

**HPLC-Analyse von Anthocyanen im Rotwein und Klassifizierung
deutscher Rotweine mittels multivariater statistischer Methoden**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Chemisch-Geowissenschaftlichen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Diplom-Chemiker Bálint Berente
geboren am 14. 12. 1974 in Jászberény (Ungarn)

Gutachter:

1. Prof. Dr. Klaus Danzer
2. Prof. Dr. Bernd Luckas
3. Prof. Dr. Helmut Dietrich

Tag der öffentlichen Verteidigung: 14.07.2004

Diese Arbeit widme ich meinen Eltern, meiner Schwester Mariann
und meiner Freundin Boženka

Szüleimnek, húgomnak, Boženkának

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	
1. <u>Einleitung</u>	1
1.1. Qualitätssicherung des Weins in Deutschland	1
1.2. Herkunfts- und Sortenerkennung mittels instrumentell-analytischer Methoden	3
1.3. Zielstellung	5
2. <u>Anthocyane im Wein</u>	6
2.1. Struktur und Biosynthese	6
2.2. Zur Chemie der Anthocyane im Wein	9
2.3. Analyse der Anthocyane	12
2.4. Der Anthocyanfingerprint und seine Rolle bei der Sortenerkennung	16
3. <u>Experimentelles</u>	23
3.1. Optimierung der Trennung der traubeneigenen monomeren Anthocyane	23
3.1.1. Chromatographische Bedingungen	24
3.1.2. Identifizierung der bekannten Anthocyane	29
3.1.3. Kalibration	31
3.1.4. Robustheitsprüfungen	33
3.2. Optimierung der Trennung aller monomeren Anthocyane im Wein	43
3.2.1. Auswahl einer geeigneten Säule	44
3.2.2. pH-Einfluss auf die Trennung der Anthocyanidin-monoglukoside und -diglukoside	49
3.3. Isolierung und Strukturaufklärung von nicht-trivialen Anthocyanen	51
3.3.1. Optimierung der Probenvorbereitung für die semipräparative HPLC	51
3.3.2. Isolierung von A1, A2 und A3	60
3.3.3. Strukturaufklärung von A1, A2 und A3 mittels MS, NMR, UV/Vis und Synthese	62
3.3.4. Identifizierung von Vitisin A	67
3.4. Messungen in der Routinearbeit	69
3.4.1. Untersuchungen bezüglich der Lagerfähigkeit der Proben	69
3.4.2. Die Proben und ihre Messungen in der Routine	71

4. <u>Statistische Auswertung</u>	74
4.1. Univariate Datenanalyse	74
4.1.1. Explorative Datenanalyse: Untersuchung der Variablen bezüglich <i>closure</i> und Suche nach Ausreißern unter den Proben	74
4.1.2. Varianzanalyse und Test der Gruppenmittelwerte bezüglich der Rebsorten	75
4.2. Multivariate Datenanalyse	77
4.2.1. Überblick über die verwendeten chemometrischen Methoden	77
4.2.2. Klassifizierung der Sorten	81
4.2.2.1. Zweistufige Klassifizierungen der Sorten	85
4.2.3. Einfluss von Jahrgang, Alter und Technologie auf den Anthocyanfingerprint	90
4.2.3.1. Vergleich der Einflussgrößen von Jahrgang/Alter und Technologie	90
4.2.3.2. Vergleich der Einflussgrößen von Jahrgang und Alter	95
4.3. Klassifizierung unbekannter Weine	100
4.3.1. Anwendung der Klassifizierungsmodelle auf die verdächtigen und unbekanntenen Weine	100
4.3.2. Die Problematik der Quantifizierung von Verschnittanteilen	103
5. <u>Zusammenfassung</u>	106

Literaturverzeichnis

Anhang A: Analytische HPLC

Anhang B: Isolierung und Strukturaufklärung von nicht-trivialen Anthocyanen

Anhang C: Die Proben

Anhang D: Ergebnisse der statistischen Auswertungen

Abkürzungsverzeichnis

α	Irrtumswahrscheinlichkeit	
A1, A2, A3	Anthocyan-Addukte	[Abb. 3.27]
BSA	Biologische Säureabbau	
Cy	Cyanidin-3- β -D-glukosid	[Tab. 2.1]
De	Delphinidin-3- β -D-glukosid	[Tab. 2.1]
f	Freiheitsgrade	
HK	Hauptkomponente	
HKA	Hauptkomponentenanalyse	
k'	Retentionsfaktor in der Chromatographie (früher: Kapazität)	
knN	Methode der k-nächsten Nachbarn	
KV	kanonische Variable	
λ	Wellenlänge	
LDA	Lineare Diskriminanzanalyse	
m	Anzahl von Variablen	
Ma	Malvidin-3- β -D-glukosid	[Tab. 2.1]
Maac	Malvidin-3-(6-O-acetyl)- β -D-glukosid	[Tab. 2.1]
Maca	Malvidin-3-(6-O-caffeoyl)- β -D-glukosid	[Tab. 2.1]
Macu	Malvidin-3-(6-O-p-coumaroyl)- β -D-glukosid	[Tab. 2.1]
Ma2	Malvidin-3,5-di- β -D-glukosid	[Tab. 2.1]
MS	Massenspektroskopie	
n	Anzahl von Messungen, bzw. Proben	
NMR	Kernresonanz (-Spektroskopie) (<i>Nuclear magnetic resonance</i>)	
OIV	Internationales Weinamt (<i>Office International de la Vigne et du Vin</i>)	
P	Statistisches Signifikanzniveau	
Pä	Päonidin-3- β -D-glukosid	[Tab. 2.1]
Pe	Petunidin-3- β -D-glukosid	[Tab. 2.1]
PVP	Polyvinylpyrrolidon	
RP	Umkehrphase (reversed phase)	
RSD	Relative Standardabweichung	
s_A, s_B	Standardabweichung der Parameter A bzw. B bei lin. Regression	
$s_{y,x}$	Reststandardabweichung bei der linearen Regression	
SPE	Festphasenextraktion (<i>Solid phase extraction</i>)	
VitA	Vitisin A	[Abb. 3.29]

1. Einleitung

Der Rotweinkonsum in Deutschland hat in den letzten Jahren eine steigende Tendenz gezeigt, was eine Zunahme der heimischen Rotweinproduktion zur Folge hatte. Trotz der verbesserten Verkaufschancen können sich jedoch nur Weine von guter Qualität auf dem Markt etablieren, da ein sehr starker Wettbewerb mit ausländischen Weinen besteht [91]. Deutschland ist traditionell als Weißweinland anzusehen, wo die mit roten Sorten bestockten Anbaufläche zwar wächst, aber immer noch nur etwa 24% der Gesamtfläche beträgt [Statistisches Bundesamt 1999], wogegen in den drei größten europäischen Weinbauländern, Italien, Frankreich und Spanien, traditionell die Rotweine dominieren. Die Konsequenz ist, dass diese Produzenten in der Öffentlichkeit oft automatisch mit besserer Qualität assoziiert werden und der steigenden Nachfrage auch leichter und ohne riskante Neubepflanzungen folgen können. Dazu kommen noch Konkurrenten aus Übersee, wie vor allem die USA, Chile und Südafrika. Leichtere und fruchtige Rotweine aus Kalifornien, die mit neuartiger reduktiver Technologie ausgebaut werden, gelten für viele sogar nicht nur als Gewinner, sondern als Auslöser der steigenden Beliebtheit von Rotweinen.

Die Bestätigung bzw. Beurteilung der Qualität sind Aufgaben der Qualitätsprüfung [136]. Sie hat eine doppelte Funktion. Die informative Funktion besteht darin, dass durch Beurteilung des Fertigproduktes „Wein“ und durch Einstufung in verschiedene Kategorien den Verbrauchern geholfen wird, sich in Fragen wie Geschmack, Qualität und Preis zu orientieren. Der andere Aspekt ist die Gewinnung von Information darüber, *wie* das Fertigprodukt entstanden ist. So hat die Qualitätsprüfung auch eine Schutzfunktion. Das bedeutet für die Verbraucher, dass der Qualitätsstufe nicht entsprechende oder gar gesundheitsschädliche Weine eliminiert werden. Qualitätsbewusste Winzer werden vor unlauteren Wettbewerbern ebenso geschützt, wenn nicht zugelassene Manipulationen aufgeklärt werden.

1.1 Qualitätssicherung des Weins in Deutschland

Das deutsche Weinrecht unterscheidet vier Qualitätsstufen wie Tafelwein, Landwein, Qualitätswein bestimmter Anbaugebiete (Q. b. A.) sowie Qualitätswein mit Prädikat. Letztere ist in fünf weitere Güteklassen unterteilt [125, 136]. Es gibt noch zahlreiche regionale Bezeichnungen für bestimmte Weinarten bzw. besonders hohe Qualitäten. Die Qualitätsprüfung besteht aus drei Teilen. Erstens schreibt das Weingesetz von 1971 für die Winzer die Führung eines Herbstbuches und Kellerbuches vor. Hier müssen die wichtigsten Daten wie Erntedatum, Erntemenge, Sorte, Herkunft und Mostgewicht bzw. Zukauf von anderen Trauben und die

kellertechnischen Maßnahmen dokumentiert werden. Der zweite und dritte Teil sind in der amtlichen Prüfung integriert, die ab der Qualitätsstufe „Q. b. A.“ obligatorisch ist. Die amtliche chemische Prüfung wird von einem anerkannten Weinlabor durchgeführt und liefert detaillierte Angaben über Alkohol-, Extrakt-, Zucker- und Säuregehalte, freie und gesamte schweflige Säure usw. Neben der Feststellung der Trinkbarkeit bildet die chemische Analyse auch die objektive Grundlage für die angestrebte Qualitätsstufe, da diese hauptsächlich von dem Zuckergehalt des Ausgangsmostes vor der Gärung und von dem erreichten Alkoholgehalt abhängt. Der dritte Teil ist die amtliche sensorische Prüfung, die von geschulten Weinexperten durchgeführt wird. Zuerst werden Vorbedingungen wie Jahrgang, Rebsorte, Prädikatsstufe, Anbaugebiet, Farbe und Klarheit durch Ja/Nein-Entscheidung geprüft, dann werden Geruch, Geschmack und Harmonie nach dem DLG 5-Punkte Schema bewertet. Die sensorische Prüfung garantiert sorten-, herkunfts- und jahrgangsspezifischen Geschmack, Geruch und Farbe und schließt Weine mit sensorischen Fehlerscheinungen aus.

Bezüglich der Bekämpfung unlauteren Wettbewerbs weisen die einzelnen Teile der Qualitätskontrolle unterschiedliche Zuverlässigkeiten auf. Die Daten im Herbstbuch und Kellerbuch sind zwar exakt, bezüglich ihrer Wahrheit sind die Behörden aber im Wesentlichen auf das Vertrauen zu den Winzern angewiesen. Erwartungsgemäß ist die analytisch-chemische Prüfung am wenigsten diskutabel, da die vorgeschriebenen chemischen Parameter ohne weiteres messbar und die Ergebnisse objektiv sind. Bedingt durch die Natur der Parameter können aber eher nur gröbere Fälschungen nachgewiesen werden, vor allem nicht erlaubte oder übermäßige Zusätze. Beispiele dafür sind Messungen von Zitronensäure oder von Äpfelsäure [132]. Aber auch schon eine Zuckeringung kann erst durch den Vergleich der Alkohol- und Restzuckerwerte mit dem Glukose/Fructose-Verhältnis nachgewiesen werden [132]. Hinweise auf feinere Fälschungen, wie zum Beispiel unerlaubter Verschnitt von Weinen verschiedener Sorten und/oder Herkünfte, erhält man von diesen Daten kaum. Die sensorische Prüfung konzentriert vor allem darauf, dass die typischen Merkmale von Rebsorte, Anbaugebiet und Jahrgang im Wein zur Geltung kommen [133]. Hier kann es im Falle eines negativen Urteils immer wieder zu Klagen kommen, weil die Prüfung trotz der erfahrenen Weinkenner nicht so objektiv angesehen werden kann wie eine analytisch-chemische Methode. Im Interesse qualitätsbewusster Weinproduzenten und Konsumenten wird also seit langem nach analytischen Verfahren gesucht, die geeignet wären, diese Fragen exakt, reproduzierbar und mit genügender Sicherheit zu beantworten.

1.2 Herkunfts- und Sortenerkennung mittels instrumentell-analytischer Methoden

Für die Überprüfung der Herkunft wurden bereits zuverlässige Methoden entwickelt, die auf Messungen der Stabilisotope mittels NMR und MS basieren. Die Isotopenverhältnisse $^2\text{H}/^1\text{H}$ in der Methylengruppe des Ethanol und $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ im Wasser sind von mikroklimatischen Besonderheiten abhängig [63, 66, 68-69]. Die Methoden sind auch schon in die Methodensammlung der Europäischen Union EEC No. 2676/90 aufgenommen [19]. Diese Methoden sind auch geeignet, eine Wässerung sowie, ergänzt durch die Messung des $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisses in Ethanol, eine Zuckering nachzuweisen [63, 66, 68-69]. Mittels ^{13}C -NMR-Spektroskopie können auch zahlreiche Weinbestandteile ohne Trennung selektiv und quantitativ bestimmt werden [103]. Nachteile dieser Methoden sind, dass die erforderliche Technik sehr teuer und die Probenvorbereitung aufwendig sind. Eine andere Möglichkeit für die Herkunftsidentifizierung ist die Messung der anorganischen Mineral- und Spurenelemente, deren Zusammensetzung im Wein vom geologischen Hintergrund ebenfalls abhängt [124]. Nachteilig ist allerdings, dass das Elementmuster auch durch andere Faktoren, wie z. B. die Keller-technologie, die Witterung und die Umweltbedingungen, beeinflusst wird.

Sowohl die Isotopenverhältnisse als auch das den Boden widerspiegelnde Elementmuster sind von der Witterung beeinflusst. Da aber diese Effekte verhältnismäßig schwach sind, können diese Methoden für eine Klassifizierung nach Jahrgang nur bedingt angewendet werden.

Die Sortenreinheit spielt hauptsächlich in der Weinkultur der deutschsprachigen Länder eine wichtige Rolle. Es wurde gezeigt, dass die ohnehin vorhandenen Daten von der analytischen Prüfung leider nicht genug Differenzierung zwischen Sorten ermöglichen [3].

Eine bessere Alternative ist die Analyse sortenspezifischer Substanzen aus genetischem Ursprung, wodurch die Sorten einfach anhand der Präsenz oder Abwesenheit charakteristischer Substanzen unterschieden werden können. In der Fachliteratur sind mehrere Möglichkeiten zu finden, die aber alle nicht universell anwendbar sind [40]. Die Analyse der DNA bietet die direkte Untersuchung der genetischen Information. *Regner et al.* konnten 220 Sorten mittels SSR (*Single Sequence Repeat*) unterscheiden [107]. Für Differenzierung von Genotypen und Klonen wurden RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA analysis*) und AFLP (*Amplified Fragment Length Analysis*) angewendet. Diese Messungen beschränken sich jedoch nur auf Sortenerkennung von Pflanzen, indem Blatt- oder Holzproben gemessen werden, weil das DNA-Muster im Wein durch die Hefen und anderen Mikroorganismen verändert wird.

Elektrophoretische Auftrennungen der Weinproteine und -enzyme wurden erfolgreich zur Unterscheidung von einigen Weißweinsorten herangezogen [73, 92]. Ein Nachteil für die

Analytik von Weinen ist es aber, dass im Zuge der Weinbereitung, insbesondere durch spezielle Schönungen mit Bentonit, der Eiweiß- und Enzymgehalt stark verringert wird, weshalb die Proben gereinigt und angereichert werden müssen. Bei Rotweinen, die wesentlich mehr phenolische Substanzen beinhalten als Weißweine, ist es noch kritischer, die Proteine vor der Trennung zu reinigen. Weitere und generelle Probleme bei elektrophoretischen Methoden sind die verhältnismäßig schwache Präzision und schlechte Übertragbarkeit.

Die Anwendung der Gaschromatographie zur Sortenerkennung deutscher Weißweine mittels der Analyse der Aromastoffe wurde von *Rapp* erfolgreich eingeführt [95-98, 100-102, 104]. Unter den leichtflüchtigen Komponenten haben sich besonders die Terpene als sortenspezifisch erwiesen. Die Anreicherung und Probenaufgabe mittels Festphasenmikroextraktion (SPME) stellt eine einfache, billige, automatisierbare Methode dar, die auch die Verwendung von umweltschädigenden Freonen als Extraktionsmittel eliminiert [27-32]. Diese Methode ist aber kaum anwendbar für Rotweine, deren Terpenegehalt aufgrund der Rotweinbereitungsverfahren stark reduziert ist. Beispiele für Rotweinklassifizierung mittels GC basieren auf Substanzen, deren Muster weniger sortenspezifisch ist, dementsprechend wurden bezüglich der Sorten nur Klassifizierungen von beschränktem Umfang durchgeführt [46, 51-52, 78]. Ein weiterer Nachteil ist, dass die Probenvorbereitung die aufwändigere Liquid-Liquid-Extraktion erfordert. Über die Anwendung von Sorbent Extraktion [60] und online Supercritical Fluid Extraktion [13] wurde auch berichtet.

Gegenüber der Weißwein- bietet die Rotweinbereitung aber durch den wesentlich höheren Gehalt an phenolischen Substanzen auch einen Vorteil. Zur Unterscheidung von Rotweinen wurden die Flavonoide, insbesondere die Anthocyane mittels HPLC und UV-spektroskopisch analysiert. Klassifizierungen von italienischen [33, 82] und französischen [45, 111] roten Sorten bzw. Rotweinen anhand des Anthocyanfingerprints wurden beschrieben. Erste Untersuchung von roten Trauben deutscher Sorten wurde von *Wenzel et al.* bereits 1987 publiziert, die analysierten Einzelproben gaben aber keine Auskunft über die möglichen herkunfts- und jahrgangsbedingten Schwankungen des Fingerprints [130]. Eine gründlichere Untersuchung aller in Österreich wichtigen Trauben [40] bzw. deren Rotweine [38] unter Einbeziehung mehrerer Proben der einzelnen Sorten und nachfolgender statistischer Auswertung wurden von *Eder et al.* durchgeführt. Gute Klassifizierungen wurden beobachtet, aber einige in Deutschland wichtige Sorten, Dornfelder und Schwarzriesling, fehlten. Die Frage, wie stabil der Anthocyanfingerprint während des Ausbaus und nach der Abfüllung erhalten bleibt, wurde in dieser Studie statistisch-repräsentativ nicht untersucht.

1.3 Zielstellung

Die bereits durchgeführten Untersuchungen lassen vermuten, dass eine sichere Klassifizierung deutscher Rotweine anhand des Anthocyanfingerprints möglich sein sollte. Folgende Ziele werden gesetzt, um diese Problematik gründlich zu bearbeiten:

Eine in jeder Hinsicht geeignete HPLC-Methode sollte für die Analyse von Anthocyanen ausgearbeitet werden, die alle relevanten Anthocyane in möglichst kurzer Zeit preiswert und robust auftrennen kann. Die Abtrennung und Identifizierung weiterer Anthocyan-Derivate, die für Klassifizierungszwecke ausgewertet werden könnten, wird ebenso erstrebt.

Die Aussagekraft des Anthocyanfingerprints soll durch Messung eines repräsentativen Datensatzes untersucht werden. Der Datensatz sollte daher Weine von allen in Deutschland relevanten Sorten in genügender Anzahl beinhalten, wobei innerhalb jeder Sorte Weine unterschiedlichen Alters und aus unterschiedlichen kellertechnologischen Verfahren vertreten sein sollten.

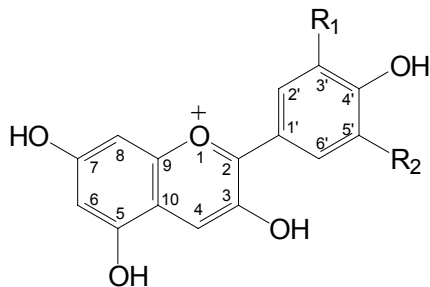
Die Untersuchung mittels multivariater statistischer Methoden sollte Auskunft geben, wie zuverlässig der Anthocyanfingerprint für Rebsortenidentifizierung herangezogen werden kann. Auch die einzelnen Variablen sollten bezüglich ihrer diskriminierenden Wirkung untersucht werden, damit analytischer und statistischer Aufwand auf das Nötige reduziert wird. Falls vorhanden, sollten signifikante Effekte der Kellertechnologie und der Alterung identifiziert werden, damit ihr Einfluss auf den natürlichen Anthocyanfingerprint korrigiert, bzw. eine Klassifizierung nach Alter oder Kellertechnologie durchgeführt werden kann.

Anhand der erstellten Modelle sollten auch kommerzielle Weine charakterisiert werden. Ferner sollte untersucht werden, ob und wie genau Verschnittanteile bestimmt werden können.

2. Anthocyane im Wein

2.1 Struktur und Biosynthese

Chemisch betrachtet, lassen sich die Farbstoffe des Rotweins, die Anthocyane, von den Pyryliumsalzen [9, 121] ableiten. Das Grundgerüst der Anthocyanidine ist das 2-Benzyl-1-benzopyrylium Kation, auch als Flavylum Ion bezeichnet, dessen 3,5,7,4'-Positionen hydroxyliert sind [Abb. 2.1]. Die unterschiedlich substituierten 3' und 5' Positionen (B-Ring) bestimmen die einzelnen Anthocyanidine (Aglykone). Die Anthocyanidine sind in gelöster Form nicht stabil [15].



3,5,7,4'-Tetrahydroxy-flavylium-Kation
Flavylum = [2-Benzyl-1-benzopyrylium]⁺

R₁, R₂: -H, -OH, -OCH₃

Abb. 2.1 Struktur der Anthocyanidine (Aglykone) [15]

Die eigentlichen Anthocyane sind mindestens in Position 3 durch ein Zuckermolekül, meistens Glukose, Galaktose, Rhamnose oder Arabinose, substituiert. Der Substituent kann auch ein Di- oder Trisaccharid sein, und zusätzliche Substitutionen können auch an anderen OH-Gruppen des Anthocyanidins, aber hauptsächlich in Position 5, erfolgen. Außerdem kann der Zuckerteil des Anthocyanmoleküls mit pflanzeigenen Säuren verestert sein. Die Klasse der Anthocyane umfasst also zahlreiche Verbindungen [15].

Die Anthocyane sind in der Natur weit verbreitet, vor allem in Blumen und Früchten. Ihre breite Farbpalette deckt die Farben von Blau über Purpur, Violett und Pink bis zu fast allen Rottönen. Die hervorgerufene Farbe hängt von vielen Faktoren ab, wie die Struktur des Anthocyanins, pH, Temperatur, Eigenassoziation der Anthocyane, Komplexbildung mit Metallionen und Kopigmentation mit anderen organischen Substanzen. Die Biosynthese der Anthocyane verwendet die trivialen Ausgangsubstanzen Acetyl-CoenzymA und L-Phenylalanin [Abb. 2.2]. Alle Reaktionen sind enzymkatalysiert und zeigen den folgenden Syntheseweg: Chalcon, Flavanon, Flavanonol (auch als 3-Hydroxiflavanon oder Dihydroflavonol bezeichnet), Anthocyanidin, Anthocyan.

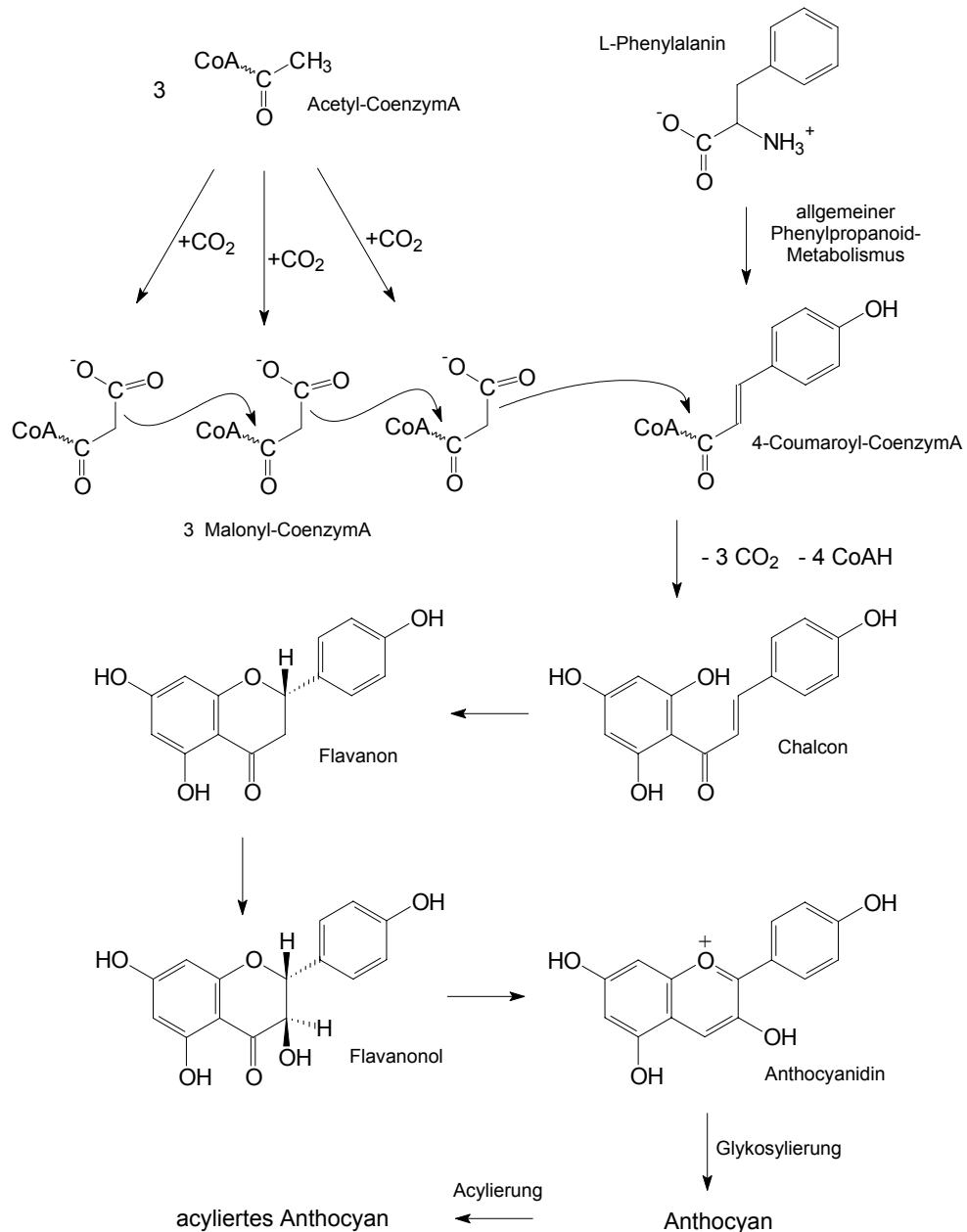


Abb. 2.2 Biosynthese der Anthocyane nach Grisebach [62]

Die unterschiedliche B-Ring-Substitution kann schon bei der p-Cumarsäure-Stufe oder später bei der Flavanon-, oder Flavanonol-Stufe erfolgen. Wichtigster externer Faktor bei der Bildung der Anthocyane ist das Licht. Die Kolorierung roter Trauben erfolgt am Ende der Reifung, und läuft zunächst parallel mit der Bildung der Glukose [99]. Viel Licht und nicht zu hohe Temperatur sind für die Anthocyan-Synthese am günstigsten [109]. In der letzten Phase der Reifung nimmt die Menge der Anthocyane wieder ab, eine Verlängerung der Reifezeit bringt keine Farbe mehr. Die Anthocyane befinden sich in der Beerenhaut in eigenen vom Protoplasma abgegrenzten Hohlräumen. Kleinere Mengen sind in den Samen zu finden, und einige bestimmte Traubensorten enthalten selbst im Fruchtfleisch Farbstoffe [99].

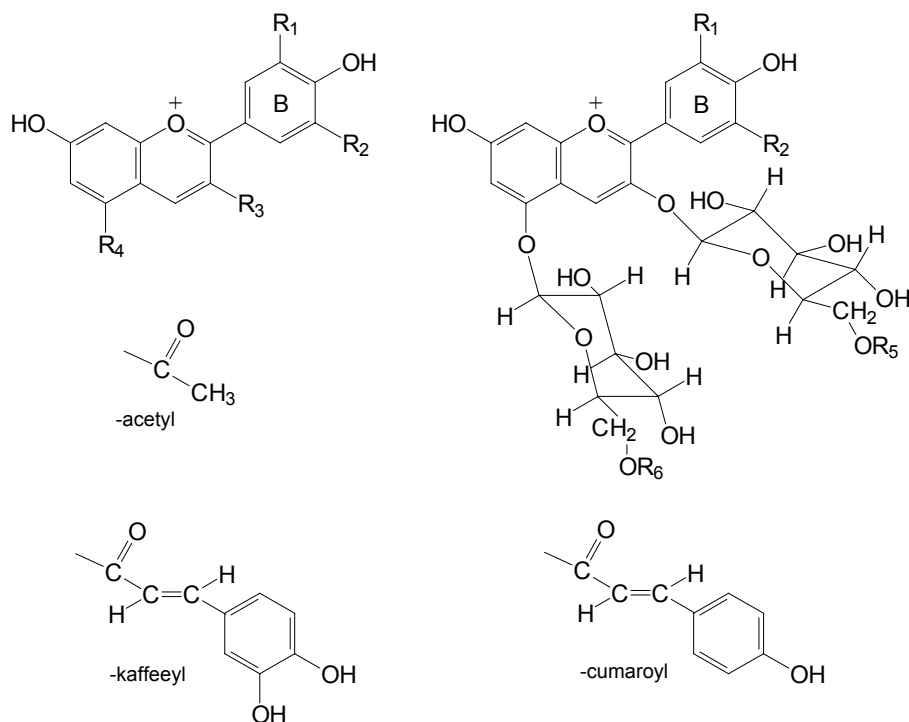


Abb. 2.3 Aufbau der Traubenanthocyane und die möglichen Acylgruppen.
Die Gruppen R₁-R₆ sind in Tab. 2.1 angegeben.

Tab. 2.1 Anthocyane der Weinrebe. Positionen der Gruppen R₁-R₆ sind in Abb. 2.3 dargestellt. De=Delphinidin, Cy=Cyanidin, Pe=Petunidin, Pä=Päonidin, Ma=Malvidin (* nur ausgewählte Beispiele aus der Gruppe)

Abk.	Aglykon		Glukosilierung		Acylierung		Gruppe
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	
De	-OH	-OH	-O-glukosid	-OH	-H	-	freie Anthocyanidin-monoglukoside
Cy	-OH	-H	-O-glukosid	-OH	-H	-	
Pe	-OH	-OCH ₃	-O-glukosid	-OH	-H	-	
Pä	-H	-OCH ₃	-O-glukosid	-OH	-H	-	
Ma	-OCH ₃	-OCH ₃	-O-glukosid	-OH	-H	-	
Maac	-OCH ₃	-OCH ₃	-O-glukosid	-OH	-acetyl	-	acylierte Anthocyanidin-monoglukoside*
Maca	-OCH ₃	-OCH ₃	-O-glukosid	-OH	-kaffeeyl	-	
Macu	-OCH ₃	-OCH ₃	-O-glukosid	-OH	-cumaroyl	-	
Ma2	-OCH ₃	-OCH ₃	-O-glukosid	-O-glukosid	-H	-H	freie Anth.-diglukoside*
Ma2 [‡]	-OCH ₃	-OCH ₃	-O-glukosid	-O-glukosid	‡	‡	acylierte Anth.-diglukoside*

[‡] -acetyl, -kaffeeyl, -cumaroyl

Die Anzahl der theoretisch möglichen Anthocyane der Weinrebe ist auf 100 reduziert. Die 5 Aglykone der in Trauben vorkommenden Anthocyane sind Tab. 2.1 zu entnehmen. Der Zuckerteil ist ausschließlich β-D-Glukose, und die 3-Monoglukoside bzw. 3,5-Diglukoside

können nur durch Essigsäure, p-Cumarsäure oder Kaffeesäure verestert werden [Abb. 2.3]. Die Zusammensetzung der Anthocyane ist sortenspezifisch [Kap. 2.4].

2.2 Zur Chemie der Anthocyane im Wein

Die Farbe des Rotweins wird nicht allein vom Traubenmaterial bestimmt, sondern die Keller-technologie spielt auch eine wichtige Rolle. Nachdem die Beeren zerquetscht worden sind, wird die Maische bei Roséweinherstellung wie bei der Weißweinherstellung sofort abgepresst, wodurch nur wenig Farbe und Gerbstoffe extrahiert werden. Bei der Rotwein-erzeugung wird die Maische vor dem Keltern erhitzt (Maischeerhitzung), oder man lässt den Most einfach in der Maische gären. Zeitlich gesteuerte Kombinationen beider Methoden sind auch bekannt. Die wichtigsten kellertechnischen Einflüsse auf die Extraktion der Poly-phenole, die Intensität der Mazeration, die Zeitdauer, in der der Most in Kontakt mit der gepressten Beerenhaut bleibt und die Temperatur, wurden vor kurzem von *Fischer et al.* bei den 3 wichtigsten deutschen Rotweinsorten systematisch untersucht [47-48].

Die Farbe eines Rotweines hängt aber auch nicht nur vom Anthocyangehalt ab, da im Wein zahlreiche reversible und irreversible Reaktionen unter Beteiligung der Anthocyane ablaufen [Abb. 2.4].

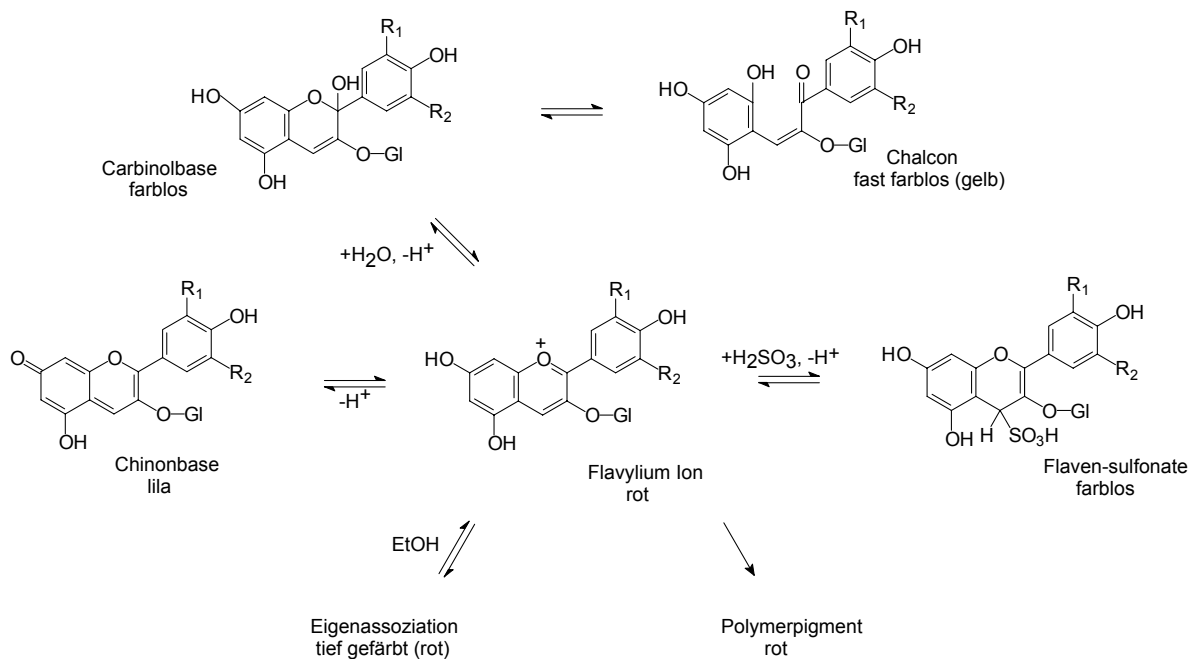


Abb. 2.4 Die Reaktionen der Anthocyane im Wein

Die positiv geladene Flavylium-Form ist unter stark saueren Bedingungen dominant. Mit steigendem pH-Wert kann das Flavylium deprotoniert oder hydratisiert und deprotoniert werden. Die erste Reaktion liefert die Chinonbase-Form, die zweite die Carbinol-Pseudobase-Form. Das Carbinol steht weiterhin mit der ring-geöffneten Chalcon-Form im Gleichgewicht. Untersuchungen von *Brouillard et al.* zeigten, dass es von der Struktur des jeweiligen Flavyliums abhängt, welche der 3 neutralen Formen entstehen [15]. Die Anthocyanidine und Anthocyane, wo Position 3 substituiert ist (-OH, bzw. -O-glukosid), bilden vorwiegend das Carbinol, wenn der pH-Wert steigt. Bei den für Wein typischen pH-Werten liegen nur etwa 10-25% der Anthocyane in der roten Flavylium-Form vor. Untersuchungen synthetisch hergestellter Flavyliumsalze ergaben, dass 3,4,5 unsubstituierte Flavyliumsalze eher mit dem Chalcon im pH-abhängigen Gleichgewicht stehen. Wird ein solches Flavylium Ion dann nur in Position 4 substituiert, wird die Chinon-Form bei höherem pH-Wert bevorzugt. Der Effekt der Temperatur auf diese Reaktionen ist wesentlich kleiner als der vom pH-Wert. Höhere Temperatur verschiebt das Gleichgewicht geringfügig zugunsten des Chalcons [15].

Die zwei bei pH-Werten des Weines überwiegenden Formen der natürlichen Anthocyane können verschiedene Reaktionen eingehen. Die positive Ladung der Flavylium-Form ist delokalisiert und verursacht partielle positive Ladungen bei den Positionen 2 und 4, sowie bei den 5, 7, und 4'-OH-Gruppen [Abb. 2.5]. Hier können nukleophile Reaktionspartner angreifen, so die Hydratation der Position 2 unter Bildung der Carbinol-Form. Und durch Deprotonierung der OH-Gruppen entstehen die Chinonbasen. Die Carbinol-Form ist eher für elektrophile Reaktionspartner günstig, da die Positionen 6 und 8 durch die 5- und 7-OH-Gruppen negativ polarisiert sind.

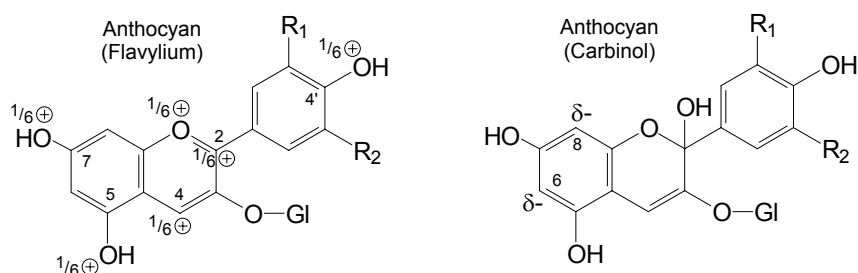


Abb. 2.5 Reaktive Positionen der zwei häufigsten Gleichgewichtsformen der Anthocyane.

Eine andere, ebenfalls wichtige reversible Reaktion des Flavylium Ions im Wein ist die Addition von Hydrogensulfitionen, die bei der Position 4 erfolgt. Hydrogensulfitionen werden dem Wein durch die Schwefelung zugesetzt und bewirken einen bleichenden Effekt. Die Eigenassoziation der Anthocyane macht sich durch eine positive Abweichung vom Lambert-

Beerschen Gesetz bemerkbar [15, 119]. Die Farbintensivierung hört nach der Gärung auf, indem das Ethanol die Molekülkomplexe auflöst.

Die irreversiblen Reaktionen führen zu einer Verringerung des Anthocyangehalts. Die Degradation der Anthocyane beginnt wahrscheinlich mit der Abspaltung der Glukose [79]. Die Aglykone sind in gelöster Form nicht stabil und zerfallen in farblose Verbindungen. Weine älter als 5 Jahre beinhalten kaum freie Anthocyane. Ein Teil der Anthocyane wird in polyphenolische Polymere eingebaut [84, 109, 119]. Dieses Phänomen ist sehr wichtig, da nach dem Abbau der freien Anthocyane allein diese Polymere die Farbe des Rotweins bestimmen. Die Reaktionsmechanismen sind noch nicht völlig geklärt, offenbar spielen bei diesen Reaktionen die partiell positiv geladenen 2- und 4-Positionen des Flavylumions sowie die negativ polarisierten 6- und 8-Positionen des Carbinols eine wichtige Rolle. Die wichtigsten Reaktionspartner sind die Catechine und die Procyanidine („*condensed Tannins*“). Abb. 2.6 stellt eine mögliche Polymerisationsreaktion dar.

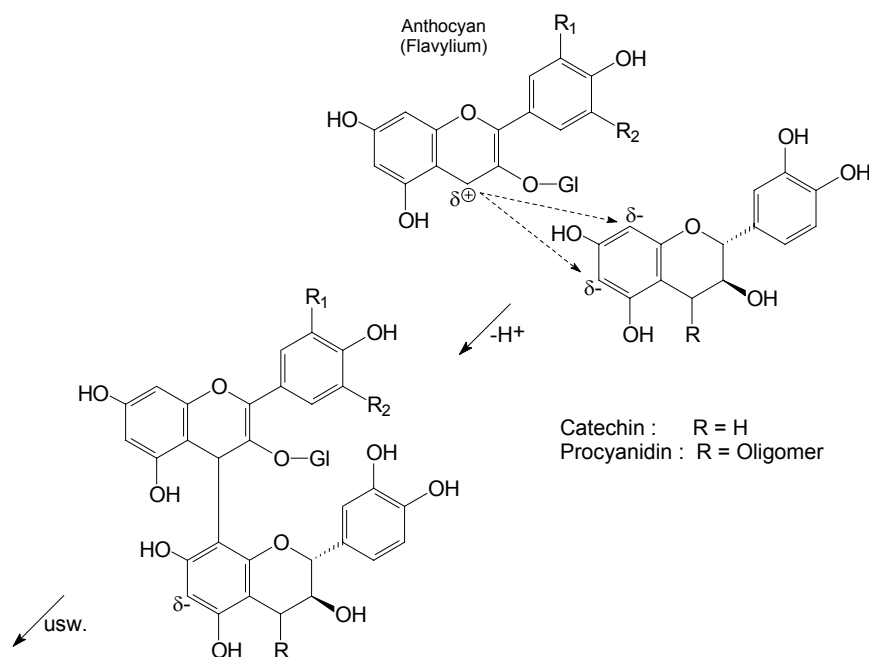


Abb. 2.6 Einbau der Anthocyane in polyphenolische Polymere.

Die Anthocyane können auch Polykondensationsreaktionen eingehen, wobei Acetaldehyd die Brücke bildet. In Abb. 2.7 ist ein Beispiel dafür dargestellt.

Die Zusammensetzung der Polymere ist undefiniert. Im Polymer können mehrere Einheiten von Catechin und anderen polyphenolischen Substanzen eingebaut werden. Laut *Es-Safi et al.* haben die Anthocyane eine terminierende Eigenschaft. Wenn ein Anthocyan eingebaut wird, wird die Polymerisation gestoppt [43]. Ein weiterer wichtiger Unterschied besteht zwischen

den beiden skizzierten Reaktionsmechanismen dadurch, dass nach der ersten Reaktion das Flavylum-System nicht mehr existiert, und so die rote Farbe verloren geht. Wird ein Anthocyan über die Positionen 6 oder 8 polymerisiert [Abb. 2.7], bleibt die Farbe erhalten.

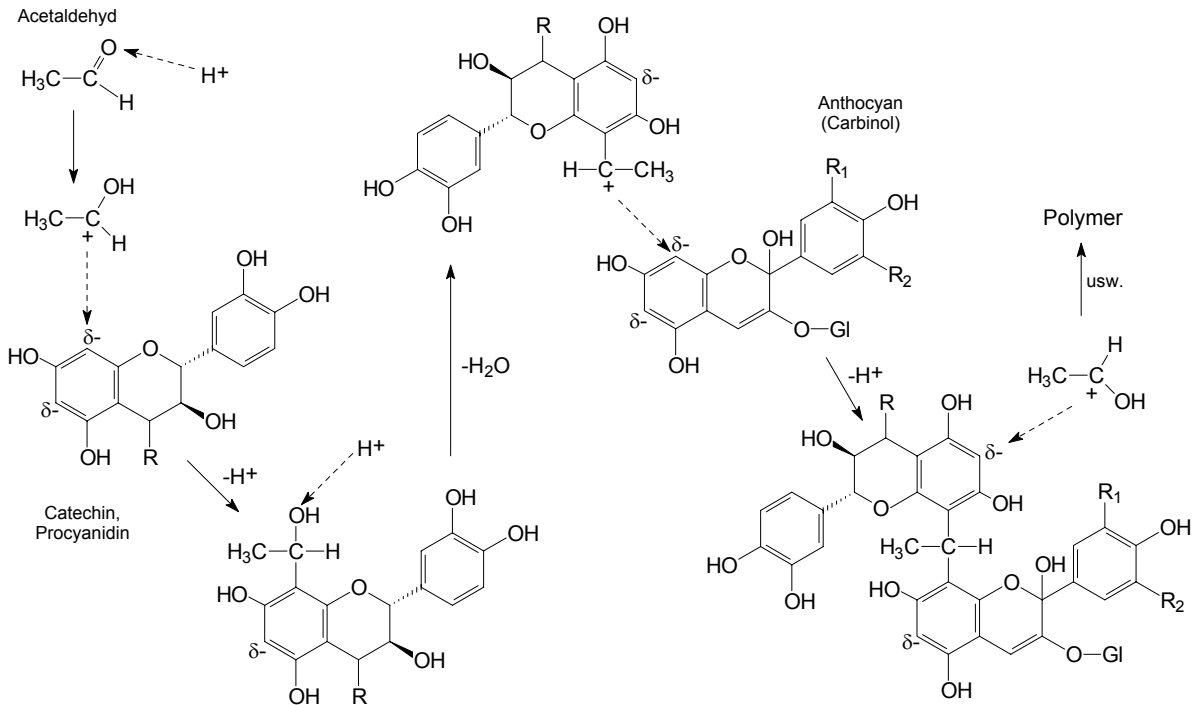


Abb. 2.7 Polykondensation von Anthocyanen und Catechinen mittels Acetaldehyd

Ergebnisse der letzten Jahre zeigen, dass die Stabilisierung von Anthocyanidin-3-monoglykosiden nicht nur durch Einbau in Polymere, sondern auch durch einfache Reaktionen mit Verbindungen mit einer C=C Doppelbindung erfolgen kann. Diese Verbindungen werden im Kapitel 3.3 detailliert diskutiert.

2.3 Analyse der Anthocyane

Die Identifikation einzelner Anthocyane hat in den 50er Jahren bereits begonnen aber ist noch längst nicht abgeschlossen [80, 122]. Das Schema der Isolierung, Reinigung und Strukturklärung ist in Abb. 2.8 dargestellt. Die Identifikation von Aglykon, Zucker und der Acylgruppe erfolgte durch Vergleich mit Standards. Detaillierte Beschreibungen der angewendeten Methoden sind in der Monographie von Francis zusammengefasst [55].

Die Entwicklung der chromatographischen und spektroskopischen Methoden hat die Strukturklärung der Anthocyane wesentlich erleichtert und erweitert. Die Anwendung von Gelchromatographie [8] und präparativer HPLC [18] bietet eine alternative Methode für die

Probenaufreinigung. Die Identifizierung von Aglykone, Zucker und Acylgruppen kann mittels HPLC [67] oder GC [18] wesentlich schneller durchgeführt werden. Mittels moderner spektroskopischer Methoden, wie MS [122] und NMR [80], kann die Struktur oft direkt ermittelt werden, ohne die Anthocyane in ihre Bausteine zu zerlegen.

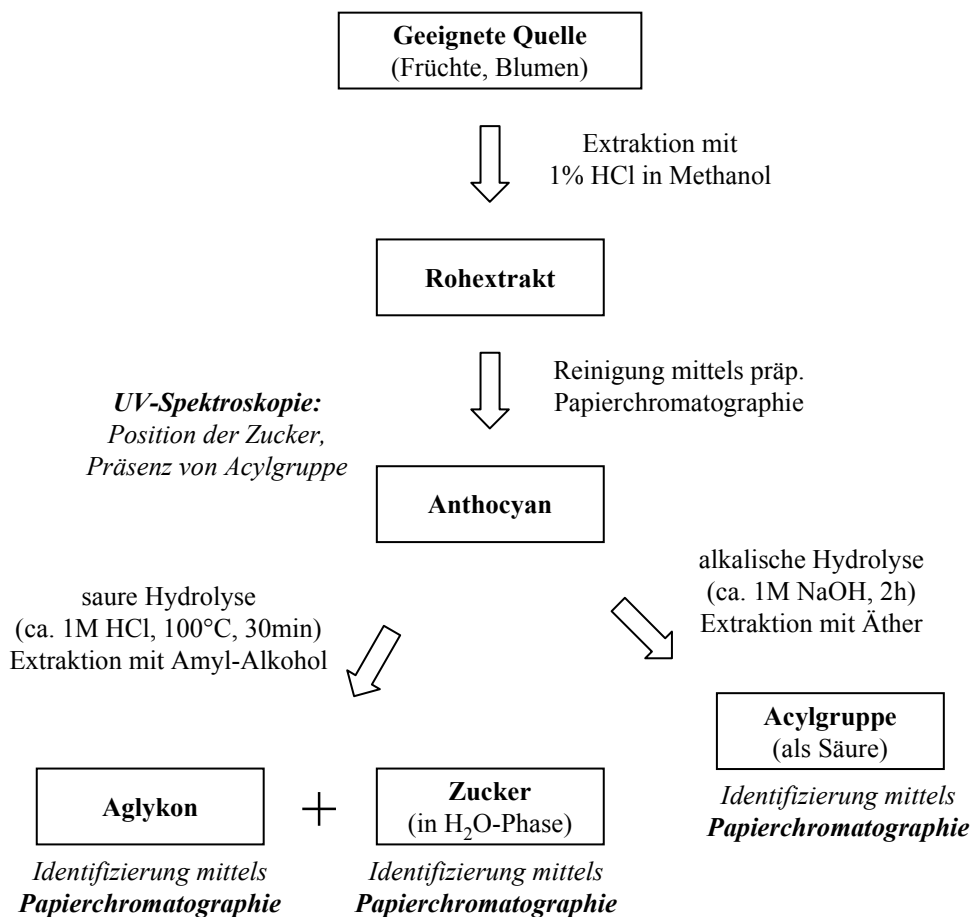


Abb. 2.8 Strukturaufklärung von Anthocyanen mittels Hydrolyse und Identifikation der Bausteine

Wie im Kapitel 2.1 bereits erwähnt, enthält die Weintraube nur bestimmte Anthocyane, deren Trennung mittels zweidimensionaler Papierchromatographie schon 1959 von *Ribéreau-Gayon* erfolgreich durchgeführt wurde [109]. Alle 5 freien Anthocyanidin-3-monoglukoside bzw. 5 freien Anthocyanidin-3,5-diglukoside sowie einige ihrer acylierten Derivate wurden aufgetrennt, insgesamt 22 Anthocyane. Mit dieser Methode konnten bereits qualitative Unterschiede zwischen der Anthocyanzusammensetzung verschiedener Gattungen erhalten werden.

Die quantitative Bestimmung der Farbstoffe im Wein ist eine wesentlich schwierigere Aufgabe als die Trennung einzelner freier Anthocyane von Traubenextrakten. Der erste Grund ist die komplizierte Matrix im Wein, wo besonders die in Polymeren gebundenen Anthocyane hervorzuheben sind. Der zweite Grund ist die Präsenz von mehreren Gleichgewichtsformen der Anthocyane, die vom Wein-pH und Schwefelung abhängen. Die

erwähnten Probleme sollten jedoch nicht bloß als Störfaktor verstanden werden, sondern vielmehr als oenologisch relevante Parameter, die sogar oft wichtiger sind als die freien Anthocyane. Die Bestimmung der Polymer-gebundenen Anthocyane ist zum Beispiel sehr wichtig für die Abschätzung der zukünftigen Farbe eines Rotweins, der längere Lagerung braucht. Daher wurden vielmehr die Anteile aller Anthocyane in den verschiedenen Formen quantitativ bestimmt als die Anthocyanzusammensetzung.

Die Erfassung der verschiedenen Gleichgewichtsformen nutzt aus, dass mittels pH-Verschiebungen bzw. durch Zugabe von Acetaldehyd oder SO₂ die verschiedenen Spezies selektiv in die detektierbare Flavylium-Form gezwungen, oder umgekehrt, gebleicht werden können [Abb. 2.4]. Dabei wurde angenommen, dass die Polymerpigmente weder durch pH noch durch SO₂ beeinflusst werden. Der Gehalt einzelner Spezies ergibt sich entweder direkt aus dem UV-spektroskopischen Messergebnis oder lässt sich als Differenz von zwei entsprechenden Messungen zu berechnen. Detaillierte Angaben findet man in der Monographie von Somers und Vérette [119]. Ein Problem mit dieser Methode ist, dass die Polymerpigmente nicht ganz pH- und SO₂-resistent sind. Auch die Farbe sehr alter Weine, die keine freien Anthocyane mehr enthalten, ändert sich geringfügig beim pH-Sprung oder bei SO₂-Zugabe. Diese Differenz wurde anfangs als freier Anthocyan-Gehalt missinterpretiert und führte zu überhöhten Anthocyan-Gehalten. Die Diskrepanz wurde später durch Anwendung der HPLC auch bestätigt [7, 85]. Um die Störung der Polymerfarbpigmente zu reduzieren, wurden die obigen Methoden auch in Kombination mit einfachen, nicht-chromatographischen Trennmethode angewendet [Abb. 2.9].

Die chemische Abtrennung der großen phenolischen Polymere (Tannine) von den freien phenolischen Substanzen wurde schon ab Ende der 50er Jahre untersucht, vorwiegend von französischen Wissenschaftlern [87, 89, 94]. Bei der Bestimmung phenolischer Substanzen, die keine Anthocyane sind, gibt es kaum Möglichkeit, die verschiedenen Substanzgruppen durch Änderungen der Messbedingungen selektiv zu erfassen. Daher wurde immer auf Trennmethode konzentriert, mit denen bestimmte Substanzgruppen meistens durch Präzipitation entfernt werden können. Der Gehalt dieser Substanzklassen kann aus der Differenz der Messung vor und nach der Präzipitation berechnet werden. Als Messmethoden haben sich zwei Methoden als besonders geeignet erwiesen: die direkte UV-Messung bei $\lambda=280$ nm, sowie Oxidation der Phenole durch das Folin-Ciocalteu Reagenz und nachfolgende Messung der entstandenen blauen Heteropolyphosphomolybdat-wolframat Anionen bei $\lambda=765$ nm [117]. Im Rahmen dieser Arbeit wird gezeigt, dass die gängigsten Methoden für die Präzipitation der Tannine auch nicht ganz selektiv sind [Kapitel 3.3.1].

