

# Nachweis und Bestimmung von Actidion in Weinen <sup>1)</sup>

VON

A. RAPP und A. ZIEGLER

Seit alters her werden zur Bereitung und Haltbarmachung der Lebensmittel verschiedene Konservierungsstoffe verwendet. Es ist erwiesen, daß die Anwendung von Schwefeldämpfen bei der Weinherstellung bereits den Ägyptern und Römern bekannt war (4). Auch im Mittelalter wurde die schweflige Säure bei der Wein- und Mostgewinnung verwendet und schon Kaiser Maximilian hat hiergegen Verbote erlassen.

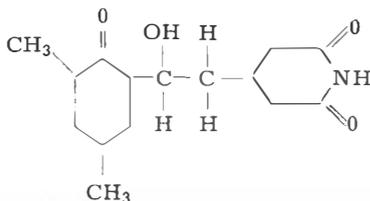
In der heutigen Zeit ist der Gebrauch von Stoffen mit konservierenden Eigenschaften in der Lebensmitteltechnologie weit verbreitet. In vielen Ländern ist der Zusatz von Konservierungsstoffen nicht geregelt, in anderen, z. B. europäischen Ländern, ist die Benutzung von Benzoesäure, Sorbinsäure, Äthyl- und Propylester der p-Hydroxybenzoesäure sowie ihren Natriumsalzen erlaubt.

Auch zur Stabilisierung von Weinen werden neuerdings außer schwefliger Säure, Pyrokohlensäurediäthylester und Ascorbinsäure auch Stoffe angewandt, deren Zusatz nicht erlaubt ist, so u. a. p-Chlorbenzoesäure, Monobromessigsäure, Natriumazid, Flußsäure, Actidion.

In der Literatur sind eine Reihe von Arbeiten und Methoden für den unspezifischen Nachweis von Konservierungsmitteln in Nahrungsmitteln erwähnt (2, 3, 12). Diese Verfahren beruhen auf der biologischen Ermittlung zugesetzter Inhibitoren, die das Wachstum gewisser Mikroorganismen, z. B. von Hefen, hemmen. Diese Methode ist dann anwendbar, wenn man nur das Vorhandensein von Hemmstoffen prüfen will. Eine Angabe, um welchen Stoff es sich handelt, ist nicht möglich. Diese biologischen Tests werden meistens auch durch andere Stoffe stark gestört; so stören bei der Überprüfung von Weinen außer der erlaubten schwefligen Säure auch der Alkoholgehalt, der Extrakt, der Gehalt an phenolischen Verbindungen usw. (1). Es ist deshalb unbedingt erforderlich, spezifische Nachweismethoden für die einzelnen, bei der Weinbereitung nicht erlaubten Konservierungsmittel auszuarbeiten. Bisher sind u. a. für p-Chlorbenzoesäure (6, 7), Sorbinsäure (11, 13), Benzoesäure, Salicylsäure, p-Hydroxybenzoesäure (5, 11) usw. Nachweis- und Bestimmungsmethoden beschrieben.

## Material und Methoden

Für Actidion gab es bisher keinen spezifischen Nachweis. Actidion (Cycloheximid;  $\beta$ -[2-(3,5-dimethyl-2-oxocyclohexyl)-2-hydroxy]-äthylglutarimid)



<sup>1)</sup> Auszug aus „Nachweis von Konservierungsmitteln in Weinen“ von B. HUSFELD und A. RAPP; vorgetragen von Prof. Dr. Dr. h. c. B. HUSFELD bei „Office international de la vigne et du vin“, Arbeitsgruppe: Microbiologie du vin, Paris, 6. Mai 1969.

ist ein Antibiotikum, das schon in Konzentrationen von 0,6—1,5 mg/l die Gärung von Weinhefen vollkommen hemmt (8, 10). Seine Anwendung zur Weinstabilisierung ist jedoch allgemein nicht erlaubt.

