

VERGLEICH ZWEIER PROBENVORBEREITUNGSMETHODEN FÜR DIE ANALYSE VON TRAUBENPHENOLEN MITTELS HPLC

STEFANIE BERGHOLD, SILVIA WENDELIN und REINHARD EDER

Höhere Bundeslehranstalt und Bundesamt für Wein- und Obstbau
Wiener Straße 74
3400 Klosterneuburg
E-Mail: stefanie.berghold@weinobst.at

Pflanzliche Phenole, speziell die des Weines, wurden auf ihre Wirkungen und Quantitäten bereits viel untersucht. Die Probenbearbeitung und Analysen stehen dabei meist im Hintergrund. Besonders über die unterschiedlichen Methoden der Probenvorbereitung wurde bis jetzt wenig veröffentlicht. Ziel dieser Arbeit war es, Traubenmaterial mit zwei verschiedenen Arten der Probenvorbereitung für die Phenolanalyse mittels HPLC vorzubereiten und diese miteinander zu vergleichen. Die verwendeten Methoden waren bei den Traubenschalen die Gefriertrocknung mit anschließender Extraktion durch methanolisches Lösungsmittel, beziehungsweise der Aufschluss mit Perchlorsäure. Bei der Pulpe erfolgte ein Vergleich der Gefriertrocknung mit anschließender Extraktion durch methanolisches Lösungsmittel mit Seihmost direkt. Die Analyse ausgewählter Phenole in den Proben erfolgte mittels RP-HPLC. Für die Untersuchungen wurden Trauben von drei Weißwein- und drei Rotweinsorten verwendet. Die Analysendaten zeigten signifikante Unterschiede zwischen den Probenvorbereitungsmethoden. Die mit Gefriertrocknung und methanolischer Extraktion vorbereiteten Beerenschalen wiesen einen höheren Phenolgehalt auf, als die Proben mit Perchlorsäure-Aufschluss (Median 76,6 mg/kg; Minimalwert 43,5 mg/kg; Maximalwert 129,2 mg/kg bei Gefriertrocknung bzw. Median 41,9 mg/kg; Minimalwert 25,6 mg/kg; Maximalwert 79,3 mg/kg bei Perchlorsäure-Aufschluss). Beim Vergleich der Pulpe enthielt hingegen der Seihmost höhere Phenolgehalte als die gefriergetrockneten Pulpen (bei Seihmost: Median 64,0 mg/kg, Minimalwert 34,4 mg/kg, Maximalwert 87,4 mg/kg bzw. bei Gefriertrocknung: Median 20,1 mg/kg, Minimalwert 10,1 mg/kg, Maximalwert 29,4 mg/kg). Diese signifikanten Unterschiede zwischen den Probenvorbereitungen wurden bei allen untersuchten Sorten festgestellt, sodass kein Einfluss der Sorte auf die Eignung der Probenvorbereitungsmethode postuliert werden kann.

Schlagwörter: Weintraube, Flavonoide, Hydroxyzimtsäuren, Extraktion, Gefriertrocknung, Perchlorsäure

Comparison of two sample preparation methods for analyses of grape phenols with HPLC. A lot of investigations have been carried out about plant phenols, especially phenolic compounds of wine, concerning their effects and quantities. In these cases sample treatment and analyses were usually in the background. Especially different methods of sample preparation have been less published. The aim of this investigation was to prepare grape material with two different sample preparations for phenol analyses by means of HPLC and to compare them. Used methods for berry skin treatment were lyophilisation with subsequent methanolic extraction as well as chemical digestion with perchloric acid. Processing of lyophilised pulp by extraction with methanolic solvent was compared with free-run must, used directly without pretreatment. Analyses of important phenolic compounds were performed with RP-HPLC. Three white wine and three red wine varieties were used for investigations. Results showed significant differences between the used preparation methods. The lyophilised and extracted berry skins showed a higher content of phenolic compounds than the variants, which were chemically digested with perchloric acid (lyophilisation: median 76.6 mg/kg; minimal 43.5 mg/kg; maximal 129.2 mg/kg; chemical digestion with perchloric acid: median 41.9 mg/kg; minimal

25.6 mg/kg; maximal 79.3 mg/kg). The phenolic content of must was – in comparison to lyophilised pulp – higher (lyophilisation: median 64.0 mg/kg; minimal 34.4 mg/kg; maximal 87.4 mg/kg; digestion with perchloric acid: median 20.1 mg/kg; minimal 10.1 mg/kg; maximal 29.4 mg/kg). These significant differences were detected with all tested grape varieties, so different grape varieties had no influence on the suitability of the sample preparation method.
Keywords: grape, flavonoids, hydroxycinnamic acid, extraction, lyophilisation, perchloric acid

Die gesundheitliche Wirkung der Substanzengruppe der Phenole war schon oft Anlass für Forschung und Publikationen (PEREIRA et al., 2009; ZÖCHLING et al., 2009; EDER et al., 2016). Phenole können von Menschen nicht gebildet werden, deshalb sind diese auf die Aufnahme durch den Konsum von pflanzlicher Nahrung angewiesen. Besonders aufgrund der antioxidativen Eigenschaften, denen man den schützenden Effekt hinsichtlich Arterienverkalkung und in weiterer Folge eine Minimierung des Risikos von Herz-Kreislauf-erkrankungen zuspricht (VIDAVALUR et al., 2006), waren diese Substanzen im Fokus der Untersuchungen.

