb. flowers. *Physiol. Mol. Biol. Plants* **2011**, *17*, 231–237.
- (4) Herderich, M.; Costello, P. J.; Grbin, P. R.; Henschke, P. A. Occurrence of 2-acetyl-1-pyrroline in mousy wines. *Nat. Prod. Lett.* **1995**, *7*, 129–132.
- (5) Strauss, C. R.; Heresztyn, T. 2-Acetyltetrahydropyridines—a cause of the “mousy” taint in wine. *Chem. Ind.* **1984**, 109–111.
- (6) Costello, P. J.; Henschke, P. A. Mousy off-flavor of wine. Precursors and Biosynthesis of the Causative N-Heterocycles 2-Ethyltetrahydropyridine, 2-Acetyltetrahydropyridine, and 2-Acetyl-1-pyrroline by *Lactobacillus hilgardii* DSM 20176. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 7079–7087.
- (7) Wakte, K.; Zanan, R.; Hinge, V.; Khandagale, K.; Nadaf, A.; Henry, R. Thirty-three years of 2-acetyl-1-pyrroline, a principal basmati aroma compound in scented rice (*Oryza sativa* L.): a status review. *J. Sci. Food Agric.* **2017**, *97*, 384–395.
- (8) Schieberle, P. Primary odorants in popcorn. *J. Agric. Food Chem.* **1991**, *39*, 1141–1144.
- (9) Luckanatinvong, V.; Mahatheeranont, S.; Siriphanich, J. Variation in the aromatic nature of Nam-Hom coconut depends on the presence and contents of 2-acetyl-1-pyrroline. *Sci. Hortic.* **2018**, *233*, 277–282.
- (10) Starkenmann, C.; Niclass, Y.; Vuichoud, B.; Schweizer, S.; He, X.-F. Occurrence of 2-acetyl-1-pyrroline and its nonvolatile precursors in celtuce (*Lactuca sativa* L. var. *augustana*). *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67*, 11710–11717.
- (11) Miyazato, H.; Nakamura, M.; Hashimoto, S.; Hayashi, S. Identification of the odour-active cyclic diketone cis-2,6-dimethyl-1,4-cyclohexanedione in roasted Arabica coffee brew. *Food Chem.* **2013**, *138*, 2346–2355.
- (12) Plancken, A. J.; Tonsbeek, C. H. T.; Copier, H. Components contributing to beef flavor. Isolation of 2-acetyl-2-thiazoline from beef broth. *J. Agric. Food Chem.* **1971**, *19*, 1014–1016.
- (13) Schieberle, P. Studies on the flavour of roasted white sesame seeds. *Progr. Flav. Prec. Studies* **1993**, 343–360.
- (14) Buttery, R. G.; Turnbaugh, J. G.; Ling, L. C. Contribution of volatiles to rice aroma. *J. Agric. Food Chem.* **1988**, *36*, 1006–1009.
- (15) Hopfer, H.; Jodari, F.; Negre-Zakharov, F.; Wylie, P. L.; Ebeler, S. E. HS-SPME-GC-MS/MS method for the rapid and sensitive quantitation of 2-acetyl-1-pyrroline in single rice kernels. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64*, 4114–4120.
- (16) Yoshihashi, T. Quantitative analysis on 2-acetyl-1-pyrroline of an aromatic rice by stable isotope dilution method and model studies on its formation during cooking. *J. Food Sci.* **2002**, *67*, 619–622.
- (17) Mestdagh, F.; Davidek, T.; Chaumonteuil, M.; Folmer, B.; Blank, I. The kinetics of coffee aroma extraction. *Food Res. Int.* **2014**, *63*, 271–274.
- (18) Alim, A.; Song, H.; Liu, Y.; Zou, T.; Zhang, Y.; Zhang, S. Flavour-active compounds in thermally treated yeast extracts. *J. Sci. Food Agric.* **2018**, *98*, 3774–3783.

- (19) Mall, V.; Schieberle, P. Evaluation of key aroma compounds in processed prawns (whiteleg shrimp) by quantitation and aroma recombination experiments. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 2776–2783.
- (20) Jost, T.; Heymann, T.; Glomb, M. A. Efficient analysis of 2-acetyl-1-pyrroline in foods using a novel derivatization strategy and LC-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67*, 3046–3054.
- (21) Hayasaka, Y. Quantitative analysis of mousy off-flavour compound 2-acetyl tetrahydropyridine in wine using liquid chromatography tandem mass spectrometry interfaced with atmospheric chemical ionisation. *J. Chromatogr. A* **2019**, *1588*, 108–114.
- (22) Han, J.; Lin, K.; Sequeira, C.; Borchers, C. H. An isotope-labeled chemical derivatization method for the quantitation of short-chain fatty acids in human feces by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **2015**, *854*, 86–94.
- (23) Han, J.; Lin, K.; Sequira, C.; Yang, J.; Borchers, C. H. Quantitation of low molecular weight sugars by chemical derivatization-liquid chromatography/multiple reaction monitoring/mass spectrometry. *Electrophoresis* **2016**, *37*, 1851–1860.
- (24) Han, J.; Gagnon, S.; Eckle, T.; Borchers, C. H. Metabolomic analysis of key central carbon metabolism carboxylic acids as their 3-nitrophenylhydrazones by UPLC/ESI-MS. *Electrophoresis* **2013**, *34*, 2891–2900.
- (25) Hofstetter, C. K.; Dunkel, A.; Hofmann, T. Unified flavor quantitation: toward high-throughput analysis of key food odorants and tastants by means of ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67*, 8599.
- (26) Hofmann, T.; Schieberle, P. New and convenient syntheses of the important roasty, popcorn-like smelling food aroma compounds 2-acetyl-1-pyrroline and 2-acetyltetrahydropyridine from their corresponding cyclic alpha-amino acids. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 616–619.
- (27) Schieberle, P.; Grosch, W. Quantitative analysis of aroma compounds in wheat and rye bread crusts using a stable isotope dilution assay. *J. Agric. Food Chem.* **1987**, *35*, 252–257.
- (28) Cerny, C.; Grosch, W. Quantification of character-impact odour compounds of roasted beef. *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.* **1993**, *196*, 417–422.
- (29) Schieberle, P. Quantitation of important roast-smelling odorants in popcorn by stable isotope dilution assays and model studies on flavor formation during popping. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 2442–2448.
- (30) Frank, O.; Kreissl, J. K.; Daschner, A.; Hofmann, T. Accurate determination of reference materials and natural isolates by means of quantitative (¹H) NMR spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 2506–2515.
- (31) Stahnke, M. L. H. 2-Acetyl-1-pyrroline - key aroma compound in mediterranean dried sausages. *Front. Flav. Sci.* **2000**, 361–365.
- (32) Chetschik, I.; Granvogl, M.; Schieberle, P. Quantitation of key peanut aroma compounds in raw peanuts and pan-roasted peanut meal. Aroma reconstitution and comparison with commercial peanut products. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 11018–11026.
- (33) Bergman, C. J.; Delgado, J. T.; Bryant, R.; Grimm, C.; Cadwallader, K. R.; Webb, B. D. Rapid gas chromatographic technique for quantifying 2-acetyl-1-pyrroline and hexanal in rice (*oryza sativa*, L.). *Cereal Chem.* **2000**, *77*, 454–458.
- (34) Grimm, C. C.; Champagne, E. T.; Lloyd, S. W.; Easson, M.; Condon, B.; McClung, A. Analysis of 2-acetyl-1-pyrroline in rice by HSSE/GC/MS. *Cereal Chem.* **2011**, *88*, 271–277.
- (35) Schieberle, P. Odour-active compounds in moderately roasted sesame. *Food Chem.* **1996**, *55*, 145–152.
- (36) Shimoda, M.; Nakada, Y.; Nakashima, M.; Osajima, Y. Quantitative comparison of volatile flavor compounds in deep-roasted and light-roasted sesame seed oil. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 3193–3196.
- (37) Tamura, H.; Fujita, A.; Steinhaus, M.; Takahisa, E.; Watanabe, H.; Schieberle, P. Assessment of the aroma impact of major odor-active thiols in pan-roasted white sesame seeds by calculation of odor activity values. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 10211–10218.
- (38) Park, M. H.; Jeong, M. K.; Yeo, J.; Son, H.-J.; Lim, C.-L.; Hong, E. J.; Noh, B.-S.; Lee, J. Application of solid phase-microextraction (SPME) and electronic nose techniques to differentiate volatiles of sesame oils prepared with diverse roasting conditions. *J. Food Sci.* **2011**, *76*, C80–8.
- (39) Moskowitz, M. R.; Bin, Q.; Elias, R. J.; Peterson, D. G. Influence of endogenous ferulic acid in whole wheat flour on bread crust aroma. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 11245–11252.
- (40) Schieberle, P.; Grosch, W. Potent odorants of rye bread crust-differences from the crumb and from wheat bread crust. *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.* **1994**, *198*, 292–296.
- (41) Zehentbauer, G.; Grosch, W. Crust aroma of baguettes I. key odorants of baguettes prepared in two different ways. *J. Cereal Sci.* **1998**, *28*, 81–92.
- (42) Rychlik, M.; Grosch, W. Identification and quantification of potent odorants formed by toasting of wheat bread. *LWT - Food Science and Technology* **1996**, *29*, 515–525.
- (43) Ribeiro, J. S.; Augusto, F.; Salva, T. J. G.; Ferreira, M. M. C. Prediction models for Arabica coffee beverage quality based on aroma analyses and chemometrics. *Talanta* **2012**, *101*, 253–260.
- (44) Wagenstaller, M.; Buettner, A. Coffee aroma constituents and odorant metabolites in human urine. *Metabolomics* **2014**, *10*, 225–240.
- (45) Frauendorfer, F.; Schieberle, P. Changes in key aroma compounds of criollo cocoa beans during roasting. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 10244–10251.
- (46) Adams, A.; De Kimpe, N. Chemistry of 2-acetyl-1-pyrroline, 6-acetyl-1,2,3,4-tetrahydropyridine, 2-acetyl-2-thiazoline, and 5-acetyl-2,3-dihydro-4H-thiazine: extraordinary Maillard flavor compounds. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 2299–2319.
- (47) Buttery, R. G.; Ling, L. C. Volatile flavor components of corn tortillas and related products. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 1878–1882.
- (48) Buttery, R. G.; Ling, L. C.; Juliano, B. O.; Turnbaugh, J. G. Cooked rice aroma and 2-acetyl-1-pyrroline. *J. Agric. Food Chem.* **1983**, *31*, 823–826.

Figure S1: Compound **3** and **3-d₃** quantifier transitions in an espresso sample

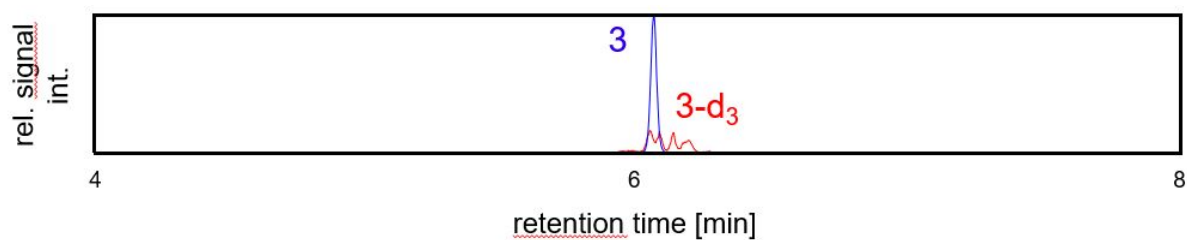
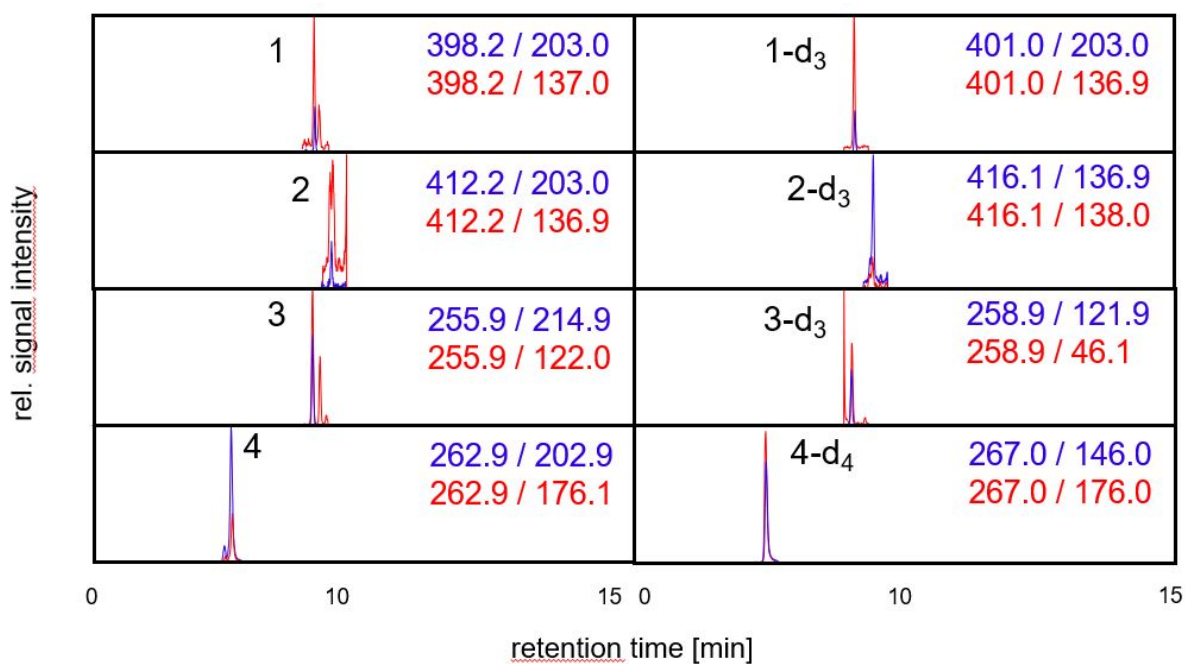


Figure S2: Quantifier (blue) and qualifier (red) transitions of compounds **1-4** and affiliated internal standards in a rice waffle sample



1 2-Acetyl-1-pyrroline

2 2-Acetyl-1,4,5,6-tetrahydropyridne

3 2-Acetylpyrazine

4 2-Acetyl-thiazoline

Table S1: MRM-transitions of the analytes and internal standards; Q1: precursor-ion; Q3: product ion; DP: declustering potential; EP: entrance potential; CE: collision energy; CXP: cell exit potential

Q1	Q3	Compound	DP	EP	CE	CXP
398.19	137.00	1	-125	-10	-28	-11
398.19	203.00	1	-125	-10	-34	-9
401.04	136.90	1-d3	-90	-10	-28	-15
401.04	203.00	1-d3	-90	-10	-34	-11
412.19	136.90	2	-110	-10	-30	-19
412.19	203.00	2	-110	-10	-34	-21
416.07	136.90	2-d3	-120	-10	-30	-13
416.07	138.00	2-d3	-120	-10	-30	-9
255.95	122.00	3	-15	-10	-28	-17
255.95	214.90	3	-15	-10	-24	-21
258.95	46.10	3-d3	-95	-10	-70	-21
258.95	121.90	3-d3	-95	-10	-28	-13
262.92	202.90	4	-60	-10	-22	-19
262.92	176.10	4	-60	-10	-30	-21
266.97	146.00	4-d4	-35	-10	-34	-13
266.97	176.00	4-d4	-35	-10	-30	-17

Table S2: Parameters of calibration curves

Compound	Calibration function	R ²
2-Acetyl-1-pyrroline (1)	$y = 1.6086x^{0.9389}$	0.9983
2-Acetyl-1,4,5,6-tetrahydropyridine (2)	$y = 1.357x^{1.0384}$	0.9978
2-Acetylpyrazine (3)	$y = 1.3576x^{0.9817}$	0.9989
2-Acetylthiazoline (4)	$y = 3.3389x^{0.9829}$	0.9982

Toward High-Throughput Analysis of Aroma Compounds Using Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry: Screening of Key Food Odorants in Various Foods

Markus Bösl, Andreas Dunkel, Daniela Hartl, Anja Dollinger, Andrea Spaccasassi, Timo D. Stark, Corinna Dawid,* and Thomas F. Hofmann*



Cite This: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c00935>



Read Online

ACCESS |



Metrics & More



Article Recommendations



Supporting Information

ABSTRACT: Recent studies show the immense capacities of the unified quantitation of aroma and taste compounds using liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS). The goal of this study was to highlight the broad application of this unified method. Thus, a stable isotope dilution analysis quantification method of the most important key food odorants in various food categories by LC–MS was developed. Using the well-known derivatization agent 3-nitrophenylhydrazine for carbonyl derivatization and a newly developed approach for alcohol and thiol derivatization, a method for the quantitation of 20 key food odorants was established. Intraday precision was determined to be $\leq 26\%$, and interday precision was between 24 and 31%. Limits of quantitation were determined between 0.014 and 283 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The work shows that a wide array of aroma compounds can be analyzed accurately by LC–MS.

