

Gaschromatographische Untersuchungen über die Aromastoffe von Weinbeeren

I. Anreicherung und kapillarchromatographische Auftrennung

von

A. RAPP, H. HASTRICH UND L. ENGEL

Gas chromatographic investigations on the aroma constituents of grape berries

I. Concentration and separation by capillary glass columns

S u m m a r y . — Using long capillary glass columns (approx. 70 m) makes it possible to separate aroma concentrates from grapeberries into up to 300 peaks during 2 to 3 hs. The destruction of the cells involves enzymatic-oxidative and enzymatic-hydrolytic processes, whereby some components are decomposed (fruit esters) and others newly built up. To determine the initially present aroma components of grapeberries, the enzymes must be inactivated (by homogenizing the grapeberries with 65% methanol). The aroma components obtained in this way are concentrated with Freon 11 (boiling point 23,8 °C) from the water-methanol solution under moderate conditions. Suppression of the enzymatic processes during the destruction of the cells, optimum concentration and good separation of the aroma concentrate including some hundred components are essential for detecting variety-specific compounds.

Einleitung

Die flüchtigen Inhaltsstoffe der Weinbeeren sind von erheblicher Bedeutung, weniger im Hinblick auf den Stoffwechsel der Hefe als vielmehr wegen ihrer sensorischen Eigenschaften. Sie tragen entscheidend zum Sortencharakter eines Mostes oder Weines bei. Die Konzentration der einzelnen Verbindungen, die den verschiedensten Stoffklassen wie Estern, Ketonen, Aldehyden, Terpenen usw. angehören, liegt unter 10^{-5} g/kg, so daß ihre Erfassung trotz empfindlichster Detektoren erst nach Anreicherung möglich ist. Wie aus zahlreichen Arbeiten hervorgeht (1, 2, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 14, 15, 17, 18, 19), enthält ein Aromakonzentrat einige hundert Einzelkomponenten. Da diese vielen Verbindungen sich u. a. in Polarität, Siedepunkt und Konzentration erheblich unterscheiden, ist ihre chromatographische Auftrennung sehr erschwert. Beim Nachweis und bei der Bestimmung der flüchtigen Aromastoffe in Früchten erweist sich die Gaschromatographie als besonders leistungsfähige und sehr gut geeignete Methode.

Mit den vorliegenden Untersuchungen beabsichtigten wir, die Aufarbeitung, Anreicherung und Auftrennung so zu gestalten, daß eine Sortencharakterisierung anhand der Aromastoffzusammensetzung möglich wird; zugleich werden damit wichtige analytische Voraussetzungen für die biochemische Früherkennung neuer Rebsorten geschaffen.

