

Charakterisierung der Whiskylaktone im Holz rheinland-pfälzischer Eichen

Einleitung

Seit einigen Jahren eröffnet sich für rheinland-pfälzisches Eichenholz die Perspektive einer hochwertigen Vermarktung als Fassholz für regionale Rotwein-Kundenwertketten im Lande (HAUBER *et al.*, 2008). Das Holz aus dem Pfälzerwald, dem Bienwald und von der Mosel wird von heimischen Küfern verwendet, um die Winzer vor Ort mit hochwertigen Fässern für die Barriqueweinherstellung auszustatten. Allerdings wurde bisher die Eignung der verschiedenen rheinland-pfälzischen Eichenherkünfte für die Küferei noch nicht untersucht. Von schweizerischen, österreichischen, spanischen und französischen Untersuchungen ist bekannt, dass es signifikante Herkunftsunterschiede gibt (VIVAS, 1997, TEISCHINGER, 2006, AUER *et al.*, 2007, JORDÃO *et al.*, 2007). Ausschlaggebend dafür sind anatomische Materialeigenschaften und die Holzinhaltsstoffe (VIVAS, 1997).

Unter den Holzinhaltsstoffen kommt den Whiskylaktonen eine besondere Bedeutung für den Barriqueweinausbau zu. Sie bereichern die Weine während der Fasslagerung um eine Kokos-Geschmacksnote (VIVAS, 1997). Bekannt ist, dass es bedeutende Unterschiede in den Laktongehalten zwischen unterschiedlichen Eichenarten und zwischen unterschiedlichen europäischen Traubeneichenherkünften gibt (MOSEDALE & SAVILL, 1996, VIVAS *et al.*, 2000). Über die rheinland-pfälzischen Verhältnisse liegen dagegen bisher keine Hinweise vor. Deshalb zielt die in Aussicht genommene Studie darauf ab, die Laktone unterschiedlicher rheinland-pfälzischer Eichenherkünfte im Vergleich zu französischen Standards und während der Fassholzreifung zu charakterisieren.

2. Experimentelles

2.1. Probenmaterial

Gemahlenes Eichenholz (Pulver).

2.2. Materialien und Chemikalien

Solid phase micro extraction (SPME) Fasern mit Divinylbenzol/carboxen/polydimethylsiloxan (DVB/CAR/PDMS)-Beschichtung und Whiskylactone (WL) waren von Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland). α -Octalacton war von Alfa Aesar® (Karlsruhe, Deutschland). Wasser wurde mittels einer MilliQ-Anlage (Millipore, Eschborn, Deutschland) gereinigt. Die enantioselektive Trennsäule war bestand aus seiner Belegung mit 6-TBDMS-2,3-DiMe- β -CD in SE 52, 30m 0,25mm i.D.; 0,25 μ m. Die Belegung und Synthese erfolgte im eigenen Labor (Quelle und Literatur: Disseration, Dr. Schmarr, Univ. Frankfurt, 1992).

2.3. Probenvorbereitung

Whiskylactone (WL) wurden mittels SPME aus einer Dispersion von 500 mg Eichenholzpulver in 10 mL Wasser extrahiert. Die SPME wurde mittels eines Combi-Pal Probengebers (Software vers. 1.5.2; CTC, Zwingen, Schweiz) durchgeführt. Zur Ausstattung des Combi-Pal gehörten SPME Faserhalter, eine Station zum Ausheizen der Faser (Conditioning station, CTC), sowie ein "single magnet mixer" (SMM, Chromtech, Idstein). Vor der Extraktion wurde die Lösung für 5 min bei 50 °C aufgeheizt. Die eigentliche Extraktion erfolgte mittels SPME-Faser während 15 min im Dampfraum (headspace; HS) der Probe bei 50 °C. Vor jeder Analyse wurde die Faser bei 270 °C für 5 min ausgeheizt.

Quantifiziert wurde mittels zweifacher Aufstockung (Standardadditionsverfahren). Die erste Aufstockung erfolgte mit 5 μ l, die zweite Aufstockung mit 10 μ l der WL-Stammlösung (1.073 mg/ml in abs. Ethanol). Zusätzlich wurde α -Octalacton zur Kontrolle der Wiederholbarkeit als Standard eingesetzt.

