

# ANALYSE VON (-)-ROTUNDON MITTELS SPE-SPME-GC-MS IN ÖSTERREICHISCHEN QUALITÄTSWEINEN DER REBSORTE 'GRÜNER VELTLINER'

STEFAN NAUER<sup>1</sup>, WALTER BRANDES<sup>1</sup>, ELSA –PATZL-FISCHERLEITNER<sup>1</sup>, STEPHAN HANN<sup>2</sup> UND REINHARD EDER<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Höhere Bundeslehranstalt und Bundesamt für Wein- und Obstbau  
A-3400 Klosterneuburg, Wiener Straße 74

<sup>2</sup> Universität für Bodenkultur, Department für Chemie  
A-1190 Wien, Muthgasse 18  
E-Mail: Stefan.Nauer@weinobst.at

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mit einer modifizierten Festphasen-Festphasenmikroextraktion Gaschromatografie-Massenspektrometrie-Methode (SPE-SPME-GC-MS) das Vorkommen des Sesquiterpenketons (-)-Rotundon in österreichischen Weinen der Sorte 'Grüner Veltliner', der Hauptsorte Österreichs, zu verifizieren. Da diese Verbindung ebenso wie 'Grüner Veltliner' mit Pfeffrigkeit assoziiert wird, war es von großem Interesse, die (-)-Rotundon-Gehalte in Weinen verschiedener Weinbaugebiete und Jahrgänge (2009 bis 2015) zu bestimmen und zu beurteilen, ob die gefundenen Gehalte eine sensorische Relevanz haben können. Zu diesem Zweck wurden 105 authentische Weinproben aus verschiedenen Weinbauregionen und Gebieten (Wachau, Weinviertel, Kamptal, Wagram, Kremstal, Traisental, Thermenregion, Carnuntum, Neusiedlersee, Neusiedlersee-Hügelland, Bergland, Wien) analysiert. Die Bandbreite der Konzentration des (-)-Rotundons bewegte sich zwischen einem Minimum von 9,50 ng/l und einem Maximum von 84,7 ng/l. Die ermittelte Schwankungsbreite lässt sich auf klimatische und weinbauliche Einflüsse in Abhängigkeit von Jahrgang und Anbauregion zurückführen. Der durchschnittliche Gehalt berücksichtigte alle untersuchten Jahrgänge und lag bei rund 31,7 ng/l. Vom sensorischen Standpunkt aus bedeutet dieser Wert eine doppelte Überschreitung des angegebenen Schwellenwertes für Rotwein, welcher laut Literatur bei 16 ng/l liegt (SIEBERT et al., 2008). Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Verbindung (-)-Rotundon in vielen österreichischen Weinen der Sorte 'Grüner Veltliner' in aromarelevanten Konzentrationen vorliegt, wobei die effektiven Gehalte in den Weinen aber in Abhängigkeit von Region, Jahrgang und den jeweiligen weinbaulichen Maßnahmen stark schwanken. So waren beispielsweise die (-)-Rotundon-Gehalte in den Weinen der Jahrgänge 2013 und 2014 durchschnittlich höher als jene der Jahrgänge 2009 und 2010, was einen klimabedingten Einfluss des Jahrgangs auf diese Gehalte und somit die Pfeffrigkeit der Weine belegt.

**Schlagwörter:** Rotundon, Grüner Veltliner, SPME, SPE, GC-MS, Pfeffrigkeit, Pfefferl

**Analysis of (-)-rotundone by means of SPE-SPME-GC-MS in Austrian quality wines of the 'Grüner Veltliner' variety.** The objective of the present work was to verify the presence of the sesquiterpeneketone (-)-rotundone in Austrian wines of the 'Grüner Veltliner' variety, the main variety of Austria, using a modified solid-phase solid-phase micro-extraction gas chromatography-mass spectrometry method (SPE-SPME-GC-MS). Since this compound, like 'Grüner Veltliner', is associated with pepperiness, it was of great interest to determine (-)-rotundone levels in wines from different vineyards and vintages (2009 to 2015) and to assess whether the levels found may have sensory relevance. For this purpose, 105 authentic wine samples from various winegrowing regions and areas (Wachau, Weinviertel, Kamptal, Wagram, Kremstal, Traisental, Thermenregion, Carnuntum, Neusiedlersee, Neusiedlersee-Hügelland, Bergland, Vienna) were analyzed. Concentrations of (-)-rotundone ranged from a minimum of 9.50 ng/l to a maximum of 84.7 ng/l. The determined variability can be attributed to climatic and viticultural influences depending

on vintage and region. Average content was calculated for all tested years and was about 31.7 ng/l. From the sensory point of view, this value exceeds the specified threshold for red wine, which according to literature is 16 ng/l (Siebert et al., 2008) by the twofold. In summary it can be stated that the compound (-)-rotundone is present in many Austrian wines of the variety 'Grüner Veltliner' in aroma-relevant concentrations, but effective contents in the wines vary strongly depending on region, vintage and the specific viticultural measures. For example, the (-)-rotundone contents in wines from the vintages 2013 and 2014 were on average higher than those from the vintages 2009 and 2010, demonstrating a climate-dependant influence of the vintage on these levels and thus the pepperiness of the wines.

**Keywords:** Rotundon, Grüner Veltliner, SPME, SPE, GC-MS, pepperiness, 'Pfefferl'

Die Aromatik von Weinen wird durch eine Vielzahl (800 bis 1500) von Verbindungen verschiedenster Stoffklassen (Ester, Alkohole, Terpene, Thiole ...) geprägt (MAARSE et al., 1992; GUTH et al., 1997). Dennoch existiert nur eine Handvoll von Verbindungen (ca. 100) sogenannter impact odours, also Leitaromen, mit geringer Wahrnehmungsschwelle, die direkt mit bestimmten und unverwechselbaren geruchlichen Assoziationen verknüpft werden (FERREIRA et al., 2000; POLASKOVA et al., 2008). Bei diesen Verbindungen handelt es sich in erster Linie um solche, welche Weinfehler, wie zum Beispiel Trichloranisol, Tribromanisol (Kork), Geosmin (Schimmel, muffige Note), 2-Aminoacetophenon (UTA), 4-Ethylphenol, Ethylguajakol (Pferdeschweiß, Brett) und TDN (1,1,6-Trimethyl-1,2-dihydronaphthalene, Petrolnote) verursachen. Als Beispiele für positiv assoziierte Geruchskomponenten wären hier die Stoffgruppe der Pyrazine und Thiole für Weine der Sorte 'Sauvignon Blanc' zu nennen. Bei zahlreichen anderen Aromasorten spielen Terpene eine wesentliche Rolle. Terpene, speziell Monoterpene, sind primär prägend für Muskatsorten (wie 'Muskat Ottonel', 'Muskateller', 'Gewürztraminer', 'Riesling'), und bekannte Vertreter sind beispielsweise Linalool, Geraniol, Nerol, Linalooloxid, Citronellol, alpha-Terpeniol, Ho-Trienol und Myrcenol. Anhand der Verteilung und Gehalte an Monoterpenen können Aussagen über Authentizität und Typizität von Weinen getroffen werden. So ist laut STRAUSS et al. (1986) eine Unterscheidung der Rebsorten anhand der Monoterpengehalte möglich, weil die Gesamtgehalte an Monoterpenen bei Muskat-Rebsorten über 6 mg/l, bei nicht-Muskat-aromatischen Sorten bei 1 bis 4 mg/l und bei Rebsorten, deren Aroma unabhängig von Monoterpenen zusammengesetzt ist, bei weniger als 1 mg/l

liegen. Inwieweit man die Typizität bzw. Authentizität der österreichischen Leitsorte 'Grüner Veltliner' anhand des Aromaspektrums charakterisieren kann, ist noch nicht ausreichend erforscht. In einer früheren Arbeit (SCHREINER et al., 2007) wurden mit einer sensitiven GC-Methode 176 Aromasubstanzen detektiert, und es konnte durch die Anwendung von modernsten statistischen Methoden (neurale Netze) eine zu 80 % richtige Zuordnung von österreichischen Weinen der Sorte 'Grüner Veltliner' zu ihrer Herkunft erreicht werden.

