

# Die Quantifizierung von Ellagitanninen in Eichenholz und in Cognac *Eaux-de-vie*

Basiert auf dem wissenschaftlichen Artikel "Validation of a Mass Spectrometry Method to Identify and Quantify Ellagitannins in Oak Wood and Cognac during Aging in Oak Barrels." (Food Chem., 2020)<sup>1</sup>.

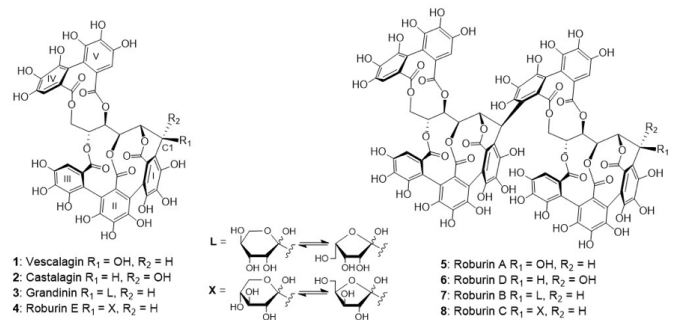
>>> Ellagitannine sind die wichtigsten Phenolverbindungen, die aus Eichenholz extrahiert werden können. Diese Verbindungen sind für eine hohe Haltbarkeit von Holz verantwortlich und spielen eine wichtige Rolle in der organoleptischen Qualität von Wein und Spirituosen (Farbe, Adstringenz und Bitterkeit). Trotz ihrer Wichtigkeit ist nur wenig darüber bekannt, in welchen Mengen diese Verbindungen in destillierten Getränken vorkommen. Ziel dieser Studie war es daher, eine Messmethode zu entwickeln und zu validieren, um mit deren Hilfe aus Cognac-Eichenholz stammende Ellagitannine zu quantifizieren. <<<

Eichenfässer sind aufgrund ihrer besonderen Eigenschaften seit langem ein wesentlicher Bestandteil der Wein- und Spirituosenproduktion. Sie bieten eine gute Wärmedämmung, sind bemerkenswert undurchlässig und tragen wesentlich zur sensorischen Qualität von Weinen und Spirituosen bei. Während der Reifung in Eichenfässern ändert sich die Zusammensetzung dieser alkoholischen Getränke aufgrund der Freisetzung von Verbindungen aus dem Holz. Diese beeinflussen organoleptische Eigenschaften wie Aroma und Farbe, aber auch andere Aspekte wie die Adstringenz und die Bitterkeit<sup>2</sup>. Unter diesen Verbindungen findet man unter anderem die Ellagitannine (hydrolysierbare Tannine). Sie sind für die hohe Haltbarkeit von Holz verantwortlich<sup>3</sup>, haben eine antioxidative Wirkung<sup>4</sup> und beeinflussen Bitterkeit und Adstringenz<sup>5</sup>.

Bislang wurden acht Ellagitannine identifiziert (Abbildung 1), wobei die meisten Erkenntnisse aus Rotweinstudien stammen<sup>6</sup>. Weniger ist jedoch über diese Verbindungen in Spirituosen bekannt, dies trifft insbesondere auf den Cognac „Eau-de-vie“ zu. Aufgrund ihrer hohen Reaktivität und strukturellen Ähnlichkeiten ist es schwierig, Ellagitannine in Spirituosen nachzuweisen und zu quantifizieren. Ziel unserer Studie war es daher, mithilfe einer einfachen, validierten Methode diese Verbindungen im Eichenholz und in Destillaten zu bestimmen und zu quantifizieren.

## ■ Die Ellagitannin-Quantifizierungsmethode

Die Herausforderung dieser Arbeit bestand darin, eine einfache und reproduzierbare Methode mit hoher Selektivität zur Quantifizierung einzelner Ellagitannine in Eichenholz und Eau-de-vie zu entwickeln. Ein leistungsstarkes Verfahren zur Untersuchung von Phenolverbindungen besteht aus einer Kombination aus Hochdruck-Flüssigkeitschromatografie und Triple Quadrupole Massenspektrometrie (LC-QQQ)<sup>1</sup>. Aus diesem Grund etablierten wir zur Charakterisierung von Ellagitanninen in Eichenholz und Cognac Eau-de-vie eine Massenspektrometrie-basierte Methode. Die Analyse des Eichenholzes wurde an Proben von Fassdauben durchgeführt, die 36 Monate im Freien lagerten. Für die Analyse der Cognac Eau-de-vie wurden 20 Destillate untersucht, die sechs Monate in Eichenfässern gereift waren. Alle Konzentrationen wurden in Vescalagin-Äquivalent ausgedrückt. Die Quantifizierung einzelner Ellagitannine wurde im negativen Modus durchgeführt



**Abbildung 1.** Chemische Strukturen der Ellagitannine 1-8. L und X entsprechen Lyxose und Xylose (nach Gadrat *et al.*)<sup>1</sup>.