2.4. HS-SPME-GC-MS

Die chromatographische Trennung erfolgte mittels eines ThermoFisher Scientific Trace GC ultra 2.0 Systems, der mit einem "programmed temperature vaporizing" (PTV) Injektor ausgestattet war. Die massenspektrometrische Detektion erfolgte mittels eines ThermoFisher Scientific PolarisQ Iontrap MS. Steuerung und Datenaufnahme erfolgte durch Xcalibur Software version 2.0.7. Die Desorption der SPME Faser erfolgte bei 200 °C im Injektor mit einem 1 mm i.D. Liner im Splitlos Modus (BGB Analytik, Adliswil, Schweiz). Nach 3 min wurde das Splitventil geöffnet und ein Splitfluß von 12 mL min⁻¹ eingestellt. Helium wurde mit 1.3 mL min⁻¹ als Trägergas eingesetzt. Die Trennsäule bestand aus einer 30 m x 0.25 mm i.d. Fused Silica Kapillare, belegt mit 0.25 μ m von 50% 6-TBDMS-2,3-DiMe- β -Cyclodextrin in SE 52. Die Ofentemperatur wurde wie folgt programmiert: 40 °C (3 min isothermal), mit 5 °C min⁻¹ auf 120 °C, mit 1.5 °C min⁻¹ auf 160 °C und mit 20 °C min⁻¹ auf 200 °C (10 min isothermal). Massenspektren wurden im Electron Impact

Modus (EI+) mit 70 eV aufgenommen. Die Quelltemperatur betrug 230 °C und die Transferleitung war auf 200 °C gesetzt. Selected ion monitoring (SIM) erfolgte für die Ionen mit m/z 41 und 71 (Qualifizierungsionen) bzw. m/z 99 (Quantifizierungsion). Die Zuordnung der Elutionsreihenfolge (trans vor cis und der Enantiomerenreihenfolge) basierte auf früheren Untersuchungen (1) und Vergleich mit Literaturdaten (2, 3).

3 Ergebnisse

Probe	Whiskylactone [ng/g]			
	trans		cis	
	3S, 4R	3R, 4S	3S, 4S	3R, 4R
Bu7	10	ND ^a	6	ND ^a
01.19	25	ND ^a	14	5
02.19	128	ND ^a	565	ND ^a
03.19	26	ND ^a	8	ND ^a
04.19	246	ND ^a	86	ND ^a
05.19	16	ND ^a	52	ND ^a
06.19	21	ND ^a	10	ND ^a
07.19	7	ND ^a	6	ND ^a
08.19	40	ND ^a	44	ND ^a
09.19	6	ND ^a	ND	ND ^a
10.19	6	ND ^a	4	ND ^a
11.19	ND	ND ^a	ND	ND ^a
12.19	ND	ND ^a	ND	ND ^a
13.19	ND	ND ^a	ND	ND ^a
14.19	43	ND ^a	16	ND ^a
15.19	ND	ND ^a	ND	ND ^a
16.19	8	ND ^a	11	ND ^a
17.19	596	ND ^a	235	ND ^a
18.19	13	ND ^a	9	ND ^a
19.19	64	ND ^a	39	16
20.19	735	ND ^a	1298	ND ^a

Probe	Whiskylactone [ng/g]			
	trans		cis	
	3S, 4R	3R, 4S	3S, 4S	3R, 4R
01.20	21	ND ^a	10	ND ^a
02.20	28	ND ^a	202	ND ^a
03.20	114	ND ^a	25	ND ^a
04.20	224	ND ^a	62	ND ^a
05.20	17	ND ^a	67	ND ^a
06.20	10	ND ^a	8	ND ^a
07.20	9	ND ^a	7	ND ^a
08.20	ND	ND ^a	ND	ND ^a
09.20	ND	ND ^a	ND	ND ^a
10.20	28	ND ^a	11	6
11.20	40	ND ^a	12	10
12.20	6	ND ^a	4	ND ^a
13.20	13	ND ^a	ND	ND ^a
14.20	64	ND ^a	20	ND ^a
15.20	ND	ND ^a	ND	ND ^a
16.20	13	ND ^a	18	ND ^a
17.20	2903	ND ^a	949	ND ^a
18.20	7	ND ^a	8	ND ^a
19.20	13	ND ^a	6	ND ^a
20.20	1380	ND ^a	1501	ND ^a