Die Sorte 'Grüner Veltliner' ist die wichtigste autochthone Sorte Österreichs mit einer Anbaufläche von rund 13.518 ha, was rund 30 % der gesamten österreichischen Rebfläche darstellt und diese Weißweinsorte somit zum Aushängeschild für österreichischen Wein macht (<http://www.oesterreichwein.at/unser-wein/oesterreichs-rebsorten/weisswein/gruener-veltliner/>; 04. 12. 2017). Sie wird außerhalb von Österreich ebenfalls in den östlichen Nachbarländern, von Norditalien bis in die USA, Neuseeland, Australien und Südafrika mit stetigem Verbreitungsgrad und wachsender Beliebtheit kultiviert. Kaum eine andere Weißweinsorte wird derartig häufig mit dem Attribut der würzigen, pfeffrigen Note belegt wie der 'Grüner Veltliner' (Synonym 'Weißgipfler'). Der in Österreich häufig benutzte Begriff des sogenannten "Pfefferls" stellt neben dem Steinobst-roma das Markenzeichen des echten typischen Grüner Veltliner-Weins dar. Diese hohe sensorische Erwartungshaltung rückt zunehmend in den Mittelpunkt des Interesses, da Konsumenten von regionalen Produkten Authentizität und unverwechselbare charakteristische Eigenschaften erwarten. KLIMEK (2011) zeigte auf, dass die verkosteten Grüne Veltliner-Weine eher an 'Sauvignon Blanc' erinnerten als an einen pfeffrigen und wür-

zigen 'Grüner Veltliner'. Nach FLAK (2007) ist die Aromatik der Sorte 'Grüner Veltliner' von Fruchtaromen (z. B. Zitrus, Grapefruit, grüner bzw. reifer Apfel, Birne, Quitte, Melone, Dörrobst, Bratapfel), vegetabilen Noten (z. B. Pfeffer, Wiesenblumen, Akazienblüte, frisches Gras, Heu, Stroh, gekochte Fisolen, Spargel, Nuss) sowie bodenassoziierten Eindrücken (z. B. mineralisch, erdig, lössartig) geprägt. Anhand der Aromatik lassen sich nach FLAK (2007, 2009) und SCHREINER et al. (2007) auch geografische Unterschiede innerhalb der gleichen Sorte festmachen. So sind laut FLAK et al. (2009) die Pfeffrigkeit von der Region und die Weinqualität vom Alter des Weingartens abhängig. Diesen Untersuchungen zufolge sind die Veltliner-Weine des Weinbaugebietes Weinviertel sensorisch stärker in Richtung "Pfefferl" geprägt als die des Weinbaugebietes Wagram. Ebenso postuliert diese Arbeitsgruppe, dass Bodentöne (Löss, Mineralik) und der sortentypische "Pfefferton" stärker durch den Standort beeinflusst werden als apfelartige und florale Aromen.

Neben der Regionalität trägt auch die genetische Variabilität der 'Grüner Veltliner'-Klone zu Unterschieden hinsichtlich der Aromatik bei. So gliedern REGNER et al. (2009) die Zugehörigkeit von Weinen der Sorte 'Grüner Veltliner' in drei "flavour types": a) Sauvignon-Typ, b) würzig-pfeffriger Typ, c) Steinfrucht-Aprikose-Typ. Bei gebietstypischen DAC-Weinen wird der würzig-pfeffrige Typ favorisiert. Laut DAC-Verordnung Weinviertel BGBl.II Nr.58/2010 sollen die DAC-Weine folgende typische Eigenart aufweisen: Farbe: hellgelb, reingelb; Geruch: typisches Sortenbukett; Geschmack: fruchtig, würzig, pfeffrig, kein Holzton, nicht einseitig alkohollastig, keine Botrytisnote.

Im Zusammenhang mit der Pfeffernote ist es sehr interessant, dass WOOD et al. (2008) mittels Gaschromatographie und olfaktorischer Detektion (GC-O-Analyse) in australischen Weinen der Rotweinsorte 'Shiraz' die Verbindung (-)-Rotundon fanden, welche maßgeblich für die Pfeffrigkeit der Weine verantwortlich sein sollte. Beim (-)-Rotundon ( $C_{15}H_{22}O$ ) handelt es sich um ein bicyclisches sauerstoffhaltiges Sesquiterpenketon der Guiane-Familie (Abb. 1), dessen Struktur starke hydrophobe und schwach polare Bereiche aufweist (WOOD et al., 2008; SIEBERT et al., 2008; MATTIVI et al., 2011).

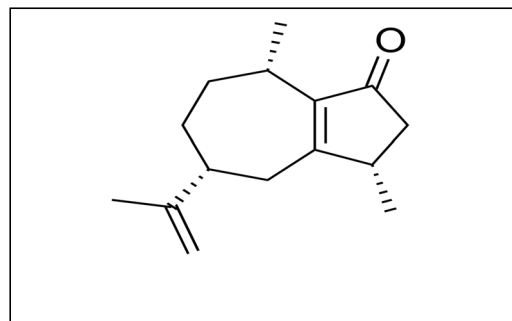


Abb. 1: Strukturformel (-)-Rotundon;  
(3S,5R,8S)-3,8-Dimethyl-5-prop-1-en-2-yl-3,4,5,6,7,8-hexahydro-2H-azulen-1-on

Die verwendeten Analysenmethoden zur Gehaltsbestimmung von Rotundon im ng/l-Bereich in Wein reichen von der einer gekoppelten SPE-SPME-GC-MS bei SIEBERT et al. (2008) bzw. einer SPE-SPME-GC-MS/MS-Variante bei MATTIVI et al. (2011) über eine einfach gehaltene SPE mit nachgeschalteter large volume-Injektion bei CULLERE et al. (2016) bis hin zu einer stirbar-Extraktion mit multidimensionaler GC-MS bei TAKASE et al. (2015). Ohne entsprechende Anreicherung/Isolierung (z. B. mittels SPE-SPME, SBSE) oder selektive Chromatografie (z. B. multidimensionale GCxGC) bzw. Massenspektrometrie (GC-MS, GC-MS/MS) ist eine Detektion/Quantifizierung im ng-Bereich in der Probenmatrix Wein unmöglich.

Bei (-)-Rotundon handelt es sich um die erste Sesquiterpenverbindung, zu welcher herausgefunden wurde, dass sie zu Trauben- und Weinaroma in 'Shiraz' beiträgt (SIEBERT et al., 2008; WOOD et al., 2008). Außer in 'Shiraz' wurde (-)-Rotundon mittlerweile in verschiedenen anderen Weinsorten rund um den Globus, wie 'Vespolina', 'Schioppettino', 'Grüner Veltliner', 'Graciano', 'Maturana tinta', 'Duras', 'Pineau d'Aunis', 'Gamay', 'Pinot Noir', 'Durif' und 'Riesling' identifiziert und in einem Konzentrationsbereich von wenigen ng/l bis zu 300 ng/l quantifiziert. (CAPUTI et al., 2011; MATTIVI et al., 2011; HERDERICH et al., 2012; CULLERE et al., 2016).

