

Der analytische Nachweis der Auslobung „Holzfasslagerung“ bei Weinen und Spirituosen mittels HPLC-MS/MS

Projektverantwortliche: Dr. Alexander Maximilian Voigt^a und Axel Beiler^a

Technische Durchführung: Marco Feyer^a

Durchführung Sensorik-Prüfungen: Martin Kühn^{a,b}

^a Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Rheinland AöR, Winterstraße 19, 50354 Hürth

^b Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW, Fachbereich 85/86, Postfach 101052, 45610 Recklinghausen

Zusammenfassung

Im Rahmen des hier vorgestellten Projektes konnte ein valides Untersuchungsverfahren zur Bestimmung von Holzfassaromen in Rotwein, Weißwein und Spirituosen entwickelt werden. Diese Hochleistungsflüssigchromatographie-Tandemmassenspektrometrie-Methode ermöglicht, unter zu Hilfenahme von isotopenmarkierten Standards sowie einer vorgeschalteten neuartigen Säulenaufarbeitung auf QuEChERS-Basis, den empfindlichen und robusten Nachweis von Ethylvanillin, Syringaldehyd und Vanillin. Ferner konnte Cumarin, ein typischer Aromastoff aus zum Beispiel zimthaltigem Glühwein, in das Untersuchungsspektrum implementiert werden.

Erste Datenerhebungen lassen einen annähernd linearen Zusammenhang zwischen Syringaldehyd und Vanillin in Rotwein, der in Holzfässern ausgebaut wurde, vermuten. Die Gehalte an Vanillin und Syringaldehyd schwankten hierbei zwischen 36,9 und 760 µg/L beziehungsweise 28,2 und 1.322 µg/L. Ebenfalls konnten *cis*- und *trans*-Whiskylactone, die als typische Aromastoffe eine Holzfasslagerung anzeigen, in diesen Rotweinen nachgewiesen werden. Vergleichbare Ergebnisse konnten für die untersuchten Spirituosen mit Holzfassauslobung festgestellt werden. Jedoch ist aufgrund der Vielzahl an untersuchten Spirituosen eine spezifischere Auswertung noch nicht möglich und bedarf einer gezielteren Probenahme (zum Beispiel durch einen Schwerpunkt auf Kornbrand, Whisky oder ähnliches).

Sensorische Untersuchungen (Rangordnungstests) der untersuchten Rotweinproben ergaben eine gute Übereinstimmung des Konsensus-Ergebnisses mit den nachgewiesenen Gehalten an Syringaldehyd und Vanillin. In Whisky konnten zudem vergleichbare Tendenzen zwischen Sensorik und den Gehalten an Vanillin und Syringaldehyd festgestellt werden.

1. Einleitung

Die Wahrung der Qualität und Authentizität von Lebensmitteln ist neben dem Gesundheitsschutz ein wesentlicher Aspekt im Rahmen des Verbraucherschutzes und der Lebensmittelüberwachung. Im Bereich „*Food Fraud*“ stellt Wein neben Produkten wie Olivenöl, Kakao und Schokolade eine der wichtigsten Warengruppen nicht tierischen Ursprungs dar. Schwerpunkte bei der Authentizitätsprüfung sind hierbei zum Beispiel die Überprüfung der geographischen Herkunft sowie einer Verfälschung durch Zugabe von Zuckern oder Wasser.^[1]

Ein weiteres önologisches Merkmal für die Qualität eines Weines – aber auch von Spirituosen - ist das entsprechende Aromaprofil, unter anderem die Holznote, die durch den Ausbau in gerösteten Holzfässern (zum Beispiel Barrique-Fässern) hervorgerufen wird. Gemäß der VO (EU) Nr. 2019/33 darf diese Holzfasslagerung bei Wein ausgelobt werden.

Hervorgerufen wird das Holzfassaroma durch die Auslaugung von unter anderem Lignin-Oxidationsprodukten (zum Beispiel Vanillin, Syringaldehyd, Coniferylaldehyd und Sinapinaldehyd, siehe Abbildung 1) aus der zuvor gerösteten Holzfassinnenoberfläche durch Ethanol. Ausgehend von einer dreimaligen Verwendung eines Barrique-Fasses (1 Fass ~ 400-700 €) bei der Weinherstellung ergeben sich zum Beispiel laut Klein (2012) Mehrkosten für den Ausbau im Holzfass von 0,5-1,0 €/L Wein. Nicht berücksichtigt wurden in diesen Zahlen die unterschiedlichen Lagerzeiten im Holzfass (circa 3-6 Monate je nach Sorte), welche die Mehrkosten pro Liter holzfassgelagertem Wein nochmals erhöhen.^[2]

Eine Möglichkeit diese Holzfassnote bei in Stahlfässern gelagertem Wein vorzutäuschen oder das Aromaprofil bei authentischen Barrique-Weinen weiter auszuprägen, stellt der Zusatz von Vanillin beziehungsweise von synthetischem Ethylvanillin als nicht zugelassenes önologisches Verfahren dar. Auch bei Spirituosen ist ein Zusatz von Vanillin sowie Ethylvanillin (gemäß VO (EG) Nr. 1333/2004 ein nicht zugelassener Zusatzstoff) denkbar, um eine Holzfasslagerung vorzutäuschen beziehungsweise die Holznote weiter auszuprägen.

Zur Überprüfung der Auslobung der oben beschriebenen Holzfasslagerung sowie einer etwaigen unerlaubten Aromatisierung von Wein und Spirituosen können oben genannte Lignin-Oxidationsprodukte und gegebenenfalls deren Verhältniszahlen herangezogen werden.^[2-4] Jedoch ist insbesondere die quantitative Analytik aufgrund der Vielzahl an Zielanalyten und der starken Matrixeinflüsse - bei zum Beispiel Rotweinen - schwierig und aktuell nicht für die Routineanalytik in der Überwachung geeignet.

Im Sinne des Verbraucherschutzes und als robuste Methode zur Authentizitätsprüfung im Bereich Wein und Spirituosen sollte eine LC-MS/MS-Methode zur Bestimmung von natürlichen und synthetischen Holzfassaromen entwickelt und etabliert werden. Ziel ist die quantitative Bestimmung von Lignin-Oxidationsprodukten wie Vanillin, Syringaldehyd und Coniferylaldehyd sowie von synthetischen Aromastoffen, wie Ethylvanillin, die zur Vortäuschung eines Holzaromaprofils in Wein und Spirituosen eingesetzt werden können. Mittels Stabilisotopenverdünnungsanalyse (SIVA) soll eine Kompensation stark unterschiedlich ausgeprägter Matrixeffekte sowie die Berücksichtigung etwaiger Aufarbeitungsverluste erfolgen. Ziel ist es, eine schnelle und robuste Direktinjektionsmethode („*dilute-and-shoot*“) zu entwickeln.

Darüber hinaus sollte versucht werden, Cumarin und 6-Methylcumarin, als typische Aromastoffe in Glühwein und waldmeisterhaltigen Spirituosen, in das Analytenspektrum mit aufzunehmen, um weitere analytische Fragestellungen im Bereich Wein und Spirituosen mit der zu entwickelnden Methode zu bearbeiten.

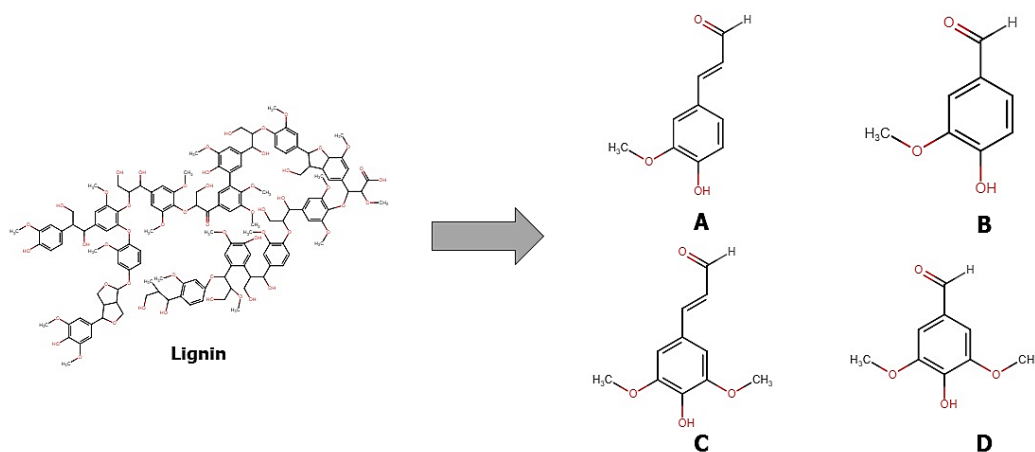


Abbildung 1 Bildung ausgewählter Aromastoffe (**A:** Coniferylaldehyd , **B:** Vanillin, **C:** Sinapinaldehyd, **D:** Syringaldehyd) durch die Oxidation von Lignin während der Röstung von Holzfässern (schematisch)

2. Methodik

1 mL der zu untersuchenden Wein- beziehungsweise Spirituosenprobe wird mit 1 mL 10%iger Ethanollösung gemischt und mit 50 µL des Internen-Mischstandards versetzt. Diese Lösung wird anschließend über eine CrossTox®-Säule (LCTech, Obertaufkirchen) zur weiteren Reduzierung der Matrix aufgereinigt und zur Empfindlichkeitssteigerung eingengt.

Ein Agilent Infinity 1260 LC-System mit einer Nucleoshell PFP Trennsäule (100 mm x 2 mm x 2,7 µm) von Macherey und Nagel (Düren, Deutschland) wird verwendet, um die Zielanalyten chromatographisch voneinander zu trennen. Das Injektionsvolumen entspricht 20 µL. Die Temperatur des Säulenofens beträgt 40 ± 2 °C. Für die chromatographische Trennung wird ein binärer Gradient aus einem Gemisch aus Reinstwasser und Essigsäure (0,1%) und Methanol bei einem Fluss von 0,4 mL/min verwendet.