21.19	12	ND ^a	17	ND ^a	21.20	26	ND ^a	40	ND ^a
22.19	9	ND ^a	ND	ND ^a	22.20	ND	ND ^a	12	ND ^a

^a nicht detektiert

Tab. 1: Laktonenantimere in den Eichenholzproben aus Treis-Brodenbach

In den meisten Holzproben aus dem Umgriff der fünf rheinland-pfälzischen Eichen-Dauerbeobachtungsflächen ließ sich Eichenlaktone nachweisen. Unter den beiden denkbaren Trans-Enantiomeren wurde jedoch nur das 3S,4R- und unter den Cis-Enantiomeren das 3S,4S-Eichenlaktone beobachtet (Tab. 1). Im Durchschnitt waren 17,54 µg Eichenlaktone / g TG in den Holzproben (Tab. 2). Allerdings variierten die Laktongehalte des Holzes bei Standardabweichungen von 16,85 µg / g TG zwischen und bis zu 17,98 µg / g TG innerhalb der Bestände beträchtlich. Das meiste Eichenlaktone wurde mit durchschnittlich 21,603 µg / g TG in Entenpfuhl nachgewiesen, wo mit 60,671 µg / g TG auch der höchste Einzelwert gemessen wurde (Tab. 2). Auf der anderen Seite ließ sich im Holz der Merzalber Eichen überhaupt kein Eichenlaktone nachweisen. Die Unterschiede zwischen den Beständen waren signifikant (Tab. 3).

Bestand	Gesamt-Eichenlaktone* (µg / g TG)	Cis-Eichenlaktoneanteil* (%)
Treis-Brodenbach	0,522 (1,207)	39,9 (23,4)
Entenpfuhl	21,603 (17,983)	83,3 (7,1)
Klink	20,474 (12,370)	57,3 (32,6)
Waldmohr	17,691 (11,290)	78,4 (27,5)
Merzalben	n. n. [#]	n. b. [§]
Mittelwert⁺	17,540 (16,845)[§]	62,3 (30,6)[§]

Tab. 2: Eichenlaktone in den Holzproben aus dem Umgriff von fünf rheinland-pfälzischen Eichen-Dauerbeobachtungsflächen.

In jedem Bestand wurden 10 Eichen beprobt (vgl. SEEGMÜLLER *et al.*, in Vorbereitung, Kap. 2.1.2). Die Proben wurden entsprechend Kap. 2.2.2 untersucht. *, Die Werte in Klammern geben die bestandesweisen Standardabweichungen an. ⁺, Die Werte dieser Zeile in Klammern geben die Standardabweichungen zwischen den Beständen an. [#], n. n., nicht nachweisbar. [§], n. b., nicht berechenbar. [§], Mittelwert und Standardabweichung ohne Merzalben.

Kennwert	χ^2	Freiheitsgrade	asymptotische Signifikanz
Gesamt-Eichenlakton	40,108	4	0,000
Anteil Cis-Lakton	15,627	3	0,001

Tab. 3: Kruskal-Wallis-Tests der Gesamt-Eichenlaktone und des Cis-Eichenlaktons auf signifikante Bestandesunterschiede.

Die Messwerte der Gesamteichenlaktone und des Cisw-Eichenlaktons in Treis-Brodenbach verteilten sich nicht normal, so dass die bestandesweisen Gehaltsunterschiede mittels Kruskal-Wallis-Tests untersucht wurden. Als signifikant gelten die Unterschiede bei asymptotischen Signifikanzen von unter 0,05.

Wie die Gesamtgehalte an Eichenlakton variierten auch die Anteil an Cis-Eichenlakton zwischen 39,9 % in Treis-Brodenbach und 83,3 % in Entenpfuhl beträchtlich (Tab. 2). Die Unterschiede zwischen den Beständen waren auch hinsichtlich der Cis-Eichenlaktonanteile signifikant (Tab. 3). Die Standardabweichung zwischen den Bestände umgab den mittleren Cis-Eichenlaktonanteil aller vier Waldstücke, in deren Holz sich Eichenlakton nachweisen ließ, von 64,7 % um $\pm 20,1$ %. Am einheitlichsten waren die Cis-Eichenlaktonanteile mit lediglich 7,1 % Standardabweichung in Entenpfuhl und am stärksten schwankten sie mit einer Standardabweichung von 32,6 % in Klink (Tab. 2).

