

## **Entwicklung einer neuen Methode für die quantitative Bestimmung von Furaneol(4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon) und Mesifuran(2,5-dimethyl-4-methoxy- 3(2H)-furanon) in Erdbeeren, Erdbeerkonfitüren und Erdbeerbränden**

Walter Brandes und Reinhard Baumann

HBLA und BA für Wein- und Obstbau Klosterneuburg  
A-3400 Klosterneuburg, Wiener Straße 74  
E-Mail: Walter.Brandes@weinobst.at

Furaneol und Mesifuran sind in verschiedenen Früchten vorkommende Aromastoffe und tragen vor allem bei Erdbeeren entscheidend zur Sensorik bei. Hohe Polarität und Siedepunkte, verbunden mit begrenzter Stabilität, stellen speziell für die Analytik von Furaneol besondere Herausforderungen dar. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine einfache Extraktionstechnik entwickelt, die bei ausreichender Empfindlichkeit und guter Wiederholbarkeit die Bestimmung von beiden Verbindungen in Erdbeeren und einigen Verarbeitungsprodukten ermöglicht. Die Bestimmung erfolgt auf einem Gaschromatographen mit polarer Trennsäule und Flammenionisationsdetektor. Die Methode liefert befriedigende analytische Kenndaten und ist außerdem preiswert und gut für Serienanalysen geeignet.

**Schlagworte:** Erdbeeraroma, Furaneol, Mesifuran, Analysenmethode

**New method for the quantitative determination of furaneol(4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon) and mesifurane(2,5-dimethyl-4-methoxy- 3(2H)-furanon) in strawberries, strawberry jams and strawberry spirits.** Furaneol and mesifurane are aroma substances that occur in various fruits and make a decisive contribution to the sensory properties of strawberries in particular. High polarity and boiling points combined with limited stability represent particular challenges for the analysis of furaneol. Within the scope of this work, a simple extraction technique was developed which, with sufficient sensitivity and good repeatability, facilitates the determination of both compounds in strawberries and some processed products. Determination is carried out on a gas chromatograph with a polar separation column and flame ionisation detector. The method offers satisfactory analytical values, is inexpensive and well-suited for serial analyses.

**Keywords:** strawberry aroma, furaneol, mesifurane, analytical method

Erdbeeren zählen auf Grund ihres feinen Aromas und der frühen Reife mit zu den wichtigsten Obstarten. Neben dem Frischverzehr wird ein bedeutender Teil der Früchte zu Folgeprodukten, insbesondere Konfitüre, verarbeitet. Sowohl für die Sortenzucht als auch die Verarbeitung ist die Kenntnis über die für das typische Aroma hauptsächlich verantwortlichen Substanzen von großem Interesse. Diesbezügliche Untersuchungen haben eine Vielzahl dieser Verbindungen, darunter Ester, Alkohole, Aldehyde, Terpene und Lactone, identifiziert (Modise et al., 2004; Negri et al., 2015; Kafkas et al., 2006; Jetti et al., 2007; Jouquad et al., 2008). Als Schlüsselaromakomponenten werden übereinstimmend besonders die für die süß-karamellartige Note verantwortlichen Komponenten Furaneol und Mesifuran genannt (Ulrich et al., 1997; Wein et al., 2002; Perez et al., 1996; Yan et al., 2018; Dirinck et al., 1981; Al-Taher et al., 2020; Oliver et al., 2018; Watson et al., 2002). Vor allem Furaneol stellt für die Analytik eine besondere Herausforderung dar. Dieses Furanderivat ist durch seine hohe Polarität vielen Anreicherungstechniken, insbesondere der in der Aromaanalytik weit verbreiteten Festphasen-Mikroextraktion (SPME) nicht in befriedigender Weise zugänglich (Bianchi et al., 2017; Zorilla et al., 2012; Kafkas et al., 2005; Siegmund et al., 2010). Seine thermische Instabilität und die vom pH-Wert abhängige Degradation in wässrigen Lösungen stellen sowohl für die Probenaufarbeitung als auch Detektion zusätzliche Herausforderungen dar. So wurden für die Anreicherung und Isolation Extraktionsverfahren mit verschiedenen Lösungsmitteln und unterschiedlichen Bedingungen getestet. Diese Verfahren benötigen jedoch einen beträchtlichen Zeitaufwand, und die teilweise schlechte Vergleichbarkeit der Ergebnisse lässt auf unzureichende Reproduzierbarkeit schließen (Fourney, 2001). Lediglich Festphasenextraktion mit speziell modifizierten Adsorbentharzen scheint befriedigende Ergebnisse zu erbringen (Ferreira et al., 2003; Siegmund et al., 2010). Der Zeitaufwand ist jedoch auch bei diesen Verfahren beträchtlich. Für die Detektion ist sowohl die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) mit UV-Detektion (Sanz et al., 1994; Perez et al., 1996; Buttery et al., 1995) als auch die Gaschromatographie (GC) mit Flammenionisationsdetektion bzw. Massenspektrometrie möglich (Larsen et al., 1992; Hirvi, 1983; Schreier, 1980; Douillard et al., 1990). Die HPLC besitzt den