Die Identifizierung und Quantifizierung der zuvor getrennten Analyten erfolgt mittels Tandemmassenspektrometrie via Agilent 6460 MS/MS-Systems. Die Ionisation der zu untersuchenden Substanzen erfolgt mittels Elektrosprayionisation im negativen sowie positiven Modus. Tabelle 1 zeigt die für die Quantifizierung beziehungsweise Identifizierung herangezogenen zwei charakteristischen Massenübergänge je Substanz inklusive der dazugehörigen MS-Parameter, die zu einer optimalen Signalintensität führen.

Tabelle 1 Substanzspezifische MS Parameter (CE = Collision Energy; CAV = Cell Accelerated Voltage)

Analyt	Vorläufer-Ion	Produkt-Ion	t_R [min]	Δt_R	Fragmentor [V]	CE [V]	CAV [V]	ESI-Modus
Coniferylaldehyd I	177,1	162,0	5,5	1	75	8	4	negativ
Coniferylaldehyd II	177,1	134,0	5,5	1	75	20	4	negativ
Cumarin I	147,0	103,0	5,5	1	125	16	4	positiv
Cumarin II	147,0	91,1	5,5	1	125	24	4	positiv
6-Methyl-Cumarin I	161,1	115,0	8,0	1	125	16	4	positiv
6-Methyl-Cumarin II	161,1	105,0	8,0	1	125	20	4	positiv
Ethylvanillin I	165,1	136,0	5,2	1	90	8	4	negativ
Ethylvanillin II	165,1	92,0	5,2	1	90	20	4	negativ
Sinapinaldehyd I	207,1	192,0	6,0	1	80	8	4	negativ
Sinapinaldehyd II	207,1	177,0	6,0	1	80	16	4	negativ
Syringaldehyd I	181,1	166,1	4,2	1	110	8	4	negativ
Syringaldehyd II	181,1	151,1	4,2	1	110	20	4	negativ
Vanillin I	151,0	136,1	3,3	1	75	8	4	negativ
Vanillin II	151,0	108,1	3,3	1	75	24	4	negativ

Fortsetzung Tabelle 1 Substanzspezifische MS Parameter (CE = Collision Energy; CAV = Cell Accelerated Voltage)

Analyt	Vorläufer-Ion	Produkt-Ion	tR		Fragmentor [V]	CE [V]	CAV [V]	ESI-Modus
			[min]	ΔtR				
<i>Interne Standards</i>								
Cumarin-D ₄ I	151,0	107,0	5,5	1	105	16	4	positiv
Cumarin-D ₄ II	151,0	95,1	5,5	1	105	28	4	positiv
Ethylvanillin-D ₅ I	170,1	138,0	5,2	1	80	8	4	negativ
Ethylvanillin-D ₅ II	170,1	136,0	5,2	1	80	12	4	negativ
Syringaldehyd- ¹³ C ₆ I	187,1	172,0	4,20	1	85	8	4	negativ
Syringaldehyd- ¹³ C ₆ II	187,1	157,0	4,2	1	85	16	4	negativ
Vanillin-Methoxy-D ₃ I	154,0	136,0	3,2	1	80	12	4	negativ
Vanillin-Methoxy-D ₃ II	154,0	108,0	3,2	1	80	24	4	negativ

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1. Methodenentwicklung

Zu Beginn der Methodenentwicklung wurden anhand von Einzelstandards (circa 10 µg/L) in einer Mischung aus Methanol:Wasser (1:1, v/v) + 0,1% Ameisensäure substanzspezifisch die Quasi-Molekülonen identifiziert und in einem darauffolgenden Q3-Scan den intensivsten Fragmentationen zugeordnet. Die daraus erhaltenen Massenübergänge wurden zur Quantifizierung (I) sowie Identifizierung (II) der entsprechenden Zielanalyten verwendet (siehe Tabelle 1). Zur Quantifizierung wurde jeweils der Massenübergang mit der höchsten Signalintensität herangezogen.

Ferner wurden softwareunterstützt die substanzspezifischen MS-Parameter Kollisionsenergie (engl. *Collision energy*, CE), Zellbeschleunigungsspannung (engl. *Cell accelerated voltage*, CAV) und die Fragmentorspannung ermittelt, die zu einer maximalen Signalintensität führten. Die Ergebnisse des Analyttunings (inklusive der isotopenmarkierten Verbindungen) sind in Tabelle 1 dargestellt.

Im folgenden Schritt wurden die ionisationsquellen- beziehungsweise flussabhängigen Potentiale und Parameter optimiert. Ziel war hier eine optimale Signalintensität für einen Großteil der Verbindungen. Um eine höhere Messzeit pro Massenübergang zu erhalten und dementsprechend mehr Datenpunkte pro Verbindung zu gewährleisten, wurde im *dynamic multiple reaction monitoring* (dMRM) Modus gemessen.

Eine optimale chromatographische Trennleistung wurde mittels Pentafluorophenylpropyl-Trennsäule (100 mm x 2 mm x 2,7 µm) von Macherey und Nagel (Düren, Deutschland) erreicht. Diese Säule eignet sich besonders für die Untersuchung von aromatischen sowie phenolischen Verbindungen, inklusive einer guten Isomeren-Trennung aufgrund ihrer ausgeprägten sterischen Selektivität bedingt durch eine Vielzahl an Wechselwirkungsmöglichkeiten (unter anderem Dipol-Dipol-Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen, π-π-Wechselwirkungen).

Um die in Abbildung 2 gezeigte Trennleistung zu erreichen, wurde ein binärer Gradient aus Reinstwasser + 0,1% Essigsäure und Methanol und ein Fluss von 0,4 mL/min verwendet. Der gewählte Gradient erlaubt eine ausreichende Trennung der Zielanalyten bei einer möglichst kurzen Analysendauer (13 min). Um die Haltbarkeit der Trennsäule zu verlängern und Matrixeffekte zu reduzieren, wurde zudem eine Vorsäule (Pentafluorophenylpropyl, 4 mm x 2 mm x 2,7 µm) eingesetzt.

Erste Vorversuche zur Leistungsfähigkeit der Methode zeigten, dass es zu starken Matrixinterferenzen in Rotwein sowie Weißwein nach Direktinjektion kommt (siehe Tabelle 2). Spirituosen wie zum Beispiel Marillenbrand oder Zwetschgenbrand scheinen hingegen weniger starken Matrixeinflüssen zu unterliegen.

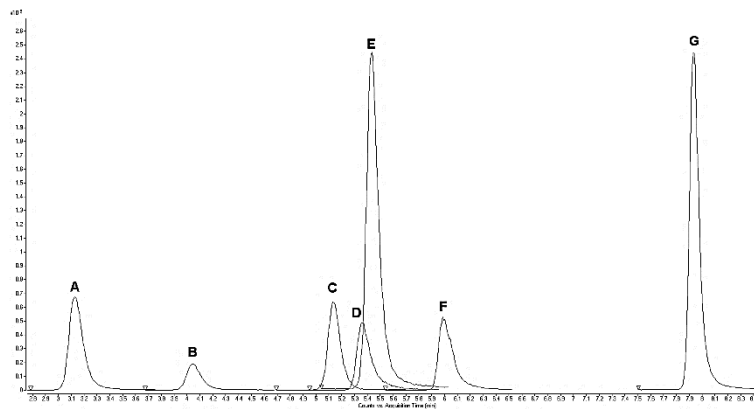


Abbildung 2 *Extracted ion chromatogram* (XIC) eines Mischstandards (300 µg/L, 10%-Ethanol) A: Vanillin ; B: Syringaldehyd ; C: Ethylvanillin ; D: Coniferylaldehyd ; E: Cumarin ; F: Sinapinaldehyd ; G: 6-Methylcumarin

Tabelle 2 zeigt zudem, dass durch die Verwendung von Spritzenvorsatzfiltern eine deutliche Verbesserung der Wiederfindungsraten beziehungsweise eine deutliche Reduzierung der Matrixeinflüsse (vor allem Ionensuppressionen) zu erreichen ist. So konnten zum Beispiel die Wiederfindungsraten von Vanillin in Rotwein von circa 21% (Direktinjektion) auf 65% (PET-Filter) beziehungsweise 61% (RC-Filter) verbessert werden. Vergleichbare Ergebnisse konnten für die weiteren Analyten und Probenmatrices erreicht werden (siehe Tabelle 2). Die Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Filtermaterialien (Polyester (PET) und regenerierter Cellulose (RC) scheinen nicht signifikant zu sein.

Tabelle 2 Wiederfindungsraten ausgewählter Analyten in dotierten Realproben (Rotwein, Weißwein und Spirituosen je 10 µg/L) unter Verwendung einer externen Kalibrierung in 10%-Ethanol nach Filtration über verschiedene Filtermaterialien (PET ; RC, n = 2) sowie unfiltrierter Direktinjektion

Matrix	Wiederfindung nach	6-Methylcumarin [%]	Cumarin [%]	Ethylvanillin [%]	Syringaldehyd [%]	Vanillin [%]
Weißwein	Direktinjektion	58,0	77,6	35,8	19,2	33,8
	PET-Filter	84,9	100,6	73,9	58,8	72,8
	RC-Filter	84,7	99,9	72,8	56,0	72,5
Rotwein	Direktinjektion	69,7	64,5	24,1	15,3	20,9
	PET-Filter	89,8	94,6	63,2	59,4	64,9
	RC-Filter	90,2	91,5	65,1	58,0	61,2
Marillenbrand	Direktinjektion	82,1	100,3	57,2	97,6	49,1
	PET-Filter	93,9	110,5	96,0	101,2	100,1
	RC-Filter	95,5	111,5	95,8	101,9	100,8
Zwetschgenbrand	Direktinjektion	93,3	110,0	97,9	97,0	114,3
	PET-Filter	95,7	111,8	102,1	99,5	112,4
	RC-Filter	97,6	113,1	104,2	102,0	114,5

Das Ausmaß der Matrixeffekte auf die zu untersuchenden Zielanalyten zeigen ferner die in Abbildung 3 exemplarisch dargestellten Kalibriergeraden für Ethylvanillin, Syringaldehyd sowie Vanillin.