Einen Überblick über die gefundenen Konzentrationen an Rotundon in verschiedenen Rebsorten liefert die folgende tabellarische Übersicht (Tab. 1).

Tab. 1: Rotundon-Konzentrationen in verschiedenen Rebsorten (Geffroy und Descôtes, 2017)

Rebsorten	Rotundongehalt (ng/l)	Rebsorten	Rotundongehalt (ng/l)	Rebsorten	Rotundongehalt (ng/l)
Duras	0--340ng/l*	Malbec	0-51ng/l*	Pineau d'Aunis	0-200ng/l*
Prunelard	0-85ng/l*	Syrah	3-231ng/l*	Castets	0-50ng/l*
Fer	0-18-50ng/l*	Pinot noir	0-38ng/l*	Mondeuse	0-62ng/l*
Abouriou	0-117ng/l*	Gamay	0-140ng/l*	Arani	0-68*
Négrette	0-38ng/l*	Mourvèdre	0-32ng/l*		

In Pflanzen wird (-)-Rotundon aus der Sesquiterpen-Vorläufersubstanz  $\alpha$ -Guaien durch Luftoxidation und biosynthetische Transformation gebildet (HUANG et al., 2014; DREW et al., 2015; TAKASE et al., 2016; ZHANG et al., 2016). MATTIVI (2016), welcher sich in einem Artikel mit den Schlüsselenzymen hinter dem Pfefferaroma beschäftigte, bemerkte bezüglich der Bildung von (-)-Rotundon, dass zuerst die enzymatische Bildung der Vorläufersubstanz  $\alpha$ -Guaien erforderlich ist, gefolgt von der nicht-enzymatischen Bildung von (-)-Rotundon durch Luftautooxidation von  $\alpha$ -Guaien. Auch in der Rebe sind für die Bildung von terpenoiden Geruchsinhaltsstoffen gemischte Formationsmechanismen aus enzymatischen und nicht-enzymatischen Schritten verantwortlich.

CAPUTI et al. (2011) haben festgestellt, dass (-)-Rotundon während der Reife im Exocarp der Traube akkumuliert wird. Daraus kann man schließen, dass der (-)-Rotundongehalt im Wein auch von der Maischestandzeit und dem Kontakt mit der Beerenhaut abhängig ist. Während der (-)-Rotundongehalt in den Beeren durch die Blattentfernung stark reduziert wird, verbessert eine Bewässerung die Akkumulation in den Beeren (Geffroy et al., 2014). Dies ist plausibel, da (-)-Rotundon in Traubenblättern und Stielen (CAPONE et al., 2012) und sogar in den Blütenkappen von Reben der Sorte 'Shiraz' in der pre-veraison-Phase (ZHANG et al., 2016) nachgewiesen wurde. Eine weitere Studie (CAPONE et al., 2012) hat gezeigt, dass die Anwesenheit von zusätzlichen Traubenblättern und -stielen während der Gärung eine Erhöhung des (-)-Rotundongehalts bewirkt. So wurde die Konzentration an (-)-Rotundon in Wein durch die Anwesenheit von zusätzlichen Traubenblättern und -stielen um das Sechsfache gegenüber der reinen Vergärung von Trauben gesteigert.

Darüber hinaus wurde festgestellt, dass die Konzentration an (-)-Rotundon in Trauben der Sorte 'Shiraz' inner-

halb eines Weinguts räumlich deutlichen Schwankungen unterliegt. (GEOFFROY et al., 2014; SCARLETT et al., 2014; ZHANG et al., 2015a). So wurde das Sesquiterpen (-)-Rotundon nur in einem australischen Wein der Sorte 'Shiraz' aus einem kühleren Klima und nicht in einem Wein aus einem wärmeren Klima nachgewiesen, was darauf hindeutet, dass seine Bildung und Stabilität in kälteren Umgebungen höher sein kann (MAYR et al., 2014). Hinsichtlich Sensorik wird von (-)-Rotundon erwartet, dass dieses relativ schwere Aroma (monoisotopische Masse 218.167065 und vorhergesagter Siedepunkt über 300 °C) das olfaktorische Epithel entweder direkt (orthonasal) oder hinter der Kehle (retronasal) erreicht (MATTIVI et al., 2011). Bemerkenswert sind die niedrige Wahrnehmungsschwelle von 8 ng/l in Wasser und 16 ng/l in Wein (SIEBERT et al., 2008), weshalb (-)-Rotundon von FERREIRA et al. (2012) als eine der 16 wichtigsten Aromakomponenten in Wein bezeichnet wurde. Eine Besonderheit dieser Verbindung ist eine spezifische Anosmie, wonach etwa 20 % der Panelisten diese Verbindung während der ersten sensorischen Versuche bei der höchsten getesteten Konzentration (4000 ng/l) auch im Wasser nicht nachweisen (WOOD et al., 2008).

## MATERIAL UND METHODEN

### WEINE

Untersucht wurden 105 österreichische Weine der Sorte 'Grüner Veltliner' der Jahrgänge 2009 bis 2015. Die Aufteilung auf die Weinbaugebiete bzw. Regionen war wie folgt (Probenanzahl): Bergland (1), Carnuntum (1), Kamptal (10), Kremstal (11), Neusiedlersee (2), Neusiedlersee-Hügelland (2), Thermenregion (2), Traisental (4), Wachau (8), Wagram (20), Weinviertel (42), Wien (1).

Die Verteilung der Proben auf die verschiedenen Jahrgänge ist in Tabelle 2 dargestellt.



Tab. 2: Jahrgangsmäßige Aufteilung der untersuchten Weinproben

Jahrgang	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
Gesamtprobenanzahl	14	12	2	3	25	36	13

## CHEMISCHE ANALYSEN

### CHEMIKALIEN UND MATERIAL

Folgende Lösungsmittel waren für die schrittweise Abfolge und Umsetzung der SPE notwendig:

n-Pentan 99,5 % p.A. (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Methanol HiPerSolv CHROMANORM®, gradient grade for HPLC (VWR Chemicals, Radnor, USA)

Dichlormethan ROTISOLV® ≥99,8 %, (Roth, Ort, Land).

Der verwendete (-)-Rotundonstandard wies eine Reinheit von 95 % auf und wurde von der Firma Chiroblock (Bitterfeld-Wolfen, Deutschland) synthetisiert.

Als interner Standard wurde 5,7-Dimethyl-1-tetralon (CAS: 13621-25-5 Reinheit von 97 % von Sigma Aldrich, St. Louis, USA) eingesetzt, da diese Verbindung sich ähnlich wie der Zielanalyt (-)-Rotundon verhielt. Dies bedeutet, dass sich durch die Verwendung dieser Verbindung sowohl Verluste bei der Festphasenextraktion als auch matrixabhängige Suppressionseffekte des GC-Signals korrigieren lassen.

### SPE-PROBENVORBEREITUNG

Es wurde eine Festphasenextraktion (Solid Phase Extraktion, SPE) mittels Schwerkraft auf LiChrolut EN-Säulchen mit 500 mg Festphase (Merck, Wien, Österreich) und 6 ml Gesamtvolumen durchgeführt. Die Säulchen wurden vorher mit 10 ml n-Pentan, 10 ml Methanol und schließlich mit 20 ml Modellwein (12 % EtOH (Ethanol absolut AnalaR NORMAPUR® ACS, VWR Chemicals, Radnor, USA) gepuffert auf pH 3,2) gereinigt und konditioniert (Abb. 2). 100 ml Weinprobe wurden nach Versetzen und Homogenisieren mit 100 µl internem Standard (5,7-Dimethyltetralon; Konzentration 1 mg/l) durch das Säulchen perkoliert. Das Säulchen wurde dann mit entionisiertem Wasser gewaschen und das (-)-Rotundon mit 10 ml N-Pentan/Dichlormethan (Verhältnis 4:1) eluiert. Das organische Lösungsmittel

wurde unter Vakuum und unter Verwendung eines Rotovapors (Büchi R-200, Flawil, Schweiz) entfernt. Der verbliebene Rückstand wurde in 1 ml 50%igem Ethanol gelöst. Dieser aufgenommene Rückstand wurde zu 14 ml entionisiertem H<sub>2</sub>O in ein 20 ml "headspace vial" überführt. Diese Lösung wurde mit der SPME-GC/MS-Methode analysiert.