Die Phenole sind eine große Gruppe von Substanzen mit vielfältigen Strukturen und Funktionen. Man kann sie in zwei größere Gruppen einteilen, die einfachen Phenole, z. B. Phenolsäuren (Hydroxybenzoesäuren, Hydroxyzimtsäuren), und komplexe Polyphenole. Sie sind Sekundärmetaboliten der Pflanzen. Im pflanzlichen Stoffwechsel besitzen sie unterschiedliche Aufgaben, so unterstützen sie die Bestäubung und Verbreitung der Pflanzen aufgrund ihrer attraktiven Wirkung als Farbstoffe (Anthocyane und Flavonoide) sowie als Geruchs- und Geschmacksstoffe (EDER, 2018). Andererseits sind sie aber auch an der Verteidigung der Pflanze gegenüber Schädlingen beteiligt, wo sie gespeichert in den Pflanzenzellen für Fraßfeinde abschreckend wirken (bitterer Geschmack), aber auch das Eindringen von Pilzen verhindern. GABLER et al. (2003) schreiben von einer hohen Korrelation zwischen hohen Gehalten an phenolischen Substanzen und der Resistenz von Reben. Andere Untersuchungen haben ergeben, dass z. B. Stilbene auch als Reaktion auf Stressfaktoren, wie z. B. Sonnenbrand oder eine Pilzinfektion, vermehrt gebildet werden. In einer vergleichenden Studie konnten OTREBA et al. (2006) zeigen, dass Weißweine aus biologischer Produktion tendenziell höhere Gehalte an Gesamtphenolen, Leukoanthocyanidinen und insbesondere

cis-Resveratrol aufweisen als solche aus konventioneller Produktion. Aufgrund der unterschiedlichen physiologischen Aufgaben in der Traube unterliegen die Phenole während der Reife sowohl qualitativ wie auch quantitativ großen Veränderungen, welche für die Qualität des Lesegutes von wesentlicher Bedeutung sind und deren Kenntnis daher für die Weinproduktion sehr wichtig ist (HUBER et al., 2005).

Von GATTO et al. (2008) wurde berichtet, dass nach Botrytisbefall höhere Phenolgehalte in den Trauben gemessen werden. Demgegenüber fanden EDER et al. (2004), dass Botrytisbefall zu einer deutlichen Verringerung von phenolischen Inhaltsstoffen, insbesondere Anthocyanen, führt. Ebenso haben Sonneneinstrahlung und Wärme Auswirkungen auf die Bildung der Substanzen, besonders UV-Licht stimuliert die Biosynthese (SPAYD et al., 2002). Auch KOYAMA und GOTO-YAMAMOTO (2008) bzw. RISTIC et al. (2007) berichten, dass bei beschatteten Trauben eine geänderte Phenolbildung gegenüber unbeschatteten Trauben vorliegt. Die Wirkung der Sonnenstrahlung kann eine unterschiedlich starke Verteilung der Inhaltsstoffe und daher auch der Phenole in den Trauben innerhalb des Stockes bewirken, was in weiterer Folge bei der Entnahme der Proben für die Analysen eine Rolle spielt.

Bisher wurden wenige Publikationen über spezifische Probenvorbereitung veröffentlicht. SUN und SPRANGER (2005) beschreiben, dass keine komplett zufriedenstellende Standardmethode für die Extraktion der Phenole aus Pflanzen vorhanden ist. Auf das Ergebnis der Extraktion haben viele Faktoren einen Einfluss. Neben der untersuchten Substanz und der Matrix spielt besonders das Lösungsmittel eine große Rolle (Polarität und pH-Wert), aber auch Faktoren wie Temperatur und Zeit. Da es sich bei Phenolen auch um eine große unterschiedliche Substanzengruppe handelt, die in den Pflanzen in unterschiedlichen Gewebeteilen unterschiedlich stark

gebunden ist, können mit einer Methode nicht alle Verbindungen gleich gut gelöst werden. Ein geringeres Problem in der Extraktion stellen monomere gegenüber polymeren Phenolen dar.

Aufgrund von Bearbeitung und Lagerung und daraus entstandener chemischer Reaktionen sind die Phenole des Weines komplexer als die der Traube (SUN und SPRANGER, 2005). In der Traube sind die Phenolgehalte bezogen auf das Frischgewicht in den Kernen am höchsten, danach kommt die Schale, gefolgt von der Pulpe mit den geringsten Konzentrationen (SANDHU und GU, 2010). Die Bestimmung erfolgte nach Gefrier-trocknung, bei der Schale, Pulpe und Samen getrennt, eingefroren, gefriergetrocknet und gemahlen wurden. Das Pulver wurde extrahiert, und die Analysen wurden mit HPLC-DAD-ESI-MS durchgeführt. Über Analysenverfahren gibt es zahlreiche Publikationen. GOMEZ-ALONSO et al. (2007) zum Beispiel berichten von HPLC-Analysen von Traubenprodukten wie Samen und Schale mit Direkteinspritzung von Extrakten. Es konnten mit einem ternären Gradienten mehr Substanzen als in bisher publizierten Methoden detektiert werden. DOWNEY und ROCHFORD (2008) schreiben von einer zeit- und geldsparenden HPLC/MS-Analyse von vielen Anthocyanen und Flavonolen.

