

TRENNUNG VON AROMASTOFFEN DES HONIGS MIT HILFE DER GAS-CHROMATOGRAPHIE

W. DÖRRSCHEIDT UND K. FRIEDRICH

*Physikalisch-Chemisches Institut der Universität Innsbruck (Österreich)
und Physikalisch-Chemisches Institut der Universität
Freiburg/Bw. (Deutschland)*

(Eingegangen dem 10. Mai 1961)

Es ist bekannt, dass Geschmack und Geruch wohlgeschmeckender und wohlriechender Naturstoffe durch das Zusammenspiel zahlreicher einzelner Aromastoffe bewirkt wird, die den Sinnesorganen als einzelne Komponenten dargeboten oft unangenehme Empfindungen hervorrufen, die in keiner Weise an den Naturstoff erinnern, aus dem sie gewonnen werden.

Die Trennung dieser Komponenten durch Gas-Chromatographie vorzunehmen ist naheliegend. Die Möglichkeit wurde z.B. bereits auf dem 21. Dechema-Kolloquium in Frankfurt/M. 1956 diskutiert¹. Die Charakterisierung von Weinsorten wurde von MECKE UND DE VRIES² mit Erfolg gas-chromatographisch durchgeführt und die Frage des "künstlichen Kaffee-Aromas" wurde, nachdem die gas-chromatographische Auftrennung gelungen war³, sogar von der Presse aufgegriffen.

Die Aromastoffe sind meist nur in sehr geringen Mengen neben Lösungsmitteln wie Alkohol, Wasser etc. vorhanden. Die Durchbruchszacken dieser Lösungsmittel verdecken dann einen so grossen Teil des chromatographischen Spektrums, dass diese im grossem Überschuss vorhandenen Stoffe entfernt bzw. wesentlich verringert werden müssen. Es ergibt sich also die Notwendigkeit, die Aromastoffe in irgendeiner Weise anzureichern, wobei natürlich auch eine Verschiebung der Häufigkeit der einzelnen Komponenten im Gemisch auftreten kann. Wegen der Vielzahl der Aromastoffe und ihrer sehr verschiedenen Häufigkeit hängt es sehr von der Güte der Säule und des Detektors, d.h. also von der gas-chromatographischen Anlage ab, wie viele Komponenten man trennen und letzten Endes identifizieren kann.

Am günstigsten für die Untersuchungen ist es natürlich, wenn man das Naturprodukt, so wie es anfällt, direkt auf die chromatographische Säule aufgeben kann.

TRENNUNG NACH ANREICHERUNG DER AROMASTOFFE

UND REGISTRIERUNG DER KOMPONENTEN DURCH EINE WÄRMELEITFÄHIGKEITSZELLE

Für die chromatographische Analyse der Aromastoffe des Honigs erhielten wir vom Institut für Honigforschung, Bremen (Leiter Dr. H. DUISBERG), verschiedene Honigsorten.

Durch Aufnahme von Chromatogrammen sollte:

- (1) eine objektive Charakterisierung der verschiedenen Honigsorten (z.B. Orangenhonig, Heidehonig etc.) möglich gemacht werden und
- (2) eine schnelle Analysenmethode ausgearbeitet werden, um eventuelle Fälschungen des Honigs rasch und sicher nachweisen zu können.

Es wurde zunächst eine Anreicherung der Aromastoffe vorgenommen, indem ca. 100 g Honig in wenig Wasser gelöst und in einem Flüssigkeitsextraktor mit Äther extrahiert wurden. Diese Extrakte gaben jedoch keine befriedigenden Chromatogramme. Wir erhielten dann vom Institut für Honigforschung, Bremen, 20 l eines Destillates, welches durch Vakuumbehandlung von 3000 kg Honig angefallen war. Hiervon extrahierten wir 7 l mit Äther und chromatographierten den nach Verdunsten der Hauptmenge des Lösungsmittels erhaltenen Rückstand.

Experimentelles

Apparatur: Gasofract der Firma Dr. Virus KG, Bonn.

Säule: 4 m Kupferrohr (4 mm lichte Weite).

Säulenfüllung: Sterchamol, belegt mit 20 % Polyäthylenglykol (Carbowachs 4000).

Probenaufgabe: Präzisionspritze 50 μ l.