### ANALYSE MITTELS IMMERSION-SPME-GC-MS

Für die Immersions-SPME-GC-MS-Analyse wurde ein Gaschromatograf (Agilent Technologies, Typ 7890A, Santa Clara, USA) mit einem Autosampler (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) und gekoppelt an ein Massenspektrometer (Agilent Technologies, Typ 5975C, Santa Clara, USA) verwendet. Eine Polydimethylsiloxan/Divinylbenzol-65µm-Faser (Supelco, Bellefonte, PA, USA) wurde für 60 min bei 35 °C unter Rühren in die Probe eingetaucht und dann im Injektor bei 250 °C für 5 min im Splitless-Modus desorbiert.

Die GC-Trennung erfolgte auf einer 60 m ZB-5MS Kapillarsäule mit einem Innendurchmesser von 0,25 mm und einer Filmdicke von 0,25 µm (Zebron ZB-5MS, Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland). Ultrareines Helium (5.0, AIR LIQUIDE AUSTRIA GmbH, Schwechat, Österreich) wurde als Trägergas mit einer konstanten Flussrate von 1,1 ml/min verwendet. Die Ofentemperatur wurde anfänglich für 3 min bei 50 °C gehalten und dann mit einer Geschwindigkeit von 20 °C/min auf 150 °C erhöht, anschließend mit einer Rate von 2,7 °C auf 210 °C gesteigert, bevor sie mit einer Geschwindigkeit von 50 °C/min auf 260 °C gesteigert und dann diese Endtemperatur für 8,5 min gehalten wurde. In Summe ergab dies eine Gesamtlaufzeit von 39,722 min.

Das Massenspektrometer wurde im Elektronenionierungsmodus (EI) bei 70 eV betrieben. Die Überleitungstemperatur/Transferlinie des Massenspektrometers wurde bei 250 °C gehalten. Die Retentionszeiten für (-)-Rotundon bzw. den internen Standard 5,7-Di-

methyl-1-tetralon betragen 24,880 min bzw. 22,420 min. (Abb. 3). Im selektierten Ionenüberwachungsmodus (SIM) wurden zur Quantifizierung von (-)-Rotundon die charakteristischen Massenfragmente bei m/z 203 und 218 und für den internen Standard 5,7-Di-

methyl-1-tetralon die Ionen bei m/z 146 und 174 verwendet.

Die Datenerfassung und -analyse erfolgte mit der Software Agilent G1701CA-ChemStation (Santa Clara, USA).

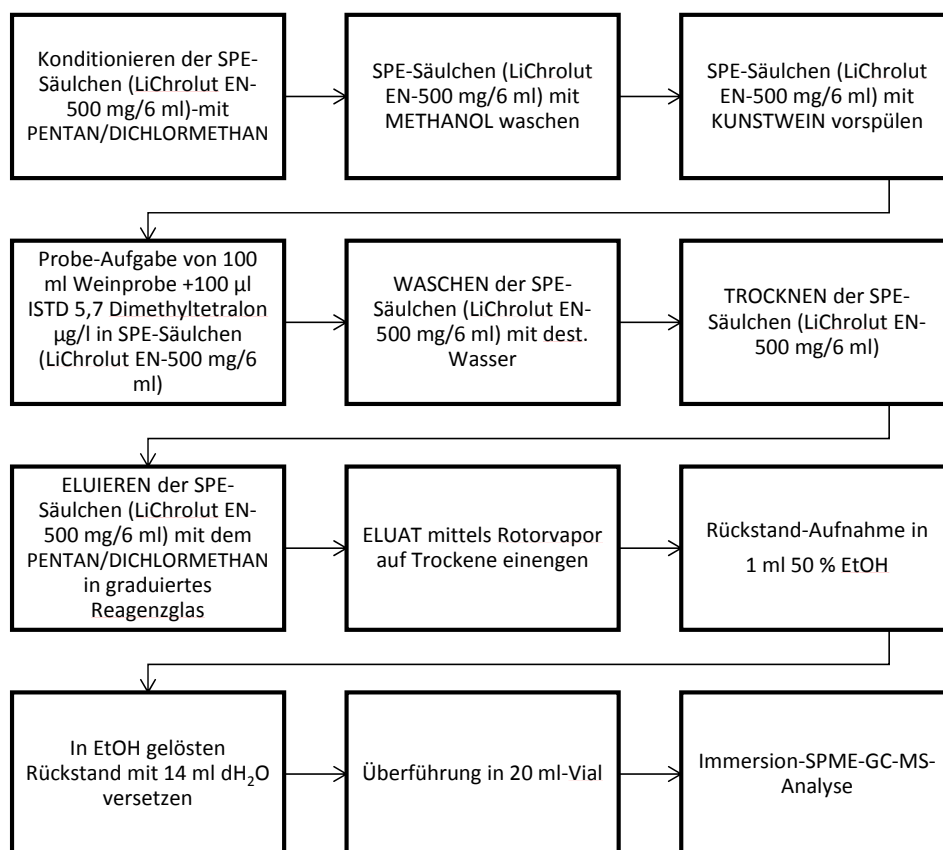


Abb. 2: Probenaufarbeitung für die Analyse von (-)-Rotundon

#### ANALYTISCHE KENNZAHLEN ZU DER IMMERSION SPME-GC-MS-ANALYSE

Die Validierung der Analytik erfolgte durch Untersuchung der Parameter Linearität, Wiederholbarkeit, Wiederfindung und Nachweisgrenze (LOD) und Bestimmungsgrenze (LOQ).

Die Linearität der Methode wurde sowohl in synthetischem Modellwein wie auch in einem realen Wein der Sorte 'Grüner Veltliner' mittels Standardaddition bis zu 500 ng/l evaluiert. Der lineare Korrelationskoeffizient beträgt für den gesamten Konzentrationsbereich im synthetischen Modellwein 0,999792 und in realer Weinmatrix 0,997791. Für die Bestimmung der Wein-