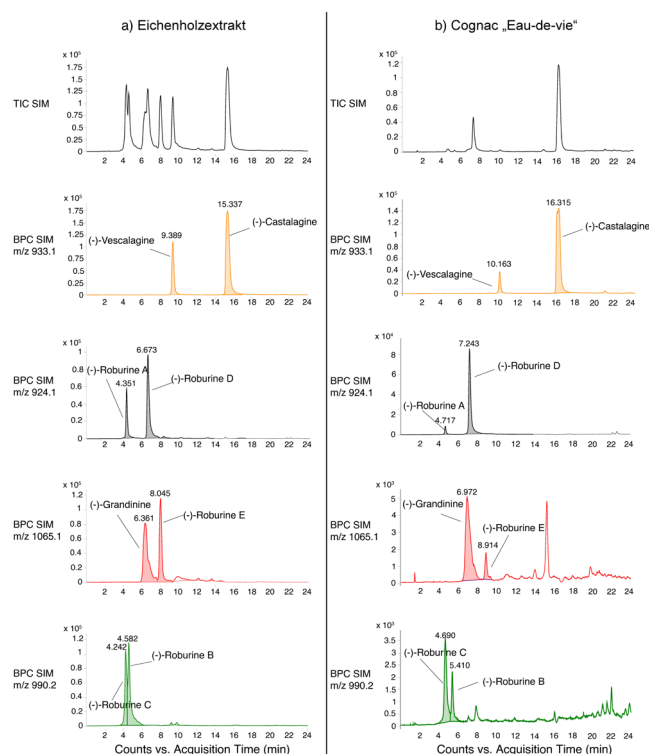
und mit den folgenden Massen identifiziert: (-)-Vescalagin und (-)-Castalagin, Monomere und Isomere mit einem identischen m/z-Verhältnis von 933,0634 (C<sub>41</sub>H<sub>25</sub>O<sub>26</sub>-); (-)-Grandinin und (-)-Roburin E, glykosylierte Monomere mit ähnlichen Strukturen und einem identischen m/z-Verhältnis von 1065,1057 (C<sub>46</sub>H<sub>33</sub>O<sub>30</sub>-); Roburin A und D, zwei Dimere mit einem identischen m/z-Verhältnis von 1849,1241 (C<sub>82</sub>H<sub>49</sub>O<sub>51</sub>-), die jedoch durch ihre doppelte Ladung einfacher bei einem m/z-Verhältnis von 924,5620 zu erfassen sind. Roburin B und C sind ebenfalls zwei glykosylierte Dimere mit einem identischen m/z-Verhältnis von 1981,1664 (C<sub>87</sub>H<sub>57</sub>O<sub>55</sub>-), die wie Roburin A und D eine doppelte Ladung besitzen und somit besser bei einem m/z-Verhältnis von 990,5831 nachgewiesen werden können.

Die acht aus dem Eichenholz stammenden Ellagitannine wurden in allen Proben gemessen und die Konzentrationen anhand einer Vescalagin-Kalibrierungskurve bestimmt. Abbildung 2 zeigt Chromatogramme der acht verschiedenen Ellagitanninverbindungen und ihre Retentionszeit in den analysierten Eichenholz-Extrakten (Abbildung 2a) und in den Cognac Eau-de-vie Proben (Abbildung 2b). Die Quantifizierungsmethode wurde hinsichtlich der folgenden Faktoren validiert<sup>1</sup>: LOD (limit of detection, Nachweisgrenze), LOQ (limit of quantification, Bestimmungsgrenze), Empfindlichkeit, Linearität im Arbeitsbereich, Wiederholpräzision innerhalb eines Tages. Letztere wurde mithilfe von fünf aufeinanderfolgenden Injektionen von zwei mittleren Konzentrationen (2 mg/L und 20 mg/L) der Kalibrierungskurve bestimmt. Die Wiederholpräzision betrug < 2 % für 2 mg/L und < 1 % für 20 mg/L, wodurch eine gute Wiederholbarkeit des Verfahrens sichergestellt wurde.