KEYWORDS: LC–MS, aroma analysis, flavor analysis, 3-nitrophenylhydrazine, stable isotope dilution assay, generalists

INTRODUCTION

The importance of food aroma for consumer acceptance and choice is undisputed. Therefore, the number of aroma-active compounds in foods is a prime target for research. The growing research interest for aromas began in the early sixties with the introduction of gas chromatography (GC). The initial assumption, that the whole set of volatiles of a food contribute to its specific smell, had to be revised and activity-guided strategies were applied.¹ Aroma extract dilution analysis employing GC-olfactometry (GC-O),² precise and robust quantification by the stable isotope dilution analysis (SIDA),³ and the calculation of odor activity values (OAV)² helped classify the importance of the aroma compounds. With the assistance of the gathered information on OAVs of aroma compounds in respective foods, the initially assumed approximate 10,000 volatiles⁴ contributing to the specific smell of foods could be narrowed down to 226 key food odorants (KFO) by Dunkel et al.⁵ This proved that most volatile compounds occurring in food, although being aroma active, do not contribute to flavor because they do not reach their respective odor thresholds (except some cases of additive and synergistic effects of sub-threshold odorants).

The KFOs as well as the basic taste compounds of many known foods are already determined, and it is assumed that in one food category, quantitative variations rather than differences in chemical structures are responsible for the perceived flavor variance within them.⁵ Consequently, it makes sense to develop accurate and efficient quantification methods, targeting these sensory-active KFOs particularly.

GC coupled with mass spectrometry (GC–MS) is a conventionally preferred way of analysis of volatile aroma

compounds. Nevertheless, extraction, sample preparation, and run times in GC are often extensive and time consuming, such as the extraction by solvent-assisted flavor evaporation.⁶ Due to the high variation of the odor thresholds for different aroma compounds, ranging from pg/kg to mg/kg concentrations (e.g., odor thresholds in water of 2-methyl-3-furanthiol and acetic acid of 0.03 ng/kg and 5.6 mg/kg, respectively),⁵ and the following differences in the concentration of these compounds can lead to difficulties during GC–MS measurements. As a result of the narrow linear range of standard GC–MS systems of up to 4 orders of magnitude, the use of multiple injections in different dilutions might be necessary, to avoid detector saturation.

Modern ultrahigh-performance liquid chromatography with fast-scanning tandem mass spectrometry (UHPLC–MS/MS) now enables highly accurate and sensitive quantitation over a large dynamic range of up to 6 orders of magnitude.⁷ Because of this development, and because the sensorial perception of food flavor is not represented by odorants or tastants alone, but a combinatorial effect of both groups, the unified quantitation of aroma compounds as well as tastants on one single LC–MS platform would be preferable.

A unified high-throughput quantitation method of volatile aroma compounds and nonvolatile tastants by means of

Received: February 14, 2023

Revised: April 25, 2023

Accepted: April 28, 2023

UHPLC–MS/MS was studied by Hofstetter et al.⁷ A method was developed to quantify all taste- and odor-active compounds of apple juice, via UHPLC–MS/MS. 3-Nitrophenylhydrazine (NPH, Figure 1) was used to derivatize

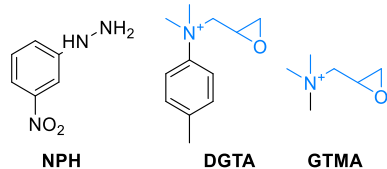


Figure 1. Derivatization agents 3-nitrophenylhydrazine (NPH), dimethyl-glycidyl-tolyl-ammonium (DGTA), and glycidyl trimethylammonium (GTMA).

volatile carbonyl compounds and nonvolatile organic acids as well as sugars, to enhance reversed-phase LC separation and MS ionization as well as fragmentation. Polyphenols and esters could as well be quantified without derivatization. NPH was also employed by Bösl et al.,⁸ Peters et al.,⁹ and Utz et al.¹⁰ for the quantification of aroma compounds in various foods, mint, and dairy, respectively. Additionally, Utz et al.¹⁰ proved the methodology by successfully establishing an almost sensory identical recombinant, employing the quantitative data from the unified LC–MS method. However, the so-far-developed methods for the unified quantitation of tastants and odorants by LC–MS cover only a small circle of different foods and analytes. The aim of this study, therefore, is to show the capabilities of the quantification of aroma compounds by LC–MS by making further KFOs accessible using the explained method and reveal a general application to a wide variety of food matrices. The focus was set on aroma compounds with high importance in many different foods. To define the importance of the KFOs, an improved method of meta-analysis building on the work of Dunkel et al.⁵ was conducted. As the resulting list of important KFOs also contained alcohols and thiols that cannot be derivatized by NPH, a new derivatization technique for volatile thiols and alcohols was required to be developed.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. The following compounds were obtained commercially: dichloromethane, (±)-epichlorohydrin, 3-nitrophenylhydrazine hydrochloride, Sc(OTf)₃, *p*-toluidine, 3-methylbutanal (1), methional (3), *Z*-3-hexenal (4), furaneol (5), 2-methylpropanal (9), 1-octen-3-one (10), *E,E*-2,4-decadienal (11), linalool (13), sotolon (15), hexanal (17), guaiacol (18), 4-ethylphenol (19), eugenol (21), 2-phenylethanol (22), 2-furfurylthiol (23), *E*-2-nonenal (24), *E,Z*-2,6-nonadienal (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), 4-vinylguaiacol (20) (Alfa Aesar, Lancashire, United Kingdom), *Z*-1,5-octadien-3-one, *E*-4,5-epoxy-*E*-2-decenal (AromaLAB, GmbH, Martinsried, Germany), methanethiol (2) 5% in glycol (Givaudan, Dubendorf, Switzerland), formic acid, methyl iodide, pyridine, *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimidehydrochloride (EDC; Merck, Darmstadt, Germany), *n*-pentane (VWR ProLabo Chemicals, AnalaR Normapur, France), methanol (J. T. Baker, Griesheim, Germany), and 1 M NaOH (Fluka, Merck KGaA, Darmstadt, Germany). The solvents used for the LC–MS/MS analysis were of LC–MS grade (Honeywell, Seelze, Germany). MeOD-*d*₃, used for the quantitative nuclear magnetic resonance (qNMR) spectroscopy, was purchased from Sigma-Aldrich. Water for chromatography was purified using a Milli-Q water advantage A 10 system (Millipore, Molsheim, France). All food samples were purchased from local retailers (Freising, Germany). The internal standards sodium-*d*₃-methanethiolate,¹¹ 3,3,3,4,4,4-*d*₆-methylpropanal,¹² 4,4-*d*₂-oct-1-en-3-one,¹³ and 1,2-*d*₂-

linalool¹⁴ were synthesized according to the cited literature. 4,5,6,7,8-*d*₃-2-Phenylethanol and *d*₁₂-hexanal were obtained by CDN-Isotopes Inc. (Quebec, Canada). 2,3-*d*₂-*E*-2-Nonenal, ¹³C₂-furanol, 9,9,10,10-*d*₄-*E,E*-decadienal, 3-(*d*₃-methylthio)propanal, ¹³C₂-sotolon, 9,10-*d*₂-2-methoxy-4-propylphenol, 4-vinyl-2-*d*₃-methoxyphenol, *d*₃-2-methoxyphenol, and 6,6-*d*₂-2-furfurylthiol were obtained from AromaLAB GmbH.

Synthesis of Dimethyl-glycidyl-tolyl-ammonium. As dimethyl-glycidyl-tolyl-ammonium (DGTA; for the IUPAC name, see Table S1) was not commercially available at the time the study was conducted, it had to be synthesized. DGTA was synthesized according to Yoon et al.¹⁵ and Hopff and Lienhard,¹⁶ applying some adjustments. *p*-Toluidine (10 mmol) was dissolved in dichloromethane (20 mL) and, after addition of Sc(OTf)₃ (5 mg) and epichlorohydrin (10 mmol), stirred for 24 h at room temperature. The mixture was dried at 20 °C in a stream of pure nitrogen; the residue was taken up in methanol/water (1:1, 20 mL), and aliquots (2 mL) were used for purification by medium-pressure liquid chromatography (phenyl-phase, Chromabond Sorbent C₆H₅, Macherey-Nagel, Düren, Germany; eluents: water and methanol, both with 0.1% formic acid as a modifier). The resulting purified 1-chloro-3-[(4-methyl phenyl)-amino]-2-propanol was taken up in acetonitrile (20 mL), NaOH (1 M, 18 mL) was added, and the mixture was stirred for 1 h. Thereafter, acetonitrile was distilled off at 20 °C in vacuo, and the mixture was extracted with dichloromethane (3 mL, 3 times). The aqueous phase was discarded, and methyl iodide (30 mmol) was added to the organic phase. After stirring for 48 h at room temperature, NaOH (1 M, 10 mL) was added, and the solution was again stirred for 1 h. The mixture was then extracted with dichloromethane (5 mL, 3 times), and the aqueous phase was discarded. The excess of the organic phase solvent was then distilled off (40 °C, in vacuo), and a substance with honey-like color and consistency, the DGTA product (see Figure 2), was obtained. The

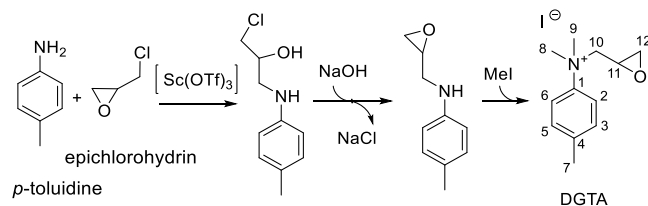


Figure 2. Synthesis of DGTA.

structure of DGTA was confirmed by ¹H NMR, ¹³C NMR, and ToF-MS/MS: ¹H NMR (400 MHz, 300 K, D₂O): δ 2.41 [s, 3H, H–C(7)], 3.21 [m, 2H, H–C(12)], 3.65 [m, 4H, H–C(11) and H–C(8) or H–C(9)], 3.75 [s, 3H, H–C(8) or H–C(9)], 3.92 [d, *J* = 12 Hz, 1H, H–C(10)], 4.16 [d, *J* = 16 Hz, 1H, H–C(10)], 7.48 [d, *J* = 8 Hz, 2H, H–C(3) and H–C(5)], 7.67 [d, *J* = 8 Hz, 2H, H–C(2) and H–C(6)]; ¹³C NMR (100 MHz, 300 K, D₂O): δ 8.72 [C(7)], 19.95 [C(12)], 53.63 [C(8) or C(9)], 57.62 [C(8) or C(9)], 65.70 [C(11)], 72.87 [C(10)], 120.37 [C(2) and C(6)], 130.85 [C(3) and C(5)], 141.44 [C(1) and C(4)]; ToF-MS/MS (ESI⁺): product ion *m/z* 192.1384 (measured), *m/z* 192.1388 (calcd. for [C₁₂H₁₈NO]⁺), fragments: *m/z* 150.1272, 135.1032, 134.0956, 54.0079.

Samples and Sample Preparation. All food samples were purchased from local retailers (Freising, Germany). Chicken and beef meat samples were cut to small pieces and pan-fried (5 min at high heat) in refined rapeseed oil, and potatoes were cooked (15 min) prior to sampling. Further details on the samples are listed in Table S2.

Sample Preparation. The extraction of samples was performed according to Bösl et al.⁸ with minor adaptations. About 0.5 g sample was weighed into bead beater extraction tubes (ceramic balls: ck mix 1.4/2.8 mm; VWR International GmbH, Darmstadt, Germany), and after addition of 1 mL acetonitrile/water (70/30, v/v) and 26 μL of an internal standard (IS) stock solution, containing all IS, the tubes were put in a bead beater homogenizer (Precellys Evolution

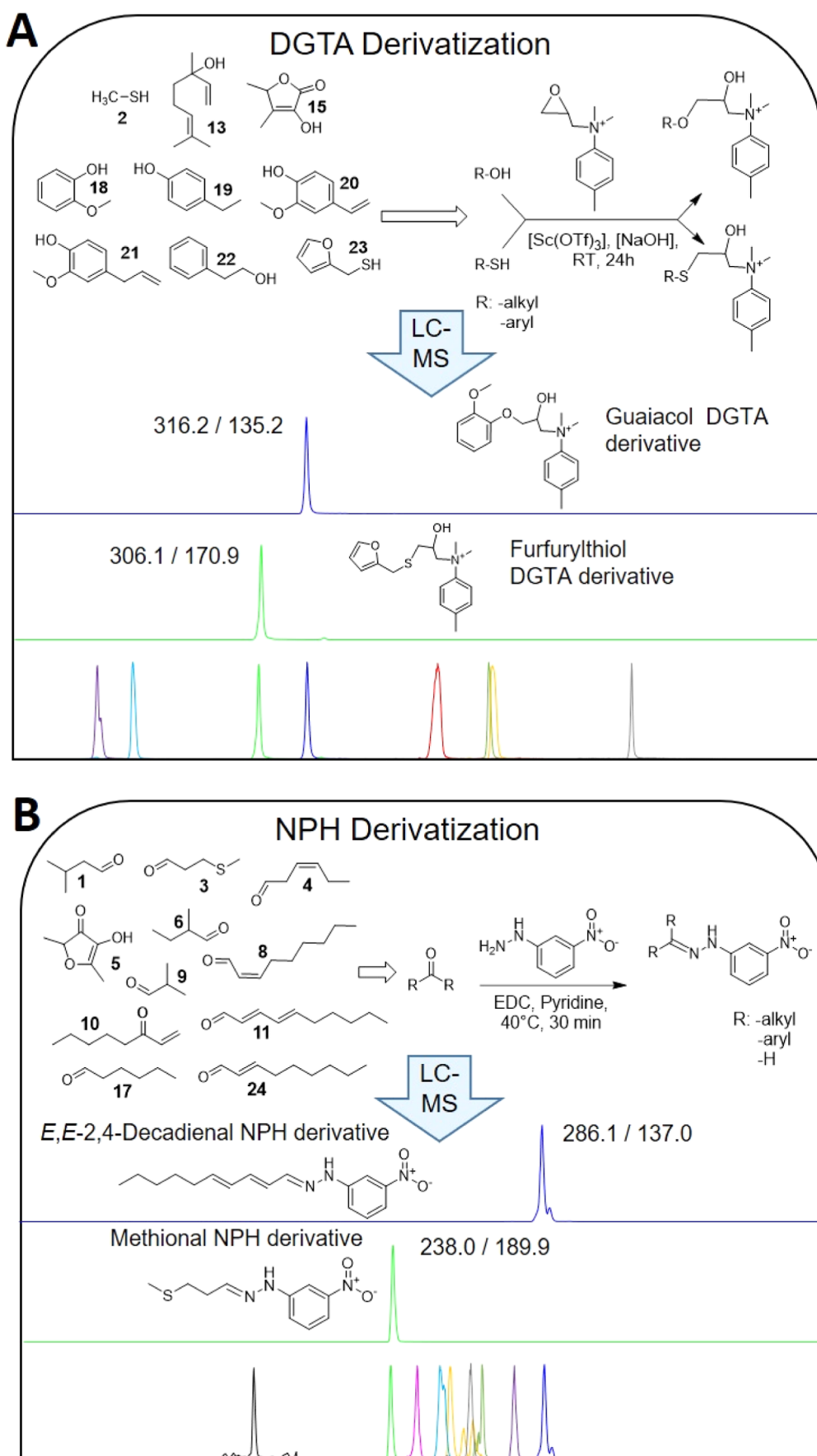


Figure 3. High-throughput analysis of aroma compounds. (A): Alcohols, phenols, and thiols by DGTA derivatization. (B): Aldehydes and ketones by NPH derivatization.