Material und Methoden

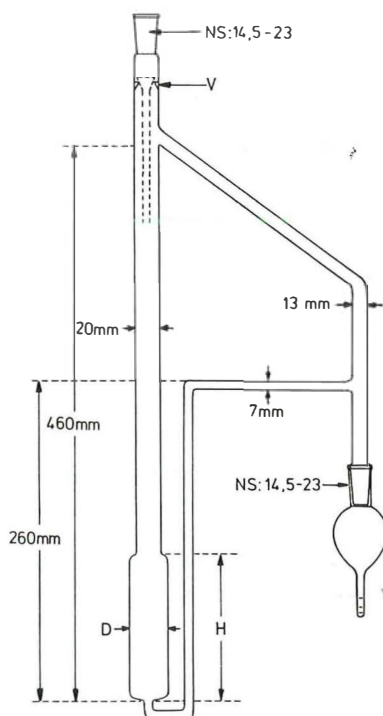
1. Anreicherung der Aromastoffe

1 kg frisch geerntete, gesunde Weinbeeren wurden mit ca. 700 ml 65%igem Methanol (mit Freon gereinigt) in einem Starmix (Braun) homogenisiert. Das Homogenat wurde abzentrifugiert und der Rückstand nochmals mit ca. 300 ml Methanol (wie oben) ausgewaschen. Die vereinigten klaren Zentrifugate wurden mit 65%igem Methanol auf 1700 ml aufgefüllt und anschließend mit etwa 70 ml Freon 11 (CCl_3F ; Siedepunkt 23,8 °C; Fa. Tega, Technische Gase und Gasetechnik, Würzburg) bei einer Wasserbadtemperatur von 27 °C mindestens 15 h extrahiert (Extraktionsvorrichtung siehe Abb. 1). Der Extrakt wurde in ausgezogenen 50-ml-Kölbchen, die mit 3 Markierungen (25 μl , 50 μl und 100 μl) versehen waren (Abb. 1), auf etwa 50 μl eingengt. Von diesem Konzentrat wurde 1 μl für die gaschromatographische Analyse verwendet.

Abb. 1: Extraktionsapparatur (ohne Kühleraufsatz) zur Anreicherung der Aromastoffe aus Wein mit Freon 11 (Dichte 1,4944). V = Vorsprünge, die ein oben erweitertes Glasrohr halten. D = 32 mm, H = 120 mm: Apparatur für 100 ml Flüssigkeit; D = 50 mm, H = 160 mm: für 250 ml; D = 70 mm, H = 260 mm: für 1000 ml.

Extraction equipment (without cooler) for enriching the volatile aroma compounds from wine with Freon 11 (specific gravity 1.4944). V = Projections to hold a glass tube widened at the upper part. D = 32 mm, H = 120 mm: equipment for 100 ml liquid; D = 50 mm, H = 160 mm: for 250 ml; D = 70 mm, H = 260 mm: for 1000 ml.

Zur Standardisierung (Zugabe einer Bezugssubstanz zur Eliminierung der Fehler, die bei der Aufarbeitung, Anreicherung und Auftrennung auftreten können) wurden zu 1 kg Weinbeeren vor der Aufarbeitung z. B. 1 μl Buttersäure-i-amylester (gaschromatographisch gereinigt) oder μl einer 10%igen 2-Phenyläthanol-Lösung (1 ml 2-Phenyläthanol puriss. in 10 ml Äthanol) zugesetzt.



2. Auftrennung des Aromakonzentrates

a) Säule: 75 m lange Glaskapillarsäule mit 0,3 mm Innendurchmesser, belegt mit LAC-3-R-728. Trägergas: 1 ml Wasserstoff/min; Splitverhältnis nach Verdampfer: 1 : 30; Temperaturprogramm: 50—150 °C; 1,5 °C/min. Gerät: Carlo-Erba, Modell 2101 AC.

b) Säule: 50 m lange Glaskapillarsäule mit 0,36 mm Innendurchmesser, belegt mit FFAP (Carbowax 20 M/2-Nitrotterephthalsäure). Trägergas: 1 ml Wasserstoff/

min; Splitverhältnis nach Verdampfer: 1 : 15. Temperaturprogramm: 50—150 °C; 1,5 °C/min. Gerät: Siemens L 400.

Ergebnisse und Diskussion

1. Anreicherung

Zur Anreicherung der flüchtigen Aromastoffe aus Traubensäften bzw. Traubenmosten benutzten wir in früheren Arbeiten (5, 11) als Extraktionsmittel Pentan/Dichlormethan (2 : 1 v/v) (Merck: Pentan zur Analyse, Dichlormethan zur Analyse). PRILLINGER und MADNER (9) verwendeten Äther/Pentan (1 : 2 v/v). VAN WYK *et al.* (19) extrahierten die Destillate von Traubenmosten 5 Tage lang mit Äther, wobei das Lösungsmittel mehrmals erneuert wurde.

Aus den verwendeten Extraktionsmitteln können Begleitstoffe in die Aromakonzentrate gelangen und so die Ergebnisse verfälschen. Etwa 50 ml der von uns verwandten Pentan/Dichlormethan-Mischung engten wir auf 50 μ l ein. Bei der gaschromatographischen Untersuchung dieses Konzentrates erhielten wir auf der 75-m-Glaskapillarsäule (LAC-3-R-728) etwa 100 Peaks, wobei bis zu Retentionszeiten von 70 min Störkomponenten nachzuweisen waren. Aus diesen Ergebnissen geht hervor, daß ein Pentan/Dichlormethan-Gemisch bei Anwendung der kapillarchromatographischen Analyse zur Anreicherung der flüchtigen Aromakomponenten nicht brauchbar ist.