Für die Matrices Rotwein, Weißwein und Roséwein kommt es für alle drei Analyten zu starken Matrixsuppressionen im Vergleich zur Kalibrierung in 10%-Ethanol. Den stärksten Matrixeinflüssen unterliegen die Zielanalyten in Rotwein, gefolgt von Roséwein und Weißwein.

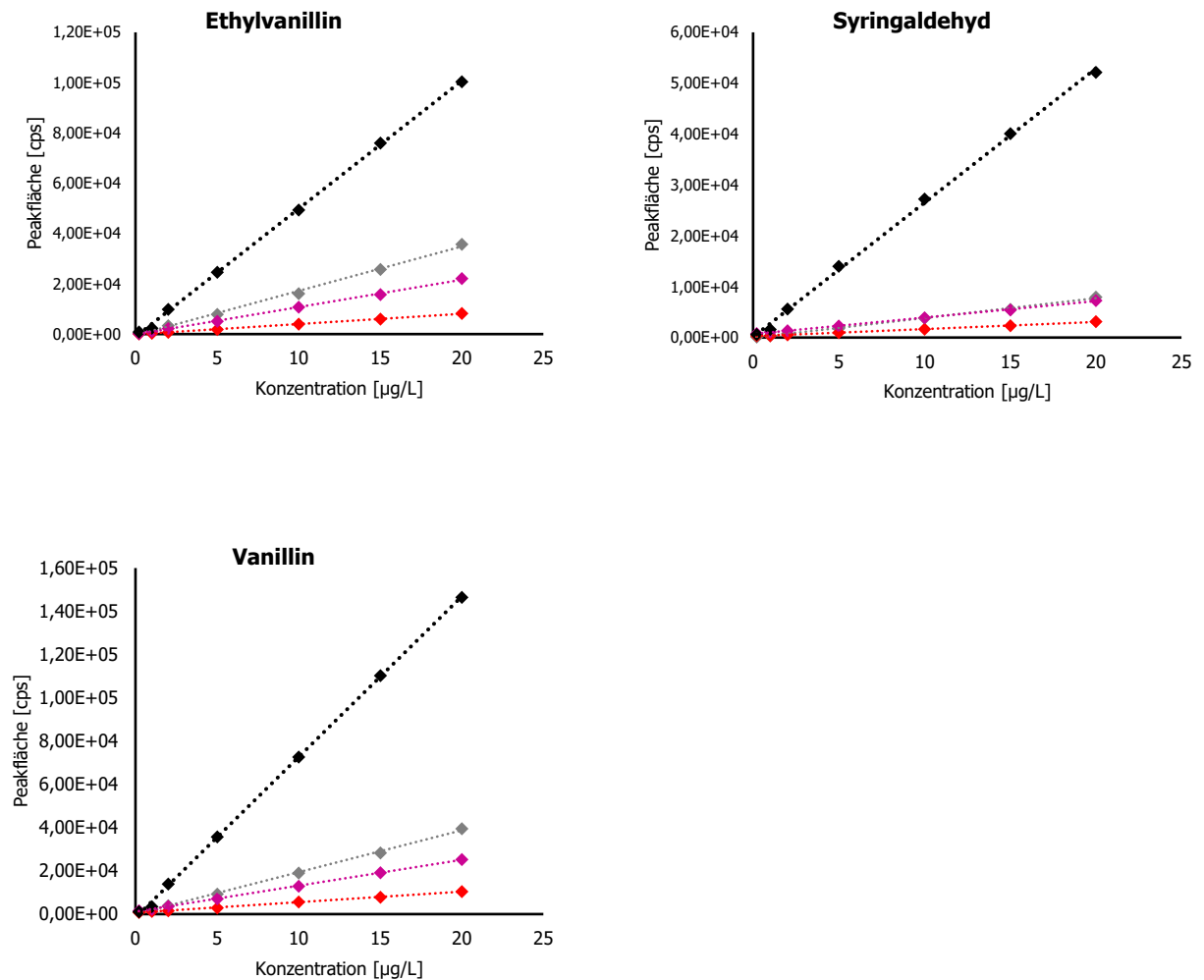


Abbildung 3 Gegenüberstellung der Empfindlichkeit ausgewählter Analyten (Ethylvanillin, Syringaldehyd und Vanillin) anhand unterschiedlicher externer Matrixkalibrierungen (10%-EtOH = schwarz; Weißwein = grau; Rotwein = rot; Roséwein = lila)

Aufgrund dieser starken Matrixeinflüsse erscheint eine externe Lösemittelkalibrierung (bisher 10%iger Ethanol) für eine robuste und routinegeeignete Untersuchung von Holzfassaromen in Spirituosen, Rot- und Weißweinen als nicht geeignet. Ferner kann eine Kalibrierung in einer Blankmatrix aufgrund der deutlich abweichenden Empfindlichkeiten der Analyten nicht übergreifend für Weißwein, Roséwein, Rotwein und Spirituosen empfohlen werden.

Zur Kompensation der Matrixeinflüsse wurde statt einer aufwändigen Standardaddition die zeiteffizientere Methodik der Stabilisotopenverdünnungsanalyse (SIVA) als Lösungsansatz gewählt. Die Zugabe von isotope markierten Strukturanalogs vor der gesamten Aufarbeitung und Verdünnung der Probe ermöglicht, neben der Kompensation der Matrixeffekte, eine Korrektur etwaiger Filtrationsverluste und Verdünnungsfehler.

Mit Vanillin-Methoxy-D₃, Ethylvanillin-D₅, Syringaldehyd-¹³C₆ sowie Cumarin-D₄ konnten für vier von sieben Zielanalyten die entsprechenden isotope markierten Verbindungen in der Untersuchungsmethode implementiert werden.

Für Sinapinaldehyd sowie Coniferylaldehyd konnten keine isotopenmarkierten strukturanalogen Verbindungen als Interne Standards käuflich erworben werden.

Die Verwendung von $^{13}\text{C}_6$ -Syringaldehyd als Interner Standard für die Quantifizierung von Coniferylaldehyd und Sinapinaldehyd zeigte hierbei keine optimale Kompensation der Matrixeffekte, was sich in niedrigen Wiederfindungsraten widerspiegelte (Coniferylaldehyd: 67,3% ; Sinapinaldehyd: 33,0% ; jeweils n = 7).

Auf diesen Erkenntnissen aufbauend sollte abschließend eine zeiteffiziente und kostengünstige Probenvorbereitung etabliert werden, um die Empfindlichkeit der Analyten in Matrix zu verbessern und bessere Wiederfindungsraten, insbesondere für Sinapinaldehyd und Coniferylaldehyd, zu erzielen. Valente et al. (2013) beschrieb ein Verfahren zur Untersuchung von Polyphenolen mittels QuEChERS-Aufbereitung.^[5] Auf Basis dieser Erkenntnisse wurde eine neuartige Säulenaufreinigung und Analytanreicherung mittels CrossTox® (LCTech, Obertaufkirchen) ausgetestet, die mit einer nicht dispersiven QuEChERS-Aufreinigung verglichen werden kann. Diese ist bereits aus dem Bereich der Mykotoxinanalytik bekannt und reduziert im Vergleich zum konventionellen (dispersen) QuEChERS-*Dilute-and-Shoot*-Ansatz die Verschmutzung des Massenspektrometers und gleichzeitig die Anzahl an Wartungen beziehungsweise erhöht die Zeiträume der Wartungsintervalle.^[6]

Es zeigte sich, dass eine Verdünnung (1:1) der Probe vor Aufgabe auf die Säule, das Waschen mit 2 mL Wasser sowie eine Elution mit 1 mL Methanol (+0,1% Ameisensäure) zu guten Wiederfindungsraten führt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine Empfindlichkeitssteigerung durch das Einengen (Faktor 2) des Messextraktes und Resuspendieren in verringertem Volumen möglich ist. Die finalen Wiederfindungsraten nach Aufreinigung, Anreicherung und Zuhilfenahme Interner Standards sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3 Mittlere Wiederfindungsraten [%], Standardabweichungen [$\mu\text{g/L}$] und relative Standardabweichungen [%] dotierter Rotwein-, Weiß- und Spirituosenmatrix (Dotierlevel 5 $\mu\text{g/L}$ sowie 75 $\mu\text{g/L}$, je n = 7)

