

Über Inhaltsstoffe von Mosten und Weinen

V. Nachweis von biogenen Aminen im Wein und deren Bedeutung

von

F. DRAWERT*)

Untersuchungen der Stickstoff-Verbindungen z. B. von Rebenblättern, Traubenbeeren bzw. Traubenmosten und Weinen, die seit 1959 laufen, haben gezeigt, daß neben den Aminosäuren und ihren höhermolekularen Formen noch andere N-Verbindungen in erheblichem Umfang am Gesamtstickstoff-Gehalt beteiligt sind. Im Zusammenhang mit Untersuchungen über den N-Stoffwechsel ergaben sich Hinweise dafür, daß ein Teil des Nichtaminosäuren-Stickstoffs auf Amine entfällt. Ihr weitverbreitetes Vorkommen geht u. a. aus den Arbeiten von E. STEIN v. KAMIENSKI (1) hervor, der in 75 von 220 untersuchten Arten von Blütenpflanzen sowie in Moosen zahlreiche Amine nachweisen konnte und Methoden für deren Isolierung und Nachweis beschrieben hat. Es ist ferner in Betracht zu ziehen, daß Amine als Stoffwechselprodukte mehr oder weniger stark auftreten und als „biogene Amine“ nach M. GUGGENHEIM (2) erhebliche physiologische Bedeutung erlangen können. Von vielen Aminen ist eine spezifische und oft starke Wirkung auf den Kreislauf und andere physiologische Funktionen bekannt. Allerdings enthalten zahlreiche Lebensmittel Aminmengen, die für sich alleine im pharmakologischen Test stark wirksam wären, über den Magen-Darm-Kanal jedoch nicht oder kaum in Erscheinung treten. Abgesehen davon, daß eine ganze Reihe von Aminen in pflanzlichen Produkten wie Orangensaft oder Gemüse, vor allem in Pilzen vorkommen, treten sie besonders in Nahrungsmitteln wie z. B. Sauerkraut auf, die durch mikrobielle Einwirkung entstanden sind. Allgemein ist auch bekannt, daß biogene Amine durch mikrobielle Zersetzung von Eiweißen gebildet werden. Einer der möglichen Bildungswege für Amine beruht auf der Decarboxylierung von Aminosäuren.

In diesem Zusammenhang ist hervorzuheben, daß der Wein Endprodukt einer langen biologischen Reihe mit vielen verschiedenen Gliedern ist. Der Traubenmost enthält je nach Rebsorte und Beerenreife zwar unterschiedliche Mengen an Aminosäuren, doch ist deren Konzentration mit 2–6 g/l beträchtlich (3). Es ist ferner in Erwägung zu ziehen, daß sich auf den Traubenbeeren Mikroorganismen in unterschiedlichem Ausmaß ansiedeln, die z. B. zur Sauer- oder Edelfäule der Trauben führen, daß die Traubenmaische nicht nur von Hefen befallen wird und, daß schließlich beim Übergang Most – Wein zahlreiche Bakterien neben den Hefen vorkommen.

Die Voraussetzungen für das Vorkommen von Aminen im Wein sind somit in mannigfaltiger Weise gegeben, und nachdem schon J. CARLES, M. LAMAZOU-BETBEDER und R. PECH (4) sowie C. TARANTOLA (5) das Vorkommen von Histamin in Weinen beobachtet haben, berichten P. MARQUARDT, H. SCHMIDT und M. SPÄTH (6) neuerdings über pharmakologische Möglichkeiten zur Bestimmung von Histamin in Weinen, wobei in badischen Weinen der Rebsorten Gutedel, Riesling, Traminer, Silvaner,

*) Eine ausführliche Publikation gemeinsam mit A. RAPP, K.-H. REUTHER und A. ZIEGLER ist in Vorbereitung.

Müller-Thurgau und Ruländer die beachtlichen Mengen von 10–20 μg Histamin pro ml Wein festgestellt worden sind. Auch K. HENNIG und K. D. MILLIES (7) weisen kurz auf das Vorkommen von Aminen im Wein hin.

Wir prüften zunächst mit Hilfe der Gaschromatographie, Dünnschicht- und Papierchromatographie, welche Amine in Weinen und Traubenmosten überhaupt vorkommen. Ziel dieser Arbeiten ist, anhand der gewonnenen chromatographischen Daten definiertes Rebenmaterial quantitativ zu untersuchen und zu vergleichen. Parallel dazu werden entsprechende Stoffwechseluntersuchungen an Mikroorganismen durchgeführt. Im folgenden wird über die in Weinen gefundenen Amine berichtet.