Ziel dieser Arbeit war es, zwei Methoden der Probenvorbereitung zu vergleichen. Die gewonnenen Extrakte der unterschiedlichen Probenvorbereitung wurden mittels HPLC analysiert. Die eine Aufschlussmethode, Homogenisation mit Perchlorsäure, ist die Standardmethode für die Untersuchung von Schalenphenolen mittels HPLC in unserem Labor. Diese wurde verglichen mit einer anderen Methode, dem Aufschluss mit methanolischem Lösungsmittel nach Gefrier-trocknung. Die Methode wurde bei Trauben in unserem Labor noch nicht angewandt. Somit haben keine direkten Vergleiche stattgefunden. Der Unterschied der Aufschlussmethoden und deren Auswirkungen auf die Analyse sollen dargestellt werden.

MATERIAL UND METHODEN

Die für die HPLC-Analyse verwendeten Standards wurden von folgenden Firmen gekauft: Firma Extrasynthese SAS (Genay, Frankreich): Ethylgallat (CAS-Nr: 831-

61-8), Ferulasäure (CAS-Nr: 537-98-4), Procyanidin B1 (CAS-Nr: 20315-25-7), Procyanidin B2 (CAS-Nr: 29106-49-8), Cumarsäure (CAS-Nr: 7400-08-0), Gallussäure (CAS-Nr: 149-91-7).

Firma Sigma-Aldrich Co. LLC (St. Louis/Missouri, USA): Epicatechin (CAS-Nr: 490-46-0), Kaffeesäure (CAS-Nr: 331-39-5), Catechin (CAS-Nr: 225937-10-0), Tyrosol (CAS-Nr: 501-94-0).

Firma Dalton Pharma Services (Toronto, Kanada): Caftarsäure (CAS-Nr: 67879-58-7).

Die Laufmittel wurden mit Wasser (HPLC-grade, CAS-Nr: 7732-18-5), Methanol (HPLC-grade, CAS-Nr: 67-56-1) und Ameisensäure CAS-Nr: 64-18-6 (alle von: Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) hergestellt.

Bei der Untersuchung von Traubensorten wurden jeweils eine Standardrebsorte, eine zugelassene neue PIWI-Sorte und eine noch nicht zugelassene PIWI-Neuzüchtung ausgewählt, um mit möglichst unterschiedlichem Traubenmaterial zu arbeiten. Konkret wurde Traubenmaterial der drei Weißweinsorten 'Grüner Veltliner', 'Donauveltliner' (Kreuzung 'Grüner Veltliner' × 'Seyval blanc'), 'I 139' (Zuchtnummer 1929-25, Kreuzung aus 'Grüner Veltliner' × 'Malverina') sowie der drei Rotweinsorten 'Blauer Burgunder', 'Pinot nova' (Kreuzung 'Blauer Burgunder' × 'Malverina'), 'I 178' (Zuchtnummer 1924-25, Kreuzung aus 'Blauer Burgunder' × 'Malverina') verwendet. Die Trauben stammen aus dem Versuchsbetrieb Götzhof der HBLA und BA für Wein- und Obstbau in Langenzersdorf.

Die Trauben wurden im Zeitraum September und Oktober 2016 geerntet und tiefgefroren (-25 °C). Zum Analysenzeitpunkt wurden je 50 Beeren entnommen und abgewogen (Gesamtgewicht). Diese Beeren wurden manuell geschält und das Gewicht der Schalen gemessen (Schalengewicht), die Pulpe von den Kernen befreit (Pulpengewicht) und gesammelt. Der Pulpe wurden zur Vermeidung des enzymatischen Abbaus ein Überschuss an Kaliumpyrosulfit (Keller-KD E224, Fa. Max Keller GmbH, Mannheim, Deutschland) zugesetzt (ca. 2 %).

Da uns keine Vergleichsuntersuchungen bezüglich der Eignung der Gefrier-trocknung zur Extraktion von Phenolen aus Traubenschalen bekannt waren, haben wir diese Technik folgendermaßen angewandt: Die Beerenschalen und ein Teil der Pulpe wurden tiefgefroren (-25 °C) und anschließend in einen Lyophilisator (ALPHA 1-4;

Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland) gegeben.