Vorteil, dass dabei auch das Glucosid des Furaneols bestimmt werden kann, das einer direkten gaschromatographischen Bestimmung auf Grund seiner Nichtflüchtigkeit nicht zugänglich ist. Eine befriedigende Trennung an Umkehrphasen ist allerdings nur schwer zu erreichen (Rousseff et al., 1998).

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer schnellen, einfachen und kostengünstigen Methode für die Bestimmung von Furaneol und Mesifuran in Erdbeeren und einigen Verarbeitungsprodukten.

## Material und Methoden

### Probenmaterial

Für die hier entwickelte Methode wurden folgende Proben verwendet.

1. Drei verschiedene Erdbeersorten, und zwar die Sorten 'Malling Centenary', 'Elsanta' und 'Darselect' der Abteilung Obstbau der HBLA und BA für Wein- und Obstbau Klosterneuburg sowie eine Handelsprobe eines regionalen Supermarktes ohne nähere Bezeichnung
2. Drei verschiedene Erdbeerkonfitüren eines regionalen Supermarktes mit Fruchtanteilen zwischen 50 und 75 %
3. Vier verschiedene Erdbeerbrände einer Versuchsserie der Abteilung Obstverarbeitung der HBLA und BA für Wein- und Obstbau Klosterneuburg mit einem Alkoholgehalt von ca. 40 %vol.

### Chemikalien und Lösungen

Ethanol 99,5 % reinst (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Tert-Butylmethylether 99,5 % (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Mono-Natriumcitrat 99 % (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Citronensäuremonohydrat 99,5 % (Sigma Aldrich, St.Louis, USA)

Furaneol 98 % (Sigma Aldrich, St.Louis, USA)

Mesifuran 97 % (Sigma Aldrich, St.Louis, USA)

Maltol (Sigma Aldrich, St.Louis, USA)

Zitratpuffer 0,1M pH 3,2: 1,3 g Mono-Natriumcitrat und 0,7 g Citronensäuremonohydrat in 100 ml Deionat

Interne Standardlösung: 250 mg/l Maltol in 20 %igem Ethanol

## Messinstrumente

Die Bestimmung von Mesifuran und Furaneol erfolgte auf einem 7820A Gaschromatographen mit Flammenionisationsdetektor und automatischem Probengeber (alles: Agilent Technologies, St. Clara, USA).

## Probenvorbereitung

Frischware und Konfitüre wurden mit einem Stabmixer püriert und homogenisiert. 10 g wurden in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen mit 20 ml Citratpuffer versetzt, 5 Minuten gevortext und anschließend zentrifugiert (4500 U/min, 10 min). Der Überstand wurde vorsichtig abgossen und für die weitere Analyse verwendet.

3 ml Überstand wurden in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen pipettiert und nach Zugabe von 90 µl Interner Standardlösung und 1 ml tert-Butylmethylether mit 4 g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat versetzt und 10 min gevortext. Anschließend wurde zentrifugiert (6000 u/min, 7 min) und der Überstand direkt für die Analyse verwendet.

Bei den Erdbeerbränden wurden 3 ml Brand nach Zusatz von 90 µl Interner Standardlösung und 1 ml tert-Butylmethylether mit 3 g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat versetzt und dann wie oben aufbereitet.

Die Kalibration erfolgte bei Frischware mit verschiedenen Konzentrationen der beiden Substanzen in wässrigen Citratpufferlösungen, die wie die Proben vorbereitet wurden. Bei Konfitüren wurde den Citratpufferlösungen zur Angleichung der Matrix an den hohen Zuckergehalt bei Konfitüren Saccharose in 15 %iger Konzentration zugefügt. Bei den Erdbeerbränden wurden zur Angleichung der Matrix für die Kalibration Citratpufferlösungen mit Ethanolzusatz verwendet (Endkonzentration 40 %vol.). Da speziell Furaneol in Lösung nur eine beschränkte Stabilität aufweist, sollten entsprechende Kalibrationen möglichst nur mit frisch bereiteten Lösungen der beiden Substanzen erfolgen.