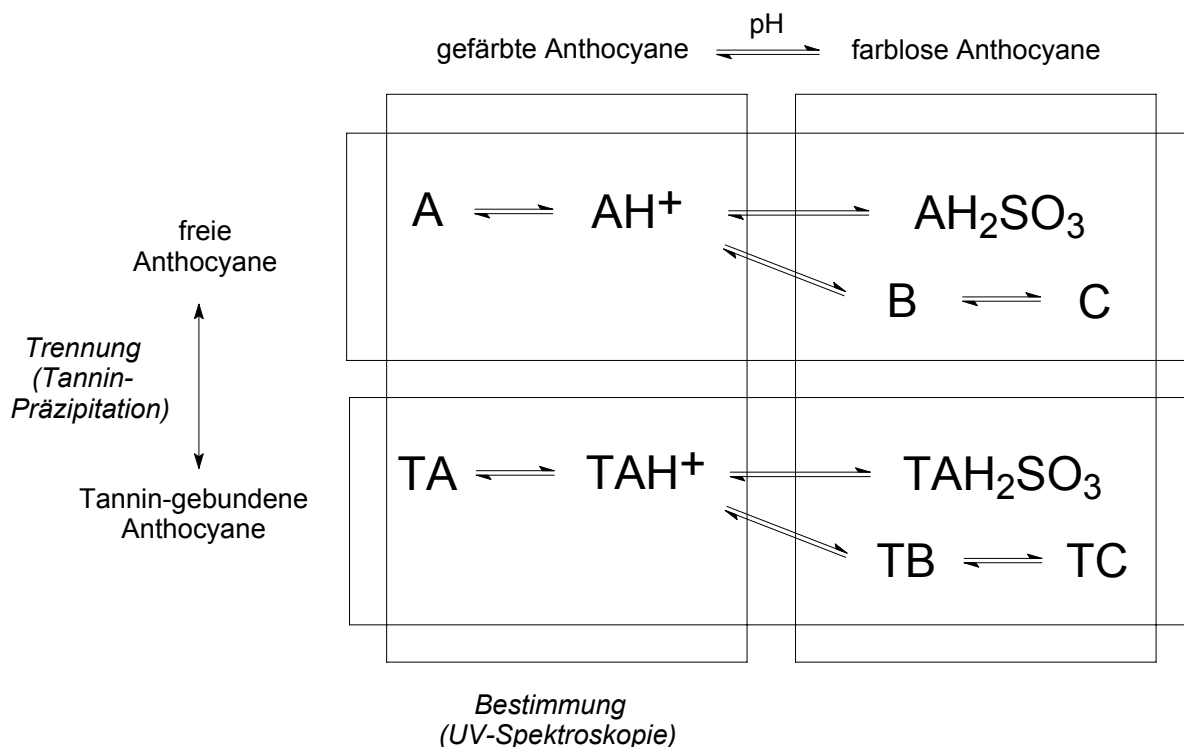


Abb. 2.9 Verschiedene Formen der Farbstoffe im Wein und ihre Bestimmung nach Ribéreau-Gayon [548]. AH^+ : Flavylum Form, A: Chinonbase, B: Carbinol Pseudebase, C: Chalcon, AH_2SO_3 : Anthocyan-Hydrogensulfit

Die gleichzeitige Auftrennung der einzelnen Anthocyane und ihre quantitative Bestimmung wurden erst durch die Anwendung der Umkehrphasen-HPLC möglich. Die ersten zwei Publikationen über die HPLC-Analyse von Rotweinen wurden 1978 von *Wulff* und *Nagel* [135] bzw. 1979 von *Williams et al.* [131] veröffentlicht. Die wesentlichen Bedingungen der HPLC-Analytik von Anthocyanen wurden bereits von *Wulff* und *Nagel* gezeigt: Anwendung von C_{18} -Umkehrphasen, stark saure Eluenten und selektive Detektion der roten Flavylum-Formen bei $\lambda=520$ nm [135]. Die Trennung der Anthocyane richtet sich stark nach der Größe und Hydrophobizität der Moleküle: Die Gruppe der freien Anthocyane eluiert zuerst, gefolgt von den acetylierten Anthocyanen, und am Ende eluieren die coumarylierten Anthocyane [Abb. 3.1].

Mit optimalem HPLC-System können auch die einzelnen Komponenten der Gruppen getrennt werden, wobei die Elution durch die Substitution des B-Rings bestimmt wird. Innerhalb jeder Gruppe eluieren die Derivate des Delphinidins zuerst, wo der B-Ring dreifach OH-substituiert ist [Tab. 2.1]. Danach eluieren die jeweiligen Derivate von Cyanidin und die von Petunidin mit zwei OH-Gruppen am B-Ring. Als nächstes eluieren die Päonidin-Derivate und am Ende jeder Gruppe die von Malvidin. Die mit Kaffeesäure veresterten Anthocyane eluieren im Endbereich der acetylierten und im Anfangsbereich der coumarylierten Anthocyane. Von dieser

Substanzgruppe ist aber meistens nur Malvidin-3-(6-O-kaffeoyl)-glukosid nachweisbar, wenn überhaupt [11, 90, 135]. Die Anthocyanentrennung der Gattung *Vitis vinifera* ist also relativ einfach.

Williams et al. erweiterten die analysierten Anthocyane mit den 3,5-Diglukosiden und mit den 3-(6-O-Coumarylglukosid)-5-Glukosiden [131]. Die Diglukoside eluierten schneller und hatten breitere Peaks als die entsprechenden Monoglukoside. Die Elutionsreihenfolge der einzelnen Anthocyane stimmt mit der von Monoglukosiden überein: De₂, Cy₂, Pe₂, P_ä₂, Ma₂. Die Trennung aller Mono- und Diglukoside gelang nicht und scheint auch nicht möglich zu sein [Kapitel 3.2]. Da aber die meisten für Rotweinanbau wichtigen Rebsorten zu der Gattung *vinifera* gehören, war die quantitative Bestimmung einzelner Diglukoside auch nicht von großer Bedeutung.

Heutzutage zählt die HPLC zu den Routineanwendungen in der Weinanalytik. Nicht nur die Anthocyane und die Flavonoide, sondern generell die phenolischen Verbindungen [12, 65, 123, 128], die Zucker [4-5], die Säuren [59, 64, 88], und die Amine [2, 16-17, 44, 115] lassen sich mittels HPLC analysieren.

In den letzten 20 Jahren wurden zahlreiche HPLC-Methoden über die Anthocyananalyse von Rotweinen publiziert [6, 11, 40, 67, 116, 119]. Die Unterschiede zwischen den angegebenen chromatographischen Methoden mögen vielleicht marginal sein, die Qualität dieser Trennungen bezüglich der Anzahl der getrennten Peaks und der Analysenzeit ist trotzdem recht unterschiedlich. Es ist daher schwer zu erklären, warum so viele Methoden parallel existieren, wo manche Methoden den anderen klar überlegen sind. Bedauerlicherweise kann man die Wahl der chromatographischen Bedingungen auch nicht nachvollziehen, denn bis auf die Arbeitsgruppe von *Eder et al.* [39] wurde in keiner Publikation über die Methodenentwicklung bzw. Vergleich zwischen HPLC-Methoden berichtet, sondern es wurden nur die endgültigen Bedingungen beschrieben. Im Kapitel 3.1-2 werden einige Aspekte der Methodenentwicklung erläutert, und eine HPLC-Methode wird vorgestellt, die die bisher publizierten übertrifft.

2.4 Der Anthocyanfingerpint und seine Rolle bei der Sortenerkennung

Mit Hilfe verschiedener chromatographischer Trennmethode können verschieden feine Unterschiede zwischen den Anthocyanfingerprints bzgl. der Rebsorte nachgewiesen werden:

1. Papierchromatographie [109, 134]

- Wichtige qualitative Unterschiede zwischen den Gattungen: die Gattung *Vitis vinifera* (*Europäerrebe*), im Gegensatz zu allen anderen Gattungen (verschiedene *Amerikanerreben*, *Wildreben*), besitzt nur Anthocyanidin-monoglukoside aber keine -Diglukoside.
- Anwendung: Nachweis eines Verschnitts mit *Amerikanerreben* bzw. *Hybridsorten* (*interspezifische* Sorten; Kreuzungen zwischen *Europäer-* und *Amerikanerreben*) [gebräuchliche Methode: OIV 1969, Referenzmethode mit Quantifizierung: OIV 1976].

2. Dünnschichtchromatographie [70]

- Wichtige qualitative Unterschiede innerhalb der *vinifera*-Gattung: die Sorten der Burgunderfamilie besitzen nur freie Anthocyanidin-3-monoglukoside aber keine acylierten Derivate.
- Anwendung: Überprüfung der Sortenreinheit von Weinen der Sorte Blauer Spätburgunder (Pinot noir) und Schwarzriesling.

3. HPLC [38, 40, 45, 67, 130]

- Quantitative Unterschiede zwischen den Anthocyanfingerprints verschiedener Sorten.
- Anwendung: Klassifizierung von Trauben und/oder Weinen nach der Rebsorte

Die Unterschiede im Anthocyanfingerprint sind leider nicht so markant, dass jede Sorte individuell erkannt werden könnte. In einer grundlegenden Studie untersuchten *Wenzel et al.* die Anthocyanzusammensetzung von 50 Rotweinträumen, darunter von allen deutschen und einigen wichtigen ausländischen Sorten [130]. Von den meisten Sorten wurden nur Einzelproben analysiert, was nur die Einteilung der Rebsorten in 5 Gruppen erlaubte.

In der Studie von *Eder et al.* wurden 88 Traubenproben von 11 österreichischen Rebsorten untersucht [40]. Die Proben stammten aus 8 Standorten und 5 Jahrgängen, wodurch die natürlichen Schwankungen im Anthocyanfingerprint ersichtlich wurden. Diese Schwankungen sind sogar so groß, bzw. manche Sorten sind so ähnlich, dass eine Klassifizierung anhand der Rohdaten nicht, sondern erst mit der Anwendung von multivariaten statistischen Verfahren möglich war. Mittels zweistufiger schrittweiser Diskriminanzanalyse konnten 96,4 % der Proben korrekt klassifiziert werden. Besonders wichtig ist, dass auch vier der in Deutschland wichtigen Sorten einbezogen wurden: Blauer Spätburgunder, Blauer Portugieser, Blauer Trollinger und Blauer Lemberger (in Österreich: Blaufränkisch), deren Differenzierung kein Problem darstellte. Wenn auch noch die Sorten Dornfelder, Schwarzriesling und Regent diskriminiert werden könnten, würden die wichtigsten deutschen Sorten, zumindest die Trauben, klassifizierbar. Untersuchungen über diese Fragestellung sind noch nicht bekannt.

Die Klassifizierung von Rotweinen ist aus zwei Gründen wesentlich schwieriger als die bisher diskutierte Traubenklassifizierung. Zusätzlich zu den natürlichen Schwankungen des Anthocyanmusters der Traube kommen noch:

1. durch die Kellertechnologie hervorgerufenen Schwankungen, sowie
2. der Abbau der Anthocyane während der Alterung des Weins.

In der Fortsetzung ihrer Untersuchungen stellten *Eder et al.* fest, dass die Bodenbearbeitung, die Traubengesundheit und verschiedene Reberziehungssysteme keinen wesentlichen Einfluss auf den Anthocyanfingerprint von Blauer Spätburgunder- bzw. Zweigelt-Weine ausüben [38]. Auch wichtige kellertechnologische Unterschiede wie Maischegärung oder Maischeerhitzung, die Anwendung verschiedener Reinzuchthefen sowie der biologische Säureabbau (BSA) und die meisten Schönungsmethoden hatten den Anthocyanfingerprint nicht wesentlich verändert. Der Effekt der verschiedenen Varianten und Kombinationen der Maischeerhitzung und Maischegärung auf das Phenolspektrum wurde von *Strasser* und *Fischer* sehr ausführlich untersucht [123]. Aus den von ihnen publizierten absoluten Konzentrationen konnten die Anthocyanfingerprints berechnet werden. Bei den Weinen der drei Sorten Blauer Spätburgunder, Dornfelder und Blauer Portugieser konnten eher nur geringfügige Schwankungen festgestellt werden.

Im Rahmen der oben genannten Versuchsserie wurde ein 97er Spätburgunder auch mit dem Mazeration Carbonique Verfahren vergärt [123]. Diese Variante zeichnete sich durch eine wesentlich geringere Farbstoffextraktion aus, wodurch in der relativen Anthocyanzusammensetzung das ohnehin bedeutendste Malvidin-3-glukosid noch größeren Anteil erlangte. Der Fingerprint war allerdings noch nicht so stark abweichend, wie es von *Da Porto et al.* in einer ähnlichen Studie festgestellt wurde (Review von *Mazza* [84]). Hier wurde traditionelle Maischegärung mit Mazeration Carbonique verglichen, und letztere wies nach 14 Tagen wesentlich geringeren Farbstoffgehalt auf als die Maischegärvariante; etwa so viel, wie bei der Maischegärung schon nach 5 Tagen extrahiert wurde. Das verursachte eine deutliche Verschiebung im Anthocyanfingerprint zugunsten des Hauptpigmentes Malvidin-3-glukosid.

Bei Maischegärung kann ein anderer Effekt wirken, der untypischen Anthocyanfingerprint verursachen kann. Die Farbstoffextraktion hängt von der Dauer des Maischekontaktes und dem Alkoholgehalt stark ab, wobei der letztere Faktor selbst zeitabhängig ist. *Leone et al.* untersuchten die Maischegärung der Sorte Troia, wo die Maische schon nach 4 Tagen abgepresst und damit die Farbstoffextraktion abgebrochen wurde (Review von *Mazza* [84]). Die im Wasser besser löslichen freien Anthocyane wurden anteilmäßig effektiver extrahiert als die

hydrophoberen acylierten Anthocyane, deren Extraktion sicher erst mit steigendem Alkoholgehalt effektiver wird. Die Abweichung konnte durch einen Vergleich mit dem Anthocyanfingerprint in der Traubenschale erkannt werden. Bei der Maischeerhitzung sorgt die Temperaturerhöhung für die Extraktion der Farbstoffe, und das sollte sich laut *Holbach et al.* auf alle Substanzen annähernd gleich auswirken [67]. Die Vergleiche zwischen den Schalenextrakt- und Mostfingerprints der Sorten Blauer Spätburgunder und Dornfelder zeigten keine großen Unterschiede.

Maischeerhitzte Weine weisen allerdings andere Probleme auf. Mehrere Autoren berichteten über die überlegene Farbintensität dieser Weine. Es wurde jedoch auch festgestellt, dass die intensive Farbe eher von in Polymeren stabilisierten Anthocyanen kommt und der Gehalt an freien Anthocyanen sogar geringer ist als in den traditionellen maischevergorenen Weinen. Die zeitliche Beständigkeit des sortentypischen Fingerprints ist dadurch eingeschränkt. Ähnliche Zusammenhänge wurden auch bei den BSA-behandelten Weinen [106] und bei der Anwendung spezieller Hefe- und Enzympräparate beschrieben [41]. Eine detaillierte Darstellung des Anthocyanfingerprints wurde nur bei dem Hefe- und Enzymversuch publiziert, und es wurden keine markanten Unterschiede zwischen den Kontroll- und Versuchsvarianten gefunden.

Dallas und Laureano untersuchten den Effekt des dosierten SO_2 auf die Extraktion der Anthocyane während der Maischegärung [22]. Drei Sorten wurden untersucht und bei allen Sorten wurden mit steigendem SO_2 -Gehalt steigende Anthocyankonzentrationen bestimmt. Den publizierten absoluten Konzentrationen kann entnommen werden, dass die Anthocyanzusammensetzungen der einzelnen Sorten nur kleine Schwankungen aufwiesen.

Als generelle Aussage bezüglich des Effektes der Kellertechnologie kann formuliert werden, dass je weniger Farbstoffe aus der Traubenschale in den Wein übergehen, desto größere Verschiebungen können im Anthocyanfingerprint zugunsten der jeweiligen Hauptpigmente festgestellt werden. Bei Maischegärung kann eine relative Anreicherung der freien Anthocyane gegenüber den acylierten im Wein erfolgen, bedingt durch die unterschiedliche Wasserlöslichkeit der Anthocyan-Untergruppen. Maischeerhitzte Moste widerspiegeln das sortenspezifische Anthocyanmuster am besten, ihre Weine haben allerdings relativ wenig freie Anthocyane.

Der Abbau der Anthocyane begrenzt nicht nur die Analysierbarkeit von beliebig alten Weinen. Da die Anthocyane verschiedene Degradationsgeschwindigkeiten haben, erfolgt auch eine Änderung des Fingerprints während des Abbaus. In der bereits genannten Studie

von *Holbach et al.* wurde festgestellt, dass der sortentypische Fingerprint eines maischeerhitzten Mostes schon während der Gärung verändert wird [67]. Stärkste Rückgänge wurden bei Cy und Pā beobachtet, gefolgt von De, Pe und Ma. Die acylierten Anthocyane überstanden die Gärung ohne besondere Verluste.

Über sehr ähnliches Verhalten wurde von *Leone et al.* bei der Untersuchung der Anthocyan-Abbaukinetik in Troia Weine berichtet [84]. Nach 4 Tagen Maischegärung zeigte sich bereits eine Veränderung im Vergleich mit dem Fingerprint der Trauben: kein Cy, verhältnismäßig wenig Pā und De, etwa der gleiche Anteil an Pe und hoher relativer Anteil an Ma wurden innerhalb der Gruppe der freien Anthocyane bestimmt. Diese Veränderung kann eher mit dem schnelleren Abbau von Cy, Pā und De als mit einer differenzierten Extraktion erklärt werden. Die Stabilität der acylierten Anthocyane im Vergleich mit den freien Anthocyanen kann auf diese Weise nicht so eindeutig geprüft werden, da bei der Maischegärung die verschiedenen Extraktionsraten auch eine Rolle spielen. Die Ergebnisse von *Nagel* und *Wulff* über die Entwicklung der Anthocyanzusammensetzung eines Cabernet Sauvignon Weines [90], ergänzt mit dem ebenso von ihnen publizierten Fingerprint der Traube [135], sind völlig im Einklang mit dem oben beschriebenen Verhalten.

Am wichtigsten ist jedoch, dass diese Veränderungen im Fingerprint während der Gärung stattfanden. Die nachfolgende Reifung wurde 165 Tage (*Leone et al.*) bzw. 240 Tage lang (*Nagel* und *Wulf*) verfolgt, und in diesem Zeitraum verringerte sich praktisch nur noch die Menge der monomeren Anthocyane, die Fingerprints blieben aber ziemlich stabil. *Eder et al.* fanden auch keine großen Unterschiede zwischen den Fingerprints nach dem 80sten bzw. 420sten Tag bei der Untersuchung von 4 Rotweinen [41]. Somit sind die Unterschiede zwischen Maischeerhitzung mit nachfolgender Gärung und Maischegärung gar nicht so groß, was die abbaubedingten Änderungen des Anthocyanfingerprints betrifft.

Wie schnell sich die monomeren Anthocyane abbauen, hängt von ihrer Anfangskonzentration und der Beschaffenheit des Weins ab. *McCloskey* und *Yengoyan* überwachten die Alterung in Cabernet Sauvignon und Zinfandel Weinen über 10 Jahre lang [85]. Bereits nach 3 Jahren zeigte sich eine Veränderung im Fingerprint, was einen schnelleren Abbau der acylierten als der freien Anthocyane indizierte. Innerhalb der acylierten Anthocyanen war die Degradation der coumarylierten Anthocyane wiederum schneller als die von den acetylierten. Nach 10 Jahren Alterung konnte in beiden Varianten nur noch Ma nachgewiesen werden, die anderen monomeren Anthocyane waren aber völlig verschwunden. Die Autoren deuteten an, dass ein

mehr oder weniger sortenspezifischer Fingerprint etwa bis 3 Jahre lang bestehe, und danach nehme die Dominanz des Hauptpigmentes Ma immer mehr zu.

Alle bisher genannten Faktoren, von dem Einfluss der Trauben über die Kellertechnologie bis zur Alterung der Weine beeinflussen individuell den Anthocyanfingerprint, und es ist praktisch unmöglich, ihre komplexen Beiträge zu modellieren und dadurch einen Anthocyanfingerprint zu errechnen. Es bleibt nun die einzige Möglichkeit, die Tauglichkeit des Anthocyanfingerprints für die Rebsortenerkennung empirisch zu prüfen, indem Weine analysiert und mittels multivariater statistischer Methoden klassifiziert werden, wenn es möglich ist. Beispiele für Rotweinklassifizierung gibt es aber sehr wenig, die meisten Klassifizierungen wurden anhand des Traubenfingerprints durchgeführt [33, 40, 82].

Etiévant et al. klassifizierten bereits 1988 französische Jungweine [45]. Neben dem durch 15 monomere Anthocyane bestimmten Anthocyanfingerprint wurden UV-spektroskopische Summenparameter sowie absolute Gehalte von 9 wichtigen Flavonoiden auch in die Auswertung einbezogen. Eine 100%-ige Klassifizierung wurde mittels Diskriminanzanalyse erreicht, allerdings war die Anzahl der Proben zu gering ($n=34$), um die Repräsentativität der Ergebnisse zu untermauern. Eine repräsentativere Studie wurde von *Eder et al.* 1997 publiziert [38]. Ähnlich der von ihnen früher durchgeführten Klassifizierung von Trauben konnten die Weinproben auch mit 93,8% sehr gut richtig klassifiziert werden. Mehr Beispiele sind uns nicht bekannt. Die Ergebnisse dieser zwei Studien lassen aber vermuten, dass eine Klassifizierung von Rotweinen der wichtigsten deutschen Sorten möglich sein sollte, was als Ziel für die vorliegende Arbeit gestellt wurde.

Vor kurzem wurde über eine neue Methode für die Rebsortenerkennung von *Edelmann et al.* berichtet [37]. Sie untersuchten alle phenolischen Substanzen im Wein mittels Fourier-Transformation-Infrarotspektroskopie (FTIR) im mittleren IR-Bereich (MIR). Die Methode erfasst alle Phenole, nicht nur die Anthocyane, wodurch ein größerer Informationsgehalt zugrunde liegt. Andererseits erfolgt die Messung ohne Trennung, nur summarische Extinktionen werden gemessen, weswegen dieser erhöhte Informationsgehalt nicht vollständig aufgelöst erfasst werden kann und eine Auswertung nur mittels chemometrischer Methoden möglich ist. Großer Vorteil dieser Methode ist, dass die Messung einfach ist und sehr schnell durchgeführt werden kann. Nachteil der Methode ist, dass die Entfernung der Zucker und organischer Säuren wegen spektraler Interferenzen unumgänglich ist. Das wird durch die Anwendung von SPE realisiert, die eigentlich den Kosten- und Zeitaufwand dieser Methode bestimmt.

Methoden für die Ermittlung von Verschnittanteilen sind in der Fachliteratur nicht zu finden. Die meisten Klassifizierungen wurden mit sortenreinen Weinen durchgeführt, bzw. keine Angaben von Verschnittanteilen wurden angegeben. Nachweismethoden für einen Versatz mit fremdem Wein sind nur für solche Fälle bekannt, wo gar kein Versatz erlaubt ist, z. B. Weißherbst Weine [67] oder Verschnitt mit Amerikanerreben [OIV 1969, OIV 1976].

Andere, gröbere Fälschungen durch natürliche Farbstoffe anderer Früchte oder gar künstliche Farbstoffe kommen auch vor. Die Analyse des Anthocyanfingerprints ist meistens nur bei Fälschungen mittels natürlicher Anthocyane nötig. *Bridle et al.* berichteten zum Beispiel über den Nachweis von Farbtintensivierung durch Holunderbeeren [14]. Die Präsenz der traubenfremden Anthocyane im Anthocyanfingerprint konnte mittels HPLC einfach nachgewiesen werden. Für die Prüfung künstlicher Farbstoffzusätze wurden sehr unterschiedliche Methoden beschrieben. Die OIV-Methode nutzt aus, dass künstliche Farbstoffe im Gegensatz zu den Anthocyanen auf einen Wollfaden fixiert werden können [134]. Bei Bedarf kann ihre Zusammensetzung papierchromatographisch bestimmt werden. Bei der Anwendung der Dünnschichtchromatographie kann auf eine Wollfaden-Extraktion sogar verzichtet werden [24]. Die von *Flak et al.* beschriebene Methode ist besonders vorteilhaft: Ein schneller Screening auf künstliche Farbstoffe kann mittels Voltammetrie in einigen Minuten ohne jegliche Probenvorbereitung durchgeführt werden. Nach positivem Befund können die einzelnen Farbstoffe mittels HPLC bestimmt werden [50].

3. Experimentelles

Seit den ersten Anwendungen der HPLC für die Analytik der Anthocyane hat sich diese Technik wesentlich verbessert. Aus diesem Grunde wurden für diese Arbeit nur HPLC-Säulen der neuesten Generation angewendet, mit denen die beste Leistung zu erwarten war. Ein weiterer wichtiger Aspekt war die Entwicklung einer Methode, die sich auch in der Routine lange Zeit anwenden lässt. Eine entscheidende Rolle spielt dabei die pH-Empfindlichkeit der herkömmlichen Umkehrphasen mit chemisch gebundener Modifizierung. Daher wurden nur solche HPLC-Säulen getestet, die laut ihrer Hersteller über eine erweiterte pH-Stabilität im sauren Bereich verfügten [Kapitel 3.1]. Die Erprobung mehrerer Säulen bzw. die daraus resultierenden Änderungen der chromatographischen Selektivität ermöglichten die Auftrennung von Farbstoffen, die nicht zur Familie der klassischen Anthocyane gehören [Kapitel 3.2]. Die Strukturaufklärung mancher nicht-trivialer Farbstoffe erforderte ihre semipräparative Isolierung. Dabei erwiesen sich ältere Methoden, die für eine selektive chemische Abtrennung der Tannine beschrieben waren, für diesen Zweck als ungeeignet [Kapitel 3.3]. Einige der isolierten Anthocyane konnten mit Hilfe von MS und NMR charakterisiert werden, andere konnten durch chemische Reaktionen hergestellt, und danach chromatographisch identifiziert werden. Untersuchungen bezüglich der Lagerfähigkeit der Weinproben wurden auch durchgeführt [Kapitel 3.4] und anschließend wurde ein großer und repräsentativer Probensatz analysiert.

3.1 Optimierung der Trennung der traubeneigenen monomeren Anthocyane

Obwohl eine Vielzahl von publizierten Methoden zur Verfügung stand, konnte keine Methode gefunden werden, die in jeder Hinsicht als geeignet anzusehen war. Als generelles Problem zeigte sich die Anwendung ganz normaler C₁₈-Phasen weit unter pH=2, was bei herkömmlichen chemisch gebundenen stationären Phasen die Hydrolyse der C₁₈-Ketten auf Silikabasis zur Folge hat. Der Mangel an Daten über die Lebensdauer der Säulen erwies sich als wesentlicher Nachteil bei der Einschätzung einer Methode für die Routine. Auf einen niedrigen pH-Wert kann nicht verzichtet werden, weil die Bildung von mehreren Gleichgewichtsformen gemäß der Anthocyan-Equilibria [Abb. 2.4] die Peaks verbreitert. Für einen niedrigen pH-Wert spricht auch die Möglichkeit einer für die roten Farbstoffe selektiven Detektion bei etwa 520 nm, während die Carbinol- und Chalcon-Formen nur im UV-Bereich detektiert werden könnten, wo mit vielen Interferenzen von anderen UV-absorbierenden Weinbestandteilen zu rechnen ist.

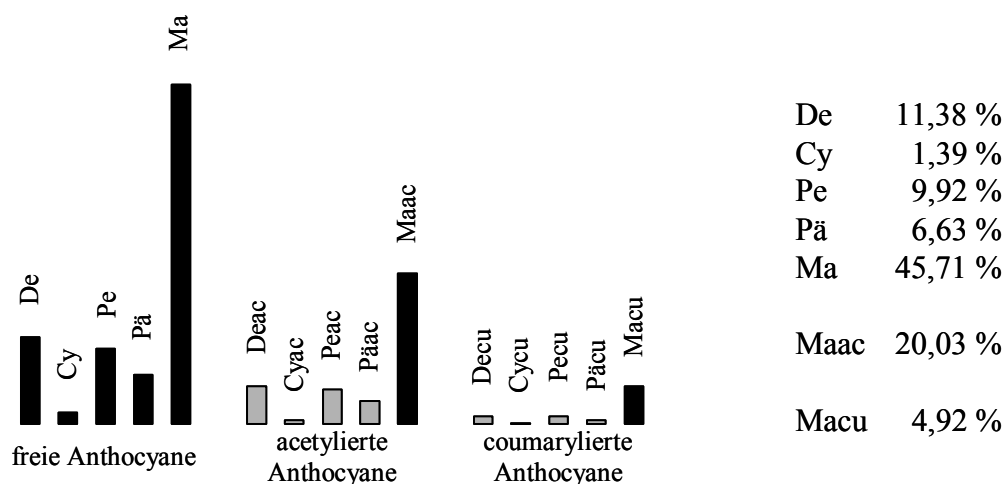
Für die meisten Anwendungen wird etwa 10% Ameisensäure in den Eluenten für einen pH-Wert von 1,6 eingesetzt. Die Verwendung von organischen Säuren ist wegen ihrer komplexbildenden Eigenschaft mit größerer Korrosionsgefahr verbunden. Der im Prozentbereich liegende Anteil an Ameisensäure im Eluent macht die Analysen auch teurer als wenn anorganische Säuren verwendet werden.

Ein generelles Problem war auch, dass keine rapide Methode mit gut aufgelösten Peakpaaren gefunden werden konnte. Methoden mit über 120 Minuten Analysenzeit waren auch zu finden, die für die Routineanalytik von erwartungsgemäß etwa 20 Komponenten unakzeptabel lange sind. Rapide Methoden zeigten dagegen oft Überlappungen, und oft fehlten die Angaben über Auflösungen von kritischen Peakpaaren überhaupt.

3.1.1 Chromatographische Bedingungen

Für die HPLC-Analyse der Anthocyane hat sich die Umkehrphasenchromatographie (RP-HPLC) mit C₁₈-stationärer Phase gut bewährt. Ein Vergleich zwischen verschiedenen polaren Modifizierern wurde von *Eder et al.* durchgeführt [39]. Für Acetonitril sprach die bessere Trennleistung und für Methanol die geringere Toxizität und Preis; Tetrahydrofuran war in jeder Hinsicht ungünstig. Im Gegensatz zu *Eder* wurde für die vorliegende Arbeit Acetonitril gewählt, da die möglichst gute Trennleistung in den Vordergrund gestellt wurde. Methanol ist auch toxisch und daher entsorgungspflichtig. Außerdem werden von Methanol immer größere Mengen gebraucht als von Acetonitril, was den finanziellen Vorteil von Methanol wieder aufhebt. Bezüglich Toxizität wäre die Anwendung von Aceton die bessere Alternative, aber es ist bekannt, dass mit Aceton keine Trennung zwischen Päu und Macu erzielt werden kann [83, 130]. Für die Einstellung des pH-Wertes wurde der für diesen Bereich empfohlene Phosphatpuffer (KH₂PO₄/H₃PO₄) verwendet [76]. Er ist kostengünstiger und weniger korrosiv als Ameisensäure und liefert ebenbürtige Trennungen [39].

Alle anderen chromatographischen Parameter wurden neu optimiert. Für die Optimierung wurde ein kommerziell erhältlicher und als rebsortenrein deklarierter Cabernet Sauvignon Wein (1996, Nicolas Napoleon, Pay d'Oc) verwendet. Der Anthocyanfingerpint dieser Sorte wurde von zahlreichen Autoren untersucht, der erwartete Fingerpint [38] ist Abb. 3.1 zu entnehmen. Nicht alle acetylierten und coumarylierten Anthocyane sind aufgezählt, aber ihre Verteilung sollte der von freien Anthocyanen ähnlich sein [130]. Der Wein wurde vor der Analyse nur mit einem Membranfilter von 0,45 µm Porengröße filtriert.

Abb. 3.1 Schematisches Chromatogramm eines Cabernet Sauvignon Weines nach *Eder* [38]

Den Ausgangspunkt der Optimierung bildete die von *Holbach* beschriebene HPLC-Methode [67], aber statt 10 % Ameisensäure wurde pH=2 mit Phosphorsäure eingestellt, damit eine kommerzielle RP-18-Säule verwendet werden kann. Die ausführliche Beschreibung dieser und aller anderen Trennungen, die lediglich eine Zwischenstufe in der Methodenentwicklung darstellten, sowie die Chemikalien und die Instrumente sind im Anhang A.1-6 zu finden. Das Chromatogramm ist in Abb. 3.2 dargestellt, und eine grobe Zuordnung der Peaks war bereits möglich. Unter diesen chromatographischen Bedingungen war die Trennung mehrerer Anthocyane unzureichend, Cy und De, Pä und Ma, Päac und Maac sowie Päcu und Macu koeluierten. Damit ist bestätigt, dass auf das stark saure Milieu nicht verzichtet werden kann.

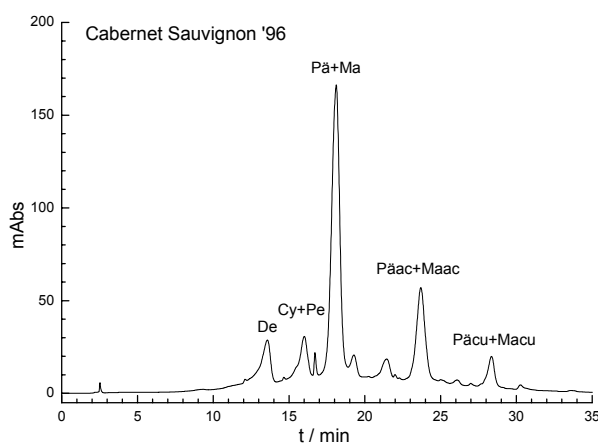


Abb. 3.2 Trennung der Anthocyane bei pH=2 mit der Hypersil ODS Säule

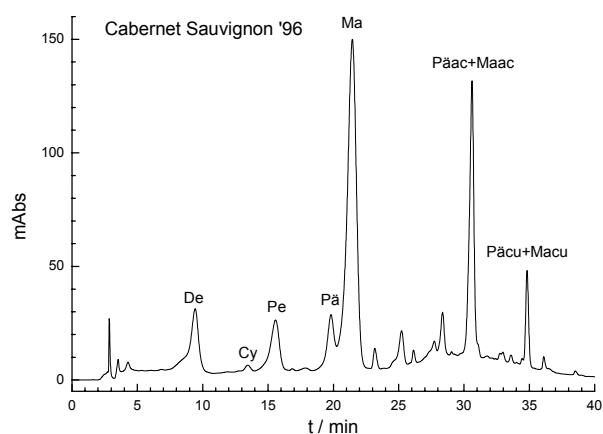


Abb. 3.3 Trennung der Anthocyane bei pH=1,7 mit der UltraSep ES RP18 Säule

Die Optimierung der chromatographischen Bedingungen wurde unter Verwendung einer modernen pH-stabilen Säule der Firma SepServ fortgesetzt [Anhang A.6], für die die Hersteller eine Verwendung bis pH=1,5 garantieren. Die Möglichkeit der pH-Erniedrigung

wurde zunächst nur bis pH=1,7 ausgeschöpft. Eine Verbesserung der Trennung zeigte sich hauptsächlich bei den freien Anthocyanen [Abb. 3.3].

Die Kontrolle der Temperatur ist essentiell für reproduzierbare Trennungen, besonders wenn die Analyten Gleichgewichtsreaktionen unterliegen. In der Monographie von *Somers* und *Vérette* wurde auch eine Thermostatisierung empfohlen [119]. Eine definitiv günstige Temperatur wurde aber nicht angegeben, auch die bisher publizierten Methoden arbeiteten bei diversen Temperaturen. Vom chromatographischen Gesichtspunkt hat eine Erhöhung der Temperatur den Vorteil, dass durch die niedrige Viskosität des Eluenten schärfere Peaks entstehen. Die Selektivität kann sich auch ändern, was manchmal vorteilhaft, manchmal aber nachteilig sein kann. Speziell bei der Anthocyananalytik könnte die Temperaturerhöhung durch die Verschiebung der Gleichgewichte zugunsten des farblosen Chalkons auch einen negativen Effekt haben. Die Summe aller diesen Effekte wurde noch nicht charakterisiert, deshalb wurde sie in der vorliegenden Arbeit auch ausführlich untersucht.

Bei erhöhter Temperatur eluierten die Peaks wesentlich schneller, weshalb der Gradient und die Fließgeschwindigkeit geringfügig geändert wurden [Anhang A.6], um eine Analysenzeit-bezogene Vergleichbarkeit mit dem bei Raumtemperatur aufgenommenen Chromatogramm aufrecht zu erhalten. Abb. 3.4 zeigt die Trennung bei 2 verschiedenen Temperaturen, die übrigen Parameter variierten zwischen diesen Läufen nicht. Insgesamt konnte die Erhöhung der Temperatur als positiv beurteilt werden. Alle freien Anthocyane waren basisliniengetrennt, und Pääc wurde vor dem Peak von Maac auch sichtbar. Das Peakpaar konnte allerdings auch bei 45°C nur zu ca. 50% getrennt werden.

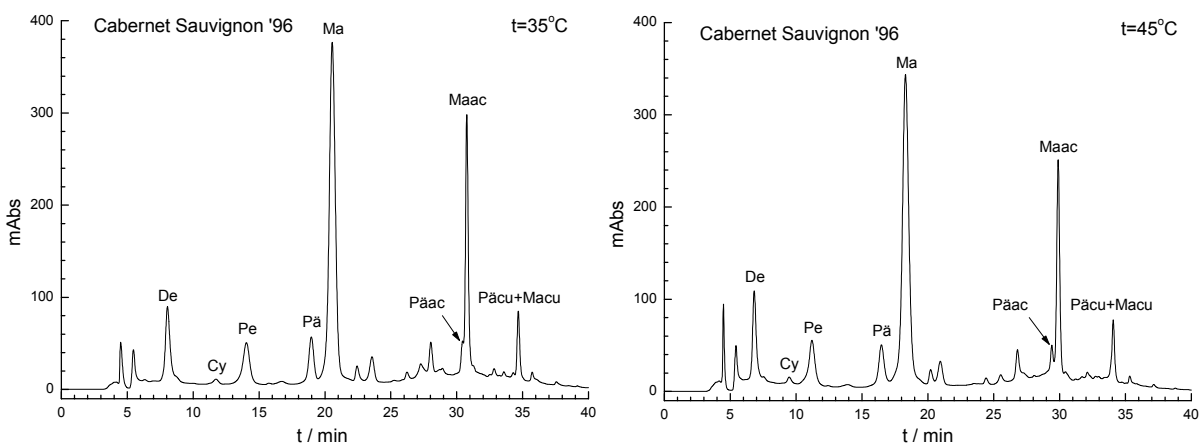


Abb. 3.4 Effekt der Temperaturerhöhung auf die Trennung

Es wurde offensichtlich, dass eine zufrieden stellende Trennung nur bei möglichst niedrigem pH und möglichst hoher Temperatur realisierbar ist. Als obere Grenze für die Temperatur bei

C₁₈-Phasen gilt 50°C, wofür hier auch entschieden wurde. Die mobile Phase wurde auf pH=1,6 eingestellt, um die vom Hersteller angegebene untere Grenze von pH=1,5 mit Sicherheit nicht zu unterschreiten. Dieser festgelegte pH-Wert wurde später mit einem Phosphatpuffer statt Phosphorsäure eingestellt, damit bessere Reproduzierbarkeit erreicht wird [Anhang A.7].

Letztlich wurden die Fließgeschwindigkeit und der Gradient optimiert. Dabei war eine Analysenzeit von 30 min mit 15-minütiger Spül- und Equilibrierungszeit festgesetzt, um eine für die Routine akzeptierbar kurze Methode zu entwickeln. Ein optimaler Kapazitätsbereich von etwa $0 < k' < 10$ wurde bei 1 ml/min Flussrate gefunden. Bei der Optimierung des Gradienten wurde berücksichtigt, dass der erste zu analysierende Peak nicht früher als etwa $k'=2$ und der letzte Peak noch mit sicherem zeitlichem Abstand vom Spülpeak eluieren sollte [118]. Die chromatographischen Bedingungen sind in Tabelle 3.1 angegeben.

Tab. 3.1 Optimierte Trennungsbedingungen mit der UltraSep ES RP18 MLDII Säule. Das Chromatogramm ist in Abb. 3.5 dargestellt. (* Herstellung der Eluenten ist in Anhang A.7 angegeben)

Säule : UltraSep ES RP18 MLD II.	Gradient : t / min	%B
Eluent : A : H ₃ PO ₄ /KH ₂ PO ₄ -Puffer*	0	19
B : 50/50 Acetonitril/Puffer*	linear ↗ 30	51
pH=1,6*	Sprung ↑ 30,01	100
Flussrate : 1 mL/min	35	100
Temperatur: 50°C	Sprung ↓ 35,01	19
Detektionswellenlänge: $\lambda=518$ nm	45	Stop

Abb. 3.5 zeigt das resultierte Chromatogramm. 12 Peaks konnten durch den Vergleich mit publizierten Daten [Abb. 3.1] zugeordnet werden [Tab. 3.3]. Zusätzliche Experimente zur Absicherung der Peakzuordnung sind im Kapitel 3.1.2 angegeben.

Die Peaks Nr.6, 7 und 8 waren durch andere, zunächst unidentifizierte Substanzen gestört, was durch einen Vergleich mit Abb. 3.4 leicht zu sehen ist. Unter jenen Bedingungen bei 45°C sind zwei Peaks zwischen 20 und 22 min, zwei andere Peaks zwischen 24 und 26 min sowie eine kleinere Schulter am Ende des Peaks bei 27 min zu beobachten, die bei der optimierten Methode jeweils koeluierten.

Aus diesem Grunde wurde auch eine zweite, als pH-stabil deklarierte Säule in die Untersuchungen einbezogen: Hypurity Elite C18 5 μm^* , 250×4,6 mm der Fa. Hypersil (*Nominalwert, die wahre Partikelgröße ist 4,1 μm). Chromatographische Parameter, die zuvor untersucht worden waren, z. B. Temperatur und pH, wurden nicht mehr variiert. Die Flussrate und

das Gradientenprofil mussten aufgrund der anderen Säulendimensionen bzw. Hydrophobizität dieser Säule angepasst werden [Tab. 3.2]

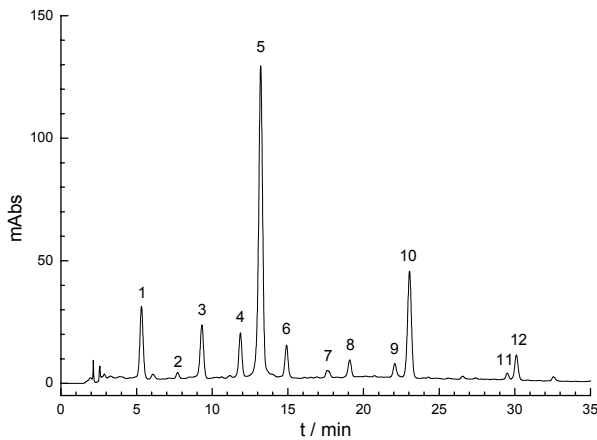


Abb. 3.5 Optimierte Trennung mit der UltraSep ES RP-18 MLDII. Säule

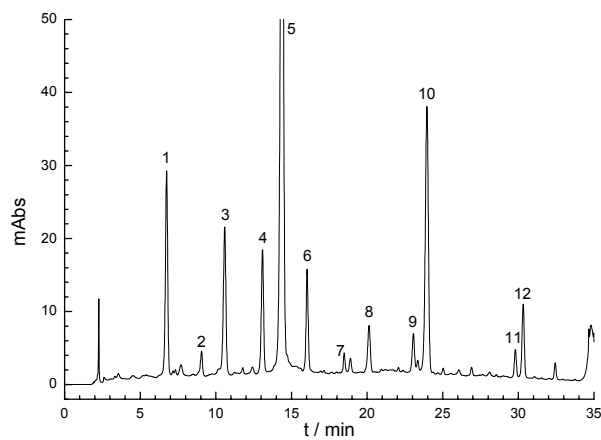


Abb. 3.6 Optimierte Trennung mit der Hypurity Elite C18 Säule (3-fach vergrößert)

Das Chromatogramm ist in Abb. 3.6 abgebildet. Auffallend ist die bessere Trennleistung der Hypurity-Säule (schmalere Peaks). Die Halbwertsbreite des Ma-Peaks (Nr.5) beträgt 16,9 s bei der UltraSep-Säule und 13,75 s bei der Hypersil-Säule. Daraus resultiert eine um 50% bessere Trennleistung, was wahrscheinlich auf die kleinere Partikelgröße zurückzuführen ist.

Tab. 3.2 Optimierte Trennungsbedingungen mit der Hypurity Elite C18 Säule. Das Chromatogramm ist in Abb. 3.6 dargestellt.

Säule : Hypurity Elite C18	Gradient : t / min	%B
Eluent : A : H ₃ PO ₄ /KH ₂ PO ₄ -Puffer	0	14
B : 50/50 Acetonitril/Puffer	linear ↗ 30	46
pH=1,6	Sprung ↑ 30,01	100
Flussrate : 1,5 mL/min	35	100
Temperatur: 50°C	Sprung ↓ 35,01	14
Detektionswellenlänge: λ=518 nm	45	Stop

Die zweite Methode zeigte auch eine bessere Trennung: Cyac und ein unidentifizierter Peak konnten getrennt werden, ebenso wurde auch ein kleiner Peak zwischen Päac und Maac sichtbar. In der Trennung von *Dallas* und *Laureano* eluierte Delphinidin-3-coumarylglukosid (Decu) zwischen Päac und Maac [22], während *Baldi et al.* an dieser Stelle über Malvidin-3-kaffeoylglukosid (Maca) berichteten [11]. Eine Entscheidung mittels HPLC-UV/Vis war nicht möglich, weil weder der Unterschied zwischen den Aglykonen De oder Ma noch zwischen den Acylgruppen -coumaryl oder -kaffeoyl deutlich genug ist. *Wege* versuchte die

Identität dieses Peaks durch semipräparative Trennung aufzuklären, aber die Ergebnisse konnten nicht eindeutig interpretiert werden [129].

Tab. 3.3 Zuordnung der Peaks und ihre Peakreinheit

Peak Nr.	Zuordnung	UltraSep ES	Hypersil Hypurity
1	De	✓	✓
2	Cy	✓	✓
3	Pe	✓	✓
4	Pä	✓	✓
5	Ma	✓	✓
6	Deac	Störung	Störung
7	Cyac	Störung	✓
8	Peac	Störung	Störung
9	Päac	✓	✓
10	Maac	✓	✓
11	Päcu	✓	✓
12	Macu	✓	✓

Obwohl die störungsfreie Trennung aller identifizierten Anthocyane mit der besseren Methode auch nicht gelungen war, wurde für den Einsatz dieser Säule für die routinemäßige Messung eines größeren Probensatzes entschieden. Während den Routinemessungen stellte es sich heraus, dass weitere Störungen vorhanden sind, die die quantitative Auswertung der Chromatogramme von bestimmten Sorten erschweren bzw. verhindern. Dies machte die Erprobung von weiteren stationären Phasen notwendig, was im Kapitel 3.2 diskutiert wird.

3.1.2 Identifizierung der bekannten Anthocyane

Die Identifizierung der chromatographischen Peaks basierte nicht nur auf die Ähnlichkeit mit dem in der Fachliteratur publizierten Fingerprint, sondern sie wurde auch durch zusätzliche Experimente bestätigt. Identifizierung mittels Vergleichssubstanzen wurde für Cy, Pä und Ma schon während der Optimierung durchgeführt [Abb. 3.7]. Besonders wichtig war es lediglich für Cy, dessen Peak im Vergleich zu

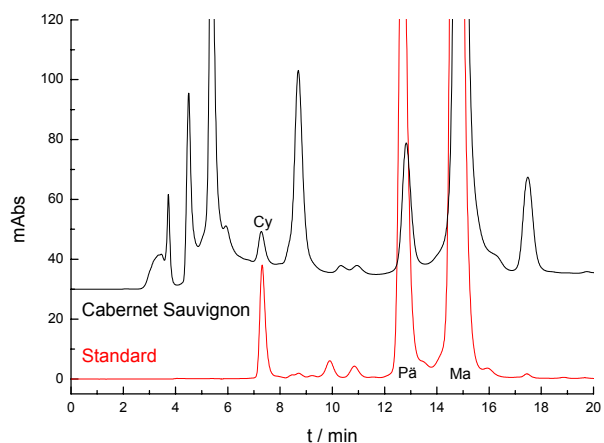


Abb. 3.7 Überlagerte Chromatogramme der Standardgemisch und Cabernet Sauvignon Wein

den anderen sehr klein ist. Die Identifizierung aller Anthocyane war mangels kommerziell erhältlicher Vergleichssubstanzen nicht möglich.

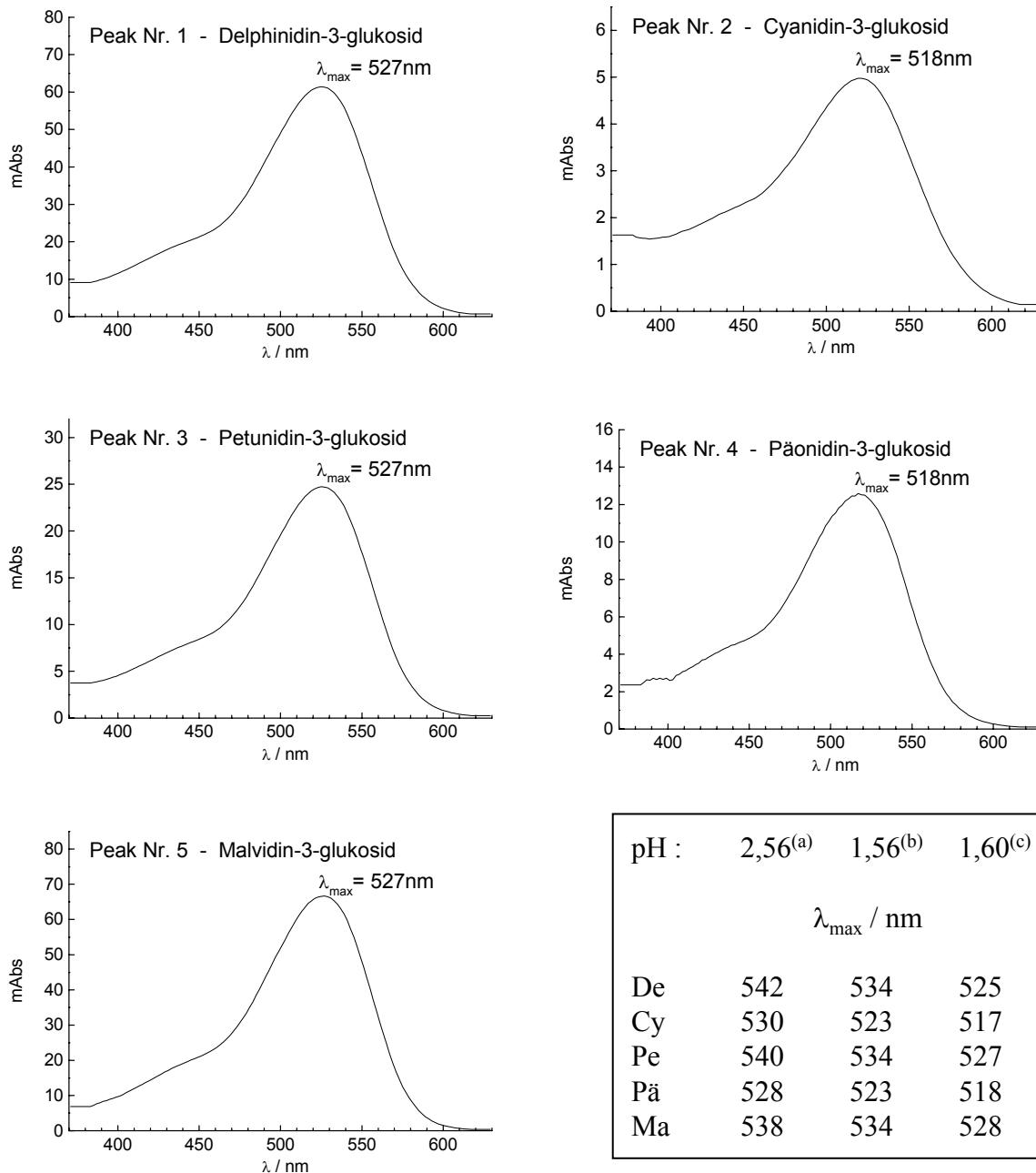


Abb. 3.8 Aufgenommene Spektren im Vergleich mit Literaturdaten. ^(a) 0,01% HCl in Methanol [135] ^(b) 0,1% HCl in Methanol [55] ^(c) 10% Ameisensäure in Acetonitril/Wasser-Laufmittelgemisch [22]

Online gekoppelte schnelle spektroskopische Methoden, wie UV/Vis-DAD oder HPLC-MS, standen für eine spektroskopische Identifizierung während der HPLC-Läufe nicht zur Verfügung. Die Aufnahme von UV/Vis-Spektren war dennoch möglich, indem die Flussrate bei jedem zu analysierenden Peak unterbrochen wurde. Von den in der Detektorzelle verweilenden Substanzen wurden auf konventioneller Weise die Spektren aufgenommen. Geräte-

technisch bedingt, konnten die Spektren auch nicht im gesamten UV/Vis-Bereich zwischen 200-900 nm aufgenommen werden, sondern nur entweder zwischen 200-370 nm mit Deuterium-Lampe oder zwischen 370-900 nm mit Wolfram-Lampe. Die chromatographische Detektion bei $\lambda=518$ nm erforderte den Einsatz der Wolfram-Lampe. Die Spektren der Substanzen Nr.1-5 wurden zwischen 370-630 nm registriert [Abb. 3.8].

Der Tabelle in Abb. 3.8 ist zu entnehmen, dass die Absorptionsmaxima sowohl vom pH-Wert (vgl. Spalte 1-2) als auch vom Lösungsmittel (vgl. Spalte 2-3) abhängen. Die Messbedingungen der vorliegenden Arbeit waren denen der Spalte 3 am ähnlichsten. Die Absorptionsmaxima stimmen gut mit den Literaturdaten überein. Somit war die Identifizierung der freien Anthocyane als sicher anzusehen.

Die Identifizierung der acetylierten Anthocyane [Abb. 3.5] erfolgte auf Grund der ähnlichen Zusammensetzung in gleicher Reihenfolge wie die freien Anthocyane [130]. Der Peak von Cyac (Nr.7) konnte erst mit der Hypurity Elite C18 Säule von seinem Störpeak getrennt werden [Abb. 3.6]. Die Entscheidung, welcher der beiden Peaks Cyac ist, erfolgte durch Berechnung der relativen Retentionen zwischen De und Pe bzw. Deac und Peac [Tab. 3.4]. Dabei wurde ausgenutzt, dass die Mitglieder einer homologen Reihe äquidistant eluieren, wenn lineare Gradientelution durchgeführt wird [1]. Anders als in klassischen Beispielen war in diesem Fall statt einer CH₂-Einheit die Acylgruppe die Differenz.

Tab. 3.4 Zuordnung des Peaks von Cyac innerhalb des aufgelösten Peakpaares zwischen 18 und 20 min im Chromatogramm von Abb. 3.6

Peak	t _R /min	Rel. Ret.	Peak	t _R /min	Rel. Ret.
De (1)	6,746	0	Deac (6)	16,030	0
Cy (2)	9,055	0,601	Cyac (7)	18,488	0,600
			Unbekannt	18,896	0,699
Pe (3)	10,586	1	Peac (8)	20,129	1

Von den coumarylierten Anthocyanen wurden nur Päu und Macu anhand publizierter Chromatogramme von *Holbach et al.* identifiziert [67]. Die Zuordnung weiterer Peaks über relative Retentionen ergab keine eindeutigen Ergebnisse.

3.1.3 Kalibration

Mit den zur Verfügung stehenden Standards wurden Kalibrationen für Cy, Pä und Ma durchgeführt. Die Konzentrationen der Substanzen im Wein variieren bei Cy zwischen 0-5 µg/ml, bei Pä zwischen 5-15 µg/ml, bei Ma zwischen 20-150 µg/ml [21, 84, 90], wobei

große Unterschiede in Abhängigkeit vom Alter, der Sorte und Herkunft zu finden sind. Bei ganz jungen Weinen kann auch ein Mehrfaches dieser Werte gemessen werden. Die Herstellung der Kalibrierlösungen ist Tab. 3.5 zu entnehmen.