Zur Anreicherung von Actidion wurden 250 ml Wein mit 2n H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> angesäuert (pH 1) und danach mehrere Male mit 10 ml Chloroform-Aceton (4 Teile Chloroform, 1 Teil Aceton) ausgeschüttelt. Eventuell auftretende Emulsionen können durch Zentrifugieren (10 min bei 3000 U/min) in eine wässrige und Lösungsmittel-Phase aufgetrennt werden. Nach dem Trocknen (mit wasserfreiem Natriumsulfat) wird das Lösungsmittel abdestilliert und der Rückstand in 1 ml Aceton aufgenommen. Diese Lösung wird dünnschichtchromatographisch untersucht.

Als Fließmittel sind folgende Gemische geeignet:

bei Kieselgel GF als Trägermaterial:

I Benzol : Chloroform : Eisessig (4 : 5 : 1),

II Benzol : Dioxan : Ameisensäure (80 : 17 : 3);

bei Polyamid (Woelm; mit 4% Fluoreszenzindikator) als Trägermaterial:

III Benzol : Pentan : Eisessig (50 : 45 : 5),

IV Benzol : Eisessig (96 : 4),

V Benzol : Essigester : Eisessig (85 : 10 : 5).

Nach dem Chromatographieren werden die Platten mit Fluoreszenzindikator getrocknet und unter UV-Licht (254 nm) betrachtet. Die Flecken oder Zonen erscheinen als dunkle Stellen auf hellem Untergrund.

Gut geeignet sind spezifische Sprühreagentien. Durch Besprühen mit Tetrazoliumblau wird nur Actidion gelb gefärbt:

L<sub>1</sub> 0,5 g Tetrazoliumblau in 100 ml Methanol,

L<sub>2</sub> 6 n NaOH in Wasser.

L<sub>1</sub> und L<sub>2</sub> werden vor dem Gebrauch 1 : 1 gemischt. Die besprühten Platten werden auf 80° C erwärmt, dabei entstehen gelbe Flecken auf violettem Untergrund.

Die durch Fluoreszenz oder durch Vergleichssubstanz ermittelten Zonen oder Flecken werden abgekratzt, in Röhrchen (4 mm  $\phi$ ) gegeben und die Substanzen mit 2,5 ml sterilem Wasser eluiert. Zu der wässrigen Lösung gibt man 2,5 ml Nährlösung (doppelt konzentriertes Grundnährmedium nach WICKERHAM (9), 400 g/l Glukose, 1 g/l L-Glutaminsäure, 1 g/l Ammoniumsulfat) und beimpft mit einer *Saccharomyces cerevisiae*-Suspension. Die Lösung wird bei 25° C vergoren. Nach 2—3 Tagen wird die Hemmung mit einer Blindprobe (ohne Actidion) und einer totalen Hemmung (50 mg/l Actidion) verglichen. Die durch die Hefen verursachte Trübung wird spektralphotometrisch bei 600 nm (Schichtdicke 1 cm) gemessen. Die Extinktion gibt einen Hinweis über das Ausmaß der Gärhemmung.

### Ergebnisse und Diskussion

Mit den Fließmitteln III, IV und V gelingt es, auf Polyamidschichten Actidion von anderen Konservierungsmitteln wie Monobromessigsäure, Sorbinsäure und p-Chlorbenzoesäure abzutrennen. Auf Kieselgel GF-Platten kann man mit den Fließmitteln I und II Actidion ebenfalls von den o. a. Antibiotika abtrennen, wobei jedoch p-Chlorbenzoesäure und Sorbinsäure nicht gut voneinander getrennt werden. Die besten Ergebnisse wurden durch zweidimensionale Auftrennung erhalten.