Die Abtrennung und Anreicherung der Amine des Weines gelang u. a. analog dem von J. AWAPARA, V. E. DAVIS und O. GRAHAM (8) beschriebenen Verfahren durch Schütteln von 100–300 ml Wein mit gereinigtem und in der H-Form befindlichen Ionenaustauscher Amberlite CG-50. Danach wird der behandelte Wein auf einer Chromatographiesäule ablaufen gelassen und das Harz mit Wasser sorgfältig im Durchlauf gewaschen. Die Elution erfolgt mit Säuren, z. B. 4n-Essigsäure, wobei Amine und basische Aminosäuren in das Eluat übertreten. Dieses wird eingengt und das Konzentrat entweder direkt chromatographiert oder einer weiteren Behandlung z. B. mit Fällungsreagenzien unterworfen.

Eine weitere Möglichkeit zur Anreicherung besteht darin, daß die Weine nach Ansäuern weitgehend abgedampft werden, wonach die Amine durch Wasserdampfdestillation aus alkalischer Lösung in eine saure Vorlage übergetrieben werden. Nach Einengen kann dann auch direkt chromatographiert werden.

Die Chromatographie erfolgte entweder gaschromatographisch oder auf Papierpulver-Dünnschicht-Platten bzw. auf Papier (S & S 2043 b) absteigend, bevorzugt mit dem Fließmittel Butanol/Eisessig/Wasser (4 : 1 : 1). Ein Imprägnieren der Papiersichten bzw. des Papiers mit 1%iger Natriumacetatlösung verbessert die Trennung. Gaschromatographisch ist die stationäre Phase 20% Paraffin auf Kieselgur (mit KOH vorbehandelt) bei 70–100° gut geeignet. Gerät: Universal-Gaschromatograph der Firma Siemens mit Flammenionisationsdetektor. Die Amine werden auf Papier mit Ninhydrin, Diazoniumsalzen (aromatische Amine), Nitroprussidnatrium und Chinon (bevorzugt sekundäre Amine), Isatin oder Joddampf (bevorzugt tertiäre Amine) (9) sichtbar gemacht. Die gefundenen R_f -Werte stimmen gut mit den Angaben der Literatur überein. Die Identifizierung wird mit Hilfe von Vergleichssubstanzen vorgenommen, wobei papier-, dünnschicht- und gaschromatographische Werte verglichen werden konnten.

Nach allen drei Methoden ließen sich etwa 15 Amine abtrennen und nachweisen, weitere 5–10 traten nur schwach oder angedeutet auf. In den bisher untersuchten Weinen konnten folgende Amine qualitativ festgestellt werden:

Methylamin
 Äthylamin
 n-Propylamin (1-Amino-propan)
 iso-Propylamin (2-Amino-propan)
 n-Butylamin (1-Amino-butan)
 iso-Butylamin (1-Amino-2-methyl-propan)
 n-Amylamin (1-Amino-pentan)
 iso-Amylamin (1-Amino-3-methyl-butan)
 β -Phenyläthylamin
 Pyrrolidin

Eine Unterscheidung der Amine auf Papier- und Dünnschicht-Chromatogrammen ist teilweise aufgrund der verschiedenen Farbreaktionen mit Sprühreagenzien möglich. Mit einer 0,2%igen Ninhydrinlösung in Isopropanol, die 20% Pyridin enthält, färben sich die meisten primären Amine violett an. Die cyclischen Amine zeigen dabei abweichende Farbtöne: Benzylamin ist rotviolett, β -Phenyläthylamin graublau (nach einiger Zeit), Tryptamin rotbraun, Histamin graubraun bis grünbraun, Pyrrolidin gelb bis braun. Der Nachweis mit Ninhydrin ist sehr empfindlich. Mit Isatin-Cadmium nach T. KNAUT (10) entstehen relativ starke Farbabstufungen. Aliphatische Iso-Verbindungen färben sich z. B. primär rotorange, n-Verbindungen rotviolett an, Pyrrolidin wie Prolin intensiv blau.

Nach den bisherigen Feststellungen überwiegen neben Äthylamin die Butyl- und Amylamine sowie β -Phenyläthylamin. Eine gewisse Analogie zur Mengenverteilung der Fuselölkohole in Weinen deutet sich damit an. Histamin konnte bei den bisher untersuchten Weinen nicht mit Sicherheit nachgewiesen werden. Ferner sind Hinweise für das Vorkommen von weiteren primären, von mehreren sekundären sowie von tertiären Aminen und Diaminen vorhanden, z. B. für:

Dimethylamin
Benzylamin
Äthanolamin
Putrescin (1.4-Diamino-butan)
Tryptamin
Tyramin.

Deren Nachweis bedarf noch der Bestätigung durch entsprechende Retentionsvergleiche bzw. differenzierte Nachweismethoden. Ebenso sind die weiteren in Papier-, Dünnschicht- und Gaschromatogrammen aufgetretenen Amine noch zu identifizieren.