Für die Extraktion der Phenole aus den Schalen wurden im ersten Versuch die Schalen ohne weitere Behandlung verwendet, da aber festgestellt wurde, dass die Schalen stark bräunen, wurden in einem zweiten Versuch die Beerenschalen in eine 0,2 % Kaliumpyrosulfatlösung getaucht und abgetropft tiefgekühlt. Die gefrorenen Proben wurden mindestens 42 Stunden im Lyophilisator bei 0,180 mbar getrocknet, anschließend entnommen und vakuumverpackt tiefgefroren (-25 °C). Im nächsten Schritt wurden die tiefgefrorenen Schalen mit einer Kugelmühle (CryoMill, Retsch GmbH, Haan, Deutschland) gemahlen (80 sec, 30 Hz). Von dem Pulver wurde für die Analysen ein Aliquot von 0,2 g entnommen. Dieses wurde drei Mal mit 2 ml Methanol:Wasser (8:2) extrahiert, indem es 30 Sekunden mittels Vortex geschüttelt und 15 Minuten in einem Ultraschallbad (Sonorex RK 100, Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland) aufgeschlossen und anschließend zentrifugiert (10 Minuten, 6.000 U/min). Die extrahierten Überstände wurden gesammelt und mit Wasser auf 10 ml aufgefüllt. Dieser Extrakt wurde vor der HPLC-Analyse mit einem Spritzenfilter (0,2 µm Porengröße, 25 mm, CS Chromatographie Service, Langerwehe, Deutschland) gereinigt.

Als Vergleich zur Probenvorbereitung mit Gefriertrocknung wurde als Standardmethode die Extraktion der Schalen mit Perchlorsäure gewählt. Hierfür wurden 5 g Schalen in einen Probenbehälter gegeben und mit 15 ml 6 % Perchlorsäure (hergestellt aus Perchlorsäure 70 % Suprapur für die Spurenanalyse, CAS-Nr: 7601-90-3, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) versetzt. Diese Mischung wurde dann mittels Homogenisator (HO 4RP, Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Deutschland) für 10 Minuten bei 20.000 U/min homogenisiert. Das Homogenisat wurde in Zentrifugenröhrchen überführt und bei 6.000 U/min für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend für die HPLC-Analyse filtriert (Spritzenfilter 0,2 µm Porendurchmesser).

Für die Bestimmung der Phenole im Seihmost wurde dieser direkt aus der Pulpe durch Filtration mit einem weichen Faltenfilter abgetrennt, noch einmal für die HPLC-Analyse vorgereinigt (Spritzenfilter 0,2 µm Po-

rendurchmesser) und direkt eingespritzt. Die gefriertrockneten Vergleichsvarianten der Pulpen wurden analog zu den Schalen behandelt, daher gemahlen, mit Wasser-Methanol-Gemisch extrahiert, filtriert und mit der HPLC analysiert. Alle Versuche wurden mittels zweifacher Durchführung wiederholt.

Die chromatographischen Analysen wurden mit einer HPLC (Typ 1200, Agilent Technologies, Santa Clara/Kalifornien, USA) durchgeführt. Es wurden 5 µl Probenlösung injiziert, und zur Auftrennung wurde eine RP-Säule (Typ Poroshell 120 SB-C18 2.1 × 150 mm 2.7 Mikron, Agilent Technologies Santa Clara/Kalifornien, USA) bei 40 °C Säulentemperatur verwendet.

Der Laufmittelgradient (Tab. 1) wurde mit Laufmittel A (0,5 % HCOOH) und Laufmittel B (100 % Methanol) bei einer Durchflussrate von 0,25 ml/min hergestellt.

Tab. 1: Laufmittelgradient für die HPLC-Analyse

Zeit (in min)	Laufmittel A	Laufmittel B
0	97 %	3 %
3	97 %	3 %
15	94 %	6 %
27	93 %	7 %
30	85 %	15 %
40	85 %	15 %
48	80 %	20 %
55	30 %	70 %
65	30 %	70 %
67	97 %	3 %

Detektiert wurde mit einem Dioden Array Detektor (Typ DAD SL, 1200 Series, Agilent Technologies Santa Clara/Kalifornien, USA) bei 280 nm (Gallussäure, Tyrosol, Catechin, Procyanidin B1, Procyanidin B2, Ethylgallat und Epicatechin) und bei 320 nm (Caftarsäure, Kaffeesäure, p-Cumarsäure und Ferulasäure; c-Coutarsäure, t-Coutarsäure und Fertarsäure werden als Caftarsäure berechnet).

Die Bestimmung erfolgte mittels externen Vergleichs von Retentionszeiten und DAD-Spektren von Standards.

Ausgewertet wurde mit der Software ChemStation for LC Rev.B.03.04(16) (Agilent Technologies, Santa Clara/Kalifornien, USA).

Die bei der HPLC-Auswertung erhaltenen Mengen (mg/l analysierter Flüssigkeit) werden auf mg/kg Trauben umgerechnet.