Analyt	Konz. [$\mu\text{g/L}$]	Rotwein				Weißwein			
		Wiederf. [$\mu\text{g/L}$]	Wiederf. [%]	STD [$\mu\text{g/L}$]	RSTD [%]	Wiederf. [$\mu\text{g/L}$]	Wiederf. [%]	STD [$\mu\text{g/L}$]	RSTD [%]
6-Methylcumarin	5	5,2	105,5	0,15	3,0	5,3	104,0	0,13	2,5
6-Methylcumarin	75	81,6	108,9	1,78	2,2	81,2	108,3	2,19	2,7
Coniferylaldehyd	5	5,5	105,6	0,54	9,8	6,4	128,3	0,28	4,3
Coniferylaldehyd	75	83,4	111,8	3,48	4,2	106,7	142,0	4,50	4,2
Cumarin	5	4,8	93,9	0,10	2,1	4,9	96,7	0,11	2,3
Cumarin	75	74,0	97,4	0,44	0,6	74,6	98,1	0,13	0,2
Ethylvanillin	5	4,8	94,6	0,42	8,8	4,8	96,4	0,21	4,3
Ethylvanillin	75	74,4	98,3	1,03	1,4	74,7	97,8	1,37	1,8
Sinapinaldehyd	5	5,0	97,6	0,19	3,8	5,9	116,0	0,18	3,0
Sinapinaldehyd	75	71,6	92,0	3,61	5,0	104,1	134,8	5,51	5,3
Syringaldehyd	5	5,1	99,7	0,12	2,4	5,0	96,5	0,16	3,2
Syringaldehyd	75	75,4	99,0	0,88	1,2	73,6	96,2	0,87	1,2
Vanillin	5	5,1	99,7	0,12	2,4	4,9	97,4	0,06	1,3
Vanillin	75	75,3	98,4	0,33	0,4	75,03	98,2	0,09	0,1

Fortsetzung Tabelle 3 Mittlere Wiederfindungsraten [%], Standardabweichungen [$\mu\text{g/L}$] und relative Standardabweichungen [%] dotierter Rotwein-, Weiß- und Spirituosenmatrices (Dotierlevel 5 $\mu\text{g/L}$ sowie 75 $\mu\text{g/L}$, je $n = 7$)

Analyt	Konz. [$\mu\text{g/L}$]	Spirituosen			
		Wiederf. [$\mu\text{g/L}$]	Wiederf. [%]	STD [$\mu\text{g/L}$]	RSTD [%]
6-Methylcumarin	5	9,6	170,8	2,21	23,1
6-Methylcumarin	75	161,0	236,3	36,31	22,5
Coniferylaldehyd	5	9,0	178,6	0,55	6,1
Coniferylaldehyd	75	133,7	177,2	6,14	4,6
Cumarin	5	5,1	100,3	0,10	1,9
Cumarin	75	76,4	100,1	1,19	1,6
Ethylvanillin	5	5,1	103,2	0,11	2,2
Ethylvanillin	75	75,7	100,3	0,53	0,7
Sinapinaldehyd	5	9,5	189,8	1,44	15,2
Sinapinaldehyd	75	131,2	175,6	28,43	21,7
Syringaldehyd	5	5,4	106,0	0,03	0,6
Syringaldehyd	75	75,2	98,1	1,01	1,3
Vanillin	5	5,1	99,7	0,20	3,8
Vanillin	75	75,4	98,7	0,09	0,1

3.2. Methodenvalidierung

Zur abschließenden Absicherung der Leistungsfähigkeit des hier entwickelten Analyseverfahrens erfolgte die Validierung des Prüfverfahrens in dotiertem Weißwein, Rotwein und Spirituosen unter Zuhilfenahme der isotope markierten Standards in Verbindung mit einer vorgeschalteten CrossTox®-Säulenaufreinigung und -anreicherung.

3.2.1. Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Mittels Kalibriergeradenverfahren (10-Punkt-Kalibrierung) wurde die Empfindlichkeit der verschiedenen Analyten in der Kalibrierlösung (= 10%iger Ethanol) untersucht. Die hierbei errechneten theoretischen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen sind in Tabelle 4 aufgeführt. Abbildung 4 zeigt exemplarisch die Kalibriergeraden für die Analyten Vanillin, Syringaldehyd und Ethylvanillin.

Tabelle 4 Mittels Kalibriergeradenverfahren berechnete Nachweisgrenze (NG) und Bestimmungsgrenze (BG) in der Messlösung [$\mu\text{g/L}$] sowie unter Berücksichtigung des Anreicherungsfaktors bezogen auf die zu untersuchende Probe [$\mu\text{g/L}$]

Analyt	NG (Messextrakt) [$\mu\text{g/L}$]	BG (Messextrakt) [$\mu\text{g/L}$]	NG (Probe) [$\mu\text{g/L}$]	BG (Probe) [$\mu\text{g/L}$]
6-Methylcumarin	1,2	4,4	0,6	2,2
Coniferylaldehyd	2,3	8,1	1,2	4,1
Cumarin	2,1	7,3	1,1	3,7
Ethylvanillin	1,7	6,0	0,9	3,0
Sinapinaldehyd	2,1	7,5	1,1	3,8
Syringaldehyd	1,6	5,9	0,8	3,0
Vanillin	2,1	7,5	1,1	3,8

Die gemäß Kalibriergeradenverfahren rechnerisch ermittelten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für die Kalibrierlösung können nicht direkt auf die zu untersuchenden Matrices übertragen werden. Das Fehlen von analytfreier Matrix, insbesondere für Vanillin und Syringaldehyd, erschwert eine rechnerische Ermittlung und erfordert für die Festlegung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen in den Proben einen Sicherheitsabstand zu den gemäß Kalibriergeradenverfahren ermittelten Grenzen.

Für die Analyten Vanillin, Ethylvanillin, Cumarin und 6-Methylcumarin wird eine Bestimmungsgrenze von 10 µg/L Probe festgelegt. Für die Analyten Syringaldehyd, Coniferylaldehyd und Sinapinaldehyd wird eine Bestimmungsgrenze von 25 µg/L Probe festgelegt. Die Nachweisgrenze wird konventionenmäßig auf die halbe Bestimmungsgrenze gelegt (5 µg/L für Ethylvanillin, Vanillin, Cumarin sowie 6-Methylcumarin und 10 µg/L für Syringaldehyd, Coniferylaldehyd und Sinapinaldehyd).

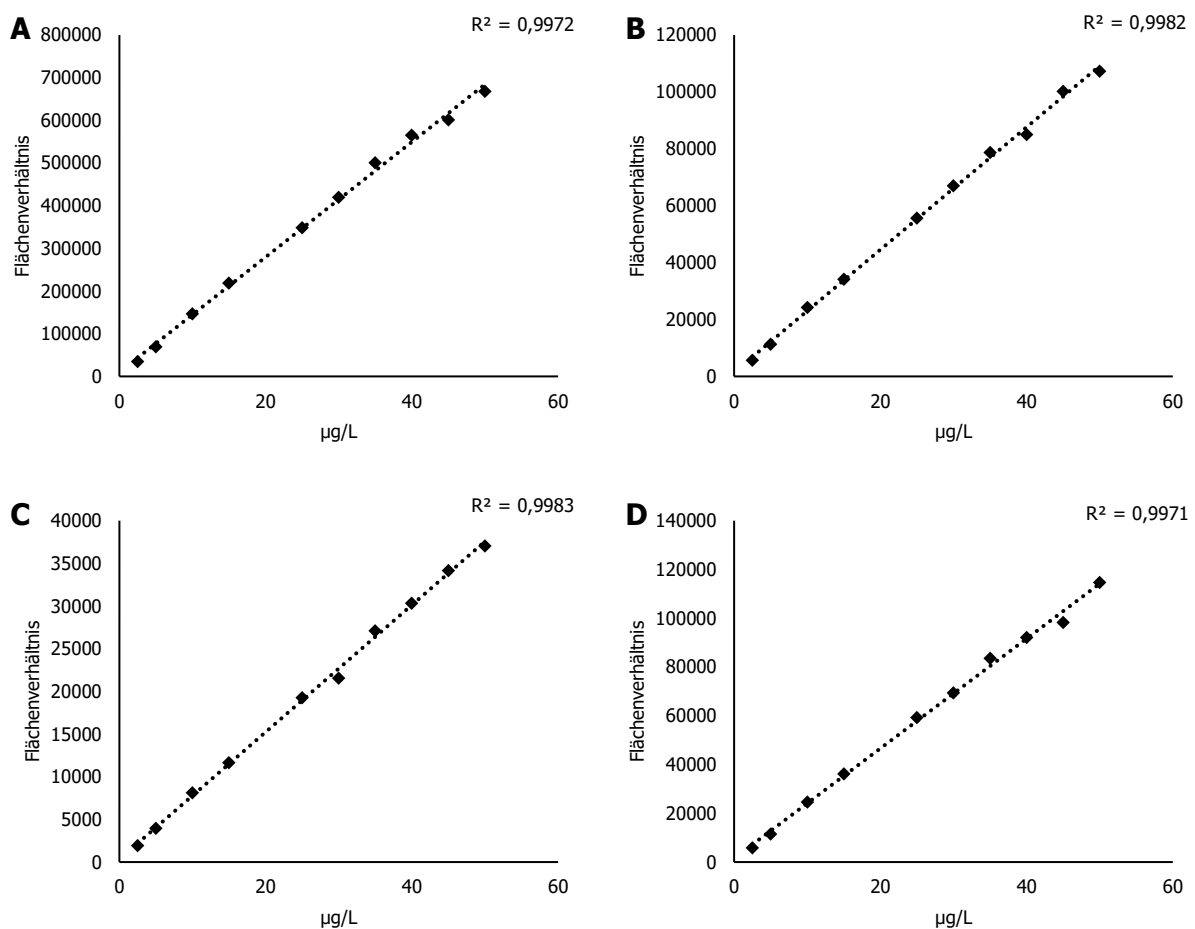


Abbildung 4 10-Punkt-Kalibriergeraden von Cumarin (A), Ethylvanillin (B), Syringaldehyd (C) und Vanillin (D) in 10%iger Ethanolösung zur Bestimmung der „Geräteempfindlichkeit“

3.2.2. Wiederfindungsexperimente und Präzisionsdaten

Zur Abschätzung der Richtigkeit sowie der Präzision unter Wiederholbedingungen wurden ein Rotwein, ein Weißwein sowie eine Spirituose mit 5 µg/L beziehungsweise 75 µg/L (jeweils n = 7) der zu untersuchenden Substanzen dotiert und die Wiederfindungsraten sowie die Präzisionsdaten nach Probenaufarbeitung und LC-MS/MS-Messung ermittelt. Tabelle 3 zeigt die entsprechenden Wiederfindungsraten, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten nach Abzug etwaiger Blindwerte der undotierten Proben.