Für die Bestimmung der Wiederfindungsraten wurden bei allen Proben Zusätze von 5 und 10 mg/l Furaneol bzw. Mesifuran verwendet. Die Bestimmung der Reproduzierbarkeit erfolgte durch viermalige Analyse aller Proben. Alle Ansätze wurden in Doppelbestimmung analysiert.

## Analytik

Injektionsvolumen: 1,0 µl, splitless

Trennsäule: DB-Wax 60 m Länge, 0,32 mm ID, 0,25 µm Filmdicke (Agilent Technologies, St. Clara, USA)

Trägergas: He mit 3,5 ml/min, konstanter Fluss

Injektortemperatur: 200 °C

Detektortemperatur: 250 °C

Temperaturprogramm: Initial 45 °C für 3 min, Aufheizen auf 80 °C mit 30 °C/min, Haltezeit 0 min, Aufheizen auf 140 °C mit 4 °C/min, Haltezeit 0 min, Aufheizen auf 167 °C mit 2 °C/min, Haltezeit 0 min, Aufheizen auf 250 °C mit 40 °C/min, Haltezeit 12 min

Die Quantifizierung erfolgte über die Peakflächen mit Maltol als Internem Standard.

## Ergebnisse

Die Kalibration erbrachte für beide Verbindungen in einem Bereich bis 20 mg/l eine ausgezeichnete Linearität (Abb. 1 und Abb. 2). Die Wiederfindung bei Zusätzen von 5 und 10 mg/l lag bei allen untersuchten Produkten zwischen 94 und 112 %. Die relative Standardabweichung bei vierfacher Wiederholung lag bei allen Produkten zwischen 0,4 und 7,3 %. Lediglich bei den Erdbeerbränden konnte für Furaneol diesbezüglich keine statistische Auswertung erfolgen, da hier die entsprechenden Gehalte bei allen Produkten unter der Bestimmungsgrenze lagen. Eine grobe Abschätzung durch Vergleich der Chromatogramme zeigte aber auch hier eine sehr gute Übereinstimmung.

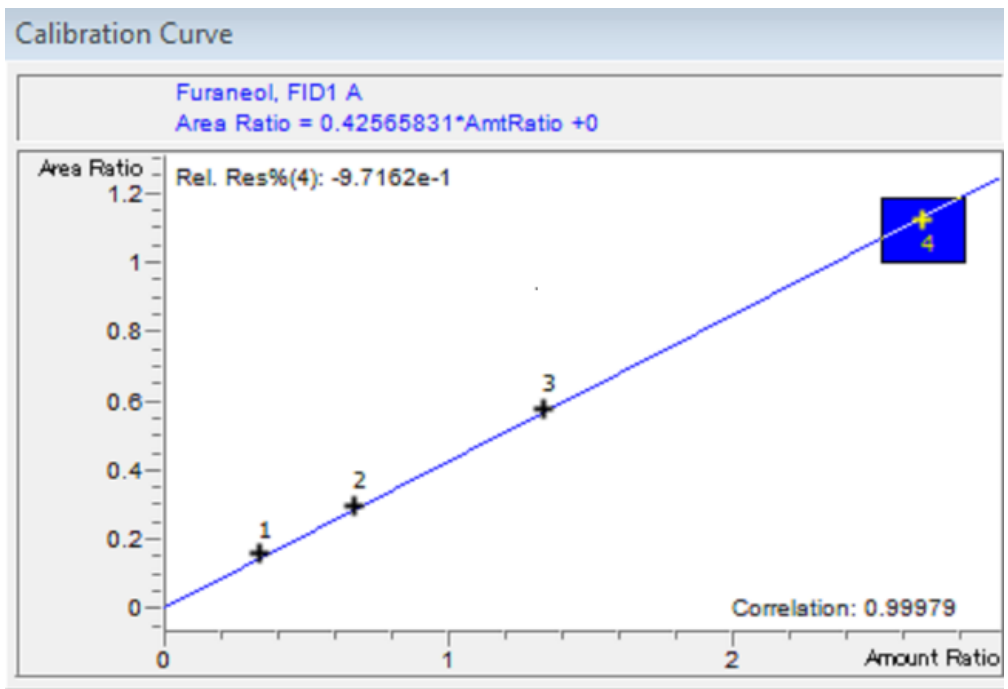


Abb.1: Kalibrationskurve Furaneol unter Verwendung wässriger Citratpufferlösungen