Bei Aufschluss mit Perchlorsäure:

$$\text{mg/kg Traube} = \frac{\text{Wert HPLC} \cdot \text{Schalengewicht} \cdot 1000}{333 \cdot \text{Gesamtgewicht}}$$

Bei Seihmost (Pulpe frisch):

$$\text{mg/kg Traube} = \frac{\text{Wert HPLC} \cdot \text{Pulpengewicht}}{1,08 \cdot \text{Gesamtgewicht}}$$

Bei Gefriergetrocknetem (Pulpe oder Schale); hier angegeben für Schale, analog verwendet bei Pulpe (Pulpengewicht vor bzw. nach Trocknung):

$$\text{mg/kg Traube} = \left(\frac{\text{Wert HPLC} \cdot \text{Schalengewicht vor Trocknung}}{\text{Einwaage} \cdot 100 \cdot \text{Schalengewicht nach Trocknung}} \right) \cdot 1000$$

Anschließend wurden die Konzentrationen der einzelnen Phenole addiert und als Gesamtphenole bezeichnet. Die statistischen Auswertungen erfolgten mittels IBM SPSS Statistics Version 22.0.0.0 (IBM Corporation, Armonk/New York, USA).

Zusätzlich zur analytischen Untersuchung wurde auch der Arbeitsaufwand für die beiden Probenbearbeitungsmethoden verglichen.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Da der Vergleich der beiden Probenvorbereitungsmethoden mit zwei verschiedenen Traubenbestandteilen (Schale, Pulpe) erfolgte, werden bei der Auswertung die Analysendaten von Schale und Pulpe getrennt betrachtet.

Die Schalen zeigten ohne die Behandlung mit Kaliumpyrosulfit nach kurzer Zeit eine braune Färbung. Da die Beerenschalen bei der Methode der Gefrier Trocknung längere Zeit dem Einfluss von Sauerstoff ausgesetzt sind, kann eine Oxidation von Phenolen erfolgen, wodurch geringere Analysenwerte zu erwarten sind. Deshalb wurde bei der Methode der Gefrier Trocknung eine Modifizierung der Arbeitsweise erprobt, indem nach dem Schälen der Beeren alternativ eine SO₂-Behandlung (mittels Kaliumpyrosulfit) erfolgte, um den enzymatischen Abbau von Phenolen durch Oxidation zu quantifizieren.

In den gefriergetrockneten Traubenschalen wurden ohne SO₂-Behandlung signifikant geringere Phenolgehalte als in den geschwefelten Varianten gefunden (Mann-Whitney-U-Test, Signifikanz 0,02). Im Mittel entsprach der Wert ohne Oxidationsschutz etwa der Hälfte des Phenolgehaltes mit Oxidationsschutz (Tab. 2). Je nach Sorte ist die Differenz zwischen den ungeschwefelten und den geschwefelten gefriergetrockneten Schalenextrakten unterschiedlich. Beispielsweise war die Differenz bei der Sorte 'Pinot nova' mit rund 17 mg/kg gering, bei der Sorte 'Donauveltliner' hingegen mit rund 76 mg/kg hoch. Die Ursache hierfür ist, dass sich die Schale unterschiedlich gut von der Pulpe löste. Es kam somit zu einem unterschiedlich starken Einfluss von Sauerstoff, der durch den Einsatz von SO₂ minimiert wurde.

Tab. 2: Phenolgehalte (in mg/kg Traube; Mittelwert von zwei Bestimmungen) in Abhängigkeit von der Probenvorbereitung

Sorte	Traubenschale		Pulpe		
	Gefriergetrocknete Schale mit SO ₂	Gefriergetrocknete Schale ohne SO ₂	Perchlorsäure	Gefriergetrocknete Pulpe	Seihmost
Donauveltliner	119,7 ± 10,9	43,5 ± 3,6	42,0 ± 1,3	13,5 ± 0,9	35,1 ± 0,9
I 139	91,7 ± 25,8	50,4 ± 14,2	70,9 ± 11,9	16,9 ± 2,6	75,9 ± 8,8
Grüner Veltliner	119,8 ± 13,3	76,0 ± 6,0	62,5 ± 5,7	28,3 ± 0,9	52,6 ± 8,2
Pinot nova	64,9 ± 7,1	47,9 ± 3,9	45,1 ± 5,9	22,8 ± 2,6	86,0 ± 2,0
I 178	76,6 ± 0,4	32,7 ± 0,1	27,5 ± 2,6	24,5 ± 2,0	76,6 ± 3,0
Blauer Burgunder	44,0 ± 0,7	17,3 ± 2,6	29,6 ± 1,3	13,1 ± 2,5	54,4 ± 5,4
Gesamt	86,1 ± 30,5	44,6 ± 19,3	46,2 ± 17,2	19,8 ± 6,1	63,4 ± 18,7

Für den Vergleich der beiden Probenvorbereitungsmethoden wurden aufgrund der obigen Ergebnisse nur die Werte der Analysen mit SO_2 -Zusatz herangezogen. Die Analysenwerte der gefriergetrockneten Schalen zeigten signifikant höhere Phenolgehalte als die Werte der Analysen mit Perchlorsäure-Aufschluss (Mann-Whitney-U-Test, Signifikanz 0,01). Die Gegenüberstellung der beiden Aufschlussmethoden in Abbildung 1 verdeutlicht diese Unterschiede (Median 76,6 mg/kg; Minimalwert 43,5 mg/kg; Maximalwert 129,2 mg/kg bei Gefriertrocknung bzw. Median 41,9 mg/kg; Minimalwert 25,6 mg/kg; Maximalwert 79,3 mg/kg bei Perchlorsäure-Aufschluss). Diese Differenz aufgrund der Probenvorbereitungsmethode konnte bei allen Sorten mehr oder weniger stark festgestellt werden, sodass bemerkt werden kann, dass auch bei sehr unterschiedlichen Sorten die Extraktionsmethode mit Gefriertrocknung höhere Phenolwerte (+129 % bis +285 %) liefert als die Standardextraktion mit Perchlorsäure.