Insgesamt konnten gute Wiederfindungsraten für Cumarin (93,3% - 100,3%), Ethylvanillin (94,6% - 103,2%), Syringaldehyd (96,2% - 106,0%) sowie Vanillin (97,4% - 99,4%) durch die Aufreinigung und Anreicherung mittels CrossTox® - Extraktion sowie die Verwendung isotope markierter strukturanaloger Interner Standards in Rotwein, Weißwein und Spirituosen erzielt werden. Ebenfalls wurden so verbesserte Variationskoeffizienten (0,1% - 8,8%) erzielt. Demnach kann die Leistungsfähigkeit der hier vorgestellten Untersuchungsmethode für die oben genannten Analyten bestätigt werden. Eine weitere Absicherung erfolgt via Teilnahme an externen Laborvergleichsuntersuchungen beziehungsweise Ringversuchen (siehe Abschnitt 3.3.).

Die Ergebnisse aus Abschnitt 3.1. sowie 3.2.2. zeigen jedoch auch, dass eine Korrektur der Analysenergebnisse zur Kompensation von Matrixeffekten unter Zuhilfenahme von Internen Standards benötigt wird, um valide Ergebnisse zu generieren. Insbesondere die hohen Wiederfindungsraten für 6-Methylcumarin (in Spirituosen), Coniferylaldehyd sowie Sinapinaldehyd, für die zurzeit keine passenden Internen Standards zur Verfügung stehen, sowie deren hohe Variationskoeffizienten in dotierten Weißweinproben ($n = 7$) und in dotierten Spirituosen ($n = 7$) zeigen, dass trotz Aufreinigung und Anreicherung via CrossTox®, strukturanaloge Interne Standards benötigt werden. Demnach erscheinen diese Analyten in der hier vorgestellten Methode nur bedingt für die quantitative Routineanalytik im Rahmen der Lebensmittelüberwachung geeignet. Die Implementierung dieser Analyten sollte jedoch einfach durchzuführen sein, sobald diese Verbindungen isotope markiert käuflich zu erwerben sind.

3.2.3. Linearer Bereich

Der lineare Bereich wurde anhand dreier Kalibriergeraden für den Bereich von 5 µg/L bis 300 µg/L festgelegt ($r^2 = 0,9980 - 0,9992$). Unter Berücksichtigung des Anreicherungs-faktors (2) ergibt sich auf die Probe bezogen ein linearer Bereich von 2,5 µg/L bis 150 µg/L.

3.3. Teilnahme an Laborvergleichsuntersuchung

Als weitere Überprüfung der Richtigkeit – neben der Ermittlung der Wiederfindungsraten dotierter Proben - wurde mit dem hier vorgestellten Analysenverfahren an zwei internationalen Laborvergleichsuntersuchungen in Rotwein (Bipea, Frankreich) beziehungsweise Whisky (LGC, England) teilgenommen.

Zum Zeitpunkt der Berichterstattung lagen die Ergebnisse der oben aufgeführten Laborvergleichsuntersuchungen noch nicht vor. Darüber hinaus ist eine weitere Teilnahme an Laborvergleichsuntersuchungen für Januar 2022 (DAPS PT DP108 - B1, LGC) sowie April 2022 (PTS 81, Bipea) geplant.

4. Datenerhebung

4.1. Weinproben

Im Rahmen des hier zusammengefassten Untersuchungsprojektes „Holzfassaromen in Wein und Spirituosen“ wurden insgesamt 25 Weine (24x Rotwein und 1x Weißwein) sowie 25 Spirituosen, die aufgrund einer Holzfasslagerung beziehungsweise eines Holzfassausbaus ausgelobt wurden, auf Holzfassaromen (Vanillin, Syringaldehyd etc.) untersucht. Darüber hinaus wurden diese Proben im CVUA Rheinland mittels GC-MS auf den Gehalt an *cis*- und *trans*-Whiskylactone untersucht.

In allen Weinproben wurde Syringaldehyd (28 µg/L bis maximal 1.322 µg/L; Median = 141 µg/L) sowie Vanillin (37 µg/L bis maximal 760 µg/L, Median = 131 µg/L) nachgewiesen. In keiner Weinprobe konnte ein unzulässiger Zusatz von Ethylvanillin (NG = 5 µg/L; BG = 10 µg/L) nachgewiesen werden. Ferner konnte kein Sinapinaldehyd und Coniferylaldehyd (je NG = 10 µg/L; BG = 25 µg/L) nachgewiesen werden. In den untersuchten Weinproben lag das Verhältnis von Syringaldehyd zu Vanillin zwischen 0,4 und 1,6, wobei der Median 0,9 betrug.

In allen Weinproben konnte *cis*-(3S4S)-Whiskylacton (16 µg/L bis maximal 444 µg/L, Median = 96 µg/L) sowie *trans*-(3S4R)-Whiskylacton (9 µg/L bis maximal 66 µg/L, Median = 26 µg/L) nachgewiesen werden, wobei das *trans*-Isomer stets in niedrigeren Konzentrationen vorlag als das *cis*-Isomer. Die Verhältnisse von *cis*-(3S4S)- zu *trans*-(3S4R)-Whiskylacton lag hierbei zwischen 1,2 und 8,8 (Median = 4,8). Des Weiteren konnte in keiner Probe *cis*-(3R4R)-Whiskylacton beziehungsweise *trans*-(3R4S)-Whiskylacton nachgewiesen werden (beide NG = 0,25 µg/L; BG = 0,90 µg/L). Diese Tendenzen stehen im Einklang mit den von Froschmeier (2018) und Cameleyre et al. (2020) veröffentlichten Ergebnissen. [7-8]

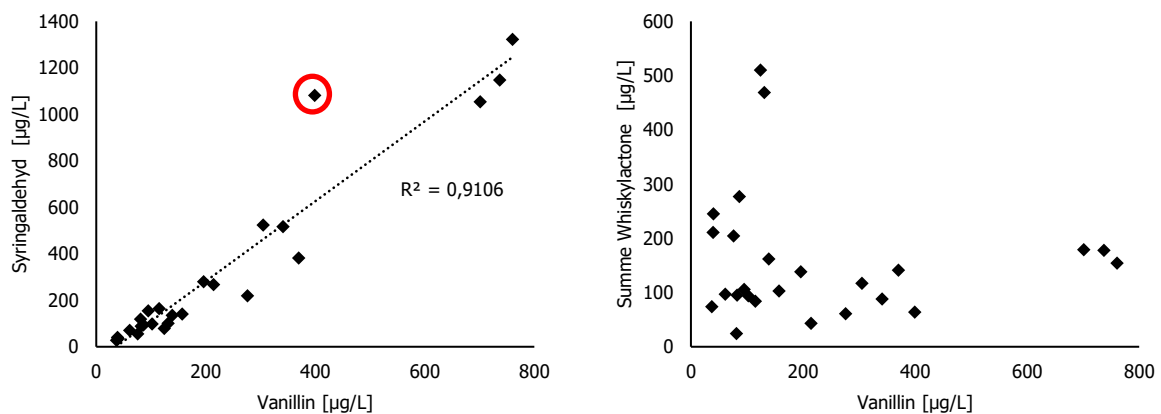


Abbildung 5 Graphischer Zusammenhang zwischen Vanillin und Syringaldehyd (links) sowie zwischen Vanillin und der Summe an Whiskylactonen (rechts) in den 2021 untersuchten Weinproben

Abbildung 5 zeigt, dass ein linearer Zusammenhang zwischen der Konzentration an Vanillin und der Konzentration an Syringaldehyd vermutet werden kann ($r^2 = 0,9106$). Um dies abschließend zu bestätigen, muss jedoch eine größere Anzahl an Stichproben untersucht werden.

Lediglich ein Wein (rot markiert) scheint von diesem Zusammenhang abzuweichen, was durch einen positiven Ausreißertest mittels Valoo bestätigt wurde. Interessanterweise handelt es sich hierbei um den einzigen Weißwein, der im Rahmen des Projektes untersucht wurde, einem Chardonnay aus 2020 (Pays d’Oc, Frankreich). In diesem konnte ein Vanillingehalt von 399 µg/L sowie ein Syringaldehydgehalt in Höhe von 1.081 µg/L nachgewiesen werden.

Demnach sollten weitere Weißweine mit ausgelobter Holzfasslagerung untersucht werden, um so eine getrennte Auswertung durchführen und etwaige charakteristische Unterschiede zwischen Rotwein und Weißwein herausstellen zu können, die für die rechtliche Beurteilung benötigt werden. Ferner könnte der Zusammenhang zwischen Vanillin und Syringaldehyd zur Authentizitätskontrolle weiter spezifiziert und herausgearbeitet werden, in dem eine spezifische Auswertung und Betrachtung von Rotweinen aus dem gleichen Herkunftsland, der gleichen Rebsorte sowie der gleichen verwendeten Holzfasssorte erfolgt.