Tab. 3.5 Herstellung der Kalibrierlösungen

Lösung	Einwaage / μg			Volumen	c / $\mu\text{g/mL}$		
	Cy	Pä	Ma		Cy	Pä	Ma
KAL 1	9	75	255	10 ml	0,90	7,50	25,50
KAL 2	11	79	267	5 ml	2,20	15,80	53,40
KAL 3	15	126	368	5 ml	3,00	25,20	73,60
KAL 4	19	155	496	5 ml	3,80	32,00	99,20
KAL 5	26	205	620	5 ml	5,20	41,00	124,00
	Volumen von KAL 1						
KAL 6	1 mL			5 ml	0,18	1,50	5,10
KAL 7	2,5 mL			5 ml	0,45	3,75	12,75

Die Lösungen KAL 1 bis KAL 5 wurden über direkte Einwaagen der Standards unter Verwendung einer Sartorius MC1 Mikrowaage hergestellt. Aus KAL 1 wurden zwei weitere Lösungen, KAL 6 und KAL 7 durch Verdünnen bereitet. Die Kalibrierlösungen wurden mit Doppelbestimmungen gemessen, die Rohdaten sind im Anhang A.8 angegeben.

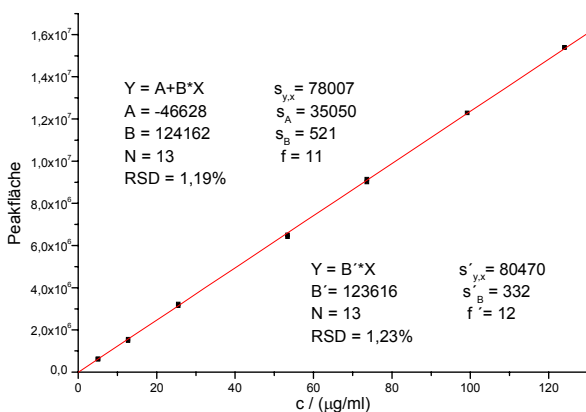


Abb. 3.9 Kalibration von Malvidin-3-glucosid

Die Kalibration war nur im Falle von Ma zufrieden stellend. Abb. 3.9 zeigt die Daten mit der angepassten Kalibriergerade nach $Y = A + B \cdot X$. Der Parameter A hat einen negativen Wert, der im Vergleich zu seiner Standardabweichung klein ist. Die Prüfgröße $|A|/s_A = 1,33 < t(0,95; 11) = 2,20$, das bedeutet, dass kein nachweisbarer Unterschied zwischen $A = -46628$ und $A = 0$ vor-

handen ist. Nach *Doerffel* liegt so die Vermutung nahe, dass ein Ausgleich nach $Y = B' \cdot X$ möglich ist [34]. Der F-Test $F = (s'_{y,x})^2 / (s_{y,x})^2 = 1,064 < 2,79 = F(0,95; 12; 11)$ lässt keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Ansätzen erkennen, daher ist die Ausgleichsgerade $Y = B' \cdot X$ gerechtfertigt [34].

Das Ergebnis stimmt mit den Erfahrungen überein, dass in der HPLC die mittels Standardlösungen erhaltene Kalibriergerade oft einen nicht von Null unterscheidbaren Ordinaten-

abschnitt aufweist. Der Grund dafür ist, dass die Selektivität der Methode sehr groß ist, und der Peak des Analyten in der Kalibrationslösung ist in der Regel ungestört [71].

Die Ermittlung einer Nachweisgrenze ist schwer und oft auch nicht sinnvoll, wenn die Signale unter realen Bedingungen gestört sind. In einer so komplexen Probe wie Wein sind die Peaks im Spurenbereich immer von Peaks anderer Spuren- oder Subspurenkomponenten gestört. Weil diese Matrix für jeden Wein unterschiedlich ist, kann auch keine Einheitsmatrix für die Ermittlung der Nachweisgrenze hergestellt werden. Andererseits ist die Nachweisgrenze für die vorliegende Aufgabenstellung, Weinklassifizierung nach Rebsorte durchzuführen, ohnehin nicht von Bedeutung.

Die Angabe eines zahlenmäßigen Konzentrationswertes ist ebenso wenig informativ, da der Anthocyangehalt der Weine von der Kellertechnik beeinflusst wird und sich auch zeitlich ändert. Für die Charakterisierung verschiedener Weine können vielmehr die relativen Anthocyangehalte verwendet werden. Wenn die Beziehung zwischen Konzentration und Peakfläche proportional ist, wie im vorliegenden Fall, können für diesen Zweck einfach die Peakflächen verwendet werden.

Die Kalibrationen für Cy und Pā waren weniger erfolgreich, sie sind nur im Anhang A.8 dargestellt. Die kommerziellen Vergleichssubstanzen waren nicht homogen genug, Einwaagen im μg -Bereich für eine Kalibration durchzuführen. Die Homogenisierung der Substanzen war nicht möglich, weil sie hygroskopisch und amorph waren, und nur sehr geringe Mengen (1 bzw. 5 mg) zur Verfügung standen. Andere Fehlerquellen können vernachlässigt werden: Die Waage arbeitete präzise und richtig, und die HPLC-Messungen waren reproduzierbar. Als Schlussfolgerung ergibt sich, dass es bei der Herstellung von Standardlösungen aus einer weitgehend inhomogenen Substanz besser ist, eine Stammlösung aus der Einwaage einer relativ großen Probenmenge entsprechend zu verdünnen.

3.1.4 Robustheitsprüfungen

Um die Anwendbarkeit einer Analysenmethode im Routinebetrieb zu beurteilen, muss man neben der Leistungsfähigkeit auch die Stabilität des Systems untersuchen. Bei zeitlich instabilen Messmethoden wie bei der Chromatographie ist diese so genannte Robustheit besonders wichtig. Die Prüfung auf Robustheit erfolgt am meisten mittels faktorieller Versuchspläne, wo die Einflussgrößen der verschiedenen Messparameter auf das Ergebnis untersucht werden [35, 81].

Wie schon bei der Optimierung zu bemerken war, spielen der pH-Wert, die Temperatur, die Flussrate und der Gradient eine wichtige Rolle. Die Untersuchung der ersten drei Parameter ist problemlos, da sie während der Analyse einen definierten Wert haben. Der Gradient ist dagegen selbst eine zeitliche Veränderung während jeder einzelnen Analyse, wofür eine untere und obere Stufe schwer erstellt werden kann. Stattdessen wurde die Wirkung der Schwankungen im Acetonitril-Anteil so berücksichtigt, dass die Menge des Acetonitrils im Eluent B variiert wurde, wo sie sonst einen definierten Wert hat. Die Stufen für die Parameter wurden relativ eng gewählt, damit nur die Wirkungen realistischer auftretender Fehler im Routinebetrieb geprüft werden: die Genauigkeit der pH-Messung ist im allgemeinen $\pm 0,1$, die relative Genauigkeit der Volumenmessung mittels Messzylinder beträgt 1-2%, die Spezifikation von HPLC-Säulenöfen garantiert eine absolute Genauigkeit von $\pm 2^\circ\text{C}$, und die HPLC-Pumpen sollten bezüglich der Flussrate eine relative Abweichung von $\pm 5\%$ nicht überschreiten [Tab. 3.6]. Für die letzten zwei Faktoren wurde ein zweifacher Bereich definiert, um eventuelle Betriebsstörungen auch mit einzurechnen. Der pH-Wert wurde bei der unteren Stufe nicht bis auf 1,5 gesenkt, sondern bei 1,6 gelassen, um die Säulen zu schützen. Die Überprüfung der angenommenen Linearität war damit nur bei den anderen drei Faktoren möglich.

Tab. 3.6 Stufen der untersuchten Faktoren

Faktoren und ihre Stufen	wahre Einheiten			kodiert		
	untere Stufe	Reguläre Bedingung	obere Stufe	untere Stufe	Reguläre Bedingung	obere Stufe
pH	1,6	1,6	1,7	-1	-1	+1
ACN in Eluent B (%)	48	50	52	-1	0	+1
Temperatur ($^\circ\text{C}$)	45	50	55	-1	0	+1
Flussrate (mL/min)						
bei UltraSep	0,9	1,0	1,1	-1	0	+1
bei Hypurity	1,4	1,5	1,6			

Für beide Säulen wurde der gleiche zweistufige fraktionelle Faktorplan mit 8 Versuchen und einem partiellen Zentralpunkt aufgestellt [Tab. 3.7]. Der Faktorplan hat eine Auflösung von $R=IV$; das bedeutet, dass jede Hauptwirkung unabhängig von den anderen Hauptwirkungen und von den kombinierten Wirkungen zweier Faktoren eindeutig identifiziert werden kann. Kombinierte Wirkungen zweier Faktoren untereinander können jedoch nicht eindeutig identifiziert werden. Der Zentralpunkt ermöglicht die Überprüfung der Linearität der Wirkungen, allerdings nicht die Herkunft einer Krümmung, falls sie vorhanden ist.

Tab. 3.7 Fraktioneller Versuchsplan (2^{4-1}) mit Auflösung R=IV und Krümmungstest

Einstellungen (kodiert)	pH	Acetonitril in Eluent B	Temperatur	Flussrate
Zentralpunkt	-1	0	0	0
Versuch 1	-1	-1	-1	-1
Versuch 2	-1	-1	+1	+1
Versuch 3	-1	+1	-1	+1
Versuch 4	-1	+1	+1	-1
Versuch 5	+1	-1	-1	+1
Versuch 6	+1	-1	+1	-1
Versuch 7	+1	+1	-1	-1
Versuch 8	+1	+1	+1	+1

Als abhängige Größen wurden die Retentionszeiten, die Auflösungen zwischen den kritischen Peakpaaren sowie die Peakflächen untersucht. Jeder Versuch wurde mit $n_j=3$, der Zentralpunkt mit $n_z=5$ Wiederholungen durchgeführt. Die Auswertung folgte der Methode von *Doerffel*, indem zuerst die Signifikanz der einzelnen Wirkungen durch den Vergleich ihrer Varianzen mit der Varianz des Versuchsfehlers mittels F-Test geprüft wurde [35].

Die Varianz der Wiederholungen (s_w^2) konnte als Versuchsfehler nicht benutzt werden, denn sie ist stets so gering ausgefallen, dass fast alle Wirkungen bei fast allen untersuchten Variablen als signifikant geschätzt wurden. Es ist normal, weil ein gut equilibriertes HPLC-System eine sehr hohe Wiederholpräzision aufweist. Die eigentliche Quelle des Versuchsfehlers ist aber hauptsächlich die Herstellung der Eluenten, wo Abweichungen des pH-Wertes und Acetonitril-Anteils trotz größter Sorgfalt nicht vermeidbar sind. Daher wurde der Versuchsfehler mit $n_z=5$ Messungen im Zentralpunkt mit jeweils neu hergestellten Eluenten und neu equilibriertem System zusätzlich bestimmt. Erst die hier beobachteten Varianzen schließen alle Fehlermöglichkeiten mit ein und repräsentieren dadurch die wahre Reproduzierbarkeit der Methode (s_R^2).

Da die Wiederholungen praktisch keine Streuung zeigten, wurden bei jedem Versuch gleich die Mittelwerte ausgewertet. Sie und die berechneten Varianzen sind im Anhang A.9-10 zu finden. Der Prüfwert im F-Test betrug $F(0,95; 1; 4)=7,71$ für alle untersuchten Variablen. Die *F*-Werte der signifikanten Wirkungen bezüglich Retentionszeit sind Tab. 3.8 zu entnehmen.

Die Stabilität der Retentionszeiten hat bei der Erkennung der Peaks durch automatische Auswertesoftware eine Bedeutung. Die beiden Säulen lieferten ein ähnliches Ergebnis: die Temperatur hat einen deutlicheren Einfluss auf die Retentionszeiten als die Flussrate selbst.

Ihre Signifikanz nimmt mit steigender Retention ab, und die später eluierenden Peaks werden vom Acetonitril-Anteil am stärksten beeinflusst. Für beide Säulen hatte die Änderung des pH-Wertes in diesem engen Bereich keine signifikante Wirkung auf die Retentionszeiten, ebenso konnten keine kombinierten Wirkungen und auch keine Krümmung nachgewiesen werden. Die Richtung der Wirkungen ist plausibel: Sowohl die Erhöhung der Temperatur, als auch die Erhöhung der Flussrate und des Acetonitril-Anteils verkürzen die Retentionszeiten, daher sind alle Koeffizienten in Tab 3.9 negativ.

Tab. 3.8 F-Werte der signifikanten Wirkungen auf die Retentionszeiten bei den UltraSep und Hypurity Säulen

Wirkung	F-Werte der signifikanten Wirkungen (UltraSep)									
	De	Cy	Pe	Pä	Ma	Päac	Maac	Päcu	Macu	
ACN	30,50	28,72	27,73	30,74	31,84	50,07	52,14	67,58	69,21	
Temperatur	196,53	151,35	108,90	87,04	67,82	48,48	41,23	42,07	37,45	
Fluss	57,28	71,55	62,51	66,02	56,57	38,21	35,05	27,19	25,73	

Wirkung	F-Werte der signifikanten Wirkungen (Hypurity)									
	De	Cy	Pe	Pä	Ma	Cyac	Päac	Maac	Päcu	Macu
ACN	(0,370)	(0,00)	(0,27)	(1,58)	(2,76)	7,97	16,78	19,14	33,93	36,45
Temperatur	67,57	57,72	46,86	41,81	34,44	27,43	30,23	26,08	30,61	27,99
Fluss	17,74	17,94	15,66	16,03	14,26	13,62	10,08	9,54	8,07	8,05

Tab. 3.9 Größe der Wirkungen auf die Retentionszeiten bei den UltraSep und Hypurity Säulen

Wirkung	Einflussgrößen (UltraSep)									
	De	Cy	Pe	Pä	Ma	Päac	Maac	Päcu	Macu	Einheit
ACN	-0,164	-0,200	-0,234	-0,274	-0,307	-0,509	-0,535	-0,697	-0,717	min / %
Temp.	-0,167	-0,184	-0,185	-0,185	-0,179	-0,200	-0,190	-0,220	-0,211	min / °C
Fluss	-4,496	-6,312	-7,020	-8,042	-8,193	-8,888	-8,772	-8,838	-8,742	min ² / mL

Wirkung	Einflussgrößen (Hypurity)										
	De	Cy	Pe	Pä	Ma	Cyac	Päac	Maac	Päcu	Macu	Einheit
ACN	(0,026)	(-0,002)	(-0,029)	(-0,076)	(-0,106)	-0,198	-0,321	-0,347	-0,503	-0,521	min / %
Temp.	-0,142	-0,153	-0,153	-0,155	-0,149	-0,147	-0,172	-0,162	-0,191	-0,183	min / °C
Fluss	-3,636	-4,261	-4,433	-4,810	-4,800	-5,166	-4,969	-4,894	-4,907	-4,898	min ² / mL

Aus Tab. 3.9 wird offensichtlich, dass schon die kleinsten Abweichungen von den normalen Analysenbedingungen merkliche Verschiebungen der chromatographischen Peaks verursachen, die die Peakidentifizierung anhand der Retentionszeiten und damit auch eine automatische Auswertung erschweren. Im späteren Routinebetrieb wurde dieses Fazit bestätigt, nach jedem Eluentenwechsel mussten die Retentionszeiten für die Auswerte-

software neu angegeben werden. Danach blieben allerdings die Retentionszeiten, infolge der guten Wiederholpräzision, stabil.

Für die quantitative Auswertung ist es sehr wichtig, dass die Auflösungen der kritischen Peakpaaren erhalten bleiben. Tab. 3.10 zeigt die F-Werte der als signifikant erwiesenen Wirkungen auf die Auflösungen. Eine Krümmung konnte hier auch nicht nachgewiesen werden. Kombinierte Wirkungen traten aber schon in Erscheinung, deren eindeutige Zuordnung theoretisch nicht möglich ist. Es ist aber sehr wahrscheinlich, dass zum Beispiel die als pH×Temperatur-Effekt angegebenen Effekte auf die Pääc/Maac-Auflösung eher aus der Kombination der als Haupteffekt hochsignifikanten pH und Temperatur stammen als aus einer Kombination von Acetonitril-Anteil und Fluss.

Tab. 3.10 F-Werte der signifikanten Wirkungen auf die Auflösungen der kritischen Peakpaare

Wirkung		F-Werte der signifikanten Wirkungen			
		UltraSep		Hypurity	
		Pääc/Maac	Päcu/Macu	Pääc/Maac	Päcu/Macu
Haupt- wirkungen	pH	397,58	415,02	260,02	(0,00)
	ACN	23,99	88,98	23,77	58,64
	Temperatur	375,09	525,11	708,89	144,38
	Fluss	(3,33)	34,83	(4,52)	13,49
Kombinierte Wirkungen	pH × Temp.	74,25	(0,20)	9,77	(5,90)
	ACN × Temp.	(0,05)	(3,81)	(4,52)	14,42

Das Pääc/Maac Peakpaar verhält sich bei beiden Säulen ähnlich: Der Fluss ist im Gegensatz zu den Retentionszeiten nicht mehr signifikant, weil eine ähnliche Verschiebung beider Peaks keine signifikante Änderung der Auflösung verursacht. Signifikant ist aber der pH-Wert, dessen Wirkung durch die Beeinflussung der Peakschärfen erklärbar ist. Ähnlicherweise wirkt die andere wichtige Wirkung, die Temperatur auch. Die verhältnismäßig geringe Wirkung des Acetonitril-Anteils ist für beide Säulen gleich ausgefallen.

Die Auflösung zwischen Päcu und Macu kann nicht mehr so einheitlich interpretiert werden. Der wichtigste Unterschied ist bei dem pH zu notieren, dessen Wirkung bei der UltraSep-Säule hochsignifikant, bei der Hypurity-Säule absolut unsignifikant ist. Dieses letztere Phänomen ist zwar schwer zu erklären, ist aber auch dadurch erhärtet, dass die Temperatur nur mit dem Acetonitril-Anteil eine signifikante kombinierte Wirkung zeigt, nicht aber mit dem pH. Mit steigender Hydrophobizität scheint der ionische Charakter der Anthocyane von der Hypurity-Säule nicht mehr wahrgenommen zu werden. Die Einflussgrößen der Wirkungen sind in Tab 3.11 angegeben.

Tab. 3.11 Koeffizienten der signifikanten Wirkungen auf die Auflösungen.

Wirkung		Einflussgrößen				Einheit
		UltraSep		Hypurity		
		Päac/Maac	Päcu/Macu	Päac/Maac	Päcu/Macu	
Haupt- wirkungen	pH	-22,207	-4,023	2,940		-
	ACN	0,026	-0,048	-0,024	0,304	1 / %
	Temperatur	-0,556	0,046	0,259	0,430	1 / °C
	Fluss		0,597		-0,738	min / mL
Kombinierte Wirkungen	pH × Temp.	0,361		-0,125		1 / °C
	ACN × Temp.				-0,008	1 / (°C·%)
Absolutglied		35,624	7,680	-3,774	-14,517	-

Wo kombinierte Wirkungen auftreten, müssen sie bei der Beurteilung der betroffenen Einzelwirkungen berücksichtigt werden. Eine Erhöhung des pH-Wertes verbessert die Auflösung zwischen Päac/Maac bei der Hypurity Säule natürlich nicht, was die Hauptwirkung vortäuschen mag, sondern verschlechtert sie zusammen mit der kombinierten Wirkung pH×Temperatur (bei ca. 50°C). Für die einfachere Betrachtung wurden die kompletten Modelle samt Absolutglied angegeben, mit denen für jedes Peakpaar gleich die Auflösung vorhergesagt werden kann.

Die Gefahr der Unterschreitung einer kritischen Auflösung von 1,5 ist höchstens bei Päcu/Macu mittels der UltraSep-Säule vorstellbar, wenn der pH über etwa 1,67 steigt, oder die Temperatur unter 45°C sinkt, was allerdings von einem qualifizierten HPLC-System nicht zu erwarten ist. Das in der vorliegenden Arbeit benutzte Präzisions-pH-Meter hat eine Genauigkeit von ±0,02 pH-Einheit, und dementsprechend gab es auch keine Probleme mit den Auflösungen. Die Wirkungen von Acetonitril-Anteil und Fluss gefährden die Auflösungen nicht ernsthaft.

Zuletzt wurden die Wirkungen der ausgewählten Faktoren auf die Peakflächen untersucht. Es war aus drei Gründen notwendig: Erstens beeinflussen pH und Temperatur durch die Anthocyan-Equilibria die Menge der detektierbaren Flavylum-Formen und dadurch die Peakflächen. Zweitens können die Peakflächen auch durch eventuelle Abtrennung von nicht-identifizierten Spurenpeaks Veränderungen erleiden. Drittens ist die Modellierung der Peakflächen unumgänglich für die Beurteilung der Stabilität des Anthocyanfingerprints. Die proportionalen Peakflächen als (abgeleitete, Mischungs-) sekundäre Variablen („*composite response*“) dürfen nämlich nicht direkt untersucht werden, wie *Massart et al.* darauf hingewiesen haben [81]. Wenn zum Beispiel der Peak des Malvidin-glukosids, das in einem

Cabernet Sauvignon etwa 50% aller Anthocyane ausmacht, eine signifikante Änderung zeige, würde sich nicht nur die proportionale Peakfläche dieses Peaks, sondern auch alle anderen proportionalen Peakflächen verändern und somit auch der ganze Fingerprint. Dieser Effekt ist aber nicht allgemeingültig, weil er in einem anderen Wein, zum Beispiel in einem Trollinger, wo Malvidin-glukosid geringere Menge hat, auch ganz fehlen kann.

Um vom untersuchten Cabernet Sauvignon Wein unabhängige Aussagen zu erhalten, wurden die prozentualen Veränderungen der absoluten Peakflächen ausgewertet, indem die Peakflächen immer durch die entsprechenden Peakflächen aus der Standardmessung dividiert wurden [Anhang A.9-10]. Die F-Werte der signifikanten Wirkungen sind in Tab 3.12 angegeben.

Tab. 3.12 F-Werte der signifikanten Wirkungen auf die Peakflächen bei den UltraSep und Hypurity Säulen

Wirkung	F-Werte der signifikanten Wirkungen (UltraSep)									
	De	Cy	Pe	Pä	Ma	Päac	Maac	Päcu	Macu	
pH	11,40	(3,28)	27,73	18,90	(1,13)	(0,63)	(3,09)	41,25	15,78	
ACN	10,89	(1,18)	9,99	(4,36)	8,49	(0,71)	12,62	57,67	8,70	
Temperatur	8,78	(1,23)	10,40	9,82	(5,84)	(3,23)	32,64	(0,21)	(5,90)	
Fluss	319,62	7,88	510,81	739,05	825,11	490,18	511,18	1696,17	165,61	
pH × Fluss	(0,00)	(0,41)	(0,60)	8,30	(1,64)	(0,05)	(0,46)	(0,69)	(1,19)	
ACN × Fluss	(2,17)	(0,98)	26,75	(5,45)	(0,98)	(0,31)	(0,04)	33,63	(2,64)	
Temp. × Fluss	(4,79)	(0,08)	8,96	(4,40)	9,46	(0,95)	(0,01)	65,76	(2,71)	

Wirkung	F-Werte der signifikanten Wirkungen (Hypurity)									
	De	Cy	Pe	Pä	Ma	Cyac	Päac	Maac	Päcu	Macu
pH	27,05	40,38	18,00	83,02	18,19	(2,46)	69,92	67,44	33,14	(7,17)
Temperatur	10,21	(1,48)	(5,16)	8,24	(2,69)	(0,16)	191,72	19,39	26,81	(1,47)
Fluss	30,55	56,90	38,85	306,20	73,42	41,19	203,13	185,73	73,64	28,82

In allen Fällen konnte keine Krümmung signifikant nachgewiesen werden, was im späteren die Anwendung linearer Modelle im untersuchten Bereich erlaubt. Für alle Peaks beider Säulen scheint die Flussrate eine entscheidende Rolle zu spielen. Das hat jedoch in erster Linie nur mit der UV/Vis-Detektion zu tun. Bei größerer Flussrate durchlaufen die Peaks die Detektorzelle schneller, und die registrierten Peaks im Chromatogramm werden schmaler, und damit die Peakflächen kleiner. Das ist charakteristisch für alle konzentrationsempfindlichen Detektoren. Dieser Effekt kann leicht ausgeschaltet werden, indem die Peakflächen mit den jeweiligen Flussraten multipliziert werden. Die Flussrate-korrigierten Peakflächen und die dem F-Test zugrunde liegenden Varianzen sind in Anhang A.9-10, die F-Werte in Tab. 3.13 angegeben.

Tab. 3.13 F-Werte der signifikanten Wirkungen auf die Peakflächen nach Korrektur durch die Flussrate

Wirkung	F-Werte der signifikanten Wirkungen (UltraSep)									
	De	Cy	Pe	Pä	Ma	Päac	Maac	Päcu	Macu	
pH	11,36	(3,05)	26,92	16,48	(0,88)	(0,67)	(2,86)	42,33	14,92	
ACN	11,88	(1,41)	13,53	(5,39)	9,08	(0,81)	12,77	66,82	9,69	
Temperatur	10,12	(1,17)	12,42	8,55	(4,45)	(2,89)	32,74	(0,12)	(6,73)	
Fluß	(0,00)	(0,00)	(2,07)	(3,20)	(5,29)	8,62	(1,59)	32,66	(0,24)	
ACN × Fluss	(3,25)	(1,21)		(6,46)	(1,65)	(0,41)	(0,32)	43,01	(3,68)	
pH × Temp.			30,12							
pH × ACN	(6,18)	(0,03)	11,00	(3,19)	8,03	(0,63)	(0,43)	65,01	(3,57)	

Wirkung	F-Werte der signifikanten Wirkungen (Hypurity)									
	De	Cy	Pe	Pä	Ma	Cyac	Päac	Maac	Päcu	Macu
pH	26,77	38,96	17,97	82,47	18,16	(2,33)	69,78	66,54	31,89	(7,06)
Temperatur	10,29	(1,70)	(5,19)	8,47	(2,61)	(0,18)	190,76	19,36	26,44	(1,45)

Die Ergebnisse zeigen, dass die Trennung mit der UltraSep Säule weniger robust ist. Bei allen Peaks, wo die Flussrate nach der Korrektur immer noch eine signifikante Wirkung hat, und/oder wo der Acetonitril-Anteil eine signifikante Wirkung hat, müssen Störungen vorhanden sein, die allein anhand der Anthocyan-Equilibria nicht erklärbar sind. Es muss sich um chromatographische Störungen handeln, die von kleineren, unidentifizierten Peaks stammen. Die kombinierte Wirkung pH×Fluss ist hier nicht mehr signifikant, die anderen zwei kombinierten Wirkungen kommen aber immer noch vor, wobei ihre Interpretation auch nicht mehr eindeutig ist: ACN×Fluss (Päcu) oder eher schon pH×Temperatur (Pe)?

Die Ergebnisse der Hypurity Säule sind viel leichter zu erklären und weisen auf eine robustere Trennung hin. Chromatographische Störungen, die nur auf die Flussrate und Acetonitril-Anteil zurückzuführen sind, sind nicht vorhanden. Die Wirkung des pH-Wertes setzt sich aus einem direkten und einem chromatographischen Effekt zusammen, und beide sind mit den Anthocyan-Equilibria zu erklären. Bei niedrigerem pH befinden sich mehr Moleküle in der Flavylum-Form, was die Peakfläche vergrößert. Dieser direkte Effekt ist durch die negativen Koeffizienten der Einflussgrößen eindeutig bewiesen [Abb. 3.10]. Gleichzeitig werden die Peaks auch schärfer, was die Abtrennung von Störpeaks beeinflussen kann. Dieser chromatographische Effekt machte sich schon bei dem pH-Einfluss auf die Auflösungen bemerkbar [Tab. 3.10-11].

Die Wirkung der Temperatur ist noch komplexer. Die Temperatur beeinflusst sowohl die Retention [Tab. 3.8-9] und dadurch die chromatographische Selektivität als auch die Peak-schärfe [Tab. 3.10-11] stark, was wiederum bei der Abtrennung von Störpeaks von Bedeutung

sein kann. Die Wirkung der Temperatur durch die Anthocyan-Equilibria kann eher als marginal eingeschätzt werden.

Bei der Untersuchung der Einflussgrößen wurden die ursprünglichen Peakflächen ohne Flussrate-Korrektur verwendet, damit der Einfluss der Flussrate auch mitmodelliert wird. Die Koeffizienten sind in Abb. 3.10 in Form einer Microsoft Excel Maske angegeben, damit die Vorgehensweise bei der Modellierung nachvollziehbarer wird.

Peakflächen für beliebige Proben:												
Wert	Wirkung	Koeffizienten für die Hypurity-Säule										
		De-gl	Cy-gl	Pe-gl	Pä-gl	Ma-gl	Cy-acgl	Pä-acgl	Ma-acgl	Pä-cugl	Ma-cugl	
1,60	pH	-129,09	-128,81	-112,39	-83,25	-77,75	-77,63	-85,54	-119,02			
45	T / °C	-0,62			-0,22		1,25	-0,39	-0,83			
1,40	F / (ml/min)	-53,59	-59,01	-58,99	-67,33	-65,41	-78,54	-64,41	-59,96	-68,91	-64,50	
Veränderung (%):		106,20	103,55	103,33	106,79	105,53	108,81	100,02	106,87	108,92	101,51	
Standardmessung:		309417	37079	254344	180151	1570469	25504	60680	516912	38342	107830	
Vorhergesagt:		De-gl	Cy-gl	Pe-gl	Pä-gl	Ma-gl	Cy-acgl	Pä-acgl	Ma-acgl	Pä-cugl	Ma-cugl	Summe:
untere Konfidenz:		314136	36663	252123	187723	1582138	27157	58950	541398	39992	107818	
Peakfläche:		328600	38395	262819	192378	1657318	27750	60691	552436	41763	109456	3271607
obere Konfidenz:		335210	38701	269032	192591	1666346	29349	60876	557374	42155	119481	
untere Konfidenz:		9,70	1,13	7,78	5,78	48,81	0,84	1,82	16,67	1,23	3,33	
Fingerprint (%):		10,04	1,17	8,03	5,88	50,66	0,85	1,86	16,89	1,28	3,35	
obere Konfidenz:		10,41	1,20	8,35	6,00	51,77	0,91	1,89	17,35	1,31	3,71	
Experimentell:		De-gl	Cy-gl	Pe-gl	Pä-gl	Ma-gl	Cy-acgl	Pä-acgl	Ma-acgl	Pä-cugl	Ma-cugl	Summe:
Peakfläche:		324673	37682	260577	190157	1624242	28253	59913	549386	41074	113649	3229606
Std. Abw.:		8486	820	6809	1961	33909	883	776	6433	871	3665	36465
Fingerprint (%):		10,05	1,17	8,07	5,89	50,29	0,87	1,86	17,01	1,27	3,52	
Std. Abw.:		0,29	0,03	0,23	0,09	1,19	0,03	0,03	0,28	0,03	0,12	

Abb. 3.10 Modellierung der Wirkungen von pH, Temperatur und Flussrate auf die HPLC-Peakflächen der Anthocyane und indirekt auf den Anthocyanfingerprint bei der Hypurity Elite C18 Säule.

Im oberen Teil der Maske befinden sich die Koeffizienten der Wirkungen (Felder C5-L8), die von dem untersuchten oder von irgendeinem Wein nicht abhängig sind. Nur pH-Wert, Temperatur und Flussrate müssen angegeben werden (Felder A6-A8), und die Veränderungen der Peakflächen bezogen auf eine Standardmessung werden ausgerechnet (Felder C10-L10). In Abb. 3.10 wurden die Bedingungen von Versuch 1 angegeben, und infolge der geringeren Flussrate liegen die vorhergesagten Werte etwas über 100%. Im mittleren Teil können die unter Standardbedingungen tatsächlich gemessenen Peakflächen eines beliebigen Weines angegeben werden (Felder C13-L13) und die absoluten Peakflächen sowie die aus denen abgeleiteten proportionalen Peakflächen (Fingerprint) werden ausgerechnet (Felder C17-L17

und C21-L21). Der untere Teil dient zur Überprüfung des Modells, falls experimentell bestimmte Daten unter den simulierten Bedingungen auch vorliegen. Aus den angegebenen Peakflächen (Felder C25-L25) wird der experimentell bestimmte Fingerprint ausgerechnet (Felder C28-L28). Wenn auch die Streuungen der Peakflächen angegeben werden (Felder C26-L26), können die Streuungen der proportionalen Peakflächen gemäß der Fehlerfortpflanzung nach Gauß auch berechnet werden (Felder C29-L29). Aus diesen Streuungen werden auch die Konfidenzintervalle (mit $P=0,95$ und $f=4$) für jede absolute und proportionale Peakfläche berechnet. Sie sind wiederum im mittleren Teil zu finden (Felder C16-L16, C18-L18, C20-L20, C22-L22). Falls die vorhergesagten Werte in diese Intervalle fallen, gibt es keinen signifikanten Unterschied zwischen den vorhergesagten und experimentellen Werten, d. h. das Modell funktioniert gut.

Mit dem erstellten Modell wurden Schranken für die untersuchten Wirkungen ermittelt, innerhalb denen noch keine signifikante Änderung der absoluten bzw. der proportionalen Peakflächen auftritt [Tab. 3.14]. Eine quantitative Bestimmung der Anthocyane erfordert die höchste Genauigkeit und Stabilität der Messbedingungen. Die Übertragbarkeit der Methode zwischen verschiedenen Laboren, wo noch mit zusätzlichen Abweichungen zu rechnen ist, scheint problematisch zu sein. Hat man dagegen nur an den Anthocyanfingerprint Interesse, muss nur auf den pH-Wert der Eluenten besonders geachtet werden. Die ermittelten Grenzen sind zwar eng, können aber mit einem modernen Präzisions-pH-Meter eingehalten werden.

Tab. 3.14 Kritische Grenzen für reproduzierbare Ergebnisse mittels der Hypurity Elite C18 Säule

Zweck	nötige Variablen	erforderliche Genauigkeit der Parameter		
		pH	Temperatur (°C)	Fluss (mL/min)
quantitative Bestimmung	absolute Peakflächen	1,58 - 1,60	48 - 51	1,47 - 1,5
Fingerprint	proportionale Peakflächen	1,57 - 1,62	45 - 55	1,2 - 1,8

Die Stabilität des Anthocyanfingersprints gegenüber HPLC-gerätebedingten Fehlerquellen, wie Schwankungen in Acetonitril-Anteil, Temperatur und Flussrate, hat auch eine weitere Konsequenz für die quantitative Bestimmung der Anthocyane. Sie kann doch robust durchgeführt werden, wenn ein geeigneter interner Standard aus der Familie der Anthocyane zur Verfügung steht. Für Trauben- und Weinuntersuchungen könnte es das sechste triviale freie Anthocyan, das Pelargonidin-3-glukosid sein, das in Trauben nicht vorkommt und dessen Abtrennung ohne weiteres möglich ist [67].

Die Koeffizienten der Einflussgrößen bei der UltraSep-Säule sind im Anhang A.9 angegeben, eine Modellierung wurde aber nicht durchgeführt. Eine plausible Erklärung gibt es nur für die Wirkung der Flussrate, die bloß mit der Detektion zu tun hat. Interessanterweise sind zum Beispiel alle Koeffizienten der pH-Wirkung positiv, und das ist gerade das Gegenteil, was von den Anthocyan-Equilibria zu erwarten ist. Es kann sich höchstens darum handeln, dass die infolge des höheren pH-Wertes breiteren Peaks Spurenpeaks überdeckt haben, und dadurch größer geworden sind. Mit solchen Effekten lohnt es sich aber keine Modellierung, da sie von Wein zu Wein anders sein können.

Alle Ergebnisse zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Analyse der Anthocyane mittels der Methode mit der Hypurity Elite C18 Säule in jeder Hinsicht robuster ist, als mit der UltraSep Säule. Es hat mit der besseren Trennqualität zu tun [Kap. 3.1.1], wodurch die Trennung mehr Abweichungen von den idealen Bedingungen „verkräften“ kann. Hier konnten die meisten Wirkungen auch sinnvoll interpretiert werden. Die Retentionszeiten reagieren sehr empfindlich auf Änderungen der Analysenbedingungen, die kritischen Auflösungen sind dagegen sehr robust. Die Ermittlung des Anthocyanfingerprints erfordert die Einhaltung des definierten pH-Wertes von 1,6, das gleiche gilt für eine quantitative Bestimmung der Anthocyane mittels interner Standardisierung.

3.2 Optimierung der Trennung aller monomeren Anthocyane im Wein

Während der Routineanalytik mittels der Hypurity Elite C18 Säule ist es offensichtlich geworden, dass in den meisten Weinproben sich weitere Störpeaks befinden, die im benutzten Cabernet Sauvignon Wein während der Methodenentwicklung nicht vorhanden waren, bzw. nicht erkannt wurden. Die Präsenz dieser Substanzen in Spätburgunder Weinen trug zu ihrer Entdeckung wesentlich bei [Abb. 3.11], weil die Sorte Spätburgunder aufgrund der fehlenden acylierten Anthocyane keine Peaks nach Ma (Peak Nr.5) besitzen dürfte. Es soll betont werden, dass die Identität dieser Addukte (Peak A1-A3) zunächst nicht bekannt war und diese erst nach aufwendigen Untersuchungen aufgeklärt werden konnten [Kapitel 3.3]. Charakteristisch für alle diese Substanzen ist, dass sie nicht mehr zu den primären, pflanzeigenen Anthocyanen gehören, sondern deren Derivate sind.

Im Fortgang der Untersuchungen wurde daher als Ziel gestellt, folgende vier Probleme bei der HPLC-Analyse von Rotweinen zu lösen: Abtrennung von Deac (Peak Nr.6) und Vitisin A (Problem-1). Die Überlagerung der Chromatogramme eines Portugieser und Spätburgunder Weines zeigt, dass das Malvidin-3-glukosid-(4-Vinylbrenzcatechin)-Addukt (Peak A1) exakt

mit dem Peak von Päu (Peak Nr.11) überlappt und die Präsenz von Päu in Spätburgunder Weinen vortäuscht, bzw. die Peakflächen von Päu verfälscht (Problem-2).

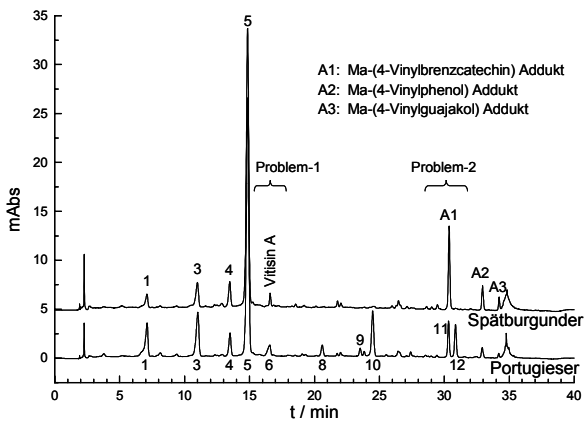


Abb. 3.11 Chromatographische Störungen durch stabile Anthocyan-Derivate (Peak Nr. von Tab. 3.3).

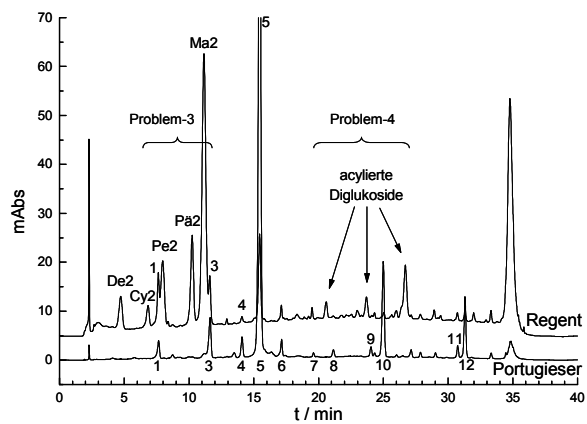


Abb. 3.12 Chromatographische Störungen durch Anthocyanidin-diglukoside.

Die Analytik der Sorte Regent lieferte weitere Probleme [Abb. 3.12]. Die Anthocyanidin-diglukoside stören die Peaks von De und Pe (Nr.1 und 3). Eine bessere Trennung in diesem Bereich ist daher erstrebenswert (Problem-3), wobei die Störungen der acylierten Anthocyane durch die acylierten Anthocyanidin-diglukoside auf das Minimum reduziert werden sollten (Problem-4).

Wegen kommerziell nicht erhältlicher Standardsubstanzen wurden Weine mit geeigneter Anthocyanzusammensetzung und ihre Mischungen als „Standardproben“ herangezogen [Anhang A.5]. Probe-5 mit allen oben erwähnten Anthocyanen wurde vorwiegend in den Tests benutzt, um alle definierte Problembereiche jeweils in demselben Lauf zu beobachten. Im Falle von Peaküberlappungen konnten die beteiligten Substanzen durch Messungen von Probe-1 bis Probe-3 identifiziert werden.

3.2.1 Auswahl einer geeigneten Säule

Die Verbesserung der Auflösung zwischen schlecht aufgelösten Peaks kann durch Erhöhung der Retention, der Selektivität und der Trennleistung erzielt werden. Die Retention kann nicht unendlich erhöht werden, weil ihr positiver Beitrag zur Auflösung immer weniger und vor allem die Analysenzeit immer größer wird. Am effektivsten ist die Änderung der Selektivität, was durch Änderung der stationären und mobilen Phase sowie der Temperatur möglich ist. Wie in Kapitel 3.1.1 beschrieben, sind eine hohe Temperatur und ein niedriger pH-Wert essentiell für erfolgreiche Trennungen, und Acetonitril sollte auch am geeignetsten sein.

Somit war die Änderung der Selektivität nur durch Änderung der stationären Phase möglich. Deshalb wurden neben den bereits getesteten C₁₈-Phasen eine C₁₂- und eine Phenyl-Phase einbezogen [Tab. 3.15]. Die Erhöhung der Trennleistung wurde durch die Anwendung einer feinkörnigeren stationären Phase, der Platinum C18 3 µm Säule, getestet. Außerdem versprach der Hersteller auch eine von den meisten C₁₈-Phasen abweichende Selektivität für dieses Material.

Tab. 3.15 Charakterisierung der untersuchten Säulen

Nr.	Hersteller	Träger-Silika	mittlere Korngröße (µm)	mittlere Porenweite (Å)	stationäre Phase	Säulen-dimension (mm)	deklarierte (niedrige) pH-Grenze
1	Sepserv	UltraSep ES	≈ 5	≈ 100	RP-18 MLD II.	250×4	1,5
2	Hypersil	Hypurity Elite	4,1 ^(a)	183 ^(a)	C18	250×4,6	0,9
3	Alltech	Platinum	≈ 3	≈ 100	C18	100×4,6	1,0 ^(b)
4	Phenomenex	Synergi	≈ 4	≈ 80	MAX-RP (C ₁₂)	250×4,6	1,5
5	Phenomenex	Synergi	≈ 4	≈ 80	POLAR-RP (-Phenyl)	250×4,6	1,5

^a Werte aus der Charakterisierung der Charge. Nominale Korngröße ist 5 µm

^b Versprochene Stabilität war nicht gegeben. Die Trennleistung nahm während der Nutzung ab.

Zunächst wurde die Gradientenzeit (t_G) für alle Säulen einheitlich bei 60 min festgelegt, um die Ergebnisse einfacher vergleichen zu können. Kapazitätsbereich und Trennleistung wurden für jede Säule individuell optimiert, was durch Optimierung der Flussrate erfolgte. Gleichzeitig mussten die günstigsten Anfangs- und Endkonzentrationen von Eluent B im Gradient gefunden werden. Die Ergebnisse sind in Tab. 3.16 dargestellt.

Tab. 3.16 Bestmögliche Bedingungen für jede untersuchte Säule

Säule	Flussrate (mL/min)	Lin. Strömungs-geschwindigkeit (mm/s)	Linearer Gradient $t_G=60$ min
UltraSep ES RP-18 MLD II.	0,5	0,66	15% Eluent B auf 55% Eluent B
Hypurity Elite C18	1,5	1,5	10% Eluent B auf 50% Eluent B
Platinum C18	1	1	10% Eluent B auf 50% Eluent B
Synergi C ₁₂	0,5	0,5	17% Eluent B auf 55% Eluent B
Synergi Phenyl	0,5	0,5	20% Eluent B auf 55% Eluent B

Stationäre Phasen mit engerer Porenweite zeigten bei niedrigeren linearen Strömungsgeschwindigkeiten wesentlich schärfere Peaks, was die Auflösungen in größerem Maße verbesserte, als was wegen der eingeschränkten Kapazitätsbereiche eingebüßt wurde. Bei diesen Säulen startete der Gradient mit höherem Anteil von Eluent B. Der Vergleich der resultierten Trennungen ist in Tab. 3.17 angegeben. Die beste Trennung konnte mit der Synergi C₁₂ Säule erzielt werden [Abb. 3.13].

Tab. 3.17 Überlappungen, die nicht behoben werden konnten, gruppiert nach den vorher definierten Kriterien, sowie praktische pH-Beständigkeit der Säulen während längerer Nutzung.

Säule	Problem-1 ^(a)	Problem-2 ^(a)	Problem-3 ^(a)	Problem-4 ^(b)	pH-Beständigkeit
UltraSep ES RP-18 MLD II.	Deac + Vit	A1 + Macu	Pe2 + De Pä2 + Cy	-	bestätigt
Hypurity Elite C18	Deac + Vit	Päcu + A1	Ma2 + Pe	Päac	bestätigt
Platinum C18	Deac + Vit	-	Pe2 + De Pä2 + Cy	Peac, Päac	nicht bestätigt
Synergi C ₁₂	-	-	Cy + Ma2	-	bestätigt
Synergi Phenyl	Ma + Deac	A1 + Macu	Cy + Pä2 Pä2 + Ma2	Päac, Maac	nicht geprüft

^a Nicht aufgelöste Peaks

^b Acylierte Anthocyanidin-monoglukoside, die durch acylierte Anthocyanidin-diglukoside gestört sind

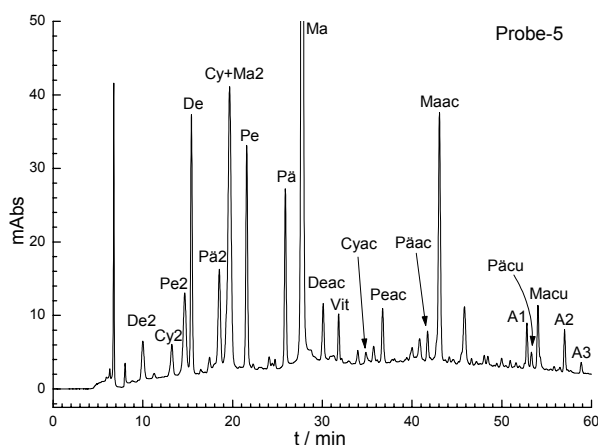


Abb. 3.13 Trennung mit der Synergi C₁₂-Säule

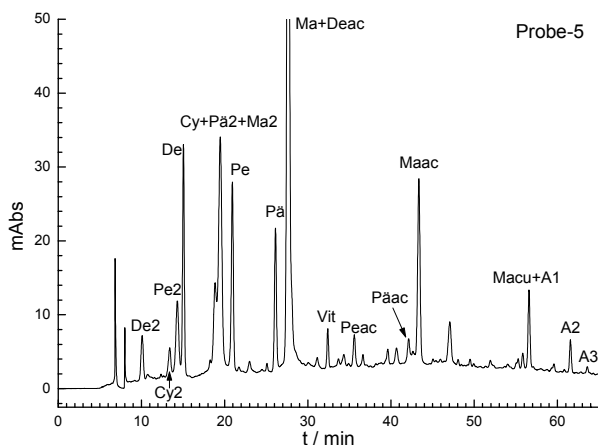


Abb. 3.14 Trennung mit der Synergi Phenyl-Säule

Die kritischen Auflösungen mit $R < 2$ waren von $R = 1,95$ zwischen Pe2 und De, $R = 1,8$ zwischen Pä2 und Ma2 und $R = 1,43$ zwischen A1 und Päcu, berechnet nach Pharm.Eur. aus den Halbwertbreiten [42, 118]. Als einziges Problem blieb die Koelution von Cy und Ma2, was von relativ geringer Bedeutung ist. Der Abbau von Cy erfolgt am schnellsten unter den freien Anthocyanen [67], deshalb kann Cy oft nicht nachgewiesen werden, und das Ma2 ist

ohnehin selten vorhanden. Umgekehrt ist eine Störung des Ma2-Peaks durch Cy noch weniger ausgeprägt, weil Ma2, wenn schon vorhanden, immer große Peaks liefert. Ist die Bestimmung von beiden Substanzen dennoch notwendig, kann dies mit der Hypurity Säule nachgeholt werden.

Die Chromatogramme der drei C₁₈-Phasen (Säule Nr.1-3 in Tab. 3.15) sind in Anhang A.11 zu finden. Die UltraSep ES und Hypurity Elite Säulen zeigten ungünstigere Selektivität und eine etwas schlechtere Trennleistung, wodurch mehr Überlappungen entstanden. Die dritte C₁₈-Phase, die Platinum C18 Säule, zeichnete sich eher durch die etwas günstigere Selektivität als durch die erhoffte gute Trennleistung aus. Diese Säule konnte zumindest die Anthocyanidin-monoglukoside von den stabilen Anthocyan-Derivaten trennen, deshalb wurde sie im späteren in der Kontrollanalytik bei der Isolierung von A1-A2-A3 eingesetzt [Kapitel 3.3].

Wie erwartet zeigte die Phenyl-Phase eine deutlich andere Selektivität als die Alkylketten-Phasen. Diese andere Selektivität wirkte sich aber keineswegs positiv auf die Trennung der Anthocyane aus [Abb. 3.14]. Die Peakschärfen waren allerdings mit denen der C₁₂-Phase vergleichbar, was auf gutes Trägersilika (beides Synergi) und gut gepackte Säulen hindeutet.

Mit Ausnahme der Synergi Phenyl-Säule wurde die pH-Stabilität der Säulen in der Routine getestet. Die UltraSep ES und Hypurity Elite Säulen wurden schon vor dem hier dargestellten Säulenvergleich länger in der Routine angewendet. Beide Säulen führten mehrere hundert Analysen durch, ohne einen Verlust an Trennleistung aufzuweisen. Die Platinum C18 Phase zeigte dagegen immer stärkeres Fronting. Bevor ihre Nutzung eingestellt wurde, hatten sich die Peakbreiten auf das Doppelte erhöht. Die Synergi C₁₂-Phase hat in der späteren Routineanalytik ebenso mehrere hundert Messungen durchgehalten.

Für den Säulenvergleich war die Analysenzeit großzügig in 60 min definiert, damit jede Säule „ihr Bestes“ zeigen kann. Die Gesamtanalysenzeit umfasst aber auch den Spülschritt mit 100% Eluent B und die Re-Equilibrierung und betrug mehr als 80 min. Deshalb wurde nur noch bei der besten Trennung geprüft, ob eine Beschleunigung der Methode noch eine zufrieden stellende Trennung ermöglicht. Die Gradientenzeit wurde auf die Hälfte, 30 min, reduziert, während die Flussrate auf das Doppelte erhöht wurde, damit das Gradientenvolumen konstant bleibt [76].

Zwei abhängige Größen wurden verglichen [Tab. 3.18]. Die Wiederfindungen konnten mangels Standardsubstanzen auf die übliche Weise nicht bestimmt werden. Stattdessen wurden Probe-1, Probe-2 und Probe-3 mit beiden Methoden analysiert, und für Probe-4 und

Probe-5, die aus den oben genannten Proben hergestellt worden waren [Anhang A.5], Sollwerte berechnet. Die Wiederfindung wurde dann bei jedem einzelnen Peak als Verhältnis zwischen der experimentell bestimmten Peakfläche in Probe-4 bzw. Probe-5 und der Sollwert-Peakfläche definiert. Die Anthocyanfingerprints sind als proportionale Peakflächen bezogen auf die Gesamtpeakfläche angegeben und wurden direkt verglichen.

Tab. 3.18 Wiederfindungen und der Anthocyanfingerprint dargestellt als Prozentwerte. Beschreibung im Text.

Peak	Wiederfindungen (%)				Proportionale Peakfläche (%)			
	Probe-4		Probe-5		Probe-4		Probe-5	
	normal ^(a)	schnell ^(b)	normal ^(a)	schnell ^(b)	normal ^(a)	schnell ^(b)	normal ^(a)	schnell ^(b)
De2	-	-	102,45	106,69	-	-	1,54	1,58
Cy2	-	-	94,19	99,93	-	-	1,06	1,41
Pe2	-	-	96,31	108,17	-	-	3,73	3,98
De	98,45	97,83	96,11	97,76	7,86	7,38	6,66	6,35
Pä2	-	-	102,16	99,10	-	-	4,31	4,03
Cy	99,17	101,33	-	-	0,93	0,96	-	-
Ma2 + Cy	-	-	97,51	97,32	-	-	14,30	14,12
Pe	100,18	98,86	98,05	97,43	7,36	7,25	6,39	6,33
Pä	100,83	102,05	101,06	98,74	6,63	6,75	4,85	4,69
Ma	100,86	100,44	99,58	99,56	52,41	52,87	38,71	38,84
Deac	102,34	98,80	101,82	101,74	2,29	2,38	1,71	1,83
Vit	102,70	101,99	98,85	100,93	1,19	1,18	1,13	1,12
Cyac	99,64	103,04	104,60	104,71	0,50	0,56	0,40	0,43
Peac	103,62	101,44	100,52	96,72	2,22	2,22	1,56	1,55
Päac	100,21	97,34	95,76	91,59	1,16	1,21	0,77	0,79
Maac	100,78	99,67	101,96	98,50	11,52	11,31	8,22	8,05
A1	101,83	101,52	101,92	111,14	1,50	1,53	1,15	1,25
Päcu	99,54	100,32	98,57	94,28	0,60	0,58	0,45	0,41
Macu	101,13	101,80	93,67	106,37	2,35	2,38	1,67	1,88
A2	101,98	101,17	98,83	102,09	1,15	1,14	1,06	1,05
A3	100,12	102,43	99,34	103,92	0,32	0,31	0,32	0,31

^a Flussrate 0,5 mL/min, Gradientenzeit 60 min. ^b Flussrate 1 mL/min, Gradientenzeit 30 min

Die besten Wiederfindungen wurden mit der normalen Methode bei der Messung von Probe-4 erreicht; zwischen 98,5-103,6 %. Die Beschleunigung der Analyse verschlechtert die Wiederfindungen nur geringfügig: 97,3-103 % (zweite Spalte). Die Präsenz der Diglukoside

bringt mehr Störung; Wiederfindungen zwischen 93,7-104,6 % (dritte Spalte), besonders wenn die Analyse schneller durchgeführt wird: 91,6-111,1 % (vierte Spalte). Die größten Abweichungen waren infolge von Überlappungen mit weiteren unidentifizierten Spurenpeaks am Anfang des Chromatogrammes sowie bei den acetylierten Anthocyanen zu finden. Die Untersuchung der Streuung der Wiederfindungen um den idealen Wert von 100 % lieferte ähnliches Ergebnis: Nach Zentrierung aller Wiederfindungen um 100 % wurden folgende Standardabweichungen berechnet: 1,4%-1,7%-3,0%-4,8% (für Spalte 1-4).

Der Anthocyanfingerprint ist, wie bei den Robustheitsprüfungen auch bestätigt, wesentlich robuster, als die absoluten Peakflächen. Auch hier konnten bei beiden Proben nur geringe Unterschiede zwischen den proportionalen Peakflächen gefunden werden, wenn die Analyse beschleunigt wurde. Diese Abweichungen sind auch wesentlich geringer als die natürlichen Schwankungen der proportionalen Peakflächen in Rotweinen derselben Sorten. Für die Routineanalytik wurde deshalb die schnellere Trennung ausgewählt, die mit insgesamt 45 min Analysenzeit eine akzeptabel kurze Methode darstellt.

3.2.2 pH-Einfluss auf die Trennung der Anthocyanidin-monoglukoside und -diglukoside

Die Robustheitsprüfungen haben gezeigt, dass die Änderung des pH-Wertes in einem engen Bereich keine signifikante Wirkung auf die Retentionszeiten und dadurch auf die relativen Retentionen der Anthocyanidin-monoglukoside hat. Die Wirkung des pH auf die Auflösungen ist mit dem Einfluss auf die Peakschärfe zu erklären [Kapitel 3.1.4]. Nach Erweiterung der untersuchten Anthocyane mit den Anthocyanidin-diglukosiden konnte aber ein pH-Einfluss auf die relative Retention zwischen den Anthocyanidin-monoglukosiden und -diglukosiden nachgewiesen werden.