Die geringsten Verunreinigungen würden durch Gasextraktion auftreten. Diese Anreicherungsverfahren ist jedoch nicht geeignet, aus der wäßrigen Lösung die Aromastoffe zum quantitativen Vergleich in ausreichender Menge zu gewinnen. BAYONOVE und CORDONNIER (1) reicherten die Aromastoffe durch Gasextraktion mit Stickstoff an. Im Konzentrat fanden sie jedoch nur 25 Peaks.

Ein Lösungsmittel mit ähnlichen Extraktionseigenschaften wie Pentan/Dichlormethan ist Freon 11 (CCl_3F). Um den Reinheitsgrad dieses Lösungsmittels im Vergleich zu Pentan/Dichlormethan zu ermitteln, engten wir auch Freon 11 von 50 ml auf 50 μ l ein und fanden auf derselben Glaskapillarsäule (75 m, LAC-3-R-728) nur noch 8 Peaks, von denen nur einer als Störpeak (Retentionszeit 63 min) anzusehen ist. Da die Retentionszeiten der übrigen Peaks unter 7 min liegen, wird die Aussagekraft der Aromagramme nicht beeinflusst. Neben diesen guten Eigenschaften (Reinheitsgrad, niedriger Siedepunkt) hat Freon 11 noch weitere Vorteile gegenüber den anderen Extraktionsmitteln: Es ist weder entflammbar noch explosiv (vgl. hingegen Äther), seine Giftigkeit ist geringer als die von Dichlormethan. Die Wasserlöslichkeit von Freon 11 liegt bei 25 °C unter 0,01 Gew.%. Dieser unpolare halogenierte Kohlenwasserstoff ist als gutes Lösungsmittel für unpolare Verbindungen und als weniger gutes für polare Verbindungen (Alkohole, Säuren) zu betrachten.

2. Inhibierung der Enzyme bei der Aufarbeitung

DRAWERT *et al.* (3) und TRESSL (16) fanden beim Zerkleinern von Äpfeln ohne Inaktivierung der Enzyme beträchtliche Mengen von Aldehyden und Alkoholen. Beim Zerstören des Zellverbandes unter Luftzutritt wurden durch enzymatische Oxidation vorwiegend Hexanal, trans-2-Hexen-al-1, cis-3-Hexen-al-1 und cis-3-Hexenol-1 gebildet. Bei Inhibierung der Enzyme konnten die Verf. nur sehr geringe Mengen der Hexenale finden. Neben diesen oxidativen Vorgängen laufen auch enzymatisch-hydrolytische Prozesse ab, die zur Spaltung der Fruchtester und somit zur Neubildung von Aromastoffen führen.

Für die Inhibierung der Enzyme stehen zahlreiche Verbindungen zur Verfügung (Schwermetallsalze, Cyanide, Sulfite usw.). Wie TRESSL (16) nachweisen konnte, wird

Bildung von C₆-Verbindungen bei der Aufarbeitung von Weinbeeren, Sorte Silvaner;
 Enzyminhibierung mit 65%igem Methanol
 Formation of C₆-compounds when processing grapeberries, cultivar Silvaner;
 inhibition of enzymes by 65% methanol

C ₆ -Verbindung	sofort		nach 10 min		Enzyminhibierung		Relation	
	Peakhöhe (mm)	194	Peakhöhe (mm)	14938	10 min: sofort	nach 120 min	120 min: sofort	120 min: sofort
n-Hexanal					77	8750	45	
Hexanol-1	100		2563		27	11350	114	
trans-2-Hexenal-1	3163		15750		5	20250	6	
trans-2-Hexenal-1	143		4500		31	15500	108	
cis-3-Hexenal-1	55		5625		102	1500	27	
cis-3-Hexenal-1	14		191		13	320	21	