4. Diskussion

Die Ergebnisse ergeben in Treis-Brodenbach insgesamt recht niedrige Gehalte an Whiskylactonen in den untersuchten Eichenholzproben (unterer ng/g-Bereich). In wenigen Fällen wurden allerdings auch Werte von etwa 0,5-3 μ g/g gemessen. MASSON *et al.* beschrieben die Gehalte von Whiskylactonen in verschiedenen Eichenholzspezies im Bereich von etwa 20 μ g / g TS (Traubeneiche aus dem Darney; auch als *Quercus petraea* (syn. *Quercus sessiliflora*) bis 45 μ g/g (trockenes) Eichenholz (4). Solche Konzentrationen finden sich beispielsweise in dem Eichenholz aus dem Soonwald, dem Saar-Hunsrück und dem Nordpfälzer Bergland. Im Gegensatz dazu ließ sich im Eichenholz aus dem Pfälzerwald überhaupt kein Lakton nachweisen, obwohl diese Herkünfte als ausgesprochen aromstoffreich gelten (7). Für Stieleiche (aus dem Limousin; auch als *Quercus robur* bzw. manchmal auch als *Q. pedunculata* oder *Q. robur* bezeichnet) wurden gleichfalls niedrige Gehalte von <1 μ g/g gefunden. Tendenziell etwas höhere Gehalte wurden in amerikanischer Eiche (*Quercus alba*) gefunden 33-45 μ g/g). Mosedale und Savill beschreiben ebenfalls niedrige Gehalte (unterer

$\mu\text{g/g}$ -Bereich) für *Quercus robur* (5). Zwischen den untersuchten Beständen unterscheiden sich die Laktongehalte signifikant. Dies weist auf standörtliche Einflüsse wie Klima oder Baumernährung hin.

Die Enantiomerisierung der untersuchten Proben ergab in den allermeisten Fällen eine klare Dominanz des (3S,4R)-Enantiomers im Falle des trans-WL bzw. des (3S,4S)-Enantiomers im Falle des cis-Whiskylactons. Diese Ergebnisse stimmen gut mit denen früherer Arbeiten überein (3, 6) und waren letztendlich zu erwarten. Inwieweit in einigen Fällen Spuren des jeweils anderen Enantiomers tatsächlich gefunden wurden, müsste in weiteren Studien eingehender untersucht werden. Aufgrund der hier eingesetzten Schnellmethode (HS-SPME) und der limitierten Probenmenge (0,5g) sind die hier ermittelten Werte tendenziell eher im Bereich der Nachweisgrenze angesiedelt. Damit geht natürlich auch ein höherer Fehler ein und es können mitunter falsch-positive Resultate (s. Enantiomerisierung) nicht gänzlich ausgeschlossen werden. In solchen Fällen wäre der Einsatz größerer Probenmengen mit alternativer Extraktion (fest-flüssig) und chromatographischer Vortrennung (LC, SPE) der Flüssigextrakte sinnvoll. In der Arbeitsgruppe wird derzeit die Synthese der deuterierten Whiskylactone betrieben, so daß in absehbarer Zeit auch die Quantifizierung über den Ansatz der Stabilisotopenverdünnungsanalyse (SIDA) möglich sein sollte. Diese Methode könnte dann für folgende Untersuchungen eingesetzt werden, was einen insgesamt reduzierten Analysenumfang ergibt, da keine zweifache-Aufstockungen nötig sind.