Die Ergebnisse der Pulpe bzw. des Seihmostes waren nicht vergleichbar mit denen der Schale. Beim Vergleich der Phenolgehalte der gefriergetrockneten Pulpe mit dem Seihmost zeigte sich zwar auch ein signifikanter Unterschied (Mann-Whitney-U-Test, Signifikanz 0,01), aber der Seihmost (ohne Gefriertrocknung: Median 64,0 mg/kg; Minimalwert 34,4 mg/kg; Maximalwert 87,4 mg/kg) wies im Mittel eine dreifach höhere Konzentration gegenüber der gefriergetrockneten Pulpe auf (Median 20,1 mg/kg; Minimalwert 10,1 mg/kg; Maximalwert 29,4 mg/kg; Abb. 2). In den untersuchten Sorten waren die Phenolgehalte in den Seihmosten unterschiedlich, was sich in den gefriergetrockneten Pulpen aber nicht so deutlich zeigte. Bei diesen sind die Schwankungen auch über die Sorten hinweg geringer. Der Unterschied kann in der anderen Aufarbeitung der Proben liegen. Bei Seihmost erfolgte eine Extraktion durch den fruchteigenen Saft, der als einzige Weiterbearbeitung filtriert wurde. Bei der Lyophilisierung der Pulpe wurde als Lösungsmittel ein Methanol/Wasser-Gemisch verwen-

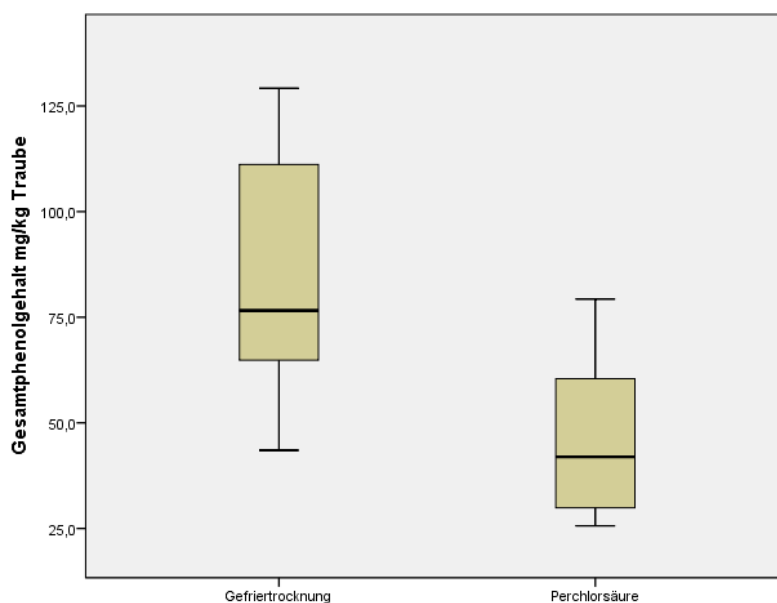


Abbildung 1: Vergleich der Phenolgehalte (mg/kg Traube) von Traubenschalen mit zwei Aufschlussmethoden (Gefriertrocknung, Perchlorsäure)

det. Wie schon bei SUN und SPRANGER (2005) erwähnt, kann sich der festgestellte Unterschied auch durch den Unterschied der Extraktion ergeben. Auch hier ist kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Einflusses der Probenvorbereitung auf die Phenolgehalte zwischen den Sorten erkennbar.

Einschränkend wird darauf hingewiesen, dass generell zwischen den einzelnen Wiederholungen der Traubenproben größere Schwankungen der Werte innerhalb der Varianten beobachtet wurden, was auf Inhomogenität bei der Probennahme hinweist. Dieser starke Einfluss der Probennahme auf die Phenolgehalte wurde bereits früher beschrieben (SPAYD et al., 2002; KOYAMA und GOTO-YAMAMOTO, 2008; RISTIC et al., 2007). Ebenso benötigt die Gefriertrocknung mehr Arbeitsschritte bei der Probenbearbeitung, wodurch die Schwankung der Werte vergrößert wird.