Homogenizer, Bertin Technologies, Montigny Le Bretonneux, France) for homogenization (6800 rpm, 3 times 30 and 20 s breaks in between). After homogenization, the tubes were incubated in a laboratory shaker (300 rpm) at room temperature for 2 h of equilibration. After centrifugation (2 min, 12100 \times g; Eppendorf Minispin Centrifuge; Eppendorf, Hamburg, Germany) and membrane filtration (0.45 μ m; Sartorius AG, Göttingen, Germany), the extracts were set for derivatization. Liquid samples were handled accordingly, without prior homogenization and addition of solvents. Beverage samples (0.5 mL) were spiked with 26 μ L of IS and subsequently membrane-filtered. All samples were analyzed as biological triplicates, and concentrations of IS in the stock solution were as follows: sodium-*d*₃-methanethiolate (362 mg/mL), 3,3,3,4,4,4-*d*₆-methylpropanal (15 mg/mL), 4,4-*d*₂-oct-1-en-3-one (19 mg/mL), 1,2-*d*₂-linalool (1092 mg/mL), 3,4,5,6,7,8-*d*₃-2-phenylethanol (119 mg/mL), *d*₁₂-hexanal (60 mg/mL), 2,3-*d*₂-E-2-nonenal (23 mg/mL), ¹³C₂-furanol (71 mg/mL), 9,9,10,10-*d*₄-E,E-decadienal (52 mg/mL), 3-(*d*₃-methylthio)propanal (1 mg/mL), ¹³C₂-sotolon (600 mg/mL), 9,10-*d*₂-2-methoxy-4-propylphenol (68 mg/mL), 4-vinyl-2-*d*₃-methoxyphenol (6 mg/mL), *d*₃-2-methoxyphenol (13 mg/mL), and 6,6-*d*₂-2-furfurylthiol (7 mg/mL).

Applied Derivatization Procedures. Derivatization by dimethyl-glycidyl-tolyl-ammonium (DGTA): 40 μ L of membrane-filtered sample (-extract), 10 μ L of 20 mmol/L Sc(OTf)₃, 15 μ L of 1 mol/L NaOH, and 40 μ L of a 0.5 mol/L DGTA solution (acetonitrile) were put in a 1.5 mL safe-lock tube and incubated on a laboratory shaker (700 rpm) for 24 h. The resulting solution of derivatized sample extract was diluted 1:1 (v/v) with water prior to LC–MS injection (2 μ L). The analytes are determined by LC–MS as the corresponding DGTA (thio-)ether-derivatives (Figure 3A).

Derivatization by 3-Nitrophenylhydrazine. Membrane-filtered beverage or rather sample extracts were derivatized by NPH as described by Han et al.¹⁷ The sample extract or rather beverage (40 μ L), 20 μ L of 120 mmol/L EDC in acetonitrile/water/pyridine (47:47:6; v/v/v), and 20 μ L of 200 mmol/L NPH hydrochloride in acetonitrile/water (50:50; v/v) were pipetted in a 1.5 mL safe-lock tube. After incubation in a thermo-shaker (40 °C, 700 rpm, 2 h; Thermo-mixer C, Eppendorf), the solution was diluted (1:1) with acetonitrile/water (50:50; v/v) prior to LC–MS injection (2 μ L). If the derivatization was conducted more than 24 h prior to the LC–MS measurement, the samples were stored undiluted at –18 °C. The analytes were determined as the resulting hydrazones (Figure 3B).

Parameters of UHPLC–MS/MS Analysis. For the identification and quantification of the NPH and DGTA derivatized analytes, LC–MS/MS analysis was performed using an Exion LC UHPLC system (Sciex, Darmstadt, Germany) connected to a QTRAP 6500+ mass spectrometer (Sciex) employing electrospray ionization (ESI) in the negative mode (–4500 V) for NPH and in the positive mode (+5500 V) for DGTA derivatives. The UHPLC system consisted of two LC AD pumps, an LC degasser, an LC AC column oven, an LC AD autosampler, and an LC controller. Chromatographic separation was achieved using a C18 column (100 \times 2.1 mm, 100 Å Kinetex 1.7 μ m; Phenomenex, Aschaffenburg, Germany) and 0.1% formic acid in water (solvent A) and 0.1% formic acid in acetonitrile (solvent B) as solvents. A flow rate of 0.4 mL/min was used for the following gradients: NPH derivatives: 0 min 15% B, 1 min, 15% B; 2 min, 35% B; 6 min, 87% B; 7 min, 93% B; 7.2 min, 100% B; 9 min, 100% B, 10 min, 15% B; 12 min, 15% B; DGTA derivatives: 0 min 20% B, 2 min, 20% B; 7 min, 45% B; 8 min, 100% B; 9 min, 100% B; 10 min, 20% B; 12 min, 20% B; a QTRAP 6500+ mass spectrometer was operated in the multiple reaction monitoring (MRM)-scan mode. Zero-grade air served as the nebulizer (55 psi) and as the turbo gas (450 °C) for solvent drying (65 psi) and nitrogen served as a curtain (35 psi) as well as a collision gas (1.5 \times 10^{–5} Torr). The quadrupoles were set at unit resolution. Data acquisition and instrumental control were performed with the Analyst 1.6.3 software (Sciex). All data evaluation was completed with the MultiQuant software (Sciex) as well as the Excel software (Microsoft, Washington, USA).

SIDA Quantitation and Validation of the Method. MS/MS Optimization. To optimize the MS/MS detection for high sensitivity

quantification, standard solutions of all analytes and ISs (concentration: 1–100 mg/L) were derivatized by either NPH or DGTA and syringe-infused at 0.1 mL/min into the MS ion source. Software-assisted ramping of the ion source and ion path parameters was performed to maximize fragment ion abundance.

The identity of the detected compounds in the analyzed food samples was confirmed by comparing the retention times and quantifier and qualifier transitions of the candidate analytes to those of the derivatized reference compounds. Resulting quantifier and qualifier transitions are recorded in Tables S3, S4.

Calibration. For internal standard calibration, a standard stock solution of the isotopically labeled compounds (see above) and for the reference compounds was prepared in acetonitrile/water (70/30, v/v). The exact concentration of each reference compound was verified by qNMR. The concentrations in the standard stock solution were as follows: 3-methylbutanal (**1**; 128.9 mg/L), methanethiol (**2**; 3.0 mg/L), methional (**3**; 0.2 mg/L), Z-3-hexenal (**4**; 7.8 mg/L), furaneol (**5**; 22.6 mg/L), 2-methylpropanal (**9**; 95.0 mg/L), 1-octen-3-one (**10**; 22.1 mg/L), E,E-2,4-decadienal (**11**; 1.4 mg/L), linalool (**13**; 42.6 mg/L), sotolon (**15**; 38.0 mg/L), hexanal (**17**; 23.5 mg/L), guaiacol (**18**; 558.6 mg/L), 4-ethylphenol (**19**; 2.5 mg/L), 4-vinylguaiacol (**20**; 11.0 mg/L), eugenol (**21**; 11.0 mg/L), 2-phenylethanol (**22**; 2.5 mg/L), 2-furfurylthiol (**23**; 0.8 mg/L), E-2-nonenal (**24**; 15.0 mg/L); the resulting standard stock solution was diluted 1:2, 1:4, 1:8, ..., 1:16777216 (25 dilution steps), and 500 μ L each of the resulting dilutions were added to 13 μ L of the IS stock solution mentioned above. Those solutions were each derivatized by NPH and DGTA as described above and were measured as technical duplicates by LC–MS.

Validation Experiments. The absolute limit of detection (LoD) and limit of quantitation (LoQ) of the method were calculated using these measurements and setting the signal-to-noise ratios of the LoD and LoQ \geq 3 and 10, respectively. For the validation of the equilibration time, various foods (chicken, peanut, smoked tofu, coffee, and wheat beer) were analyzed with alternating equilibration times of 30 min, 2 h, and 12 h at room temperature. For the determination of recovery, 0.5 g of potato and peanut and 0.5 mL of coffee beverage were spiked each with 100, 200, and 500 μ L of the standard stock solution (see above) as biological triplicates prior to sample preparation. For the determination of interday precision, the sample workup procedure, derivatization, and LC–MS measurements were performed in a different week.

For the demonstration of the simultaneous analysis of DGTA and NPH derivatized analytes, the reference mix and smoked tofu sample extract (prepared as described above) were derivatized by both methods. The derivatized solutions were mixed 1:1 and then injected into the LC–MS system. The LC method used was the same as for NPH derivatives, and the MS method used was the combined mass transitions from DGTA and NPH methods by employing a polarity switching method (settling time: 50 ms).

q-NMR Spectroscopy. The qNMR spectra were recorded on a 400 MHz AVANCE III spectrometer (Bruker, Rheinstetten, Germany), equipped with a Broadband Observe BBFO plus Probe (Bruker). MeOD-*d*₃ (600 μ L) was used as the solvent, and chemical shifts were reported in ppm relative to the MeOD-*d*₃ solvent residual signal. Data processing was performed using Topspin NMR software ver. 3.2 (Bruker). The q-NMR spectroscopy was performed as reported earlier by Frank et al.;¹⁹ the spectrometer was calibrated with the ERETIC 2 tool using the PULCON methodology.¹⁹

Statistical Analysis. Meta-analysis on Key Food Odorants. The database resulting from the systematic review (meta-analysis) performed by Dunkel et al.⁵ was also employed in this study. The review was conducted by means of SciFinder, using the search terms “aroma analysis” and “flavor analysis”, as well as the German National Library using the terms “aroma” and “flavor”. Following the removal of duplicates and refinement by the search phrase “food” yielded a total of 5642 publications originating primarily from papers in scientific magazines, while the latter process gave 949 hits, primarily from monographs and PhD theses. To reduce the list of publications to be considered for subsequent analysis, the following criteria were

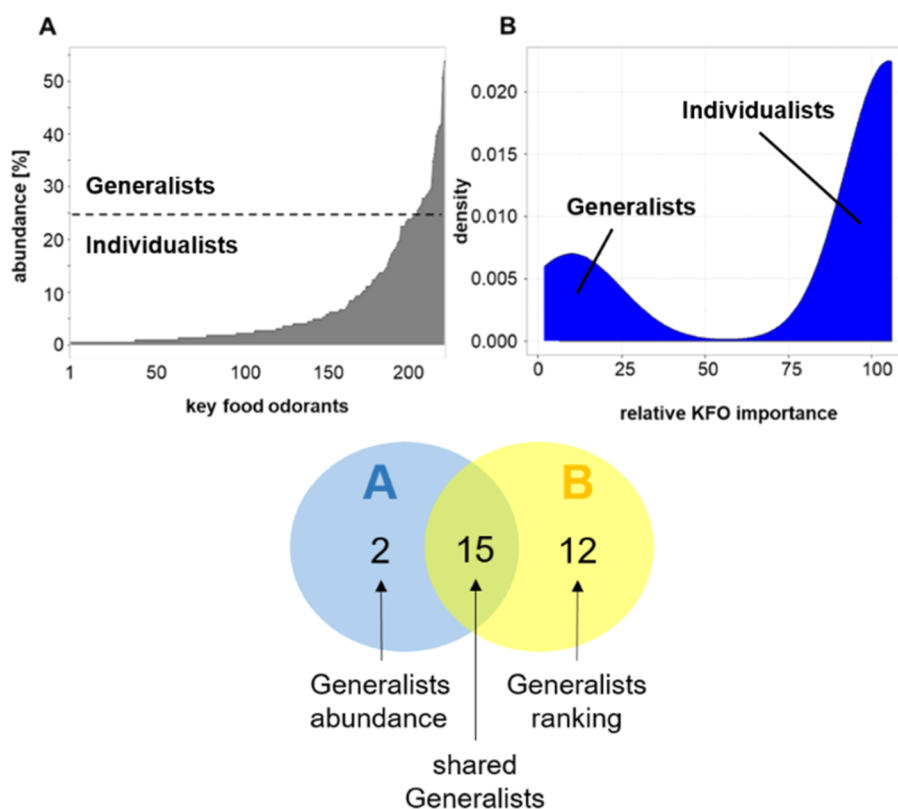


Figure 4. Abundance of the 226 KFOs in the 227 considered food items (A) and relative KFO importance based on abundance and odor activity rank (B). Venn diagram illustrating the intersection of generalists for A and B.

applied: First, a bioactivity-guided identification of odorants by means of GC-O analysis; second, accurate identification of KFOs by comparison of the chromatographic retention time, mass spectrometric results, as well as sensory data with those of reference compounds; and third, accurate quantitation using robust techniques such as SIDA. Using this quality-oriented strategy, a total of 115 publications reporting on the KFOs in 227 food samples were selected and exploited for the database.⁵

Categorization of the KFOs by Ranking. First, the database was conflated, by grouping the foods that were occurring multiple times (e.g., 8 entries of different orange juices) and averaging their individual OAVs. In the next step, a rank order analysis of each KFO in every food group was performed, by assigning rank numbers based on descending OAVs; e.g., the KFO with the highest OAV in each food group was set to rank number 1 and so on. The lists of rank numbers obtained for each KFO across the multiple food groups was summarized to the 90th percentile; e.g., the highest 10% of rank numbers was discarded for each KFO to minimize the impact of outliers. The resulting “relative KFO importance” represents the maximum rank number that was assigned to a KFO when considering 90% of the food groups; e.g., compounds with a low value are found in most foods among the KFOs with the highest OAV values. The distribution of the “relative KFO importance” is visualized in Figure 4B, showing a distinct group of compounds with low rank numbers in most foods (“generalists”). Data analysis was performed using the R statistical programming environment (version 4.1.2).²⁰ Density plot visualization of the distribution of the relative KFO importance was performed using the R package ggplot2.²¹

Quantitative Data Visualization. Quantitative data were analyzed in the R environment (version 4.1.2).²⁰ Before plotting the heatmap (Figure S7), normalization was applied to bring data to the 0 to 1 scale by subtracting the minimum and dividing by the maximum of all measured analytes. Afterward, data was transposed, and the heatmap was generated using the R package ComplexHeatmap.²² Boxplot visualizations for method validation data were generated using the R package ggplot2.²¹

RESULTS AND DISCUSSION

Redefinition of Key Food Odorant Categories.

According to Dunkel et al.,⁵ KFOs represent the subset of volatile compounds in food that was selected by sensory-directed discovery using, e.g., GC-O;²³ unequivocally identified;²⁴ quantified by accurate techniques such as SIDA;¹ and ideally validated using psychophysical recombination experiments. Aimed at the generation of a respective compound database, a comprehensive literature survey from a wide range of food categories, such as cereal and bakery products, meat products, fish and sea food, cocoa and chocolate, dairy products, fats and oil seeds, vegetables, fruits, mushrooms, herbs and spices, alcoholic beverages, tea and coffee, or rather a typical Western diet was conducted.⁵ The aroma compounds present in the examined publications were filtered according to whether they contribute to the aroma ($OAV \geq 1$), resulting in 226 KFOs. These KFOs were then categorized according to their abundance (A) in the food samples. KFOs with the highest abundance ($A > 25\%$), medium abundance ($A 5\text{--}25\%$), and low abundance ($A < 5\%$) were labeled as “generalists” (16 KFOs), “intermediaries” (57 KFOs), and “individualists” (151 KFOs), respectively.

Considering the gradation of KFOs by Dunkel et al.⁵ (Figure 4A), with regard to only the frequency of compounds present in the 227 food samples, but not their OAV in the individual food items, an alternative metric to quantify the KFO importance was developed. First, to mitigate the risk of overestimating the significance of individual compounds due to the different frequencies of occurrence of some food products, an additional step that takes into consideration the averages of the individual OAVs for each food group was executed. The food group of orange juice, for instance, had eight entries in

the initial database (of Dunkel et al.⁵), with a marginal difference in the processing technology or plant variety, while olive oil was present with three samples of different origins. The grouping of the foods resulted in a reduction, which yielded a final number of 69 groups covering all major elements of a Western diet. In the next step, a rank distribution analysis was conducted. KFOs in each food group were assigned rank numbers, while the lowest rank was assigned to the compound with the highest OAV. The multiple rank lists were then converted into one single rank distribution by assigning one value (“relative KFO importance”) to every KFO, employing a statistical analysis. Figure 4B shows the resulting distribution as a density plot with the KFOs positioned along the abscissa. Therefore, compounds on the left represent KFOs that occur in many food groups with a high position on the odor activity rank order. The resulting bimodal distribution indicates again the existence of “generalists” and “individualists”, although this time not only differentiated by a randomly chosen threshold and lacking a larger group of KFOs with intermediate abundance or rather importance. Comparison of both sets of “generalists” revealed a slight increase in the number of “generalists” from 17 to 27, from the (former) abundance to the (new) ranking-based evaluation. However, all “generalists” of the initial approach were still rated very high, leading to two groups mostly overlapping as depicted in the Venn diagram in Figure 4 and shown in detail in Figure S1. Compounds such as methylbutanal (1 and 6), methional (3), acetic acid, or 2,3-butanedione, which are among other things generated during fermentation, stay on a high position among the “generalists”, while aliphatic aldehydes, such as hexanal (17) and *E,E*-2,4-decadienal (11), end up on lower positions in the new ranking system, mostly due to the removal of redundant food items, such as the prior mentioned orange juice or olive oil, in which they play an important role. Compounds, such as methanethiol (2), that have high OAVs in the foods they are found are rated higher by the new ranking method.