## ■ Ellagitanninbestimmung in Eichenholzproben

Um Ellagitannine in Eichenholz zu untersuchen, wurden neun Fassdauben von verschiedenen Stellen des Stapels einer Palette untersucht: drei Proben von unten, drei aus der Mitte und drei von oben<sup>1</sup>. Alle Konzentrationen wurden als Milligramm Vescalagin-Äquivalent pro Gramm Holz auf der Basis des Verdünnungsfaktors ausgedrückt. Die Gesamtkonzentrationen an einzelnen Ellagitanninen lagen im Bereich von 10,37 bis 18,77 mg/g Vescalagin-Äquivalenten. Eine ANOVA-Analyse zeigte, dass der Ellagitanningehalt von der Position im Holzstapel auf der Palette abhängt. Bei einem Wert von p < 0,05 unterscheidet

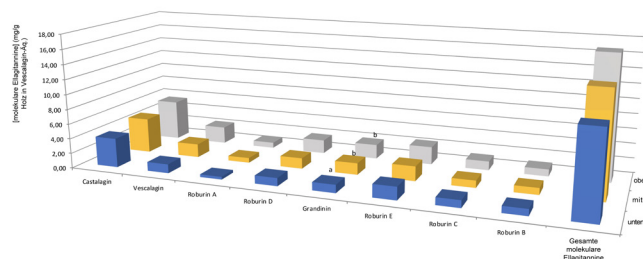
sich der Gehalt an Gesamtellagitanninen je nach Position der Dauben innerhalb des Stapels signifikant: der Anteil steigt von oben (11,27 mg/g Holz in Vescalagin-Äquivalenten) bis zum Boden des Stapels (16,72 mg/g Holz in Vescalagin-Äquivalenten) (Abbildung 3). Dies war auch bei einigen individuellen Ellagitanninen der Fall, wie zum Beispiel für Castalagin und Roburin D. Bei allen anderen jedoch waren die beobachteten Unterschiede entweder geringer oder nicht signifikant. Mithilfe dieser vorläufigen Studie konnte die Probenentnahme aus Holzstücken optimiert werden, um somit eine gute Repräsentation der Ellagitanninkonzentrationen in Eichenholz zu erreichen.



**Abbildung 2.** Negative LC-MS/MS von a) Eichenholzextrakt und b) Cognac Eau-de-vie entsprechend der  $[M - H]^-$  Ionen der Ellagitannine (nach Gadrat *et al.* 2020<sup>1</sup>).

### ■ Ellagitanninbestimmung in „Eaux-de-vie“-Proben

Die oben beschriebene Methode wurde auch zur Quantifizierung von Ellagitanninen in Cognac angewendet. Zwanzig Proben junger, in Fässern gereifter Cognac Eau-de-vie, wurden mit jeweils vier Wiederholungen analysiert. In allen Proben wurden Ellagitannine nachgewiesen. Alle acht Ellagitannine konnten in jungem „Eau-de-vie“ nachgewiesen werden, wobei jedes einzelne jedoch ein individuelles Extraktionsmuster aufwies. Castalagin machte etwa 40 bis 70 % der gesamten extrahierten Menge aus. Dieses Monomer ist das Hauptellagitannin im Eichenholz und aufgrund der Position der Hydroxylgruppe am Kohlenstoff 1 stabiler als sein Isomer Vescalagin. Das Roburin D-Dimer und das glykosylierte Grandinin-Monomer sind nach Castalagin die am besten extrahierbaren Ellagitannine. Im Allgemeinen lag die Gesamtellagitanninkonzentration in Vescalagin-Äquivalenten im Bereich von 1,9 bis 9,3 mg/L. Einzelne Ellagitanninkonzentrationen in Cognac wurden vor dieser Studie noch nie analysiert. Deshalb sind die hier beschriebenen Werte die ersten, die für Cognac-Spirituosen publiziert wurden. Für Brandy wurde eine Gesamtkonzentration von Vescalagin und Castalagin zwischen 9 und 12 mg/L in Gallussäure-Äquivalenten publiziert<sup>7</sup>. In einem französischen Cabernet Sauvignon Rotwein lag die Summe der einzelnen Ellagitanninkonzentrationen in Castalagin-Äquivalenten nach sechs bzw. zwölf Monaten in



**Abbildung 3.** Die Konzentration der acht bekannten Ellagitannine in von Fassetrauben stammendem Holz. Die Dauben lagerten an drei verschiedenen Stellen im Stapel (unten, mittig, oben). *ac* zeigen die signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Positionen ( $p < 0,05$ ) (nach Gadrat *et al.*, 2020<sup>1</sup>).

