

Gaschromatographische Untersuchungen zur Frage des Honigaromas*

Von

E. Cremer und M. Riedmann

Aus dem Physikalisch-Chemischen Institut der Universität Innsbruck

Mit 1 Abbildung

(Eingegangen am 10. Dezember 1964)

Das Aroma von Honigen wurde gaschromatographisch untersucht. Die Trennung wurde auf einer Makro-Golay-Säule (Carbowax 1500 als stationäre Phase) durchgeführt. Als Anzeigegerät diente ein Flammenionisationsdetektor (FID). Es konnte gezeigt werden, daß Phenylalanin ein Precursor des artspezifischen Aromas von Honigen ist.

Aroma components of different honeys were investigated gaschromatographically, using a macro Golay column with Carbowax 1500 as stationary phase and a flame ionisation detector. It could be shown that phenylalanine is a precursor of the specific aroma components of honey.

Die Anwendung einer chromatographischen Trennmethode auf die qualitative und quantitative Mikroanalyse von gasförmigen Stoffen mit Hilfe eines Gases als Eluierungsmittel wurde zuerst in den Jahren 1946 bis 1950 in Innsbruck durchgeführt.^{1, 2, 3}

Schon damals konnte gezeigt werden, daß

1. bei Verwendung einer Wärmeleitfähigkeitszelle als Detektor die Fläche unter der angezeigten Zacke der aufgegebenen Substanzmenge proportional

* Herrn Professor Dr. H. Bretschneider zum 60. Geburtstag gewidmet.

¹ F. Prior, Dissertat. Univ. Innsbruck, Mai 1947; E. Cremer und F. Prior, Vortrag auf der Tagung des Vereins Österr. Chemiker, Linz, Mai 1949; Österr. Chemikerztg. **51**, 161 (1950), sowie Z. Elektrochem. **55**, 66 (1951).

² R. Müller, Dissertat. Univ. Innsbruck, Mai 1950; E. Cremer und R. Müller, Vortrag auf dem I. Internat. Mikrochem. Kongreß, Juli 1950; Microchim. Acta [Wien] **36/37**, 553 (1951), Z. Elektrochem. **55**, 217 (1951).

³ E. Cremer, Diskussionsbemerkung Hauptversammlung d. Deutschen Bunsen-Ges., Marburg 1950, Z. Elektrochem. **55**, 65 (1951).

war und ein solches Chromatogramm somit für die quantitative Analyse geeignet ist,

2. sich aus den relativen Verzögerungszeiten einer Substanz und einer Standardsubstanz eine charakteristische Kenngröße $(\Delta\lambda)^4$ ermitteln läßt, die die qualitative Analyse ermöglicht (vgl. Abb. 1 a und 1 b),

3. die Methode besonders als Mikromethode geeignet ist (Anzeigegrenze der ersten Apparatur war 10^{-5} g),

4. Trennungen und Analysen, die nach anderen Methoden Stunden oder Tage dauern würden, sich quantitativ und qualitativ in einem Arbeitsgang, der nur wenige Minuten benötigt, vollziehen lassen.

Anfang 1950 waren neben einigen anorganischen Stoffen bereits eine Reihe organischer Verbindungen (C_2H_2 , C_2H_4 , C_3H_6 , C_2H_5Cl) untersucht worden, doch ahnten zu jener Zeit selbst die auf die Methode schwörenden Bearbeiter nicht, in welchem Maße 15 Jahre später die Gaschromatographie in die Laboratoriumspraxis eingegangen sein würde. Erste in dieser Richtung gegebene Anregungen fielen sogar auf skeptische Ablehnung. Man befürchtete irreversible Adsorption und Reaktion mit dem Trägermaterial, ungenügende Reproduzierbarkeit der Werte und vor allem die Launen der Wärmeleitfähigkeitszelle. Heute ist es gerade diese, die als Detektor in der organischen Chemie am meisten benützt wird.