Im Gegensatz hierzu zeigen die Untersuchungsergebnisse, dass kein genereller Zusammenhang zwischen dem Gehalt an Vanillin und der Summe aus *cis*- und *trans*-Whiskylactonen in den untersuchten Rotweinen vorliegt (siehe Abbildung 5, rechts). Dies könnte unter anderem daran liegen, dass die oben genannten schwerer flüchtigen Verbindungen (Vanillin und Syringaldehyd) sowie die flüchtigeren Verbindungen (Whiskylactone) unterschiedliche Vorläuferverbindungen besitzen und der Gehalt und die Zusammensetzung von Holzaromastoffen im allgemeinen von unterschiedlichsten Faktoren abhängen (unter anderem Holzart, Herkunft des Holzes, Standzeit der Spirituose beziehungsweise des Weines, Alkoholgehalt oder auch die Art der thermischen Behandlung des Holzes).^[2, 9]

4.2. Spirituosen

In den untersuchten Spirituosen konnten in 23 der 25 (= 92%) Proben Vanillin (<10 µg/L bis maximal 171.965 µg/L; Median = 232 µg/L) und in 18 der 25 (= 72%) Proben Syringaldehyd (<25 µg/L bis maximal 8.693 µg/L; Median = 435,5 µg/L) nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den untersuchten Weinproben waren in 14 von 25 (= 56%) Spirituosen sowohl Coniferylaldehyd (60,1 µg/L bis maximal 5.662 µg/L; Median = 219,5 µg/L) als auch Sinapinaldehyd (91,4 µg/L bis maximal 4.705 µg/L; Median = 319 µg/L) nachweisbar. Das Verhältnis von Syringaldehyd zu Vanillin betrug dabei 0,3 bis 2,4.

Ferner konnten in 16 von 25 (= 64%) Proben Whiskylactone nachgewiesen werden. Auch hier konnten nur die holzfasstypischen *cis*-(3S4S)-Whiskylacton (2,0 µg/L bis maximal 3.120 µg/L, Median = 76,1 µg/L) und *trans*-(3S4R)-Whiskylacton (4,0 µg/L bis maximal 366 µg/L, Median = 93,5 µg/L) nachgewiesen werden. In keiner Probe waren *cis*-(3R4R)-Whiskylacton beziehungsweise *trans*-(3R4S)-Whiskylacton nachweisbar (beide NG = 0,25 µg/L; BG = 0,90 µg/L). Weiterhin scheint *cis*-(3S4S)-Whiskylacton stets in höheren Konzentrationen vorzukommen als *trans*-(3S4R)-Whiskylacton. Die Verhältnisse von *cis*-(3S4S)- zu *trans*-(3S4R)-Whiskylacton lagen zwischen 1,5 und 11,1 (Median = 7,3).

Im Gegensatz zu den untersuchten Rotweinproben konnte kein eindeutiger Zusammenhang zwischen den Gehalten an Vanillin und Syringaldehyd beziehungsweise der Summe aus *cis*- und *trans*-Whiskylactonen probenübergreifend festgestellt werden (siehe Abbildung 6).

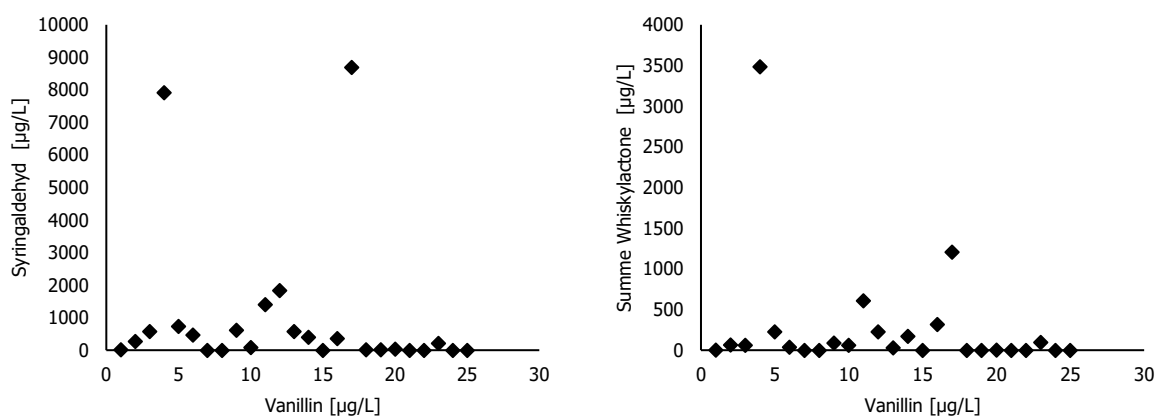


Abbildung 6 Graphischer Zusammenhang zwischen Vanillin und Syringaldehyd (links) sowie zwischen Vanillin und der Summe an Whiskylactonen (rechts) in den 2021 untersuchten Spirituosen

Die wahrscheinlichste Erklärung hierfür ist die Vielzahl an unterschiedlichen Spirituosenarten, die untersucht wurden (siehe Anhang Tabelle A2). Denn die Probenauswahl enthielt neben Spirituosen mit Holzfassauslobung (zum Beispiel Whiskys, Weinbrand sowie Grappa, siehe Tabelle A2) ebenfalls Spirituosen ohne Holzfassauslobung (unter anderem vier Gins und ein Ouzo mit indirekter Holzfassauslobung, siehe Tabelle A2) sowie Spirituosen, die aufgrund ihrer Verkehrsbezeichnung „Spirituose“ gemäß den VO (EU) Nr. 2019/787 in Verbindung mit VO (EG) Nr. 1334/2008 sowie VO (EG) Nr. 872/2012 zulässigerweise mit zum Beispiel Vanillin aromatisiert werden dürfen.

Die unterschiedlichen Ausgangsstoffe, Herstellungsbedingungen etc. führen zudem zu einer deutlich höheren Anzahl an Variablen im Vergleich zu den untersuchten Rotweinproben und erschweren die statistische Auswertung. Insbesondere sei erwähnt, dass diese Analysenmethode nicht zwischen zugesetztem Vanillin (natürlich oder synthetisch) und Vanillin, welches aus dem Holzfass extrahiert wurde, unterscheiden kann. Diese Differenzierung gelingt nur anhand des gleichzeitigen Nachweises von unter anderem Syringaldehyd – ein Beispiel hierfür stellt die im Fazit erläuterte Spirituose mit Geschmacksrichtung Haselnuss dar.

Dies untermauert die getrennte Auswertung der explizit ausgelobten Spirituosen entsprechend der Anmerkung in Tabelle A2 (siehe Abbildung 7) sowie beispielhaft der fünf untersuchten Whiskyproben (siehe Abbildung 8). Demnach scheinen auch für Spirituosen Vanillin und Syringaldehyd geeignete Marker für den Nachweis einer Holzfasslagerung zu sein. Jedoch wird für eine weiterführende Bewertung eine größere Stichprobenmenge pro Spirituosenkategorie benötigt (zum Beispiel Whisky, Weinbrand sowie Grappa/Trester).

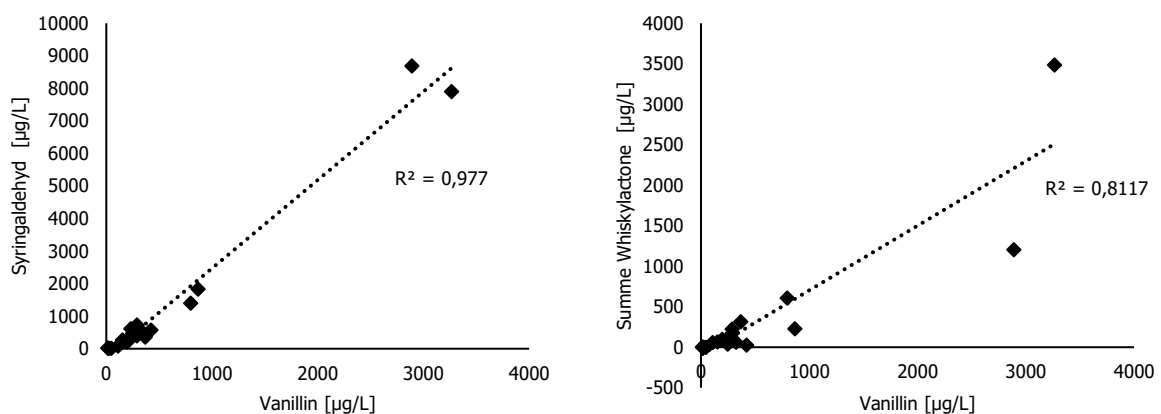


Abbildung 7 Graphischer Zusammenhang zwischen Vanillin und Syringaldehyd (links) sowie zwischen Vanillin und der Summe an Whiskylactonen (rechts) in den explizit ausgelobten Spirituosen (2021, siehe Tabelle A2)

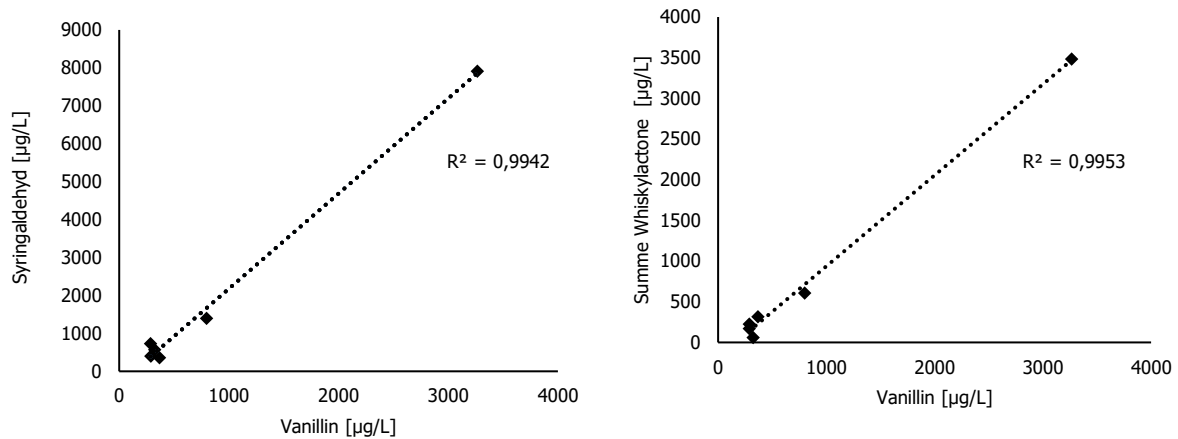


Abbildung 8 Graphischer Zusammenhang zwischen Vanillin und Syringaldehyd (links) sowie zwischen Vanillin und der Summe an Whiskylactonen (rechts) in den fünf untersuchten Whiskyproben (2021)

4.3. Vergleich Instrumentelle Analytik versus Sensorik

Es konnte gezeigt werden, dass das Verhältnis zwischen Vanillin und Syringaldehyd in Rotweinen durchschnittlich bei circa 1 liegt. Diesbezüglich konnte für Spirituosen allgemein kein eindeutiger Zusammenhang ermittelt werden. Im Folgenden sollen für fünf ausgewählte Rotweine sowie für die fünf untersuchten Whiskys die Ergebnisse der LC-MS/MS-Messung in einem Rangordnungstest mit den Ergebnissen einer sensorischen Prüfung verglichen werden (siehe Abbildung 9).



