

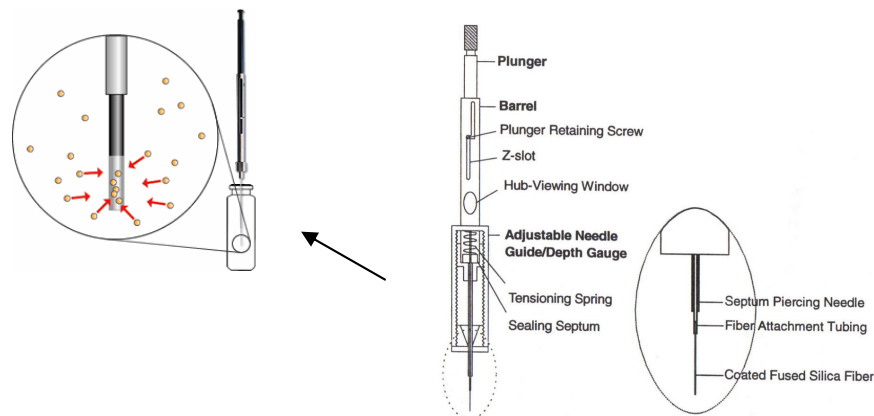
# QUANTIFIZIERUNG AROMARELEVANTER VERBINDUNGEN IN WEISSWEIN MITTELS SPME

Lisa-Maria Zefferer, Erich Leitner

Institut für Analytische Chemie und Lebensmittelchemie, Technische Universität Graz,  
Petersgasse 12/2, 8010 Graz, Austria

Spricht man über Wein und dessen Qualität, so sind es vor allem Aromastoffe, die das sortentypische Bouquet eines Weines sowohl positiv, hinsichtlich angenehm fruchtiger oder floraler Noten, aber auch negativ durch die Bildung von Fehltonen, beeinflussen können.

In der Literatur werden über 800 flüchtige, aromarelevante Verbindungen im Weinaroma zitiert [1]. Dabei wird das sortentypische Weinbouquet meist nur durch eine kleine Anzahl spezifisch und äußerst geruchsaktiver Substanzen, die in relativ niedrigen Konzentrationen, im Mikrogramm- bis Nanogrammbereich vorliegen, gebildet. Viele dieser Verbindungen werden bereits in der Traube generiert, weshalb der Traubenstoffwechsel von wesentlicher Bedeutung für die Weinaromatik ist [2]. Die meisten Substanzen werden während der Fermentation des Traubensaftes gebildet, andere wiederum entwickeln sich im Laufe von Reifungs- und Lagerungsprozessen [3]. Die Bestimmung dieser Verbindungen erweist sich oft als sehr komplex und basiert häufig auf langwierigen Probenvorbereitungsmethoden. Zu den geläufigsten Extraktionstechniken zählen unter anderem die statische Headspace-Analyse, das Purge- und Trap-Verfahren, die Festphasenextraktion und die Flüssig-flüssig Extraktion. Diese Techniken weisen einige Nachteile auf, dazu zählen unter anderem der Einsatz organischer Lösungsmittel, welche zu chromatographischen Überlagerung mit leichtflüchtigen Stoffen neigen, sowie eine oftmals notwendige Konzentrierung der Zielanalyten, um detektierbare Gehalte zu erreichen [4]. Eine lösungsmittelfreie Alternative dazu stellt die Festphasenmikroextraktion (SPME, Solid Phase Microextraction) dar. Sie gilt als eine effiziente, sehr einfach handhabbare und schnelle Probenvorbereitungstechnik. In der folgenden Abbildung ist das Funktionsprinzip der SPME schematisch dargestellt.