Trägengas: Wasserstoff, 0,5 ml/sec.

Anbeitstemperatur: 175°C.

Das aus diesem Konzentrat erhaltene Chromatogramm ist in Fig. 1 dargestellt. Stationäre Phasen wie Dinonylphthalat, Apiezon L, Silikonfett ergaben schlechte oder gar keine Trennungen. Carbowachs 4000 und die niedermolekulare Form Carbowachs 1500 zeigten etwa das gleiche Trennvermögen.

Die hier beschriebene Methode hat jedoch einige Nachteile:

- (1) Das Lösungsmittel (Äther) ist in grossem Überschuss vorhanden und kann daher einige Banden verdecken.

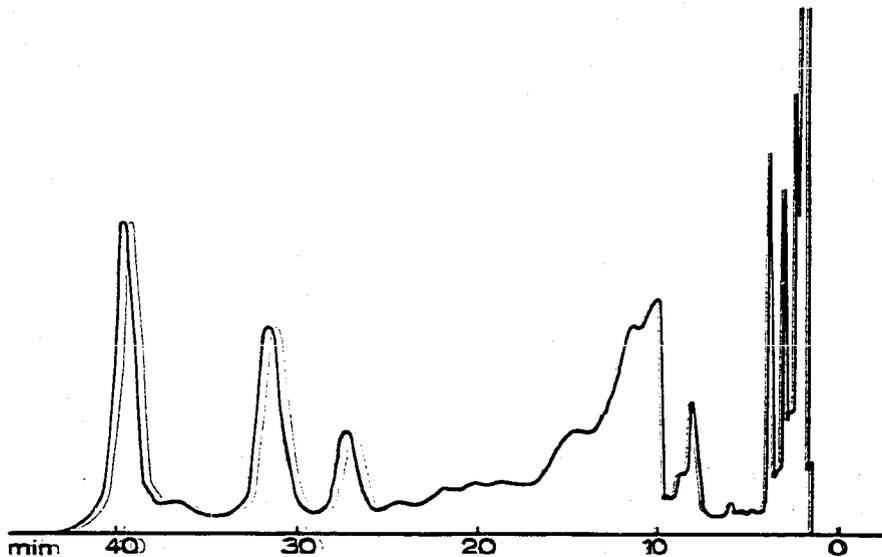


Fig. 11. Chromatogramm von Honigaromastoffen, gewonnen durch Extraktion mit Äther aus einem Vakuumdestillat (W. DÖRRSCHEIDT).

(2) Verunreinigungen des Lösungsmittels ergeben Banden, die nicht von den Aromastoffen des Honigs herrühren.

(3) In Äther wenig- oder nicht-lösliche Komponenten werden nicht erfasst.

(4) Das immer vorhandene Wasser tritt bei der verwendeten Säulenfüllung stets als stark asymmetrische Bande durch, und einige der Aromastoffe kommen nur als kleine Ausbuchtungen der Rückfront zur Anzeige.

(5) Eine quantitative Aussage ist unmöglich, da eine Verschiebung in den Konzentrationen der einzelnen Substanzen je nach ihrer Löslichkeit in Äther auftritt.

TRENNUNG OHNE ANREICHERUNG DER AROMASTOFFE

UND REGISTRIERUNG DER KOMPONENTEN MIT EINEM FLAMMENIONISATIONSDETektor

Die unter 1–5 im vorhergehenden Absatz angeführten Nachteile entfallen, wenn man die in der Dampfphase über dem Honig vorhandenen flüchtigen Bestandteile direkt chromatographiert. Bei der geringen Konzentration dieser Stoffe reicht eine Wärmeleitfähigkeitszelle als Detektor nicht mehr aus, weshalb wir einen Flammenionisationsdetektor verwendeten.

Experimentelles

Apparatur: Fraktometer 116 E mit Flammenionisationsdetektor des Bodenseewerkes Perkin-Elmer und Co. GmbH, Überlingen.

Säule: 2 m Stahlrohr (4 mm lichte Weite).

Säulenfüllung: Chromosorb, belegt mit 30 % Polyäthylenglykol (Carbowachs 1500).

HETP: 2 mm.

Trägergas: Helium, 1.3 ml/sec.

Arbeitstemperatur: 110°C.