Abbildung 9 Versuchsanordnung Rangordnungstest Whisky- und Rotweinproben (2021)

Die Konsensus-Ergebnisse in Tabelle 5 der Sensorikprüfung (3 Prüfer) zeigten eine sehr gute Übereinstimmung mit den analytisch nachgewiesenen Gehalten an Vanillin und Syringaldehyd. So zeigt Tabelle 5 eine identische Rangordnung für den Gehalt an Vanillin, den Gehalt an Syringaldehyd sowie die Intensität der Holznote. Eine größere Diskrepanz ergibt sich beim Vergleich des sensorischen Eindruckes „Holznote“ mit den Gehalten an *cis*- und *trans*-Whiskylactonen. Demnach scheinen für Rotwein Vanillin und Syringaldehyd bessere Marker im Vergleich zu den Whiskylactonen zu sein, um eine Holzfassausblobung bei negativem Sensorikbefund beziehungsweise bei erschwerter Sensorik zu überprüfen. So kann zum Beispiel bei hohem Alkoholgehalt ein daraus resultierender süßlicher Geschmackseindruck eine Vanillenote vortäuschen.

Tabelle 5 Vergleich des chemischen Aromaprofils „Holznote“ versus sensorisches Aromaprofil „Holznote“ ausgewählter Rotweine (von links nach rechts sortiert nach aufsteigendem Gehalt der Summe aus Vanillin und Syringaldehyd)

	Cabernet Sauvignon, 2016 (La Mancha, Spanien) 14% vol.	Dornfelder, 2019 (Pfalz, Deutschland)	Cuvée, 2016 (Rioja, Spanien) 13,5% vol	Cuvée*, 2019 (Pays d'Oc, Frankreich) 14% vol.	Primitivo, 2018 (Primitivo di Manduria, Italien) 14,5% vol.
Gehalt an Vanillin und Syringaldehyd [$\mu\text{g/L}$]	79,0	172,2	232	298	1.524
Gehalt an Vanillin [$\mu\text{g/L}$]	39,2	82,0	131	157	687
Gehalt an Syringaldehyd [$\mu\text{g/L}$]	39,8	88,2	101	141	837
Gehalt <i>cis</i> - und <i>trans</i> -Whiskylactone [$\mu\text{g/L}$]	211	95,0	469	103	178
Rangfolge nach Intensität der Holznote**	I	II	III	IV	V

* Cuvée aus Syrah, Merlot und Viognier

** Rangordnung nach aufsteigender Intensität der „Holznote“ (I = niedrigste, V = stärkste „Holznote“)

Eine stärkere Abweichung der analytischen und sensorischen Rangordnung konnte bei den untersuchten beziehungsweise verkosteten Whiskys festgestellt werden (siehe Tabelle 6), wobei zu berücksichtigen ist, dass die Gehalte an Syringaldehyd und Vanillin der verschiedenen Proben nur geringe Unterschiede aufweisen. Ferner konnte der höchste Gehalt an Syringaldehyd und Vanillin sensorisch herausgefunden werden (Rang V, Tabelle 6).

Eine mögliche Erklärung für diese Unterschiede könnte der Einfluss weiterer Holzfassaromastoffe sein, zum Beispiel Sinapinaldehyd und Coniferylaldehyd, die entsprechend der Tabellen A1 und A2 lediglich in den untersuchten Spirituosen und nicht in den untersuchten Weinen nachgewiesen werden konnten.

Das Fehlen von Sinapinaldehyd und Coniferylaldehyd in den untersuchten Weinen kann anhand der vorliegenden Datenbasis noch nicht abschließend erklärt werden. Gegebenenfalls könnte der höhere Alkoholgehalt bei den untersuchten Spirituosen dafür gesorgt haben, dass die oben genannten Aldehyde zum einen durch saure Ethanololyse in höheren Gehalten gebildet wurden und zum anderen eine verbesserte Extraktion der nach dem „Toasting“ gebildeten Verbindungen aus dem Holzfass erfolgte. So konnte Moser (2019) zeigen, dass alle oben genannten Aldehyde in Cognacs bis in den einstelligen mg/L-Bereich nachgewiesen werden können und Coniferylaldehyd sowie Sinapinaldehyd (Oxidationsprodukte von Monolignolen) in gleichen Größenordnungen vorliegen genauso wie Vanillin und Syringaldehyd (thermische Abbauprodukte des Lignins).^[9] Vergleichbare Tendenzen in den Aldehydgehalten zeigten sich in den in diesem Projekt untersuchten Spirituosen (siehe Tabelle A2).

Ein weiterer Ansatzpunkt könnte die bei Rotweinen noch im Holzfass ablaufende Gärung sein, die gegebenenfalls zu weiteren Metabolisierungen dieser Substanzen führen könnten. Hier gilt bei Verfügbarkeit isopenmarkierter Interner Standards für Coniferylaldehyd und Sinapinaldehyd diese zu erwerben und beide Verbindungen ins Analytenspektrum zu implementieren und die Probenvorbereitung und Analytik nochmals anzupassen.

Ferner erscheint es sinnvoll, einen Whisky mit unterschiedlichen Konzentrationen an Syringaldehyd und Vanillin zu dotieren und nochmals zu verkosten und diese Rangordnung mit den analytischen beziehungsweise dotierten Gehalten zu vergleichen, da so der Einfluss aller anderen Komponenten gleich sein sollte und lediglich der Einfluss des Vanillins und Syringaldehyds verglichen werden könnte.

Tabelle 6 Vergleich des chemischen Aromaprofils „Holznote“ versus sensorisches Aromaprofil „Holznote“ ausgewählter Whiskys (von links nach rechts sortiert nach aufsteigendem Gehalt der Summe aus Vanillin und Syringaldehyd)

	Kanadischer Whisky* 40%	Kanadischer Whisky* 40%	Single Malt Scotch Whisky 40%	Blended Scottish Whisky 40%	Irish Whisky 40%
Gehalt an Vanillin und Syringaldehyd [µg/L]	689	728	897	1019	2199
Gehalt an Vanillin [µg/L]	288	367	323	287	798
Gehalt an Syringaldehyd [µg/L]	401	361	574	732	1401
Gehalt <i>cis</i> - und <i>trans</i> -Whiskylactone [µg/L]	172	315	61	227	607
Rangfolge nach Intensität der Holznote**	III	II	I	IV	V
Auslobung	6 Jahre Holzfasslagerung	6 Jahre Holzfasslagerung	Lagerung in „Eichenfass“	Lagerung in „Eichenfass“	Lagerung in „Eichenfass“

* Unterscheidung in Lot-Nummer

** Rangordnung nach aufsteigender Intensität der „Holznote“ (I = niedrigste, V = stärkste „Holznote“)

5. Fazit

Die hier vorgestellte Prüfmethode zur Untersuchung von Spirituosen und Weinen auf Syringaldehyd, Vanillin und Ethylvanillin erweitert das Portfolio an Untersuchungsmethoden zur Überprüfung der Auslobung einer Holzfasslagerung. Weiterhin ermöglicht diese Methode den Nachweis und die Quantifizierung des Cumaringehaltes in Spirituosen und Weinen.

Aufgrund starker Matrixinterferenzen, die zu schlechten Wiederfindungsraten führen, ist ein quantitativer Nachweis von 6-Methylcumarin, Sinapinaldehyd und Coniferylaldehyd zurzeit nicht möglich beziehungsweise wird nicht empfohlen. Sobald für diese Verbindungen strukturanaloge isotoopenmarkierte Interne Standards käuflich erwerbbar sind, sollten diese jedoch leicht in die beschriebene Methode integriert werden können.

Erste Ergebnisse der untersuchten Proben legen nahe, dass ein annähernd linearer Zusammenhang zwischen den Gehalten an Vanillin und Syringaldehyd in Rotwein besteht. Um diese Zusammenhänge abschließend bewerten zu können und diese auf andere Matrices wie Weißwein oder einzelne Spirituosenkategorien (zum Beispiel Tresterbrände wie Grappa, Weinbrände wie Cognacs oder Whiskys) auszuweiten, müssen jedoch weitere Daten spezifischer Warengruppen gesammelt und statistisch ausgewertet werden.

Den Mehrwert dieser neuen Prüfmethode zeigt eine während des Projektzeitraums als irreführend bemängelte Spirituose mit Geschmacksrichtung Haselnuss. Diese Probe wurde in der Etikettierung mit den Hinweisen 'Erlesene Spirituose im Holzfass gelagert' sowie „Holzfass gelagert“ in Verbindung mit einer Holzfassabbildung ausgelobt. Aufgrund eines besonders ausgeprägten Haselnussaromas konnte sensorisch keine eindeutige Beurteilung des Holzfassaromas durchgeführt werden.