**Abbildung 1 Prinzip der HS-SPME [5]**

Zahlreiche Studien belegen, dass es sich bei der Festphasenmikroextraktion um eine rasche und qualitative Screening-Methode handelt. Ihr Einsatz zur quantitativen Bestimmung flüchtiger Verbindungen wird jedoch sehr kritisch betrachtet. Bei Quantifizierungen mit dieser Methode sind einige Parameter wie Matrixeinflüsse oder Verdrängungsreaktionen von unterschiedlichen Analyten an Fasern mit adsorptiven Beschichtungen zu berücksichtigen [6]. Zur Methodenoptimierung müssen Parameter wie beispielsweise die Auswahl der richtigen Faserbeschichtung, geeignete Anreicherungszeit und -temperatur, sowie Probenmenge und Zugabe von Salzen berücksichtigt werden. Die wichtigsten Optimierungsmöglichkeiten werden unter den folgenden Punkten zusammengefasst:

- Polarität und Schichtdicke der Faser
- Art und Weise der Probenentnahme (Headspace oder Eintauchen der Faser in die Probe)
- Probenvolumen
- pH-Wert und Salzkonzentration der Probe
- Extraktions- bzw. Anreicherungszeit
- Agitation der Probe

Des Weiteren muss eine vollständige Desorption der flüchtigen Analyten von der Faser erfolgen. Hinsichtlich der Sorptionsmechanismen kann prinzipiell zwischen absorbierenden und adsorbierenden Fasern unterschieden werden, die aufgrund ihrer Materialeigenschaften unpolar, bipolar oder polar sein können. Neben der Polarität der

Fasern sind außerdem Oberflächen- und Porenstruktur der Beschichtungen von Bedeutung. Während bei Absorptionsfasern die Extraktion auf der Verteilung in dem entstehenden Mehrkomponentensystem basiert, wird bei Adsorptionsfasern das Anreicherungsvermögen durch die Oberflächenbeschaffenheit der Faser determiniert. Im folgenden Absatz werden die Sorptionsmechanismen von SPME-Fasern veranschaulicht sowie unterschiedliche Fasermaterialien und ihre Trennungseigenschaften aufgelistet.

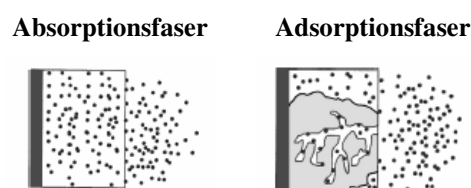


Abbildung 2 Sorptionsmechanismen in der SPME [5]

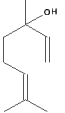
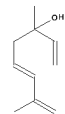
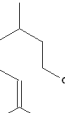
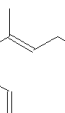
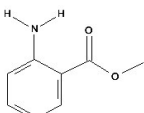
Tabelle 1 Eigenschaften von SPME-Fasern in der GC

Faser	Schichtdicke [ $\mu\text{m}$ ]	Polarität
Polydimethylsiloxan	7 $\mu\text{m}$ , 30 $\mu\text{m}$ , 100 $\mu\text{m}$	unpolar
Polydimethylsiloxan/Divinylbenzen	65 $\mu\text{m}$	bipolar
Polydimethylsiloxan/Carboxen	75 $\mu\text{m}$	bipolar
Carbowax/Divinylbenzen	65 $\mu\text{m}$	polar
Polyacrylat	85 $\mu\text{m}$	polar

Im Zuge der Untersuchung aromarelevanter Substanzen diverser Weißweinsorten wurde eine effiziente und rasche Methode basierend auf HS-SPME gekoppelt mit GC-MS (Gaschromatographie-Massenspektrometrie) zur Quantifizierung terpenoider Verbindungen in Wein entwickelt. Aufgrund ihrer geringen Schwellenwerte und positiven olfaktorischen Eigenschaften (Rose, Lavendel, Apfel, Honig) haben sich Vertreter dieser Substanzklasse als sortentypisches Merkmal und somit als bedeutendes Kriterium bei der Beurteilung der Qualität von Weinen etabliert. Das Hauptaugenmerk der Untersuchung wurde dabei auf typische Vertreter dieser Stoffklasse gelegt. Zusätzlich dazu wurde der Phenylester Methylanthranilat, der aufgrund seiner Fruchtigkeit das Aroma stark beeinflussen kann, sowie die Verbindungen 1,1,6-Trimethyldihydronaphthalin (1,1,6-TDN) und  $\beta$ -Damascenon, bekannt als wichtige Komponenten während der Lagerung und Reifung von Weinen, in die Untersuchungen mit einbezogen. Im Gegensatz zu anderen phenolischen Estern, die aufgrund ihrer geringen Flüchtigkeit und niedrigen Konzentrationen keinen wesentlichen sensorischen