Die Möglichkeit der Trennung von Aromastoffen wurde auf dem ersten DECHEMA-Kolloquium über Gaschromatographie im Mai 1956⁵ bereits diskutiert und dort von *K. Fischbeck* der Vorschlag gemacht, den sehr empfindlichen menschlichen oder auch tierischen Geruchssinn als Detektor zu verwenden⁶. Diese Anzeigemethode ist jedoch für den Beobachter anstrengend und quantitativ schwer auswertbar. Die Entwicklung der *Golay*-Säule, durch die bei stark verringerter Aufgabemenge die Trennschärfe erhöht wurde, und die Erfindung hochempfindlicher Detektoren (bis 10^{-13} g) gestattete schließlich eine direkte Untersuchung der Duftstoffe.

Seit einigen Jahren beschäftigen wir uns auf Anregung von Herrn Dr. *H. Duisberg*, Direktor des Instituts für Honigforschung in Bremen, mit der gaschromatographischen Analyse der Honigaromen⁷. *Dörrscheidt* und *Friedrich*⁸ konnten 1962 in einer über Honig entnommenen Gasprobe 31 Komponenten trennen, aber keine davon mit Sicherheit identifizieren.

⁴ Vgl. auch *E. Cremer* und *H. Nonn*, *Mh. Chem.* **95**, 910 (1964), sowie *E. Cremer* und *H. L. Gruber*, *J. Gas Chromatogr.* **3**, 8 (1965).

⁵ Vortrag *E. Cremer*, ref. in *E. Cremer* und *L. Roselius*, *Angew. Chem.* **70**, 42 (1958).

⁶ *L. Roselius*, Dissertat. Univ. Innsbruck, Juli 1957, S. 32; s. a.: *Die Pyramide* **6**, 3 (1958).

⁷ *W. Dörrscheidt*, Dissertat. Univ. Innsbruck, April 1961.

⁸ *W. Dörrscheidt* und *K. Friedrich*, *J. Chromatogr.* **7**, 13 (1962).

Wir benutzten zur Trennung der Honigaromastoffe eine Makro-Golay-Säule, 100 m lang, 1 mm i. D. mit Carbowax 1500 als stationärer Phase, bei 50°C und 11 ml/min N₂ für die niedrig siedenden, bei 136°C und 32 ml/min N₂ für die hochsiedenden Komponenten. Als Anzeigergerät diente ein Flammenionisationsdetektor. Mit dieser Anordnung ließen sich 120 Komponenten trennen, von denen wir über die Hälfte identifizieren konnten⁹. Das von Merz¹⁰ gefundene und als die charakteristische Substanz für das Honigaroma angegebene Hydroxymethylfurfurofoll konnte von uns bisher nicht nachgewiesen werden.

Zwei Aroma-Arten sind deutlich voneinander zu unterscheiden: der artspezifische Typengeruch und der trachtspezifische Spitzengeruch¹¹. Für den Typengeruch scheinen neben Estern als Hauptträger des Aromas noch Alkohole mitzuenterscheiden. Das Gesamtaroma wird durch Ester, Aldehyde, Ketone, Alkohole und vielleicht auch durch freie Säuren abgerundet. Den Hauptanteil in den Chromatogrammen der Aromen stellen die Alkohole dar. Allgemein werden diese von ihren Oxydationsprodukten, den Ketonen und Aldehyden, sowie von entsprechenden Estern begleitet. Diese sind, verglichen mit den Alkoholen, ausschließlich in sehr kleinen Konzentrationen vorhanden, sodaß sie gaschromatographisch nicht immer angezeigt werden können.