In summary, the definition of KFO categories was put on a more solid foundation by additionally considering the OAVs of the compounds. Therefore, the new ranking is based on a relative KFO importance rather than just the abundance.

Analysis of Volatile Alcohols, Phenols, and Thiols by LC–MS. The 27 “generalists” evaluated by ranking, listed in Table 1 and partly depicted in Figure 5, contain 10 compounds, for which LC–MS quantification methods by NPH derivatization were already developed. Hence, these 10 compounds could be excluded from the present study. Therefore, the aim was to develop a quantification method by LC–MS/MS for the remaining 17 “generalists”. Compounds containing carbonyl groups, such as 3-methylbutanal (1) or methional (3), can be derivatized by NPH. However, methanethiol (2), dimethyl sulfide (12), linalool (13), and sotolon (15) do not possess any carbonyl moiety and, hence, need to be derivatized by a different approach. The requirements for the new derivatization approach were for it to be viable in aqueous extracts of different foods. The derivatization methods also needed to modify the analytes, to achieve good separation via reversed-phase UHPLC, as well as high MS/MS sensitivity, by ionizing and fragmenting well. For the analysis of thiols and alcohols, of all literature-known derivatization techniques, the reaction with glycidyl trimethylammonium (GTMA) was found to be the technique that was most adequate for the requirements. GTMA was used to

Table 1. List of “Generalists” by New Ranking Method; Ranked by Relative KFO Importance Based on Abundance and Odor Activity; Sorted from the Highest to the Lowest Rank^a

compound	LC–MS quantitation method in literature
3-methylbutanal (1)	
methanethiol (2)	
methional (3)	
acetaldehyde	a, b
<i>E</i> - β -damascenone	a
3-ethyl 2- and 3-methyl butanoate	a
Z-3-hexenal (4)	
furaneol (5)	
butanedione	b
2-methylbutanal (6)	
Z-1,5-octadien-3-one (7)	
Z-2-nonenal (8)	
2-methylpropanal (9)	
acetic acid	b, c
ethyl-2-methyl propanoate	a
1-octen-3-one (10)	
<i>E,E</i>-2,4-decadienal (11)	
2-acetylpyrroline	d
2- and 3-methylbutanoic acid	c
dimethyl sulfide (12)	
linalool (13)	
<i>E</i>-4,5-epoxy-<i>E</i>-2-decenal (14)	
ethylbutanoate	a
butanoic acid	b, c
sotolon (15)	
<i>E,Z</i>-2,6-nonadienal (16)	
hexanal (17)	

^aLC–MS quantitation methods were developed for their part: a: Hofstetter et al. (2019), b: Utz et al. (2021), c: Han et al. (2015), d: Bösl et al. (2021). The compounds in bold letters were analyzed or trialed in this study.

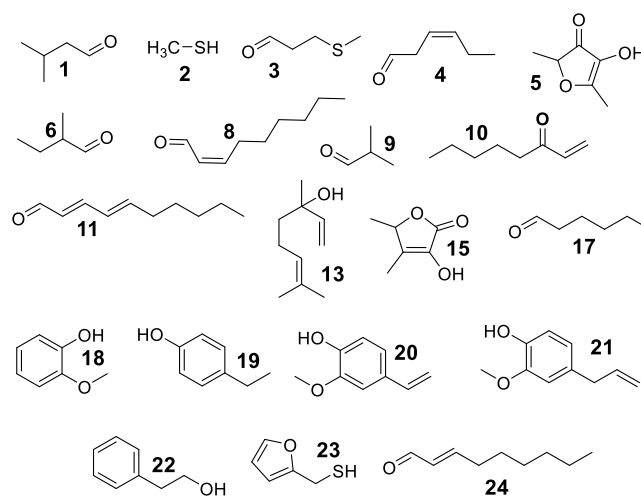


Figure 5. Overview of all analyzed aroma compounds: 3-methylbutanal (1), methanethiol (2), methional (3), *Z*-3-hexenal (4), furaneol (5), 2-methylbutanal (6), *Z*-2-nonenal (8), 2-methylpropanal (9), 1-octen-3-one (10), *E,E*-2,4-decadienal (11), linalool (13), sotolon (15), hexanal (17), guaiacol (18), 4-ethylphenol (19), 4-vinylguaiacol (20), eugenol (21), 2-phenylethanol (22), furfurylthiol (23), and *E*-2-nonenal (24).

derivatize small oligosaccharides for a matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry by Gouw et al.²⁵ and for the quantification of terpenoid alcohols in mint by Peters et al.⁹ However, the GTMA derivatized compounds have strongly increased polarity, impeding the reversed-phase UHPLC. Apolar compounds, such as terpenoids, can still be separated after GTMA derivatization, while smaller and more polar molecules, such as methanethiol or sotolon, cannot. A derivatization agent with the same reactive group (epoxy group bridged to the quaternary nitrogen; see Figure 1, blue color) as GTMA, but less polar, was sought for. Since no such molecule was commercially available, the synthesis of dimethyl-glycidyl-tolyl-ammonium (DGTA) was conducted.

The synthesis of DGTA (Figure 2) could be performed by simply expending low-cost educts. After the reaction of equimolar amounts of epichlorohydrin and *p*-toluidine, the intermediate product was purified chromatographically. After creating the epoxy group under basic conditions and the following methylation, the final product DGTA was obtained.

Subsequently, a protocol for the derivatization of alcohols and thiols in aqueous food extracts and beverages by the synthesized DGTA was developed. The nucleophilic reaction of the alcohol or the thiol moiety with the epoxy group of DGTA could be enhanced by the addition of Lewis acid Sc(OTf)₃ as the catalyst. Sc(OTf)₃, according to Kobayashi and Hachiya,²⁶ is contrary to most Lewis acids stable in aqueous conditions, and hence, it was possible to use it in this approach for the amplification of the electrophilicity of the epoxy group of DGTA. Further, the nucleophilicity of the target compounds was increased by adding sodium hydroxide to deprotonate the alcohol or thiol moieties. Under these conditions, incubation for 24 h at room temperature in a laboratory shaker was used to derivatize the target compounds sufficiently. The developed protocol was then used for the derivatization of the standard substances (“generalists”) without carbonyl groups mentioned earlier (2, 3, 12, and 15). All compounds except 12, which consists of neither a thiol nor an alcohol group, could be derivatized by DGTA. To further show the capabilities of the newly developed derivatization technique, further analytes were added: the phenols guaiacol (18), 4-ethylphenol (19), 4-vinylguaiacol (20), and eugenol (21); the alcohol 2-phenylethanol (22); and the thiol furfurylthiol (23). All compounds except 19 and 22 were separated by MS/MS, and eventually all compounds were successfully separated by reversed-phase LC, using a C18 column and acetonitrile and water as eluents, as shown in Figures 3A and S3.

Analysis of Volatile Carbonyls by LC–MS. The compounds containing a carbonyl group could be derivatized by NPH. The derivatization by NPH was conducted as established by Han et al.,¹⁸ adding NPH and 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) to the food extracts and incubating the mixture at 40 °C for 30 min. All the targeted compounds (1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 14, 16, 17) could be derivatized by NPH. However, the NPH derivative of *Z*-1,5-octadien-3-one (7) was hardly detectable due to poor sensitivity. Alkenones such as *Z*-1,5-octadien-3-one or β -damascenone are believed to be reluctant to couple with the NPH reagent. Hofstetter et al.⁷ analyzed all carbonyls in apple juice by NPH, except the alkenone β -damascenone, which was analyzed unaltered. Additionally, *E*-4,5-epoxy-*E*-2-decenal (14) and 2,4-nonadienal (16) revealed several peaks for the standard substance runs and therefore also showed

poor sensitivity, leading to higher LoQs. Furthermore, *Z*-3-hexenal (4), *Z*-2-nonenal (8), and *E*-2-nonenal (24) standard runs each displayed three peaks, which in this case did not drastically affect sensitivity, but made 8 and 24 chromatographically inseparable (Figure S4). All unsaturated aldehydes except 11, which only indicated a peak shoulder, showed three peaks, for the respective standard runs, displaying a relation of molecule structure and chromatographic separation of the NPH derivatized compounds. The possibility of NPH derivatives leading to more than one peak in LC–MS analysis was also recognized by Han et al.¹⁷ for pyruvic acid; they explained that NPH can bind in the *E* or *Z* configuration to an analyte. Additionally, 3- and 2-methylbutanal (1 and 6) were not separated chromatographically and hence were quantified together. The conjoint quantification of 1 and 6 or rather 8 and 24 in known food products is supposed to be a minor impediment owing to the fact that for many foods, only one of two compounds are expected to be present, or the ratio of the two compounds in the food is known. In summary, for the said reasons, the inseparable 8 and 24 and 6 and 1 were quantified together, but the analysis of 7, 14, and 16 was not further studied in this experiment. However, the authors do not want to exclude that 7, 14, and 16 can also be accurately quantified by this method but with LoQ concentrations clearly higher than the compounds occurring in natural food products. The NPH derivatized analytes were also separated by LC–MS using a C18 column and acetonitrile and water as mobile phases (Figures 3B and S5). As the polarities of the DGTA and NPH derivatized aroma compounds were comparable, it was also possible to analyze both groups in one LC–MS run, by mixing the derivatized extracts prior to injection. A polarity switch method was used to analyze the positive ionized DGTA and negative ionized NPH derivatized compounds in one LC–MS run (Figure S6). The simultaneous determination of NPH and DGTA derivatives by means of a polarity-switch method has the advantage that the two-in-one analysis can save 50% of the measurement time. However, sensitivity is also lost when using this method. Since the NPH derivatives are measured to be negatively ionized and the DGTA derivatives positively ionized during the analysis, the mass spectrometer must switch quickly between positive and negative ionization modes. This switch requires a settling time, which is usually 50–100 ms and is added to the cycling time (time required to analyze all mass transitions). However, the cycling time is already prolonged in this method because more analytes are analyzed at the same time. A cycling time that is too long results in only few measurement points per second being measured for each analyte, leading to inaccurate quantification. To shorten the cycling time, the time spent per measured mass transfer can be reduced, but this has a negative effect on the sensitivity of the method. For these reasons, it was preferred for this study to analyze the groups in two separate LC–MS/MS methods.

High-Throughput Sample Preparation. After the derivatization techniques and LC–MS methods were established, an extraction method that is viable for many different food matrices and high throughput was developed. The extraction method established by Bösl et al.⁸ for the quantitation of 2-acetylazaheterocycles in foods and beverages was found to be feasible. According to this method, only 0.5 g of the sample was put to homogenization in a bead beater with methanol as an extraction fluid. After equilibration, centrifugation, and membrane filtration of the samples, their extracts could be derivatized and analyzed. For beverages, the

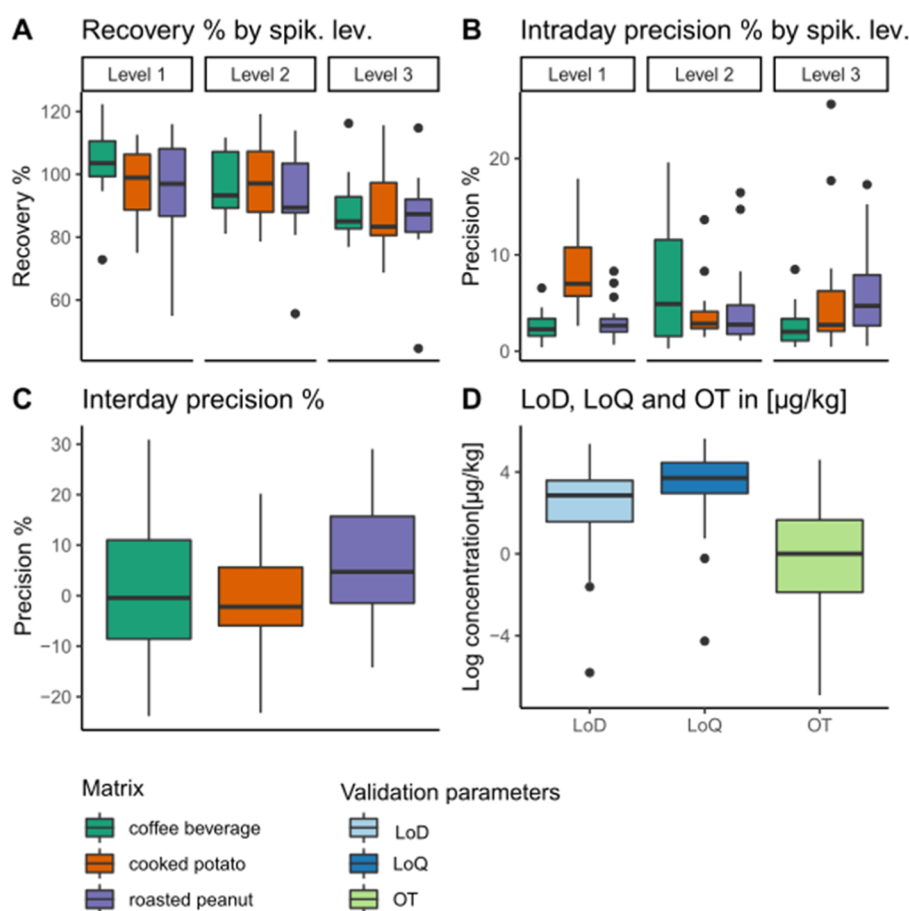


Figure 6. Distribution of validation results for quantification of aroma compounds in different foods; recovery, intraday precision, and interday precision, as well as LoD (limit of detection) and LoQ (limit of quantitation) (determined in the solvent), as compared to OT (odor threshold); data listed in Tables S5 and S7.

homogenization and addition of extraction fluid were omitted. However, instead of methanol, acetonitrile/water (70/30, v/v) was used as the extraction fluid in this study because methanol would react with the derivatization agent DGTA. Additionally, to the extraction fluid, internal standards were added prior to sample workup to enable accurate quantification: sodium- d_3 -methanethiol (for the quantitation of **2**), 3,3,3,4,4,4- d_6 -methylpropanal (**1**, **6**, **9**), d_2 -4-oct-1-en-3-one (**10**), 1,2- d_2 -linalool (**13**), 4,5,6,7,8- d_5 -2-phenylethanol (**22**), d_{12} -hexanal (**4**, **17**), 2,3- d_2 -*E*-2-nonenal (**8**, **24**), $^{13}\text{C}_2$ -furanol (**5**), 9,9,10,10- d_4 -*E,E*-decadienal (**11**), 3-(d_3 -methylthio)propanal (**3**), $^{13}\text{C}_2$ -sotolon (**15**), 9,10- d_2 -2-methoxy-4-propylphenol (**21**), 4-vinyl-2- d_3 -methoxyphenol (**20**), d_3 -2-methoxyphenol (**18**), and 6,6- d_2 -2-furfurylthiol (**23**). The developed extraction, derivatization, and LC–MS/MS approach are high-throughput processes, suitable for many samples that can be efficiently extracted and derivatized at the same time, and LC–MS/MS methods were developed for rapid run times of 12 min. A single person is estimated to be able to analyze and evaluate the data of at least 50 food samples in 1 week.