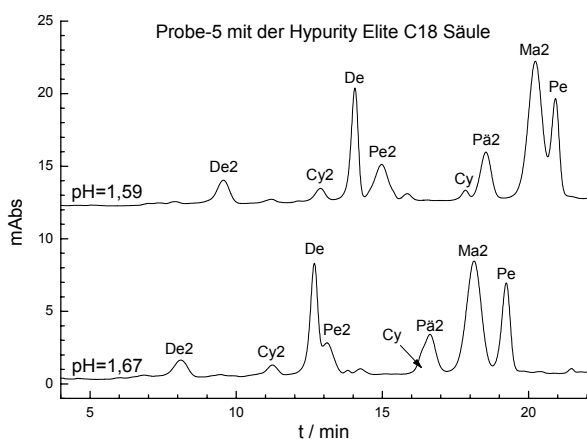


Abb. 3.15 pH-Einfluss auf die relativen Retentionen der Anthocyanidin-mono- und -diglukoside

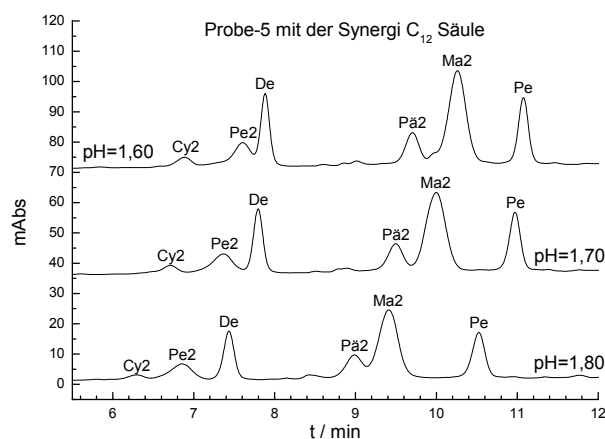


Abb. 3.16 Korrektur der Auflösung zw. Pe2/De durch Änderung des pH

Abb. 3.15 zeigt, dass schon eine geringe Abweichung vom idealen pH-Wert von 1,6 die Auflösungen De/Pe2 und Cy/Pä2 ernsthaft verschlechtert. Dieser Effekt hat eindeutig mit den Trennfaktoren und nicht mit den Peakschärfen zu tun: Die Auflösung zwischen Ma2 und Pe ist bei pH=1,7 sogar besser geworden, obwohl die Peakschärfen bei pH=1,6 besser sind als bei pH=1,7. Es kann formuliert werden, dass bei höherem pH-Wert die Anthocyanidin-diglukoside *relativ schneller* als die -monoglukoside eluieren. Die absoluten Retentionszeiten werden in diesem Bereich nach wie vor von Schwankungen anderer Faktoren wie Flussrate, Temperatur und Acetonitril-Anteil beeinflusst.

Der Effekt konnte bei der Synergi C₁₂-Phase bestätigt bzw. gleich ausgenutzt werden. Wegen Änderung der Selektivität der zuerst benutzten Säule – A1 und Päu konnten nicht mehr getrennt werden – musste eine zweite Säule eingesetzt werden, die jedoch nicht ganz identisch mit der ersten Säule war. Wahrscheinlich handelte es sich um eine geringere Oberflächenbedeckung durch die C₁₂-Ketten, weil die Retention der zweiten Säule generell etwas geringer war. Solche Abweichungen zwischen Chargen einer stationären Phase gelten als akzeptabel. Nachteilig war aber, dass sich die Auflösung zwischen Pe2 und De auch verschlechterte [Abb. 3.16].

Nun wurde der pH-Wert absichtlich variiert, um die Auflösung Pe2/De zu verbessern. Im Einklang mit den früheren Beobachtungen bewirkte die Erhöhung des pH eine *relativ schnellere* Elution der Diglukoside gegenüber der Monoglukoside, wodurch Pe2 und De besser getrennt werden konnten. Für die Routine wurde pH=1,7 gewählt, weil Pe2/De schon gut genug und Päu/Ma2 noch gut genug getrennt waren, und die proportionalen Peakflächen der anderen, ungestörten Peaks auch keine große Abweichungen von der Messung bei pH=1,6 zeigten.

Der hier beschriebene Effekt erwies sich also als sehr vorteilhaft bei der Korrektur von feinen Abweichungen, wie etwa bei zwei Chargen der gleichen stationären Phase, zeigte aber auch gleichzeitig, dass ein als optimal festgelegter pH-Wert genauestens eingehalten werden muss. Größere pH-Änderungen sind aber nicht empfehlenswert, auch wenn manche Auflösungen es bedürften, weil sich der Anthocyanfingerprint signifikant ändern kann.

3.3 Isolierung und Strukturaufklärung von nicht-trivialen Anthocyanen

Die im Kapitel 3.2 bereits angesprochenen, zunächst unidentifizierten Anthocyane zeichnen sich durch eine bemerkenswerte Stabilität aus. Abb. 3.17 zeigt das Chromatogramm eines lange gelagerten, nicht mehr trinkbaren Weines, wo nur noch diese Substanzen (Vitisin A, A1, A2 und A3) und lediglich Spuren von Ma zu finden waren. Die Identifizierung dieser Substanzen wird in den folgenden Kapiteln beschrieben.

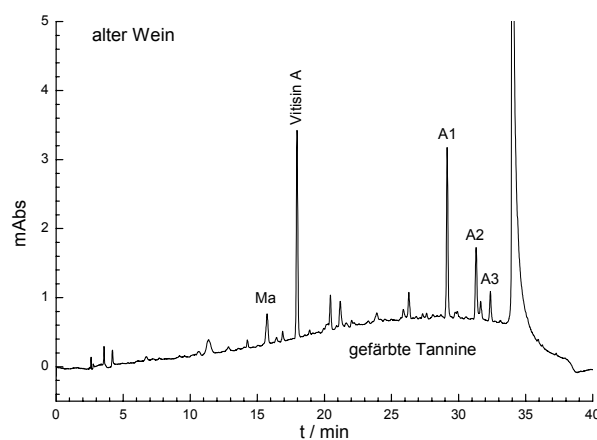


Abb. 3.17 Stabile Anthocyan-Derivate im überalterten Wein

3.3.1 Optimierung der Probenvorbereitung für die semipräparative HPLC

Eine Isolierung von A1, A2 und A3 war ohne die Anwendung von HPLC nicht vorstellbar, weil ihre nahe eluierenden Peaks auf sehr ähnliche chemische Eigenschaften hindeuteten [Abb. 3.17]. Chromatographische Methoden sollten aber erst für die Trennung von vorgereinigten Analyten angewendet werden, damit die begrenzte Beladbarkeit der stationären Phasen ausschließlich durch die Analyten ausgeschöpft und die Anzahl der kostspieligen chromatographischen Läufe auf das Notwendige reduziert wird. Abb. 3.17 zeigt, dass die für die Isolierung ausgewählten Weine neben den gesuchten Analyten einen vielfachen Gehalt an Tanninen hatten: Die breite Schulter entlang des ganzen Chromatogrammes hat eine etwa 26,5-mal größere Fläche als die Peakflächensumme von A1-A2-A3 (825 000/31 000 counts). Das Verhältnis der Massen muss noch ungünstiger sein, weil die HPLC-Detektion nur die farbigen Einheiten innerhalb der Tannine erfasst. Zucker, organische Säuren und Amine sind im Wein auch in großer Menge vorhanden, deren Entfernung aber aufgrund der größeren chemischen Unterschiede nicht so problematisch ist. Deshalb wurden hauptsächlich solche Methoden für die Probenvorbereitung getestet, die die Entfernung der Tannine versprachen [Tab. 3.19].

Aufgrund der einfachen liquid-liquid Extraktion wurde zuerst Methode Nr.1 getestet. 100 mL Rotwein wurde auf pH=1 angesäuert und zunächst mit 4×25 mL Chloroform extrahiert. Bei den ersten Extraktionsschritten wurde eine starke Emulsionsbildung beobachtet, die die Phasenseparation erschwerte und zu Verlusten führte. Der Grund dafür war vermutlich die

viel komplexere Matrix eines gealterten Weines als die eines frischen Tresterextraktes, für den diese Methode beschrieben war. Die wässrige Phase wurde mit 4×25 mL n-Butanol extrahiert, die BuOH-Phase wurde eingeeengt und mit Ethanol-Wasser auf das ursprüngliche Volumen aufgefüllt. Die Ergebnisse der HPLC-Analyse sind in Tab. 3.20 angegeben. Die Wiederfindungen waren zufrieden stellend, aber ein beträchtlicher Teil der Tannine (24%) und wahrscheinlich auch andere Substanzen, die die HPLC bei $\lambda=518$ nm nicht erfasste, wurden mit extrahiert. Deshalb war das Abziehen des mit Wasser nicht mischbaren n-Butanols auch sehr schwer, denn ein zähflüssiger Sirup entstand, der kaum weiter eingeeengt werden konnte. Weitere Nachteile, wie der hohe Lösungsmittelverbrauch und die durch die Emulsionsbildung sehr verlangsamte Bearbeitung, trugen auch bei, diese Methode für die Bearbeitung von etwa 10 L Rotwein eher als ungünstig einzuschätzen.

Tab. 3.19 Zusammenfassung der publizierten Methoden, die in der vorliegenden Arbeit getestet wurden.

Nr.	Referenz	Extraktionsmittel bzw. Reagenz	Prinzip	Probe
1	<i>Renault et al.</i> [108]	Chloroform, n-Butanol	Entfernung lipophiler Komponenten, dann Extraktion der Anthocyane	Tresterextrakt
2	<i>Peri und Pompei</i> [93-94]	Cinchonin	Präzipitation der Tannine	Wein
3	<i>Mitjavila et al.</i> [87]	Polyvinylpyrrolidon (PVP, $M \approx 24000$)		
4	<i>Montedoro und Fantozzi</i> [89]	Methylcellulose		
5	<i>Glories</i> [61]	Ethanol, Methanol-Chloroform, PVP	fraktionierte Präzipitation der Tannine	Wein

Die Methoden Nr.2-4 wurden für die quantitative Bestimmung von Anthocyanen und Tanninen im Wein beschrieben [Details in Anhang B.5]. Alle drei Methoden haben die Tannine vollständig präzipitiert [Tab. 3.20]. Die Reaktionen waren aber nicht selektiv: Die Zielverbindungen wurden auch vollständig entfernt.

Tab. 3.20 Ergebnisse der Probenvorbereitung-Versuche laut Fachliteratur

Nr.	Tannine	Wiederfindung (%)		
		A1	A2	A3
1	24,0	85,8	87,3	83,6
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
4	0	0	0	0

Selbst die freien Anthocyane wurden bei Methode Nr.2 und Nr.4 abgereichert, wogegen bei Methode Nr.3 eine Wiederfindung von 475% für Ma gemessen wurde, was auf die Abspaltung und Freisetzung von gebundenen Anthocyanen unter stark sauren Bedingungen hindeutet. Daher sind diese Methoden nicht nur für die Probenvorbereitung ungeeignet, sondern auch für die Analytik von Anthocyanen im Spurenbereich neben großen Mengen von Tanninen.

Methode Nr.5 versprach eine fraktionierte Präzipitation: Die Erhöhung des Ethanolgehalts kann die Tannin-Polysaccharid- und Tannin-Salz-Komplexe präzipitieren, gefolgt von einer Präzipitation der „stark kondensierten“ und „mittelmäßig kondensierten“ Tannine mit Methanol-Chloroform. Die „wenig kondensierten“ Tannine, Tannin-Anthocyan-Komplexe, Anthocyane und andere kleine Moleküle bleiben in der Lösung und können auf PVP adsorbiert werden, von dem sie wiederum selektiv abgelöst werden können. Methode Nr.5 konnte nicht exakt wiederholt werden, weil keine detaillierte Beschreibung vorhanden war [61], aber die dargestellte Vorgehensweise erwies sich als sehr nützlich.

Die Präzipitationsreaktionen wurden in vereinfachter Form getestet, indem nur Methanol dem Wein zugemischt wurde (Wein:MeOH=1:4). Ein weiß-rosenfarbiger Niederschlag bildete sich in großen Mengen, der nicht näher analysiert wurde, aber wahrscheinlich mit den oben genannten Tannin-Untergruppen übereinstimmte. Im HPLC-Chromatogramm der Klarphase blieb die breite Schulter der gefärbten Tannine weitgehend erhalten [vgl. Abb. 3.17], in Übereinstimmung damit, dass die als „Tannin-Anthocyan-Komplex“ bezeichneten Substanzen in Lösung bleiben. Es ist auch möglich, dass es sich um Tannine mit kovalent gebundenen Anthocyanen handelt, die gemäß der terminierenden Eigenschaft der Anthocyane eher zu den wenig kondensierten Tanninen gehören sollten [Kapitel 2.2, bzw. *Ref. 43*] und daher nicht präzipitiert werden. Bei den Analyten traten auch keine Verluste auf. Daher wurde diese Methode als Schritt 1 für die präparative Probenvorbereitung gewählt [Kapitel 3.3.2, Abb. 3.23].

Die Methode hatte neben ihrer Einfachheit viele andere Vorteile: Sie funktionierte auch bei stark eingengten Weinen, wodurch das Volumen der Proben gleich am Anfang um 90% reduziert werden konnte [Abb. 3.23]. Es brachte eine wesentlich bessere Handhabung, weniger Lösungsmittelverbrauch und schnellere Bearbeitung mit sich. Der Niederschlag setzte sich schnell ab, was eine einfache Dekantierung der Klarphase ermöglichte, und das Methanol konnte einfach, schnell und schonend im Rotationsverdampfer zurückgewonnen werden.

Der andere wichtige Schritt bei Methode Nr.5 war die PVP-Adsorption und die nachfolgende selektive Ablösung der restlichen Polyphenole. Nach diesem Prinzip wurden alle drei früher als ungeeignet beurteilten Präzipitationsmethoden (Tab. 3.19, Nr.2-4) mit einer neuen Zielstellung getestet: Statt selektiver Präzipitation der Tannine wurde die Extraktion der Analyten aus den Niederschlägen und die Freisetzung der Tannine geprüft. Diese geänderte Vorgehensweise ist auch geeignet, kleine und/oder polare Matrixbestandteile (Zucker, Säuren), die nicht präzipitiert werden, gleich mit der Klarphase zu entfernen. Deshalb richtete sich die Dosierung von PVP, Methylcellulose bzw. Cinchonin nicht mehr nach den Vorschriften sondern erfolgte nur bis zur Bildung einer Trübung oder eines Niederschlags. Die Bedingungen sind in Anhang B.6 angegeben. Außerdem wurde auf den starken Säurezusatz bei der PVP-Methode verzichtet, nachdem in einem unabhängigen Versuch nachgewiesen worden war, dass eine zu starke Ansäuerung die Analyten A1, A2 und A3 degradiert.

Der Methylcellulose-Tannin-Niederschlag konnte sehr schwer filtriert werden, obwohl nur insgesamt 10 mL Wein im Versuch bearbeitet wurde. Nach der Injektion der Klarphase in die analytische HPLC erhöhte sich der Säulenvordruck, ein Hinweis darauf, dass im HPLC-Laufmittel weitere Fällungen stattfanden. Beide Beobachtungen wurden als sehr ungünstig für die spätere präparative Arbeit beurteilt. Die PVP- und Cinchonin-Niederschläge konnten problemlos filtriert werden.

Abb. 3.18 zeigt die Chromatogramme vom Ausgangswein und den Klarphasen nach Präzipitation und Membranfiltrierung. Die verringerten Reagenzmengen [vgl. Anhang B.5 und B.6] präzipitierten die Tannine nicht mehr vollständig, was die Entfernung der in der Klarphase gebliebenen polaren Tannine ermöglicht, besonders bei PVP [Abb. 3.18]. Bei PVP war es allerdings nachteilig, dass auch relativ viel Analyten gelöst blieben.

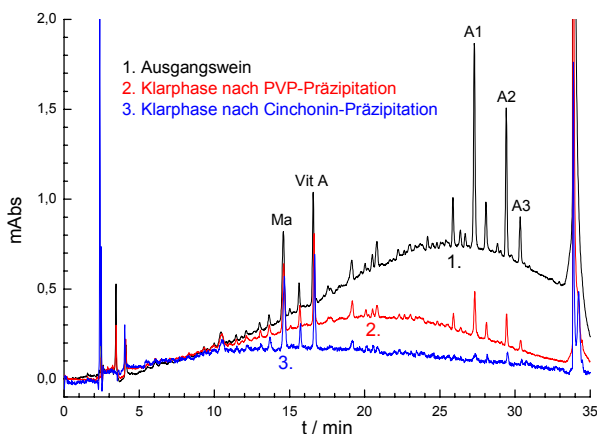


Abb. 3.18 Rotwein vor und nach den Präzipitationsreaktionen

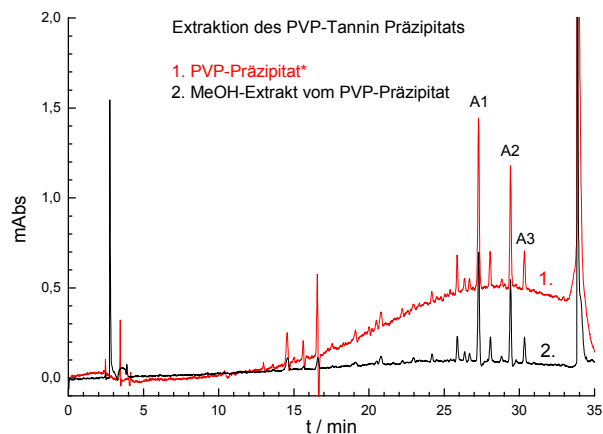


Abb. 3.19 Chromatogramm des Präzipitats* und seines MeOH-Extrakts (* simuliert)

Die quantitativen Ergebnisse sind in Tab. 3.21 angegeben. Die Menge der in den Präzipitaten befindlichen Substanzen ist nicht direkt messbar sondern ergab sich als Differenz zwischen 100% und den Wiederfindungen in der Klarphase. Methylcellulose und Cinchonin präzipitierten die Analyten fast vollständig, aber auch größere Mengen von Tanninen.

Tab. 3.21 Verteilung der Zielsubstanzen zwischen der Klarphase und dem Präzipitat* (* nur berechnet).

Reagenz	Klarphase (%)				Präzipitat* (%)			
	Tannine	A1	A2	A3	Tannine	A1	A2	A3
PVP	51,4	22,8	20,6	22,7	48,6	77,2	79,4	77,3
Methylcellulose	26,6	6,0	2,4	0	73,4	94,0	97,6	100
Cinchonin	30,0	6,1	6,5	0	70,0	93,9	93,5	100

Auch die theoretischen Chromatogramme der präzipitierten Anteile wurden simuliert, indem das Chromatogramm jeder Klarphase von dem des unbehandelten Weines subtrahiert wurde. Abb. 3.19 zeigt ein Beispiel für die PVP-Präzipitation. Gemessen werden konnten nur die MeOH-Extrakte der Niederschläge, wie in Abb. 3.19 dargestellt. Es ist ersichtlich, dass ein großer Anteil der Tannine nicht mehr freigesetzt wird.

Die quantitativen Ergebnisse sind Tab. 3.22 zu entnehmen. Die Wiederfindungen von A1 und A3 sind ähnlich bei den Methylcellulose- und PVP-Niederschlägen. Da mit PVP weniger Analyten präzipitiert worden waren [Tab. 3.21], war die Extraktion der Analyten hier effektiver [Tab. 3.22, rechte Spalten]. Die Freisetzung der Tannine war bei diesen zwei Methoden sehr ähnlich (etwa 26%), deutlich niedriger als bei dem Cinchonin-Präzipitat mit 39%. Da das Ziel dieser Untersuchungen vor allem die Verringerung des Tanningehalts war, wurde auch die Cinchonin-Methode als wenig geeignet eingestuft.

Tab. 3.22 Wiederfindungen in den MeOH-Extrakten der Präzipitate bezogen auf den Ausgangswein, sowie Freisetzungen aus den jeweiligen Präzipitaten.

Reagenz	Extrakt (%)				Extrakt / Präzipitat (%)			
	Tannine	A1	A2	A3	Tannine	A1	A2	A3
PVP	12,8	49,2	53,3	55,8	26,4	63,7	67,1	72,2
Methylcellulose	19,1	52,6	61,4	56,9	26,0	56,0	62,9	56,9
Cinchonin	27,1	53,4	84,1	75,7	38,7	56,9	89,9	75,7

Die Ergebnisse der Substanz A2 wurden weniger berücksichtigt, weil sie in mehreren Versuchen von A1 und A3 deutlich abweichende Wiederfindungen zeigte, was zur Zeit der Untersuchungen noch nicht plausibel erklärt werden konnte. Erst nach der Strukturaufklärung [Kapitel 3.3.3] konnte ein möglicher Grund gefunden werden: A1 und A3 können in A2

umgewandelt werden, was für A2 höhere Wiederfindungen vortäuschen kann. Umgekehrte Reaktionen sind auch nicht auszuschließen.

Für die präparative Arbeit wurde die Präzipitation mit PVP ausgewählt. Entscheidend war, dass sich das Analyt/Tannin-Verhältnis bei dieser Methode am meisten verbessert hatte. Eine Verbesserung der einleitenden Präzipitation war aber notwendig, um die Verluste von etwa 20% [Tab. 3.21] zu verringern. Dabei wurden die PVP-Reagenzmenge, der pH-Wert und die Entfernung des Wein-Ethanol mit jeweils 10 mL Wein getestet [Tab. 3.23].

Tab. 3.23 Verbesserung der PVP-Präzipitation (* durchschnittliche Werte im Wein – nicht gemessen)

Nr.	Bedingungen			Tannine	Klarphase (%)		
	PVP	pH	EtOH		A1	A2	A3
1	1 mL	2	≈12%*	33,5	17,8	15,9	14,6
2	1 mL	3,4	≈12%*	31,6	12,8	8,9	10,2
3	2 mL	3,4	≈12%*	20,4	8,0	4,7	7,3
4	2 mL	2	0	15,3	7,1	5,4	7,9

Die Erhöhung der dosierten Reagenzmenge auf 1 mL [vgl. Versuch Nr.1 mit Anhang B.6] bewirkt vielmehr die bessere Präzipitation der Tannine als der Analyten [vgl. Tab. 3.21 und 3.23]. Im Versuch Nr.2 wurde der Wein nicht angesäuert, sondern bei seinem natürlichen pH von 3,4 behandelt. Dieser Schritt brachte eine merkliche Verbesserung, denn nur noch etwa 10% der Analyten blieben gelöst und nicht wesentlich mehr Tannine wurden mit präzipitiert. Weiterhin deutet dies bei den Analyten auf eine Anthocyan-ähnliche Struktur hin, weil mit steigendem pH ihre Hydrophobizität auch offensichtlich stieg. Mit einer Erhöhung der Reagenzmenge auf 2 mL konnte der Anteil der nicht präzipitierten Analyten unter 10% verringert werden [Versuch Nr.3], wobei auch nur noch 20% der Tannine in der Klarlösung blieben. Dieses Ergebnis wäre für die präparative Arbeit gut genug gewesen, aber diese Lösung ließ sich kaum filtrieren. Ein wiederholter Versuch lieferte erneut eine kaum filtrierbare Lösung, was signifikant auf die Bildung eines zu feinen Niederschlags bei diesem pH und bei dieser Reagenzmenge hindeutet. Für eine gute Filtrierbarkeit musste der ursprüngliche pH-Wert von 2,0 statt 3,4 angewendet werden [87]. Die dadurch wieder steigende Löslichkeit der Analyten wurde durch Verringerung des Ethanolgehalts kompensiert [Versuch Nr.4].

Dass auch schon der natürliche Ethanolgehalt im Wein von etwa 12% die Löslichkeit der Anthocyane bedeutend erhöht, wurde von *Eder et al.* bei der SPE von Anthocyanen bemerkt [39], und von *Wege* bestätigt [129]. Deshalb wurde der Wein im Versuch Nr.4 zuerst im

Rotationsverdampfer „entgeistet“. Die Fällung der Analyten war nicht schlechter als im Versuch Nr.3, die Filtrierung aber besser. Daher wurde Versuch Nr.4 als Schritt 2 für die präparative Probenvorbereitung gewählt [Abb. 3.23].

Die Niederschläge und Membranfilter aus Versuch Nr.2 und Nr.4 wurden mit 3×10 mL Methanol im Ultraschallbad extrahiert. Da die Präzipitation bei Nr.4 in saurem Milieu durchgeführt worden war, wurde auch das extrahierende Methanol auf pH=2 angesäuert. Tab. 3.24 zeigt die Ergebnisse.

Tab. 3.24 Wiederfindungen in den MeOH-Extrakten bezogen auf den Ausgangswein, sowie Freisetzungen aus den jeweiligen Präzipitaten.

Nr.	pH	Summe aller Extrakte (%)				Extrakt / Präzipitat (%)			
		Tannine	A1	A2	A3	Tannine	A1	A2	A3
2	neutral	13,4	83,4	94,1	97,0	19,6	95,6	103,3	108,0
4	2	19,6	142,7	134,3	143,7	23,1	153,6	142,0	156,0

Die Extraktionen bei pH=2 lieferten eine deutlich höhere Ausbeute an Analyten. Die über 100% liegenden Wiederfindungen können mit durch Hydrolyse aus Tanninen freigesetzten Analyten erklärt werden. Die Tannin-Extraktion selbst zeigt weniger Abhängigkeit vom pH-Wert (19,6 bzw. 23,1%), da aber bei Methode Nr.4 mehr Tannine präzipitiert worden sind [Tab. 3.23], liegt ihre Wiederfindung hier auch etwas höher (19,6%). Entscheidend war wiederum, dass die Verbesserung des Analyt/Tannin-Verhältnisses bei Methode Nr.4 größer war, deshalb wurde die saure Extraktion für die präparative Arbeit gewählt (Schritt 3 in Abb. 3.23).

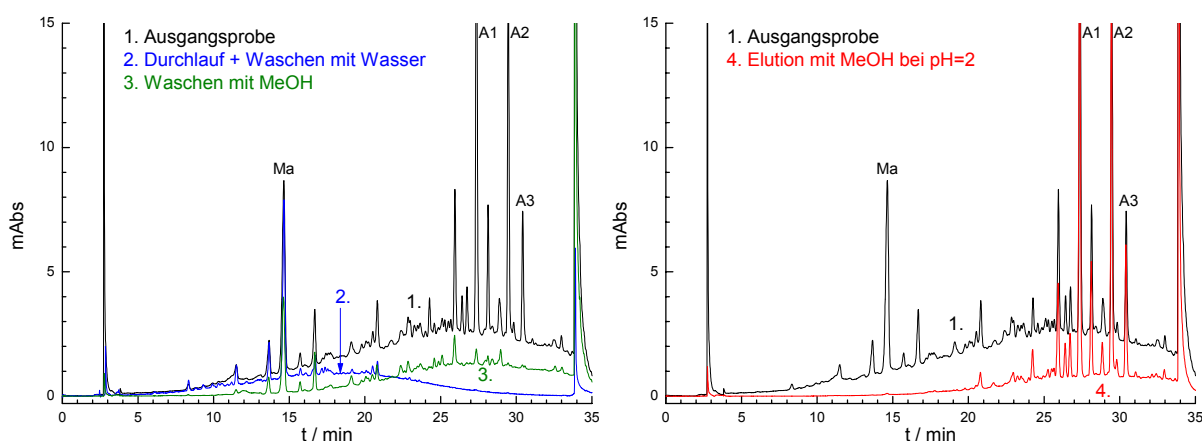


Abb. 3.20 Fraktionen bei der SPE. (Ausgangsprobe: MeOH-Extrakt von PVP-Niederschlag bei pH=2.)

Mit den bisher durchgeführten Schritten konnte erst ein Peakflächenverhältnis von ungefähr 1:7 zwischen den Analyten und der Tannin-Schulter erreicht werden, also waren weitere

Schritte nötig. Die C₁₈-SPE wurde zuerst getestet, weil sie für die Reinigung von Anthocyanen am geeignetsten ist [20] und auch für präparative Aufreinigung von Vitisin A erfolgreich angewendet wurde [8]. Die optimalen Bedingungen sind in Anhang B.7 angegeben. Wichtige Entdeckung war, dass A1-A2-A3 offensichtlich wesentlich hydrophober sind als Vitisin A, was einen Spülschritt mit reinem MeOH erlaubte, ohne A1-A2-A3 abzulösen. Dieser Schritt entfernt mehr als die Hälfte der hydrophoberen Tannine [Chrom. Nr.3 in Abb. 3.20]. Die Analyten eluieren erst mit angesäuertem MeOH [Chrom. Nr.4].

Trotz der guten Ergebnisse erwiesen sich aber zwei Nachteile: Die Beladbarkeit der SPE-Kartuschen ist sehr gering, deshalb wären bei der präparativen Probenvorbereitung entweder sehr viele Extraktionen mit jeweils geringen Probemengen oder ein großer Verbrauch an SPE-Material notwendig gewesen, was den Zeitbedarf bzw. die Kosten erhöht hätte. Der andere Nachteil ist, dass Tannine, die in der HPLC im Bereich der Analyten eluieren, nicht vollständig entfernt wurden. Dies ist auf die gleichen Retentionsmechanismen bei der SPE und HPLC zurückzuführen. Daraus folgt, dass vor der SPE noch mindestens eine weitere Methode mit größerer Beladbarkeit in die Probenvorbereitung einbezogen werden sollte, die über eine andere Selektivität verfügt als die bereits angewendeten Methoden. Aus diesem Grund wurde die Gelfiltration getestet.

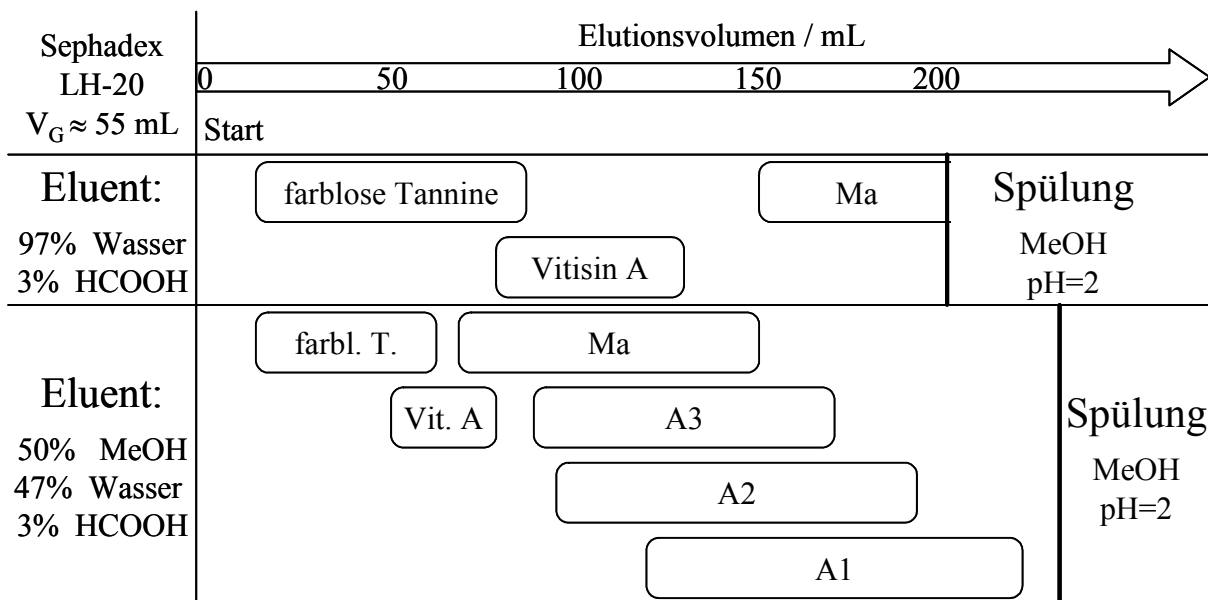


Abb. 3.21 Effekt des Methanols auf die Elution bei Sephadex LH-20

Bakker und Timberlake berichteten über die Anwendung von Sephadex LH-20 Gel mit 3% Ameisensäure in Wasser als mobile Phase bei der Isolierung von Vitisin A [8]. Ihre Ergebnisse konnten reproduziert werden, d. h. Vitisin A eluierte zuerst unter den gefärbten Kompo-

nenten [Abb. 3.21]. Mit dem zur Verfügung stehenden MPLC-Apparat war nur eine Detektion bei $\lambda=280$ nm möglich [Anhang B.2, B.8], was einerseits bei der Erkennung von farblosen Tanninen sehr nützlich war, andererseits konnten die gefärbten Komponenten nicht selektiv detektiert werden. Die Elutionsbereiche der Analyten wurden mittels analytischer HPLC der in 20 mL-Schritten gesammelten Fraktionen rekonstruiert [Abb. 3.21].

Bei dem LH-20 Gel bestimmen zwei verschiedene Effekte die Retention. Die frühe Elution der farblosen Tannine ist hauptsächlich mit dem herkömmlichen Ausschlusseffekt zu erklären [1]. Die adsorptiven Wechselwirkungen sind weniger ausgeprägt, bei 50% MeOH im Eluent eluieren sie nicht viel schneller. Bei den Analyten spielt die adsorptive Retention eine sehr wichtige Rolle, sonst hätten sie als kleine Moleküle spätestens bei 55 mL ($=V_G$) eluieren müssen. Die gefärbten Tannine wurden noch stärker retardiert und konnten erst mit 100% MeOH (pH=2) ausgespült werden, bzw. ein Teil blieb irreversibel in der Säule. Bemerkenswert ist auch die von RP-HPLC abweichende Elutionsreihenfolge. Für die präparative Arbeit wurde ein MeOH-Anteil von 50% gewählt, die detaillierte Beschreibung ist in Anhang B.8 zu finden.

Die Wiederfindungen nach der kombinierten Anwendung von Gelfiltration und C_{18} -SPE wurden überprüft, die Chromatogramme sind in Abb. 3.22 dargestellt. Der Methanol-Anteil der in der Gelfiltration gesammelten Fraktion wurde vor der SPE mit Rotationsverdampfer entfernt. Die quantitativen Ergebnisse sind Tab. 3.25 zu entnehmen. Die Peakfläche der breiten Schulter wurde auf weniger als ein fünftel reduziert, die Verluste an Analyten liegen um 10%. Die kombinierte Anwendung beider Methoden ist daher geeignet, die Probenvorbereitung für die semipräparative HPLC-Trennung abzuschließen (Schritt 4-5 in Abb. 3.23)

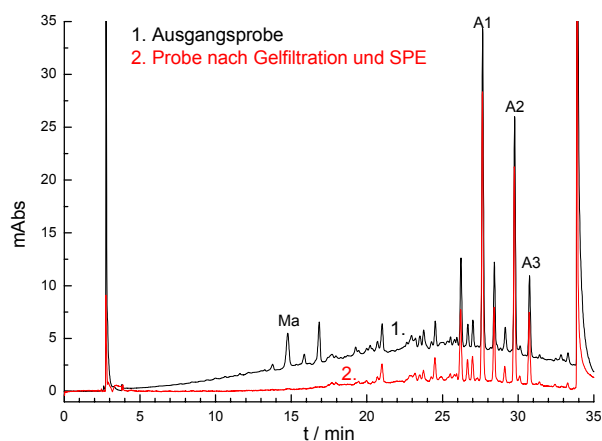


Abb. 3.22 Effekt der Gelfiltration und SPE. (Ausgangsprobe: MeOH-Extrakt von PVP-Niederschlag bei pH=2.)

Tab. 3.25 Wiederfindungen und Verbesserung des Analyt:Tannin-Verhältnisses nach Gelfiltration und SPE

Tannine	Wiederfindung (%)			Analyt : Tannin - Verhältnis	
	A1	A2	A3	Ausgangsprobe	nach Gelfiltr. und SPE
17,7	93,4	92,0	89,2	1 : 10,4	1 : 2,0

3.3.2 Isolierung von A1, A2 und A3

Die genaue Menge von A1, A2 und A3 war mangels Extinktionskoeffizienten nicht bekannt, aber ihre sehr kleinen, im mAbs-Bereich liegenden Peaks ließen nur Mengen im Spurenbereich vermuten [Abb. 3.17]. Daher war die Bearbeitung möglichst großer Mengen an Wein notwendig. Für die Isolierung wurden aber nur Spätburgunder Weine genutzt, damit keine coumarylierten Anthocyane die semipräparative HPLC-Trennung stören.

Die zur Verfügung stehenden Weine (ca. 10 L) wurden in drei Gruppen eingeteilt, vereinigt und bearbeitet [Abb. 3.23 stellt den Prozess summarisch dar]. In Abweichung von der Methodenoptimierung [Kapitel 3.3.1] wurde die Trennung des PVP-Präzipitats von der Klarphase mittels Zentrifugieren realisiert, weil die Oberfläche der Membranfilter ($d=20$ mm) zu klein war und durch die große Menge an Niederschlägen immer wieder verstopft wurde. Bei der Gelfiltration wurde die stationäre Phase überladen, deshalb war die Fraktion der Zielsubstanzen mit Tanninen verunreinigt [Anhang B.8]. Diese Tannine waren aber relativ hydrophil und konnten mit der nachfolgenden SPE entfernt werden.

Während der Bearbeitung der ersten Gruppe wurden die einzelnen Schritte mittels analytischer HPLC überwacht, die Wiederfindungen sind in Tab. 3.26 angegeben. Weil keine großen Verluste festgestellt worden waren, wurde die Bearbeitung der anderen zwei Gruppen nur am Ende kontrolliert. Die Wiederfindungen bezogen auf die gesamte Probenmenge nach der kompletten Bearbeitung sind in Tab. 3.26 angegeben.

Tab. 3.26 Wiederfindungen der Zielsubstanzen während der Probenvorbereitung

Analyt	Wiederfindungen (%)			alle Weine komplette Probenvorbereitung (Schritt 1-5)
	bei der ersten Gruppe			
	Nach MeOH- Behandlung (Schritt 1)	Nach PVP- Behandlung (Schritt 2-3)	Nach Gelfiltration und SPE (Schritt 4-5)	
A1	131,9	97,7	105,9	113,8
A2	129,8	103,8	111,5	122,2
A3	132,6	108,3	111,6	112,1

Die Entfernung der Matrixbestandteile war effektiv: Im Schritt 1 wurden insgesamt 30 g Tannin-Salz- und Tannin-Polysaccharid-Komplexe entfernt. Im Schritt 2-5 wurde die breite Schulter der gefärbten Tannine drastisch reduziert: das Analyt/Tannin-Verhältnis war 1,0:1,0 am Ende der Probenvorbereitung. Die vorbereiteten Proben wurden für die semipräparative Trennung vereinigt.

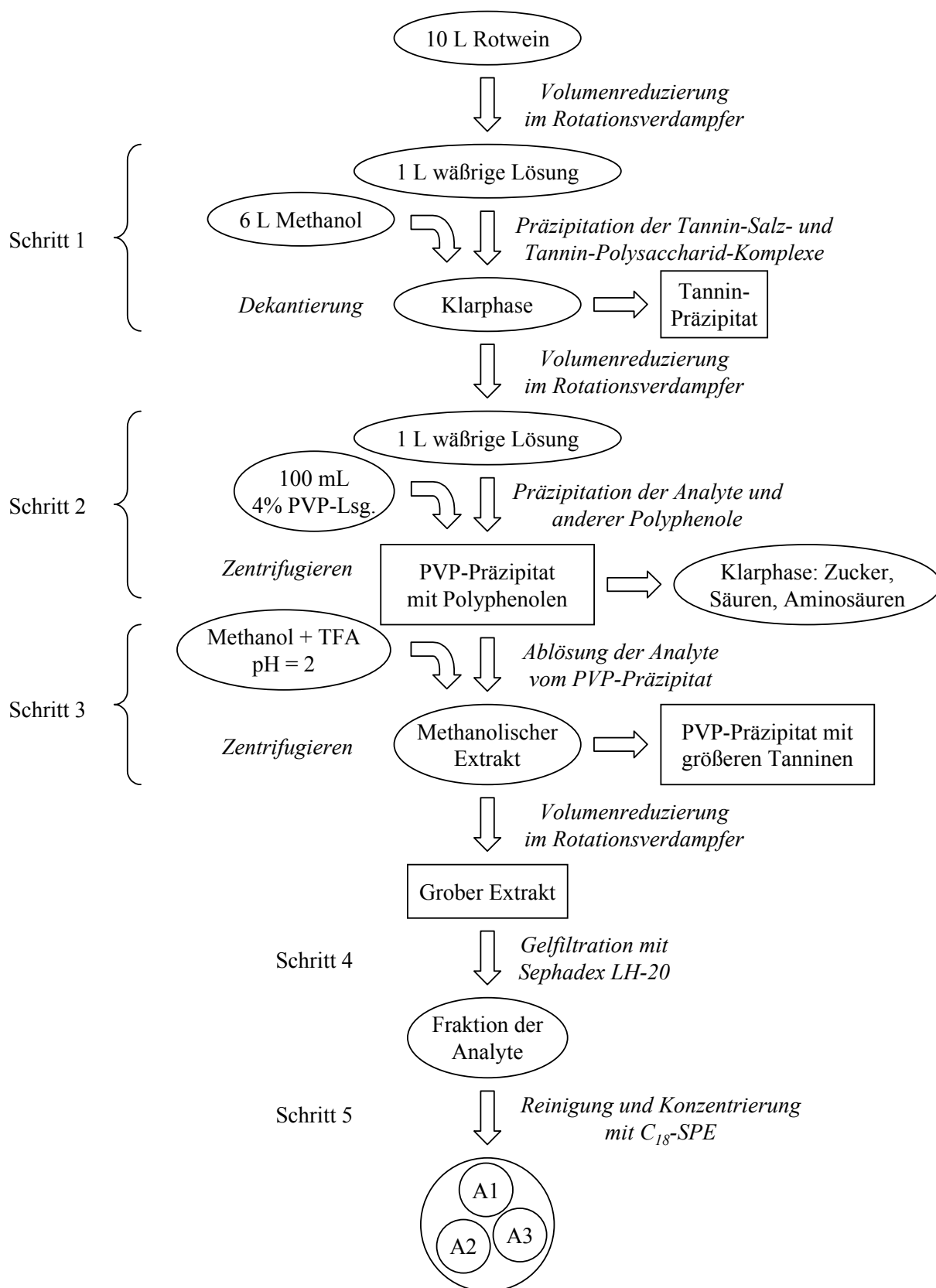


Abb. 3.23 Probenvorbereitung für die semipräparative HPLC.

Für die semipräparative Trennung stand keine pH-stabile stationäre Phase zur Verfügung [Anhang B.4], deshalb wurde die Trennung bei dem etwas ungünstigen pH=2 optimiert. Für

möglichst scharfe Peaks wurde Acetonitril (20%) statt dem üblichen preiswerteren Methanol benutzt. Die semipräparativen Trennungen wurden nach 100fachem scale-up durchgeführt, die Bedingungen sind im Anhang B.9 zu finden. Abb. 3.24 zeigt das Chromatogramm und die Grenzen der Fraktionensammlung.

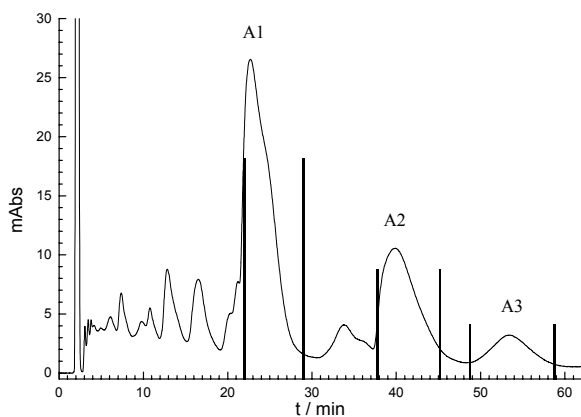


Abb. 3.24 Semipräparative Trennung der Zielsubstanzen.

Aus den gesammelten Fraktionen wurde das Acetonitril im Rotationsverdampfer entfernt, die wässrige Lösungen mittels SPE konzentriert, und die methanolischen SPE-Eluat im Rotationsverdampfer und Exsikkator getrocknet. Nach der HPLC-Trennung der Zielsubstanzen traten erhebliche Verluste auf, die auf Abbau der Substanzen zurückgeführt werden können. Dies passierte während der Kühlschranks-Lagerung der Acetonitril-entfernten Fraktionen

vor der Durchführung der SPE. Möglicher Grund war der Einfluss von Sauerstoff. Folgende Wiederfindungen wurden gemessen: A1: 23,7% A2: 59,0% A3: 43,5%

Die Reinheit der isolierten Substanzen nach der SPE wurde mittels HPLC bei $\lambda_1=518$ nm und $\lambda_2=280$ nm geprüft. Die Chromatogramme bei $\lambda_2=280$ nm zeigten keine zusätzliche Peaks, d. h. keine farblose polyphenolische Verunreinigungen konnten nachgewiesen werden. Die Reinheiten sind als Flächenprozent bezogen auf die Peakflächensumme aller Peaks bei $\lambda_1=518$ nm angegeben: A1: 86,8% A2: 94,4% A3: 93,8%

Nach Trocknung der Substanzen im Exsikkator wurden folgende Mengen erhalten: A1: 10,0 mg A2: 10,3 mg A3: 6,8 mg. Der Gehalt an Substanzen war unbekannt, weil die Bestimmung des Restlösungsmittels (Wasser, Methanol) aufgrund der geringen Mengen nicht möglich war. Die späteren NMR-Messungen zeigten einen großen Anteil an Lösungsmittel, eine bessere Trocknung wurde aber nicht erstrebt, weil die Strukturaufklärung mit diesen Proben auch sicher vorgenommen werden konnte [Kapitel 3.3.3].

3.3.3 Strukturaufklärung von A1, A2 und A3 (mittels MS, NMR, UV/Vis und Synthese)

Die Bestimmung der Molmassen von A1, A2 und A3 erfolgte mit ESI-MS in Methanol [Tab 3.27]. Bei der Anwendung von CID, was einer quasi-chemischen Ionisation entspricht, wurden Peaks bei M-162 am intensivsten detektiert. Dies wurde zunächst der Abspaltung von

Glukose zugeordnet, was in der Fachliteratur häufig beschrieben ist [6, 11, 57] und auf eine chemische Veränderung der herkömmlichen Aglykone hindeutete.

Tab. 3.27 MS-Daten von A1, A2, A3

Ionisation	Art des MS-Basispeaks	MS-Peak (m/z)		
		A1	A2	A3
ESI	Molpeak (M)	625,1	609,1	639,1
ESI mit CID	Aglykon (M-162)	463,1	447,0	477,0

Ein Anthocyan-Derivat mit charakteristischen MS-Peaks von 609,0 und 447,1 wurde von *Fulcrand* und *Cameira dos Santos* als Addukt von Malvidin-3-glukosid und 4-Vinylphenol beschrieben [18, 56]. Die Übereinstimmung von A2 mit dem Ma-4-Vinylphenol Addukt wurde in der vorliegenden Arbeit mit $^1\text{H-NMR}$ und Synthese bestätigt [Abb. 3.25].

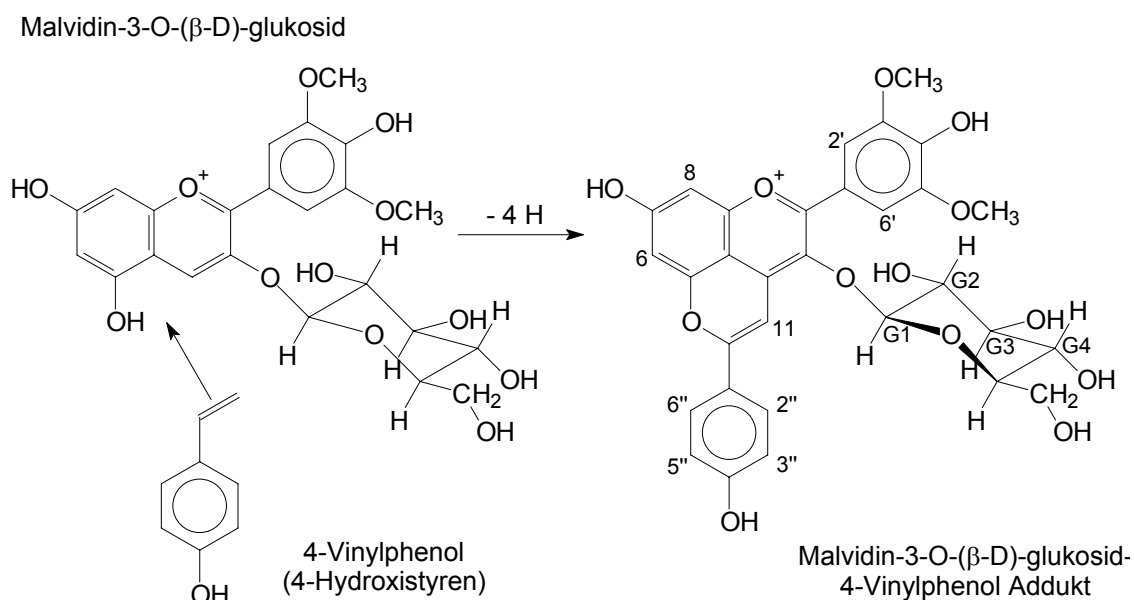


Abb. 3.25 Bildung des Ma-4-Vinylphenol Adduktes nach *Fulcrand et al.* [56], sowie Nummerierung der C-gebundenen Protonen für Tab. 3.28.

$^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von A2 wurde bei 400 MHz in $^2\text{H-DMSO} + 1\%$ TFA aufgenommen. Gekoppelte Protonen wurden in zusätzlichen 1D-TOCSY-Experimenten durch selektive Anregungen aufgeklärt, was die sichere Zuordnung der Signale ermöglichte. Die Signale der C-gebundenen Protonen sind in Tab. 3.28 angegeben. Die Lage der Signale (δ_H) zeigt gute Übereinstimmung mit den Literaturdaten [56]. Die kleineren Kopplungskonstanten (J) und vor allem die Protonen des β -D-Glukosen (bis G4) konnten nur mit den Literaturdaten von Vitisin A [6] verglichen werden, abgesehen von 2'' bis 6'', die in Vitisin A nicht vorhanden sind [Abb. 3.29]. Die etwas größeren Unterschiede zwischen den chemischen Verschiebungen

(δ_H) sind eher auf Lösungsmittel- und pH-Unterschiede zurückzuführen. Wichtig ist die gute Übereinstimmung der J -Werte, was die Identität des in MS abgespaltenen Zuckerteiles als β -D-Glukose bestätigt [80].

Tab. 3.28 Vergleich der gemessenen $^1\text{H-NMR}$ -Daten (400 MHz in $^2\text{H-DMSO} + 1\%$ TFA) mit Literaturdaten

Position	Ma-4-Vinyphenol Literatur [56]		A2 experimentell		Vitisin A Literatur [6]		A1 experimentell	
	δ_H (ppm)	J (Hz)	δ_H (ppm)	J (Hz)	δ_H (ppm)	J (Hz)	δ_H (ppm)	J (Hz)
6	7,19	s	7,21	d 1,86	7,267	d 2,0	7,16	d 1,88
8			7,27	d 1,86	7,497	d 2,0	7,23	d 1,87
2' und 6'	7,73	s	7,75	s	7,872	s	7,69	s
-OCH ₃ (3', 5')	4,00	s	3,86	s	3,955	s	3,86	s
G1	3,55-3,9	multpl.	4,81	d 7,8	4,766	d 7,8	4,80	d 7,7
G2			3,50	dd 8,8 7,8	3,478	dd 8,8 7,8	3,49	dd 8,7 7,7
G3			3,24	t 9,0 8,8	3,256	t 8,3 8,8	3,23	t 9,3 8,7
G4			-	-	3,136	dd 9,8 8,3	-	-
G5			-	-	3,093	ddd -	-	-
G6a			-	-	3,521	dd -	-	-
G6b			-	-	3,293	dd -	-	-
11			7,94	s	7,96	s	8,018	s
2'' und 6''	8,15	d 8,8	8,10	d 8,88				
3'' und 5''	7,03	d 8,8	7,01	d 8,89				
2''							7,54	d 2,19
5''							6,97	d 8,48
6''							7,61	dd 8,51 2,25

Das NMR-Spektrum zeigte große Mengen an Wasser, wonach in der 10,3 mg Substanz nur etwa 1-2 mg A2 vorhanden war. Auf eine bessere Trocknung mittels Gefriertrocknung wurde verzichtet, weil die Übereinstimmung der $^1\text{H-NMR}$ -Daten mit den Literaturdaten die Anwendung von $^{13}\text{C-NMR}$ unnötig machte.

Stattdessen wurde die Identität von A2 mit einer dritten unabhängigen Methode bestätigt: Ma-4-Vinylphenol wurde nach Referenz [56] synthetisiert und mit A2 im Wein chromatographisch verglichen. Die genauen Synthesebedingungen sind in Anhang B.10 angegeben. Abb. 3.26 zeigt perfekte Überlappung zwischen dem Syntheseprodukt und A2.

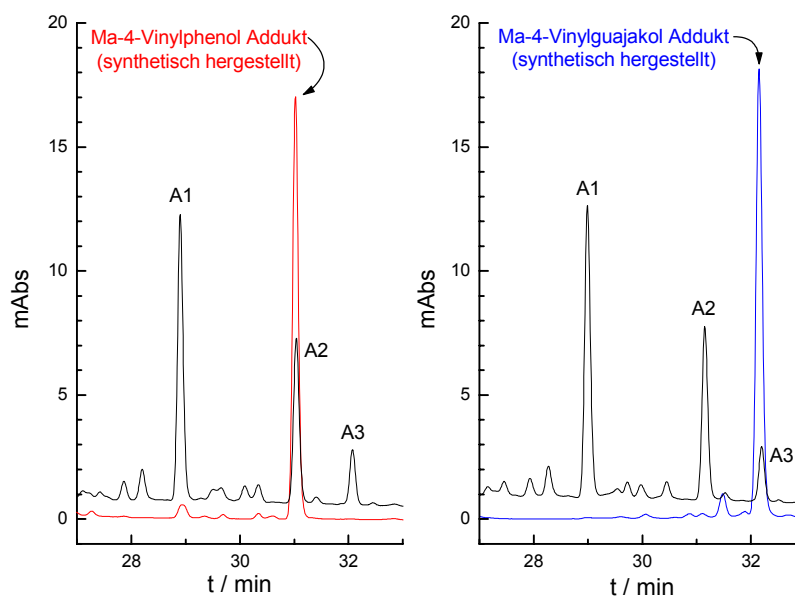


Abb. 3.26 Chromatographische Identifizierung von A2 und A3 als Addukt von Ma und 4-Vinylphenol bzw. Ma und 4-Vinylguajakol.

Von A1 und A3 standen keine Literaturangaben zur Verfügung. Die Elutionsreihenfolge in der RP-HPLC und die MS-Peaks der Substanzen gaben folgende Hinweise: A1 eluiert früher als A2, A1 ist daher polarer als A2, und A1 ist 16 amu schwerer als A2, was eindeutig auf eine -OH/H Substitution hinweist. A3 eluiert später als A2, A3 ist daher unpolarer als A2, und A3 ist 30 amu schwerer als A2, was auf eine -OCH₃/H Substitution hinweist.