Zusätzlich zur analytischen Untersuchung, ob die beiden Probenvorbereitungsmethoden unterschiedliche quantitative Ergebnisse erbringen, wurde auch der Arbeitsaufwand für die beiden Probenbearbeitungsmethoden verglichen. Von der Probennahme bis inklusive zur Trennung der Schalen von der Pulpe ist die Bearbeitung der unterschiedlichen Methoden gleich. Nach dem Schälen der Beeren teilt sich die Probenvorbereitung der beiden Methoden. Trotzdem konnte unter unseren Laborbedingungen, pro Probe gerechnet, derselbe Zeitaufwand (etwa 75 Minuten) für die Gefriertrocknung bzw. die Extraktion mit Perchlorsäure festgestellt werden (exklusive der Zeit im Gefriertrockner und während des HPLC-Analysenlaufs, die aber keinen Arbeitsaufwand darstellen).

Ein weiterer möglicher Unterschied der Vorbereitungsmethoden ist die Anzahl bearbeitbarer Proben pro Tag. Beim Aufschluss mit Perchlorsäure können nur wenige Proben (ca. vier Proben) pro Tag bearbeitet werden. Al-

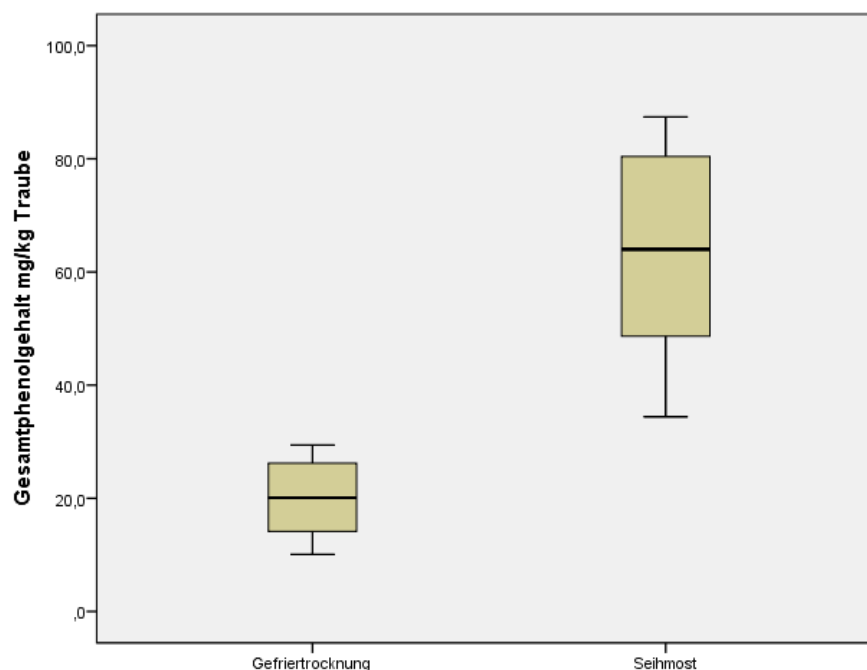


Abbildung 2: Vergleich der Phenolgehalte (mg/kg Traube) von Seihmost und gefriergetrockneter Pulpe

lerdings gelangt man an diesem Tag auch zu den Analysenergebnissen. Bei der alternativen Bearbeitung mit Gefriertrocknung sind zwar im ersten Schritt, bis inklusive der Gefriertrocknung, nur gleich viele Proben pro Tag möglich wie beim Perchlorsäure-Verfahren, allerdings kann bei der nachfolgenden Extraktion eine größere Probenanzahl pro Tag abgearbeitet werden (8 bis 12 Proben). Andererseits sind bei dieser Methode mehrere Schritte mit einem vermehrten Einsatz von Geräten notwendig. Dem gegenüber steht die Gefährlichkeit der Verwendung von Perchlorsäure, welche als stark ätzend und korrosiv eingestuft wird. Durch die Verwendung von Perchlorsäure entstehen auch noch weitere Kosten, da diese Chemikalie die HPLC-Säule korrodiert und deshalb ein Austausch öfter notwendig ist. Die richtige Entsorgung von Perchlorsäure ist ebenfalls zu beachten. Auch die Unterschiede in der Haltbarkeit der Proben nach der Trennung von Schale und Pulpe ist zu beachten. Während sich die gefriergetrockneten Proben länger halten, müssen beim Aufschluss mit Perchlorsäure und auch bei der Messung von Seihmost die Proben jedes Mal neu vorbereitet werden.

LITERATUR

DOWNEY, M. O. UND ROCHFORD, S. 2008: Simultaneous separation by reversed-phase high-performance liquid chromatography and mass spectral identification of anthocyanins and flavonols in Shiraz grape skin. *Journal for Chromatography A* 1201: 43-47.

EDER, R. 2018 PHENOLE. In: Dietrich, H.D., Wittkowski, C.-D. und Otteneder, H. (Hrsg). *Analytik des Weines*. Stuttgart, Eugen Ulmer, 2018. (in Druck)

EDER, R., OSWALD, B. UND WENDELIN, S. 2004: Einfluss von pektolytischen Enzympräparaten mit Acetylaseaktivität sowie Botrytisbefall und Maischeerhitzung auf Anthocyanzusammensetzung und Qualität von Rotweinen. *Mitt. Klosterneuburg* 54: 204 – 221.