Die art- und trachtspezifischen Aromakomponenten können als ursprüngliche Bestandteile der Blüten von den Bienen eingesammelt werden und auch durch Gärung des Honigs entstehen. Hierbei kommt sowohl alkoholische als auch Aminosäuregärung in Betracht und es kann aus der gaschromatographischen Analyse der Gärungsprodukte, die im Aroma auftreten, auf die im Honig enthaltenen Vorläufer geschlossen werden. Die Abb. 1 a und 1 b zeigen die Aromazusammensetzung eines Mexico-Honigs im Siedebereich bis zu 130°C vor und nach der Lagerungszeit von einem Jahr. Es waren während dieser Zeit — neben einer Reihe anderer Komponenten — vier Alkohole entstanden, die Produkte der Aminosäuregärung sind: Propanol-(1), 3-Methylbutanol-(1), 2-Methylbutanol-(1) und Pentanol-(1).

Durch Ionenaustausch- und Papierchromatographie sind von anderer Seite^{12, 13} eine Anzahl entbehrlicher und unentbehrlicher Aminosäuren in Honigen festgestellt worden, darunter auch Phenylalanin. Dieses wird aber — wie auch andere Aminosäuren — nicht immer gefunden.

⁹ M. Riedmann, Dissertat. Univ. Innsbruck, April 1964, sowie E. Cremer und M. Riedmann, Z. Naturforsch. **19 b**, 76 (1964), und bisher unveröffentlichte Messungen.

¹⁰ J. H. Merz, J. Apicultural Res. **2**, 1/55 (1963).

¹¹ „Fruchtaromen“, Symposium Bern; 1962, Juris-Verlag, Zürich.

¹² A. J. Virtanen und S. Kari, Acta Chem. Scand. **9**, 1548 (1955).

¹³ S. Maeda, A. Mukai, N. Kosugi und Y. Okada, J. Food Sci. and Technol. **9**, 270 (1962).

In Analogie zu den Aminosäuren Norleucin, Isoleucin, Leucin, α -Aminobuttersäure, denen die vier genannten Alkohole entsprechen, kann Phenylalanin als Precursor von Phenyläthylalkohol angesehen werden.