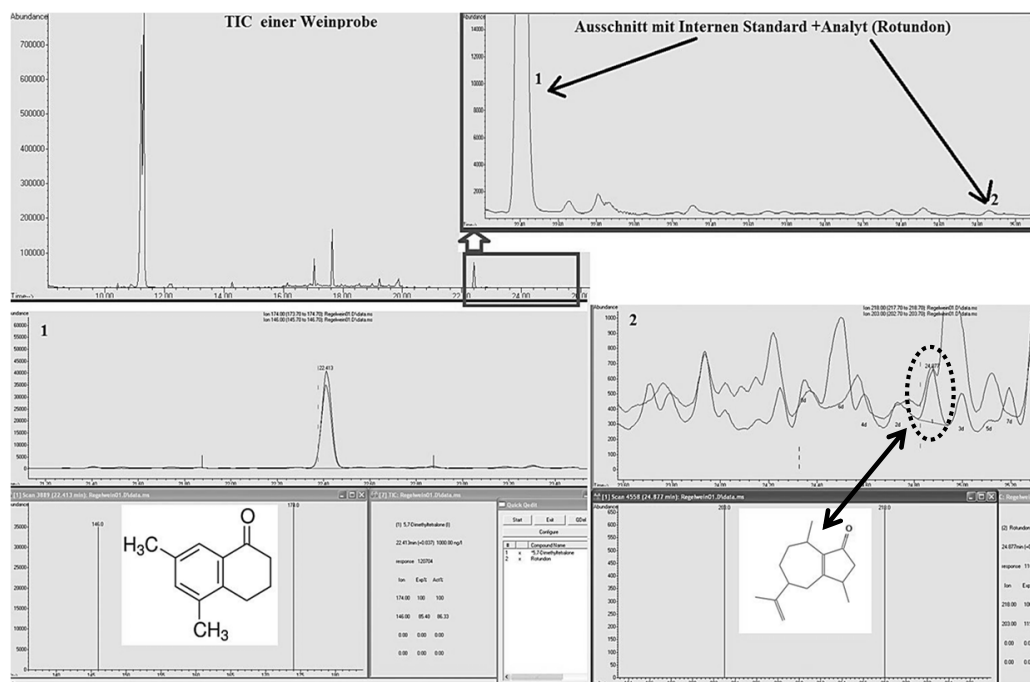


Abb. 3: Chromatogramm Weinprobe mit internem Standard ( 5,7-Dimethyltetralon) und dem Zielanalyten (-)Rotundon

proben wurde die Kalibration über die Standardaddition (5 Konzentrationslevel durch Zugabe von 50 ng, 100 ng, 125 ng, 250 ng und 500 ng Rotundon) in realer Weinmatrix herangezogen. Da für die Bestimmung von Rotundon kein Referenzmaterial (= deuteriertes Rotundon) verfügbar war, wurde als interner Standard die Verbindung 5,7-Dimethyltetralon herangezogen, da diese ähnliche Stoffeigenschaften wie der Zielanalyt aufweist. Für die Bestimmung der Reproduzierbarkeit des Analysenverfahrens wurde die gesamte Analyse mit derselben Probe innerhalb einer Serie (9- bzw. 14-mal) durchgeführt. Die relative Standardabweichung der Methodenpräzision (RSD) betrug 10,5 % mit der Modelweinkalibration. Die Wiederfindung bei verschiedenen mit 100 ng/l gespickten Weinproben bewegte sich zwischen 102 und 124 %. Die Nachweisgrenze (LOD) von 3 ng/l und die Bestimmungsgrenzen (LOQ) von 10 ng/l wurden als diejenigen Konzentrationen definiert, bei denen die Signal-Rausch-Verhältnisse 3:1 bzw. 10:1 betragen. Für

die Berechnung des Signal-Rausch-Verhältnisses wurden die Chromatogramme von Weinen mit geringen Mengen (<15 ng/l Rotundon) und die Signalhöhe eines 10 ng/l Standards als Grundlage herangezogen und Signalauswerten über das Retentionszeitfenster des Zielanalyten mit der Agilent Software Data Analysis (Santa Clara, USA) berechnet.

Für die Erfassung und statistische Auswertung wurden Software-Programme wie MS EXCEL, IBM SPSS 24.0 und OriginPro 2017 genutzt.

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Im Rahmen der Studie wurden 105 österreichische Handelsproben der Sorte 'Grüner Veltliner' hinsichtlich ihres Gehalts an (-)-Rotundon untersucht. Die Gehalte liegen zwischen 9,5 ng/l und 87,5 ng/l. Um den Einfluss des Jahrgangs bzw. der Weinherkunft abzuleiten, werden nachfolgend dementsprechende Darstellungen präsentiert.

### EINFLUSS DES JAHRGANGS AUF DIE (-)-ROTUNDONGEHALTE

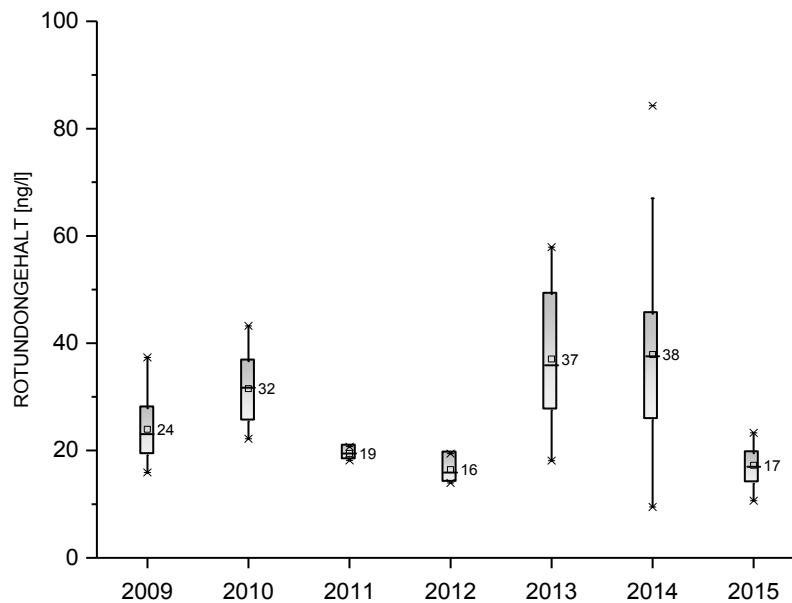


Abb. 4: Boxplot-Darstellung Einfluss des Jahrgang (2009 bis 2015) auf den (-)-Rotundongehalt

Für die Untersuchung wurden 105 österreichische Qualitätsweine herangezogen, die Proben verteilten sich auf folgende sieben Jahrgänge: 2009 (14 Proben), 2010 (12 Proben), 2011 (2 Proben), 2012 (3 Proben), 2013 (25 Proben), 2014 (36 Proben) und 2015 (13 Proben). Betrachtet man die Boxplots der Analysenresultate aller Jahrgänge von 2009 bis 2015, bewegt sich die ermittelte Konzentration zwischen 9,5 und 84,3 ng/l. Der durchschnittliche gefundene (-)-Rotundongehalt der 105 Proben liegt zwischen 32 und 33 ng/l. Im Detail lassen sich von jeder Kastengrafik für jedes Jahr folgende Kennwerte festhalten bzw. ablesen. Das Maximum von 2009 liegt bei 37 ng/l, 2010 bei 43 ng/l, 2011 bei 21 ng/l, 2012 bei 19 ng/l, 2013 bei 58 ng/l, 2014 bei 67 ng/l und 2015 bei 23 ng/l. Folgende jahrgangsbedingten Minima wurden gefunden: 2009: 16 ng/l; 2010: 22 ng/l; 2011: 18 ng/l, 2012: 14 ng/l, 2013: 18 ng/l, 2014: 9,5 ng/l, 2015: 11 ng/l. Der Median weist 2009 einen Wert von 24 ng/l auf, 2010 betrug er 32 ng/l, 2011 19 ng/l, 2012 16 ng/l, 2013 37 ng/l, 2014 38 ng/l und 2015 17 ng/l.