Einfluss auf die Aromatik von Weinen haben, verleiht Methylantranilat *Vitis labrusca* Varietäten ihr typisches traubenartiges Aroma, dem bei höheren Konzentrationen der Begriff „foxy“ (fuchsartig) zugeschrieben wird [7]. Bei den Substanzen 1,1,6-TDN und  $\beta$ -Damascenon hingegen handelt es sich um Abbauprodukte von Carotinoiden, genauer betrachtet entstehen diese durch die saure Hydrolyse ihrer glykosidischen Vorläufer während der Weinlagerung [8]. Übersteigt die Konzentration des 1,1,6-TDN seinen Schwellenwert um das Fünf- bis Zehnfache wird es mit seinen Kerosin- und Petrolnoten als Fehlton angesehen. Faktoren wie beispielsweise ein hoher Säuregehalt in den Trauben, Wasserstress, hohe Sonneneinstrahlung während der Traubenreife aber auch ein geringer Ernteertrag sowie eine späte Lese fördern die Generierung von 1,1,6-TDN. Daneben wird der Petrolton bei Rieslingen von hohen Prädikaten und entsprechender Lagerung über mehrere Jahre jedoch als positiv erachtet [9].  $\beta$ -Damascenon hat aufgrund des sehr niedrigen Schwellenwertes von 2 ng/L in Wasser eine wichtige Bedeutung für die Fruchtigkeit der Weine [10]. Die nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick über die untersuchten Verbindungen, deren Schwellenwerte und ausgewählte Ionen für die massenselektive Bestimmung.

**Tabelle 2 Struktur, selektive Ionen, Geruchsbeschreibung sowie Schwellenwerte ausgewählter Verbindungen**

Verbindung	Struktur	selektive Ionen (m/z)	Geruchsbeschreibung	Schwellenwert [ $\mu\text{g/L}$ ] <sup>[11-18]</sup>
Linalool		136, 121, 93	Blume, Lavendel	2-50
Hotrienol		82, 71, 79	Hyazinthe	25-110
D-Citronellol		123, 81, 69	Rose	15-100
Geraniol		123, 93, 69	Rose, Geranie	30-130
Methylantranilat		151, 119, 92	Blume, Honig	300

Verbindung	Struktur	selektive Ionen (m/z)	Geruchsbeschreibung	Schwellenwert <sup>[11-18]</sup> [ $\mu\text{g/L}$ ]
1,1,6-TDN		172, 142, 115	Kerosin, rauchig	20
$\beta$ -Damascenon		190, 121, 69	Apfel, Rose, Honig	0,002-7
Nerolidol		107, 136, 93	Holz, Blume, Wachs	15-1000

Für die Methode wurde eine 2 cm Stableflex DVB/CAR/PDMS (Divinylbenzen/Carboxen 50/30  $\mu\text{m}$  auf Polydimethylsiloxan) SPME-Faser gewählt, da aufgrund der beiden Adsorptionsschichten Moleküle über einen weiten Molekulargewichtsbereich angereichert werden können. Die Trennung und Bestimmung erfolgte mittels GC-MS auf einer unpolaren Trennsäule. Um Bestimmungsgrenzen (Tab. 3) im Bereich der sensorischen Wahrnehmungsschwelle zu erreichen, wurde mit selected ion monitoring (SIM) bei ausgewählten Fragmentspuren gemessen. Die Quantifizierung erfolgte mittels  $\beta$ -Cyclocitral als interner Standard.