Mittels einer im CVUA Rheinland bereits etablierten GC-MS-Prüfmethode konnten hohe Gehalte an Piperonal (typisches Haselnussaroma) sowie Glycerintriacetat (Aromaträgerstoff) nachgewiesen werden. Dies bestätigte den sensorischen Eindruck einer starken Haselnussnote und weist auf eine zulässige Aromatisierung der vorliegenden Spirituose hin. Jedoch waren keine holzfasstypischen Whiskylactone in dieser Probe nachweisbar.

In Übereinstimmung hierzu konnte zwar ein sehr hoher Gehalt an Vanillin (circa 120 mg/L) jedoch kein Syringaldehyd (BG = 25 µg/L) nachgewiesen werden. Aufgrund der erläuterten Zusammenhänge zwischen Vanillin und Syringaldehyd – sowie des Fehlens charakteristischer Whiskylactone - kann davon ausgegangen werden, dass diese Spirituose ebenfalls mit Vanillin aromatisiert wurde und nicht, wie ausgelobt, in einem Holzfass gelagert wurde. Die abschließende Klärung einer etwaigen Irreführung durch eine Betriebskontrolle und Überprüfung der Buchführung des Betriebes mit dem zuständigen Wein- und Spirituosenkontrolleur/in wurde seitens des CVUA Rheinlandes empfohlen.

Literatur

- [1] <https://ec.europa.eu/jrc/en/research-topic/food-authenticity-and-quality> (letzter Zugriff: 17.03.2021)
- [2] Klein, M (2012). Entwicklung analytischer Methoden und multivariater statistischer Modelle zur Differenzierung von Barrique Weinen und Weinen, die mit Eichenholzchips behandelt wurden. Dissertation, Braunschweig.
- [3] Canas, S et al. (2008). Wood related chemical markers of aged wine brandies. *Ciência téc. Vitiv.*, **23(1)**: 45-52.
- [4] Pérez-Magarino, S et al. (2008). Optimization of a solid-phase extraction method using copolymer sorbents for isolation of phenolic compounds in red wines and quantification by HPLC. *J. Agric. Food Chem.*, **56**: 11560-11570.
- [5] Valente M I et al. (2013). New application of the QuEChERS methodology for the determination of volatile phenols in beverages by liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, **1271**: 27-32
- [6] https://www.lctech.de/securedl/sdl-eyJ0eXAiOiJKV1QiLCJhbGciOiJIUzI1NiJ9.eyJpYXQiOiJlNDA2NTgxNDAsImV4cCI6MTY0MDczNjAwMCwidXNlciI6MCwiZ3JvdXBzIjpbMCwtMV0sImZpbGUiOiJmaWxlYWRTaW5cL3VzZXJfdXBsb2FkXC9Qcm9zcGVrdGVfRmx5ZXJcL0x0xVGVjaC1Dcm9zc1RPWC1GbHllcl9kZS5wZGYiLCJwYWdlIjo2NTR9.T5Y36Gre4w-ZZgYHtOxxXnGLCT00wnaH1JDKOYM4Ck/LCTech-CrossTOX-Flyer_de.pdf (letzter Zugriff: 28.12.2021)
- [7] Cameleyre M et al. (2020). Impact of Whisky Lactone Diastereoisomers on Red Wine Fruity Aromatic Expression in Model Solution. *J. Agric. Food Chem.*, **68**: 10808-10814
- [8] Froschmeier, A (2018). Molekulare Charakterisierung von Schlüsselgeschmacksstoffen in Whisky. Dissertation, München.
- [9] Moser, D (2019). Identifizierung und Quantifizierung von phenolischen Komponenten in Cognacs mittels Hochleistungsflüssigchromatographie und Massenspektrometrie. Masterarbeit, Innsbruck.

Appendix

Tabelle A 1 Ergebnisse der Datenerhebung 2021 (Wein)

Bezeichnung	Jahrgang	6-Methylcumarin [µg/L]	Coniferylaldehyd [µg/L]	Cumarin [µg/L]	Ethylvanillin [µg/L]	Sinapinaldehyd [µg/L]	Syringaldehyd [µg/L]	Vanillin [µg/L]	cis-R-Whiskylacton [µg/L]	cis-S-Whiskylacton [µg/L]	3R4S-trans-Whiskylacton [µg/L]	3S4R-trans-Whiskylacton [µg/L]	Summe Whiskylacton [µg/L]
Rotwein I	2020	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	119	80,8	n.n.	16	n.n.	8	24
Rotwein II	2014	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	28,2	36,9	n.n.	58	n.n.	16	74
Rotwein III	2018	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	1148	737	n.n.	148	n.n.	30	178
Rotwein IV	2018	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	135	139	n.n.	118	n.n.	44	162
Rotwein V	2016	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	39,8	39,2	n.n.	162	n.n.	49	211
Rotwein VI	2015	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	280	196	n.n.	114	n.n.	24	138
Rotwein VII	2017	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	164	115	n.n.	64	n.n.	20	84
Rotwein VIII	2019	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	71	61,2	n.n.	52	n.n.	45	97
Rotwein IX	2016	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	78,7	124	n.n.	444	n.n.	66	510
Rotwein X	2019	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	516	341	n.n.	78	n.n.	10	88
Rotwein XI	2018	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	1054	701	n.n.	148	n.n.	31	179
Rotwein XII	2020	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	1322	760	n.n.	102	n.n.	52	154
Rotwein XIII	2015	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	523	305	n.n.	97	n.n.	20	117
Rotwein XIV	2014	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	155	94,8	n.n.	95	n.n.	11	106
Rotwein XV	2017	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	94,4	86,4	n.n.	233	n.n.	44	277
Rotwein XVI	2019	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	381	370	n.n.	91	n.n.	50	141
Rotwein XVII	2013	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	34,3	40,1	n.n.	211	n.n.	34	245
Rotwein XVIII	2019	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	88,2	82	n.n.	84	n.n.	11	95
Rotwein XIX	2016	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	268	214	n.n.	34	n.n.	9	43
Rotwein XX	2016	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	101	131	n.n.	408	n.n.	61	469
Rotwein XXI	2019	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	219	276	n.n.	39	n.n.	22	61
Weißwein I	2020	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	1081	399	n.n.	49	n.n.	15	64
Rotwein XII	2018	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	55,5	75,9	n.n.	180	n.n.	24	204
Rotwein XXIII	2019	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	141	157	n.n.	76	n.n.	27	103
Rotwein XXIV	2019	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	97,7	102	n.n.	84	n.n.	10	94

Tabelle A 2 Ergebnisse der Datenerhebung 2021 (Spirituosen)

Bezeichnung	6-Methylcumarin [µg/L]	Coniferylaldehyd [µg/L]	Cumarin [µg/L]	Ethylvanillin [µg/L]	Sinapinaldehyd [µg/L]	Syringaldehyd [µg/L]	Vanillin [µg/L]	cis-R-Whiskylacton [µg/L]	cis-S-Whiskylacton [µg/L]	3R4S-trans-Whiskylacton [µg/L]	3S4R-trans-Whiskylacton [µg/L]	Summe Whiskylacton [µg/L]
Vermut Rojo ⁺	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	13,2	24,5	n.n.	2	n.n.	<BG	2
Grappa ⁺	n.n.	60,1	n.n.	n.n.	169	274	151	n.n.	44	n.n.	23	67
Scotch Whisky ⁺	n.n.	119	n.n.	n.n.	310	574	323	n.n.	55	n.n.	6	61
Bourbon Whisky ⁺	n.n.	2574	n.n.	n.n.	2467	7910	3265	n.n.	3120	n.n.	366	3486
Blended Scotch Whisky ⁺	n.n.	246	n.n.	n.n.	432	732	287	n.n.	207	n.n.	20	227
Weinbrand ⁺	n.n.	75	n.n.	n.n.	217	470	246	n.n.	25	n.n.	14	39
Spirituose (Haselnuss) ⁺	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	171965	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Wermut	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Aquavit ⁺	n.n.	91,5	n.n.	n.n.	328	611	232	n.n.	76	n.n.	14	90
Weinbrand	n.n.	105	n.n.	n.n.	152	83,7	109	n.n.	46	n.n.	14	60
Irish Whisky ⁺	n.n.	353	n.n.	n.n.	768	1401	798	n.n.	554	n.n.	53	607
Grappa ⁺	n.n.	658	n.n.	n.n.	1854	1832	867	n.n.	136	n.n.	92	228
Spirituose (spanisch) ⁺	n.n.	86,5	n.n.	n.n.	121	579	421	n.n.	24	n.n.	4	28
Canadian Whisky ⁺	n.n.	91,8	n.n.	n.n.	207	401	288	n.n.	156	n.n.	16	172
Ouzo	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Canadian Whisky ⁺	n.n.	122	n.n.	n.n.	91,4	361	367	n.n.	289	n.n.	26	315
Apfelbrand ⁺	n.n.	2798	n.n.	n.n.	4705	8693	2889	n.n.	1085	n.n.	122	1207
Spirituose (Marille) ⁺	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	18,5	44,6	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Kornbrand ⁺	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	13,1	15,3	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Korn ⁺	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	30	13,3	n.n.	2	n.n.	<BG	2
Gin	n.n.	n.n.	8,34	n.n.	n.n.	n.n.	8,51	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Enzian	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	3,25	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Raki si ⁺	n.n.	643	n.n.	n.n.	1370	211	196	n.n.	76	n.n.	21	97
Gin	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	3,5	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Gin	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	3,55	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

⁺ Spirituose mit explizierte Holzfassauslobung