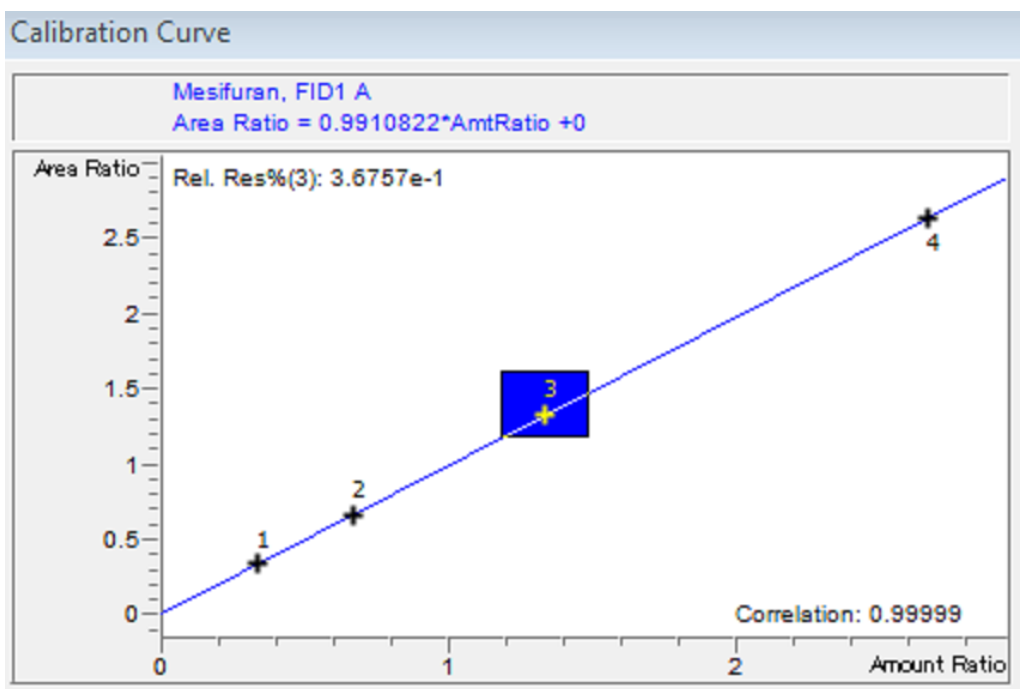


Abb.2: Kalibrationskurve Mesifuran unter Verwendung wässriger Citratpufferlösungen

Tab. 1: Wiederfindungsraten und relative Standardabweichungen (Rel.StdAbw) von Furaneol und Mesifuran in den verschiedenen Proben (Mittelwert der Doppelbestimmungen; Wf1 = Wiederfindungsrate bei 5 mg/l Zusatz, Wf2 = Wiederfindungsrate bei 10 mg/l Zusatz)

	Wf1%	Wf1%	Wf2%	Wf2%	Rel.StdAbw %	Rel.StdAbw %
	Furaneol	Mesifuran	Furaneol	Mesifuran	Furaneol	Mesifuran
<b>Erdbeere1</b>	102,1	102,1	102,8	99,5	1,3	0,8
<b>Erdbeere2</b>	105,7	105,7	106,1	99,7	0,4	0,6
<b>Erdbeere3</b>	111,0	111,0	111,8	100,9	0,7	1,0
<b>Erdbeere4</b>	102,7	102,7	102,9	98,5	2,0	2,1
<b>Konfitüre1</b>	96,5	96,5	97,4	96,4	2,1	2,5
<b>Konfitüre2</b>	99,7	99,7	97,1	93,7	2,3	6,7
<b>Konfitüre3</b>	99,2	99,2	98,9	99,0	1,4	7,3
<b>Brand1</b>	103,9	101	104,5	101,2	n.best.	2,2
<b>Brand2</b>	99,2	98,2	100,2	98,75	n.best.	1,7
<b>Brand3</b>	94,7	94	96,8	96,2	n.best.	1,7
<b>Brand4</b>	105,3	99,4	105,3	100,2	n.best.	2,1