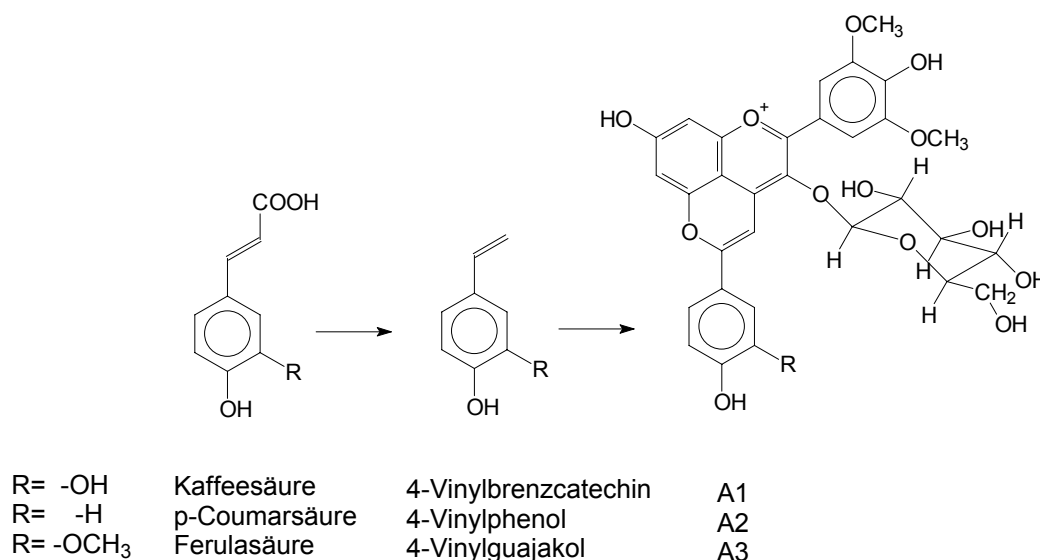


Abb. 3.27 Vorgeschlagene Strukturen für A1 und A3 unter Berücksichtigung der Struktur von A2.

Als wahrscheinlichste Substitutionsposition bei A1 und A3 galt die Position 3'' [Abb. 3.25]. Es ist bekannt, dass 4-Vinylphenol im Wein durch enzymatische Decarboxylierung der p-Coumarsäure entsteht [57, 105]. Hydroxy- und Methoxy-substituierte Derivate der

p-Coumarsäure sind natürliche Komponenten des Weins: Kaffeesäure bzw. Ferulasäure [105, 123]. Beide sind in Position 3 substituiert und liefern über 4-Vinylbrenzcatechin bzw. 4-Vinylguajakol die in Abb. 3.27 dargestellten Strukturen für A1 und A3.

Eine Substitution in anderer Position ist unwahrscheinlich: Malvidin trägt die meisten Gruppen auf dem Flavyliumgerüst unter den fünf natürlichen Anthocyanidinen [Kapitel 2.2], weshalb eine zusätzliche Hydroxy- oder Methoxy-Substitution sehr unwahrscheinlich ist. Grundsätzlich andere Reaktionen, die nicht mit Vinylphenolen ablaufen, sind auch auszuschließen: Die anderen bekannten Reaktionspartner der Anthocyane sind die Catechine, oft unter Mitwirkung von Acetaldehyd, deren Reaktionsprodukte aber höhere Molmassen haben und in RP-HPLC schneller eluieren [23, 43, 53-54, 58, 110].

Die Struktur von A1 wurde mittels $^1\text{H-NMR}$ bestätigt [Tab. 3.28]. Alle Signale von A1 sind mit denen von A2 bis auf das Spinsystem des 1,4-bisubstituierten Aromaten ($2''$, $3''$, $5''$, $6''$ in A2) identisch, was bei A1 fehlt. Stattdessen wurde ein 1,2,4-trisubstituiertes Aromat mit einer ortho- ($J=8,5$ Hz), meta- ($J=2,2$ Hz) und para-Kopplung (nicht aufgelöst) detektiert, was drei theoretisch möglichen Anordnungen der zwei OH-Gruppen ergibt [Abb. 3.28]. Rechnerunterstützte Spektrumsimulationen (SPECTOOL 2.1) ergaben, dass die gemessenen chemischen Verschiebungen (δ_H) nur mit der in Abb. 3.27 vorgeschlagenen Struktur übereinstimmbar sind (links in Abb. 3.28).

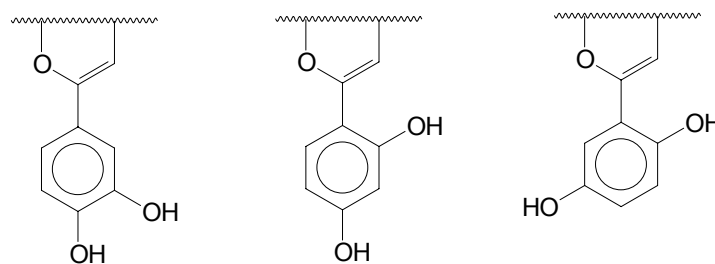


Abb. 3.28 Mögliche Anordnungen der zwei -OH-Gruppen in einem 1,2,4-trisubstituierten Aromaten.

Die ortho-Stellung der -OH-Gruppen wurde in einem unabhängigen Experiment bestätigt: In UV-Spektren der Anthocyane, die am B-Ring zwei benachbarte -OH-Gruppen tragen, wird der Hauptpeak bei $\lambda=525$ nm nach größeren Wellenlängen verschoben, wenn Al^{3+} -Ionen der Lösung zugeführt werden, was auf Chelatbildung zurückzuführen ist [8, 135]. Bei A1 trat auch eine bathochrome Verschiebung von 42 nm auf (von 519 nm nach 561 nm), nachdem 50 μL 5%ige AlCl_3 -Lösung zu 3 mL Lösung von A1 ($c=20$ $\mu\text{g/mL}$) dosiert wurde. Da der B-Ring von A1 nur eine -OH-Gruppe hat (ursprünglich Ma), kann der Effekt nur mit den benachbarten $3''$, $4''$ -OH Gruppen erklärt werden. Bei den anderen zwei Anordnungen von

Abb. 3.28 wäre kein Effekt aufgetreten. Damit war die Identifizierung von A1 als Addukt von Malvidin-3-O- β -D-glukosid und 4-Vinylbrenzcatechin als gesichert abgeschlossen.

NMR-Messung von A3 war aufgrund der geringen Menge der isolierten Substanz nicht möglich. Die vermutete Struktur von A3 [Abb. 3.27] wurde durch Synthese bestätigt. Statt 4-Vinylphenol [Abb. 3.25] wurde 4-Vinylguajakol benutzt, die Bedingungen sind in Anhang B.11 angegeben. Der eindeutige Ablauf der Reaktion wurde mittels HPLC geprüft und der Peak des Syntheseprodukts überlappte perfekt mit dem von A3 im Wein [Abb. 3.26]. Damit war die Identifizierung von A3 als Addukt von Malvidin-3-O- β -D-glukosid und 4-Vinylguajakol auch abgeschlossen.

A1 und A3, ähnlich dem schon früher charakterisierten A2 [116], spielen eine wichtige Rolle bei der Farbe des Rotweins. Sie werden aufgrund der substituierten Position 4 durch Hydrogensulfitionen kaum gebleicht und sind wesentlich stabiler, als die herkömmlichen Anthocyane [116]. Ihr Beitrag zur Rotweinfarbe ist daher besonders bei länger gelagerten Weinen wichtig. Aus der Sicht der Vinylphenole bieten die hier dargestellten Reaktionen eine zusätzliche Erklärung, warum Rotweine einen geringeren Gehalt an Vinylphenole haben als Weißweine [105].

3.3.4 Identifizierung von Vitisin A

Über Vitisin A wurde zuerst von *Bakker et al.* berichtet [8]. Als wichtigste Eigenschaft wurde die Resistenz gegen den bleichenden Effekt der Hydrogensulfitionen hervorgehoben, was auf ein in Position 4 substituiertes Anthocyan hindeutete. In RP-HPLC eluiert Vitisin A gleich nach Ma [6]. *Dallas und Laureano* berichteten über eine Substanz mit den gleichen Eigenschaften, ohne die Substanz genauer zu beschreiben [21]. Hervorgehoben wurde vor allem eine die herkömmlichen Anthocyane übertreffende Stabilität dieser Substanz im Wein. Die Isolierung und ausführliche Charakterisierung sowie erster Strukturentwurf wurden wiederum von *Bakker et al.* publiziert [6, 8]. Die Bildung von Vitisin A konnte auch aufgeklärt werden [Abb. 3.29], und die Reaktion wurde aus mehreren oenologischen Gesichtspunkten untersucht [112, 113]. Die endgültige Strukturaufklärung von Vitisin A wurde von *Fulcrand et al.* durchgeführt [57].

Erste Hinweise zur Identifizierung von Vitisin A in der vorliegenden Arbeit waren die Ma-nahe Elution und die Präsenz in sehr alten Weinen [Abb. 3.17]. UV/Vis-DAD-Spektren dieser Substanz waren ebenfalls publiziert worden [6, 57], die aber in der vorliegenden Arbeit gerätebedingt nicht wiederholt werden konnten. Die Optimierung der Gelfiltration für die

Isolierung von A1, A2 und A3 lieferte einen zweiten Hinweis, indem Vitisin A in Übereinstimmung mit Referenz [8] als erstes rot gefärbtes Pigment eluierte [Kapitel 3.3.1].

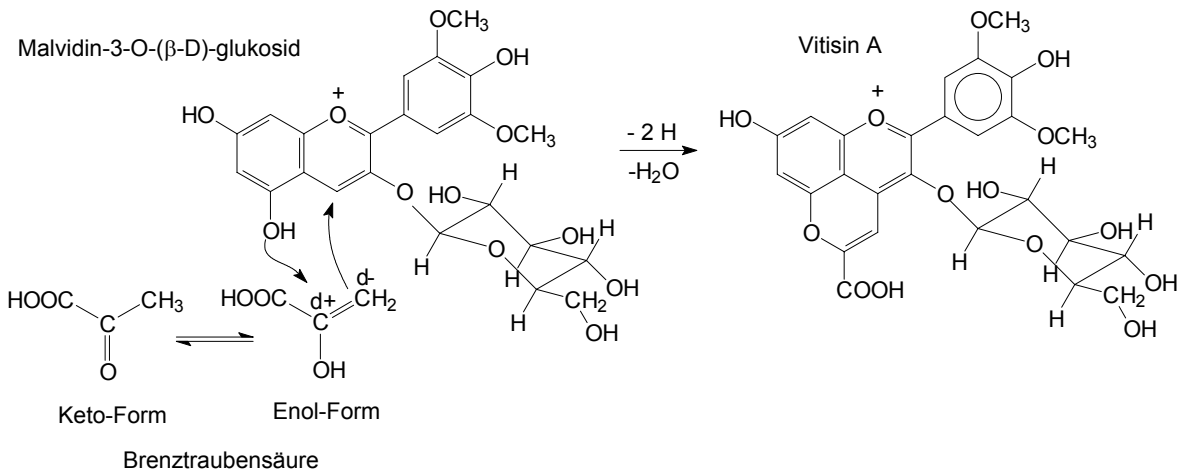


Abb. 3.29 Reaktion zwischen Ma und Brenztraubensäure zu Vitisin A (Struktur nach *Fulcrand et al.* [57]).

Die endgültige Identifizierung basierte auf die Synthese von Vitisin A aus Brenztraubensäure und Ma [Anhang B.12]. Der Ablauf der Reaktion war eindeutig, nur eine gefärbte Substanz bildete sich. Die Bildung von Vitisin A war in den ersten drei Wochen sehr langsam, deshalb wurden im späteren nur seltener Proben genommen [Abb. 3.30].

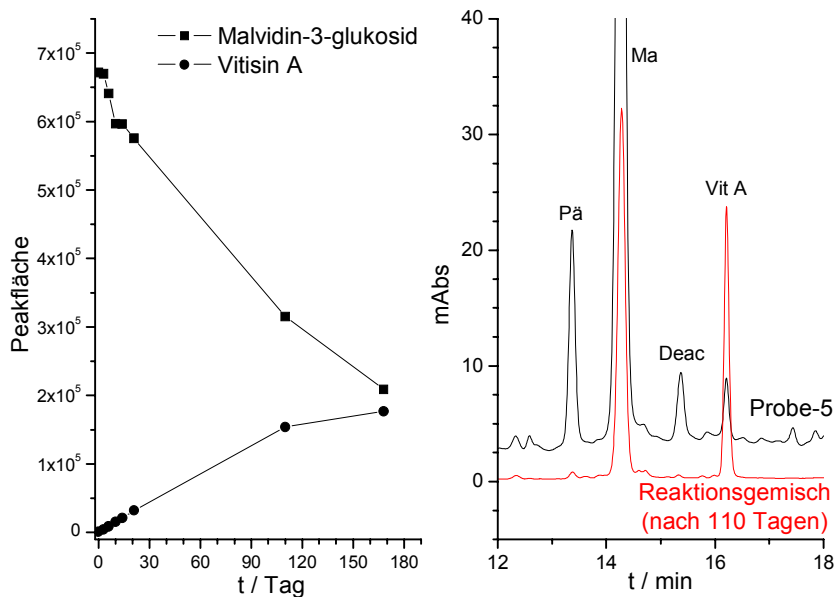


Abb. 3.30 HPLC-Peakflächen von Ma und Vitisin A über 170 Tage (links). Ausschnitt aus den überlappten Chromatogrammen von Reaktionsgemisch und Probe-5 [Anhang A.5] (rechts).

Nach 110 Tagen Reaktionszeit betrug die Peakfläche von Vitisin A schon etwa die Hälfte von Ma, deutlich genug, die chromatographische Identifizierung durchzuführen. Das synthetisierte

Vitisin A überlappte perfekt mit dem vermuteten Peak von Vitisin A im Wein [Abb. 3.30]. Damit ist die Identifizierung von Vitisin A als gesichert anzusehen.

3.4 Messungen in der Routinearbeit

In den bisherigen Kapiteln wurden Einzelheiten der HPLC-Methoden und der Peakidentifizierung erläutert, der gesamte Analysenprozess schließt aber auch die Probenvorbereitung und die Auswertung ein. Diese Aspekte werden in den folgenden Kapiteln diskutiert.

3.4.1 Untersuchungen bezüglich der Lagerfähigkeit der Proben

Zahlreiche Weine wurden bereits 1996 hinsichtlich ihrer flüchtigen Aromastoffe mittels SPME/GC analysiert. Diese Proben waren bei -18°C tiefgefroren aufbewahrt. Von den Weinproben, die erst für die vorliegende Arbeit angeschafft worden waren, wurden ebenfalls kleinere Mengen für eventuelle spätere Versuchszwecke durch Einfrieren archiviert.

Das Einfrieren als Archivierungsmethode beschädigt die Anthocyane nicht und wurde von zahlreichen Autoren angewendet [3, 135]. Der Grund für die Untersuchungen war, dass nach Auftauen der gefrorenen Proben, auch wenn sie früher filtriert wurden, immer ein unlöslicher Niederschlag zu beobachten war, der Anthocyane mit eingeschlossen haben könnte, oder an dessen Oberfläche Anthocyane adsorbiert werden könnten. Der Niederschlag selbst wurde nicht näher untersucht, es könnte sich zum Beispiel um irreversibel veränderte Weinproteine handeln. Untersucht wurde nicht nur der Effekt des Einfrierens und Auftauens, sondern auch andere Lagerungsarten, damit die Stabilität der während des Routinebetriebs in HPLC-Probenflaschen abgefüllten Weinproben abgeschätzt werden kann.

Für die Untersuchungen wurde ein kommerziell erhältlicher Beaujolais (Clochemerle 1997, Frankreich) ausgewählt, da die Beaujolaisweine sehr jung auf den Markt gebracht werden und der anfänglich große Anthocyangehalt relativ schnell abnimmt. Über 69 Tage verteilt wurden nach fünf verschiedenen Lagerungszeiten Analysen durchgeführt.

Bei der ersten Analyse wurde die erste Weinflasche analysiert, und von diesem Wein wurden Proben für drei verschiedene Lagerungsarten zubereitet:

- Lagerung bei Raumtemperatur, im verschlossenen Erlenmeyerkolben
- Lagerung im Kühlschrank bei 4°C , im verschlossenen Erlenmeyerkolben
- Lagerung bei -18°C , in verschlossenen GC-Headspace-Flaschen (22 mL)

Außerdem wurde noch geprüft, ob das mehrmalige Auftauen und Einfrieren einer Probe einen Verlust an Anthocyanen verursacht. Zu diesem Zweck wurde eine der gefrorenen Proben an jedem Versuchstag aufgetaut, analysiert und dann wieder eingefroren, während die anderen gefrorenen Proben nach dem Auftauen nur einmal analysiert wurden. An jedem Versuchstag wurde auch eine neue Weinflasche geöffnet, um die Ergebnisse mit der Veränderung der Anthocyane in den ungeöffneten Flaschen vergleichen zu können.

Die Proben wurden mit der für die UltraSep ES RP-18 Säule beschriebenen Methode [Kapitel 3.1.1; Tab. 3.1] als Doppelbestimmung analysiert. Zur Auswertung wurde die Summe der Peakflächen der 9 identifizierten Anthocyane herangezogen. Die primären Ergebnisse sind im Anhang C.1 zu finden; Tab. 3.29 zeigt die Änderung der Peakflächen bezogen auf die erste Messung.

Tab. 3.29 Abnahme der Anthocyane in verschieden gelagerten Weinen

Lagerungszeit (Tag)	Peakflächensumme von 9 Anthocyanen bezogen auf den ersten Tag (%)				
	frisch geöffnete Weinflasche	tiefgefroren, einmalige Analyse	tiefgefroren, wiederholte Analysen	4 °C	bei Raum- temperatur
0	100	100	100	100	100
14	97	98	98	96	76
27	88	96	92	91	59
43	86	99	99	84	33
69	76	98	94	67	9

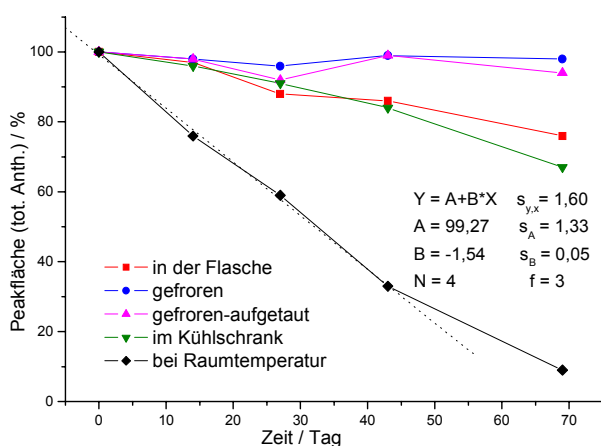


Abb. 3.31 Graphische Darstellung der Anthocyan-Degradation

Das wichtigste Ergebnis ist, dass die Lagerung von Weinproben bei -18 °C keine merkliche Veränderung der Anthocyane bewirkt, selbst dann nicht, wenn die gegebene Probe für eine Analyse inzwischen mehrmals aufgetaut wird [Abb. 3.31]. Diese Lagerungsart von Weinproben ist bezüglich der Anthocyane als sicher anzusehen. Sowohl der Sauerstoff in der Luft als auch höhere Temperaturen beschleunigen die Degradation der Anthocyane [79]. Die vor-

liegende Untersuchung bestätigt diese Aussage: Der größte Verlust an Anthocyanen erfolgte bei der Lagerung bei Raumtemperatur, wo der Zutritt von Sauerstoff beim Öffnen des Erlenmeyer-Kolben auch stattfinden konnte. Die Wirkung von Sauerstoff scheint einen

größeren Einfluss auf den Abbau der Anthocyane zu haben als die Temperatur, da die Abnahme der Anthocyane in den ungeöffneten Weinflaschen bei Raumtemperatur geringer war als bei Lagerung einer auf 4°C abgekühlten, geöffneten Probe.

Die Degradation der Anthocyane durch Temperatur und Sauerstoffeinfluss hat am Anfang einen linearen Verlauf. Die auf die ersten 4 Punkte angepasste Gerade ist in Abb. 3.31 zu sehen. Anhand der Steigung von -1,54% / Tag kann abgeschätzt werden, dass die abgefüllten Proben in der Routine für einen halben Tag (Nachtbetrieb) ohne Gefahr im Autosampler gelassen werden dürfen. Das war vor den Untersuchungen nicht ohne weiteres anzunehmen, da die verwandte Substanzklasse der Flavonoide beispielsweise nur in frisch vorbereiteten Weinproben quantitativ analysiert werden kann [114]. Ansonsten müssen die Proben gekühlt werden [123], bzw. Sauerstoff muss ausgeschlossen sein. Dies kann durch Spülen mit Inertgas oder durch randvolles Füllen der Probenflaschen realisiert werden [83].

3.4.2 Die Proben und ihre Messungen in der Routine

Es wurden insgesamt 270 Weinproben analysiert, die ausführliche Beschreibung der Proben ist im Anhang C.2 angegeben. Die 206 authentischen Proben stammen aus den Weinbauinstituten in Neustadt an der Weinstraße (Pfalz) und Weinsberg (Württemberg). Die Zusammensetzung des authentischen Probensatzes nach Rebsorte, Jahrgang und Alter ist Tab. 3.30 zu entnehmen. Die scheinbare Diskrepanz zwischen Jahrgang und Alter lässt sich davon ableiten, dass die Proben zu verschiedenen Zeitpunkten angeschafft, archiviert bzw. analysiert wurden.

Tab. 3.30 Die Verteilung der authentischen Weinproben bezüglich Rebsorte, Jahrgang und Alter

Rebsorte	Anzahl	Anteil der Sorten (%)		Jahrgang	Anzahl	Alter (Jahr)	Anzahl
		Proben	Deutschland*				
Spätburgunder	67	35,6	34,4	1995	10	0,5	17
Portugieser	18	9,6	19,4	1996	48	1	13
Dornfelder	31	16,5	15,0	1997	84	1,5	25
Trollinger	23	12,2	10,1	1998	37	1,75	41
Schwarzriesling	19	10,1	9,1	1999	10	2,5	25
Lemberger	21	11,2	4,4	2000	17	2,75	36
Regent	9	4,8	1,3			3,5	39
Samtrot	3					4,5	10
Cab. Sauvignon	15						

* Statistisches Bundesamt 1999

Die Probenanzahl der 7 wichtigsten deutschen Sorten stellt annähernd die deutsche Rotweinproduktion dar, nur die Portugieser Weine sind im Probensatz etwas unterrepräsentiert. Die meisten Weinproben sind Produkte systematischer kellertechnologischer Versuchsserien, was gewährleistet, dass im Probensatz auch ein breites Spektrum von kellertechnologischen Verfahren vertreten ist [Anhang C.3]. Daher kann dieser ausgeglichene Probensatz als repräsentativ für die Gesamtheit der Weinwirtschaft angesehen werden.

Die Mehrheit der 64 kommerziellen Weine stammt aus dem Landesuntersuchungsamt für das Gesundheitswesen Nordbayerns, Würzburg (fränkische Weine), der Rest wurde käuflich erworben.

Die Qualitätssicherung während der Routine konnte auf das Minimale reduziert werden. Eine Kontrolle der Probenvorbereitung war nicht notwendig, weil die Proben direkt analysiert wurden. *Eder et al.* berichteten zwar über die Anwendung von SPE als Probenvorbereitung [39], die Methode scheint aber mehr Aufwand mit sich zu bringen als Vorteile. Der wesentlichste Nachteil ist die mögliche Verfälschung des Anthocyanfingerprints durch Verluste an weniger retardierten hydrophileren Anthocyane [39, 129]. Die Entfernung bestimmter Matrixkomponente ist belanglos, weil die Detektion ohnehin nur die Farbstoffe erfasst. Eine Aufkonzentrierung hätte eventuell bei den Roséweinen notwendig sein können, aber sie konnten auch direkt analysiert werden.

Zum Schutz der HPLC-Säule müssen feste Mikropartikel aus den Proben entfernt werden. Am Anfang wurde das gewöhnliche Membranfiltrieren mit 0,45 µm Porengröße durchgeführt. Von mehreren Autoren wurde darauf hingewiesen, dass Anthocyane an der Membran adsorbiert werden könnten, und deshalb die ersten 5 mL des Filtrats verworfen werden sollten [67, 123]. In der vorliegenden Arbeit, bedingt durch die teilweise sehr geringe Probenmenge (< 5mL), war nicht einmal die Verwerfung von ein Paar mL der Proben vertretbar. Deshalb wurde für eine online Filtrierung mittels eines direkt vor die HPLC-Säule gekoppelten Stahlfrittenfilters mit 0,2 µm Porengröße entschieden, und die Weine wurden ohne jegliche Vorbehandlung injiziert. Es ist bemerkenswert, dass der Säulenvordruck keine Erhöhung während des Routinebetriebs zeigte, also nur minimale Menge von festen Partikeln in den Weinen vorhanden war. Nachdem Vorsäulen von der Synergi C₁₂ stationären Phase kommerziell erhältlich waren, wurden diese statt des Stahlfrittenfilters vor die analytische Säule gekoppelt. Eine Qualitätssicherungsmaßnahme entfiel also auch bezüglich der Probenfiltration.

Da keine Quantifizierung der Anthocyane durchgeführt wurde, musste die Gültigkeit der Kalibration auch nicht überwacht werden. Nur der lineare Bereich des Detektors wurde überprüft [Kapitel 3.1.3].

Lediglich mit zwei groben Fehlern konnte gerechnet werden, der Kontamination der Proben durch eventuell verschmutzte HPLC-Probenflaschen und einem Dosierfehler des Autosamplers. Deshalb wurde jede Probe in zwei Probenflaschen abgefüllt und analysiert. Reproduzierbare Chromatogramme wurden als korrekt anerkannt, da die Wahrscheinlichkeit sehr gering ist, zweimal den gleichen Dosierfehler oder zwei gleich verschmutzte Probenflaschen zu haben. In der Routine trat ein einziges Mal ein Dosierfehler auf.

Aus den Doppelbestimmungen wurden die Mittelwerte der absoluten Peakflächen der 21 identifizierten Anthocyane gebildet, diese Daten galten als Rohdaten. Weitere Transformationen dieser Variablen für die multivariaten statistischen Auswerteverfahren werden im Kapitel 4.2.1 erläutert.

4. Statistische Auswertung

4.1 Univariate Datenanalyse

Vor der eigentlichen multivariaten Datenanalyse sind in der Regel bestimmte Untersuchungen nötig, Strukturen und Auffälligkeiten, z. B. Ausreißer, in der Datensatz aufzudecken [25].

4.1.1 Explorative Datenanalyse: Untersuchung der Variablen bezüglich *closure* und Suche nach Ausreißern unter den Proben

Die für die Sortenklassifizierung verwendeten Anthocyanfingerprints stellen geschlossene Datensätze dar (*closure*). Durch Normierung der einzelnen Peakflächen auf die Summe der Peakflächen (100%) verringert sich die Dimension des Datensatzes um eins, d. h. eine (beliebige) Variable kann aus den anderen berechnet werden und ist daher redundant. Das Hauptproblem ist aber, dass zusätzliche Artefakte, nichtlineare Korrelationen auftreten können [25].

Laut *Johansson et al.*, die den Effekt von *closure* untersuchten [72], sind vor allem Datensätze mit wenig Variablen ($m < 8$) von negativen Wirkungen von *closure* betroffen, aber auch größere Datensätze mit großen Unterschieden zwischen den Werten der Variablen. Der Effekt kann sich durch eine negative Korrelation zwischen den großen Variablen und/oder durch eine positive Korrelation zwischen den kleinen Variablen bemerkbar machen. Die absteigend sortierten Mittelwerte der prozentualen Peakflächen aus allen Fällen sind in Anhang D.1 angegeben. Nach Berechnung der Korrelationsmatrix konnten folgende Korrelationen nachgewiesen werden [Anhang D.2]:

- alle Diglukoside sind untereinander stark korreliert: De2-Cy2-Pe2-Pä2-Ma2, ebenso
- bestimmte Derivate von De, Pe und Ma: De-Pe-Deac-Peac-Maac-Macu sowie
- bestimmte Derivate von Cy und Pä: Cy-Pä-Cyac-Päac-Päcu;
- die Anthocyan-Addukte korrelieren ebenfalls: VitA-A1-A2-A3

Die gefundenen Korrelationen haben plausible Erklärungen: Alle Diglukoside kommen nur zusammen in den Regent Weinen vor [Kapitel 4.1.2], was automatisch zu positiven Korrelationen führt. Die positiven Korrelationen unter den Anthocyanen mit zweifach bzw. dreifach substituiertem B-Ring (Cy, Pä bzw. De, Pe, Ma) haben ihren biologischen Grund. Die starken positiven Korrelationen zwischen den einzelnen freien Anthocyanen und ihren entsprechenden acylierten Derivaten wurden von *Wenzel et al.* ebenfalls festgestellt [130]. Die

positive Korrelation zwischen den Anthocyan-Addukten kann mit ihrer Stabilität erklärt werden, sie sind alle in älteren Weinen verstärkt vertreten.

Negative Korrelationen zwischen den großen Variablen und positive Korrelationen zwischen den kleinen Variablen wurden nicht gefunden, daher ist die Verwendung der Anthocyan-Fingerprints in der multivariaten Statistik nicht problematisch.

Nach der Untersuchung der Variablen wurden die Fälle (Weinproben) auf Ausreißer geprüft. Dabei wurden die einzelnen Proben mit den anderen Proben derselben Sorte verglichen und Weine mit sehr abweichendem Fingerprint notiert. Aus der Modellbildung wurden jedoch nur solche Weine ausgeschlossen, bei denen die Abweichung auf eine Kontamination oder auf einen Verschnitt hingewiesen hatte. Drei Kriterien wurden benutzt: die Präsenz von Diglucosiden in anderen Weinen als Regent, die Präsenz von acylierten Anthocyanen in Weinen der Sorten Spätburgunder und Schwarzriesling sowie starke Abnahme der acetylierten Anthocyane bei Portugieser und Dornfelder Weinen, was bei Verwendung bestimmter Enzyme vorkommen kann [49]. Diese Bemerkungen sind im Anhang C.2 zu finden. Die Abweichungen wurden je nach Ausmaß durch Werte von 1 bis 3 eingestuft. Für die Modellbildung wurden nur die Weine mit höchstens geringfügiger Störung (=0, 1) verwendet.

Es ist wichtig zu betonen, dass die aus der Modellbildung ausgeschlossenen Weine im Sinne des Weingesetzes nicht unbedingt als Verschnitt anzusehen sind, da ein Versatz mit höchstens 15% erlaubt ist.

Andererseits blieben auch solche Weine im Datensatz, die von der gegebenen Sorte stark abweichenden Anthocyanfingerprint hatten, infolge eines natürlichen Prozesses, wie z. B. größere Mengen der stabilen Anthocyan-Addukte in älteren Weinen. Eine möglichst große Variabilität innerhalb der Sorten ist erforderlich, um die Vorhersagegüte der Klassifizierungen realistisch einschätzen zu können.

4.1.2 Varianzanalyse und Test der Gruppenmittelwerte bezüglich der Rebsorten

Der Einzelbeitrag der Variablen zur Sortenklassifizierung wurde mittels einfacher Varianzanalyse untersucht. Die Prüfgrößen (F-Werte) stellen bei jeder Variable das Verhältnis von Zwischen-Gruppen-Varianz zu Inner-Gruppen-Varianz dar. Alle Variablen zeigen signifikante Unterschiede ($P=0,95$), die nach Größe sortierten F-Werte sind Tab. 4.1 zu entnehmen.

Anschließend wurde bei jeder Variablen untersucht, welche Mittelwerte sich von den anderen signifikant unterscheiden [Tab. 4.1]. Aufgrund der besonderen Eignung für das Testen von

Gruppen unterschiedlicher Größe wurde der Spjotvoll-Stoline-Test durchgeführt [120]. Die Mittelwerte bei einer gegebenen Variablen, die sich von allen anderen Mittelwerten mit $\alpha=0,05$ signifikant unterscheiden, sind mit Farben hervorgehoben und fett gedruckt. Anschließend wurde auch der als weniger konservativ geltende Duncan-Test für den Mittelwert-Vergleich durchgeführt [36, 120]. Mittelwerte bzw. höchstens Mittelwert-Paare, die sich von den anderen Mittelwerten signifikant unterscheiden, sind in der Tabelle kursiv und umrahmt dargestellt.

Tab. 4.1 Einfache Varianzanalyse der prozentualen Peakflächen bzgl. Rebsorten und Vergleich der Mittelwerte

Variable	F-Wert	Mittelwerte der prozentualen Peakflächen (%)						
		Spätburg.	Schwarzr.	Portug.	Dornf.	Lemberg.	Troll.	Regent
Ma2	1943	0,03	0,01	0,18	0,18	0,07	0,03	53,58
Pä2	490	0,00	0,00	0,11	0,07	0,00	0,02	11,27
Maac	329	0,17	0,07	8,67	6,04	1,00	1,07	1,23
Cy2	298	0,00	0,00	0,03	0,03	0,00	0,01	2,04
Pe2	298	0,00	0,00	0,09	0,00	0,00	0,00	8,27
Päcu	177	0,00	0,05	0,73	0,55	0,48	3,02	0,15
De2	164	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00	3,24
Macu	147	<i>0,08</i>	<i>0,33</i>	4,52	<i>3,40</i>	<i>3,68</i>	<i>2,30</i>	<i>1,66</i>
Peac	144	0,01	0,00	1,21	1,60	0,07	0,18	0,22
Pä	111	5,48	10,03	2,73	4,80	2,57	26,56	0,82
Päac	95,2	0,00	0,02	<i>1,05</i>	<i>1,01</i>	0,16	1,43	0,04
Ma	91,9	71,39	65,84	65,51	50,96	77,09	45,80	10,76
Deac	75,5	0,00	0,00	1,04	1,70	0,13	0,14	0,28
Cyac	62,5	0,01	0,00	<i>0,28</i>	<i>0,38</i>	0,04	0,59	0,01
Cy	40,9	0,70	0,92	0,38	0,91	0,20	4,41	0,17
Pe	39,3	6,74	10,21	7,07	12,49	7,90	7,83	3,31
De	35,2	4,08	8,09	3,88	11,60	4,95	4,73	2,09
A1	16,7	5,12	2,22	1,03	0,71	0,44	0,75	0,09
A3	11,5	0,90	0,31	0,21	0,34	0,11	0,18	0,07
VitA	9,95	<i>2,17</i>	1,13	0,80	<i>2,32</i>	0,78	0,30	0,44
A2	8,01	<i>3,12</i>	0,78	0,46	0,93	0,34	0,67	0,24

Die in Tab. 4.1 dargestellten Unterschiede zwischen den Gruppenmittelwerten sind nur Voraussetzungen aber keine Garantie für eine erfolgreiche Klassifizierung. Die Streuung der Variablen verursacht meistens Überlappungen zwischen den Gruppen und verhindert eine univariate Klassifizierung [40]. Die kleinste Streuung im vorliegenden Datensatz zeigt Ma bei der Lemberger-Gruppe mit RSD=5,8%, aber bei den Spurenkomponenten kommen häufig

RSD-Werte größer als 100% vor. Im Durchschnitt beträgt die relative Standardabweichung der Gruppenmittelwerte 57,5%, was den Einsatz multivariater statistischer Methoden notwendig macht.

Dennoch schafft Tab. 4.1 eine Übersicht über die Sorten und ermöglicht die Abschätzung, welche Sorten sich voraussichtlich schwer unterscheiden lassen, bzw. erleichtert die Interpretation der später sich ergebenden Klassifizierungsregel.

Die Sorten Regent bzw. Trollinger zeigen sehr individuelle Fingerprints, geprägt von den Diglukosiden bzw. Pä- und Cy-Derivaten. Portugieser und Dornfelder sowie Spätburgunder und Schwarzriesling weichen von den anderen Sorten auch deutlich ab, wobei innerhalb beider Sorten-Paare nur kleinere Unterschiede zu finden sind. Die Sorte Lemberger fällt dadurch auf, dass sie keine einzige Variable besitzt, deren Mittelwert sie von den anderen Sorten abtrennen könnte. Das erklärt das Phänomen, dass Proben, die keiner der vordefinierten Gruppen richtig zugehören, meistens als Lemberger fehlklassifiziert werden [Kap. 4.3.1].

Mit Hilfe von Tab. 4.1 und Anhang D.2 kann auch abgeschätzt werden, welche Variablen redundant sind, und daher ihre gleichzeitige Aufnahme in die multivariaten Klassifizierungen unwahrscheinlich ist. Solche Variablen sind z. B. die Anthocyanidin-diglukoside.

4.2 Multivariate Datenanalyse

4.2.1 Überblick über die verwendeten chemometrischen Methoden

Die multivariate Datenanalyse kommt zum Einsatz, wenn die Komplexität einer Fragestellung die Messung vieler Merkmale erfordert, die univariat nicht mehr erklärt bzw. interpretiert werden können. Sie verfolgt insbesondere folgende Ziele [25]:

1. Auffinden von Strukturen in den Daten. Im vorliegenden Fall: Erkennung von Rebsorten, Jahrgänge, usw. (Mustererkennung, *pattern recognition*)
2. Ermittlung der Variablen und ihrer Zusammenhänge, die als Einflussfaktoren für die Strukturen in den Daten verantwortlich sind. Im vorliegenden Fall: Selektion geeigneter Variablen mittels verschiedener Methoden
3. Quantitative Beschreibung der Modelle mit dem Ziel, zukünftig unbekannte Objekte beurteilen zu können. Im vorliegenden Fall: Anwendung der Klassifizierungsregel in der Weinüberwachung

Unüberwachte Klassifizierungsmethoden suchen bzw. zeigen die Strukturen im Datensatz allein aufgrund der Variablenwerte. Die in der vorliegenden Arbeit benutzte Hauptkomponentenanalyse (HKA) konzentriert die im Datensatz vorhandene Varianz in wenige neue, orthogonale Variablen, die Hauptkomponenten (HK), die durch Linearkombinationen aus den ursprünglichen Variablen gebildet werden. Die Objekte können im Raum der ersten zwei oder drei HK dargestellt und visuell beurteilt werden (Scoreplot). Die Ladungen, die Korrelationen zwischen den ursprünglichen Variablen und den Hauptkomponenten, geben Auskunft, welche Variablen für die beobachteten Effekte (z. B. Gruppierungen) verantwortlich sind. Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass die Leistungsfähigkeit der unüberwachten Methoden in der Regel nicht ausreicht, Weinklassifizierungen durchzuführen [26, 46, 77, 107, 127].

Die Methoden des überwachten Lernens streben statt der Darstellung der natürlichen Struktur des Datensatzes vielmehr die bestmögliche Modellierung eines Lerndatensatzes an. Es hat zwei Konsequenzen: ein Lerndatensatz wird gebraucht, dessen Umfang als ausreichend ($n > 3m$) und dessen Variabilität als repräsentativ angesehen werden kann. Die Objekte des Lerndatensatzes müssen bezüglich der Klassifizierungsziele genau und zuverlässig (Authentizität!) definiert sein. Zweitens besteht aufgrund der Erzielung einer bestmöglichen Klassifizierung die Gefahr der Übermodellierung, was zwar eine exzellente Reklassifizierung des Lerndatensatzes erlaubt, aber schlechte Vorhersagegüte verursacht. Das Modell wird daher ungeeignet, unbekannte Objekte zu beurteilen. Deshalb müssen überwachte Klassifizierungen immer validiert werden, indem die Vorhersagegüte des Modells geprüft wird [25, 126]. In der vorliegenden Arbeit wurden drei verschiedene überwachte Klassifizierungsmethoden angewendet: Lineare Diskriminanzanalyse (LDA), die Methode der k -nächsten Nachbarn (knN) sowie die Anwendung von Klassifikationsbäumen.

Die Funktionsweise der LDA kann auf unterschiedliche Weise veranschaulicht werden, wobei die mehr oder weniger unterschiedliche statistisch-mathematische Einsätze immer dasselbe Ergebnis liefern [75, 126]: Als Linearkombinationen der ursprünglichen m Variablen werden k neue, so genannte kanonische Variablen gebildet (auch als Diskriminanzfunktion [25], kanonische Funktion [126], *canonical root* [120] genannt):

$$d_k = w_{0k} + w_{1k} \cdot x_1 + w_{2k} \cdot x_2 + \dots + w_{mk} \cdot x_m, \quad k \leq \min[p-1; m],$$

wo p die Anzahl der vordefinierten Klassen ist. Die Koeffizienten w_{jk} werden so gebildet, dass die Varianz zwischen den Klassen im Vergleich mit der Varianz innerhalb der Klassen im Raum der entstehenden kanonischen Variablen möglichst groß wird. Der mathematische Einsatz ist die Lösung eines nicht-symmetrischen Eigenvektor-Eigenwert-Problems [126]. Die

Analyse der Koeffizienten w_{jk} liefert wichtige Information, welche Variablen zwischen welchen Klassen besonders gut diskriminieren. Die kanonischen Variablen stellen auch eine Dimensionsreduzierung dar, und eignen sich besonders gut für visuelle Interpretierungen. Exakte numerische Ergebnisse bezüglich der Klassifizierung können durch Berechnung der Mahalanobis-Distanzen zwischen den Objekten und Klassen-Mittelpunkten im Raum der Originalvariablen erhalten werden. Die Wahrscheinlichkeit, wie sicher die Klassifizierung eines gegebenen Objektes ist, kann auch berechnet werden [25, 126].

Die Methode der k-nächsten Nachbarn (knN) stellt die Objekte im Raum der Originalvariablen dar, und startet mit der Berechnung der Distanzmatrix, die die Entfernung zwischen jeden Objekt-Paaren beinhaltet. Ein Objekt wird in jene Klasse eingeordnet, zu der die Mehrheit seiner k-nächsten Nachbarn gehört ($k=1, 3, 5, 7$ usw.). Als Abstandsmaß wird gewöhnlich die euklidische Distanz verwendet [25, 126].

Die Methode der Klassifikationsbäume ist eine relativ neue Klassifizierungsmethode [120], deren Anwendung in der Chemometrik bis jetzt relativ selten ist [126]. Die Klassifizierung erfolgt durch sequentiellen ja/nein-Entscheidungen, z. B. „wenn ein Wein große Mengen an Diglukosiden hat, dann ist es ein Regent, sonst nicht.“ Die Gruppe der „Nicht-Regent-Weine“ wird danach mittels geeigneter Kriterien weiter aufgespaltet, bis die anderen vordefinierten Klassen auch getrennt werden. Dadurch entsteht ein hierarchisch verzweigtes Diagramm („Baum“, siehe Abb. 4.4). Das ist der wesentlichste Unterschied gegenüber der LDA, wo das Modell versucht, alle Klassen gleichzeitig zu trennen. Die Entscheidungen können univariat oder multivariat, als Linearkombinationen der ursprünglichen Variablen, erfolgen [120].

Die Methode der k-nächsten Nachbarn erforderte die Standardisierung der Variablen: Von jeder Variable wurde der Mittelwert subtrahiert, und anschließend durch die Standardabweichung dividiert [25]:

$$x'_{ij} = \frac{x_{ij} - \bar{x}_j}{s_j}; \quad i = 1, \dots, n; \quad j = 1, \dots, m$$

Die auch als Autoskalierung genannte Transformation gewährleistet, dass jede Variable die gleiche Chance hat, der Klassifizierung beizutragen. Da durch die Standardisierung Variablen mit und ohne relevante Information gleichgestellt werden, ist eine Selektion der Variablen (*feature selection*) hier besonders wichtig [127].

Bei LDA und Klassifikationsbäumen, die durch Linearkombinationen neue Variablen konstruieren, werden nicht-relevante Variablen ohnehin schwach gewichtet und stören die

Klassifizierung wenig. In diesen Fällen spricht man eher von Dimensionsreduzierung (*feature reduction*) [126]. Dennoch lohnt es sich auch bei solchen Methoden nur die relevanten Variablen für das Modell auszuwählen, damit die Interpretierung der Variablenbeiträge und das Modell selbst einfacher werden. Außerdem könnte die Verwendung zu vieler Variablen auch zu Übermodellierung führen.

Es ist bekannt, dass die univariaten F-Werte der Variablen [Tab. 4.1], die die Korrelationen zwischen den Variablen nicht berücksichtigen, in der Regel nicht geeignet sind, die Auswahl der Variablen zu steuern [77, 127]. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Varianten der schrittweisen Variablenselektion angewendet: gemäß Minimierung des Wilks' Lambda und gemäß Maximierung der korrekten Reklassifizierungen. Bei beiden Methoden wird in jedem Schritt jene Variable zum Modell hinzugefügt, die die bereits erzielte Klassifizierung noch am meisten steigern kann, gemessen durch die oben genannten Kriterien. Wilks' Lambda ist ein Maß für die Trennungsqualität zwischen den Klassen bei der LDA: die Determinante der Inner-Gruppen-Varianz-Kovarianz-Matrix geteilt durch die Determinante der Gesamt-Varianz-Kovarianz-Matrix [126]. Dieser Wert wird nur während der LDA automatisch berechnet, die entstandene Reihenfolge für die Einbeziehung der Variablen wurde aber auch mit den anderen Methoden getestet. Die Variablenauswahl gemäß Maximierung der korrekten Reklassifizierungen wurde bei jeder Methode individuell durchgeführt.

Andere Methoden der Variablenselektion konnten mit den vorliegenden Variablen nicht durchgeführt werden: die schrittweise Rückwärtseliminierung der Variablen aus dem Modell (LDA) scheitert daran, dass die Ausgangsklassifizierung mit allen Variablen wegen *closure* nicht durchgeführt werden kann. Die von *De la Calle* angewendete simultane Prüfung aller Variablen mittels Plackett-Burman-Pläne [26] kann nur dann angewendet werden, wenn kombinierte Wirkungen mehrerer Variablen vernachlässigbar sind. Das war im vorliegenden Fall nicht gegeben: bei verschiedenen Positionierungen der Variablen im Plackett-Burman-Plan wurden verschiedene Variablen ausgewählt, also auch signifikante kombinierte Effekte mussten vorhanden sein [81].

Die Validierung der Ergebnisse erfolgte mittels Kreuzvalidierung: Der Lerndatensatz wurde zufallsmäßig in zwei Teile geteilt, und beide Hälften wurden als Testdatensatz mit Hilfe der anderen als Lerndatensatz vorhergesagt [25, 126]. Sie wurde bereits während der Variablenselektion aktiv eingesetzt: im Bereich des Optimums, bei den letzten ausgewählten Variablen wurden Kreuzvalidierungen durchgeführt, um Übermodellierungen zu vermeiden.

4.2.2 Klassifizierung der Sorten

Bei den Klassifizierungen wurden 170 authentische Proben [Anhang C.2] der sieben wichtigsten deutschen Sorten [Tab. 3.30] verwendet. Zuerst wurde die LDA durchgeführt, damit die Variablenselektion *gemäß Minimierung des Wilks' Lambda* erhalten wird [Abb. 4.1].

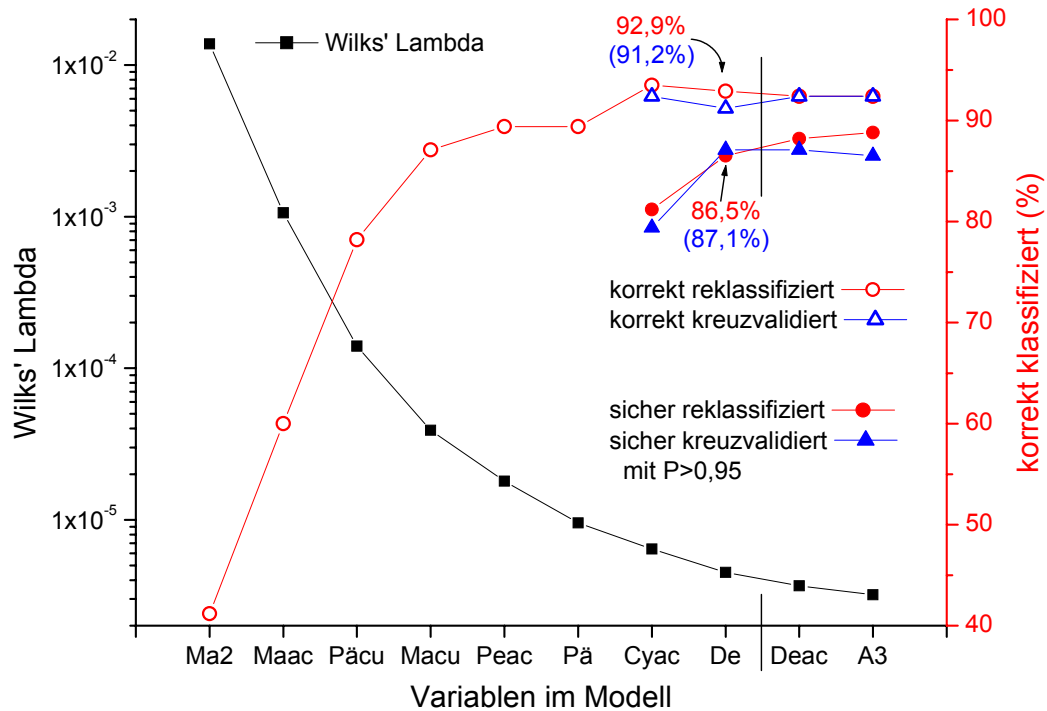


Abb. 4.1 Variablenselektion gemäß Minimierung des Wilks' Lambda und Verbesserung der Klassifizierung

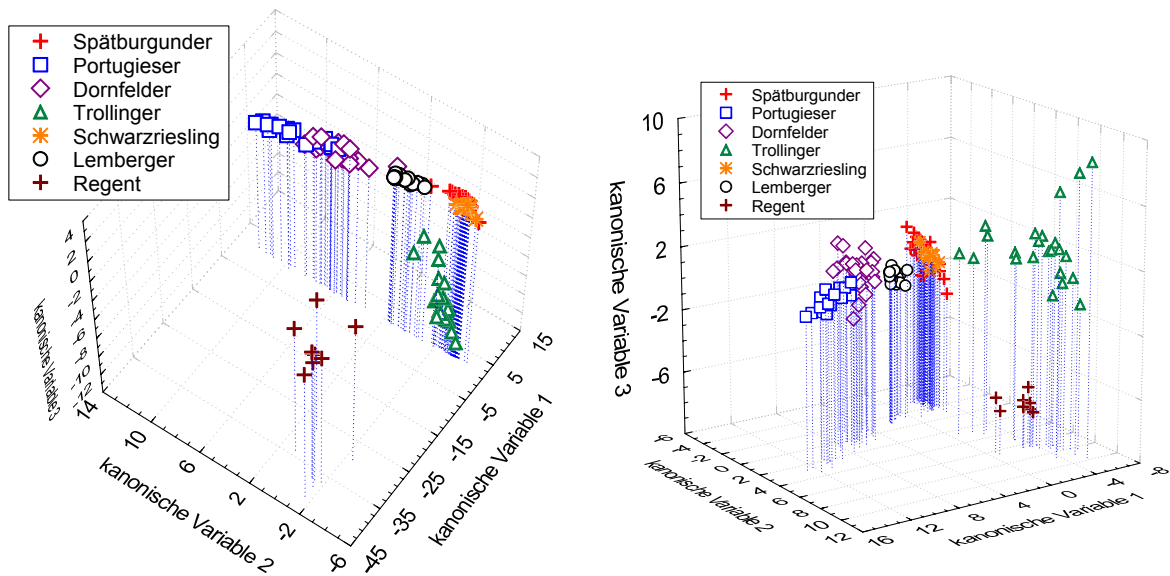


Abb. 4.2 Die Weine im Raum der ersten 3 kanonischen Variablen. Variablenauswahl gemäß Minimierung des Wilks' Lambda (Ma2-De) (links), bzw. gemäß maximaler Reklassifizierung (Päu-Deac) (rechts).

Der größte Anteil an korrekt reklassifizierten Weinen wird mit 7 Variablen erreicht. Durch Hinzufügen weiterer Variablen kann der Anteil solcher Weine, die nicht einfach korrekt, sondern eindeutig korrekt reklassifiziert werden („sicher“ mit $P > 0,95$), deutlich erhöht werden. Bei der Prüfung der Vorhersagegüte mittels Kreuzvalidierung wurden ebenso beide Werte ermittelt. Als letzte Variable wurde De ausgewählt, weil der Anteil an sicher kreuzvalidierten Weinen nach De nicht mehr steigt [Abb. 4.1]. Detaillierte Ergebnisse der LDA sind Anhang D.3 zu entnehmen. Die getrennten Gruppen sind in Abb. 4.2 dargestellt.

Mit der obigen Rangfolge der Variablen wurden ebenfalls Klassifizierungen mittels knN ($k=1, 3, 5, 7$) und Klassifikationsbäumen durchgeführt. Da bei der knN-Methode keine Möglichkeit besteht, Wahrscheinlichkeiten zu berechnen, wurde ein Objekt als „sicher klassifiziert“ betrachtet, wenn alle seine kn-Nachbarn zur richtigen Klasse gehörten. Die besten Ergebnisse wurden unter Berücksichtigung von $k=3$ Nachbarn erreicht. Diese Methode lieferte bereits mit 6 Variablen bessere Reklassifizierung als die LDA (97,1%, siehe Abb. 4.3). Die Klassifizierungsmatrix ist Anhang D.4 zu entnehmen.

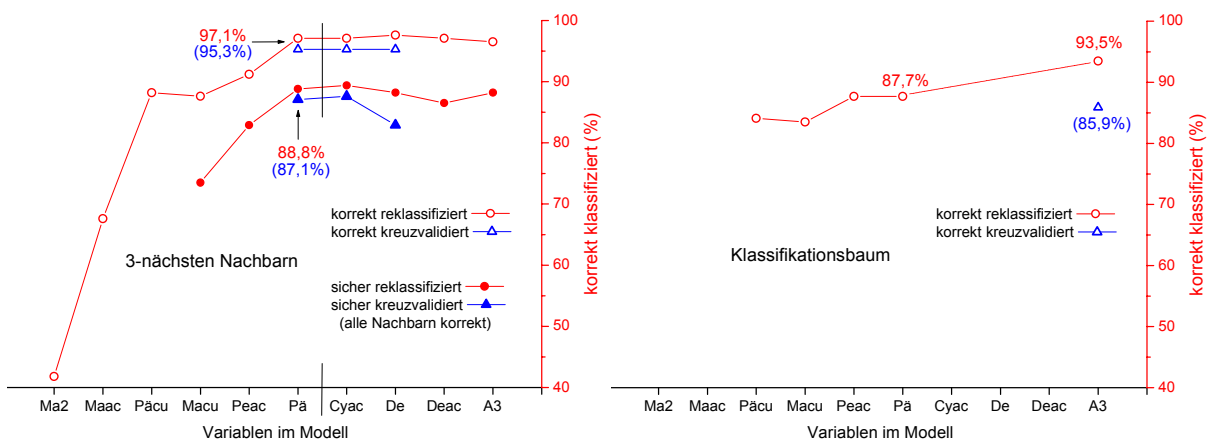


Abb. 4.3 Verbesserung der Klassifizierungen bei der Methode der k-nächsten Nachbarn ($k=3$) und Klassifikationsbäumen unter Verwendung der Wilks' Lambda selektierten Variablen aus der LDA

Bei Anwendung von Klassifikationsbäumen stehen mehrere Optionen zur Verfügung, und zwar ob bei den Knoten univariate oder multivariate Entscheidungen getroffen werden bzw. wie die Auswahl des Baumes angemessener Größe erfolgt [120]. Hier wurden multivariate Entscheidungen aus Linearkombinationen der selektierten Variablen optimiert (Methode „QUEST“ [120]), und das Wachsen des Baumes wurde durch „direkten Abbruch“ (Methode „FACT“ [120]) gestoppt.

Es wurde versucht, den Parameter für den direkten Abbruch so einzustellen, dass 7 Endknoten entsprechend den 7 Sorten entstehen. Nach Einbeziehung von Cyac, De und Deac wurden

jedoch Modelle mit entweder nur 6 oder gleich 8 Endknoten als optimal berechnet. Bei 6 Endknoten sind die Klassifizierungen noch schlecht, weil mindestens zwei Klassen ungetrennt bleiben. Modelle mit 8 Endknoten wurden nicht akzeptiert, damit die Vergleichbarkeit mit der LDA und knN erhalten bleibt. Die Reklassifizierungsrate nach Einbeziehen von 10 Variablen ist mit der LDA vergleichbar (93,5%), die Vorhersagegüte ist allerdings wesentlich schlechter [Abb. 4.3]. Diese Methode bietet keine Möglichkeit, die Sicherheit der Zuordnungen zu schätzen. Der Klassifikationsbaum ist in Abb. 4.4 dargestellt, die Linearkombinationen für die multivariaten Entscheidungen sind im Anhang D.5 angegeben.