Probenaufgabe: Gasschleife, Volumen 1.5 cm³.

Zwei so erhaltene Chromatogramme sind in den Fig. 2 und 3 dargestellt.

Die zuletzt beschriebene Methode hat gegenüber der ersten folgende Vorteile:

(1) Die Chromatogramme enthalten keine Banden eines Lösungsmittels, sondern nur die Banden der flüchtigen Bestandteile des Honigs.

(2) Wasser stört nicht, da der Flammenionisationsdetektor nur organische Verbindungen registriert.

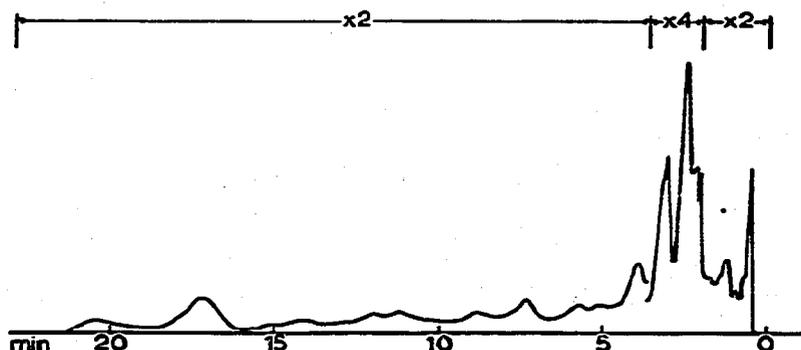


Fig. 2. Chromatogramm der Dampfphase über Honig, Calif. Salbeihonig (K. FRIEDRICH).

(3) Die langwierige und umständliche Anreicherung der Aromastoffe entfällt; die Methode ist daher ein schnelles Mittel, charakteristische Chromatogramme ("fingerprints") für verschiedene Honigsorten zu erhalten.

(4) Eine quantitative Aussage über die Zusammensetzung des Dampfes über dem Honig ist möglich. Eine quantitative Aussage über die wirklichen Konzentrationen

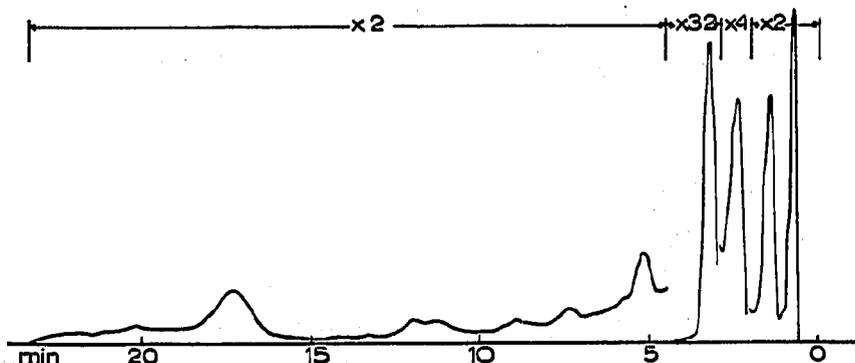


Fig. 3. Chromatogramm der Dampfphase über Honig, Spanischer Orangenhonig (K. FRIEDRICH).

der Aromastoffe im Honig ist erst nach deren Identifizierung und Kenntnis der Ansprechfaktoren möglich.

In Tabelle I sind die Durchbruchzeiten der einzelnen Komponenten des Aromas für sieben Honigsorten zusammengestellt und mit den Durchbruchzeiten der Methyl-ester der C_1 - C_6 *n*-Carbonsäuren und der C_1 - C_6 Alkohole verglichen. Folgende Honigsorten wurden untersucht:

- | | |
|-----------------------------------|---------------------------------|
| A. Span. Orangenhonig | B. Calif. Salbeihonig |
| C. Herkunft unbekannt | D. Norweg. Heidehonig |
| E. Franz. Heidehonig
(Calluna) | F. Franz. Heidehonig
(Erika) |
| G. Chin. Buchweizenhonig | |

Es ist zu ersehen, dass die Banden 1, 10, 11, 17 bei allen untersuchten Honigsorten auftreten und dass die Durchbruchzeiten der Banden 8 und 13 dieselben sind wie die von Essigsäuremethylester und *n*-Buttersäuremethylester. Dass die Banden 8 und 13 von diesen Estern herrühren ist wahrscheinlich. Der endgültige Nachweis muss jedoch noch geführt werden.