Tabelle 1 gibt eine Zusammenfassung der analytischen Kenndaten. Die gewonnenen Extrakte sind farblos und die entsprechenden Chromatogramme einfach auszuwerten (Abb. 3 und Abb. 4). Lediglich bei den Bränden erfordert die Auswertung, bedingt durch die große Anzahl der hier auftretenden Gärungsnebenprodukte, etwas mehr Sorgfalt (Abb. 5). Ein Vorteil gegenüber einer SPE-Aufreinigung ist, dass die nach der Zentrifugation der Proben/Citratpuffer-Gemische verbleibende leichte Trübung die weitere Aufarbeitung nicht stört. Die Methode ist schnell, preiswert und gut für Serienuntersuchungen geeignet. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen, berechnet aus dem Signal/Rausch-Verhältnis, betragen 0,08 bzw. 0,27 mg für Mesifuran und 0,23 bzw. 0,75 mg für Furaneol bezogen auf 1 kg Frischware oder Konfitüre. Bei Erdbeerbrand sind die entsprechenden Werte 0,06 bzw. 0,20 mg für Mesifuran und 0,17 bzw. 0,55 mg für Furaneol bezogen auf 1 l Brand. Die geringere Empfindlichkeit für Furaneol im Vergleich zu Mesifuran ist eine Folge des deutlich geringeren Responses

dieser Verbindung. Dieser geringere Response tritt auch bei Direktinjektion einer Lösung mit gleichen Konzentrationen an Mesifuran und Furaneol auf und ist damit keinesfalls auf die schlechtere Extraktion von Furaneol im Zuge der Probenaufarbeitung zurückzuführen. Eine Steigerung der Empfindlichkeit durch Einengung des Volumens der Etherextrakte ist mit hoher Wahrscheinlichkeit möglich, jedoch von entsprechendem Mehraufwand begleitet. Diese Möglichkeit wurde hier jedoch nicht weiterverfolgt, da in fast allen untersuchten Produkten die Konzentrationen beider Verbindungen deutlich über den Bestimmungsgrenzen lagen. Lediglich bei den Bränden mit ihren sehr geringen Furaneolgehalten wäre diese Möglichkeit überlegenswert. Wie erwähnt, ist das Glucosid des Furaneols durch seine fehlende Flüchtigkeit auf diesem Weg nicht direkt bestimmbar.