Um die Jahrgangsunterschiede erklären zu können, sollte man die förderlichen äußeren Verhältnisse für die Akkumulation von (-)-Rotundon beachten. Laut ZHANG et al. (2015) sind dies kühle klimatische Bedingungen. Dies würde somit erklären, warum die durchschnittliche Rotundonkonzentration in kühleren Jahrgängen wie 2010 und 2014 höher ist als in wärmeren Jahrgängen wie 2009, 2011, 2012 und 2015. Die für diese Aussage zugrundeliegenden Klima-Informationen bezüglich Einteilung in wärmere, trockenere Jahrgänge beziehungsweise feuchtere, kühlere Jahrgänge stammen einerseits von der Webseite der österreichischen Weinmarketing (<http://www.oesterreichwein.at/daten-fakten/oesterreichs-jahrgaenge-1986-2015/>; 04.12.2017) bzw. der Webseite der Zentralanstalt für Meteorologie (Monatsrückblick Juli/August 2009 bis 2015, <https://www.zamg.ac.at/cms/de/klima/klima-aktuell/monatsrueckblick>; 04.12.2017). Im Jahr 2013 mit eher warmen Sommermonaten wurden durchschnittlich höhere (-)-Rotundongehalte gefunden als in den anderen



warmen Jahrgängen. Dies könnte unter anderem darauf zurückgeführt werden, dass das Klima in den einzelnen Regionen unterschiedlich sein kann und auch die künstliche Bewässerung eventuell eine Rolle spielt (z. B. Wachau-Bewässerung bzw. Donauraum-Mikroklima). Neben dem Einfluss von niedrigen Temperaturen ist auch erwiesen, dass die Wasserversorgung der Reben (feuchtere Jahrgänge) für die vermehrte Bildung von Rotundon entscheidend ist (GEFFROY et al., 2014). Speziell das Jahr 2014 war ein kühles, niederschlagsreiches Jahr, und hier ist auch der durchschnittliche Rotundongehalt mit fast 85 ng am höchsten, was die Beobachtung von ZHANG et al. (2015) bestätigt. Sie definierten, dass der Wert Traubentemperatur/Anzahl der täglichen Sonnenstunden negativ mit der Rotundonkonzentration korreliert. Demzufolge führen heiße und trockene Jahre wie 2015, 2012, 2011 zu geringeren Menge an vorhandenem (-)-Rotundon gegenüber kühlen Jahren.

**EINFLUSS DES WEINBAUGEBIETES AUF DIE (-)-ROTUNDONGEHALTE**

Die Auswirkungen des Weinbaugebietes auf den (-)-Rotundongehalt werden in Abbildung 5 veranschaulicht. Schon ein Blick auf die Mittelwerte belegt, dass der Faktor Region eine nicht zu unterschätzende Rolle in Bezug auf den Rotundongehalt spielen dürfte, da die Werte von 9,95 bis 42,74 ng/l variieren. Eine Reihung der Gebiete nach dem durchschnittlichen Rotundongehalt wird von der Wachau angeführt, gefolgt von Kamptal, Wagram, Kremstal und Weinviertel. Aus den Boxplot Darstellungen lassen sich folgende Medianwerte, geordnet nach der Größe, ablesen: Wachau: 42,74 ng/l; Kamptal: 37,0 ng/l; Wagram: 30,2 ng/l; Kremstal: 28,1 ng/l; Weinviertel: 26,16 ng/l; Traisental: 24,76 ng/l; Neusiedlersee: 21,3 ng/l; Wien: 17,7 ng/l; Neusiedlersee-Hügelland: 15,45 ng/l; Thermenregion: 12,12 ng/l und Bergland:

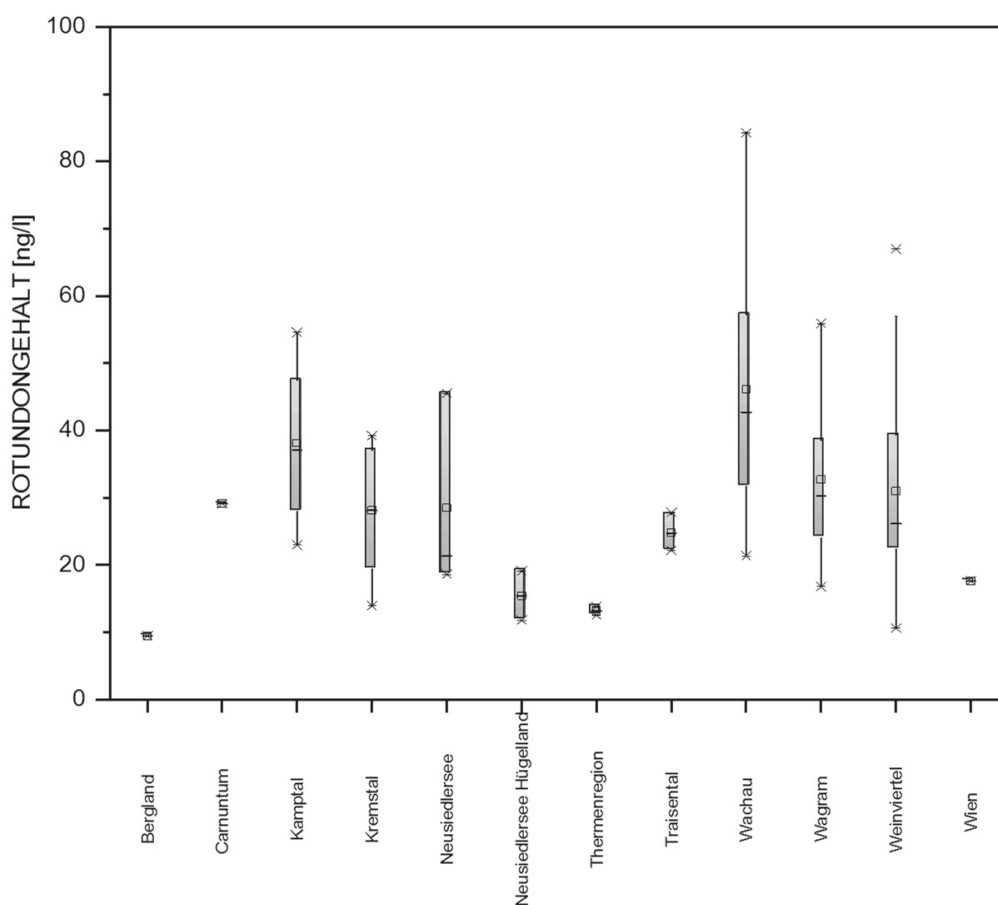


Abb. 5: Einfluss des Weinbaugebietes/der Weinbauregion auf den Rotundongehalt

9,95 ng/l. Eine eindeutige Interpretation der Daten bezüglich des Einflusses der klimatischen Verhältnisse auf die Unterschiede zwischen den Gebieten ist nicht möglich, da beispielsweise im kühleren Bergland die Gehalte niedriger als im wärmeren Burgenland sind. Vielmehr ist es wahrscheinlich, dass die Unterschiede zwischen den Gebieten auf verschiedene Einflussfaktoren und deren Kombination (z. B. Klima, Boden, Klon, Erntetermin, Weingartenmanagement) zurückzuführen sind. Klarerweise sollte deren Erforschung den Inhalt weiterer Studien darstellen.

Wie schon bereits zuvor angemerkt, liegt ein Einfluss von Jahrgang und Weinbaugebiet auf die (-)-Rotundongehalte vor, und zusätzlich sind auch Wechselwirkungen von Jahrgang und Region aus den Daten ersichtlich (Abb. 6). Besonders auffällig sind die Unterschiede bei den Jahrgängen 2014 und 2013 in der Wachau, aber der klimatische bedingte Einfluss wird auch in den anderen Gebieten, wie Wagram, Weinviertel, Kremstal, Kamptal, sichtbar. Dies deckt sich mit den Erkenntnissen des Australian Wine Research Institute (GEOFFREY et al., 2015), wonach eine große Variabilität der (-)-Rotundongehalte in verschiedenen Weingärten und zwischen verschiedenen Jahrgängen besteht.