METHOD VALIDATION

To validate the equilibration time of the sample extraction, different food samples (chicken, peanut, smoked tofu, coffee, and wheat beer) were equilibrated for 0.5, 2, and 12 h (Figure S2). The equilibration must be sufficient, such that the equilibrium of IS and target compounds in the matrix that is

required for accurate SIDA quantitation is reached. Longer equilibration time, on the other hand, can enhance the generation of artifacts during sampling. For example, lipid oxidation products, such as **17** or **24**, can be generated from lipids during the equilibration time. As the detected amounts of some analytes were recognized to be increased from 0.5 to 2 h, not 2 to 12 h of equilibration, 0.5 h was found to be an insufficient amount of time for the generation of equilibrium, and 12 h was rather too long. Hence, 2 h was chosen as the appropriate amount of time. Furthermore, LoDs and LoQs were determined and compared to the organoleptic odor thresholds (OT) of the respective compounds. LoQs for all compounds except **5** (LoQ: 128.9 µg/kg), **10** (LoQ: 217 µg/kg), **15** (LoQ: 44 µg/kg), and **23** (LoQ: 16 µg/kg) were lower than OTs or in the range, exceeding not more than 2 magnitudes (Figure 6 and Table S5). Aroma compounds **5**, **10**, **15**, and **23** have in common that their OTs are very low (OT: 0.04, 0.03, 0.001, and 0.005 µg/kg, respectively),^{27,28} making it hard to meet these thresholds by the high-throughput method without any enrichment step developed in this study. However, for food products with high concentrations of **5** like roasted peanut (1304 µg/kg), of **10** like mushrooms (298 µg/kg), of **15** like lovage (382 µg/kg), or of **23** like coffee (1731 µg/kg) (see Table S6), the LoQs of this method are still practicable. Further, it is to be expected that future generations of LC–MS systems have increased sensitivity, leading to lower LoQs. Recovery rates and interday precision were determined in three different food matrices (Figure 6 and Table S7), to

demonstrate the general applicability of the extraction and LC–MS methods. Cooked potato was chosen as a starch-containing matrix, roasted peanuts as fat and protein containing, and coffee was chosen as an example for a beverage with a complex high molecular weight fraction, which is usually an obstacle to different analysis methods. Recovery rates were found to be in the range of 77–122%, except for **4**, which had rates from 45 to 91%. Because no analogous IS was available, **4** was quantitated with **17-d₁₂**. The assumed higher stability of **17-d₁₂** compared to **4** explains the low recoveries. Interday precision was found to range from –23 to 31%. The highest value of 31% was determined for **20** in coffee presumably due to phenolic interactions of the compound with the high molecular weight fraction of coffee, which was studied by Gigl et al.²⁹ Intraday precision, determined on biological triplicates, did not exceed 20% for any of the spiking levels or food matrices.

Quantitation Results of Analyzed Foods. The 20 analytes (Table S6) that were validated for the quantitation in different matrices were then analyzed in 30 different foods as depicted in the heatmap in Figure S7. Every analyte could be detected in at least one food, and in every food at least one of the analyzed compounds was detected. The quantified aroma compound amounts were coherent with the values specified in the literature. For example, *Z*-3-hexenal (**4**) was quantified in tomatoes at $876 \pm 189 \mu\text{g}/\text{kg}$, which fits well to the amounts of 501–1554 $\mu\text{g}/\text{kg}$ found in tomatoes by Kreissl and Schieberle.³⁰ Further, amounts of the very volatile and hence hard-to-quantify methanethiol (**2**) detected in roasted peanuts ($216 \pm 17 \mu\text{g}/\text{kg}$) were similar to the quantified values by Chetschik et al.³¹ of 113 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Lastly, 4-vinylguaiacol (**20**) was quantified at $5.8 \pm 0.1 \text{ mg}/\text{kg}$ in coffee in this study, which is close to the amounts quantified by Semmelroch and Grosch of up to 5.4 mg/kg **20** in the coffee brew.³²

Advantages of the Method, Obstacles, and Comparison to Current GC Methods. One advantage of the method used here for analyzing aroma compounds by LC–MS/MS with SIDA and preceding derivatization is that compounds with very low volatility as well as non-volatiles can be analyzed. Extreme volatile analytes such as methanethiol or acetaldehyde⁷ can be accurately quantified without additional effort. Determination of acetaldehyde and methanethiol by GC, on the other hand, is difficult, when low discriminatory extraction methods such as SAFE are used. The reason is that for these methods the volatility of the extraction solvent is lower than of the analytes. Which is why SPME methods, for example, with in-fiber derivatization, are used for the determination of very volatile compounds by GC.¹⁰ However, the simultaneous determination of low volatile flavors or rather non-volatile flavors as well as highly volatile compounds causes no additional effort for the new methodology developed in this work.

An advantage of the determination of aroma compounds by LC–MS/MS, in which analytes do not have to be evaporated, is the significantly lower heat load than with GC, in which injector blocks are usually heated to more than 200 °C. This is an improvement with heat-labile analytes, especially those that require intensive heating in GC analysis due to their high boiling point.

Also, the use of SIDA and of an excess of the derivatization agent renders the method robust to influences of major food components, such as proteins, amino acids, sugars, and carotenoids even though they can partly react with the

derivatization agents. Also, as shown by the validation experiments in the work of Bösl et al.,⁸ Maillard reactions during NPH derivatization is not possible due to NPH reacting with the amino acid and sugar precursor molecules.

An obstacle for the newly developed method is the higher detection limits compared to GC–MS methods. Nedele et al.,³³ for example, could show that by direct immersion-stir bar sorptive extraction and following GC–MS quantitation, LoDs for *E,E*-2,4-decadienal (**11**), hexanal (**17**), 4-vinylguaiacol (**20**), and *E*-2-nonenal (**24**) of 0.39, 1.45, 0.01 $\mu\text{g}/\text{kg}$, and 0.25 $\mu\text{g}/\text{L}$, respectively, could be achieved [new method: 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (**11**), 75.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (**17**), 3.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (**20**), and 17.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (**24**)]. However, these problems could potentially be overcome by employing different derivatization agents with better reactivity and ionization rate. In future experiments, other derivatization agents, especially the inefficiently NPH derivatized alkenones and long-chain aldehydes, should be tested. Further chances to decrease LoDs lie in new developments of future LC–MS generations. With respect to GC, it should be noted that although all KFOs are analyzable by GC, different extraction or enrichment methods, detector systems, derivatizations, and separation columns may be required.

The new method is also characterized by its high-throughput capabilities, according to which it is estimated that a single person can process, measure, and analyze up to 50 samples in a week. Additionally, when several people are simultaneously engaged in a project, the low LC–MS measurement times (12 min per run) mean that many times more samples can be measured with just one instrument.

The versatility of the method could be demonstrated by application to a wide variety of foods in a screening. Good validation results were obtained, although the samples studied included starchy and fatty foods such as potatoes or peanuts, but also coffee, which has a complex high molecular weight fraction.

Also, worth mentioning is the wide range of analytes that are already covered with only two derivatizations. Volatile carboxylic acids,¹⁷ aldehydes, ketones, thiols, alcohols, and phenols can be determined by LC–MS/MS. If additional methods are used, for example, the enrichment of esters by SBSE⁷ or the use of an APCI ion source for the analysis of terpenes,⁹ the field of application of the methodology is further extended. In addition, pyrazines can be determined by ESI ionization without derivatization by LC–MS,³⁴ and thiophenes can be measured if they have derivatizable moieties like 2-thiophenemethanethiol. Apart from the exceptions mentioned, such as dimethyl sulfide or *Z*-1,5-octadien-3-one, the majority of KFOs can be analyzed by LC–MS and much of it again using only a C18 column, ESI ionization source, and only two derivatization reagents (NPH and DGTA).

In conclusion, the categorization of KFOs into “generalists” and “individualists” was set on a more solid foundation, by additionally taking OAVs into consideration and ordering the KFOs by importance. Subsequently, a method for the quantification of the said “generalists” with applicability in various foods and beverages with an emphasis on high-throughput suitability was developed. All “generalists”, except dimethyl sulfide, could be derivatized by either NPH or the newly developed DGTA derivatization approach. However, some NPH derivatized compounds were either coupled poorly with the NPH agent or problematic in the chromatographic separation and were therefore excluded. Further experiments to find more reactive or better suitable derivatization agents

can possibly overcome these weaknesses of the method. Finally, it could be shown that 23 of the 27 “generalists” can be quantified by LC–MS/MS in various foods and beverages. Further validation demonstrated recovery rates of 77–122%, excluding one outlier. Interday precision was determined to range from –23 to 31%.

■ ASSOCIATED CONTENT

SI Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.3c00935>.

Comparison of key food odorant categories by abundance or ranking, chromatography, validation, heatmap of quantitation data, sample list, analytical parameters, and validation results (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

Corinna Dawid – Chair of Food Chemistry and Molecular and Sensory Science, Technical University of Munich, Freising 85354, Germany; orcid.org/0000-0001-5342-2600; Phone: +49 8161 71 2901; Email: corinna.dawid@tum.de; Fax: +49 8161 71 2949

Thomas F. Hofmann – Chair of Food Chemistry and Molecular and Sensory Science, Technical University of Munich, Freising 85354, Germany; orcid.org/0000-0003-4057-7165; Email: thomas.hofmann@tum.de

Authors

Markus Bösl – Chair of Food Chemistry and Molecular and Sensory Science, Technical University of Munich, Freising 85354, Germany; orcid.org/0000-0002-5878-1810

Andreas Dunkel – Leibniz-Institute for Food Systems Biology at the Technical University of Munich, Freising 85354, Germany

Daniela Hartl – Chair of Food Chemistry and Molecular and Sensory Science, Technical University of Munich, Freising 85354, Germany

Anja Dollinger – Chair of Food Chemistry and Molecular and Sensory Science, Technical University of Munich, Freising 85354, Germany

Andrea Spaccasassi – Chair of Food Chemistry and Molecular and Sensory Science, Technical University of Munich, Freising 85354, Germany

Timo D. Stark – Chair of Food Chemistry and Molecular and Sensory Science, Technical University of Munich, Freising 85354, Germany; orcid.org/0000-0002-6502-173X

Complete contact information is available at: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.3c00935>

Author Contributions

M.B. developed the presented method, performed practical work, and procured parts of the sample material. In addition, he developed the structure of the paper, designed all Tables and Figures ¹, ², ³, and ⁵ and Figure ⁴ together with A.D. M.B. also wrote the first draft of the manuscript and performed the revision. A.D., C.D., T.S., and T.H. contributed to the conceptualization of the method. T.S. proofread the initial version of the manuscript. A.D. and A.S. performed statistical analyses, and the latter also produced Figures ⁶ and ⁷. A.D. and D.H. performed practical work and procured parts of the sample material.

Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

Many thanks to the Leibniz-Institute for Food Systems Biology at the Technical University of Munich for supplying some of the reference substances and internal standards.

■ REFERENCES

- (1) Grosch, W. Evaluation of the key odorants of foods by dilution experiments, aroma models and omission. *Chem. Senses* **2001**, *26*, 533–545.
- (2) Grosch, W. Determination of potent odourants in foods by aroma extract dilution analysis (AEDA) and calculation of odour activity values (OAVs). *Flavour Fragrance J.* **1994**, *9*, 147–158.
- (3) Schieberle, P.; Hofmann, T. Evaluation of the character impact odorants in fresh strawberry juice by quantitative measurements and sensory studies on model mixtures. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 227–232.
- (4) Rijkens, F. *MH Boelens in Aroma Research*; Centre of Agricultural Publishing and Documentation: Wageningen, 1975; pp 203–222.
- (5) Dunkel, A.; Steinhaus, M.; Kotthoff, M.; Nowak, B.; Krautwurst, D.; Schieberle, P.; Hofmann, T. Nature's Chemical Signatures in Human Olfaction: A foodborne perspective for future biotechnology. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2014**, *53*, 7124–7143.
- (6) Engel, W.; Bahr, W.; Schieberle, P. Solvent assisted flavour evaporation – a new and versatile technique for the careful and direct isolation of aroma compounds from complex food matrices. *Eur. Food Res. Technol.* **1999**, *209*, 237–241.
- (7) Hofstetter, C. K.; Dunkel, A.; Hofmann, T. unified flavor quantitation: toward high-throughput analysis of key food odorants and tastants by means of ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67*, 8599–8608.
- (8) Bösl, M.; Dunkel, A.; Hofmann, T. F. rapid, high-throughput quantitation of odor-active 2-acetyl azaheterocycles in food products by UHPLC–MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* **2021**, *69*, 1405–1412.
- (9) Peters, V. C. T.; Dunkel, A.; Frank, O.; McCormack, B.; Dowd, E.; Didzbalis, J.; Dawid, C.; Hofmann, T. A high throughput toolbox for comprehensive flavor compound mapping in mint. *Food Chem.* **2021**, *365*, 130522.
- (10) Utz, F.; Kreissl, J.; Stark, T. D.; Schmid, C.; Tanger, C.; Kulozik, U.; Hofmann, T.; Dawid, C. Sensomics-assisted flavor decoding of dairy model systems and flavor reconstitution experiments. *J. Agric. Food Chem.* **2021**, *69*, 6588–6600.
- (11) Li, J.-X.; Schieberle, P.; Steinhaus, M. Development of stable isotope dilution assays for the quantitation of the food odorants hydrogen sulphide, methanethiol, ethanethiol, and propane-1-thiol and application to durian (*Durio zibethinus* L.) pulp. *Eur. Food Res. Technol.* **2017**, *243*, 69–79.
- (12) Grimm, J. E.; Steinhaus, M. Characterization of the major odor-active compounds in jackfruit pulp. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67*, 5838–5846.
- (13) Lin, J.; Welti, D. H.; Vera, F. A.; Fay, L. B.; Blank, I. synthesis of deuterated volatile lipid degradation products to be used as internal standards in isotope dilution assays. 2. vinyl ketones. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 2822–2829.
- (14) Steinhaus, M.; Fritsch, H. T.; Schieberle, P. Quantitation of (R)- and (S)-linalool in beer using solid phase microextraction (SPME) in combination with a stable isotope dilution assay (SIDA). *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 7100–7105.
- (15) Yoon, H. J.; Kong, S.-Y.; Park, M.-H.; Cho, Y.; Kim, S.-E.; Shin, J.-Y.; Jung, S.; Farhanullah; Kim, H.-J.; Lee, J. Aminopropyl carbazole

analogues as potent enhancers of neurogenesis. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 7165–7174.

(16) Hopff, H.; Lienhard, P. Zur reaktivität von farbstoffepoxiden. *Helv. Chim. Acta* **1962**, *45*, 1741–1749.

(17) Han, J.; Gagnon, S.; Eckle, T.; Borchers, C. H. Metabolomic analysis of key central carbon metabolism carboxylic acids as their 3-nitrophenylhydrazones by UPLC/ESI-MS. *Electrophoresis* **2013**, *34*, 2891–2900.

(18) Han, J.; Lin, K.; Sequeira, C.; Borchers, C. H. An isotope-labeled chemical derivatization method for the quantitation of short-chain fatty acids in human feces by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **2015**, *854*, 86–94.

(19) Frank, O.; Kreissl, J. K.; Daschner, A.; Hofmann, T. Accurate determination of reference materials and natural isolates by means of quantitative ¹H NMR spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 2506–2515.

(20) R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*; R Foundation for Statistical Computing, 2021. <https://www.R-project.org>.

(21) Wickham, H. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*; Springer-Verlag New York, 2016. <https://ggplot2.tidyverse.org>.

(22) Gu, Z.; Eils, R.; Schlesner, M. Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. *Bioinformatics* **2016**, *32*, 2847–2849.

(23) Kubičková, J.; Grosch, W. Evaluation of potent odorants of camembert cheese by dilution and concentration techniques. *Int. Dairy J.* **1997**, *7*, 65–70.

(24) Molyneux, R. J.; Schieberle, P. Compound identification: a journal of agricultural and food chemistry perspective. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 4625–4629.

(25) Gouw, J. W.; Burgers, P. C.; Trikoupis, M. A.; Terlouw, J. K. Derivatization of small oligosaccharides prior to analysis by matrix-assisted laser desorption/ionization using glycidyltrimethylammonium chloride and Girard's reagent T. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2002**, *16*, 905–912.

(26) Kobayashi, S.; Hachiya, I. Lanthanide triflates as water-tolerant lewis acids. activation of commercial formaldehyde solution and use in the aldol reaction of silyl enol ethers with aldehydes in aqueous media. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 3590–3596.

(27) Dijkstra, F. Y.; Wikén, T. O. Studies on mushroom flavours. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1976**, *160*, 255–262.

(28) Leffingwell, J. C.; Leffingwell, D. GRAS Flavor chemicals—detection thresholds. *Perfum. Flavor.* **1991**, *16*, 1–13.

(29) Gigl, M.; Hofmann, T.; Frank, O. NMR-based studies on odorant–melanoidin interactions in coffee beverages. *J. Agric. Food Chem.* **2021**, *69*, 15334–15344.

(30) Kreissl, J.; Schieberle, P. Characterization of aroma-active compounds in italian tomatoes with emphasis on new odorants. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 5198–5208.