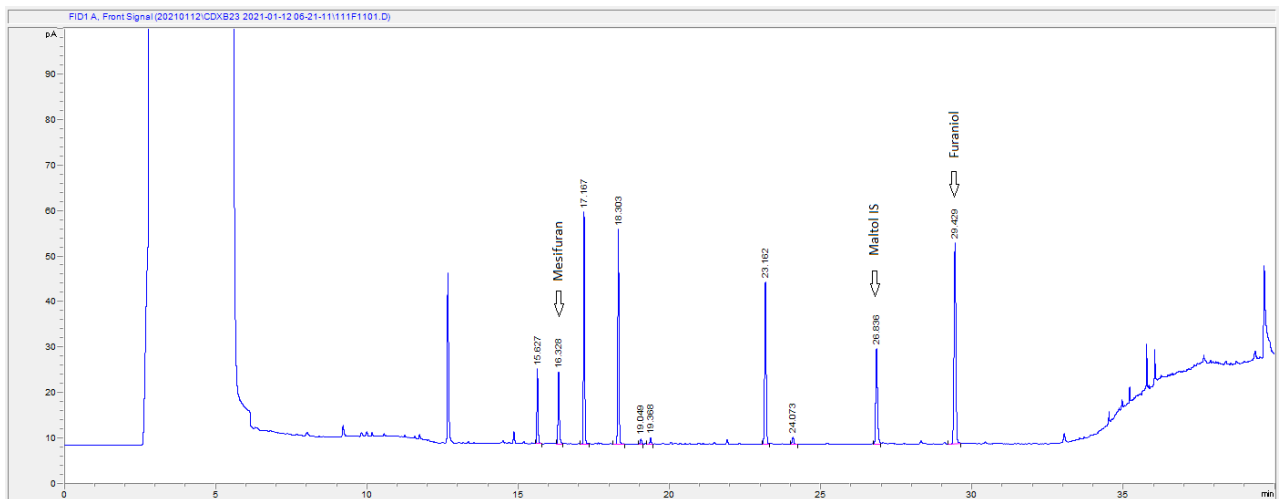


Abb. 3: Chromatogramm eines Extraktes aus frischen Erdbeeren

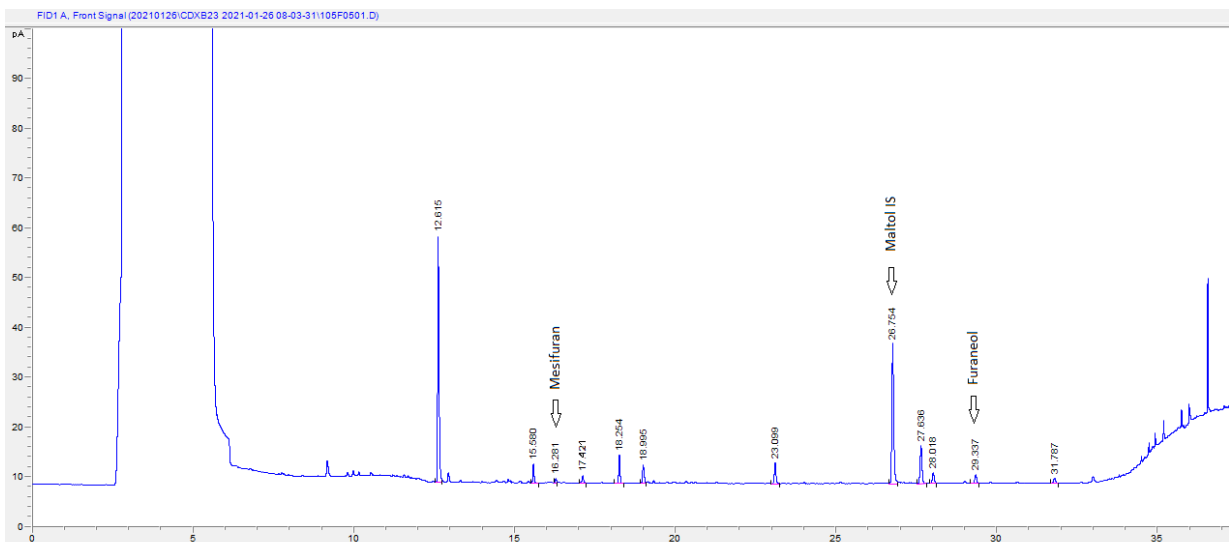


Abb. 4: Chromatogramm eines Extraktes aus Konfitüre

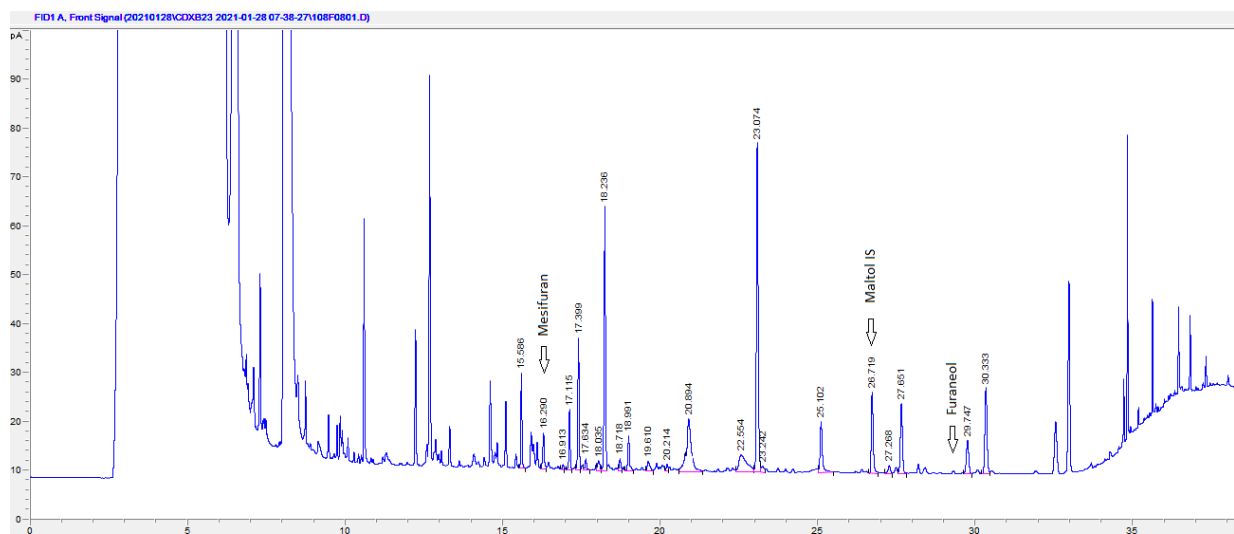


Abb. 5: Chromatogramm eines Extraktes aus einem Erdbeerbrand

## Diskussion

Die hier vorgestellte Methode für die Bestimmung von Furaneol und Mesifuran erscheint auf Grund der vorliegenden Ergebnisse sowohl für Frischware als auch für Konfitüren und Brände als gut geeignet. Der Zeitbedarf pro Probe ist, vor allem bei Serienanalytik, relativ gering, und die benötigten Chemikalien sind kostengünstig und ungiftig. Durch die Sättigung der Probelösung mit Natriumdihydrogenphosphat wird einerseits der pH-Wert in den für die Stabilität von Furaneol günstigen, schwach sauren Bereich gebracht, und andererseits der Verteilungskoeffizient soweit in Richtung tert-Butylmethylether verschoben, dass

mit dem hier beschriebenen Phasenverhältnis weitgehende Extraktion erfolgt. Die Probenvorbereitung erfordert lediglich zwei Zentrifugationsschritte im Vergleich zu den sonst häufig erforderlichen Filtrationstechniken, und die Anpassung an verschiedene Probenmatrizes ist in einfacher Weise durch Veränderung der Matrix der Kalibrationsstandards möglich. Wahrscheinlich kann durch Einengung der Etherextrakte die Empfindlichkeit noch deutlich erhöht werden, wobei der Zeitaufwand dann allerdings steigt. Nachteilig gegenüber flüssigchromatographischer Analysetechniken ist lediglich, dass damit Furaneolglucosid nicht direkt bestimmt werden kann.

## Literatur

**Al-Taher, F. and Nemzer, B.** 2020: Identification of Aroma Compounds in Freeze-dried Strawberries and Raspberries by HS-SPME-GC-MS J.Food Research Vol 9(4): 30-40.

**Bianchi, G., Lucchi, P., Maltoni, M.L. and Fagherazzi, A.** 2017: Analysis of aroma compounds in new strawberry advanced genotypes. Acta Horticulturae 1156: 673-678.