**KOMBINIERTER EINFLUSS VON WEINBAUGEBIET UND JAHRGANG AUF DIE (-)-ROTUNDONGEHALTE**

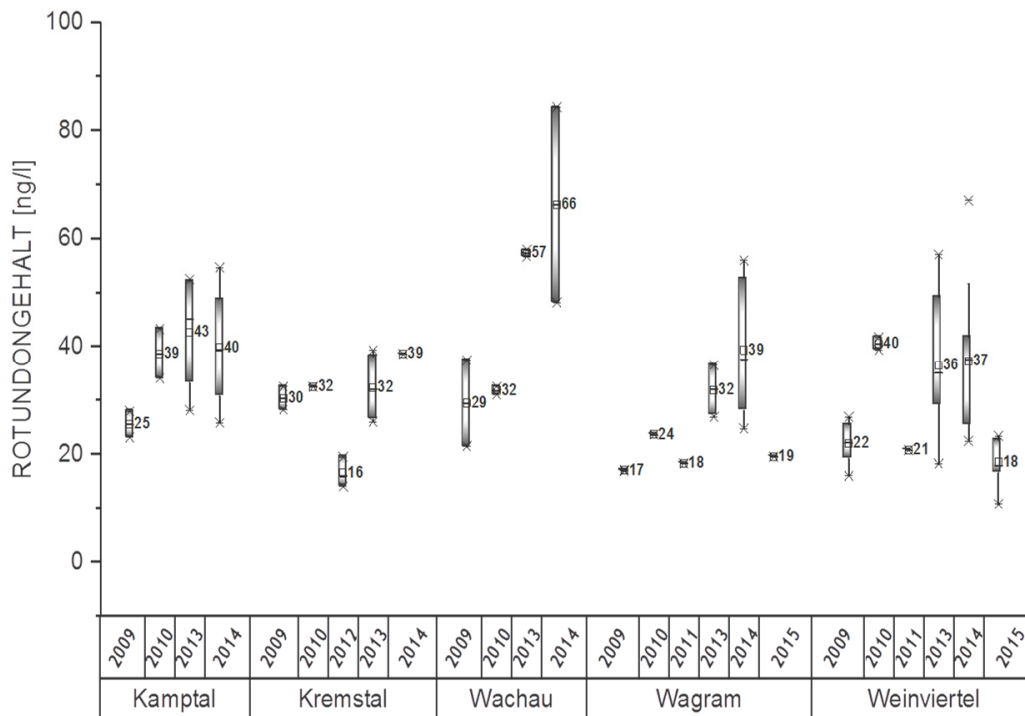


Abb. 6: Kombiniertes Einfluss des Weinbaugebietes und der Region auf den Rotundongehalt

## SCHLUSSFOLGERUNG

Da die analysierten Gehalte an (-)-Rotundon in den meisten untersuchten Weinen der Sorte 'Grüner Veltliner' den von SIEBERT et al. (2008) beschriebenen Schwellenwert von 16 ng/l überschreiten, kann postuliert werden, dass (-)-Rotundon eine Markersubstanz für das Pfefferaroma ist, welches wiederum ein geruchsprägender Bestandteil in österreichischen Grüner Veltliner-Weinen darstellt. Angesichts dieser direkten Verknüpfung von (-)-Rotundon mit dem pfeffrigen Aroma des Weins eröffnen sich Möglichkeiten (z. B. Bewässerung, Laubwandmanagement, Klonenwahl) und önologische Maßnahmen (z. B. Maischestandzeit, Schwefelung, Hefewahl) exakter zu bestimmen, wodurch es möglich sein sollte, die Ausprägung des "Pfeffer"-Potenzials eines Weines gezielter zu fördern. Denn gerade die künftig absehbaren klimatischen Veränderungen, wie beispielsweise eine höhere Temperatur und veränderte Niederschlagsmuster, könnten für die Synthese bzw.

Akkumulation dieser Verbindung in Trauben ungünstig sein. Da die Pfefferaromatik ein wesentlicher Bestandteil des regionalen Profils österreichischer Weine der Sorte 'Grüner Veltliner' darstellt, werden diese Veränderungen noch eine große Herausforderung darstellen. Bezüglich der sensorischen Relevanz von (-)-Rotundon muss aber einschränkend nochmals betont werden, dass rund 20 % der Personen eine Anosmie aufweisen und sogar 4000 ng/l im Wein nicht erkennen können (WOOD et al., 2008). Deswegen sollte die subjektive sensorische Beschreibung von Weinen nicht geringgeschätzt werden, da die Sensorik auf einem Zusammenspiel vieler Komponenten (z. B. Fruchtaromen, Vegetabilitätsaromen und bodenassoziierter Aromen) beruht und sich nicht nur auf eine einzelne Aromasubstanz bezieht. Unabhängig von der analytischen oder sensorischen Sichtweise ist österreichischer 'Grüner Veltliner' mit seiner Pfeffer-Note ein einmaliges und unverkennbares sensorisches Stück Heimat.

## LITERATUR

- BRAMLEY, R. G. V., SIEBERT, T. E., HERDERICH, M. J. AND KRSTIC, M. P. 2017: Patterns of within-vineyard spatial variation in the 'pepper' compound rotundone are temporally stable from year to year. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 23(1): 42-47.
- CAPONE, D. L., JEFFERY, D. W. AND SEFTON, M. A. 2012: Vineyard and fermentation studies to elucidate the origin of 1, 8-cineole in Australian red wine. *Journal of agricultural and food chemistry* 60(9): 2281-2287.
- CAPUTI, L., CARLIN, S., GHIGLIENO, I., STEFANINI, M., VALENTI, L., VRHOVSEK, U. AND MATTIVI, F. 2011: Relationship of changes in rotundone content during grape ripening and winemaking to manipulation of the 'peppery' character of wine. *J Agric Food Chem.* 2011 May 25;59(10):5565-71. doi: 10.1021/jf200786u. Epub 2011 May 2.
- CULLERÉ, L., ONTAÑÓN, I., ESCUDERO, A. AND FERREIRA, V. 2016: Straightforward strategy for quantifying rotundone in wine at ngL(-1) level using solid-phase extraction and gas chromatography-quadrupole mass spectrometry. Occurrence in different varieties of spicy wines. *Food Chem.* 2016 Sep 1;206:267-73. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.03.039. Epub 2016 Mar 15.
- DREW, D. P., ANDERSEN, T. B., SWEETMAN, C., MØLLER, B. L., FORD, C. AND SIMONSEN, H. T. 2015: Two key polymorphisms in a newly discovered allele of the *Vitis vinifera* TPS24 gene are responsible for the production of the rotundone precursor  $\alpha$ -guaiene. *Journal of experimental botany*, erv491.
- GEFFROY, O., DUFOURCQ, T., CARCENAC, D., SIEBERT, T., HERDERICH, M. AND SERRANO, E. 2014: Effect of ripeness and viticultural techniques on the rotundone