Es ist besonders hervorzuheben, daß Amine in allen bisher untersuchten Weinen vorhanden waren; in Weinen derselben Rebsorte und des gleichen Standortes aber verschiedenen Jahrganges, in Weinen aus gesunden wie auch aus edelfaulen Beeren, in Weinen verschiedener Rebsorten wie auch in einfachen Weinen oder Spät- und Auslesen. Durch Anwendung empfindlicher Nachweismethoden zeigte sich, daß in den verschiedenen Weinen weitgehend die gleichen Amine vorliegen; die Unterschiede sind im wesentlichen quantitativer Art.

Die Wirkung von Aminen auf den menschlichen Organismus wird in der Regel aus Tierexperimenten abgeleitet, aus denen sich Hinweise über Dosis und Wirkung ergeben. Es ist indessen zu bedenken, daß die verschiedenen Amine unterschiedlich aus dem Magen-Darm-Kanal resorbiert werden und zum Teil sehr wirksame Systeme für Abbau und Ausscheidung von Aminen vorhanden sind. Ansonsten wäre es unverständlich, daß aminhaltige Lebensmittel wie Sauerkraut, Spinat, Orangensaft oder Tomatensaft, die zum Teil erhebliche Aminmengen enthalten, ohne die vom pharmakologischen Experiment her bekannten akuten Wirkungen verzehrt werden können. Allerdings scheint nach den Befunden von MARQUARDT, SCHMIDT und SFÄTH (6) der Alkoholgehalt des Weines die Wirkung von Histamin zu verstärken.

Neben den qualitativen führen wir quantitative Untersuchungen der Amine von Weinen, Traubenmosten und Rebenmaterial durch. Sollte sich dabei herausstellen, daß bestimmte Amine, bedingt durch die Rebensorte, Pfropfkombination, den Reifegrad der Beeren oder äußere Faktoren wie Pilzbefall der Beeren, Gärführung u. a., verstärkt auftreten, dann wären geeignete Versuche zur Überprüfung der Wirkung dieser Amine zusammen mit Wein durchzuführen.

Zusammenfassung

Im Zusammenhang mit Aminosäuren-Untersuchungen wurden in verschiedenen Weinen biogene Amine aufgefunden. Deren Abtrennung erfolgte durch Ionenaustausch oder Destillation, ihre Auftrennung papier-, dünn- oder gaschromatographisch. Retentionsvergleiche und Nachweisreaktionen weisen auf das Vorkommen von mindestens 20–25 primären, sekundären, tertiären und von Diaminen in Weinen hin. Die Unterschiede der verschiedensten Weine im Gehalt an Aminen sind bevorzugt quantitativer Art.

Literaturverzeichnis

1. STEIN v. KAMIENSKI, E.: Untersuchungen über die flüchtigen Amine der Pflanzen. Mitt. I–IV. *Planta* 50, 291–314, 315–330, 331–352 (1958).
2. GUGGENHEIM, M.: Die biogenen Amine. 4. Aufl., S. Karger-Verl., Basel 1951.
3. DRAWERT, F.: Biochemisch-physiologische Untersuchungen an Traubenbeeren. Das Verhalten der Aminosäuren während der Reifung und der Zucker nach Einfrieren der Beeren. *Vitis* 4, 49–56 (1963).
4. CARLES, J., M. LAMAZOU-BETBEDER und R. PECH: Les acides aminés libres du vin. *C. R. hebd. Séances Acad. Sci.* 246, 1254 (1958).
5. TARANTOLA, C.: *Atti Accad. Ital. Vite e Vino* 6, 146 (1954).
6. MARQUARDT, P., H. SCHMIDT und M. SPÄTH: Histamin in alkoholhaltigen Getränken. *Arzneimittelforsch.* 13, 1100–1101 (1963).
7. HENNIG, K. und K. D. MILLIES: Jahresber. d. Hess. Lehr- und Forschungsanstalt für Wein-, Obst- und Gartenbau Geisenheim. S. 28, 1964.
8. AWAPARA, J., V. E. DAVIS und O. GRAHAM: Chromatographic methods for the identification of biogenic amines. *J. Chromatog.* 3, 11–19 (1960).
9. Vgl. STEIN v. KAMIENSKI, E. in H. F. LINSKENS: *Papierchromatographie in der Botanik*, S. 337 ff. Springer-Verl., Heidelberg 1959.
10. KNAUT, T.: Die Anwendung vom Isatin-Cd.-Komplex zum papierchromatographischen Nachweis von Aminosäuren. *J. Chromatog.* 13, 560–561 (1964).

Eingegangen am 9. 7. 1965

Dr. F. DRAWERT
Forschungs-Institut für Rebenzüchtung
Geilweilerhof
Siebeldingen, Landau/Pfalz