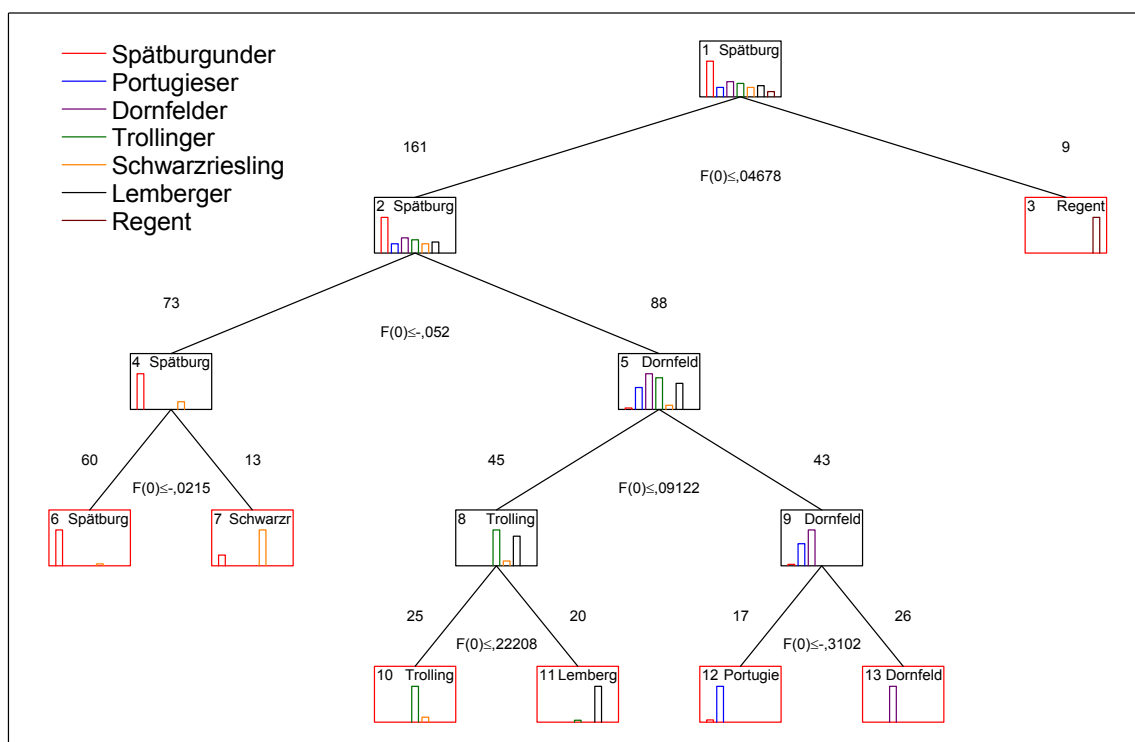


Abb. 4.4 Klassifikationsbaum unter Verwendung von Linearkombinationen aus Ma2-A3

Die schrittweisen Variablenselektionen gemäß Verbesserung der Reklassifizierungsrate wurden bei der LDA und knN individuell durchgeführt. Für die Klassifikationsbäume wurde keine eigene Variablenselektion durchgeführt, denn weitere Parameter hätten auch noch gleichzeitig und gegenseitig optimiert werden müssen. Stattdessen wurden die mittels LDA und knN ausgewählten Variablensets übernommen und getestet [Tab. 4.2].

Bei der LDA steigt die Reklassifizierungsrate durch Auswahl von Päac, Maac und Macu am schnellsten [Tab. 4.2, links], die bei der Wilks' Lambda-Variablenselektion auch ausgewählt wurden. Mit weiteren 4 Variablen konnte eine Reklassifizierungsrate von 92,9% erreicht werden, die auch durch die Kreuzvalidierung bestätigt wurde. Der Anteil an sicher ($P > 0,95$) reklassifizierten und kreuzvalidierten Weinen (82,9% und 82,4%) ist allerdings schlechter, als

mit der Wilks' Lambda-Selektion. Ein Vergleich der beiden Klassifizierungen ist anhand Abb. 4.2 möglich. Detaillierte Ergebnisse der Klassifizierung sind in Anhang D.3 angegeben.

Tab. 4.2 Variablenauswahl gemäß maximaler Zunahme der Reklassifizierungsrate bei LDA bzw. knN ($k=3$)

Reihenfolge bei LDA		Reklassifizierung (%)		Reihenfolge bei knN		Reklassifizierung (%)	
	Variable	LDA	K.-baum		Variable	knN	K.-baum
1	Päcu	58,2	70,0	1	Peac	66,5	keine sinnvolle Klassif.
2	Maac	72,4	85,3	2	Päcu	92,4	
3	Macu	84,7	84,1	3	Pä	95,3	
4	Pe	88,8	87,1	4	A3	97,1	
5	Vita	90,0	-	5	Ma2	97,6	
6	Ma	91,8	95,9	6	Cy	97,6	
7	Deac	92,9	95,9	7	Macu	97,6	
sicher mit $P > 0,95$		82,9	-	sicher (3/3 korrekt)		93,5	
Kreuzvalidierung		93,5	90,8	Kreuzvalidierung		97,6	
sicher mit $P > 0,95$		82,4	-	sicher (3/3 korrekt)		90,0	

Bei den Klassifikationsbäumen ermöglichten diese Variablen sowohl eine bessere Reklassifizierung als auch eine bessere Vorhersagegüte, als die Wilks' Lambda-selektierten Variablen [vgl. Abb. 4.3 und Tab. 4.2]. Der Klassifikationsbaum und die Koeffizienten der multivariaten Entscheidungen sind Abb. 4.5, bzw. Anhang D.5 zu entnehmen.

Mit der knN-Methode konnte bereits mit 4 Variablen eine Reklassifizierungsrate von 97,1% erreicht werden [Tab. 4.2, rechts]. Das Hinzufügen weiterer Variablen erhöhte noch den Anteil an sicher reklassifizierten und kreuzvalidierten Weinen. Die 7 selektierten Variablen stimmen gut mit denen aus der Wilks' Lambda-Auswahl überein, nur Maac wurde durch Cy und A3 ersetzt. Diese Änderung steigert vor allem die sicheren Reklassifizierungen und Kreuzvalidierungen (93,5% bzw. 90,0%) und ergibt die beste Trennung zwischen den Sorten. Diese Variablenauswahl ermöglichte dagegen keine nennenswerte Klassifizierung mittels Klassifikationsbäumen: die Schwarzriesling-Proben bildeten keine eigene Gruppe, und die Spätburgunder- und Trollinger-Weine wurden sehr schlecht diskriminiert.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Güte der Modelle von der Variablenselektion stark abhängt. Die LDA schneidet mit den Variablen gemäß Wilks' Lambda-Optimierung besser ab, bei der Methode der knN ist es besser, die Reklassifizierungsrate maximal zu steigern. Ähnliche Ergebnisse wurden von *van der Voet et al.* veröffentlicht [127]. Bei Klassifikationsbäumen ist eine interne Variablenselektion kaum möglich. In der vorliegenden Arbeit erwiesen sich die von der LDA übernommenen Variablen gemäß maximaler Reklassifizierung am besten.

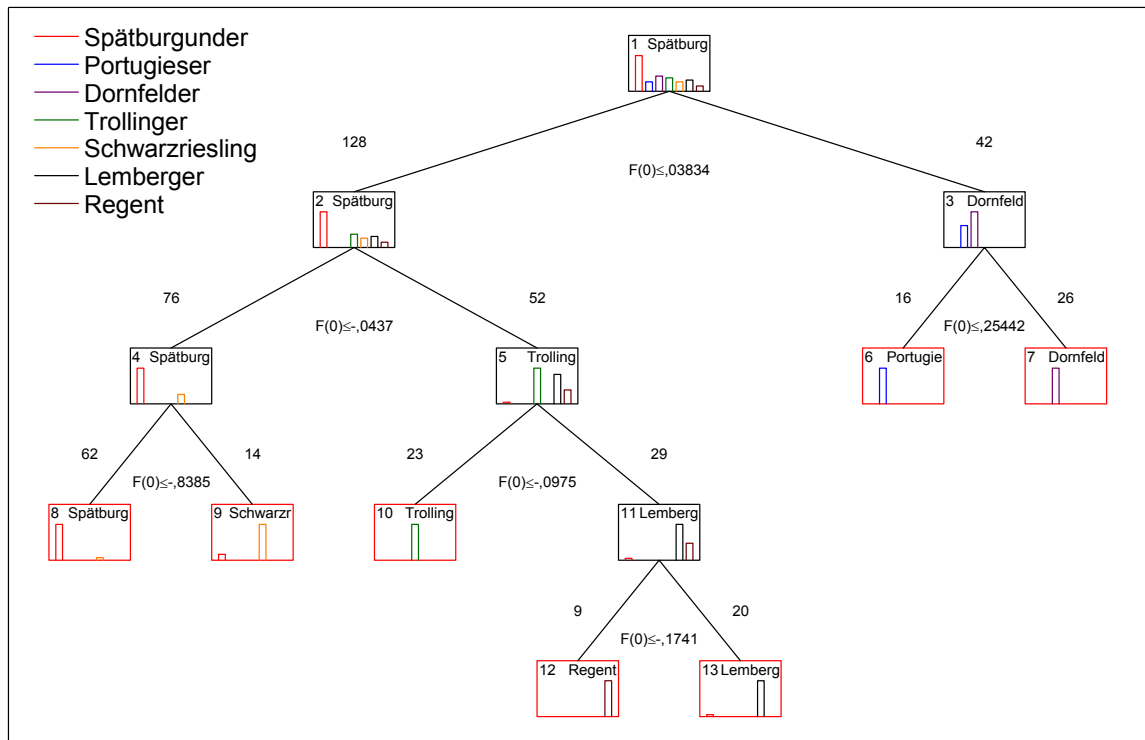


Abb. 4.5 Klassifikationsbaum mit den Variablen aus LDA gemäß Maximierung der Reklassifizierungsrate

Unter den 3 untersuchten chemometrischen Methoden lieferte knN die besten Ergebnisse, nur diese Methode mit $k=3$ konnte den Lerndatensatz mit mehr als 95%-iger Trefferquote kreuzvalidieren, davon 90% sicher mit 3/3 korrekten Nachbarn [Tab. 4.2]. Die LDA und die Klassifikationsbäume waren geringfügig schlechter. Von diesen beiden Methoden war die LDA zuverlässiger: sie hat zwar etwas niedrigere Reklassifizierungsraten gezeigt als die Klassifikationsbäume, diese Werte blieben aber auch in der Kreuzvalidierung erhalten.

Der Hauptanteil der Fehlklassifizierungen ist auf zwei Sortenpaare zurückzuführen: wie Abb. 4.2 auch zeigt, die Sorten Portugieser und Dornfelder überlappen stark, Spätburgunder und Schwarzriesling vollständig, zumindest im Raum der ersten 3 kanonischen Variablen. Es wird untersucht, ob diese Sortenpaare mittels zweistufigen Klassifizierungen besser diskriminiert werden können.

4.2.2.1 Zweistufige Klassifizierungen der Sorten

Die große Ähnlichkeit zwischen den Anthocyanmustern von Blauer Spätburgunder und Schwarzriesling ist bekannt [67] und mit der engen biologischen Verwandtschaft erklärbar (Burgunder-Gruppe, Abb. 4.6). Unter den Elternteilen von Dornfelder sind alle wichtigen

deutschen Stammsorten vertreten. Wie in Tab. 4.1 und im Kapitel 4.2.2 gezeigt, ist der Anthocyanfingerprint von Dornfelder unter diesen am meisten von Portugieser geprägt.

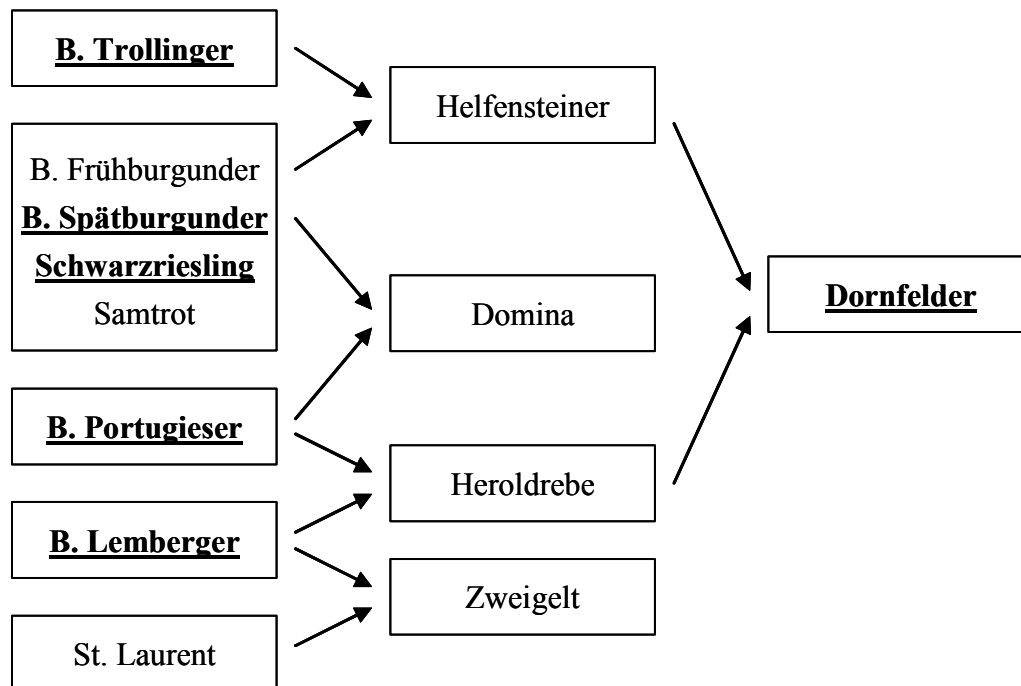


Abb. 4.6 Genetische Abstammung der wichtigeren deutschen blauen Rebsorten

Zur Verbesserung der Diskriminierung zwischen diesen sehr ähnlichen Sorten wurden zweistufige Klassifizierungen durchgeführt, ähnlich wie von *Eder et al.* durchgeführt [40]. Zuerst wurden vereinigte Gruppen von Spätburgunder und Schwarzriesling (Gruppe „Burgunder“) bzw. Portugieser und Dornfelder (Gruppe „Gleich“ wegen ihrer „annähernd gleichmäßigen Anthocyanverteilung“ nach *Wenzel et al.* [40]) gebildet und Klassifizierungen durchgeführt: „Gruppentrennung“. Im zweiten Schritt wurden nur die Sorten innerhalb den Mischgruppen klassifiziert: Burgunder- und „Gleich“-Trennung. Auch bei der zweistufigen Vorgehensweise wurden alle 3 chemometrischen Methoden mit beiden Variablenselektionsmethoden für jede Teilaufgabe einzeln getestet. Im Folgenden werden nur die jeweils besten Ergebnisse dargestellt und diskutiert.

Tab. 4.3 Variablenauswahl gem. Minimierung des Wilks' Lambda bei zweistufiger Klassifizierung mittels LDA

Teilaufgabe	Variablen	Reklassifizierung (%)		Kreuzvalidierung (%)	
		korrekt	sicher	korrekt	sicher
Gruppen-	Ma2, Maac, Päcu, Macu	99,4	98,8	99,4	99,4
Burgunder-	Pä, De, A3, A2	90,9	76,6	90,9	77,9
„Gleich“-	Pe, Päcu, A1	100	100	100	100
Insgesamt		95,3	88,2	95,3	89,4

Bei allen drei Teilklassifizierungen mittels LDA zeigten die Wilks' Lambda-selektierten Variablen die besten Ergebnisse [Anhang D.6]. Die Reklassifizierungsrate von 99,4% bei der Gruppen-Trennung [Tab. 4.3] bedeutet eine einzige fehlklassifizierte Probe aus 170 Proben. Abb. 4.7 stellt die Weine im Raum der ersten 3 kanonischen Variablen dar.

In der zweiten Stufe wurden aus den insgesamt 77 Spätburgunder und Schwarzriesling Proben 7 fehl- und weitere 11 Proben nur unsicher reklassifiziert [Abb. 4.7]. Die Portugieser und Dornfelder Weine konnten dagegen perfekt getrennt werden, wodurch auch die gesamte Klassifizierung mit 95,3% [Tab. 4.3] die einstufige Methode etwas übertrifft.

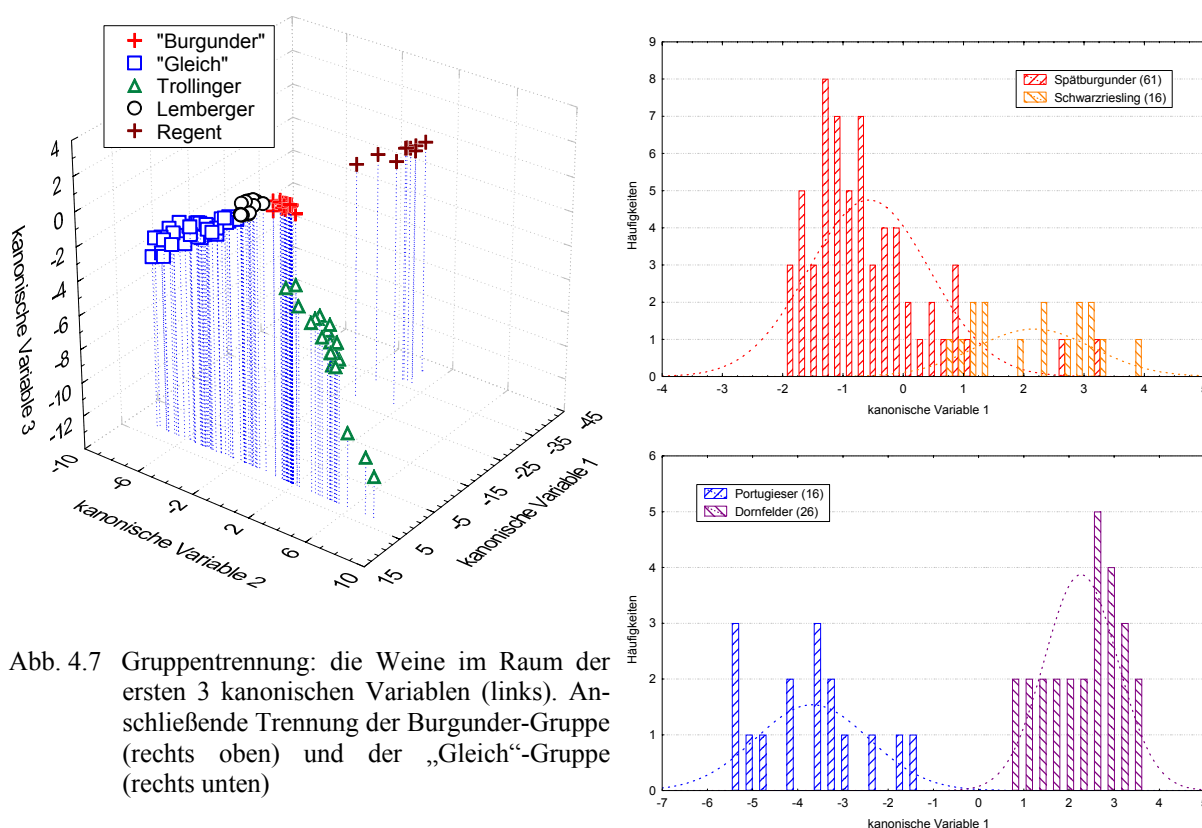


Abb. 4.7 Gruppentrennung: die Weine im Raum der ersten 3 kanonischen Variablen (links). Anschließende Trennung der Burgunder-Gruppe (rechts oben) und der „Gleich“-Gruppe (rechts unten)

Die Wilks' Lambda-selektierten Variablen aus der LDA lieferten unter Verwendung der 3nN die besten Ergebnisse für die Gruppen-Trennung: Alle 170 Proben konnten sicher (3/3 Nachbarn korrekt) zugeordnet werden [Tab. 4.4]. Für die Trennung innerhalb der Burgunder- bzw. „Gleich“-Gruppen eigneten sich die Variablen gemäß Maximierung der Reklassifizierungsrate besser [Anhang D.7]. Da beide letzte Klassifizierungen nur 3 Variablen benötigten, kann die Anordnung der Weine auch graphisch dargestellt werden [Abb. 4.8]. Besonders die Trennung der Spätburgunder und Schwarzriesling Weine gelang hier besser als mittels LDA, weswegen auch die gesamte Klassifizierung mittels zweistufiger 3nN am besten abschneidet [vgl. Tab. 4.2-4].

Tab. 4.4 Variablenauswahl bei zweistufiger Klassifizierung mittels 3-nächsten Nachbarn

Teil-aufgabe	Variablen	Reklassifizierung (%)		Kreuzvalidierung (%)	
		korrekt	sicher	korrekt	sicher
Gruppen-	Ma2, Maac, Päcu, Macu	100	100	100	100
Burgunder-	Pä, A3, Cy	96,1	89,6	94,8	88,3
„Gleich“-	Pe, Macu, Cy	100	100	100	95,2
Insgesamt		98,2	95,3	97,6	93,5

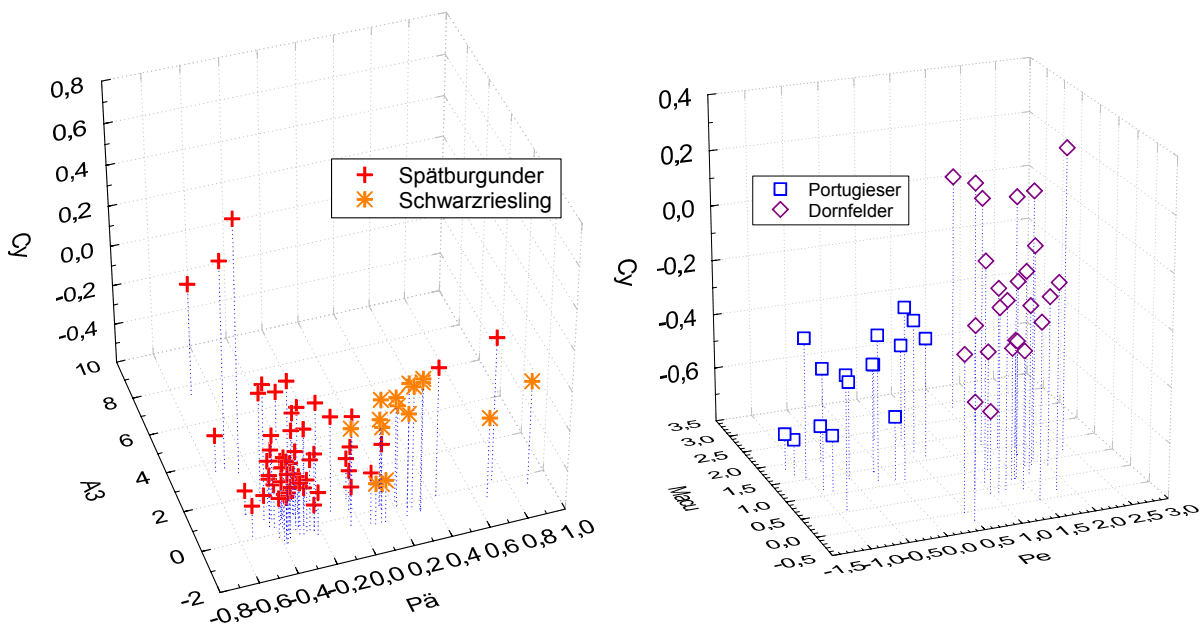


Abb. 4.8 Klassifizierungen mittels 3nN innerhalb der Burgunder- und „Gleich“-Gruppen

Bei den Klassifikationsbäumen gaben für alle 3 Teilaufgaben erneut jene Variablen die besten Ergebnisse, die gemäß Maximierung der Reklassifizierungsrate mittels LDA ausgewählt wurden [Tab 4.5]. Die Diskriminierung zwischen Spätburgunder und Schwarzriesling (Burgunder-Trennung) übertrifft die Ergebnisse der zweistufigen LDA [vgl. Tab. 4.3 und 4.5], was insgesamt eine der LDA ähnliche Klassifizierung ergibt.

Tab. 4.5 Variablenauswahl bei zweistufiger Klassifizierung mittels Klassifikationsbäumen

Teil-aufgabe	Variablen	Reklassifizierung (%)		Kreuzvalidierung (%)	
		korrekt	sicher	korrekt	sicher
Gruppen-	Päcu, Maac, Macu, Ma2	97,7	-	96,9	-
Burgunder-	Pä, A3, A2	96,1	-	90,9	-
„Gleich“-	Pe, Päcu	100	-	100	-
Insgesamt		95,9	-	92,9	-

Der Baum-Graph der Gruppen-Trennung ist in Abb. 4.9 dargestellt, die Klassifizierung ist geringfügig schlechter als mittels der anderen zwei Methoden [Tab. 4.5]. Die Koeffizienten der multivariaten Entscheidungen sind Anhang D.8 zu entnehmen.

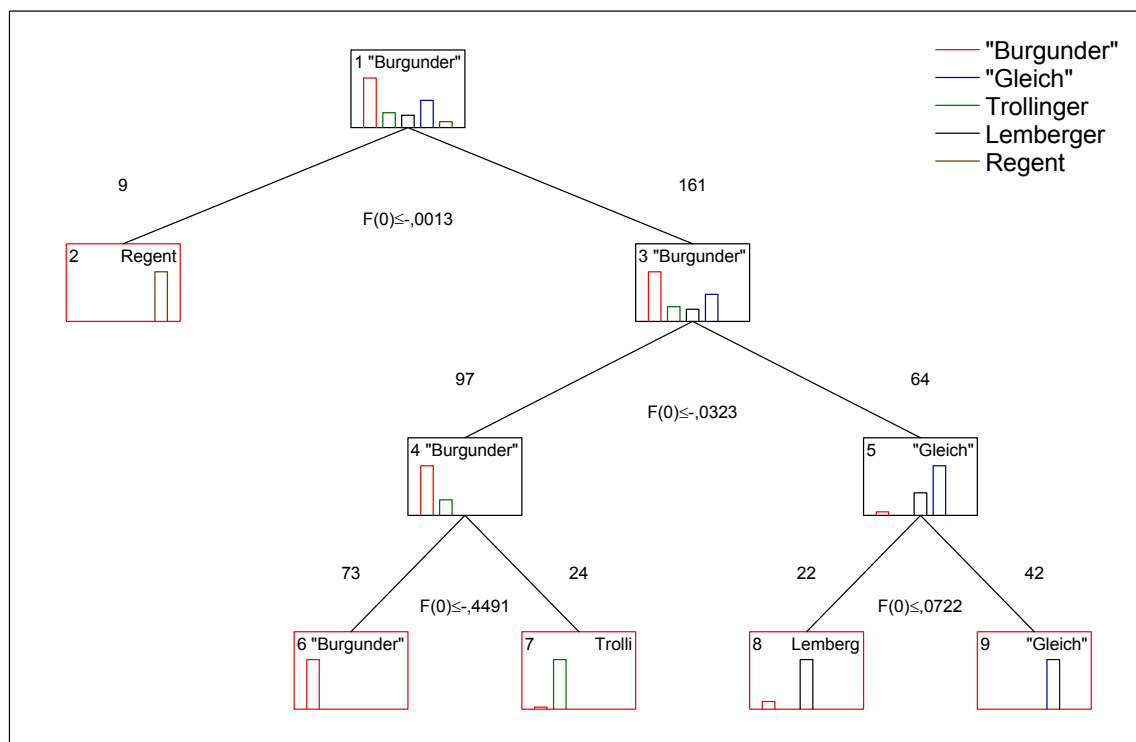


Abb. 4.9 Gruppentrennung mittels Klassifikationsbaum

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass eine zweistufige Klassifizierung bei allen drei chemometrischen Methoden bessere Ergebnisse liefert als die direkte einstufige Klassifizierung [Tab. 4.6]. Die Verwechslungen zwischen Portugieser und Dornfelder konnten eliminiert werden, und die eng verwandten Sorten Spätburgunder und Schwarzriesling konnten mittels 3nN auch mit fast 90%-iger Trefferquote vorhergesagt werden.

Tab. 4.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

	LDA		3-nächsten Nachbarn		Klassifikationsbaum	
	einstufig	zweistufig	einstufig	zweistufig	einstufig	zweistufig
Reklassifizierung (%)	92,9	95,3	97,6	98,2	95,9	95,9
sicher (%)	86,5	88,2	93,5	95,3	-	-
Kreuzvalidierung (%)	91,2	95,3	97,6	97,6	90,8	92,9
sicher (%)	87,1	89,4	90,0	93,5	-	-

Bei jeder Methode und für jede Teilaufgabe (bis auf die Gruppen-Trennung mittels 3nN) erwiesen sich die gleichen Variablenselektionsmethoden als optimal wie bei den direkten Klassifizierungen. Daher kann darauf geschlossen werden, dass die Variablenselektion stärker von der eingesetzten chemometrischen Methode als vom Klassifizierungsproblem abhängt.

4.2.3 Einfluss von Jahrgang, Alter und Technologie auf den Anthocyanfingerprint

Der Einfluss der Rebsorten auf den Anthocyanfingerprint ist so dominierend, dass gleichzeitige Klassifizierungen von Weinen verschiedener Sorten nach Herkunft, Jahrgang, Alter oder Kellertechnologie nicht möglich ist. Diese sekundären Effekte können höchstens bei jeder Sorte einzeln untersucht werden. Aufgrund des Probensatzes, dessen Zusammenstellung sich nach einer möglichst großen Vielfalt bzgl. Jahrgang, Alter und Technologie richtete, konnten solche Auswertungen nur beschränkt durchgeführt werden. In vielen Fällen mangelte es an einer für die Statistik ausreichenden Anzahl von Proben in den einzelnen Untergruppen.

Der Einfluss der Herkunft auf den Anthocyanfingerprint wurde nicht untersucht, da die einzelnen Sorten keine Variabilität bezüglich Herkunft aufwiesen. Alle untersuchten Spätburgunder, Portugieser, Dornfelder und Regent Weine stammen aus der Pfalz, hingegen praktisch alle Trollinger, Schwarzriesling und Lemberger aus Württemberg [Anhang C.2].

4.2.3.1 Vergleich der Einflussgrößen von Jahrgang/Alter und Technologie

In diese Untersuchungen konnten nur diejenigen Weine mit einbezogen werden, bei denen Information über die angewendete Kellertechnologie zur Verfügung stand und höchstens als „geringfügig gestört“ eingestuft wurden [Kapitel 4.1.1, bzw. Anhang C.2]. Diese Proben entstanden im Rahmen verschiedenster kellertechnologischen Versuchszwecke, weshalb lediglich eine grobe Einstufung der Proben erfolgte, und zwar nach der Art der Wärmebehandlung: Maischegärung, -Erwärmung, -Erhitzung [Anhang C.3]. Aufgrund der geringen Anzahl dieser gut dokumentierten Weine kamen überwachte Klassifizierungsmethoden nicht in Frage, sondern nur Hauptkomponentenanalysen (HKA) wurden durchgeführt. Die Eigenwerte und Ladungen der extrahierten Hauptkomponenten sind im Anhang D.9 angegeben.

Bei den zuerst untersuchten Dornfelder Weinen handelte es sich um Weine aus identischem Traubengut, wo ausschließlich die Kellertechnologie variierte [123]. Zusätzliche Unterschiede bzgl. Jahrgang und Alter waren also nicht vorhanden. Abb. 4.10 zeigt die Weine im Raum der ersten zwei Hauptkomponenten. Nicht einmal eine grobe Gruppierung zwischen den Weinen

aus Maischegärung und Maischeerwärmung ist festzustellen, selbst die Gärwiederholungen sind abgesehen von D96V1-1 und D96V1-2 sehr zerstreut. Dies deutet auf einen geringen Einfluss der Kellertechnologie auf den Anthocyanfingerprint hin.

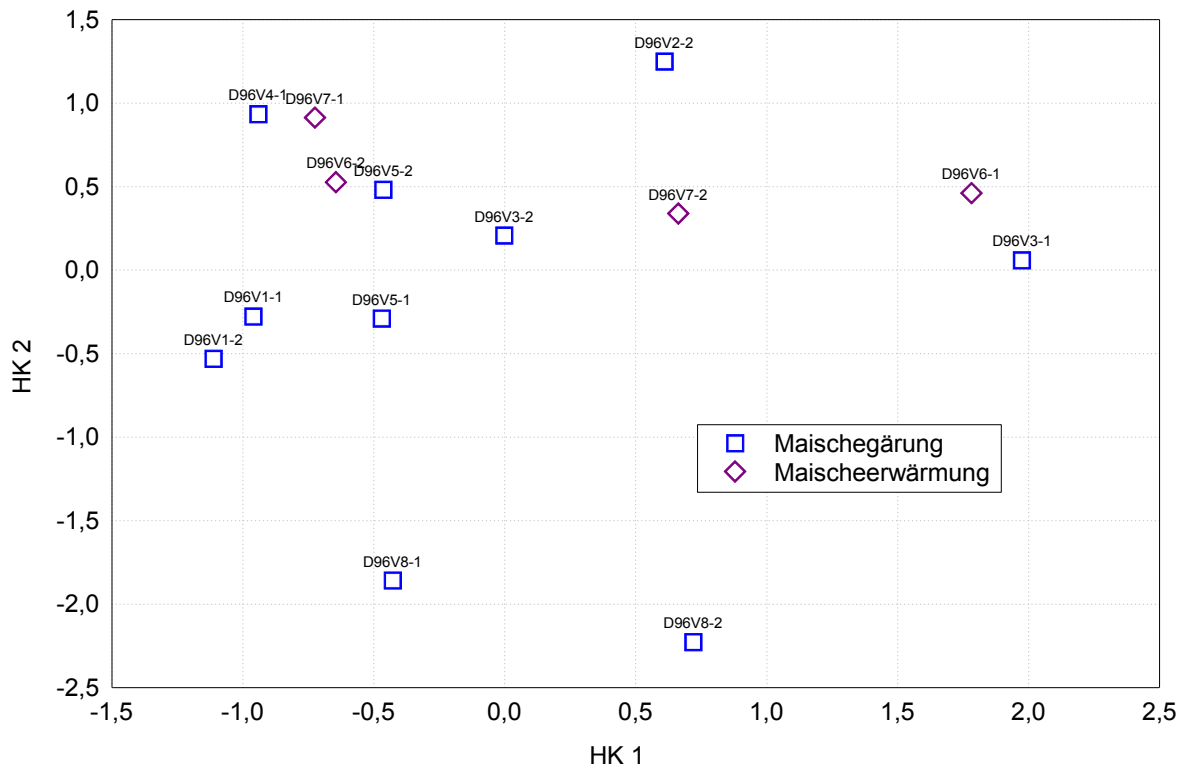


Abb. 4.10 Scoreplot von Dornfelder Weinen von bekannter Kellertechnologie

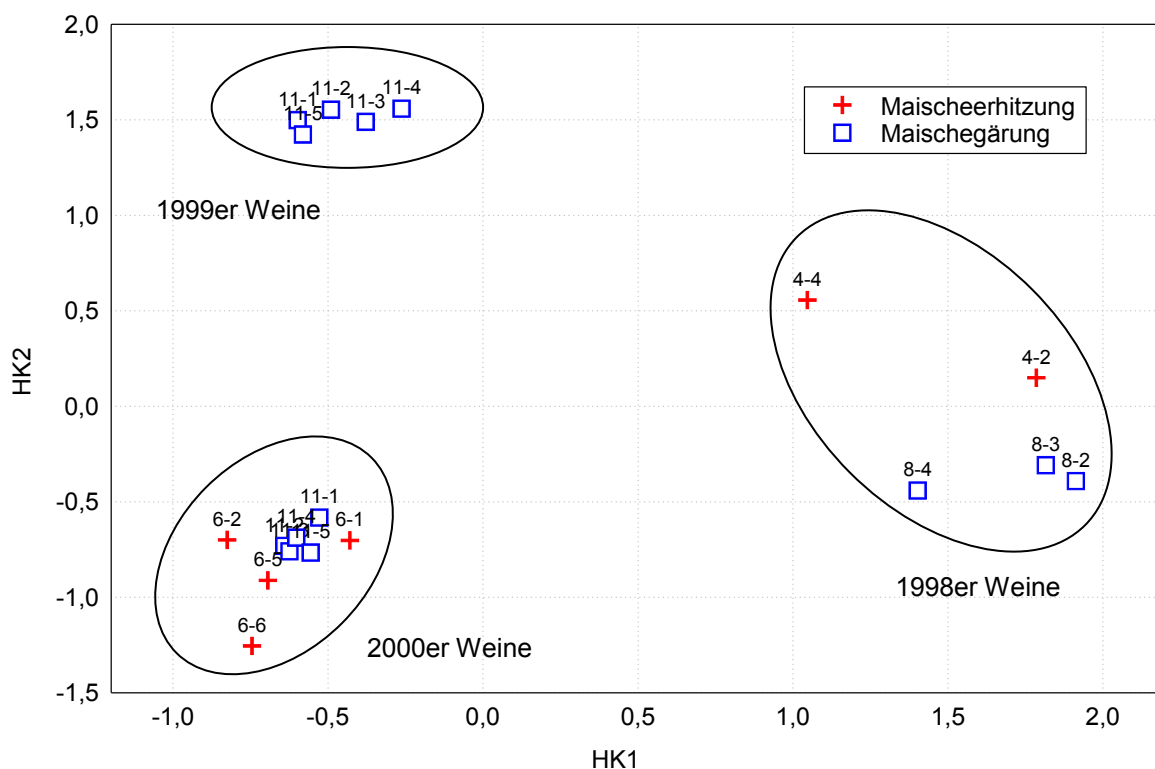


Abb. 4.11 Scoreplot von Lemberger Weinen von bekannter Kellertechnologie

Die Lemberger, Schwarzriesling und Spätburgunder Weine waren bzgl. Jahrgang und Alter nicht mehr homogen. Daher konnte bei diesen Sorten verglichen werden, ob der Jahrgang und Alter oder die Kellertechnologie das Anthocyanmuster stärker beeinflussen.

Eine deutliche Trennung ist nur bei den Lemberger Weinen zu beobachten und zwar eindeutig nach dem Jahrgang/Alter [Abb. 4.11]. Ein Effekt der Kellertechnologie kann nicht nachgewiesen werden, nur eine schwache Tendenz innerhalb der Gruppe der 1998er Weine.

Bei den Schwarzriesling Weinen sind die einzelnen Untergruppen gut erkennbar, also die Abweichungen innerhalb der Versuchsserien sind geringer als zwischen ihnen [Abb. 4.12]. Bei der Anordnung der Gruppen ist ein Jahrgang-Effekt hervorzuheben: HK1 trennt die 1997er Weine von den anderen. Ein Effekt der Kellertechnologie kommt nur sekundär, innerhalb der 1997er Weine, zur Geltung. Auf eine Ähnlichkeit zwischen den maischegegorenen Weinen gegenüber den Maischeerhitzten kann jedoch nicht geschlossen werden.

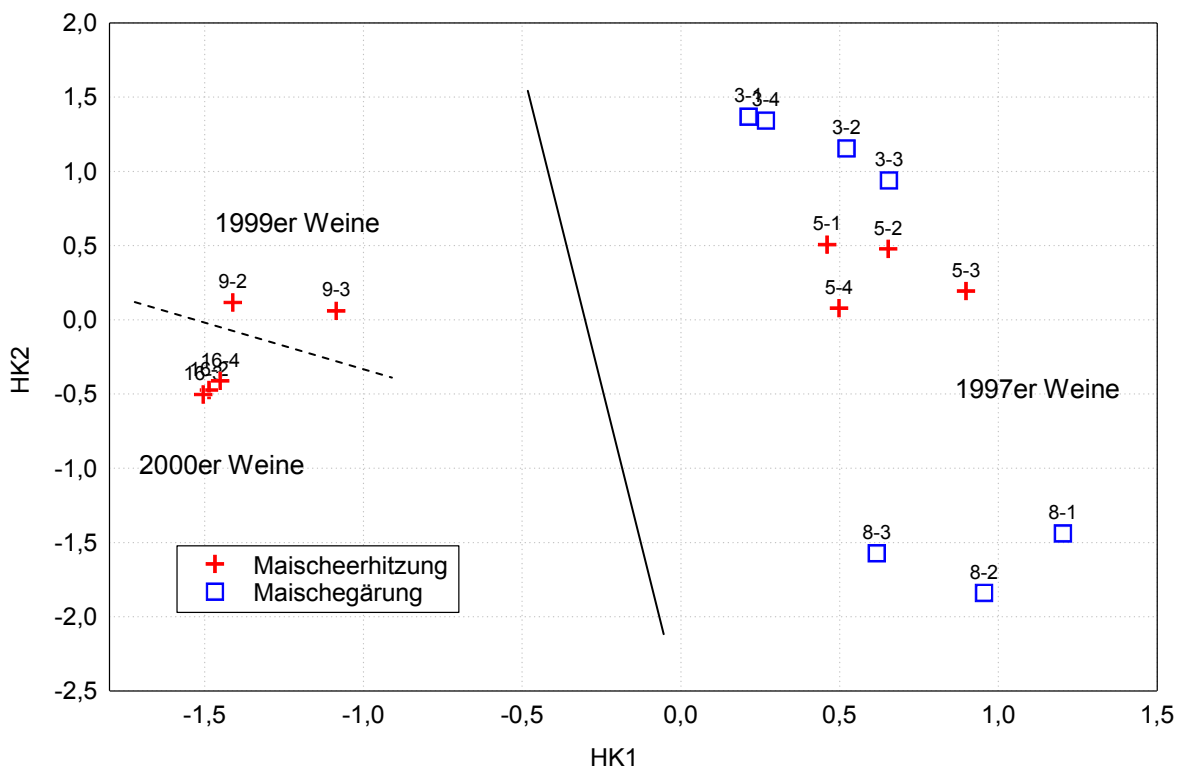


Abb. 4.12 Scoreplot von Schwarzriesling Weinen von bekannter Kellertechnologie

Der Vorteil des relativ großen Probensatzes von Spätburgunder-Weinen war durch den geringen Anteil an maischeerwärmten und maischeerhitzten Weinen wiederum aufgehoben. Die Weine sind auf dem Scoreplot sehr zerstreut, besonders die 1996er Weine, wo selbst viele Gärwiederholungen voneinander weit entfernt liegen [Abb. 4.13]. Mangels deutlicher Gruppen sind auch keine scharfen Trennungen vorhanden, höchstens Tendenzen. Ein Effekt

von Jahrgang/Alter ist hier auch etwas mehr ausgeprägt: die 1996er Weine besitzen höhere Faktorwerte als die 1997er, und befinden sich mehr rechts oben auf dem Scoreplot.

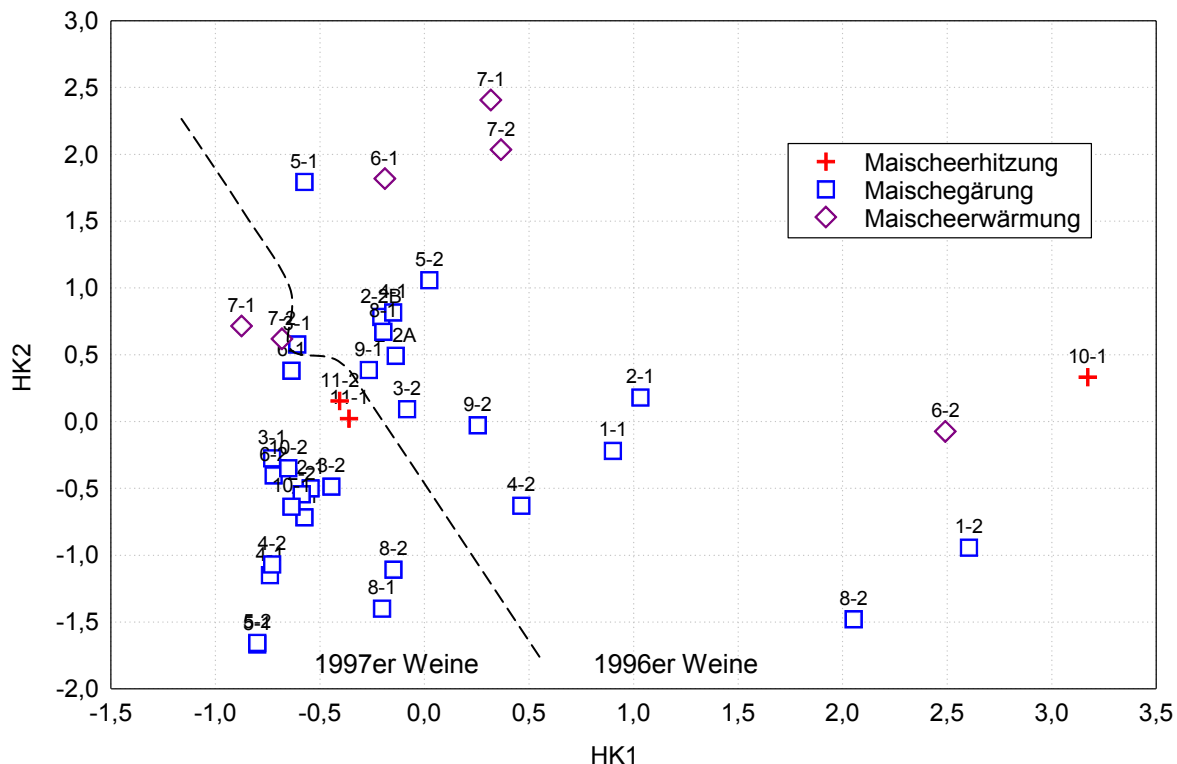


Abb. 4.13 Scoreplot von Spätburgunder Weinen von bekannter Kellertechnologie

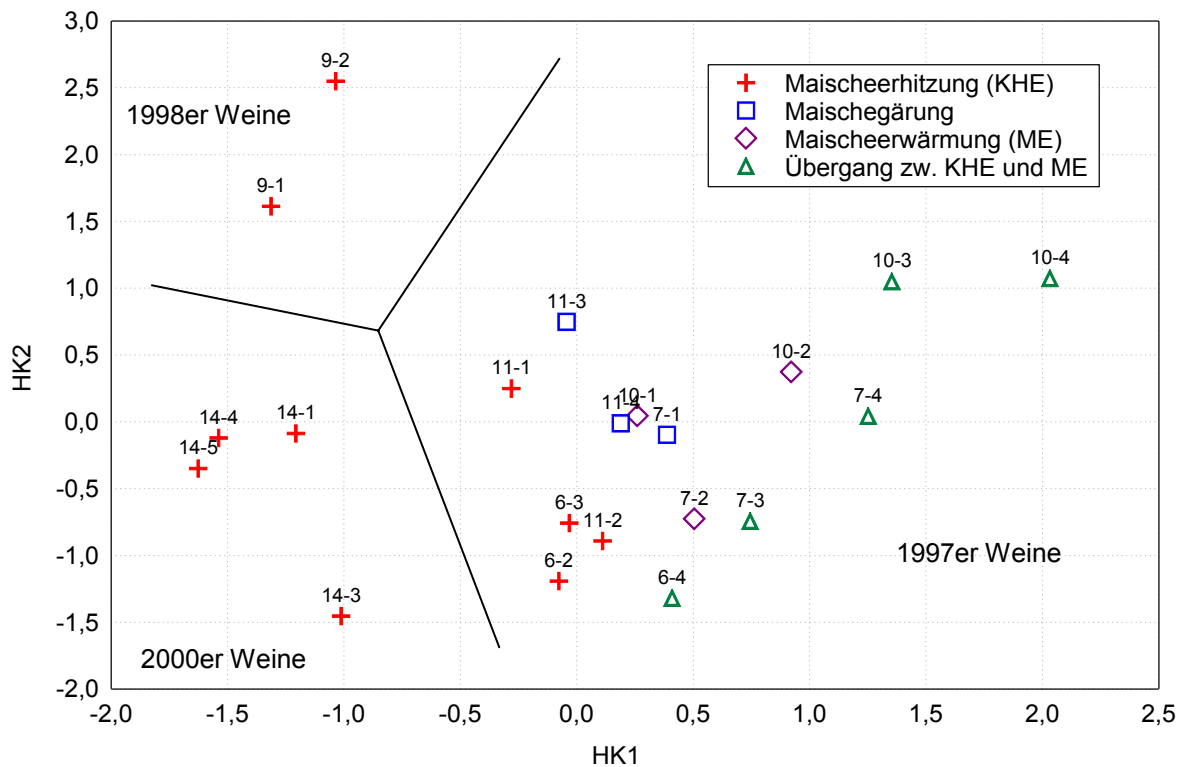


Abb. 4.14 Scoreplot von Trollinger Weinen von bekannter Kellertechnologie

Bei den Trollinger Weinen wurde eine vierte Gärungsart definiert, bei der die angewendete Temperatur der Kurzzeiterhitzung ähnlich war, allerdings mit einer wesentlich längeren Zeitdauer [Anhang C.3]. Somit stellen sie eine Art „Übergang“ zwischen Maischeerhitzung und Maischeerwärmung dar [Abb. 4.14]. Hier sind die Proben auch eher nach Jahrgang/Alter separiert, die Gruppen sind aber nicht so kompakt, wie bei den Lemberger Weinen [Abb. 4.11]. Unter den 1997er Trollinger überlappen die verschiedenen Versuchsserien deutlich (siehe die Beschriftung der Datenpunkte). Die Markierung der Datenpunkte nach Art der Wärmebehandlung stellt auch keine Gruppierung dar.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Kellertechnologie bei den hier untersuchten Proben keinen wesentlichen Einfluss auf den Anthocyanfingerprint ausgeübt hat. Der Effekt des Jahrgangs/Alters ist dagegen bemerkbar, bei Spätburgunder Weinen ist nur eine sehr schwache Tendenz vorhanden, während die Lemberger Weine perfekt getrennt sind. Ob der Effekt zu den verschiedenen Jahrgängen oder zur Veränderung der Weine während der Alterung zurückgeleitet werden kann, ist nicht eindeutig identifizierbar. Da alle Weine der einzelnen Sortengruppen zum selben Zeitpunkt analysiert wurden, hängen Jahrgang und Alter voneinander gegenseitig ab, und die beiden Effekte können rein statistisch nicht aufgelöst werden. Unter Berücksichtigung der Oenologie gibt es Argumente für beide Faktoren.

Tab. 4.7 Zusammenfassung der Ladungen der Variablen an den jeweiligen HK1 [alle HK im Anhang D.9]

Variable	Ladungen an der jeweiligen HK1			
	Lemberger	Trollinger	Schwarzriesling	Spätburgunder
De	0,85	0,14	0,69	0,26
Cy	0,77	0,92	0,67	0,71
Pe	0,81	-0,73	0,78	-0,29
Pä	0,18	0,93	-0,31	-0,63
Ma	-0,78	-0,95	-0,93	-0,97
Deac	-0,49	0,19	-	-
VitA	0,91	-0,29	0,32	0,94
Cyac	0,73	0,93	-	-
Peac	-0,29	0,26	-	-
Päac	-0,33	0,85	-	-
Maac	-0,25	0,18	-	-
A1	0,96	0,60	0,66	0,89
Päcu	-0,83	-0,54	-	-
Macu	-0,48	-0,91	-	-
A2	0,89	0,74	0,80	0,95
A3	0,91	0,76	0,80	0,95

Es fällt auf, dass bei allen Sorten immer die älteren Weine die höheren Faktorwerte besitzen [Abb. 4.11-14]. HK1 trennt den jeweils ältesten Jahrgang mit positiven Faktorwerten von den

anderen Jahrgängen ab, unter denen HK2 ähnlich differenziert. Dabei zählt es nicht, um welche Jahrgänge es geht, sondern nur um die zeitliche Reihenfolge der Jahrgänge. Es wäre ein Argument für die Alterung als wahrer Effekt der Gruppierung. Dies ist weiter verstärkt dadurch, dass HK1 mit den stabilen Addukten bei allen Sorten einheitlich positiv korreliert, während mit dem Hauptvertreter der instabilen Anthocyanen (Ma) eine durchgehend negative Korrelation existiert [Tab. 4.7]. Damit könnte HK1 die Alterung repräsentieren, denn das Verhältnis zwischen den stabilen Addukten und instabilen Anthocyanen nimmt in älteren Weinen tatsächlich zu.

Andererseits, wenn die Alterung so einen ausgeprägten Effekt hätte, sollte die HK1 die übrigen Jahrgänge auch vergleichbar trennen bzw. die Spätburgunder Weine sollten auch besser getrennt werden. Für HK2 und die übrigen unwichtigeren Hauptkomponenten kann keine einzige Variable gefunden werden, die sich bei allen Sorten signifikant und ähnlich verhält [vgl. Ladungen im Anhang D.9], was zur Interpretation eines allgemeingültigen Effektes, wie die Alterung, nötig wäre. Daher ist es wahrscheinlich, dass ein Jahrgang-Effekt auch vorhanden ist. Welcher Effekt schließlich eine größere Rolle spielt, wird im Kapitel 4.2.3.2 anhand geeigneter Probensätze untersucht.

4.2.3.2 Vergleich der Einflussgrößen von Jahrgang und Alter

Effekte von Jahrgang und Alter konnten nur bei Spätburgunder und Dornfelder Weinen untersucht werden, denn nur bei diesen Sorten lagen Analysendaten aus unterschiedlichen Zeitpunkten vor. Das ist eine unabdingbare Voraussetzung, damit Jahrgang und Alter nicht in perfekter Antikorrelation stehen, und Effekte der beiden Faktoren statistisch auflösbar sind. Alle authentischen und höchstens „geringfügig gestörten“ Weine [Anhang C.2] wurden in die statistische Auswertung einbezogen.

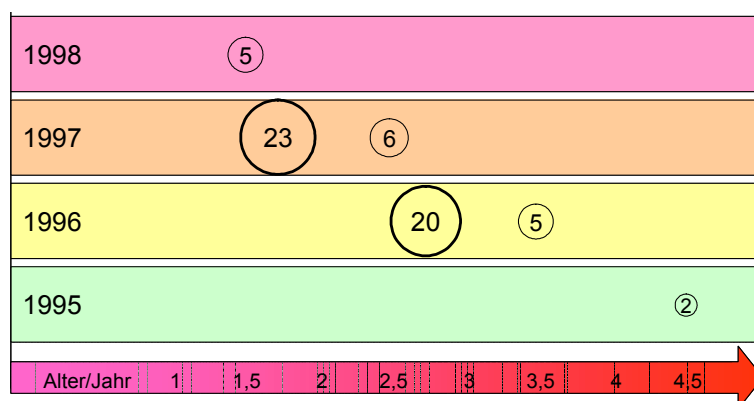


Abb. 4.15 Anzahl der Spätburgunder Weine, geordnet nach Jahrgang und Alter (insgesamt 61 Proben)

Abb. 4.15 zeigt die Verteilung der Spätburgunder-Proben bezüglich Jahrgang und Alter. Die Gruppen der 2,75 Jahre alten Weine von 1996 und der 1,75 Jahre alten Weine von 1997 verfügen über eine ausreichende Probenanzahl für eine überwachte Klassifizierung. Sie wurden mittels schrittweiser LDA klassifiziert, die Variablenauswahl erfolgte gemäß Minimierung des Wilks' Lambda. Bereits mit 3 Variablen (De, P_a, P_e) konnte eine perfekte Reklassifizierung (100%) erreicht werden, davon 93,0% sicher mit $P > 0,95$. Das Ergebnis wurde mittels Kreuzvalidierung bestätigt: auch 100% der Weine wurde korrekt vorhergesagt, davon 93,0% sicher mit $P > 0,95$. Abb. 16 zeigt die Reklassifizierung.