**Buttery, R.G., Takeoka, G.R. and Ling, L.C.** 1995: Furaneol: Odor Threshold and Importance to Tomato Aroma J. Agric Food Chem. 43: 1638-1640.

**Dirinck, P.J., De Pooter, H.L., Willaert, G.A. and Schamp, N.M.** 1981: Flavour Quality of Cultivated Strawberries: The role of the Sulphur Compounds J.Agric.Food Chem 29: 316-321.

**Douillard, C. and Guichard, E.** 1990. The aroma of strawberry (*Fragaria ananassa*): Characterisation of some cultivars and influence of freezing. J. Sci. Food Agr. 50:517-531.

**Ferreira, V., Jarauta, I., Lopez, R. and Cacho, J.** 2003: Quantitative determination of sotolon, maltol and free furaneol in wine by solid-phase extraction and gas chromatography-ion-trap mass spectrometry J.Chrom.1010(1): 95-103

**Forney, C.F.** 2001: Horticultural and other Factors Affecting Aroma Volatile Composition of Small Fruit Hortecchnology 11(4): 529-538.

**Hirvi, T.** 1983. Mass fragmentographic and sensory analyses in the evaluation of the aroma of some strawberry varieties. Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie 16:157-161.

**Jetti, R.R., Yang, E., Kurnianta, A., Finn, C. and Qian, M.C.** 2007: Quantification of Selected Aroma-Active Compounds in Strawberries by Headspace Solid-Phase Microextraction Gas Chromatography and Correlation with Sensory Descriptive Analysis. Journal of Food Science Vol 72: 487-496 .

**Jouquad, C., Chandler, C., Plotto, A., and Goodner, K.** 2008: A Sensory and Chemical Analysis of Fresh Strawberries Over Harvest Dates and Seasons Reveals Factors That Affect Eating Quality. Journal of the American Society for Horticultural Science Volume 133: 859-867.

**Kafkas, E., Kafkas, S., Koch-Dean, M., Schwab, W., Larkov, O., Lavid, N., Bar, E., Ravid, U. and Lewinsohn, E.** 2005: Comparison of Methodologies for the Identification of Aroma Compounds in Strawberry. *Turk J Agric For* 29: 383-390.