Anhang:

Experimentelle Bedingungen

Proben

- ca. 500mg gemahlene Holzpulver

HS-SPME (Combi Pal Autosampler 1.5.2, Software: Cycle Composer Version 1.5.2)

- 50/30µm DVB/CarboxenTM/PDMS Stable FlexTM Fiber (SupelcoTM Analytical, 57329-U)

1. SPME Needle Heater

- Bake Out Temp (°C): 270
- Bake Out Temp (m:ss): 300 (5 min)
- Penetration (mm): 40
- Fiber Exposure (mm): 25

2. SPME Extraction Step

- Extraction Temperature (°C): 50
- Extraction Time (m:ss): 900 (15 min)
- PreIncubation Time (m:ss): 300 (5 min)
- SMM Speed (rpm) 500
- Vial Penetration (mm) 18
- Fiber Extraction Exposure (µl) 13

3. SPME Injektion

- Desorb to GC Inj1
- Desorption Time (m:ss) 180 (3 min)
- Penetration (mm): 40
- Fiber Exposure (mm): 22

GC-MS Datasystem Xcalibur 2.0.7

GC

- Trennsäule: 6-TBDMS-2,3-DiMe-β-CD in SE 52, 30m 0,25mm i.D.; 0,25µm
- Trace GC Ultra 2.0:

1. Oven Method

- Initial Temp (°C): 40
- Initial Time (min): 3
- Rate #1 (deg/min): 5
- Final Temperature #1 (°C): 120
- Hold Time #1 (min): 0
- Rate #2 (deg/min): 1.5
- Final Temperature #2 (°C): 160
- Hold Time #2 (min): 0
- Rate #3 (deg/min): 20
- Final Temperature #3 (°C): 200
- Hold Time #3 (min): 10

2. Right PTV Method

- Base Temperature (°C): 200
- Mode: CT Splitless
- Split Flow: On
- Split Flow (ml/min): 12
- Splitless Time (min): 3
- Constant Purge: On

3. Right Carrier Method

- Mode: Constant Flow
- Initial Value: On
- Initial Value (ml/min): 1.30
- Initial Time: 1
- Gas Saver Flow (ml/min): 15
- Gas Saver Time: 3.50
- Vacuum Compensation: On

4. Aux Zones

- MS Transfer Line: On
- MS Transfer Line (°C): 200

MS

- PolarisQ version 2.0.1
- Source Temp (°C): 230
- Micro Scans: 3
- Max Ion Time (ms): 25
- Scan Mode: SIM
- SIM: 41, width 1.0 / 71, width 1.0 / 99, width 1.0

Quant Browser

- Qualifier Masses: 41, 71
- Quantifier Masses: 99

Additionsstandard

- conc. IS, α -octalactone, A328: 1.0872 μ g/ μ L dest. EtOH
98%, L14303, cas. no. 689-76-0
- conc. AS, Wiskylacton, A063: 1.073 μ g/ μ L dest. EtOH
W38,031-8, cas. no. 39212-23-2

Dosagen:

- A. Zugabe interner Standard: 50 μ L in 10ml MilliQ⁵⁰ Wasser +500mg Holz
- dOL1: 27,2 μ g
 - dOL2: 27,2 μ g
- B. eindache Aufstockung: 5 μ L in 10ml MilliQ⁵⁰ Wasser +500mg Holz
- WL1: 1.9 μ g
 - WL2: 1.9 μ g
 - WL3: 0.8 μ g
 - WL4: 0.8 μ g
- C. zweifache Aufstockung: 10 μ L in 10ml MilliQ⁵⁰ Wasser +500mg Holz
- WL1: 3.8 μ g
 - WL2: 3.8 μ g

- WL3: 1.6μg
- WL4: 1.6μg

Alternative Darstellung der Ergebnisse:

Whiskylacton-Gehalte in den Eichenholzproben [ng\g]

Proben- bezeichnung	<i>3S, 4R (trans)</i>	<i>3R, 4S (trans)</i>	<i>3S, 4S (cis)</i>	<i>3R, 4R (cis)</i>
Bu7	10	ND ^a	6	ND ^a
01.19	25	ND ^a	14	5
02.19	128	ND ^a	565	ND ^a
03.19	26	ND ^a	8	ND ^a
04.19	246	ND ^a	86	ND ^a
05.19	16	ND ^a	52	ND ^a
06.19	21	ND ^a	10	ND ^a
07.19	7	ND ^a	6	ND ^a
08.19	40	ND ^a	44	ND ^a
09.19	6	ND ^a	ND	ND ^a
10.19	6	ND ^a	4	ND ^a
11.19	ND	ND ^a	ND	ND ^a
12.19	ND	ND ^a	ND	ND ^a
13.19	ND	ND ^a	ND	ND ^a
14.19	43	ND ^a	16	ND ^a
15.19	ND	ND ^a	ND	ND ^a
16.19	8	ND ^a	11	ND ^a
17.19	596	ND ^a	235	ND ^a
18.19	13	ND ^a	9	ND ^a
19.19	64	ND ^a	39	16
20.19	735	ND ^a	1298	ND ^a
21.19	12	ND ^a	17	ND ^a
22.19	9	ND ^a	ND	ND ^a