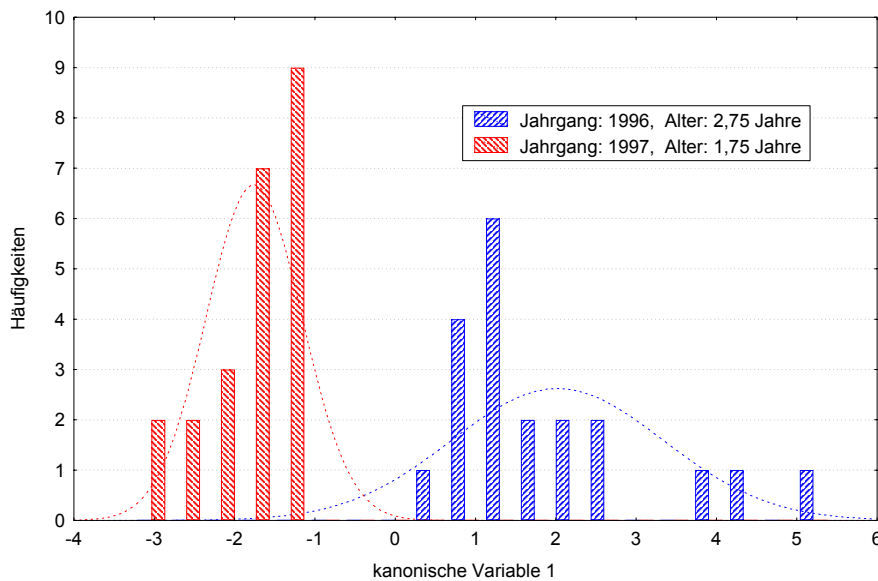


Abb. 4.16 LDA unter Verwendung von De, P_a, P_e: Trennung der Weine entlang der (einzigen) KV

Diese zwei Gruppen unterscheiden sich sowohl angesichts des Jahrgangs als auch des Alters. Welcher der beiden Faktoren die größere Rolle spielt, wurde durch Anwendung der obigen Klassifizierungsregel auf die restlichen Proben untersucht. Tab. 4.8 zeigt die Ergebnisse.

Tab. 4.8 Klassifizierung der übrigen bekannten Spätburgunder-Proben als „Testdatensatz“

Gruppe	wirkliche Charakterisierung		Vorhersage (Anzahl der Proben)	
	Jahrgang	Alter	Jahrgang: 1996 Alter: 2,75 Jahre	Jahrgang: 1997 Alter: 1,75 Jahre
1	1995	4,5	-	2
2	1996	3,5	5	-
3	1997	2,5	-	6
4	1998	1,5	-	5

Das Merkmal „Alter“ wird auf einer verhältnisskalierten Skala gemessen [Abb. 4.15]. Falls bei der Klassifizierung die Alterung der dominierende Faktor wäre, sollten die Proben in den

Gruppen Nr.1 (4,5 Jahre alt), Nr.2 (3,5 Jahre alt) und Nr.3 (2,5 Jahre alt) der Klasse der 2,75 Jahre alten Weine zugeordnet werden. Das ist offensichtlich nicht der Fall [Tab. 4.8], sowohl Gruppe Nr.1 als auch Gruppe Nr.3 wurde eindeutig den jüngeren 1,75 Jahre alten Weinen zugeordnet. Demnach ist es unwahrscheinlich, dass die Alterung der überlegene Effekt ist.

Wenn der Jahrgang als dominierender Effekt angenommen wird, ist kein Widerspruch zu finden. „Jahrgang“ ist eine nominalskalierte Variable, daher ist zunächst nur die Klassifizierung von Gruppe Nr.2 und Nr.3 ausschlaggebend. Beide Gruppen sind bzgl. ihrer Jahrgänge richtig zugeordnet. Ferner kann festgestellt werden, dass die beiden Jahrgänge 1995 (Gruppe Nr.1) und 1998 (Gruppe Nr.4) dem Jahrgang 1997 ähnlicher sind [Tab. 4.8].

Dasselbe Ergebnis wurde mittels knN ($k=3$) unter Verwendung der Variablen Ma, De und Pä erzielt. Weder die LDA noch die Methode der knN selektierte die stabilen Anthocyan-Addukte für die Klassifizierung. Dies ist ein weiterer Hinweis, dass bei einer überwachten Klassifizierung nicht die Alterung das Entscheidende ist.

Die Anzahl der Dornfelder Weine war wesentlich kleiner [Abb. 4.17], daher sind die hier beobachteten Ergebnisse weniger zuverlässig. Die 2,75 Jahre alten 1996er und die 0,75 Jahre alten 1998er Dornfelder Weine wurden erneut mittels schrittweiser LDA klassifiziert, die Variablenauswahl erfolgte gemäß Minimierung des Wilks' Lambda. Bereits mit 2 Variablen (Maac, Macu) konnte eine perfekte Reklassifizierung (100%) erreicht werden, davon auch 100% sicher mit $P>0,95$. Die Vorhersagegüte wurde mittels Kreuzvalidierung bestätigt.

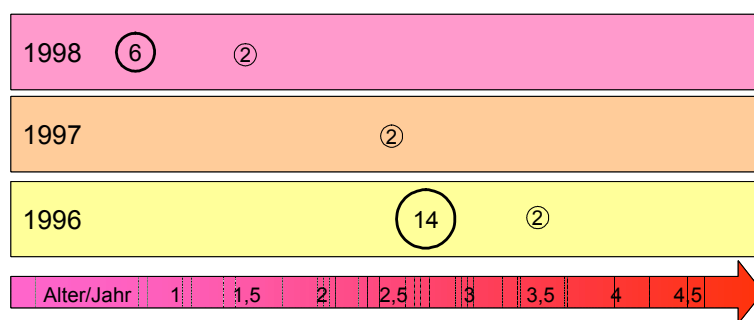


Abb. 4.17 Anzahl der Dornfelder Weine, geordnet nach Jahrgang und Alter (insgesamt 26 Proben)

Mittels der erstellten Klassifizierungsregel wurden die übrigen 6 Proben klassifiziert, die Ergebnisse sind Tab. 4.9 zu entnehmen. Die Klassifizierung der Gruppen Nr.1 und Nr.3 ist sowohl bzgl. des Jahrgangs als auch bzgl. des Alters korrekt. Die Wichtigste ist aber Gruppe Nr.2, deren Weine zwar keinem der beiden Jahrgänge zugehören, ihr Alter von 2,5 Jahren liegt aber den 2,75 Jahre alten Weinen viel näher als den 0,75 Jahre alten Weinen.

Gruppe Nr.2 wurde trotzdem den jüngeren 1998er Weinen zugeordnet, was dafür spricht, dass das Alter nicht der wichtigste Effekt sein kann.

Tab. 4.9 Klassifizierung der übrigen bekannten Dornfelder-Proben als „Testdatensatz“

Gruppe	wirkliche Charakterisierung		Anzahl der vorhergesagten Proben	
	Jahrgang	Alter	Jahrgang: 1996 Alter: 2,75 Jahre	Jahrgang: 1998 Alter: 0,75 Jahre
1	1996	3,5	2	-
2	1997	2,5	-	2
3	1998	1,5	-	2

Bei einer solch kleinen Anzahl von Proben kann aber nicht eindeutig behauptet werden, dass der Jahrgang der wahre Effekt ist, selbst wenn die beiden Jahrgänge 1997 und 1998 auch bei den Spätburgundern als ähnlich ausgefallen sind. Ein weiterer Grund, die Ergebnisse vorsichtig zu interpretieren, ist, dass die beiden Variablen im Modell (Maac, Macu) praktisch das Verhältnis der acetylierten und coumarylierten Anthocyane repräsentieren, auf das sich auch die Kellertechnologie auswirken kann.

Um einen Effekt der Kellertechnologie möglichst auszuschließen, wurde die chemometrische Auswertung ohne die acylierten Anthocyane wiederholt. Die Normierung erfolgte auch nur unter den freien Anthocyanen und Addukten. Mit 3 Variablen (A2, Cy, Pe) konnte eine perfekte Reklassifizierung (100%) erreicht werden, davon auch 100% sicher mit $P > 0,95$. Die Kreuzvalidierung ergab auch eine Vorhersagegüte von 100%. Die Klassifizierung ist in Abb. 4.18 dargestellt.

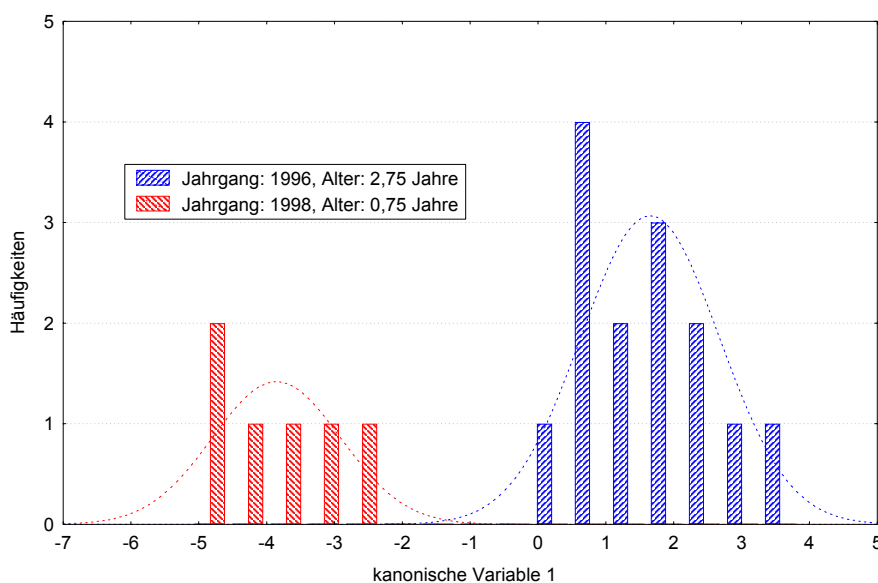


Abb. 4.18 LDA unter Verwendung von A2, Cy, Pe: Trennung der Weine entlang der (einzigen) KV

Die Klassifizierung der übrigen 6 Proben mittels dieses Modells lieferte dasselbe Ergebnis, wie früher mit den Variablen Maac und Macu [Tab. 4.9]. Außerdem wurde auch im Falle der Dornfelder Weine die Methode der knN ($k=3$) eingesetzt, die die mittels der LDA erhaltenen Ergebnisse mit und ohne die acylierten Anthocyane bestätigte. Bei einer überwachten Klassifizierung tritt also der Effekt des Jahrgangs gegenüber dem Alter hervor.

Es besteht nur eine scheinbare Diskrepanz zwischen diesen Ergebnissen und denen der HKA [Kapitel 4.2.3.1]. Die HKA spiegelt die natürliche Struktur der Daten wider, wonach tatsächlich die Alterung für die größte Varianz im Datensatz verantwortlich ist, repräsentiert durch die relative Zunahme der stabileren Anthocyan-Addukte. Die Größe dieses Effekts ist jedoch nicht einheitlich genug, die Grundlage einer Klassifizierung zu werden. Verschiedene Weine altern unterschiedlich schnell, was zu Überlappungen zwischen den Weinen verschiedenen Alters führt.

Überwachte Klassifizierungsmethoden selektieren andere Variablen, mit denen diskrete Gruppen gebildet werden können, auch wenn die von ihnen verursachte Varianz geringer ist. Der Jahrgang hat gerade solch einen diskreten Effekt, und die Unterschiede zwischen den verschiedenen Jahrgängen sind vielmehr durch die herkömmlichen Anthocyane repräsentiert. Solange diese instabilen Anthocyane im Wein noch nicht allzu sehr abgebaut sind, bleiben die jahrgangsbedingte Unterschiede im Anthocyanfingerprint erhalten. Es ist in Übereinstimmung mit den Beobachtungen von *Leone et al.* [84], *Nagel und Wulf* [90] und *Eder et al.* [41], dass der Fingerprint sich während den ersten Jahren der Alterung wenig ändert, vor allem wenn man berücksichtigt, dass diese Autoren keine Addukte in den Anthocyanfingerprint einbezogen haben.

Die Ergebnisse zeigen auch, dass die von *Wenzel et al.* beschriebenen „vorhandenen, jedoch nicht sehr großen“ Unterschiede bzgl. des Jahrgangs [130] unter Einbeziehung statistischer Verfahren ausreichen können, Weine nach Jahrgang zu klassifizieren. Abb. 4.19 zeigt die Klassifizierung aller 1996er und 1997er Spätburgunder Weine mittels LDA.

Aus 54 Proben wurden 53 (98,1%) korrekt, davon 41 (75,9%) sicher mit $P>0,95$ klassifiziert. Diese Ergebnisse zeigen, dass die zwei Jahrgänge etwas unsicherer klassifizierbar sind, wenn sie bezüglich des Alters nicht homogen sind [vgl. Abb. 4.16 und 4.19]. Der Effekt der Alterung macht sich also dadurch bemerkbar, dass jahrgangsbedingte Unterschiede verwischt werden. Daher ist es auch unwahrscheinlich, dass viele Jahrgänge simultan klassifizierbar sind, besonders wenn das Alter der Proben sehr streut.

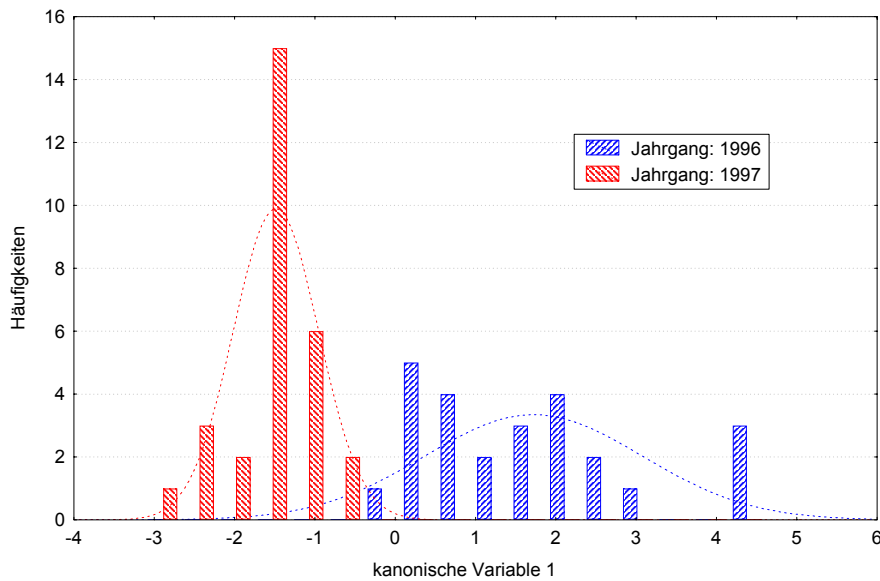


Abb. 4.19 LDA unter Verwendung von De, Pe, Pä: Trennung der Weine entlang der (einzigen) KV

4.3 Klassifizierung unbekannter Weine

4.3.1 Anwendung der Klassifizierungsmodelle auf die verdächtigen und unbekanntenen Weine

Die im Kapitel 4.2.2 errechneten Klassifizierungsregeln wurden auf die übrigen authentischen Weine und auf die kommerziellen Weine angewendet. Die Ergebnisse sind im Anhang D.10 in drei Tabellen aufgelistet. In der ersten Tabelle befinden sich die authentischen Weine, die einen vom typischen abweichenden Fingerprint besitzen. Kleine Mengen von Diglukosiden stören die Klassifizierungen kaum. Größere Mengen verursachen oft Fehlklassifizierungen, diese Weine werden allerdings meistens als Lemberger erkannt. Nur die zweistufige Klassifizierung mittels Klassifikationsbäumen ordnet diese Weine der Sorte Regent zu. Ein Mangel an acetylierten Anthocyanen bei Portugieser und Dornfelder Weinen ist sehr kritisch. Da bei diesen Weinen nur die acetylierten, jedoch nicht die coumarylierten Anthocyane fehlen, besitzen sie einen Fingerprint ähnlich dem der Sorte Lemberger [vgl. Kapitel 4.1.2]. Deshalb sind diese Weine als Lemberger fehlklassifiziert. Die Präsenz der acylierten Anthocyane bei den Sorten Spätburgunder und Schwarzriesling ist auch kritisch. Abgesehen vom Spätburgunder Nr.122 sind diese Weine vorwiegend fehlklassifiziert.

Angenommen, dass der Fingerprint dieser Weine nur durch zufällige Kontaminationen, aber nicht durch absichtlichen Versatz verändert wurde, sind die Entscheidungen der multivariaten

Methoden als ziemlich streng anzusehen. Daraus folgt, dass mittels dieser Methoden eher nur die Bestätigung eines sortenreinen Weines erfolgen kann, falls die Klassifizierung korrekt ist, aber eine Fehlklassifizierung noch nicht unbedingt auf einen unerlaubten Verschnitt hinweist. Ein weiterer Nachteil ist, dass der Ursprung der Abweichungen und die resultierenden (Fehl-) Klassifizierungen nicht konsistent sind, z. B. Diglukosid-Kontamination und Klassifizierung als Lemberger.

Die Präsenz von Diglukosiden verursacht auch bei den kommerziellen Weinen viele Fehlklassifizierungen, aber auch diese Weine wurden nur durch die zweistufige Klassifizierung mittels Klassifikationsbäumen der Sorte Regent zugeordnet [Anhang D.10, zweite Tabelle]. Diese Weine wurden nur mittels zweistufiger knN korrekt klassifiziert, ähnlich wie bei den authentischen Weinen, wo auch die zweistufige knN die wenigsten Fehlklassifizierungen zu verbuchen hatte. Bei den zwei Portugiesern (Nr.242, 257) waren nicht nur die acetylierten, sondern auch die coumarylierten Anthocyane stark abgebaut, deshalb wurden sie meistens nicht als Lemberger, sondern als Schwarzriesling oder „Burgunder“ klassifiziert. Ein umgekehrter Effekt durch das Vorhandensein von acylierten Anthocyanen in Weinen der Burgunder-Gruppe war dagegen nicht so eindeutig. Nur in 7 Fällen (Nr.239, 217, 223, 235, 260, 241, 269) tendieren die Zuordnungen in Richtung der „Gleich“-Gruppe oder der Sorte Lemberger. Bei den übrigen Weinen spiegelt sich eher die schwere Trennbarkeit zwischen Spätburgunder und Schwarzriesling wider. Eine vierte Kategorie bildeten hier die Weine mit sehr stark abgebautem Anthocyanfingerprint. Dennoch wurden diese Proben recht gut klassifiziert.

In der dritten Tabelle von Anhang D.10 sind die kommerziellen Weine angegeben, die anscheinend einen akzeptablen Fingerprint aufwiesen. Die wenigen Proben von Sorten Trollinger, Lemberger und Regent wurden meistens problemlos klassifiziert. Mit den schwer trennbaren Sorten konnten nicht so gute Ergebnisse erzielt werden. Als positiv kann hervorgehoben werden, dass Verwechslungen nur innerhalb der beiden Sorten-Paare Spätburgunder-Schwarzriesling und Portugieser-Dornfelder vorkamen, nicht aber zwischen vollkommen fremden Sorten. Die Unterscheidung zwischen Spätburgunder und Schwarzriesling ist sehr schwach ausgeprägt. Es gibt mehr Verwechslungen als korrekte Zuordnungen. Die Erkennung von Portugieser Weinen war noch am besten, abgesehen davon, wenn es mittels 3nN erfolgte. Dornfelder Weine wurden leider auch sehr häufig als Portugieser klassifiziert.

Tab. 4.10 fasst die Ergebnisse zusammen. Unter den einstufigen Klassifizierungen erreichte die LDA die höchste Klassifizierungsrate mit 60,9%. Das ist zum Teil den besseren Zuord-

nungen der akzeptablen kommerziellen Weine zu verdanken, aber leider auch der weniger strengen Erkennung von Spätburgunder und Schwarzriesling Weinen, die fremde acylierte Anthocyane aufwiesen [Anhang D.10]. Die beiden anderen Methoden stellen das Gegenteil dar: sie erkannten Weine mit untypischem Fingerprint viel konsequenter, aber bei den akzeptablen kommerziellen Weinen haben sie sehr viel Proben nicht korrekt klassifiziert.

Tab. 4.10 Zusammenfassung der Ergebnisse

	LDA		3-nächsten Nachbarn		Klassifikationsbaum	
	einstufig	zweistufig	einstufig	zweistufig	einstufig	zweistufig
Klassifizierung (%)	60,9	62,3	40,6	53,6	43,5	33,3
sicher (%)	50,7	39,1	34,8	40,6	-	-
zweistufige Klassifizierung nur bis Gruppen-Trennung:						
Klassifizierung (%)	-	79,7	-	73,9	-	44,9
sicher (%)	-	71,0	-	66,7	-	-

Eine zweistufige Arbeitsweise erhöht nur bei der Methode der 3-nächsten Nachbarn die Klassifizierungsrate (53,6%). Tab. 4.10 zeigt auch, dass bei LDA und 3nN ca. 80% bzw. 74% der Weine nach der ersten Gruppen-Trennung noch korrekt klassifiziert sind. Die Fehlklassifizierungen von 20% bzw. 26% wurden vor allem durch Weine mit groben Abweichungen verursacht. Die weitere Senkung der Klassifizierungsraten auf 62,3% bzw. 53,6% (Endergebnisse) verraten, dass bei beiden Methoden etwa 20% der falsch klassifizierten Weine auf die kritischen Sorten-Paare zurückzuführen sind. Die Klassifikationsbäume scheinen für diesen Zweck ganz ungeeignet zu sein, weil es unwahrscheinlich ist, dass nur 33,3% der Weine korrekt klassifizierbar wäre.

Die oft beobachteten Verwechslungen unter den kritischen Sorten-Paaren Spätburgunder-Schwarzriesling und Portugieser-Dornfelder weisen darauf hin, dass die Modelle für den Lerndatensatz zwar gut anwendbar sind, ihre allgemeine Gültigkeit jedoch beschränkt ist. Die Erhöhung der Trennschärfe bei diesen Sorten-Paaren dürfte die Einbeziehung weiterer Substanzen, beispielsweise die Flavonoide, erfordern. Vorteilhaft wären dabei die ähnlichen chromatographischen Bedingungen der Anthocyan- und Flavonoiden-Analyse, was unter Verwendung eines Multiwellenlängendetektors die simultane Bestimmung beider Substanzklasse ermöglicht [123]. Die Tatsache, dass die Flavonoide einen Beitrag zur Klassifizierung leisten könnten, wurde von *Etiévant et al.* für französische Weine [45] und *Baldacchino* für deutsche Weine [10] bereits gezeigt, allerdings nur bei einer eher bescheidenen Anzahl von Proben.

Es liegt noch eine offene Frage vor, und zwar inwieweit die Weine mit untypischem Fingerprint als unerlaubter Verschnitt angesehen werden können. Im Sinne des Weingesetzes sind sie nicht unbedingt Verschnitte, da ein Versatz von 15% erlaubt ist. Für eine Aussage wäre es also notwendig, die Verschnittanteile zu quantifizieren [Kapitel 4.3.2].

4.3.2 Die Problematik der Quantifizierung von Verschnittanteilen

Die Farbe spielt bei der Beurteilung der Rotweine eine besonders große Rolle. Daher ist es üblich, Rotweine mit schwacher Farbe durch Zusatz von einem farbkräftigen Wein, dem sogenannten Deckwein, zu verbessern. Das Weingesetz erlaubt einen Verschnittanteil von höchstens 15%. Eine Ausnahme ist die Kategorie Weißherbst, eine Art Roséwein, der nicht verschnitten werden darf. Die Kontrolle der Einhaltung der 15%-Grenze würde einen sehr wichtigen Beitrag darstellen, unlauteren Wettbewerb zu unterbinden.

Da der Fingerprint des Deckweins den Fingerprint des Grundweins verändert, bietet sich die Möglichkeit an, Verschnittanteile durch Messung des Anthocyanfingerprints zu ermitteln. Nach ausführlichen Überlegungen gelangt man jedoch zu der Schlussfolgerung, dass es nicht möglich ist, da der resultierende Fingerprint nicht nur vom Mischungsverhältnis, sondern auch von den ursprünglichen Farbintensitäten des Grund- und Deckweines abhängt. Das bedeutet, dass selbst der „absolute Fingerprint“ eines Verschnitts, der nicht nur die proportionale Zusammensetzung, sondern die exakten Mengen der einzelnen Anthocyane angibt, alleine nicht ausreichen kann, die Mischverhältnisse auszurechnen. Dafür wäre auch noch mindestens einer der beiden absoluten Fingerprints, von Grund- oder von Deckwein, nötig.

Das folgende Beispiel sollte die Situation veranschaulichen [Tab. 4.11]. Als Grundwein wird ein Spätburgunder, als Deckwein ein Regent benutzt; ihre Fingerprints sind in den ersten drei Spalten angegeben. In den letzten 6 Spalten sind die absoluten und relativen Fingerprints von 3 verschiedenen simulierten Verschnitten angegeben. Der Einfachheit halber wird die absolute Farbintensität des Grundweins immer gleich 1 gesetzt. Am Beispiel des zweiten Verschnitts ist zu sehen, dass der Deckwein eine mindestens 7,66fache Farbintensität besitzen müsste, um die Farbe des entstehenden Verschnitts im Vergleich zu Grundwein zu verdoppeln, ohne die 15%-Grenze zu überschreiten. Das erste Beispiel rechnet mit einem noch intensiveren Deckwein, von dem schon 10% Zusatz mehr Farbe bringt, als das mittlere Beispiel. Das dritte Beispiel zeigt das Gegenteil, von einem schwächeren Deckwein reicht sogar 20% nicht, die Farbintensität zu verdoppeln, obwohl 20% bereits einen nicht erlaubten Zusatz bedeutet.

Tab. 4.11 Beispiel zur Veranschaulichung, dass verschiedene Verschnitte identischen Fingerprint haben können; weswegen es in umgekehrter Richtung Fingerprint→Verschnittanteil keine eindeutige Funktion gibt.

			Verschnitte					
			Grundwein : Deckwein		Grundwein : Deckwein		Grundwein : Deckwein	
Farbintensitäten der Ausgangsweine			1	12,17	1	7,66	1	5,42
Anteile (%)			90	10	85	15	80	20
Farbintensität des Verschnitts			2,12		2,00		1,88	
Anthocyan	Fingerprint (%)		Fingerprint		Fingerprint		Fingerprint	
	Grundwein (Spätburg.)	Deckwein (Regent)	absolute Intensitäten (10 ⁻²)	normiert (%)	absolute Intensitäten (10 ⁻²)	normiert (%)	absolute Intensitäten (10 ⁻²)	normiert (%)
De2	0,00	3,24	3,94	1,86	3,72	1,86	3,50	1,86
Cy2	0,00	2,04	2,48	1,17	2,35	1,17	2,21	1,17
Pe2	0,00	8,27	10,07	4,76	9,52	4,76	8,95	4,76
De	4,08	2,09	6,21	2,93	5,87	2,93	5,52	2,93
Pä2	0,00	11,27	13,72	6,48	12,96	6,48	12,19	6,48
Cy	0,70	0,17	0,84	0,40	0,79	0,40	0,75	0,40
Ma2	0,03	53,58	65,27	30,82	61,65	30,82	58,00	30,82
Pe	6,74	3,31	10,09	4,76	9,53	4,76	8,97	4,76
Pä	5,48	0,82	5,94	2,80	5,61	2,80	5,28	2,80
Ma	71,39	10,76	77,36	36,53	73,06	36,53	68,76	36,54
Deac	0,00	0,28	0,34	0,16	0,33	0,16	0,31	0,16
VitA	2,17	0,44	2,49	1,18	2,35	1,18	2,21	1,18
Cyac	0,01	0,01	0,02	0,01	0,02	0,01	0,02	0,01
Peac	0,01	0,22	0,27	0,13	0,25	0,13	0,24	0,13
Päac	0,00	0,04	0,05	0,03	0,05	0,03	0,05	0,03
Maac	0,17	1,23	1,65	0,78	1,56	0,78	1,47	0,78
A1	5,12	0,09	4,72	2,23	4,46	2,23	4,20	2,23
Päcu	0,00	0,15	0,19	0,09	0,18	0,09	0,17	0,09
Macu	0,08	1,66	2,09	0,99	1,97	0,99	1,86	0,99
A2	3,12	0,24	3,10	1,46	2,93	1,46	2,76	1,46
A3	0,90	0,07	0,90	0,43	0,85	0,43	0,80	0,43
Σ=			2,12	100%	2,00	100%	1,88	100%

Das wichtigste ist aber, dass Beispiel 1 und 3 absichtlich so konstruiert wurden, dass sie denselben normierten Fingerprint ergeben, wie das mittlere Beispiel. Für den Analytiker wären

also auf Grund der multivariat-statistischen Methoden alle 3 Weine identisch, abgesehen von ihren leicht abweichenden absoluten Farbintensitäten. Die absoluten Farbintensitäten können aber jahrgangsbedingt oder in Abhängigkeit der Kellertechnologie viel stärker streuen. Kurz gefasst, allein der Fingerprint eines Verschnitts ohne Kenntnis der ursprünglichen Farbintensitäten kann die Verschnittanteile nicht rekonstruieren.

Bei realen Weinen können zusätzliche Probleme auftreten. Oft kann nicht einmal die Sorte des Deckweins einfach aufgeklärt werden. Im Kapitel 4.3.1 wurde bereits gezeigt, dass Weine, in denen sortenfremde Anthocyanidin-diglukoside nachgewiesen wurden, nicht der plausiblen Sorte Regent, sondern der Sorte Lemberger zugeordnet wurden. Es kann auch vorkommen, dass der Verschnitt unter dem Sortennamen des Deckweins verkauft werden sollte, wie etwa die nicht erlaubte „Produktion“ von Roséweinen durch geschicktes Mischen von Weiß- und Rotweinen. In diesem Fall stimmen sogar die angegebene Sorte und der Fingerprint überein, und ein Nachweis der Fälschung mittels des Anthocyanfingerprints ist nicht möglich. Und nicht zuletzt könnten auch die natürlichen Schwankungen der Fingerprints, die die Klassifizierung eines sortenreinen Weines normalerweise noch nicht verhindern, bei einer Aufgabenstellung quantitativer Natur schon beträchtliche Fehler verursachen.

5. Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Erarbeitung einer einfachen, schnellen und in der Routine stabil laufenden HPLC-Methode zur Auftrennung der Anthocyane im Rotwein zwecks Erhaltung des Anthocyanfingerprints. Die optimierte Methode ermöglichte die Abtrennung einiger nicht-trivialer Anthocyan-Derivate, deren semipräparative Isolierung und Strukturaufklärung erfolgreich vollzogen wurde. Es wurde untersucht, ob und inwieweit sich der Anthocyanfingerprint eignet, eine Klassifizierung der Rotweine nach Rebsorte unter Einbeziehung von multivariat-statistischen Methoden durchzuführen. Der Einfluss weiterer Faktoren wie Jahrgang, Alter und Kellertechnologie wurde ebenfalls untersucht.

Aufgrund der sehr komplexen Natur der Rotweine kann die erforderliche Auflösung zwischen den einzelnen Komponenten nur mit möglichst schmalen chromatographischen Peaks erreicht werden. Diese Voraussetzung wurde durch die Wahl von Acetonitril als organische Komponente der Eluenten, durch eine möglichst hohe Säulentemperatur (50°C) und vor allem durch einen möglichst niedrigen pH-Wert (1,6) erfüllt. Eine routinemäßige Arbeit unter diesen für die HPLC extremen Bedingungen wurde durch neu entwickelte stationäre Phasen ermöglicht. Drei der als pH-stabil deklarierten Phasen, die UltraSep ES RP-18 MLD II., die Hypurity Elite C18 und die Synergi MAX-RP, zeigten hervorragende pH-Stabilität, während sich die Leistung der Platinum C18 Säule im Laufe der Nutzung stark verringert hat. Für die Einstellung des pH-Wertes wurde Phosphatpuffer statt der häufig publizierten Ameisensäure verwendet, um die Metallteile des HPLC-Geräts von der komplexbildenden Eigenschaft organischer Säuren zu schützen.

Die Identifizierung der 5 herkömmlichen freien Anthocyane wurde durch ihre UV/Vis-Spektren, sowie durch Vergleich einiger typischer Sortenmuster mit Literaturdaten durchgeführt. Cy, Pā und Ma wurden mit Hilfe von Vergleichssubstanzen chromatographisch zusätzlich identifiziert. Die herkömmlichen acylierten Anthocyane wurden ebenfalls durch Vergleich mit typischen Sortenmustern, sowie durch ihre relative Retention zugeordnet.

Als Ergebnis der Kalibration wurde gezeigt, dass eine gesicherte lineare Beziehung zwischen Konzentration und Peakfläche im Konzentrationsbereich 5-125 µg/mL vorhanden ist. Die Linearität gilt als Voraussetzung für die Verwendung der HPLC-Peakflächen statt der Konzentrationen in der multivariaten Statistik.

Die Robustheit der Trennungen wurde mittels zweistufiger fraktioneller Faktorpläne mit 8 Versuchen und einem partiellen Zentralpunkt geprüft. pH, Acetonitril-Anteil im Eluent B, Temperatur und Flussrate wurden systematisch variiert, um die Empfindlichkeit der Messungen gegenüber zufälligen Betriebsstörungen abzuschätzen. Die Retentionszeiten reagieren sehr empfindlich auf Änderungen der Analysenbedingungen, weswegen eine automatische Auswertung der Chromatogramme anhand der Retentionszeiten die regelmäßige Aktualisierung der zugrunde liegenden Zeitdaten erfordert. Die kritischen Auflösungen sind dagegen sehr robust, und die Ermittlung des Anthocyanfingerprints erfordert auch nur die Einhaltung des definierten pH-Wertes von 1,6. Das gleiche gilt für eine quantitative Bestimmung mittels interner Standardisierung, wogegen quantitative Messungen mit externer Kalibration die höchste Genauigkeit und Stabilität der Messbedingungen erfordern.

In der nächsten Phase der Methodenoptimierung wurde der Umfang der in die Auswertung einbezogenen 12 Anthocyane um die 5 freien Anthocyanidin-diglukoside und einige zunächst unbekanntes Anthocyan-Addukte erweitert. Unter Beibehaltung der zuvor optimierten generellen HPLC-Bedingungen wurde ein Vergleich zwischen verschiedenen Säulen durchgeführt, um die beste Selektivität für dieses komplexe Trennungsproblem zu finden. Unter Verwendung der Silika-gebundenen C₁₂-Phase, der Synergi MAX-RP, konnten alle 21 Analyten, bis auf Cy und Ma2, getrennt werden. Darüber hinaus wurde beobachtet, dass die Retention der Anthocyanidin-monoglukoside und -diglukoside vom pH-Wert unterschiedlich abhängt, was eine zusätzliche Möglichkeit bietet, die Trennung von einzelnen Komponenten beider Substanzklassen zu optimieren.

Eines der Anthocyan-Addukte, das in der Literatur ausführlich charakterisierte Vitisin A, wurde durch chromatographischen Vergleich mit selbst synthetisiertem Vitisin A identifiziert. Die anderen 3 Addukte wurden semipräparativ isoliert und mittels strukturanalytischer Techniken wie MS, NMR, UV-Spektroskopie und konfirmative Synthese identifiziert. Eine dieser Substanzen erwies sich als das vor kurzem entdeckte Malvidin-glukosid-4-Vinylphenol Addukt, während die anderen zwei Addukte von Malvidin-glukosid und 4-Vinylbrenzcatechin, bzw. Malvidin-glukosid und 4-Vinylguajakol in der Fachliteratur noch nicht beschrieben waren.

Vor der semipräparativen HPLC-Trennung der Addukte war eine aufwendige Probenvorbereitung notwendig: Fällungsreaktionen mittels MeOH und PVP, selektives Ablösen der Addukte vom PVP-Präzipitat, Gelfiltration auf Sephadex LH-20 Gel und C₁₈-SPE. Diese

Vorgehensweise konnte die im mg-Bereich liegenden Zielsubstanzen aus etwa 10L Rotwein ohne Verluste anreichern, während mehr als 30 g Matrixkomponenten entfernt wurden.

Während der Erarbeitung des obigen Isolierungsschemas wurden einige für analytische Fragestellungen entwickelten Anthocyan/Tannin-Trennungsmethoden getestet. Eine selektive Fällung von Tanninen konnte weder mit Chinchonin noch mit PVP oder Methylcellulose erzielt werden, weil die Anthocyane auch präzipitiert werden. Daher erwiesen sich die in der Fachliteratur beschriebenen Methoden nicht nur für die präparative Reinigung der Addukte als ungeeignet, sondern auch ihre Anwendung als Einleitung einer selektiven Tannin- und Anthocyan-Bestimmung ist bedenklich.

Die Untersuchung der Lagerfähigkeit der Proben hatte zwei Gründe. Die Abschätzung der Anthocyan-Degradation von -1,5% pro Tag bei Raumtemperatur unter Luftsauerstoff-Einfluss sicherte, dass die für den Routinebetrieb im Autosampler gelassenen Proben innerhalb ein Paar Stunden nur vernachlässigbare Verluste an Anthocyanen haben. Andererseits wurde die Eignung des Einfrierens zur Lagerung der Weinproben über einen längeren Zeitraum bestätigt. Auch nach mehrmaligen Auftauen und Einfrieren konnte kein Verlust an Anthocyanen nachgewiesen werden, obwohl in den aufgetauten Weinproben ein gefärbter Niederschlag zu beobachten war.

Die Qualitätssicherung während der Routine konnte auf die Überprüfung von Dosierfehler und zufälligen Kontaminationen reduziert werden. Da eine Probenvorbereitung und absolute Quantifizierung nicht erforderlich waren, entfielen die Überprüfung der Wiederfindungen und eine Kontrolle der Gültigkeit der Kalibration. Während der Routine wurden mehrere hundert Analysen in ununterbrochenem Autosampler-Betrieb durchgeführt, wobei ein einziges mal ein Dosierfehler auftrat. Neben der Zuverlässigkeit und Einfachheit ist auch die Geschwindigkeit der Methode hervorzuheben. Eine totale Analysenzeit von 45 min für 21 Komponenten erlaubte die Messung von 16 Weinproben pro Tag mittels Doppelbestimmungen. Als Rohdaten galten die Mittelwerte der Peakflächen aus den Doppelbestimmungen.

Es wurden insgesamt 270 Weinproben analysiert, davon 206 authentische und 64 kommerzielle Probe. Die authentischen Proben stammten aus den Weinbauinstituten in Neustadt an der Weinstraße (Pfalz) und Weinsberg (Württemberg). Die Probenanzahl der 7 wichtigsten deutschen Sorten, Blauer Spätburgunder, Blauer Portugieser, Dornfelder, Blauer Trollinger, Schwarzriesling, Blauer Lemberger und Regent, repräsentiert annähernd die deutsche Rot-

weinproduktion. Die meisten Weinproben sind Produkte systematischer kellertechnologischer Versuchsserien, was gewährleistet, dass im Probensatz auch ein breites Spektrum von kellertechnologischen Verfahren vertreten ist. Die Mehrheit der kommerziellen Weine stammt aus dem Landesuntersuchungsamt für das Gesundheitswesen Nordbayerns, Würzburg (fränkische Weine), der Rest wurde käuflich erworben.

Der Anthocyanfingerprint wurde durch Normierung der einzelnen Peakflächen auf die Summe aller Peakflächen (100%) gebildet. Durch Normierung entstehen geschlossene Datensätze (*closure*), was bei multivariat-statistischen Methoden Artefakte verursachen kann. Im vorliegenden Fall konnten keine negativen Auswirkungen von *closure* nachgewiesen werden. Während der explorativen Datenanalyse wurden die authentischen Proben auf Ausreißer geprüft, und die Proben, bei deren Fingerprints die Abweichungen vom typischen Sortenmuster auf eine Kontamination oder Versatz hingewiesen hatten, wurden in die Modellbildung nicht einbezogen.

Die Klassifizierungen der 7 wichtigsten deutschen Sorten wurden unter Verwendung der Fingerprints von 170 authentischen Weinen durchgeführt. Drei Klassifizierungsmethoden, die lineare Diskriminanzanalyse, die Methode der k -nächsten Nachbarn und die Methode der Klassifikationsbäume, wurden mit zwei Variablenselektionsmethoden, der Minimierung der Wilks' Lambda und der Maximierung der Reklassifizierungsrate kombiniert.

Die beste Reklassifizierungsrate von 97,6% konnte mit der knN bei $k=3$ erreicht werden, davon 93,5% sicher mit 3/3 korrekten Klassifizierungen. Die LDA erreichte 92,9% (davon 86,5% sicher mit $P>0,95$), mittels Klassifikationsbaums konnten 95,9% der Weine korrekt zugeordnet werden. Die Vorhersagegüte der Modelle wurde mittels Kreuzvalidierung geprüft. Die LDA und 3nN konnten den Lerndatensatz genauso gut vorhersagen wie reklassifizieren, bei den Klassifikationsbäumen wurde ein Rückgang von 5% auf 90,8% beobachtet. Die wenigen Fehlklassifizierungen konnten auf zwei Sortenpaare zurückgeführt werden: Spätburgunder und Schwarzriesling, bzw. Portugieser und Dornfelder wurden in einigen Fällen verwechselt.

Mittels zweistufiger Klassifizierungen konnten die Zuordnungen weiter geringfügig verbessert werden, besonders die Unterscheidung zwischen Portugieser und Dornfelder Weinen. Am besten hat erneut die 3nN mit 98,2% abgeschnitten. Die bevorzugten Variablenselektionsmethoden der einzelnen Klassifizierungsmethoden waren die gleichen bei einstufiger und zweistufiger Arbeitsweise. Für LDA selektiert die Minimierung des Wilks' Lambda die geeignetsten Variablen, während für die knN jene Variablen am günstigsten sind, die die

Reklassifizierungsrate maximal steigern. Für die Klassifikationsbäume wurden Variablen aus der LDA herangezogen, allerdings nicht die mittels Wilks' Lambda ausgewählten, sondern die anhand Maximierung der Reklassifizierungsrate selektierten Variablen.

Unter Berücksichtigung aller drei Klassifizierungsmethoden sind folgende Variablen besonders wichtig: Ma2, Maac, Päcu, Macu, sowie Pä, A3 und Pe. Ma2 diskriminiert die Regent Weine, während Päcu für die Abtrennung der Trollinger verantwortlich ist. Maac und Macu tragen gemeinsam vor allem zur Identifizierung von Portugieser, Dornfelder und Lemberger bei. Die Verwendung von Pä und A3 ist für die Differenzierung zwischen Spätburgunder und Schwarzriesling signifikant. Pe spielt bei der Unterscheidung zwischen Portugieser und Dornfelder eine große Rolle.

Bei der Untersuchung der Einflussgrößen weiterer Faktoren wurde festgestellt, dass der Anthocyanfingerprint am wenigsten durch die Kellertechnologie, genauer gesagt die Anwendung von Maischegärung oder Maischeerhitzung, beeinflusst wird. Der Effekt der Alterung spiegelt sich in der relativen Zunahme der stabilen Anthocyan-Addukte eindeutig wider. Die Größe des Effekts ist allerdings sehr variabel und daher ungeeignet für die Klassifizierung der Weine nach Alter. Weniger auffällig, jedoch viel einheitlicher sind die Unterschiede zwischen den verschiedenen Jahrgängen, was im vorliegenden Fall eine Klassifizierung nach Jahrgang bei den Sorten Spätburgunder und Dornfelder erlaubt. Hier spielten die stabilen Anthocyan-Addukte keine Rolle, sondern nur die herkömmlichen Anthocyane, was auch auf solche Unterschiede zwischen den Weinen hinweist, die schon vom Anfang an vorhanden waren, also ein Effekt des Jahrgangs.

Die Anwendung der Klassifizierungsregel auf die authentischen Weine mit untypischem Fingerprint sowie auf die kommerziellen Weine zeigte, dass die Modelle sehr streng arbeiten. Die beste Klassifizierungsrate von 60,9% wurde mittels LDA erreicht, die anderen Methoden schnitten bei 40% ab. Die zweistufige Klassifizierung bringt einen Vorteil bis zur Gruppentrennung mit Klassifizierungsraten um 75-80%, nach den häufigen Verwechslungen zwischen den kritischen Sorten-Paaren bleibt jedoch nur bei der Methode der 3nN eine Verbesserung der Klassifizierung um 13% auf 53,6%. Ob diese Ergebnisse gut oder schlecht sind, lässt sich schlecht entscheiden, weil keine genauere Information über diese Weine vorliegt. Verschnittanteile können nicht ausgerechnet werden, weil dafür andere chemische Merkmale nötig wären, die keine normierten Größen darstellen. Daher ist der Anthocyanfingerprint eher für eine schnelle und zuverlässige Bestätigung eines sortenreinen Weines geeignet. Fehlklassi-

fizierte Weine sollten jedoch auch anderen Untersuchungen unterworfen werden, bevor sie als unerlaubter Verschnitt deklariert werden.

Trotzdem ist die Methode nicht zu unterschätzen. Beispielsweise kann eine GC-Analyse mit ähnlicher Fragestellung kaum angewendet werden, weil ein Terpenprofil bei den Rotweinen praktisch fehlt. Auch wenn noch offene Fragen bestehen, ist dies die einzige Methode derzeit, um das Problem der Sortenerkennung von Rotweinen instrumentell-analytisch näher einzugehen.

Literaturverzeichnis

- [1] Aced G., Möckel H. J.; Liquidchromatographie, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 1991, 85-86
- [2] Achilli G., Cellerino G. P., Melzi d'Eril G.; Journal of Chromatography A, 661 (1994) 201-205
- [3] Almela L., Javaloy S., Fernandez-Lopez J. A., Lopez-Roca J. M.; J Sci Food Agric 1996, 70, 173-180
- [4] Anonym; Macherey-Nagel HPLC-Katalog 2000; 106-110
- [5] Anonym; Phenomenex Catalog 2001/2002 (HPLC-Katalog) 2001; 273-277
- [6] Bakker J., Bridle P., Honda T., Kuwano H., Saito N., Terahara N., Timberlake C.; Phytochemistry, Vol. 44, No. 7, 1375-1382, 1997
- [7] Bakker J., Preston N. W., Timberlake C. F.; Am. J. Enol. Vitic., Vol. 37, No. 2, 1986, 121-126
- [8] Bakker J., Timberlake C. F.; J. Agric. Food Chem. 1997, 45, 35-43
- [9] Balaban A. T., Schroth W., Fischer G.; (1969) Adv. Heterocycl. Chem. 10: 241-326
- [10] Baldacchino C.; Classification of German Red Wines on the Basis of Volatile and Non-Volatile Compounds by Multivariate Statistical Methods - Diplomarbeit, Friedrich-Schiller-Universität Jena, 2002
- [11] Baldi A., Romani A., Mulinacci N., Vincieri F. F., Casetta B.; J. Agric. Food Chem. 1995, 43, 2104-2109
- [12] Betes-Saura C., Andres-Lacueva C., Lamuela-Raventos R. M.; J. Agric. Food Chem. 1996, 44, 3040-3046
- [13] Blanch H. P., Reglero G., Herraiz M.; J. Agric Food Chem., Vol.43, No.5, 1995: 1251-1258
- [14] Bridle P., Garcia-Viguera C.; Food Chemistry, Vol. 55, No. 2, 1996: 111-113
- [15] Brouillard R.; in Markakis P. (Editor), Anthocyanins as Food Colors (in der Serie Food Science and Technology), 1982, Academic Press, New York: 1-40
- [16] Busto O., Guasch J., Borulli F.; Journal of Chromatography A, 737 (1996) 205-213
- [17] Busto O., Valero Y., Guasch J., Borulli F.; Chromatographia Vol. 38, No. 9/10, 1994, 571-578
- [18] Cameira-dos-Santos P.-J., Brillouet J.-M., Cheynier V., Moutounet M.; J Sci Food Agric 1996, 70, 204-208
- [19] Council regulation (EEC) No. 2676/90, 1990; Official Journal of the European Communities L272: 64-73
- [20] Csiktusnádi Kiss G. A., Forgács E., Cserháti T., Candeias M., Vilas-Boas L., Bronze R., Spranger I.; Journal of Chromatography A, 889 (1-2) (2000): 51-57
- [21] Dallas C., Laureano O.; J. Sci. Food Agric. 1994, 65: 477-485
- [22] Dallas C., Laureano O.; Vitis 33, 41-47 (1994)

- [23] Dallas C., Ricardo-da-Silva J. M., Laureano O.; *J. Agric. Food Chem*, 1996, 44: 2402-2407
- [24] Damberger V., Wurzinger A., Bandion F.; *Mitteilungen Klosterneuburg* 47 (1997): 173-178
- [25] Danzer K., Hobert H., Fischbacher C., Jagemann K.-U.; *Chemometrik – Grundlagen und Anwendungen*; Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 2001: 81-132
- [26] De la Calle García D.; *Anwendung der SPME für die GC-Analyse von Weinen und deren Klassifizierung mittels chemometrischer Methoden*, Dissertation; Friedrich-Schiller-Universität Jena; 1998
- [27] De la Calle García D., Magnaghi S., Reichenbacher M., Danzer K.; *J. High Resol.Chromatogr.* 19 (1996): 257-262
- [28] De la Calle García D., Reichenbacher M., Danzer K., Hurlbeck C., Bartzsch C., Feller K. H.; *J. High Resol.Chromatogr.* 20 (1997): 665-668
- [29] De la Calle García D., Reichenbacher M., Danzer K., Hurlbeck C., Bartzsch C., Feller K. H.; *Fresenius J. Anal. Chem.* (1998) 360: 784-787
- [30] De la Calle García D., Reichenbacher M., Danzer K., Hurlbeck C., Bartzsch C., Feller K. H.; *J. High Resol.Chromatogr.* 21 (1998): 373-377
- [31] De la Calle García D., Reichenbacher M., Danzer K.; *Vitis* 37(4), 181-188 (1998)
- [32] De la Calle García D., Reichenbacher M.; in Pawliszyn J. (Editor) *Applications of Solid Phase Microextraction*, The Royal Society of Chemistry 1999, 372-392
- [33] Del Caro A., Franco M. A., Sferlazzo G., Mattivi F., Versini G., Monetti A., Castia T.; *Vignevini*, No. 11, 1994, 63-69
- [34] Doerffel K.; *Statistik in der analytischen Chemie*; Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie GmbH Leipzig, 1996, 159-164 (Kalibration)
- [35] Doerffel K.; *Statistik in der analytischen Chemie*; Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie GmbH Leipzig, 1996, 178-187 (Faktorexperimente)
- [36] Doerffel K.; *Statistik in der analytischen Chemie*; Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie GmbH Leipzig, 1996, 141-146 (Vergleich mehrerer Mittelwerte)
- [37] Edelmann A., Lendl B.; *Vortrag: Klassifizierung von Rotweinsorten mittels FTIR-Spektroskopie*; in 1. Anwendertreffen „Weinanalytik“, 25-26. Januar 2001, Dortmund
- [38] Eder R.; *2. Rotweintag*, Neustadt an der Weinstraße, 2 September 1997, Tagungsband: 29-47
- [39] Eder R., Wendelin S., Barna J.; *Mitteilungen Klosterneuburg* 40 (1990): 68-75
- [40] Eder R., Wendelin S., Barna J.; *Mitteilungen Klosterneuburg* 44 (1994): 201-212
- [41] Eder R., Wendelin S., Kalchgruber R., Rosenthal F., Barna J.; *Mitteilungen Klosterneuburg* 42 (1992): 148-157
- [42] Ermer J.; in Kromidas S.: *Handbuch Validierung in der Analytik*; Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 2000; Kapitel 6.8: 320-359
- [43] Es-Safi N.-E., Fulcrand H., Cheynier V., Moutounet M.; *J. Agric.Food Chem.* 1999, 47, 2096-2102
- [44] Etiévant P., Schlich P.; *J. Sci. Food Agric.* 1988, 45, 25-41

- [45] Etiévant P., Schlich P., Bertrand A., Symonds P., Bouvier J.-C.; *J. Sci. Food Agric.* 1988, 42: 39-54
- [46] Etiévant P., Schlich P., Cantagrel R., Bertrand A., Bouvier J.-C.; *J. Sci. Food Agric.* 1989, 46, 421-438
- [47] Fischer U.; 2. Rotweintag, Neustadt an der Weinstraße, 2 September 1997, Tagungsband: 49-65
- [48] Fischer U., Strasser M., Gutzler K.; *International Journal of Food Science and Technology* 2000, 35: 81-94
- [49] Fischer U.; persönliche Mitteilung
- [50] Flak W., Batusic M., Schaber R., Schubert G.; *Mitteilungen Klosterneuburg* 48 (1998): 74-80
- [51] Forcén M., Berna A., Mulet A.; *Lebensm.-Wiss. u. -Technol.*, 26, 54-58 (1993)
- [52] Forcén M., Mulet A., Berna A.; *J. Sci. Food Agric.* 1992, 60, 229-238
- [53] Francia-Aricha E. M., Guerra M. T., Rivas-Gonzalo J. C., Santos-Buelga C.; *J. Agric. Food Chem.* 1997, 45: 2262-2266
- [54] Francia-Aricha E. M., Rivas-Gonzalo J. C., Santos-Buelga C.; *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A* (1998) 207: 223-228
- [55] Francis F. J.; in Markakis P. (Editor), *Anthocyanins as Food Colors* (in der Serie *Food Science and Technology*), 1982, Academic Press, New York: 181-207
- [56] Fulcrand H., Cameira dos Santos P.-J., Sarni-Manchado P., Cheynier V., Favre-Bonvin J.; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1996: 735-739
- [57] Fulcrand H., Benabdeljalil C., Rigaud J., Cheynier V., Moutounet M.; *Phytochemistry*, Vol. 47, No. 7, 1401-1407, 1998:
- [58] García-Viguera C., Bridle P., Bakker J.; *Vitis* 33 (1994): 37-40
- [59] Garcia Romero E., Sanchez Munoz G.; *Journal of Chromatography A*, 655 (1993) 111-117
- [60] Gelsomini N., Capozzi F., Faggi C.; *Journal of High Resolution Chromatography* VOL. 13, 1990: 352-355
- [61] Glories Y.; *Ann. Nutr. Alim.*, 1978, 32: 1163-1169
- [62] Grisebach H.; in Markakis P. (Editor), *Anthocyanins as Food Colors* (in der Serie *Food Science and Technology*), 1982, Academic Press, New York: 69-92
- [63] Hermann A.; GDCh-Informationstag Nr.705/97, 5 Juni 1997, Oppenheim
- [64] Herraiz T., Huang Z., Ough C. S.; *J. Agric. Food Chem.*, 1993, 41, 455-459
- [65] Ho P., Hogg T. A., Silva M. C. M.; *Food chemistry* 64 (1999) 115-122
- [66] Holbach B., Förstel H., Otteneder H., Hützen H.; *Z Lebensm Unters Forsch A* (1994) 198: 223-229
- [67] Holbach B., Marx R., Ackermann M.; *Lebensmittelchemie* (1997) 51: 78-80
- [68] Holbach B., Marx R., Förstel H., Hützen H.; *Vitic. Enol. Sci.* (1996) 51 (2): 103-108
- [69] Holbach B., Otteneder H., Marx R., Förstel H., Hützen H.; *Lebensmittelchemie* (1995) 49: 79-80