**Kafkas, E., Cabaroglu, T., Selli, S., Bozdogan, A., Kürkcüoğlu, M., Paydas, S. and Baser, K.H.C.** 2006: Identification of volatile aroma compounds of strawberry wine using solid-phase microextraction techniques coupled with gas chromatography–mass spectrometry *Flavour Fragr.* 21: 68–71.

**Larsen, M. and Poll, L.** 1992: Odour thresholds of some important aroma compounds in strawberries. *Zeitschrift. für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung* 195:120–123.

**Modise, D.M., Wright, C.J., Watson, R., Linforth, R. and Taylor, A.J.** 2004: Flavour volatile compound analysis in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) fruits: comparison of two mass spectrometer techniques for identifying volatile compounds *South African Journal of Botany* 2004, 70(2): 306–309.

**Negri, A.S., Allegra, D., Simoni, L., Ruscino, F., Tonelli, C., Espen, L. and Galbiati, M.** 2015: Comparative analysis of fruit aroma patterns in the domesticated wild strawberries “Profumata di Tortona” (*F. moschata*) and “Regina delle Valli” (*F. vesca*) *Front. Plant Sci.* Vol.6 Art.56: 1-13.

**Oliver, P., Cicerale, S., Pang, E. and Keast, R.** 2018: Identifying Key Flavors in Strawberries Driving Liking via Internal and External Preference Mapping. *J.Food Science* 83: 1073-1083.

**Perez, A.G., Olias, R., Sanz, C. and Olias, J.M.** 1996: Furanones in Strawberries: Evolution during Ripening and Postharvest Shelf Life. *J. Agric. Food Chem.* 44: 3620–3624.

**Rouseff, R., Goodner, K., Norby, H. and Naim, M.** 1998: Comparison of HPLC and GC-MS analysis of furans and furanones in citrus juices *Am.Chem.Soc.:* 211-222.

**Sanz, C., Perez, A.G. and Richardson, D.G.** 1994: Simultaneous HPLC Determination of 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3 (2H)-Furanone and Related Flavor Compounds in Strawberries *J.Food Sci.* Vol 59(1): 139-141.

**Schreier, P.** 1980. Quantitative composition of volatile constituents in cultivated strawberries, *Fragaria ananassa* cv. Senga Sengana, Senga Litesa and Senga Gourmella. *J. Sci. Food Agr.* 31:487–494.

**Siegmund, B., Bagdonaite, K. and Leitner, E.** 2010 Furanol and Mesifuran in Strawberries—An analytical challenge *Expression of Multidisciplinary Flavour Science* 537-540.

**Ulrich, D., Hoberg, E., Rapp, A. und Kecke, S.** 1997: Analysis of strawberry flavour—discrimination of aroma types by quantification of volatile compounds. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und Forschung* 205(3): 218-223.

**Watson, R., Wright, C.J., Mcburney, T., Taylor, A.J., and Linforth, R.S.T.** 2002: Influence of harvest date and light integral on the development of strawberry flavour compounds. *Journal of Experimental Botany*, Volume 53, Issue 377 Pages 2121–2129.

**Wein, M., Lavid, N., Lunkenbein, S., Lewinsohn, E., Schwab, E. and Kaldenhoff, R.** 2002: Isolation, cloning and expression of a multifunctional O-methyltransferase capable of forming 2,5-dimethyl-4-methoxy-3(2H)-furanone, one of the key aroma compounds in strawberry fruits. *The Plant Journal* 31(6): 755-765.

**Yan, J.W., Ban, Z.J., Lu, H.Y., Li, D., Poverenov, E., Luo, Z.S. and Li, L.** 2018: The aroma volatile repertoire in strawberry fruit: a review. *J Sci Food Agric.* 2018 Sep;98(12): 4395-4402.

**Zabetakis, I., Koulentianos, A., Orruno, E. and Boyes, I.** 2000: The effect of high hydrostatic pressure on strawberry flavour compounds. *Food Chemistry* Vol 71: 51-55.



**Zorilla-Fontanesi, Y., Rambla, J.-L., Cabeza, A., Medina, J.J., Sanchez-Sevilla, J.F., Valpuesta, V., Botella, M.A., Granell, A. and Amaya, I.** 2012: Genetic Analysis of Strawberry Fruit Aroma and Identification of O-Methyltransferase FaOMT as the Locus Controlling Natural Variation in Methylated Content Plant Physiol. Vol. 159: 851-870.

Eingelangt am 12. März 2021