(31) Chetschik, I.; Granvogl, M.; Schieberle, P. Quantitation of key peanut aroma compounds in raw peanuts and pan-roasted peanut meal. aroma reconstitution and comparison with commercial peanut products. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 11018–11026.

(32) Semmelroch, P.; Grosch, W. Studies on character impact odorants of coffee brews. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 537–543.

(33) Nedele, A.-K.; Mayer, N.; Feller, N.; Hinrichs, J.; Zhang, Y. Off-flavor in soy drink: Development, optimization, and validation of an easy and fast method to quantify the key odorants. *Talanta* **2021**, *229*, 122251.

(34) Yan, Y.; Chen, S.; He, Y.; Nie, Y.; Xu, Y. Quantitation of pyrazines in Baijiu and during production process by a rapid and sensitive direct injection UPLC-MS/MS approach. *Lebensm.-Wiss. Technol.* **2020**, *128*, 109371.

Toward High-Throughput Analysis of Aroma Compounds Using Ultra-High-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry: Screening of key food odorants in Various Foods

Markus Bösl^a, Andreas Dunkel^b, Daniela Hartl^a, Anja Dollinger^a, Andrea

Spaccasassi^a, Timo D. Stark^a, Corinna Dawid^{*a} and Thomas F. Hofmann^a

^aChair of Food Chemistry and Molecular and Sensory Science, Technical University of Munich, Lise-Meitner-Str. 34, 85354 Freising, Germany and

^bLeibniz-Institute for Food Systems Biology at the Technical University of Munich, Lise-Meitner-Str. 34, 85354 Freising, Germany).

Database for key food odorant ranking:

The initial database published in Dunkel et al. (2014) was reused for data analysis, the complete data is also available at <https://fsbi-db.de/>.

Additional figures:

Generalists

A: abundance

methanethiol
dimethylsulfide
Z-2-nonenal
E,Z-2,6-nonadienal
Z-1,5-octadien-3-one
ethyl-2-methyl propanoate
E-4,5-epoxy-*E*-2-decenal
Z-3-hexenal
2-methylpropanal
β-damascenone
ethyl butanoate
linalool
butanoic acid
3- and 2-methylbutanoic acid
2-acetylpyrroline *
vanillin
E-2-nonenal
ethyl- 2- and 3-methyl butanoate
acetaldehyde
acetic acid
2-methylbutanal
1-octen-3-one
sotolon
hexanal
furanol
E,E-2,4-decadienal
2,3-butanedione
3-methylbutanal
methional

B: ranking

vanillin
E-2-nonenal
hexanal
E,Z-2,6-nonadienal
sotolon
butanoic acid
ethyl butanoate
E-4,5-epoxy-*E*-2-decenal
linalool
dimethylsulfide
3- and 2-methylbutanoic acid
2-acetylpyrroline
E-2,4-decadienal
1-octen-3-one
ethyl-2-methyl propanoate
acetic acid
2-methylpropanal
Z-2-nonenal
Z-1,5-octadien-3-one
2-methylbutanal
2,3-butanedione
furanol
Z-3-hexenal
ethyl- 2- and 3- methyl butanoate
β-damascenone
acetaldehyde
methional
methanethiol
3-methylbutanal

Figure S1. Comparison of KFO importance estimates; On the left side (A) the key food odorants are ordered by abundance and on the right side (B) by ranking evaluation. Generalists according to the individual methods are highlighted in green;

Figure S1 shows the metrics of abundance (A) to the ranking-based evaluation (B) by sorting compounds with decreasing relevance for the overall KFO composition from bottom to top, followed by connecting the individual odorants. The red lines indicate compounds moving up and the black lines indicate compounds moving down from list A to B. Many key compounds such as methyl butanal (**1** and **6**), methional (**3**), acetic acid, or 2,3-butanedione change their position only by a negligible amount, while other generalists belonging to the group of aliphatic aldehydes were found to be significantly less important for flavor objects after scoring by the ranking method. This is mainly the result of the removal of redundant food items, such as the repeatedly present groups of orange juice, meat, and fish samples, which contain aldehydes *E,E*-2,4-decadienal (**11**), hexanal (**17**), and *E*-2-nonenal (**24**) well above their respective recognition thresholds.¹ On the other hand, *Z*-3-hexenal (**4**), *E*- β -damascenone and dimethyl sulfide, which were not among generalists based on the simple compound abundance, can be found on a higher rank. The biggest change between the abundance and the ranking method was observed for methanethiol, which, despite its average orthonasal odor threshold of 0.59 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in water,² achieves high OAVs in many food groups, such as in Gruyere cheese,³ roasted peanuts,⁴ chicken meat,⁵ durian,⁶ parsley⁷ and boiled fish⁸.

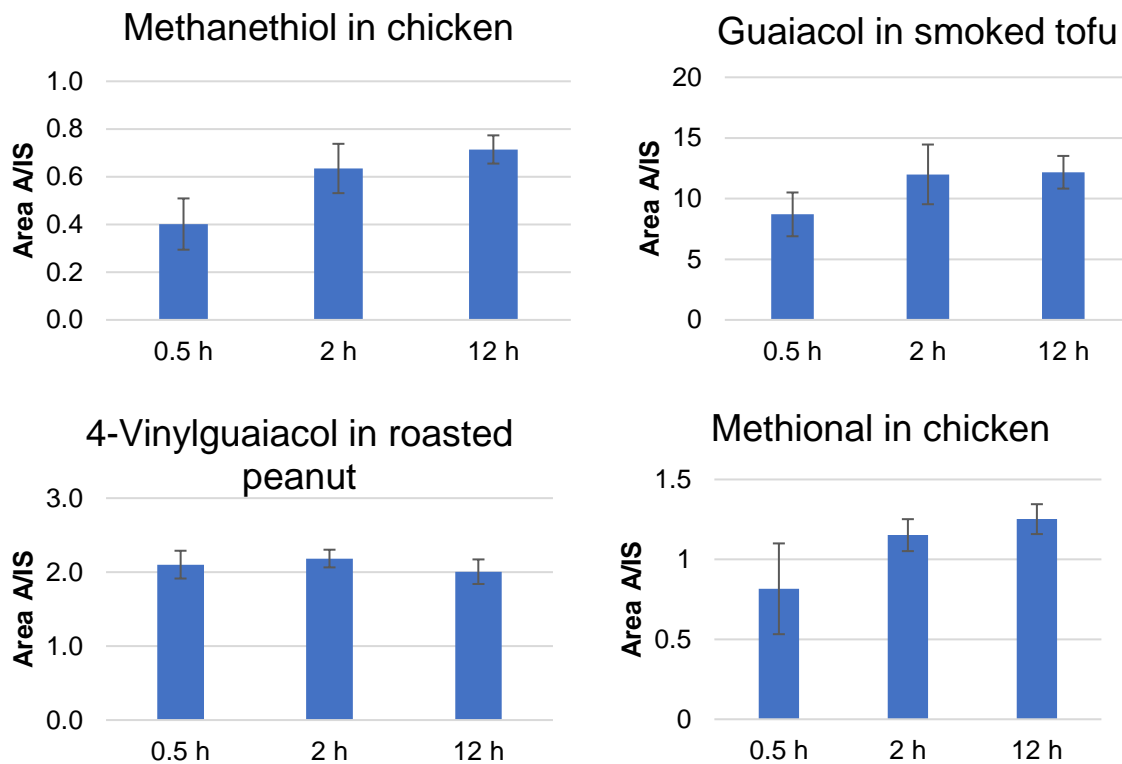


Figure S2. For the validation of the equilibration time, various foods were equilibrated for different times (biological triplicates). For methanethiol, guaiacol, and methional, the determined amounts for 0.5 h of equilibration were lower in some food products, indicating insufficient equilibration of internal standards in the matrix. While e.g., for 4-vinyl guaiacol in peanut 0.5 h seemed sufficient. Error bars indicate standard deviation.

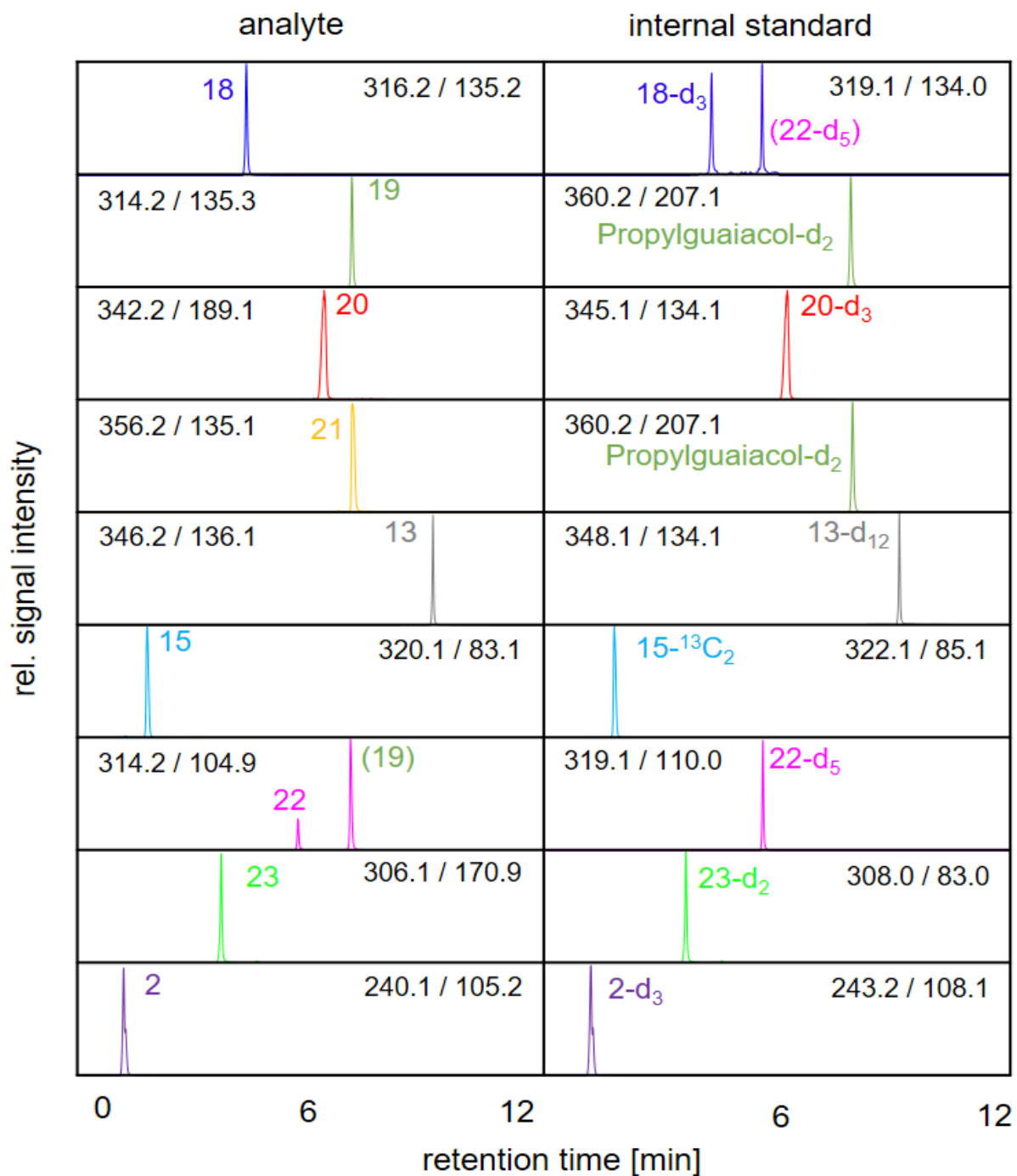


Figure S3. Quantifier mass transitions of dimethyl-glycidyl-tolyl-ammonium (DGTA) derivatized compounds in a standard run.

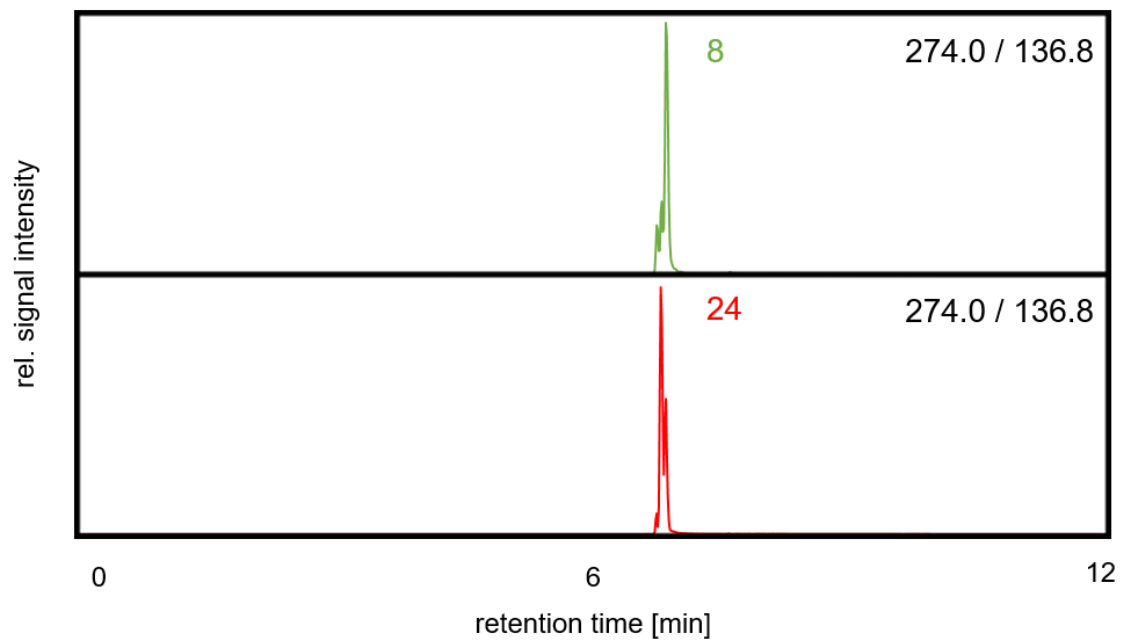


Figure S4. *Z*-2-nonenal (**8**) and *E*-2-nonenal (**24**) standard runs in direct comparison.



Figure S5. Quantifier transitions of 3-nitrophenylhydrazine (NPH) derivatized compounds in a standard run.

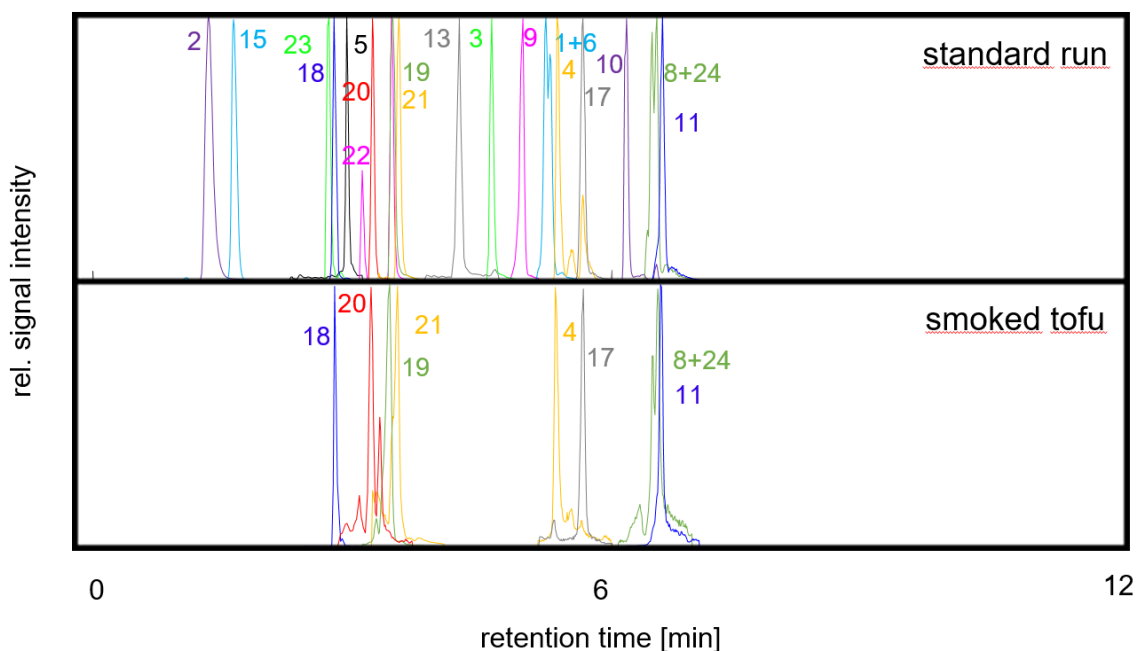


Figure S6. NPH and DGTA derivatized compounds analyzed in one run using a polarity switching method for a standard run and smoked tofu sample.