Eichenfässern zwischen 0,6 und 15,5 mg/L. Italienische und amerikanische Cabernet Sauvignon Weine wiesen nach sechs- bis zwölfmonatiger Lagerung in der Summe eine Konzentration von 0,5 bis 5,76 mg/L bzw. von 0,6 bis 12,4 mg/L in Castalagin-Äquivalenten auf. Wie bei Rotweinen ist Castalagin der am häufigsten vorkommende Bestandteil in der Gesamtellagitanninfraktion in „Eau-de-vie“ und macht 68 bis 79 % aus<sup>8</sup>.

### ■ Fazit

Zum ersten Mal wurden aus Eichenholz extrahierte Ellagitannine in Cognac „Eaux-de-vie“ mithilfe einer schnellen und genauen Spektrometriemethode präzise quantifiziert. Diese validierte Methode wurde erfolgreich zum Nachweis und zur Mengenbestimmung der acht bekannten Ellagitannine angewendet, die von unterschiedlichen Eichenholz- und „Eaux-de-vie“-Proben stammten. ■

*Mathilde Gadrat*<sup>1,2</sup>, *Joel Lavergne*<sup>2</sup>, *Catherine Emo*<sup>2</sup>, *Pierre-Louis Teissedre*<sup>1</sup>, *Kleopatra Chira*<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Unité de recherche Œnologie, EA 4577, USC 1366 INRAE, ISVV, Univ. Bordeaux, Bordeaux INP, F33882 Villenave d'Ornon France  
<sup>2</sup> Courvoisier SAS, 2 places du château, 16200 Jarnac, France

- Gadrat, M.; Lavergne, J.; Emo, C.; Teissedre, P.-L.; Chira, K. Validation of a Mass Spectrometry Method to Identify and Quantify Ellagitannins in Oak Wood and Cognac during Aging in Oak Barrels. *Food Chem.* 2020, 128223. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128223>.
- Li, S.-Y.; Duan, C.-Q. Astringency, Bitterness and Color Changes in Dry Red Wines before and during Oak Barrel Aging: An Updated Phenolic Perspective Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2019, 59 (12), 1840–1867. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1431762>.
- Scalbert, A.; Monties, B.; Dupouey, J. L.; Becker, M. Polyphénols Extractibles Du Bois de Chêne : Variabilité Interspécifique, Interindividuelle et Effet de La Duramisation. *Bull. Liaison Groupe Polyphenol* 1986, No. 13, 617–619.
- Alañón, M. E.; Castro-Vázquez, L.; Díaz-Maroto, M. C.; Gordon, M. H.; Pérez-Coello, M. S. A Study of the Antioxidant Capacity of Oak Wood Used in Wine Ageing and the Correlation with Polyphenol Composition. *Food Chem.* 2011, 128 (4), 997–1002. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.005>.
- Chira, K.; Teissedre, P.-L. Chemical and Sensory Evaluation of Wine Matured in Oak Barrel: Effect of Oak Species Involved and Toasting Process. *Eur. Food Res. Technol.* 2015, 240 (3), 533–547. <https://doi.org/10.1007/s00217-014-2352-3>.
- González-Centeno, M. R.; Chira, K.; Teissedre, P.-L. Comparison between Malolactic Fermentation Container and Barrel Toasting Effects on Phenolic, Volatile, and Sensory Profiles of Red Wines. *J. Agric. Food Chem.* 2017, 65 (16), 3320–3329. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b05497>.
- Canas, S.; Casanova, V.; Pedro Belchior, A. Antioxidant Activity and Phenolic Content of Portuguese Wine Aged Brandies. *J. Food Compos. Anal.* 2008, 21 (8), 626–633. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2008.07.001>.
- González-Centeno, M. R.; Chira, K.; Teissedre, P.-L. Ellagitannin Content, Volatile Composition and Sensory Profile of Wines from Different Countries Matured in Oak Barrels Subjected to Different Toasting Methods. *Food Chem.* 2016, 210, 500–511. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.139>.