Dazu eignen sich folgende Fließmittelgemische:

- |                          |                         |
|--------------------------|-------------------------|
| 1. Lauf Fließmittel III, | 2. Lauf Fließmittel IV; |
| 1. Lauf Fließmittel III, | 2. Lauf Fließmittel V.  |

Sind gleichzeitig mehrere Konservierungsmittel vorhanden, so ist eine zweidimensionale Auftrennung unbedingt erforderlich. Sind dabei noch einige Substanzen in mehrfacher Konzentration gegenüber anderen vorhanden (z. B. 10  $\gamma$ /l Actidion neben 25 mg/l Sorbinsäure), so empfiehlt es sich, zuerst eine präparative eindimensionale Auftrennung vorzunehmen. Dabei werden bis 200  $\mu$ l der Probe streifenförmig aufgetragen, nach dem Lauf die einzelnen Zonen abgekratzt, die Substanzen mit Äther eluiert und anschließend zweidimensional aufgetrennt.

Tabelle 1  
Noch sicher nachweisbare Antibiotika-Mengen

Substanz	Nachweis durch		
	spez.	Fluoreszenz	Gärhemmung
	Sprühreagentien	bei 254 nm	(mikrobiol. Test)
	$\gamma$	$\gamma$	$\gamma$
Actidion	10	40	0,5
Monobromessigsäure	5	40	10
p-Chlorbenzoesäure	8	1	50

Aus Tab. 1 ist die Nachweisgrenze von Actidion zu ersehen. Die Nachweisempfindlichkeit ist bei den verschiedenen Methoden sehr unterschiedlich. Während bei der Fluoreszenzmethode 40  $\gamma$  Actidion gerade noch nachweisbar sind, können durch das spezifische Sprühreagenz noch 10  $\gamma$  erfaßt werden. Der mikrobiologische Nachweis ist wesentlich empfindlicher. Noch 0,5  $\gamma$  Actidion können sicher nachgewiesen werden. Diese Nachweisempfindlichkeit reicht aus, um die zur Weinstabilisierung nötige Menge (50  $\gamma$ /l) sicher feststellen zu können.

In Tab. 2 sind die Ergebnisse des mikrobiologischen Nachweises der nach dünn-schichtchromatographischer Auftrennung aus Polyamidschichten eluierten Konservierungsmittel (mit Wasser) zusammengestellt. Bei den untersuchten Wirkstoffen stimmt die Hemmung mit der in Modellversuchen festgestellten überein (10). Durch Kombination der dünn-schichtchromatographischen Trennung mit einem mikrobiologischen Nachweis können gärhemmend wirkende Stoffe sicher nachgewiesen werden. Die Extinktion gibt im Vergleich zu den Blindwerten einen Anhaltspunkt über die Menge der vorhandenen Konservierungsmittel.

In Tab. 3 sind die Ergebnisse der Actidionbestimmung aus Weinen enthalten. Dabei zeigt sich deutlich, daß die zugesetzte Menge Actidion (50  $\gamma$ /l) eindeutig nachzuweisen ist.

### Zusammenfassung

Mittels der dünn-schichtchromatographischen Analyse konnten wir Actidion von anderen Konservierungsmitteln abtrennen und bestimmen. Durch Besprühen mit einem spezifischen Reagenz kann die Nachweisempfindlichkeit von Actidion gegenüber der Fluoreszenzmethode wesentlich gesteigert werden.

Die Kombination Dünnschichtchromatographie mit anschließendem mikrobiologischem Hemmtest der eluierten Substanzen erlaubt eine einwandfreie Bestimmung von Actidion in Weinen.

Der mikrobiologische Nachweis ermöglicht eine genaue Identifizierung der dünn-schichtchromatographisch getrennten Konservierungsmittel.

Tabelle 2  
Mikrobiologischer Nachweis von Konservierungsmitteln nach dem Eluieren aus Polyamidschichten

	Actidion		Monobromessigsäure					p-Chlorbenzoesäure			Blindwerte	
auf Polyamid-												
schichten auf-	0,25	0,5	2,5	5	25	2,5	5	25	50	100	200	
getragene												
Menge $\gamma$												
Gärlösung	0,05	0,1	0,5	0,1	5	0,5	1	5	10	20	40	0
enthält												100 mg/l
mg/l												Actidion
Hemmung	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
Extinktion	0,370	0,084	0,032	0,018	0,024	0,600	0,395	0,036	0,008	0,166	0,080	0,518
												0,000

+ nicht gehemmt, - gehemmt.