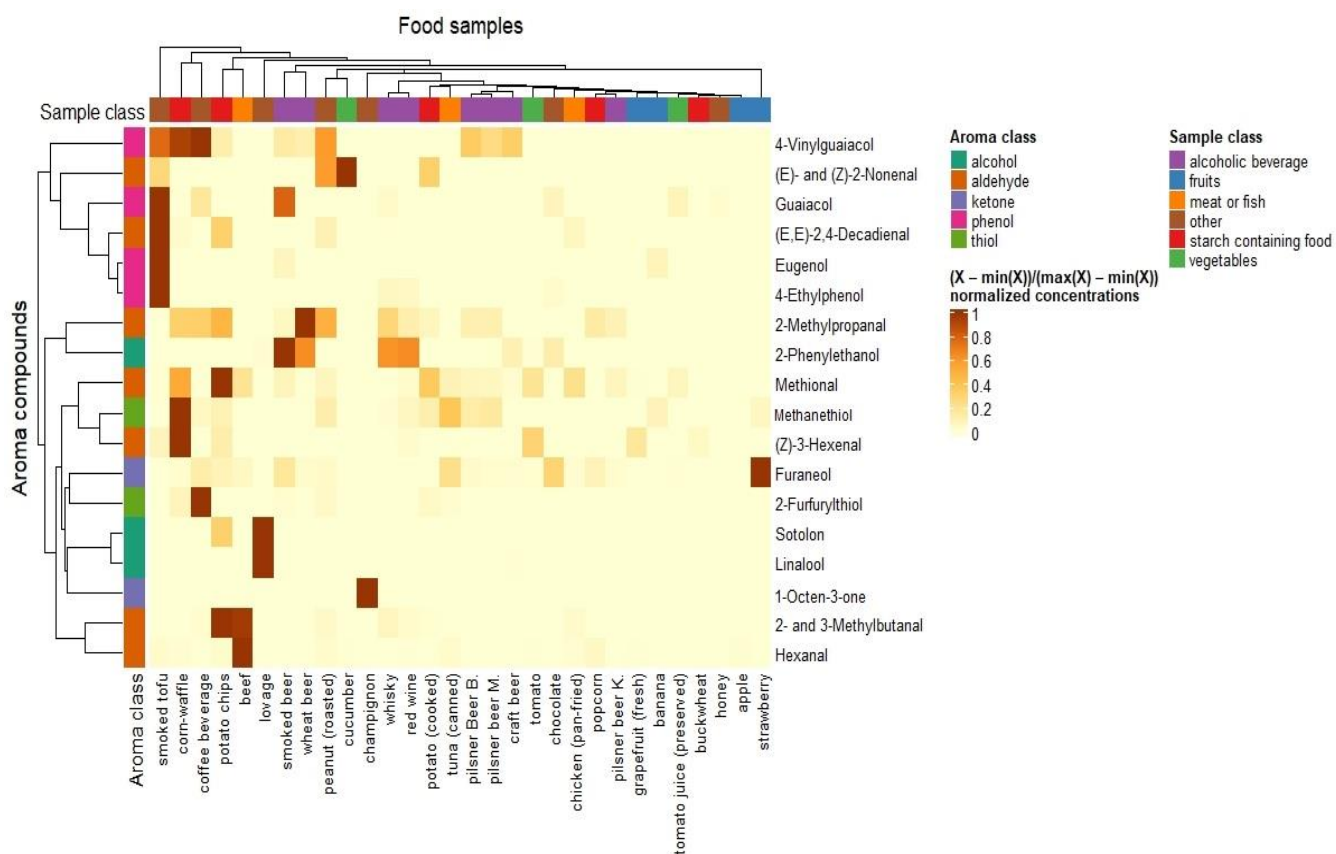


Figure S7. Heat map of the quantification data of 30 foods; data listed in Table S3.

Additional Tables:**Table S1.** IUPAC names of compounds, that were referred to with trivial names

	IUPAC name
methional (3)	3-(Methylsulfanyl)propanal
<i>Z</i> -3-hexenal (4)	(3 <i>Z</i>)-Hex-3-enal
furaneol (5)	4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3-furanone
linalool (13)	3,7-Dimethylocta-1,6-dien-3-ol
sotolon (15)	3-Hydroxy-4,5-dimethylfuran-2(5H)-one
guaiacol (18)	2-Methoxyphenol
4-vinylguaiacol (20)	4-Ethenyl-2-methoxyphenol
eugenol (21)	2-Methoxy-4-(prop-2-en-1-yl)phenol
furfurylthiol (23)	(Furan-2-yl)methanethiol
dimethyl-glycidyl-tolyl-ammonium (DGTA)	<i>N,N</i> ,4-trimethyl- <i>N</i> -(oxiran-2-ylmethyl)benzenaminium (iodide)

Table S2. Food samples used for quantitation and validation

food	food category	“product name – brand, manufacturer or vendor” / preparation	Country of origin
potato (cooked)	starch containing food	“mostly hard-boiling potatoes - Edeka” cooked in boiling salt water for 15 min. Peeled	Germany
peanut (roasted, unsalted)	other	“Geröstete Erdnüsse – Edeka”	USA
coffee beverage	other	Colombian coffee beans (100% <i>arabica</i>) prepared in fully automatic coffee machine	Colombia
corn-waffle	starch containing food	“Maiswaffeln mit Meersalz – Bio-Zentrale“	unknown
tuna (canned)	meat or fish	“Thunfisch in eigenem Saft – Armada“	Taiwan
smoked beer	alcoholic beverage	“Aecht Schlenkerla Rauchbier – Schlenkerla Brauerei“	Germany
banana	fruits	“Edeka Gut & Günstig” fresh fruits	Colombia
whisky	alcoholic beverage	“16 years old single highland malt scotch whiskey – Clynelish”	United Kingdom
red wine	alcoholic beverage	“Primitivo Puglia 2018 – Avogadri Luigi”	Italy
champignon	other	“Pilzland Vertriebs GmbH” raw, fresh brown champignons (<i>Agaricus bisporus</i>)	Germany
strawberry	fruits	“Edeka” fresh organic strawberries	Germany
potato chips	starch containing food	“Crunchips salted – Lorenz”	Germany
pilsner beer M.	alcoholic beverage	“Mönchshof original Pils – Mönchshof”	Germany
pilsner Beer B.	alcoholic beverage	“Bitburger premium Pils – Bitburger”	Germany
craft beer	alcoholic beverage	“Sommertraum – Dampfbierbrauerei Zwiesel”	Germany
lovage	other	fresh, whole lovage from garden	Germany
smoked tofu	other	“Räuchertofu – Edeka Bio”	Germany
chocolate	other	“Zartbitterschokolade 81% - Edeka” (Swiss bittersweet chocolate with 81% cocoa)	Switzerland
wheat beer	alcoholic beverage	“Erdinger Weißbier – Erdinger”	Germany
tomato	vegetables	“Rispen tomate – Edeka” / fresh unpeeled vine tomatoes	Germany
tomato juice (preserved)	vegetables	“Tomaten Direktsaft – DM Bio” / Tomato direct juice	Germany
honey	other	“Wildblütenhonig – Langnese” / wildflower honey	Mixed; bottled in Germany
chicken breast (pan-fried)	meat or fish	“Edeka” / cut to small pieces and pan-fried (5 min at high heat, about 200 °C)	Germany
popcorn	starch containing food	“popcorn sweet – Snackline” / sweet popcorn ready from shelf	Germany
pilsner beer K.	alcoholic beverage	“Königspilsner – Königspilsener”	Germany
beef	meat or fish	“Edeka” / a steak cut to small pieces and pan-fried (5 min at high heat, about 200 °C)	Germany
buckwheat	starch containing food	“Bio Buchweizen – DM” – organic, untreated buckwheat	Germany
grapefruit (fresh)	fruits	“Edeka”	USA
cucumber	vegetables	“Edeka”	Germany
apple	fruits	“Edeka”	Germany

Table S3. Mass transitions and retention time of NPH derivatized compounds.

Analyt	[M + H] ⁺	Q1 (<i>m/z</i>)	Q3 (<i>m/z</i>)	DP [V]	CE [V]	CXP [V]	RT [min]
3 and 2-Methylbutanal-NPH (1 and 6)	Quantifier	220.1	137.0	-100	-24	-19	4.6
	Qualifier		177.0	-100	-22	-21	
Methional-NPH (3)	Quantifier	238.0	189.9	-55	-16	-27	5.0
	Qualifier		47.0	-55	-54	-21	
Methional-d ₃ -NPH	Quantifier	241.0	189.9	-55	-16	-27	5.0
	Qualifier		46.0	-55	-54	-21	
Z-3-Hexenal-NPH (4)	Quantifier	232.0	136.9	-65	-24	-13	5.7
	Qualifier		46.0	-65	-60	-21	
Furaneol-NPH (5)	Quantifier	262.1	177.0	-55	-24	-19	3.2
	Qualifier		45.9	-55	-58	-21	
Furaneol- ¹³ C ₂ -NPH	Quantifier	264.1	177.0	-55	-24	-19	3.2
	Qualifier		45.9	-55	-58	-21	
Z and E-2-Nonenal-NPH (8 and 24)	Quantifier	274.1	136.8	-125	-22	-23	6.9
	Qualifier		45.9	-125	-84	-9	
E-2-Nonenal d ₂ -NPH	Quantifier	275.9	136.9	-100	-26	-15	6.9
	Qualifier		45.9	-100	-86	-21	
2-Methylpropanal-NPH (9)	Quantifier	206.0	137.0	-70	-22	-15	5.3
	Qualifier		155.0	-70	-18	-17	
2-Methylpropanal-d ₆ -NPH	Quantifier	212.0	137.0	-70	-22	-15	5.3
	Qualifier		155.0	-70	-18	-17	
1-Octen-3-one-NPH (10)	Quantifier	260.1	144.9	-85	-24	-9	6.5
	Qualifier		161.0	-85	-24	-15	
1-Octen-3-one-d ₄ -NPH	Quantifier	264.0	144.9	-85	-24	-17	6.5
	Qualifier		161.0	-85	-24	-13	
E,E-2,4-Decadienal-NPH (11)	Quantifier	286.1	137.0	-110	-28	-21	6.4
	Qualifier		46.0	-110	-74	-21	
E,E-2,4-Decadienal-d ₄ -NPH	Quantifier	290.0	136.9	-95	-28	-15	6.4
	Qualifier		46.1	-95	-82	-3	
Hexanal-NPH (17)	Quantifier	234.0	136.8	-100	-22	-53	5.9
	Qualifier	234.1	177.2	-100	-22	-11	
Hexanal-d ₁₂ -NPH	Quantifier	246.0	138.1	-100	-28	-15	5.9
	Qualifier		46	-100	-70	-1	
E,Z-2,6-Nonadienal-NPH	Quantifier	272.0	202.8	-50	-18	-25	6.3
	Qualifier		176.8	-50	-20	-19	
E-4,5-Epoxy-E-2-decenal-NPH	Quantifier	302.1	113.0	-150	-20	-19	6.0
	Qualifier		137.0	-150	-26	-7	
Z-1,5-Octadien-3-one-NPH	Quantifier	257.9	136.8	-55	-28	-19	6.3
	Qualifier		45.8	-55	-70	-13	

Table S4. Mass transitions and retention time of DGTA derivatized compounds.

Analyt	[M + H] ⁺	Q1 (<i>m/z</i>)	Q3 (<i>m/z</i>)	DP [V]	CE [V]	CXP [V]	RT [min]
Sotolon-DGTA (15)	Quantifier	320.14	83.1	71	29	10	1.8
	Qualifier						
Sotolon ¹³ C ₂ -DGTA	Quantifier	322.14	85.1	71	29	10	1.8
	Qualifier						
Methanethiol-DGTA (2)	Quantifier	240.12	105.2	41	21	6	1.2
	Qualifier		134.2	41	47	14	
Methanethiol-d ₃ -DGTA	Quantifier	243.22	108.1	1	21	12	1.2
	Qualifier		134.0	1	49	22	
Linalool-DGTA (13)	Quantifier	346.24	136.1	1	31	16	8.3
	Qualifier		135.1	1	43	14	
Linalool-d ₂ -DGTA	Quantifier	348.11	134.1	31	69	16	8.3
	Qualifier		135.0	31	41	14	
Eugenol-DGTA (21)	Quantifier	356.16	135.1	31	37	2	6.7
	Qualifier		134.2	31	71	8	
4-Propylguaiacol d ₂ -DGTA	Quantifier	348.11	134.1	31	69	16	7.4
	Qualifier		135.0	31	41	14	
4-Vinylguaiacol-DGTA (20)	Quantifier	342.20	189.1	41	27	22	6.0
	Qualifier		135.1	41	35	16	
4-Vinylguaiacol-d ₃ -DGTA	Quantifier	345.07	134.1	31	69	16	6.0
	Qualifier		135.0	31	41	14	
4-Ethylphenol-DGTA (19)	Quantifier	314.16	135.3	11	33	4	6.6
	Qualifier		134.0	11	69	6	
2-Phenylethanol-DGTA (22)	Quantifier	314.17	104.9	1	31	14	5.4
	Qualifier		134.9	1	39	44	
2-Phenylethanol-d ₅ -DGTA	Quantifier	319.14	135.0	6	35	16	5.4
	Qualifier	319.12	110.0	6	31	14	
Guaiacol-DGTA (18)	Quantifier	316.17	135.2	1	35	8	4.3
	Qualifier		134.1	1	57	16	
Guaiacol-d ₃ -DGTA	Quantifier	319.14	134.0	6	65	16	4.3
	Qualifier	319.12	110.0	6	31	14	
Furfurylthiol-DGTA (23)	Quantifier	305.93	81.0	1	25	4	3.5
	Qualifier	306.11	170.9	1	23	20	
2-Furfurylthiol-d ₂ -DGTA	Quantifier	307.99	83.0	10	25	4	3.5
	Qualifier		172.9	10	23	20	

Table S5. Limit of quantitation (LoQ) and limit of detection (LoD) determined in validation experiments and odor thresholds (OT) in µg/kg in water with respective literature.

	LoQ [µg/kg]	LoD [µg/kg]	Odor Threshold [µg/kg]
3-Methylbutanal (1)	84.8	10.6	2.0 ⁹
Methanethiol (2)	0.014	0.003	0.59 ²
Methional (3)	0.8	0.2	0.2 ¹⁰
(Z)-3-Hexenal (4)	21.2	10.5	0.3 ¹¹
Furaneol (5)	128.9	32.2	0.04 ¹²
2-Methylbutanal (6)	84.8	10.6	13.0 ⁹
(Z)-2-Nonenal (8)	34.9	17.5	4.5 ¹³
2-Methylpropanal (9)	94.2	94.2	1.0 ¹⁴
1-Octen-3-one (10)	216.6	216.6	0.030 ¹⁵
(E,E)-2,4-Decadienal (11)	2.1	0.3	0.1 ¹⁰
Linalool (13)	282.3	141.1	6.0 ¹⁰
Sotolon (15)	44.4	22.2	0.001 ¹⁰
Hexanal (17)	150.7	75.4	23.0 ⁹
Guaiacol (18)	51.8	51.8	1.0 ¹⁶
4-Ethylphenol (19)	20.6	5.2	21.0 ¹⁶
4-Vinylguaiacol (20)	15.0	3.8	5.0 ¹⁶
Eugenol (21)	47.4	23.7	100.0 ¹⁶
2-Phenylethanol (22)	37.7	18.8	0.4 ¹⁶
Furfurylthiol (23)	16.0	2.0	0.005 ¹⁰
(E)-2-Nonenal (24)	34.9	17.5	1.0 ¹⁶

Table S6. Quantitation data of 32 foods in µg/L or µg/kg respectively.