EDER, R., GLATZ, CH. AND WENDELIN, S. 2016: Ethylgallate – a new positive health related phenol in red

Die Effizienz bzw. Vollständigkeit der Extraktion wird durch mehrere Faktoren beeinflusst, wie auch bei SUN und SPRANGER (2005) bereits erwähnt. Trotz großer Bemühungen konnte bisher keine 100-prozentige Extraktion der Phenole erreicht werden, aber aus quantitativer Sicht sollten Methoden empfohlen werden, die bei vergleichbarem Ausgangsmaterial einen höheren Phenolgehalt ergeben.

Bei der verwendeten HPLC-Analyse wurden auch nur einzelne phenolische Substanzen erfasst. Diese Analysen lieferten aufgrund der verwendeten pilzwiderstandsfähigen Sorten interessante Daten. Diese werden weiter untersucht und sollen in folgenden Publikationen veröffentlicht werden.

DANKSAGUNG

Für das zur Verfügung gestellte Traubenmaterial danken wir der Abteilung Rebzüchtung unter der Leitung von HR Dr. FERDINAND REGNER.

wine? 28th Int. Conference on Polyphenols. ICP 2016 Vienna, 11.-15.July 2016 Polyphenols Communication: 374-375.

GABLER, F. M., SMILANICK, J. L., MANSOUR, M., RAMMING, D. W. UND MACKAY, B. E. 2003: Correlations of Morphological, Anatomical, and Chemical Features of Grape Berries with Resistance to *Botrytis cinerea*. *Phytopath.* 93 (10): 1263-1273.

GOMEZ-ALONSO, S., GARCIA-ROMERO, E. UND HERMOSIN-GUTIERREZ, I. 2007: HPLC analysis of diverse grape and wine phenolics using direct injection and multidetector by DAD and fluorescence. *J. Food Comp. Anal.* 20: 618-626.

GATTO, P., VRHOVSEK, U., MUTH, J., SEGALA, C., ROMUALDI, C., FONTANA, P., PRUEFER, D., STEFANINI, M.,

- MOSER, C., MATTIVI, F. UND VELASCO, R. 2008: Ripening and Genotype Control Stilbene Accumulation in Healthy Grapes. *J. Agric. Food Chem.* 56: 11773-11785.
- HUBER, E., WENDELIN, S., KOBLER, A., BERGHOFER, E. UND EDER, R. 2005: Einsatz eines optischen Sensors bei der Traubenannahme zur Ermittlung der phenolischen Qualität von Rotweintrauben. *Mitt. Klosterneuburg* 55: 201-210.
- KOYAMA, K. UND GOTO-YAMAMOTO, N. 2008: Bunch Shading During Different Developmental Stages Affects the Phenolic Biosynthesis on Berry Skins of 'Cabernet Sauvignon' Grapes. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 133 (6): 743-753.
- OTREBA, J. B., BERGHOFER, E., WENDELIN, S. AND EDER, R. 2006: Polyphenole und antioxidative Kapazität in österreichischen Weinen aus konventioneller und biologischer Traubenproduktion. *Mitt. Klosterneuburg* 56: 22 – 32.
- PEREIRA, D.M., VALENTÃO, P., PEREIRA, J. AND ANDRADE, P.B. 2009. Phenolics: From chemistry to biology. *Molecules* 2009, 14: 2202-2211; doi:10.3390/molecules14062202
- RISTIC, R., DOWNEY, M. O., ILAND, P. G., BINDON, K., FRANCIS, I. L., HERDERICH, M. AND ROBINSON, S. P. 2007: Exclusion of sunlight from Shiraz grapes alters wine colour, tannin and sensory properties. *Australian Journal of Grape and Wine Research* vol 13 (2): 53-65.
- SANDHU, A. UND GU, L. 2010: Antioxidant Capacity, Phenolic content, and Profiling of Phenolic Compounds in the Seeds, Skin, and Pulp of *Vitis rotundifolia* (Muscadine Grapes) As Determined by HPLC-DAD-ESI-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* vol. 58 (8): 4681-4692.
- SPAYD, S.E., TARARA, J.M., MEE, D.L. UND FERGUSON, J.C. 2002: Separation on Sunlight and Temperature Effects on the Composition of *Vitis Vinifera* cv. Merlot Berries. *Am. J. Enol. Vitic.* 53: 171-182.
- SUN B. UND SPRANGER M. I. 2005: Review: Quantitative Extraction and Analysis of Grape and Wine Proanthocyanidins and Stilbene. *Ciencia e Tecnica Vitivinicola* 20 (2): 59-89.
- VIDAVALUR, R., OTANI, H., SINGAL, P. K. UND MAULIK, N. 2006: Significance of wine and resveratrol in cardiovascular disease: French paradox revisited. *Experimental & clinical cardiology* 11 (3): 217-225.
- ZÖCHLING, A., REITER, E., EDER, R., WENDELIN, S., LIEBNER, F. AND JUNGBAUER, A. 2009: The flavonoid kaempferol is responsible for the majority of estrogenic activity in red wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 60: 223-232.

Eingelangt am 17. April 2018