Die Identifizierung der einzelnen Aromastoffe wird mit Hilfe der Ultrarotspektroskopie und anderen Methoden durchgeführt; diese Untersuchungen sind noch nicht abgeschlossen.

DANK

Wir danken Frau Prof. Dr. E. CREMER, Innsbruck, und Herrn Prof. Dr. R. MECKE, Freiburg/Br., für die Stellung des Themas und die vielseitige Beratung bei der Durchführung der Messungen.

Ferner sind wir Herrn Dr. H. DUISBERG, Leiter des Institutes für Honigforschung, Bremen, für die Anregung zu dieser Arbeit und die Überlassung von Honigproben und -Extrakten zu grossem Dank verpflichtet.

TABELLE I

VERZEICHNIS DER GEFUNDENEN DURCHBRUCHSZEITEN DER BANDEN BEI 7 HONIGSORTEN (A-G),
VERGLICHEN MIT DEN DURCHBRUCHSZEITEN VON TESTSUBSTANZEN
Gemessen an Carbowachs 1500 bei 110°C mit Helium 1.3 ml/sec als Trägergas

No.	t_D sec	A	B	C	D	E	F	G	Testsubstanz (t_D)
1	35	+	+	+	+	+	+	+	
2	41				+	+			
3	47	+	+						
4	60	+	+		+	+	+	+	
5	71	+	+	+	+	+		+	
6	87	+	+	+			+		Ameisensäuremethylester (84)
7	92				+	+		+	
8	110		+		+	+	+	+	Essigsäuremethylester (110)
9	132	+	+	+		+	+	+	
10	146	+	+	+	+	+	+	+	Methanol, Äthanol, <i>tert.</i> -Butanol (142)
11	183	+	+	+	+				Propionsäuremethylester (153)
12	197	+	+	+					Isopropanol (171)
13	222					+	+		<i>n</i> -Buttersäuremethylester (222)
14	237		+		+				<i>n</i> -Propanol (261)
15	275				+	+	+	+	Butanol-2 (283)
16	309	+	+	+				+	<i>n</i> -Valeriansäuremethylester (333)
17	345	+	+	+	+	+	+	+	Isobutanol (369)
18	400	+		+		+			
19	408				+			+	
20	435	+	+	+			+		<i>n</i> -Butanol (498)
21	531	+	+	+			+		
22	556				+			+	<i>n</i> -Capronsäuremethylester (627)
23	672	+	+	+					Isoamylalkohol (702)
24	720	+	+						
25	790	+						+	
26	861		+	+					<i>n</i> -Amylalkohol (894)
27	927			+					
28	1038	+	+						
29	1180			+					
30	1224	+	+						
31	1329	+		+					Hexanol (1575)

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird die Trennung der Aromastoffe des Honigs beschrieben. Zwei Verfahren kamen zur Anwendung:

(1) Die Trennung und der Nachweis der Aromastoffe mit einer üblichen gaschromatographischen Apparatur (Wärmeleitfähigkeitszelle als Detektor), wobei die Aromastoffe zunächst angereichert werden mussten.

(2) Eine Direktanalyse der Aromastoffe ohne vorherige Anreicherung, wobei ein Flammenionisationsdetektor als Anzeigerät diente. Mit Carbowachs als stationäre Phase konnten 31 Komponenten getrennt werden.

SUMMARY

The separation of the odorous substances of honey is described. The two following methods were used:

(1) Separation and detection of the odorous substances by means of a common gas chromatographic apparatus (heat conductivity cell as detector), in which case the odorous substances had first to be concentrated.

(2) Direct analysis of the odorous substances without prior concentration, using a flame ionization detector. With carbowax as stationary phase 31 components could be separated.

LITERATUR

¹ E. CREMER, *Vortrag auf dem 21. Dechema-Kolloquium*, Frankfurt/Main, 1956.

² R. MECKE UND M. DE VRIES, *Wein-Wiss. Beih. Fachz. deut. Weinbau*, 15 (1960) Okt., Nr. 10.

³ J. W. RHOADES, *Food Research*, 23 (1958) 254.