die Hexenal-Bildung durch Blausäure und Quecksilber-II-cyanid überhaupt nicht, durch Ascorbinsäure nur schwach gehemmt; Trichloressigsäure, Methanol, Quercetin und schweflige Säure verhindern hingegen weitgehend die Bildung von C₆-Verbindungen. Aufgrund eigener Untersuchungen erwies sich Methanol als günstigster Inhibitor. Hierzu ist jedoch eine äußerst sorgfältige Reinigung des Methanols erforderlich. Beim Extrahieren von destilliertem 65%igem wässrigem Methanol mit Freon 11 fanden wir etwa 50 Peaks, wobei die längste Retentionszeit 27 min betrug und ein Peak wiederum nach 63 min auftrat (Störpeak von Freon). Eine 15stündige

Extraktion des Methanols ist deshalb unumgänglich. Eine erneute Extraktion des bereits gereinigten Methanols brachte nur noch 20 Peaks, wobei nach einer Retentionszeit von 11 min keine Störpeaks mehr auftraten (außer dem Störpeak des Freons). Somit kann Methanol ohne Verfälschung der Aromagramme als Inhibitor verwendet werden.

Wie aus der Tabelle hervorgeht, wurde die Aromastoffzusammensetzung ohne Inaktivierung der Enzyme beim Aufarbeiten erheblich verändert. Wurde die Inhibierung erst 10 min nach Beginn der Zerstörung des Zellverbandes durchgeführt, so waren bereits ganz erhebliche Mengen an n-Hexanal, trans-2-Hexenal-1, cis-3-Hexenal-1, trans-2-Hexenol-1 und Hexanol-1 entstanden. Der n-Hexanal-Gehalt nahm hierbei um das 77fache gegenüber demjenigen bei sofortiger Inaktivierung zu, trans-2-Hexenal-1 um das 5fache, Hexanol-1 um das 2fache, cis-3-Hexenal-1 um das 102fache und cis-3-Hexenol-1 um das 13fache. Während weiterer 110 min (Inaktivierung der Enzyme 120 min nach Zerstören des Zellverbandes) nahm trans-2-Hexenal-1 kaum noch zu, trans-2-Hexenol-1 stieg auf das 3,5fache an und cis-3-Hexenol-1 fast auf das doppelte. Hexanol-1 und trans-2-Hexenol-1 nahmen im Verlauf von 120 min am stärksten zu, nämlich auf das 114- bzw. 108fache der Kontrolle (Tabelle). Der Gehalt an n-Hexanal, der bereits 10 min nach dem Zerstören des Zellverbandes die Kontrolle 77fach übertraf, nahm im weiteren Verlauf wieder ab. Hexanal wird hierbei, wie GROSCH (6) bei Erbsen festgestellt hat, durch den ADH-NADH-Komplex zum Hexanol-1 hydriert. In der inaktiven Weinbeere (sofortige Inhibierung) waren bereits geringe Mengen an n-Hexanal, Hexanol-1, trans-2-Hexenol-1, cis-3-Hexenal-1 und cis-3-Hexenol-1 sowie ein erheblicher Anteil an trans-2-Hexenal-1 enthalten. PRILLINGER und MADNER (9) fanden bei der Extraktion frisch gepreßter Trauben, ohne Zusatz eines Inhibitors, große Mengen Hexanol-1 im Aromakonzentrat. VAN WYK *et al.* (19) und HARDY (7), die ebenfalls Weinbeeren ohne Inaktivierung entsafteten und aus dem Saftdestillat die Aromastoffe durch Extraktion anreicherten, stellten beträchtliche Mengen Hexanol-1, trans-2-Hexenal-1 und trans-2-Hexenol-1 fest.

Diese stark ausgeprägte Neubildung von Aromastoffen beim Zerstören des Zellverbandes läßt einen Vergleich der Aromastoffzusammensetzung verschiedener Sorten nur nach Ausschalten der sekundär ablaufenden Reaktionen zu. Die Aufarbeitung der Weinbeeren muß somit unter Inaktivierung der Enzyme geschehen.