**Tabelle 3 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen (LOD & LOQ)**

Verbindung	LOD [ $\mu\text{g/L}$ ]	LOQ [ $\mu\text{g/L}$ ]
Linalool	0,1	0,4
Hotrienol	0,06	0,2
D-Citronellol	0,7	2,5
Geraniol	0,3	0,9
Methylantranilat	0,3	1
1,1,6-TDN	0,5	1,8
$\beta$ -Damascenon	0,06	0,2
(Z)-Nerolidol	0,2	0,6
(E)-Nerolidol	0,5	1,7

Eine übersichtliche Zusammenfassung der GC-MS Methodenparameter findet sich in Tabelle 4 wieder. Anhand ausgewählter Beispiele werden entsprechende Daten präsentiert.

**Tabelle 4 GC-MS Analysenparameter**

<b>HS SPME GC-MS</b>	
Injektortemperatur	270 °C
Detektortemperatur	280 °C
Constant Flow	0,37 bar bei 50 °C
Solvent Delay	5,5 min
Massenbereich	20-300 amu
Messmodus	Scan; (atune)
Temperaturprogramm	
50 °C (1 min) - 12°C/min - 280 °C (1 min)	
Säulenparameter	
Säule	HP-5 (Optima-5 Accent)
Säulenlänge	30 m
Säulendurchmesser (ID)	0,25 mm
Schichtdicke	1 µm
Trägergas	He

- [1] Berger R.G., Springer 2007, ISBN 978- 3-540-49338-9
- [2] Wüst M., Chemie unserer Zeit 37. Jahrgang (2003) 8-17
- [3] Howell K. S., Swiegers J. H., Elsey G. M., Siebert T. E., Bartowsky E. J., Fleet G. H., Pretorius I. S., de Barros Lopes M. A., FEMs Microbiology Letters 240 (2001) 125-129
- [4] Howard K. L., Mike J. H., Riesen R., Am. J. Enol. and Vitic. 56:1 (2005) 37-45
- [5] [http://www.labhut.com/images/static\\_pages/autosamplers/spme\\_diagram.png](http://www.labhut.com/images/static_pages/autosamplers/spme_diagram.png)
- [6] Self R., Royal Society of Chemistry 2005, ISBN 0-85404-592-9, 247
- [7] Jackson R. S., Academic Press 1994, ISBN 0-12-379062-X, 256
- [8] Rapp A., Chemie unserer Zeit 26. Jahrgang (1992) 273-284
- [9] Winterhalter P., J. Agric. Food Chem. 39 (1991) 1825-1829
- [10] Naiker M., S. Pac. J. nat. Sci., 19 (2001) 11-17
- [11] López R., Aznar M., Cacho J., Ferreira V., Journal of Chromatography A 966 (2002) 167-177
- [12] Palomo S. E., Díaz-Maroto M. C., González Viñas M. A., Soriano-Pérez A., Pérez-Coello M. S., Food Control 18 (2007) 398-403
- [13] Castro-Vázquez L., Díaz-Maroto C., Pérez-Coello M. S., J. Agric. Food Chem. 54 (2006) 4809-4813
- [14] Zea L., Moyano L., Moreno J., Cortes B., Medina M., Food Chemistry 75 (2001) 79-84
- [15] Zalacain A., Marín J., Alonso G. L., Salinas M.R., Talanta 71 (2007) 1610-1615
- [16] <http://d.scribd.com/docs/21uiq7u4pti0c1tn00q2.pdf>
- [17] <https://people.ok.ubc.ca/neggers/Chem422A/VARIETAL%20AROMA%20COMPOUNDS.pdf>
- [18] Mendes-Pinto M. M., Archives of Biochemistry and Biophysics 483 (2009) 236–245