- concentration in red wine made from *Vitis vinifera* L. cv. Duras. Australian Journal of Grape and Wine Research 20(3): 401-408.
- GEFFROY, O., YOBRÉGAT, O., DUFOURCQ, T., SIEBERT, T. AND SERRANO, E. 2015:. Certified clone and powdery mildew impact rotundone in red wine from *Vitis vinifera* L. cv. Duras N. OENO One 49(4): 231-240.
- GEFFROY, O., SCHOLASCH, T., DUFOURCQ, T. AND SERRANO, E. 2015: Understanding and mapping rotundone spatial variability in *Vitis vinifera* L. cv Duras. In 19<sup>th</sup> International Meeting GiESCO (Vol. 2, pp. 589-592). , (2015, May).
- GEFFROY, O., BUISSIÈRE, C., LEMPEREUR, V. AND CHATELET, B. 2016:. A sensory, chemical and consumer study of the peppery typicality of French gamay wines from cool-climate vineyards. OENO One 50(1): 35-47.
- GEFFROY, O., SIEBERT, T., HERDERICH, M., MILLE, B. AND SERRANO, E. 2016:. On-vine grape drying combined with irrigation allows to produce red wines with enhanced phenolic and rotundone concentrations. Scientia Horticulturae 207: 208-217.
- GUTH, H. 1997: Identification of character impact odorants of different white wine varieties. J. Agric. Food Chem. 45: 3022 – 3026.
- HERDERICH, M., SIEBERT, T., PARKER, M., CAPONE, D., JEFFERY, D., OSIDACZ, P. AND FRANCIS, I. 2012: Spice up your life: Analysis of key aroma compounds in Shiraz ACS Symposium Series 2012
- HUANG, A. C., BURRETT, S., SEFTON, M. A. AND TAYLOR, D. K. 2014:. Production of the pepper aroma compound, (-)-rotundone, by aerial oxidation of  $\alpha$ -guaiene. Journal of agricultural and food chemistry 62(44): 10809-10815.
- FERREIRA, V.; LOPEZ, R. AND CACHO, J. F. 2000: Quantitative determination of the odorants of young red wines from different grape varieties. J. Sci.Food. Agric. 1667: 1659 – 1667.
- FERREIRA, V. 2012, November: Bases moléculaires de l'arôme du vin. In Proceedings of the International Symposium on Wine Aromas (VINAROMAS project, pp. 5-6
- FLAK, W.; KRIZAN, R.; KUTSCHER, W.; TSCHIEK, G. UND WALLNER, E. 2007: Charakterisierung von Weinen der Sorte „Grüner Veltliner“ aus verschiedenen Herkünften im Weinbaugebiet Weinviertel. Mitt. Klosterneuburg 57: 131-139.
- FLAK, W., KRIZAN, R., PASSMANN, G., TSCHIEK, G. UND WALLNER, E. 2009: Charakterisierung von Leitweinen des Weinbaugebietes Wagram. Teil 1: ‚Grüner Veltliner‘. Mitteilungen Klosterneuburg 59: 227-236.
- GEFFROY, O.; DESCÔTES, J. 2017: Rotundone et arômes poivrés des vins. Ce que l'on sait aujourd'hui; Revue des oenologues et des techniques vitivinicoles et oenologiques: magazine trimestriel d'information professionnelle, Vol. 44, N°.162, 2017, pages. 47-52
- KLIMEK 2011 - Weinkolumne / Wein und Wahrheit: Ist Veltliner noch Veltliner? Eine Kolumne von Manfred Klimek <http://www.zeit.de/leben/essen-trinken/2011-05/weinkolumne-veltliner/seite-2>
- MAARSE, H.; VISSCHER, C. A.; WILLEMSSENS, L. C. AND BOELENS, M. H. 1992: Volatile Compounds in Food: Qualitative and Quantitative Data, Suppl.4; TNO-CIVO Food Analysis Institute: The Netherlands, 1992.
- MATTIVI, F., CAPUTI, L., CARLIN, S., LANZA, T., MINOZZI, M., NANNI, D., VALENTI, L. AND VRHOVSEK, U. 2011: Effective analysis of rotundone at below-threshold levels in red and white wines using solid-phase microextraction gas chromatography/tandem mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom. Feb 28;25(4):483-8. doi: 10.1002/rcm.4881
- MATTIVI, F. 2016: Key enzymes behind black pepper aroma in wines. Journal of experimental botany 67(3): 555-557.
- MAYR, C. M.; GEUE, J. P.; HOLT, H. E.; PEARSON, W. P.; JEFFERY, D. W. AND FRANCIS, I.L. 2014: :Characterization of the key aroma compounds in Shiraz wine by quantitation, aroma reconstitution, and omission studies J. Agric. Food Chem. 2014 62: 4528– 4536.

- POLASKOV A, P.; HERSZAGE, J. AND EBELER, S. E. 2008: Wine flavour: chemistry in a glass. *Chem. Soc. Rev.* 37: 2478 – 2489.  
<http://www.oesterreichwein.at/unser-wein/oesterreichs-rebsorten/weisswein/gruener-veltliner/>
- REGNER, F.; HACK, R.; HANAK, K. AND SANTIA-GO, J.L. 2009: The variability within the cultivar Grüner Veltliner under different aspects. *Acta Horticulturae*. 827: 245-252.
- SCARLETT, N. J., BRAMLEY, R. G. V. AND SIEBERT, T. E. 2014: Within-vineyard variation in the ‘pepper’ compound rotundone is spatially structured and related to variation in the land underlying the vineyard. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 20(2): 214-222.
- SCHREINER, A., BRANDES, W., VERSINI, G., BERGHOFER, E. UND EDER, R. 2007: Herkunftsunterscheidung von Weinen der Sorte ‚Grüner Veltliner‘ anhand ihrer Aromaprofile mit Hilfe von Data Mining-Techniken und Neuronalen Netzwerken. *Mitteilungen Klosterneuburg* 57: 2-22.
- SIEBERT, TRACEY E., CLAUDIA WOOD, GORDON M. ELSEY, UND ALAN P. POLLNITZ. 2008: “Determination of rotundone, the pepper aroma impact compound, in grapes and wine.” *Journal of agricultural and food chemistry* 56, no. 10 (2008): 3745-3748;
- STRAUSS, C.R., WILSON, GOOLEY, P.R. AND WILLIAMS, P.J. 1986: Role of Monoterpenes in Grape and Wine Flavor. Reprinted Symposium Series No 317, Biogenerations of Aromas.
- TAKASE, H., SASAKI, K., SHINMORI, H., SHINOHARA, A., MOCHIZUKI, C., KOBAYASHI, H. AND TAKATA, R. 2016: Cytochrome P450 CYP71BE5 in grapevine (*Vitis vinifera*) catalyzes the formation of the spicy aroma compound (–)-rotundone. *Journal of experimental botany* 67(3): 787-798.
- WOOD, C., SIEBERT, T. E., PARKER, M., CAPONE, D. L., ELSEY, G. M., POLLNITZ, A. P., EGGERS M., MEIER, M., VÖSSING, T., WIDDER, S. S. AND G. KRAMMER. 2008: “Spice up your life–The Rotundone story.” *Expression of Multidisciplinary flavour science, Proceedings of the 12th Weurman Symposium, 2008*: 483-485.
- WOOD, C, TRACEY E. SIEBERT, MANGO PARKER, DIMITRA L. CAPONE, GORDON M. ELSEY, ALAN P. POLLNITZ, MARCUS EGGERS et al. 2008: “From wine to pepper: rotundone, an obscure sesquiterpene, is a potent spicy aroma compound.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, no. 10 (2008): 3738-3744.
- ZHANG, P., BARLOW, S., KRSTIC, M., HERDERICH, M., FUENTES, S. AND HOWELL, K. 2015: Within-vineyard, within-vine, and within-bunch variability of the rotundone concentration in berries of *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz. *Journal of agricultural and food chemistry* 63(17): 4276-4283.
- ZHANG, P., HOWELL, K., KRSTIC, M., HERDERICH, M., BARLOW, E. W. R. AND FUENTES, S. 2015: Environmental factors and seasonality affect the concentration of rotundone in *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz wine. *PloS one*, 10(7), e0133137.
- ZHANG, P., FUENTES, S., WANG, Y., DENG, R., KRSTIC, M., HERDERICH, M. AND HOWELL, K. 2016: Distribution of Rotundone and Possible Translocation of Related Compounds Amongst Grapevine Tissues in *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz. *Frontiers in Plant Science*, 7.

Eingelangt am 5. Dezember 2017