3. Auftrennung der Aromakonzentrate

Säulenchromatographische Vortrennungen der Aromastoffe an Kieselgel (18), in Fraktionen verschiedener Polaritätsstufen, sind bei der Identifizierung der Substanzen mit Hilfe der Koppelung von Gaschromatographie und Massenspektroskopie eine große und entscheidende Hilfe. Da hierdurch jedoch die quantitativen Verhältnisse beeinflußt werden, ist diese Methode im Rahmen von Untersuchungen, die einen Sortenvergleich anstreben, nicht geeignet.

Auch die Auftrennung auf gepackten Trennsäulen, die bisher bei vielen Arbeiten eingesetzt wurden, scheidet für unsere Zielsetzung aus, da ihre Trennleistung bei weitem nicht ausreicht. Zu viele Komponenten können in einem Peak erscheinen. Trotz langer Analysenzeiten erhält man nur relativ wenige Peaks. So konnten z. B. VAN WYK *et al.* (19) auf einer 10 ft. langen gepackten Säule (Innendurchmesser $\frac{1}{4}$ in.) selbst bei einem Temperaturprogramm von 80—225 °C und einer Laufzeit von 25 min nur 21 Peaks auftrennen.

Durch Injektion des Extraktes auf mehrere Trennsäulen mit unterschiedlicher Phase konnten wir, jedoch mit sehr viel Aufwand, bei Verwendung gepackter Säulen mehr Information erhalten (11). Die Anwendung der Mehrstufentechnik (4) zeig-

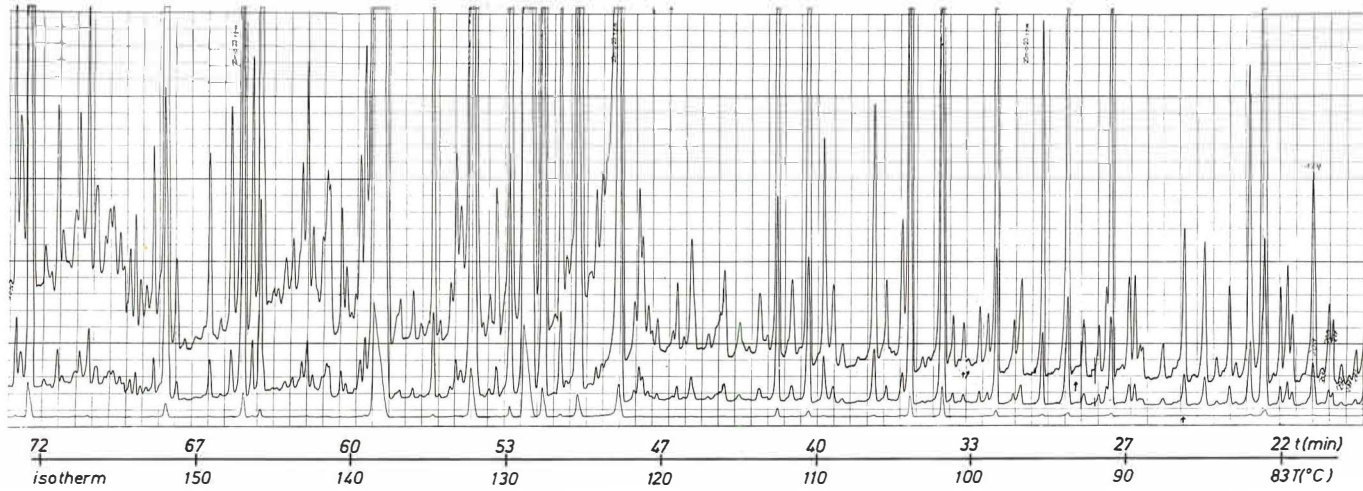


Abb. 2: Aromagrammausschnitt von Morio-Muskat-Trauben. Obere Kurve: höchste Empfindlichkeit; mittlere Kurve: 5fache Abschwächung; untere Kurve: 125fache Abschwächung.