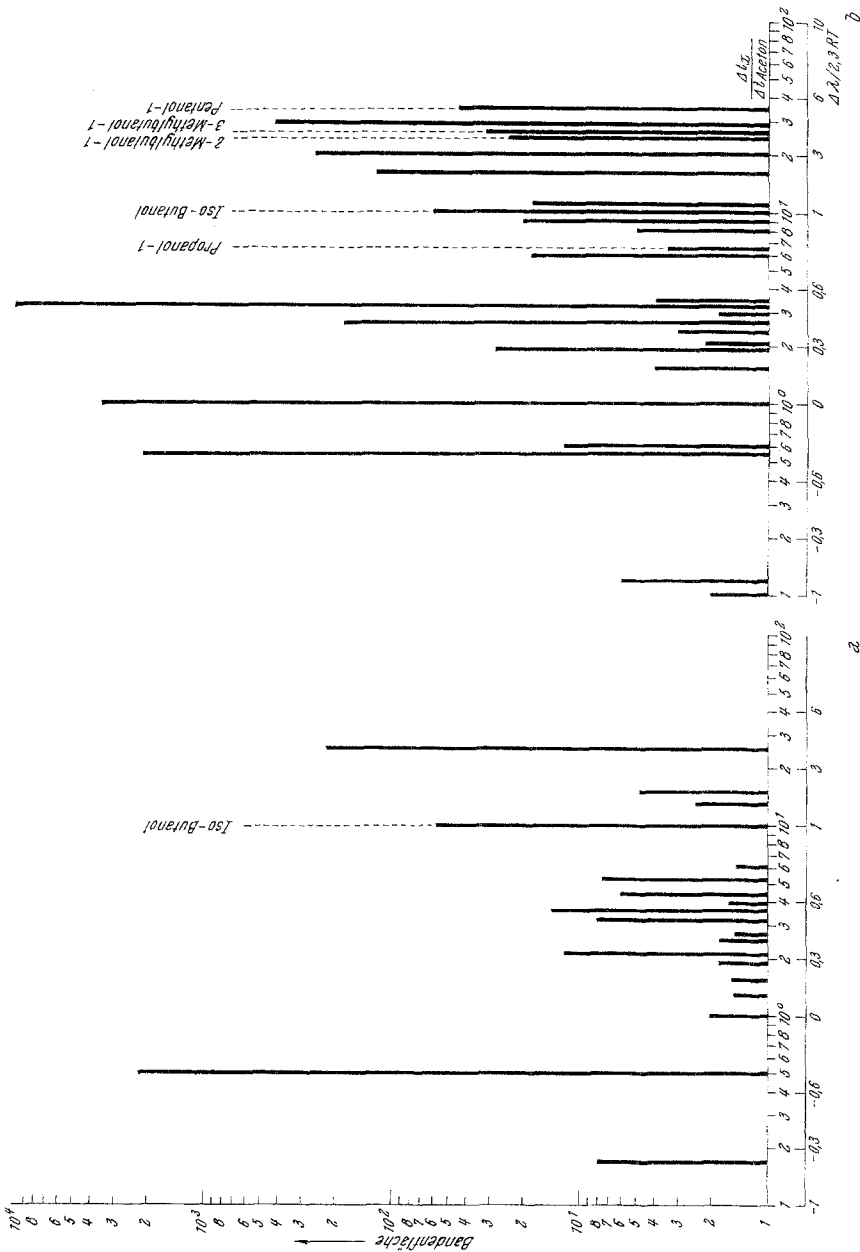


Abb. 1. Chromatographisches Spektrum der niedrig siedenden Aromastoffe eines Mexico-Honigs: Auftragung des log der Bandenfäche gegen $\log \frac{\Delta t_x}{\Delta t_{Aceton}} = 2,3 \text{ Rip}$ bezogen auf Aceton ($\Delta \lambda = 0$);
 a) vor der Lagerung, Δt_x = Verzögerungszeit der entsprechenden Substanz b) nach der Lagerung
 Aufgenommen an Carbowax bei 50°C. Der Bandenfäche 1 entsprechen bei Eichung mit Aceton 10⁻¹⁰. Die Beschriftung der oberen Abszissenskala soll mit 10⁻¹ beginnen (nicht mit 1). In der unteren Abszissenskala lese man 1.3 (statt 3) und 1.8 (statt 6).

Abb. 1 zeigt 31 verschiedene Komponenten; davon konnten 28 identifiziert werden⁹.

Von 22 chromatographierten Honigen enthielten 16 Phenyläthylalkohol und von diesen 14 auch Benzylalkohol. Die anderen 6 Honige zeigten im Chromatogramm keine dieser Komponenten und nur in einigen Fällen einen der Aminosäuregärungsalkohole, wie Propanol-(1), Isobutanol, 3-Methylbutanol-(1), 2-Methylbutanol-(1), Pentanol-(1). Auch sind sie organoleptisch nicht als „Honige“ zu bezeichnen und im Gesamtaroma äußerst flach. Dies kann auf Fehlen von Aminosäuren, auf Gärungshemmung oder auf spezifischem Enzymmangel beruhen.

Bei der Oxydation von Phenyläthylalkohol entsteht Phenylelessigsäure, die teilweise mit Methanol und Äthanol verestert wird. Daneben entstehen auch Benzoesäuremethyl- und äthylester, die einen den Phenylelessigsäureestern ähnlichen Geruch haben. Das Estergemisch wird organoleptisch von den beiden Alkoholen Phenyläthylalkohol und Benzylalkohol blumig abgerundet.

Herrn *Robert Krämer* danken wir für die finanzielle Unterstützung der Arbeit und Herrn Dr. *Herwarth Duisberg*, Leiter des Institutes für Honigforschung, Bremen, für die freundliche Überlassung der Honigproben.