	2- and 3-Methylbutanal (1 and 6)	Methanethiol (2)	Methional (3)	Z-3-Hexenal (4)	Furaneol (5)
Potato (cooked)	141.4 ± 22.5	200.4 ± 33.2	281.4 ± 27.5		
Peanut (roasted)	585.7 ± 63.6	216.4 ± 16.9	50.2 ± 4.8		1304 ± 104.5
Coffee	277.6 ± 1	93 ± 1.7			4259 ± 2.8
Corn-waffle		1775.5 ± 89.7	420.7 ± 178.8	2911.5 ± 709.3	701 ± 69.1
Tuna (canned)		673.7 ± 41.3	71.5 ± 3.1		7432.5 ± 1257.3
Smoked beer			60.8 ± 5.2		5760.3 ± 150.2
Banana		145.3 ± 29.3			
Whisky	931.7 ± 88.9	28.2 ± 2.7			
Red wine	372.7 ± 67.8	95.7 ± 27.4	21.2 ± 0.1	81.9 ± 10.9	
Champignon					
Strawberry		97.5 ± 29.4			34051.5 ± 8620.6
Potato chips	14655.4 ± 928.2	163.8 ± 51.4	796.6 ± 36	358 ± 30.5	2856.6 ± 151.5
Pilsner beer (Mönchshof)		278.7 ± 7.3	48.2 ± 13.7		667.7 ± 10.1
Pilsner Beer (Bitburger)		231.2 ± 3.1	50.1 ± 18		1128.6 ± 17.9
Craftbeer			12.3 ± 5.3		545.6 ± 5
Lovage					
Smoked tofu			7.6 ± 0.7	219.1 ± 61.1	
Chocolate					9981.6 ± 460.1
Wheat beer					784.9 ± 16.3
Tomato			146.7 ± 10.4	876.5 ± 189.8	327.8 ± 47
Tomato juice (preserved)			52.9 ± 23.5		192.8 ± 48.7
Honey					
Chicken (pan-fried)	489.9 ± 145.1		172 ± 5.4		515.8 ± 87
Popcorn (sweet)					2922.7 ± 1153.1
Pilsner beer (Königspilsener)			50.1 ± 5.4		746.4 ± 10.3
Beef	14141.8 ± 3999.5		151.4 ± 28.3		1780.3 ± 188.6
Buckwheat			0.8 ± 0.1	122.5 ± 4.8	
Grapefruit (fresh)			6.3 ± 0.5	499.6 ± 122.5	
Cucumber					
Apple					

Table S6 continued

	(Z)- and (E)-2-Nonenal (8 and 24)	2-Methylpropanal (9)	1-octen-3-one (10)	(E,E)-2,4-Decadienal (11)
Potato (cooked)	47.8 ± 0.4	222.2 ± 20.9		2.2 ± 0.2
Peanut (roasted)	88.4 ± 2.8	1700.8 ± 400.5		524.7 ± 70.9
Coffee		1119 ± 33.4		2.6 ± 0.6
Corn-waffle		1101.1 ± 361.6		161.4 ± 51.8
Tuna (canned)				
Smoked beer		182.3 ± 10.6		
Banana				
Whisky		961.1 ± 252		11.2 ± 2.8
Red wine		391 ± 61.5		5 ± 0.8
Champignon			297.8 ± 55.5	
Strawberry				
Potato chips		1615.7 ± 84.5		1721.6 ± 95.5
Pilsner beer (Mönchshof)		364.8 ± 40.8		
Pilsner Beer (Bitburger)		362.7 ± 52.4		
Craftbeer				
Lovage				
Smoked tofu	41.3 ± 8.8			5471.1 ± 436.7
Chocolate				
Wheat beer		3455.1 ± 543.2		
Tomato				
Tomato juice (preserved)				
Honey				
Chicken (pan-fried)				327.3 ± 64.3
Popcorn (sweet)		493.9 ± 98.9		
Pilsner beer (Königspilsener)		306.7 ± 38.9		
Beef				
Buckwheat				
Grapefruit (fresh)				
Cucumber	152.0 ± 2.5			
Apple				

Table S6 continued

	Linalool (13)	Sotolon (15)	Hexanal (17)	Guaiacol (18)
Potato (cooked)				
Peanut (roasted)			1244 ± 46.3	
Coffee				764.8 ± 10.8
Corn-waffle			491 ± 69.5	
Tuna (canned)			1209.2 ± 513.5	
Smoked beer				3519.9 ± 49.6
Banana				
Whisky				171.2 ± 12.6
Red wine			278.3 ± 62	
Champignon				
Strawberry				
Potato chips		120 ± 32.3	1081 ± 57.5	
Pilsner beer (Mönchshof)				
Pilsner Beer (Bitburger)				
Craftbeer	393.2 ± 3.1			
Lovage	55094.4 ± 12809.3	382.1 ± 21.4		
Smoked tofu			1270.1 ± 162.7	4491.1 ± 563.8
Chocolate				321.4 ± 16.9
Wheat beer				
Tomato			302.3 ± 84.1	
Tomato juice (preserved)				355.4 ± 41.3
Honey				97.8 ± 8
Chicken (pan-fried)			556.5 ± 61.5	
Popcorn (sweet)			2065.6 ± 346.7	
Pilsner beer (Königspilsener)				
Beef			44066.6 ± 12352.9	
Buckwheat				
Grapefruit (fresh)			166.9 ± 21.4	
Cucumber			405.8 ± 78.2	
Apple			836.6 ± 219.3	

Table S6 continued

	4-Ethylphenol (19)	4-Vinylguaiacol (20)	Eugenol (21)	2-Phenylethanol (22)	2-Furfurylthiol (23)
Potato (cooked)					74.5 ± 2
Peanut (roasted)		3412.5 ± 113.8			69 ± 1.8
Coffee		5768.5 ± 29.3			1730.5 ± 191.8
Corn-waffle		5392.2 ± 1374.6			126 ± 13.6
Tuna (canned)					23.1 ± 2.8
Smoked beer		833.5 ± 35	102.9 ± 3.9	39559.3 ± 255.5	28.3 ± 9.5
Banana			124.6 ± 16.7		
Whisky	137.7 ± 43.4			24386.6 ± 203.4	
Red wine	110.2 ± 9.8			25468.7 ± 864.3	
Champignon					
Strawberry					
Potato chips		685.4 ± 72			
Pilsner beer (Mönchshof)		1409.2 ± 230.3			
Pilsner Beer (Bitburger)		2010.8 ± 440.4			
Craftbeer		1903.6 ± 98.9		3843.3 ± 12.2	
Lovage				639 ± 31.9	
Smoked tofu	2376.5 ± 146.4	4413.1 ± 453.2	1607.1 ± 205.1		
Chocolate	62.7 ± 6.3			4834.1 ± 16.1	
Wheat beer		619 ± 164.1		25221.2 ± 3056.7	
Tomato				235.9 ± 32.7	
Tomato juice (preserved)					
Honey					
Chicken (pan-fried)					
Popcorn (sweet)					
Pilsner beer (Königspilsener)					
Beef					
Buckwheat					
Grapefruit (fresh)					
Cucumber					
Apple					

Table S7. Recovery rates and intra- and interday precision determined in validation experiments.

	Spike level 1: recovery/precision					
	Potato (cooked)		Peanut (roasted)		Coffee	
	recovery	precision	recovery	precision	recovery	precision
3-Methylbutanal (1)	112%	11%	112%	3%	122%	5%
Methanethiol (2)	103%	8%	90%	8%	116%	7%
Methional (3)	95%	12%	97%	2%	108%	3%
(Z)-3-Hexenal (4)	75%	3%	55%	4%	73%	2%
Furaneol (5)	86%	6%	95%	2%	119%	1%
2-Methylbutanal (6)	112%	11%	112%	3%	122%	5%
(Z)-2-Nonenal (8)	99%	8%	86%	3%	106%	3%
2-Methylpropanal (9)	89%	6%	86%	3%	99%	3%
1-Octen-3-on (10)	108%	18%	77%	6%	101%	0%
(E,E)-2,4-Decadienal (11)	87%	7%	107%	2%	101%	2%
Linalool (13)	99%	7%	103%	1%	99%	2%
Sotolon (15)	105%	16%	97%	3%	101%	2%
Hexanal (17)	110%	4%	116%	7%	117%	3%
Guaiacol (18)	89%	3%	93%	1%	107%	1%
4-Ethylphenol (19)	113%	7%	115%	1%	100%	2%
4-Vinylguaiacol (20)	96%	4%	99%	4%	97%	2%
Eugenol (21)	90%	5%	109%	3%	95%	4%
2-Phenylethanol (22)	106%	11%	108%	3%	99%	1%
Furfurylthiol (23)	86%	7%	87%	2%	109%	1%
(E)-2-Nonenal (24)	99%	8%	86%	3%	106%	3%

	Spike level 2: recovery/precision					
	Potato (cooked)		Peanut (roasted)		Coffee	
	recovery	precision	recovery	precision	recovery	precision
3-Methylbutanal (1)	99%	3%	103%	4%	110%	13%
Methanethiol (2)	107%	14%	89%	15%	106%	6%
Methional (3)	95%	2%	88%	1%	89%	3%
(Z)-3-Hexenal (4)	79%	4%	56%	2%	81%	11%
Furaneol (5)	80%	2%	96%	5%	99%	6%
2-Methylbutanal (6)	99%	3%	103%	4%	110%	13%
(Z)-2-Nonenal (8)	109%	2%	88%	2%	112%	17%
2-Methylpropanal (9)	88%	3%	84%	1%	93%	7%
1-Octen-3-on (10)	119%	5%	83%	8%	104%	2%
(E,E)-2,4-Decadienal (11)	91%	3%	96%	4%	85%	1%
Linalool (13)	87%	1%	90%	1%	91%	6%
Sotolon (15)	99%	8%	89%	5%	92%	0%
Hexanal (17)	111%	4%	114%	2%	111%	20%
Guaiacol (18)	87%	2%	88%	2%	90%	1%
4-Ethylphenol (19)	105%	3%	111%	3%	89%	1%
4-Vinylguaiacol (20)	92%	5%	111%	16%	88%	4%
Eugenol (21)	90%	2%	106%	3%	89%	1%
2-Phenylethanol (22)	109%	3%	103%	7%	94%	2%
Furfurylthiol (23)	83%	3%	81%	2%	105%	4%
(E)-2-Nonenal (24)	109%	2%	88%	2%	112%	17%

Table S7 continued

	Spike level 3: recovery/precision					
	Potato (cooked)		Peanut (roasted)		Coffee	
	recovery	precision	recovery	precision	recovery	precision
3-Methylbutanal (1)	81%	2%	82%	3%	83%	0%
Methanethiol (2)	114%	26%	99%	8%	97%	3%
Methional (3)	84%	2%	83%	2%	82%	1%
(Z)-3-Hexenal (4)	69%	4%	45%	4%	91%	8%
Furaneol (5)	77%	1%	79%	5%	91%	3%
2-Methylbutanal (6)	81%	2%	82%	3%	83%	0%
(Z)-2-Nonenal (8)	116%	7%	96%	5%	101%	1%
2-Methylpropanal (9)	81%	2%	82%	5%	84%	3%
1-Octen-3-on (10)	110%	18%	115%	14%	116%	2%
(E,E)-2,4-Decadienal (11)	87%	0%	90%	1%	82%	2%
Linalool (13)	87%	6%	92%	3%	83%	5%
Sotolon (15)	83%	3%	83%	8%	84%	3%
Hexanal (17)	90%	3%	90%	6%	86%	5%
Guaiacol (18)	83%	2%	85%	2%	82%	1%
4-Ethylphenol (19)	80%	2%	91%	17%	77%	2%
4-Vinylguaiacol (20)	95%	9%	82%	11%	92%	4%
Eugenol (21)	75%	1%	90%	15%	79%	1%
2-Phenylethanol (22)	105%	4%	93%	1%	94%	2%
Furfurylthiol (23)	80%	3%	80%	2%	92%	2%
(E)-2-Nonenal (24)	116%	7%	96%	5%	101%	1%

	interday precision		
	Potato (cooked)	Peanut (roasted)	Coffee
	interday precision	interday precision	interday precision
3-Methylbutanal (1)	-5%	13%	-15%
Methanethiol (2)	5%	18%	-24%
Methional (3)	8%	0%	-13%
(Z)-3-Hexenal (4)	20%	29%	25%
Furaneol (5)	19%	-1%	-1%
2-Methylbutanal (6)	-5%	13%	-15%
(Z)-2-Nonenal (8)	-8%	21%	12%
2-Methylpropanal (9)	6%	15%	-1%
1-Octen-3-on (10)	-6%	19%	4%
(E,E)-2,4-Decadienal (11)	9%	-10%	0%
Linalool (13)	1%	-4%	3%
Sotolon (15)	-4%	3%	-1%
Hexanal (17)	-3%	2%	-1%
Guaiacol (18)	-2%	9%	-7%
4-Ethylphenol (19)	-23%	-14%	11%
4-Vinylguaiacol (20)	-6%	1%	31%
Eugenol (21)	5%	-12%	17%
2-Phenylethanol (22)	-7%	-5%	7%
Furfurylthiol (23)	2%	7%	-14%
(E)-2-Nonenal (24)	-8%	21%	12%

Further notes:

The measurements for LoD, LoQ, recovery rates and intraday precision were performed on 12th of July 2021 and the measurements for interday precision on the 21st of July. The sample preparations were each performed in the week before the respective measurement.

References:

1. Dunkel, A.; Steinhaus, M.; Kotthoff, M.; Nowak, B.; Krautwurst, D.; Schieberle, P.; Hofmann, T., Nature's Chemical Signatures in Human Olfaction: A Foodborne Perspective for Future Biotechnology. *Angewandte Chemie International Edition* **2014**, *53* (28), 7124-7143.
2. Li, J.-X.; Schieberle, P.; Steinhaus, M., Development of stable isotope dilution assays for the quantitation of the food odorants hydrogen sulphide, methanethiol, ethanethiol, and propane-1-thiol and application to durian (*Durio zibethinus* L.) pulp. *European Food Research and Technology* **2017**, *243* (1), 69-79.
3. Rychlik, M.; Bosset, J. O., Flavour and off-flavour compounds of Swiss Gruyere cheese. Identification of key odorants by quantitative instrumental and sensory studies. *International Dairy Journal* **2001**, *11* (11-12), 903-910.
4. Chetschik, I.; Granvogl, M.; Schieberle, P., Quantitation of key peanut aroma compounds in raw peanuts and pan-roasted peanut meal. Aroma reconstitution and comparison with commercial peanut products. *Journal of agricultural and food chemistry* **2010**, *58* (20), 11018-11026.
5. Kerler, J.; Grosch, W., Character impact odorants of boiled chicken: changes during refrigerated storage and reheating. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A* **1997**, *205* (3), 232-238.
6. Li, J.-X.; Schieberle, P.; Steinhaus, M., Insights into the Key Compounds of Durian (*Durio zibethinus* L. 'Monthong') Pulp Odor by Odorant Quantitation and Aroma Simulation Experiments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2017**, *65* (3), 639-647.
7. Masanetz, C.; Grosch, W., Key odorants of parsley leaves (*Petroselinum crispum* [Mill.] Nym. ssp. *crispum*) by Odour-activity values. *Flavour and fragrance journal* **1998**, *13* (2), 115-124.
8. Milo, C.; Grosch, W., Potent odorants in boiled cod as affected by the storage of raw material. **1997**.
9. Moore, J. E.; Forrester, L. J.; Pelosi, P., Specific anosmia to isobutyraldehyde: the malty primary odor. *Chemical Senses* **1976**, *2* (1), 17-25.
10. Leffingwell, J. C.; Leffingwell, D., GRAS Flavor Chemicals—Detection Thresholds. *Perfumer Flavorist* **1991**, *16*, 1-13.
11. Buttery, R. G.; Teranishi, R.; Ling, L. C.; Turnbaugh, J. G., Quantitative and sensory studies on tomato paste volatiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1990**, *38* (1), 336-340.
12. Ohloff, G., Recent developments in the field of naturally-occurring aroma components. In *Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe/Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, Springer: 1978; pp 431-527.
13. Gassenmeier, K.; Schieberle, P., Comparison of important odorants in puff-pastries prepared with butter or margarine. *LWT-Food Science and Technology* **1994**, *27* (3), 282-288.
14. Guadagni, D. G.; Buttery, R. G.; Turnbaugh, J. G., Odour thresholds and similarity ratings of some potato chip components. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1972**, *23* (12), 1435-1444.
15. Dijkstra, F. Y.; Wikén, T. O., Studies on mushroom flavours. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung* **1976**, *160* (3), 255-262.
16. Kosowska, M.; Majcher, M. A.; Jeleń, H. H.; Fortuna, T., Key Aroma Compounds in Smoked Cooked Loin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2018**, *66* (14), 3683-3690.