Tabelle 3  
Nachweis von Actidion in Weinen

Weinprobe <sup>1)</sup>	Aus Polyamidschichten eluiertes Actidion				Blindwerte	
	A	C	P	R	ohne Actidion	Actidion 100 mg/l
Hemmung	+	—	+	—	+	—
Extinktion	0,705	0,040	0,790	0,100	0,750	0,000

+ nicht gehemmt, — gehemmt.

<sup>1)</sup> Weinproben wurden 1968 von der OIV, Arbeitsgruppe «Microbiologie du vin», zur Überprüfung der vorgeschlagenen Methoden zur Verfügung gestellt.

Die Proben enthalten folgende Konservierungsmittel:

A: Weißwein ohne Zusatz,

C: Weißwein mit 1 mg/l Monobromessigsäure, 25 mg/l Kaliumsorbat, 5 mg/l p-Chlorbenzoesäure, 0,05 mg/l Actidion,

P: Rotwein ohne Zusatz,

R: Rotwein mit 1 mg/l Monobromessigsäure, 25 mg/l Kaliumsorbat, 5 mg/l p-Chlorbenzoesäure, 0,05 mg/l Actidion.

### Literaturverzeichnis

1. ANONYM, 1968 und 1969: Bericht OIV, Arbeitsgruppe Microbiologie du vin.
2. BERNAERTS, M. J., 1955: *Conserva* 4, 38.
3. — —, 1956: Über den unspezifischen Nachweis von Konservierungsmitteln in Marmelade mittels osmophiler Hefen. *Z. Lebensm.-Untersuch. u. -Forsch.* 104, 405—412.
4. BIOLETTI, F. H., 1912: *Intern. Congr. Appl. Chem.* 14, 31.
5. COPIUS-PEERBOOM, J. W. and BEEKES, H. W., 1964: Thin-layer chromatography of preserving agents. *J. Chromatog.* 14, 417—423.
6. CUSMANO, A. M., 1960: Contributo alla ricerca dell' acido p-clorobenzoico nei vini. *Riv. Viticult. Enol. (Conegliano)* 18, 37—41.
7. FISCHER, R. und BENKENDORF, F. G., 1961: Nachweis und Bestimmung der p-Chlorbenzoesäure in Obstweinen, Fruchtweinen, Obst-Dessertweinen und Obstschäumweinen. *Z. Lebensm.-Untersuch. u. -Forsch.* 117, 400—415.
8. GARINO-CANINA, E. e TREVISIOL, E., 1954: Gli antibiotici nella tecnica enologica. Bericht 10. Intern. Congr. Ernährungsindustrie, Madrid.
9. LASKOWSKY, W., 1960: Entwicklungszyklen und Erbverhalten der Hefen. In: REIFF, F. *et al.* (Hrsg.): *Die Hefen*. Hans Carl Verlag, Nürnberg. Bd. 1. S. 189.
10. HUSEFELD, B. und RAPP, A., 1968 und 1969: Nachweis von Konservierungsmitteln in Weinen. Bericht OIV, Arbeitsgruppe: Microbiologie du vin, Paris (unveröff.).
11. LUDWIG, E. und FREIMUTH, H., 1965: Zur Anwendung der Dünnschichtchromatographie in der Lebensmittelchemie. *Nahrung* 9, 751—754.
12. LÜTHI, H. und BEZZEGH, T., 1963: Über eine mikrobiologische Methode zum qualitativen Nachweis der chemischen Konservierung von Weinen. *Mitt. Geb. Lebensmitteluntersuch. Hyg. (Bern)* 53, 259—269.
13. WÜRDIG, G., 1966: Die gaschromatographische Bestimmung von Sorbinsäure und Benzoesäure im Wein. *Dt. Lebensm.-Rundsch.* 62, 147—149.

Eingegangen am 15. 7. 1969

Dr. A. RAPP  
BFA für Rebzüchtung  
Geilweilerhof  
6741 Siebeldingen