^a nicht detektiert

Whiskylacton-Gehalte in den Eichenholzproben [ng\g]

Probe	3 <i>S</i> , 4 <i>R</i> (<i>trans</i>)	3 <i>R</i> , 4 <i>S</i> (<i>trans</i>)	3 <i>S</i> , 4 <i>S</i> (<i>cis</i>)	3 <i>R</i> , 4 <i>R</i> (<i>cis</i>)
01.20	21	ND ^a	10	ND ^a
02.20	28	ND ^a	202	ND ^a
03.20	114	ND ^a	25	ND ^a
04.20	224	ND ^a	62	ND ^a
05.20	17	ND ^a	67	ND ^a
06.20	10	ND ^a	8	ND ^a
07.20	9	ND ^a	7	ND ^a
08.20	ND	ND ^a	ND	ND ^a
09.20	ND	ND ^a	ND	ND ^a
10.20	28	ND ^a	11	6
11.20	40	ND ^a	12	10
12.20	6	ND ^a	4	ND ^a
13.20	13	ND ^a	ND	ND ^a
14.20	64	ND ^a	20	ND ^a
15.20	ND	ND ^a	ND	ND ^a
16.20	13	ND ^a	18	ND ^a
17.20	2903	ND ^a	949	ND ^a
18.20	7	ND ^a	8	ND ^a
19.20	13	ND ^a	6	ND ^a
20.20	1380	ND ^a	1501	ND ^a
21.20	26	ND ^a	40	ND ^a
22.20	ND	ND ^a	12	ND ^a

^a nicht detektiert

Referenzen

- Schmarr, H.-G.; Eisenreich, W.; Engel, K.-H., Synthesis and analysis of thio-, thiono-, and dithio-derivatives of whiskey lactone. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49, (12), 5923-5928.

2. Mosandl, A.; Kustermann, A.; Palm, U.; Dorau, H. P.; König, W. A., Stereoisomeric flavor compounds. XXVIII. Direct chiro-specific HRGC analysis of natural γ -lactones. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* **1989**, 188, (6), 517-20.
3. Guichard, E.; Fournier, N.; Masson, G.; Puech, J. L., Stereoisomers of β -methyl- γ -octalactone. I. Quantification in brandies as a function of wood origin and treatment of the barrels. *American Journal of Enology and Viticulture* **1995**, 46, (4), 419-423.
4. Masson, G.; Guichard, E.; Fournier, N.; Puech, J. L., Stereoisomers of β -methyl- γ -octalactone. II. Contents in the wood of French (*Quercus robur* and *Quercus petraea*) and American (*Quercus alba*) oaks. *American Journal of Enology and Viticulture* **1995**, 46, (4), 424-428.
5. Mosedale, J. R.; Savill, P. S., Variation of heartwood phenolics and oak lactones between the species and phenological types of *Quercus petraea* and *Q. robur*. *Forestry* **1996**, 69, (1), 47-55.
6. Guenther, C.; Mosandl, A., Stereoisomeric aroma substances. XV. Chiro-specific analysis of natural aroma components: 3-methyl-4-octanolide, \"*Quercus*-whiskylactone\". *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* **1987**, 185, (1), 1-4.
7. Vivas, N., Absalon, C., Benoist, F., Vitry, C., Grazillier, S., de Revel, G. & Bertrand, A. (2000): Les chênes européens: *Q. robur* L. et *Q. petraea* (Matt.) Liebl.: Analyse des potentialités œnologiques des différents massifs forestiers. *V^e Colloque des Sciences et Techniques de la Tonnellerie*: S. 31-37.