Part of the aromagram of Morio Muscat grapes. Upper curve: highest sensibility; medium curve: 5 times recorder decrease; lower curve: 125 times recorder decrease.

te deutlich, wie einheitlich aussehende Peaks bei Überführung auf eine weitere Trennsäule z. T. in mehrere Komponenten zerlegbar sind. Die Anwendung der Trapping-Methode (12) könnte so selbst bei gepackten Trennsäulen zu guten Ergebnissen führen.

Mit der Kapillarchromatographie, die sich als leistungsfähigste analytische Variante aus der klassischen Gaschromatographie entwickelt hat, sind die Voraussetzungen für die Auftrennung des im Aromakonzentrat vorliegenden Vielkomponentengemisches geschaffen. Ausgehend von etwa 400 Komponenten im Aromakonzentrat sollte bei einem Trennvermögen von 2—3 Substanzen je min bei einer Analysenlaufzeit von 2—3 h das Problem zu lösen sein.

HARDY (7) fand auf einer 50-ft.-Kapillarsäule (0,02 in. Innendurchmesser; LB 550 X) bei einem Temperaturprogramm von 32—165 °C über eine Analysenzeit von 70 min nur 30 Peaks. RAMSHAW und HARDY (10) benutzten eine Apiezon-Kapillarsäule (50 ft.; 0,02 in. Innendurchmesser; 40—180 °C) und fanden nach 70 min 52 Peaks. PRILLINGER und MADNER (9) erreichten beim Auftrennen von Aromakonzentraten auf Kapillar-Festschichtsäulen (Carbowax 1540) bei einem Temperaturprogramm von 70—130 °C nach 35 min 63 Peaks.

Mit der von uns eingesetzten Trennsäule (LAC-3-R-728)¹⁾ können wir aus Freon-Anreicherungen von wäßrig-methanolischen Weinbeerhomogenisaten bei einer Analysenzeit von 150 min (Temperaturprogramm: 50—150 °C, 1,5 °C/min, danach isotherm) 270 Peaks auffinden. In Abb. 2 ist das Ergebnis dieser Trennung von der 22. bis zur 72. min dargestellt. In dieser Zeit durchlief das Temperaturprogramm den Bereich von 83—150 °C. Wie die Abbildung zeigt, ist über den gesamten Bereich keine Nullpunktdrift festzustellen. Wiederholungsanalysen erbrachten eine sehr gute Reproduzierbarkeit sowohl der Retentionszeiten als auch der Peakhöhen.

Zusammenfassung

Durch Verwendung von langen Glaskapillarsäulen (ca. 70 m) besteht die Möglichkeit, aus Aromaanreicherungen von Weinbeeren bei einer Analysenzeit von 2—3 h bis zu etwa 300 Peaks aufzutrennen. Beim Zerstören der Zellstrukturen laufen enzymatisch-oxidative sowie enzymatisch-hydrolytische Prozesse ab, wobei einige Komponenten (Fruchtster) abgebaut und andere neu gebildet werden. Um die primär vorhandenen Aromastoffe von Weinbeeren bestimmen zu können, muß die Aufarbeitung unter gleichzeitiger Inaktivierung der Enzyme durchgeführt werden (Homogenisieren der Weinbeeren mit 65%igem Methanol). Die so gewonnenen Aromastoffe werden mit Freon 11 (Siedepunkt 23,8 °C) aus der wäßrig-methanolischen Lösung unter schonenden Bedingungen angereichert. Die Ausschaltung der enzymatischen Vorgänge beim Zerstören der Zellstrukturen sowie eine bestmögliche Anreicherung und eine gute Auftrennung des einige hundert Komponenten umfassenden Aromakonzentrates sind wichtige Voraussetzungen zum Auffinden der sortentypischen Verbindungen.

Literaturverzeichnis

1. BAYONVE, C. et CORDONNIER, R., 1970: Recherches sur l'arôme du Muscat. Ann. Technol. Agric. 19, 79—93.
2. CHAUDHARY, S. S., KEPNER, R. E. and WEBB, A. D., 1964: Identification of some volatile com-

¹⁾ Wir danken Herrn Dr. G. SCHOMBURG, MPI Mülheim/Ruhr für die Überlassung dieser Trennsäule sowie für die vielen Diskussionen, die mit zum Gelingen dieser Arbeit beitragen.

- pounds in an extract of the grape, *Vitis vinifera* var. Sauvignon Blanc. Amer. J. Enol. Viticult. 15, 190—198.
3. DRAWERT, F., HEIMANN, W., EMBERGER, R. und TRESSL, R., 1965: Enzymatische Bildung von Hexen-2-al-1 und Hexenal-1 bei der Aufarbeitung von Äpfeln. Z. Naturforsch. 20 b, 497—498.
 4. — — und RAPP, A., 1964: Gaschromatographische Analyse komplexer Stoffgemische (Alkohole, Ester, Ketone, Terpene) unter Anwendung der Mehrstufentechnik. Chemiker-Ztg. 88, 267—270.
 5. — — und — — , 1968: Gaschromatographische Untersuchung pflanzlicher Aromen. I. Anreicherung, Trennung und Identifizierung von flüchtigen Aromastoffen in Traubenmosten und Weinen. Chromatographia 1, 446—457.
 6. GROSCH, W., 1969: Bildung flüchtiger Alkohole in Erbsen durch die Wirkung der Lipoxygenase und Alkoholdehydrogenase. Die Nahrung 13, 393—401.
 7. HARDY, P. J., 1970: Changes in volatiles of Muscat grapes during ripening. Phytochemistry 9, 709—715.
 8. KEPNER, R. E. and WEBB, A. D., 1956: Volatile aroma constituents of *Vitis rotundifolia* grapes. Amer. J. Enol. Viticult. 7, 8—18.
 9. PRILLINGER, F. und MADNER, A., 1970: Die flüchtigen Inhaltsstoffe von Muskatmosten und -weinen. Mitt. Klosterneuburg 20, 202—205.
 10. RAMSHAW, E. H. and HARDY, P. J., 1969: Volatile compounds in dried grapes. J. Sci. Food Agric. 20, 619—621.
 11. RAPP, A., 1965: Über Inhaltsstoffe von Traubenmosten und Weinen unter besonderer Berücksichtigung der flüchtigen Verbindungen und des stofflichen Geschehens während der Hefegärung. Diss. Univ. Mainz.
 12. SCHOMBURG, G., HUSMANN, H. and WEEKE, F., 1975: Aspects of double-column gas chromatography with glass capillaries involving intermediate trapping. J. Chromatography 112, 205—217.
 13. SCHREIER, P. und DRAWERT, F., 1974: Gaschromatographisch-massenspektrometrische Untersuchung flüchtiger Inhaltsstoffe des Weines. Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm. 3, 154—160.
 14. STEVENS, K. L., BOMBEN, J., LEE, A. and MCFADDEN, W. H., 1966: Volatiles from grapes. Muscat of Alexandria. J. Agric. Food Chem. 14, 249—252.
 15. TERRIER, A. et BOIDRON, J. N., 1972: Identification des dérivés terpeniques dans les raisins de certaines variétés de *Vitis vinifera*. Connaiss. Vigne Vin 6, 147—160.
 16. TRESSL, R., 1967: Über die Bildung und enzymatische Veränderung einiger Fruchtaromastoffe. Diss. Univ. Karlsruhe.
 17. WEBB, A. D. and KEPNER, R. E., 1957: Some volatile aroma constituents of *Vitis vinifera* var. Muscat of Alexandria. Food Res. 22, 384—395.
 18. — — , — — and MAGGIORA, L., 1966: Gas chromatographic comparison of volatile aroma materials extracted from eight different muscat-flavored varieties of *Vitis vinifera*. Amer. J. Enol. Viticult. 17, 247—254.
 19. VAN WYK, C. J., WEBB, A. D. and KEPNER, R. E., 1967: Some volatile components of *Vitis vinifera* variety White Riesling. I. Grape juice. J. Food Sci. 32, 660—664.

Eingegangen am 27. 1. 1976

Dir. u. Prof. Dr. A. RAPP
BFA für Rebenzüchtung
Geilweilerhof
6741 Siebeldingen