- [70] Holbach B., Wilken R.; Lebensmittelchemie (1994) 48: 4-5
- [71] Huber W.; Analytiker Taschenbuch 12; Springer Verlag Berlin Heidelberg New York, 1994: 21-33
- [72] Johansson E., Wold S., Sjödin K.; Anal. Chem. 1984, 56: 1685-1688
- [73] Kalchgruber R., Eder R., Barna J.; Mitteilungen-Klosterneuburg. 1994; 44 (1-2) 14-23
- [74] Kaufmann A.; Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 85, 566-578 (1994)
- [75] Kaufmann A.; Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 87, 604-622 (1996)
- [76] Kromidas S.; HPLC-Tips Band I; Verlag Hoppenstedt GmbH, Darmstadt, 1997, 95-96
- [77] Larrechi M. S., Guasch J., Rius F. X., Solé A.; Vitis 26, 172-182 (1987)
- [78] Marais J., Van Rooyen P. C., Du Plessis C. S.; S. Afr. J. Enol. Vitic., Vol. 2. No. 1. 1981, 19-23
- [79] Markakis P.; in Markakis P. (Editor), Anthocyanins as Food Colors (in der Serie Food Science and Technology), 1982, Academic Press, New York: 163-180
- [80] Markham K. R., Geiger H.; in Harborne J. B. (Editor) The Flavonoids, Advances in Research since 1986, Chapman&Hall, London, 1994: 441-497
- [81] Massart D. L., Vandeginste B. G. M., Buydens L. M. C., De Jong S., Lewi P. J., Smeyers-Verbeke J.; in Vandeginste B. G. M., Rutan S. C. (Editors) Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A, (in der Serie: Data Handling in Science and Technology Vol 20A) (1997); Kapitel 21-23: 643-699
- [82] Mattivi F., Scienza A., Failla O., Villa P., Anzani R., Tedesco G., Gianazza E., Righetti P.; Proc. 5th Int. Symposium on Grape Breeding, St. Martin-Pfalz, (BRD) 12-16 September 1989; Vitis special issue: 119-133
- [83] Mayer L.; Staatliche Lehr- und Versuchsanstalt für Wein- und Obstbau Weinsberg, Frucht- und Weintechnologie, 2000; persönliche Mitteilung
- [84] Mazza G.; Critical Reviews in Food Science and Nutrition, (1995) 35(4): 341-371
- [85] McCloskey L. P., Yengoyan L. S.; Am. J. Enol. Vitic. (1981), 32(4), 257-261
- [86] McMurrough I., Madigan D., Smyth M. R.; J. Agric. Food Chem. 1996, 44, 1731-1735
- [87] Mitjavila S., Schiavon M., Derache R.; Ann. Technol. agric., 1971, 20 (4), 335-346
- [88] Mongay C., Pastor A., Olmos C.; Journal of Chromatography A, 736 (1996) 351-357
- [89] Montedoro G., Fantozzi P.; Lebensm.-Wiss. u. Technol./vol.7 (1974) No.3, 155-161
- [90] Nagel C. W., Wulf L. W.; Am. J. Enol. Vitic., Vol. 30 No. 2, 1979: 111-116
- [91] Oberhofer J.; 2. Rotweintag, Neustadt an der Weinstraße, 2 September 1997, Tagungsband: 81-83
- [92] Paar E., Doubek S., Eder R.; Mitteilungen-Klosterneuburg. 1999; 49 (5): 176-185
- [93] Peri C., Pompei C.; Phytochemistry, 1971, Vol. 10, 2187-2189
- [94] Peri C., Pompei C.; Am. J. Enol. Vitic. 22: 55-58 (1971)
- [95] Rapp A.; in Liskens, G. F.; Jackson, J. F. (Editors) Wine Analysis, Springer Verlag Berlin Heidelberg New York, 1988: 29-66
- [96] Rapp A.; Fresenius J. Anal. Chem. (1990) 337: 777-785
- [97] Rapp A.; Chemie in unserer Zeit / 26. Jahrgang 1992 / Nr.6, 273-284

- [98] Rapp A.; *Lebensmittelchemie* 50, 149-154 (1996)
- [99] Rapp A.; in Würdig, G.; Woller, R. (Hrsg.), *Chemie des Weines*, Stuttgart: Ulmer, 1989, Kapitel 2.2.7.3, 104-106
- [100] Rapp A., Güntert M.; *Vitis* 24, 139-150 (1985)
- [101] Rapp A., Hastrich H., Engel L.; *Vitis* 15, 29-36 (1976)
- [102] Rapp A., Hastrich H., Engel L.; *Vitis* 17, 288-298 (1978)
- [103] Rapp A., Markowetz A.; *Labor* 2000 (1991): 113-120
- [104] Rapp A., Ringlage S.; *Vitis* 28, 21-29 (1989)
- [105] Rapp A., Versini G.; *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 92. Jahrg., Heft 2, 1996: 42-48
- [106] Rauhut D., Bauer O., Krieger S.-A., Dittrich H.-H.; *Mitteilungen Klosterneuburg* 45 (1995): 82-89
- [107] Regner F., Sefc K., Stadlbauer A., Steinkellner H.; *Acta-Horticulturae*. 1998, No. 473, 49-61
- [108] Renault J.-H., Thépenier P., Zèches-Hanrot M., Le Men-Olivier L., Durand A., Foucault A., Margraff R.; *J. Chromatogr. A* 763 (1997): 345-352
- [109] Ribéreau-Gayon P.; in Markakis P. (Editor), *Anthocyanins as Food Colors* (in der Serie *Food Science and Technology*), 1982, Academic Press, New York: 209-244
- [110] Rivas-Gonzalo J. C., Bravo-Haro S., Santos-Buelga C.; *J. Agric. Food Chem.*, 1995, 43: 1444-1449
- [111] Roggero J. P., Larice J. L., Rocheville-Divorne C., Archier P., Coen S.; *Revue Franc. d'Enol.* (1988) 112: 41-48
- [112] Romero C., Bakker J.; *J. Agric. Food Chem.* 1999, 47, 3130-3139
- [113] Romero C., Bakker J.; *International Journal of Food Science and Technology* 2000, 35, 129-140
- [114] Saettel D.; *Friedrich-Schiller-Universität Jena, Institut für Anorganische und Analytische Chemie*, 2001; persönliche Mitteilung
- [115] Sanchez-Rodas D., Hohaus E., Wenclawiak B.; *Fresenius J. Anal. Chem.* (1996) 355: 187-189
- [116] Sarni-Manchado P., Fulcrand H., Souquet J.-M., Cheynier V., Moutounet M.; *J. of Food Science*, Volume 61, No. 5, 1996: 938-941
- [117] Singleton V. L.; in Liskens, G. F.; Jackson, J. F. (Editors) *Wine Analysis*, Springer Verlag Berlin Heidelberg New York, 1988: 173-218
- [118] Snyder L. R., Glajch J. L., Kirkland J. J.; *Practical HPLC Method Development*; John Wiley & Sons, New York, 1988, 159-176
- [119] Somers T. C., Vérette E.; in Liskens, G. F.; Jackson, J. F. (Editors) *Wine Analysis*, Springer Verlag Berlin Heidelberg New York, 1988: 219-257
- [120] STATISTICA für Windows, *Computer-Handbuch*; Statistica Inc. Tulsa, OK
- [121] Staunton J.; in Sammes P. G. (Editor) *Comprehensive Organic Chemistry Vol. 4* (1979), Pergamon Oxford: 607-627
- [122] Strack D., Wray V.; in Harborne J. B. (Editor) *The Flavonoids, Advances in Research since 1986*, Chapman&Hall, London, 1994: 1-22

- [123] Strasser M.; Einfluß verschiedener Technologien auf das Phenolspektrum in Rotwein - Diplomarbeit, Universität Kaiserslautern, 1999
- [124] Sun L-X., Danzer K., Thiel G.; Fresenius J Anal Chem (1997) 359: 143-149
- [125] Supp E. in André Dominé, Wein, 2000 Könnemann Verlagsgesellschaft mbH, 460-463
- [126] Vandeginste B. G. M., Massart D. L., Buydens L. M. C., De Jong S., Lewi P. J., Smeyers-Verbeke J.; in Vandeginste B. G. M., Rutan S. C. (Editors) Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part B, (in der Serie: Data Handling in Science and Technology Vol 20B) (1997); Kapitel 33: 207-241
- [127] v. d. Voet H., Doornbos D. A., Meems M., v. d. Haar G.; Analytica Chimica Acta, 159 (1984): 159-171
- [128] Waterhouse A. L., Teissedre P.-L.; ACS Symp. Ser. (1997), 661(Wine), 12-23
- [129] Wege R.; „Methodenentwicklung und Optimierung der HPLC-Analyse der Anthocyane im Rotwein“ Diplomarbeit an der Friedrich-Schiller-Universität Jena; 1999
- [130] Wenzel K., Dittrich H.H., Heimfarth M.; Vitis 26, 65-78 (1987)
- [131] Williams M., Hrazdina G., Wilkinson M. M., Sweeny J. G., Iacobucci G. A.; Journal of Chromatography, 155 (1978) 389-398
- [132] Woller R.; in Würdig G., Woller R. (Hrsg.); Chemie des Weines, Stuttgart: Ulmer, 1989; Kapitel 5.2, 628-650
- [133] Woller R.; in Würdig G., Woller R. (Hrsg.); Chemie des Weines, Stuttgart: Ulmer, 1989; Kapitel 5.3, 650-666
- [134] Woller R., Breitbach K., Holbach B.; in Würdig G., Woller R. (Hrsg.); Chemie des Weines, Stuttgart: Ulmer, 1989; 831-832
- [135] Wulf L. W., Nagel C. W.; Am. J. Enol. Vitic., Vol. 29 No. 1, 1978: 42-49
- [136] Würdig G., Woller, R. (Hrsg.); Chemie des Weines, Stuttgart: Ulmer, 1989; Kapitel 5, 466-692

Anhang A: Analytische HPLC

1. Chemikalien:

- Destilliertes bzw. deionisiertes Wasser
- Acetonitril *HPLC Ultra Gradient Grade* (Fa. Roth, Karlsruhe)
- KH_2PO_4 *pro analysi* (Fa. Merck, Darmstadt)
- 85% H_3PO_4 *pro analysi* (Fa. Merck, Darmstadt)
- Membranfilter von 0,45 μm Porengröße (Fa. Schleicher&Schuell)
- Online Säulenschutzfilter von 0,2 μm Porengröße (Fa. Supelco)

2. HPLC-Geräte:

Shimadzu 6er Serie für die Methodenentwicklung und Routine-Analytik:

- Helium-Entgasung
- zwei analytischen HPLC-Pumpen (Shimadzu LC-6A)
- Eluentenmischkammer mit $V_{DWELL}=1,5$ mL (Shimadzu)
- Autosampler (Shimadzu SIL-6B)
- Säulenofen (Shimadzu CTO-6A)
- UV/VIS-Detektor (Shimadzu SPD-6AV)
- Systemsteuerung (Shimadzu SCL-6B)
- Integrator (Shimadzu C-R4A)
- Auswertesoftware nach Konvertierung der Rohdaten (Shimadzu Class-LC10 Vers.1)

Spektrumaufnahme: mittels des analytisch-präparativen Geräts [Anhang B.3] mit folgenden Änderungen/Ergänzungen:

- Vakuum-Entgaser (ERC-3520)
- Injektor: Rheodyne 7125 mit 20 μL -Schleife.
- Säulenofen (Shimadzu CTO-6A)

3. Verwendete Säulen:

- ODS 5 µm, 250×4,6 mm, ohne Vorsäule (Hypersil)
- UltraSep ES RP18 MLD II. 5 µm, 250×4 mm, mit 10×4 mm Vorsäule (Sepserv)
- Hypurity Elite C18 5 µm, 250×4,6 mm, mit 10×4,6 mm Vorsäule (Hypersil)
- Platinum C18 3 µm, 100×4,6 mm (Alltech), Vorsäule wie bei Hypurity Elite C18
- Synergi 4 µm C12 „MAX-RP“, 250×4,6 mm, mit 4×3 mm Vorsäule (Phenomenex)
- Synergi 4 µm Phenyl „POLAR-RP“, 250×4,6 mm, Vorsäule wie oben (Phenomenex)

4. Standardsubstanzen :

- Cy: Fa. Roth, 6136.1, Charge : 50734186 (Kuromaninchlorid)
- Pä: Fa. Roth, 9412.1, Charge : 51734185
- Ma: Fa. Roth, K030.1, Charge : 50734188 (Oeninchlorid)

5. Standardproben:

1. Cabernet Sauvignon, 1996, Nicolas Napoleon, Pay d'Oc, Frankreich
2. Blauer Spätburgunder, 1997, SLFA, Neustadt an der Weinstraße
3. Regent Barrique, 1996, SLFA, Neustadt an der Weinstraße
4. 1:1 Mischung der Proben 1 und 2
5. 1:1:1 Mischung der Proben 1, 2 und 3

Die Weine 1, 2 und 3 repräsentierten 1, 2,5 und 3 Jahre alte Weine, weil sie seit 18. 12. 1997, 23. 3. 2000 bzw. 26. 6. 1999 bei -18°C tiefgefroren gelagert waren. Die Proben 4 und 5 wurden immer aus den aufgetauten Proben 1, 2, 3 frisch hergestellt.

6. Chromatographische Bedingungen einiger Trennungen aus der Methodenentwicklung

[Kapitel 3.1.1]

Trennung bei pH=2 [Abb. 3.2]

Säule: Hypersil ODS	Gradient : t / min	%B
Eluent: A: 5/95 Acetonitril/Wasser	0	5
B: 40/60 Acetonitril/Wasser	6	20
pH=2 mit H ₃ PO ₄	16	50
Flussrate : 1,2 ml/min	30	85
Temperatur: Raumtemperatur	35	100
Detektionswellenlänge: $\lambda=518$ nm	35	5

Trennung bei pH=1,7 [Abb. 3.3]

Säule : UltraSep ES RP-18 MLD II.	Gradient : t / min	%B
Eluent : A : 5/95 Acetonitril/Wasser	0	8
B : 80/20 Acetonitril/Wasser	15	14
pH=1,7 mit H ₃ PO ₄	30	35
Flussrate : 0,8 ml/min	35	40
Temperatur: Raumtemperatur	40	100
Detektionswellenlänge: $\lambda=518$ nm	45	100

Effekt der Temperatur auf die Trennung bei pH=1,7 [Abb. 3.4]

Säule : UltraSep ES RP-18 MLD II.	Gradient : t / min	%B
Eluent : A : 5/95 Acetonitril/Wasser	0	10
B : 80/20 Acetonitril/Wasser	15	18
pH=1,7 mit H ₃ PO ₄	30	52
Flussrate : 0,5 ml/min	35	100
Temperatur: 35-40-45°C	40	100
Detektionswellenlänge: $\lambda=518$ nm		

7. Herstellung der Eluenten bei der endgültigen Methode:

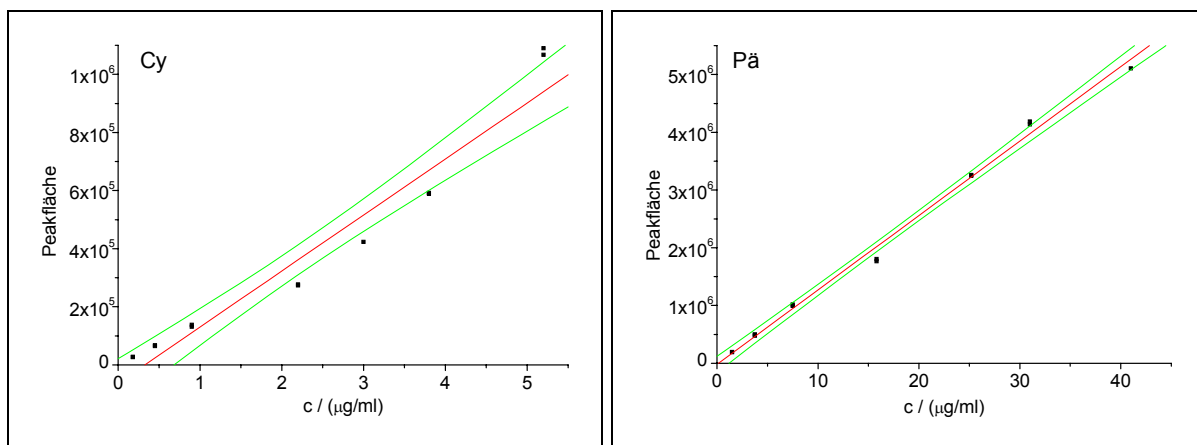
Eluent A war ein Phosphatpuffer, der wie folgt hergestellt wurde: 1,36 g KH₂PO₄ (10 mmol) und 6 mL 85%-ige H₃PO₄-Lösung wurden in 1 L deionisiertem Wasser aufgelöst. Eluent B wurde durch Mischung von 500 mL Eluent A, 500 mL Acetonitril und 9 mL 85%-ige H₃PO₄-Lösung hergestellt. Der pH-Wert der Eluenten wurde mit einem pH-Meter überprüft. Danach wurden die Eluenten durch einen Membranfilter mit 0,45 μ m Porendurchmesser filtriert.

8. Ergebnisse der Kalibration:

[Kapitel 3.1.3]

Messung	Lösung	Cy		Pä		Ma	
		c / µg/ml	Peakfläche	c / µg/ml	Peakfläche	c / µg/ml	Peakfläche
1.	KAL 6	0,18	27168	1,50	195194	5,10	632131
2.	KAL 6	0,18	26268	1,50	190083	5,10	601454
3.	KAL 7	0,45	67021	3,75	498962	12,75	1559650
4.	KAL 7	0,45	64805	3,75	477393	12,75	1491816
5.	KAL 1	0,90	137854	7,50	1016933	25,50	3229053
6.	KAL 1	0,90	131546	7,50	992938	25,50	3148172
7.	KAL 2	2,20	273243	15,80	1765687	53,40	6411487
8.	KAL 2	2,20	277253	15,80	1802290	53,40	6504916
9.	KAL 3	3,00	422928	25,20	3246010	73,60	9011136
10.	KAL 3	3,00	422855	25,20	3258732	73,60	9150178
11.	KAL 4	3,80	592062	31,00	4187580	99,20	12580005
12.	KAL 4	3,80	589486	31,00	4137633	99,20	12286338
13.	KAL 5	5,20	1090132	41,00	5104230	124,00	15397686
14.	KAL 5	5,20	1067494	41,00	4924096	124,00	15380596

Kalibration für Cy und Pä mit Konfidenzintervallen ($P=0,95$). Die schlechte Qualität der Kalibrationen wurde durch das inhomogene Probenmaterial und die direkten Einwaagen geringer Massen verursacht.



$$Y = A + B \cdot X$$

$$s_{y,x} = 88582$$

$$A = -62642$$

$$s_A = 38770$$

$$B = 192851$$

$$s_B = 13663$$

$$N = 14$$

$$f = 12$$

$$Y = A + B \cdot X$$

$$s_{y,x} = 140196$$

$$A = -19711$$

$$s_A = 62892$$

$$B = 128883$$

$$s_B = 3053$$

$$N = 13$$

$$f = 11$$

9. Robustheitsprüfung der Säule UltraSep ES RP18 MLD II. (Fa. Sepserv)

[Kapitel 3.1.4]

Mittelwerte aus $n_z=5$ bzw. $n_j=3$ ($j=1..8$) Wiederholungen

	Retentionszeiten (min)								
	De	Cy	Pe	Pä	Ma	Päac	Maac	Päcu	Macu
Zentral	5,317	7,702	9,308	11,854	13,193	22,065	23,038	29,496	30,103
Vers. 1	7,620	10,322	12,096	14,828	16,229	25,721	26,687	33,693	34,291
Vers. 2	4,875	7,107	8,724	11,261	12,687	21,821	22,920	29,563	30,271
Vers. 3	5,822	8,093	9,619	12,018	13,277	21,898	22,795	29,140	29,684
Vers. 4	5,080	7,504	9,171	11,790	13,133	21,682	22,654	28,729	29,339
Vers. 5	6,368	8,775	10,396	12,994	14,330	23,880	24,836	31,983	32,590
Vers. 6	5,577	8,217	9,945	12,745	14,163	23,647	24,681	31,532	32,213
Vers. 7	6,649	9,303	10,886	13,486	14,703	23,505	24,331	30,780	31,284
Vers. 8	4,265	6,321	7,744	10,143	11,379	19,846	20,784	26,977	27,589

	Auflösungen	
	Päac/Maac	Päcu/Macu
Zentral	2,48	1,73
Vers. 1	2,33	1,62
Vers. 2	2,59	2,17
Vers. 3	2,46	1,48
Vers. 4	2,66	1,87
Vers. 5	1,77	1,31
Vers. 6	2,31	1,60
Vers. 7	1,83	0,98
Vers. 8	2,46	1,60

	Peakflächen (counts)								
	De	Cy	Pe	Pä	Ma	Päac	Maac	Päcu	Macu
Zentral	461124	34533	371417	280668	2436990	98015	796202	44599	171686
Vers. 1	516491	44808	402604	300958	2679634	112750	894576	49812	191232
Vers. 2	414766	37974	331902	258722	2230925	87560	711345	40525	155246
Vers. 3	416758	34214	324386	246483	2170299	89869	724936	39032	153823
Vers. 4	502801	40341	408933	313239	2746289	110168	834647	51573	185201
Vers. 5	459407	43926	369996	259685	2239176	87352	757274	44395	175144
Vers. 6	530475	47947	423260	328900	2825982	109288	873269	53492	203467
Vers. 7	524937	51837	431234	317716	2687589	112460	888541	50798	201911
Vers. 8	407129	35266	318247	252092	2153957	87953	693416	38930	150409

	Prozentuale Veränderungen der Peakflächen bezogen auf die Standardmessung (%)								
	De	Cy	Pe	Pä	Ma	Päac	Maac	Päcu	Macu
Zentral	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
Vers. 1	112,01	129,75	108,40	107,23	109,96	115,03	112,36	111,69	111,38
Vers. 2	89,95	109,96	89,36	92,18	91,54	89,33	89,34	90,86	90,42
Vers. 3	90,38	99,07	87,34	87,82	89,06	91,69	91,05	87,52	89,60
Vers. 4	109,04	116,82	110,10	111,61	112,69	112,40	104,83	115,64	107,87
Vers. 5	99,63	127,20	99,62	92,52	91,88	89,12	95,11	99,54	102,01
Vers. 6	115,04	138,84	113,96	117,18	115,96	111,50	109,68	119,94	118,51
Vers. 7	113,84	150,11	116,11	113,20	110,28	114,74	111,60	113,90	117,61
Vers. 8	88,29	102,12	85,68	89,82	88,39	89,73	87,09	87,29	87,61

	Peakflächen nach Korrektur mit der Flussrate (counts·mL/min)								
	De	Cy	Pe	Pä	Ma	Päac	Maac	Päcu	Macu
Zentral	461124	34533	371417	280668	2436990	98015	796202	44599	171686
Vers. 1	464842	40327	362344	270863	2411671	101475	805118	44831	172109
Vers. 2	456242	41772	365092	284595	2454017	96316	782479	44577	170771
Vers. 3	458434	37635	356825	271131	2387329	98856	797429	42935	169205
Vers. 4	452521	36307	368040	281915	2471660	99152	751183	46416	166681
Vers. 5	505347	48318	406996	285654	2463094	96088	833001	48835	192658
Vers. 6	477427	43152	380934	296010	2543384	98360	785942	48143	183120
Vers. 7	472444	46653	388111	285944	2418830	101214	799687	45719	181720
Vers. 8	447842	38792	350072	277301	2369353	96749	762758	42823	165450

	Prozentuale Veränderungen der mit der Flussrate korrigierten Peakflächen bezogen auf die Standardmessung (%)								
	De	Cy	Pe	Pä	Ma	Päac	Maac	Päcu	Macu
Zentral	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
Vers. 1	100,81	116,78	97,56	96,51	98,96	103,53	101,12	100,52	100,25
Vers. 2	98,94	120,96	98,30	101,40	100,70	98,27	98,28	99,95	99,47
Vers. 3	99,42	108,98	96,07	96,60	97,96	100,86	100,15	96,27	98,55
Vers. 4	98,13	105,14	99,09	100,44	101,42	101,16	94,35	104,07	97,08
Vers. 5	109,59	139,92	109,58	101,78	101,07	98,03	104,62	109,50	112,22
Vers. 6	103,54	124,96	102,56	105,47	104,37	100,35	98,71	107,94	106,66
Vers. 7	102,45	135,10	104,49	101,88	99,25	103,26	100,44	102,51	105,84
Vers. 8	97,12	112,33	94,25	98,80	97,22	98,71	95,80	96,02	96,37

Berechnete Varianzen der Wirkungen und Varianz des Versuchsfehlers (mit Freiheitsgraden)

Wirkungen und Fehler		Varianzen der Retentionszeiten bzgl. der Wirkungen (min ²)								
		De	Cy	Pe	Pä	Ma	Päac	Maac	Päcu	Macu
Haupt- wirkungen (<i>f</i> =1)	pH	0,036	0,021	0,051	0,035	0,071	0,007	0,022	0,003	0,001
	ACN	0,861	1,279	1,749	2,409	3,023	8,280	9,156	15,528	16,442
	Temp.	5,549	6,742	6,868	6,820	6,439	8,018	7,239	9,668	8,896
	Fluss	1,617	3,187	3,942	5,173	5,370	6,320	6,155	6,249	6,114
Kombinierte Wirkungen (<i>f</i> =1)	ACN × Temp.	0,021	0,005	0,007	0,008	0,007	0,008	0,007	0,017	0,016
	ACN × Fluss	0,012	0,009	0,006	0,005	0,005	0,006	0,005	0,010	0,011
	Temp. × Fluss	0,039	0,027	0,013	0,004	0,001	0,006	0,007	0,017	0,019
Krümmung (<i>f</i> =1)		0,227	0,246	0,283	0,308	0,327	0,410	0,421	0,493	0,504
Versuchsfehler - s_R^2 (<i>f</i> =4)		0,028	0,045	0,063	0,078	0,095	0,165	0,176	0,230	0,238

Wirkungen und Fehler		Varianzen der Auflösungen bzgl. der Wirkungen	
		Päac/Maac	Päcu/Macu
Haupt- wirkungen (<i>f</i> =1)	pH	0,350	0,340
	ACN	0,021	0,073
	Temp.	0,330	0,431
	Fluss	0,003	0,029
Kombinierte Wirkungen (<i>f</i> =1)	pH × ACN	0,000	0,001
	pH × Temp.	0,065	0,000
	ACN × Temp.	0,000	0,003
Krümmung (<i>f</i> =1)		0,001	0,002
Versuchsfehler - s_R^2 (<i>f</i> =4)		0,00088	0,00082

Wirkungen und Fehler		Varianzen der Peakflächen bzgl. der Wirkungen (% ²)								
		De	Cy	Pe	Pä	Ma	Päac	Maac	Päcu	Macu
Haupt- wirkungen (<i>f</i> =1)	pH	29,74	490,7	50,85	24,12	1,33	1,41	4,36	27,99	87,52
	ACN	28,41	177,1	18,32	5,57	9,96	1,59	17,77	39,13	48,29
	Temp.	22,91	184,2	19,07	12,54	6,85	7,24	45,95	0,15	32,74
	Fluss	834	1180	937	943	969	1100	719	1151	919
Kombinierte Wirkungen (<i>f</i> =1)	pH × Fluss	0,01	61,04	1,10	10,60	1,93	0,12	0,65	0,47	6,58
	ACN × Fluss	5,67	147,0	49,04	6,95	1,16	0,70	0,06	22,82	14,63
	Temp. × Fluss	12,50	12,53	16,44	5,62	11,10	2,13	0,01	44,62	15,05
Krümmung (<i>f</i> =1)		0,09	154,6	1,15	0,07	0,53	3,58	0,29	1,63	0,03
Versuchsfehler - s_R^2 (<i>f</i> =4)		2,61	149,8	1,83	1,28	1,17	2,24	1,41	0,68	5,55

Wirkungen und Fehler		Varianzen der mit der Flussrate korrigierten Peakflächen bzgl. der Wirkungen (% ²)									
		De	Cy	Pe	Pä	Ma	Päac	Maac	Päcu	Macu	
Haupt- wirkungen ($f=1$)	pH	29,65	456,7	49,37	21,03	1,03	1,50	4,02	28,72	82,78	
	ACN	31,00	210,8	24,80	6,88	10,65	1,81	17,98	45,33	53,75	
	Temp.	26,42	174,7	22,78	10,92	5,22	6,48	46,08	0,08	37,33	
	Fluss	0,00	0,01	3,79	4,09	6,21	19,34	2,24	22,16	1,30	
Kombinierte Wirkungen ($f=1$)	pH × Fluss	0,21	31,33	0,11	7,64	1,62	0,21	0,36	1,47	2,66	
	ACN × Fluss	8,49	181,1	55,22	8,25	1,93	0,93	0,45	29,18	20,42	
	Temp. × Fluss	16,12	4,76	20,17	4,07	9,42	1,42	0,60	44,11	19,81	
Krümmung ($f=1$)		0,36	134,4	4,04	1,27	0,05	0,73	1,86	0,03	1,08	
Versuchsfehler - s_R^2 ($f=4$)		2,61	149,8	1,83	1,28	1,17	2,24	1,41	0,68	5,55	

Einflussgrößen der Wirkungen auf die prozentualen Veränderungen der Peakflächen bezogen auf die Standardmessung

Wirkung	Einflussgrößen (Koeffizienten)									
	De	Cy	Pe	Pä	Ma	Päac	Maac	Päcu	Macu	Einheit
pH	40,5		43,8	263,3				45,3	65,1	%
ACN	-0,9		11,6		-0,6		-0,7	7,3	-1,2	
Temp.	-0,3		2,6	0,3			-0,5			% / °C
Fluss	-102,1	-121,5	654,1	271,3	-118,0	-117,2	-94,8	303,3	-107,2	% / mL/min
pH × Fluss				-230,2						% / mL/min
ACN × Fluss			-12,4					-8,4		1 / mL/min
Temp. × Fluss			-2,9		0,2			-0,02		% / °C·mL/min
Konstant	201,5	234,8	-571,4	-236,9	238,7	218,3	256,1	-218,9	164,3	%

10. Robustheitsprüfung der Säule Hypurity Elite C18 (Fa. Hypersil)

[Kapitel 3.1.4]

Mittelwerte aus $n_z=5$ bzw. $n_j=3$ ($j=1..8$) Wiederholungen

	Retentionszeiten (min)									
	De	Cy	Pe	Pä	Ma	Cyac	Päac	Maac	Päcu	Macu
Zentral	6,751	9,059	10,589	13,089	14,371	18,488	23,065	23,958	29,805	30,322
Vers. 1	8,095	10,609	12,244	14,893	16,221	20,575	25,526	26,420	32,770	33,306
Vers. 2	5,892	8,128	9,701	12,235	13,620	17,913	22,638	23,655	29,675	30,300
Vers. 3	7,116	9,380	10,876	13,282	14,508	18,473	23,032	23,857	29,624	30,108
Vers. 4	6,399	8,689	10,216	12,680	13,964	18,025	22,318	23,224	28,741	29,297
Vers. 5	7,324	9,747	11,356	13,973	15,296	19,689	24,773	25,668	32,172	32,707
Vers. 6	6,656	9,085	10,721	13,392	14,777	19,271	24,032	25,022	31,194	31,823
Vers. 7	8,481	10,875	12,383	14,848	16,027	20,064	24,516	25,284	31,043	31,498
Vers. 8	6,392	8,593	10,085	12,475	13,725	17,726	21,974	22,855	28,352	28,891

	Auflösungen	
	Päac/Maac	Päcu/Macu
Zentral	2,72	1,96
Vers. 1	2,46	1,93
Vers. 2	2,97	2,32
Vers. 3	2,30	1,71
Vers. 4	2,98	2,09
Vers. 5	2,18	1,77
Vers. 6	2,65	2,65
Vers. 7	2,06	1,68
Vers. 8	2,53	1,96

	Peakflächen (counts)									
	De	Cy	Pe	Pä	Ma	Cyac	Päac	Maac	Päcu	Macu
Zentral	309417	37079	254344	180151	1570469	25504	60680	516912	38342	107830
Vers. 1	324673	37682	260577	190157	1624242	28253	59913	549386	41074	113649
Vers. 2	268338	32590	221576	161870	1453592	23974	60649	464716	32602	95904
Vers. 3	283443	32290	227544	165027	1409487	24398	52375	478668	34119	94665
Vers. 4	298328	37910	248907	186517	1651654	28928	68883	525487	38239	106341
Vers. 5	259797	31350	212845	154662	1322182	23859	48823	450855	32933	92624
Vers. 6	272889	33071	229637	173731	1569593	26841	63134	487957	33005	102492
Vers. 7	282802	33188	238654	176420	1499891	27584	56351	504701	37195	102017
Vers. 8	234453	28116	195772	148229	1338302	23351	55169	425323	28721	85665

	Prozentuale Veränderungen der Peakflächen bezogen auf die Standardmessung (%)									
	De	Cy	Pe	Pä	Ma	Cyac	Päac	Maac	Päcu	Macu
Zentral	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
Vers. 1	104,93	101,63	102,45	105,55	103,42	110,78	98,74	106,28	107,13	105,40
Vers. 2	86,72	87,89	87,12	89,85	92,56	94,00	99,95	89,90	85,03	88,94
Vers. 3	91,61	87,08	89,46	91,60	89,75	95,67	86,31	92,60	88,99	87,79
Vers. 4	96,42	102,24	97,86	103,53	105,17	113,42	113,52	101,66	99,73	98,62
Vers. 5	83,96	84,55	83,68	85,85	84,19	93,55	80,46	87,22	85,89	85,90
Vers. 6	88,19	89,19	90,29	96,44	99,94	105,24	104,04	94,40	86,08	95,05
Vers. 7	91,40	89,50	93,83	97,93	95,51	108,16	92,87	97,64	97,01	94,61
Vers. 8	75,77	75,83	76,97	82,28	85,22	91,56	90,92	82,28	74,91	79,45

	Peakflächen nach Korrektur mit der Flussrate (counts·mL/min)									
	De	Cy	Pe	Pä	Ma	Cyac	Päac	Maac	Päcu	Macu
Zentral	464125	55619	381516	270227	2355704	38256	91020	775368	57512	161744
Vers. 1	454542	52755	364808	266220	2273939	39555	83878	769140	57503	159109
Vers. 2	429341	52143	354521	258991	2325747	38358	97038	743545	52163	153447
Vers. 3	453509	51663	364070	264043	2255180	39037	83800	765869	54590	151464
Vers. 4	417660	53074	348470	261123	2312316	40499	96437	735681	53535	148878
Vers. 5	415675	50160	340552	247460	2115491	38174	78117	721368	52693	148198
Vers. 6	382045	46299	321492	243224	2197430	37577	88387	683140	46207	143489
Vers. 7	395923	46463	334115	246988	2099847	38618	78891	706582	52073	142824
Vers. 8	375125	44986	313236	237166	2141284	37361	88270	680517	45953	137065

	Prozentuale Veränderungen der mit der Flussrate korrigierten Peakflächen bezogen auf die Standardmessung (%)									
	De	Cy	Pe	Pä	Ma	Cyac	Päac	Maac	Päcu	Macu
Zentral	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
Vers. 1	97,94	94,85	95,62	98,52	96,53	103,40	92,15	99,20	99,98	98,37
Vers. 2	92,51	93,75	92,92	95,84	98,73	100,27	106,61	95,90	90,70	94,87
Vers. 3	97,71	92,89	95,43	97,71	95,73	102,04	92,07	98,77	94,92	93,64
Vers. 4	89,99	95,42	91,34	96,63	98,16	105,86	105,95	94,88	93,08	92,05
Vers. 5	89,56	90,19	89,26	91,57	89,80	99,79	85,82	93,04	91,62	91,62
Vers. 6	82,32	83,24	84,27	90,01	93,28	98,23	97,11	88,11	80,34	88,71
Vers. 7	85,31	83,54	87,58	91,40	89,14	100,95	86,67	91,13	90,54	88,30
Vers. 8	80,82	80,88	82,10	87,77	90,90	97,66	96,98	87,77	79,90	84,74

Berechnete Varianzen der Wirkungen und Varianz des Versuchsfehlers (mit Freiheitsgraden)

Wirkungen und Fehler		Varianzen der Retentionszeiten bzgl. der Wirkungen (min ²)									
		De	Cy	Pe	Pä	Ma	Cyac	Päac	Maac	Päcu	Macu
Haupt- wirkungen (<i>f</i> =1)	pH	0,228	0,279	0,284	0,320	0,286	0,389	0,396	0,349	0,477	0,454
	ACN	0,022	0,000	0,027	0,183	0,357	1,250	3,289	3,843	8,103	8,697
	Temp.	4,029	4,674	4,704	4,829	4,451	4,302	5,925	5,237	7,310	6,678
	Fluss	1,058	1,453	1,572	1,851	1,843	2,135	1,975	1,916	1,926	1,919
Kombinierte Wirkungen (<i>f</i> =1)	ACN × Temp.	0,001	0,004	0,006	0,009	0,009	0,011	0,017	0,015	0,031	0,028
	ACN × Fluss	0,003	0,006	0,009	0,012	0,013	0,016	0,013	0,013	0,012	0,013
	Temp. × Fluss	0,233	0,212	0,194	0,158	0,137	0,084	0,031	0,025	0,001	0,000
Krümmung (<i>f</i> =1)		0,012	0,016	0,023	0,027	0,034	0,054	0,078	0,088	0,126	0,148
Versuchsfehler - s_R^2 (<i>f</i> =4)		0,060	0,081	0,100	0,116	0,129	0,157	0,196	0,201	0,239	0,239

Wirkungen und Fehler		Varianzen der Auflösungen bzgl. der Wirkungen	
		Päac/Maac	Päcu/Macu
Haupt- wirkungen (<i>f</i> =1)	pH	0,208	0,000
	ACN	0,019	0,189
	Temp.	0,567	0,466
	Fluss	0,004	0,044
Kombinierte Wirkungen (<i>f</i> =1)	pH × ACN	0,001	0,014
	pH × Temp.	0,008	0,019
	ACN × Temp.	0,004	0,047
Krümmung (<i>f</i> =1)		0,001	0,002
Versuchsfehler - s_R^2 (<i>f</i> =4)		0,00080	0,00323

Wirkungen und Fehler		Varianzen der Peakflächen bzgl. der Wirkungen (% ²)									
		De	Cy	Pe	Pä	Ma	Cyac	Päac	Maac	Päcu	Macu
Haupt- wirkungen (<i>f</i> =1)	pH	203,5	197,7	129,0	98,33	84,78	29,51	114,2	104,4	171,0	82,86
	ACN	9,29	9,25	3,66	0,69	2,50	3,42	0,02	1,64	1,53	27,45
	Temp.	76,82	7,25	36,95	9,76	12,55	1,93	313,2	30,04	138,3	16,94
	Fluss	229,8	278,6	278,4	362,7	342,3	493,5	331,8	287,7	379,9	332,8
Kombinierte Wirkungen (<i>f</i> =1)	pH × Fluss	0,50	13,68	1,38	0,21	0,10	4,33	5,75	0,09	13,96	0,02
	ACN × Fluss	1,25	13,97	0,01	0,24	0,01	4,88	0,03	1,05	13,92	1,10
	Temp. × Fluss	0,23	8,43	0,11	0,41	0,69	1,43	0,44	0,01	1,43	0,13
Krümmung (<i>f</i> =1)		20,65	22,39	26,70	4,47	4,14	9,62	0,11	4,56	18,29	18,53
Versuchsfehler - s_R^2 (<i>f</i> =4)		7,52	4,90	7,17	1,18	4,66	11,98	1,55	1,63	5,16	11,55

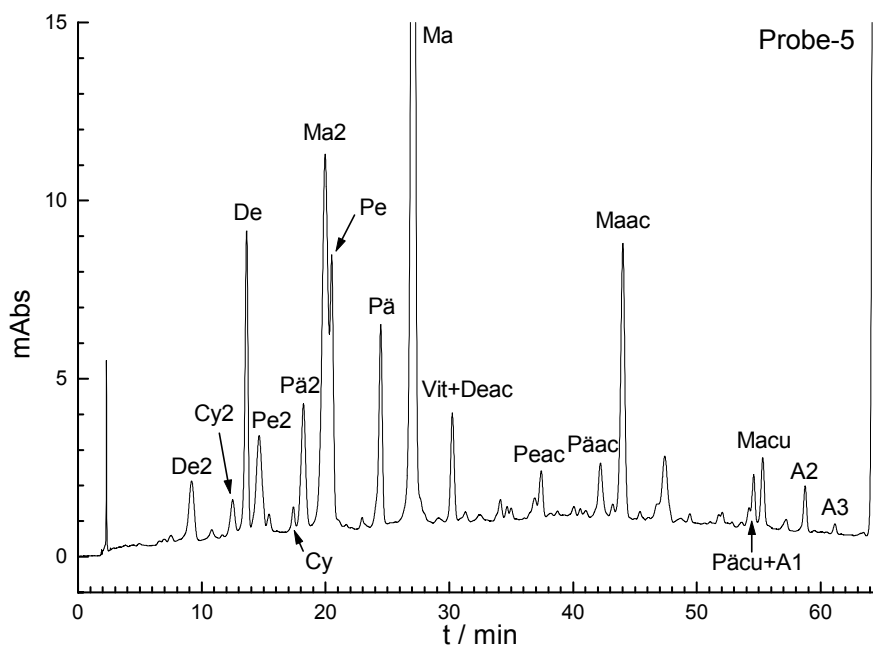
Wirkungen und Fehler		Varianzen der mit der Flussrate korrigierten Peakflächen bzgl. der Wirkungen (% ²)									
		De	Cy	Pe	Pä	Ma	Cyac	Päac	Maac	Päcu	Macu
Haupt- wirkungen ($f=1$)	pH	201,4	190,8	128,8	97,68	84,68	27,93	114,0	103,1	164,5	81,59
	ACN	9,00	10,81	3,96	0,74	2,44	2,93	0,00	1,69	2,21	27,55
	Temp.	77,38	8,32	37,21	10,03	12,16	2,16	311,6	29,98	136,4	16,74
	Fluss	3,20	0,05	0,10	1,68	0,47	9,40	0,02	0,58	5,80	0,81
Kombinierte Wirkungen ($f=1$)	pH × Fluss	0,03	7,84	0,44	0,03	0,28	3,41	0,30	0,12	8,18	0,20
	ACN × Fluss	0,25	15,22	1,70	0,26	0,05	3,83	5,70	0,15	14,58	0,24
	Temp. × Fluss	1,13	9,50	0,54	0,72	0,35	1,66	0,27	0,08	0,17	0,01
Krümmung ($f=1$)		23,89	26,65	30,48	6,38	5,89	6,69	0,52	6,33	22,71	22,20
Versuchsfehler - s_R^2 ($f=4$)		7,52	4,90	7,17	1,18	4,66	11,98	1,55	1,63	5,16	11,55

Einflussgrößen der Wirkungen auf die prozentualen Veränderungen der Peakflächen bezogen auf die Standardmessung

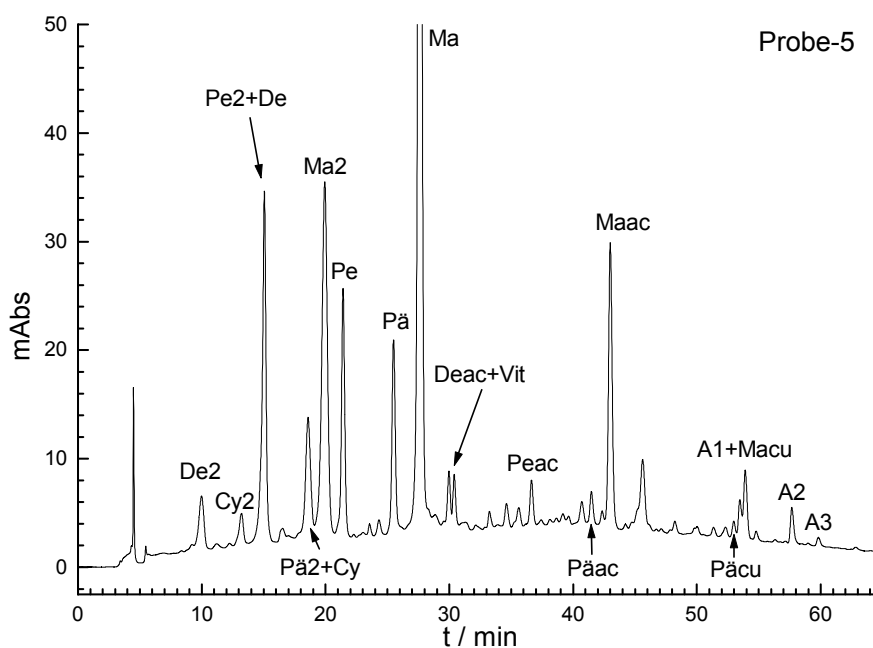
Wirkung	Einflussgrößen (Koeffizienten)										Einheit	
	De	Cy	Pe	Pä	Ma	Cyac	Päac	Maac	Päcu	Macu		
pH	-129,1	-128,8	-112,4	-83,3	-77,7		-77,6	-85,5	-119,0		%	
Temp.	-0,6			-0,2			1,3	-0,4	-0,8		% / °C	
Fluss	-53,6	-59,0	-59,0	-67,3	-65,4		-78,5	-64,4	-60,0	-68,9	-64,5	% / mL/min
Konstant	415,7	392,3	365,8	344,2	321,5		218,8	258,1	345,1	433,3	191,8	%

11. Trennung der erweiterten Anthocyane mittels der C₁₈-Phasen im Säulenvergleich

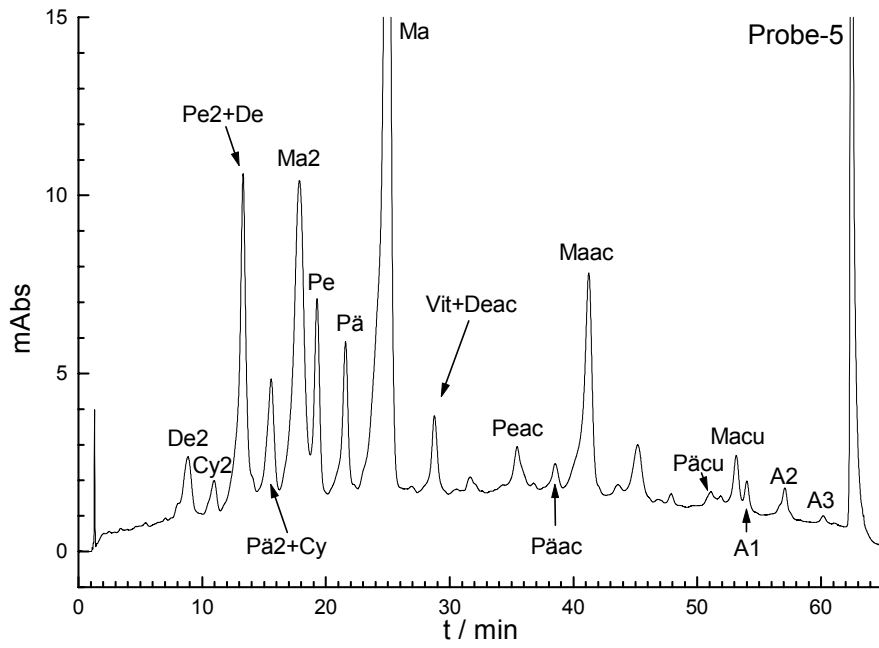
Die chromatographischen Bedingungen sind in Tab. 3.16 [Kapitel 3.2.1] angegeben.



Hypurity Elite C18 5µm, 250x4,6 mm



UltraSep ES RP18 MLD II. 5µm, 250x4 mm



Platinum C18 3 μ m, 100 \times 4,6 mm

Anhang B: Isolierung und Strukturaufklärung von nicht-trivialen Anthocyanen

1. Chemikalien und Geräte:

- Trifluoressigsäure (TFA), (Fa. Roth, Karlsruhe)
- Chloroform (Fa. Roth, Karlsruhe)
- n-Butanol (Fa. Roth, Karlsruhe)
- Cinchonin (Fa. Roth, Karlsruhe)
- NaOH
- KH_2PO_4
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$
- NaHCO_3
- 1:3 H_2SO_4
- Na_2SO_4
- Polyvinylpyrrolidon (PVP), $M \approx 24000$ (Fa. Roth, Karlsruhe)
- Trichloressigsäure (Fa. Merck, Darmstadt)
- Methylcellulose $M \approx 3000$ (Fa. Roth, Karlsruhe)
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- Methanol (Fa. Roth, Karlsruhe)
- Destilliertes bzw. deionisiertes Wasser
- Acetonitril *HPLC Isocratic Grade* (Fa. J. T. Baker, Niederlande)
- Malvidin-3-glukosid „Oeninchlorid“ von: Fa. Roth, Karlsruhe bzw.
Fa. Extrasynthèse, Frankreich
- 4-Vinylphenol 10% in Propylenglykol (Fa. Lancaster, England)
- 4-Vinylguajakol „2-Methoxy-4-vinylphenol“ 97% (Fa. Lancaster, England)
- Brenztraubensäure (Fa. Roth, Karlsruhe)

- Membranfilter von 0,45 μm Porengröße (Fa. Schleicher&Schuell)
- Zentrifuge Janetzki T30 (MLW, Leipzig)
- SPE-Manifold spe-12G (Fa. J. T. Baker, Niederlande)
- Online Säulenschutzfilter von 0,45 μm Porengröße (Fa. Supelco)

2. MPLC-Gerät der Fa. Labomatic (Schweiz):

bei der Gelfiltration benutztes präparatives Gerät:

- eine analytische HPLC-Pumpe (Shimadzu LC-6A), gekoppelt an den
- Drucksensor der MPLC-Pumpe (Labomatic MD-50/80/100)
- 5 mL-Probenschleife
- UV-Detektor (190-370 nm) mit präparativer Fließzelle (Labomatic LABOCORD 200)
- Schreiber (Fa. Knauer, Berlin)
- manuelle Fraktionssammlung

3. HPLC-Gerät:

Shimadzu analytisch-präparatives Gerät für die präparative HPLC und deren Optimierung:

- zwei präparativen HPLC-Pumpen (Shimadzu LC-8A)
- Eluentmischkammern mit $V_{DWELL}=15$ mL für den präparativen Fließweg und mit $V_{DWELL}=4,75$ mL für den analytischen Fließweg (Shimadzu)
- Injektoren: Rheodyne 7000L mit 5 mL-Schleife im präparativen Fließweg und Rheodyne 7125 mit 50 μ L-Schleife im analytischen Fließweg.
- UV/VIS-Detektor mit präparativer oder analytischer Fließzelle (Shimadzu SPD-10AV Dual)
- Communication Bus Module (Shimadzu CBM-10AV)
- Integrator (PC 80386SX mit 80387 mathematischem Koprozessor, Drucker)
- Auswertesoftware (Shimadzu Class-LC10 Vers.1)

4. Stationäre Phasen:

Gelfiltration:

- Sephadex LH-20 Gel (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden), gefüllt in einer MPLC-Glassäule (Labomatic MPGC-3A) 171×18,5 mm, $V \approx 55$ mL

Festphasenextraktion (SPE):

- 5 mL Kunststoffkartuschen gefüllt mit je 3 g C₁₈-Material auf Silikabasis (40 μ m Partikelgröße, 60Å Porenweite), (Fa. J. T. Baker, Niederlande)

HPLC:

- UltraSep ES RP18 7 μ m, 250×3 mm, mit 10×4 mm Vorsäule (Sepserv, Berlin) für die Trennungsoptimierung
- UltraSep ES RP18 10 μ m, 250×32 mm, (Sepserv), für die semipräparative Trennung

5. Getestete Methoden für die Entfernung von Tanninen gemäß Fachliteratur

[Kapitel 3.3.1, Tab. 3.19-3.20]

Nr.1 [108]

- beschrieben im Kapitel 3.3.1

Nr.2 [93-94]

- 10 mL Wein mit NaOH-Lsg. auf pH=7 eingestellt
- 5 mL Phosphatpuffer (1,36 g KH_2PO_4 , 8,35 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 12,50 g NaHCO_3 auf 500 mL mit Wasser) für pH=7,9
- 2,5 mL Cinchonin-Lsg. (1,5 g Cinchonin, 2 mL 1:3 verd. H_2SO_4 auf 100 mL mit Wasser)
- nach 20 min membranfiltriert
- der Rückstand mit 2×2 mL Na_2SO_4 -Lsg. (10% Na_2SO_4 in Wasser) gewaschen, mit der Klarlösung vereinigt

Nr.3 [87]

- 2,5 mL Wein
- 5 mL PVP-Lsg. (0,2 g PVP in 100 mL Wasser)
- 10 mL CCl_3COOH -Lsg. (20 g CCl_3COOH in 100 mL Wasser)
- der Rückstand mit 5 mL CCl_3COOH -Lsg. gewaschen, mit der Klarlösung vereinigt

Nr.4 [89]

- 5 mL Wein
- 2 mL Methylcellulose-Lsg. (0,4% in Wasser), einige Sekunden geschüttelt
- 4 mL gesättigte $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lsg.
- nach 20 min membranfiltriert

Nr.5 [61]

- beschrieben im Kapitel 3.3.1

6. Test von Präzipitationen und Extraktionen der Analyten aus den Niederschlägen

[Kapitel 3.3.1, Tab. 3.21-3.22]

Cinchonin-Methode

- 10 mL Wein mit NaOH-Lsg. auf pH=7 eingestellt
- 5 mL Phosphatpuffer (1,36 g KH_2PO_4 , 8,35 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 12,50 g NaHCO_3 auf 500 mL mit Wasser) für pH=7,9
- 2 mL Cinchonin-Lsg. (1,5 g Cinchonin, 2 mL 1:3 H_2SO_4 auf 100 mL mit Wasser)
- nach 20 min membranfiltriert
- der Rückstand mit 2×2 mL Na_2SO_4 -Lsg. (10% Na_2SO_4 in Wasser) gewaschen, mit der Klarlösung vereinigt
- der Rückstand und der Membranfilter mit 10 mL Methanol 10 min im Ultraschallbad extrahiert

PVP-Methode

- 10 mL Wein mit CF_3COOH auf pH=2 eingestellt
- 0,6 mL PVP-Lsg. (0,2 g PVP in 100 mL Wasser)
- der Rückstand und der Membranfilter mit 10 mL Methanol 10 min im Ultraschallbad extrahiert

Methylcellulose-Methode

- 10 mL Wein mit CF_3COOH auf pH=2 eingestellt
- 0,6 mL Methylcellulose-Lsg. (0,4%)
- nach 20 min filtriert
- der Rückstand und der Membranfilter mit 10 mL Methanol 10 min im Ultraschallbad extrahiert

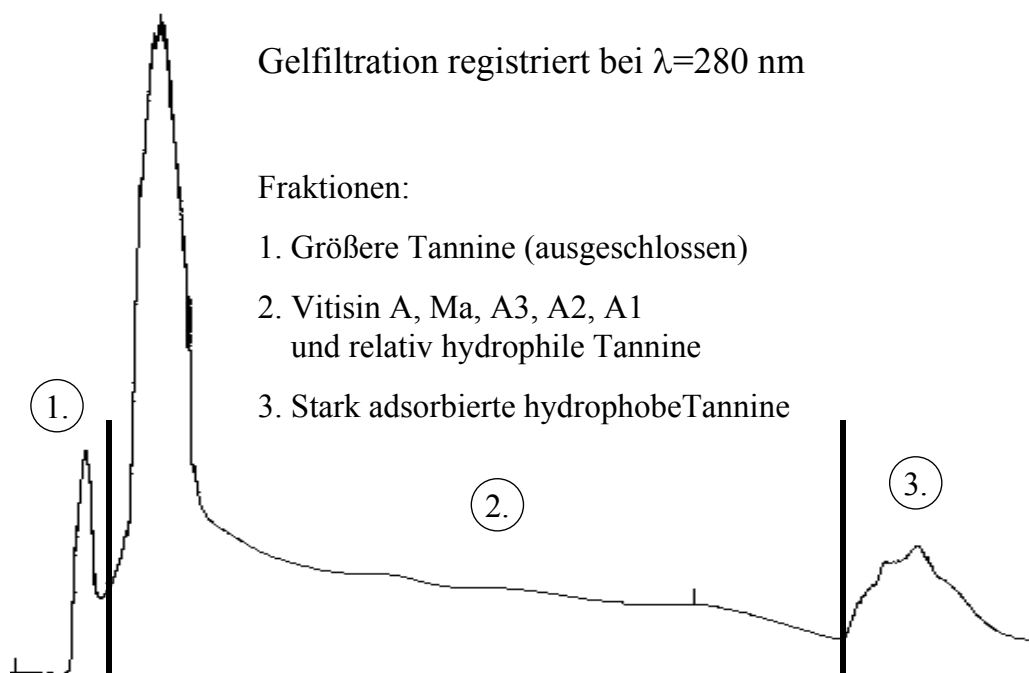
7. SPE-Methode

für 3 g C₁₈-Festphase (V ≈ 3 mL)

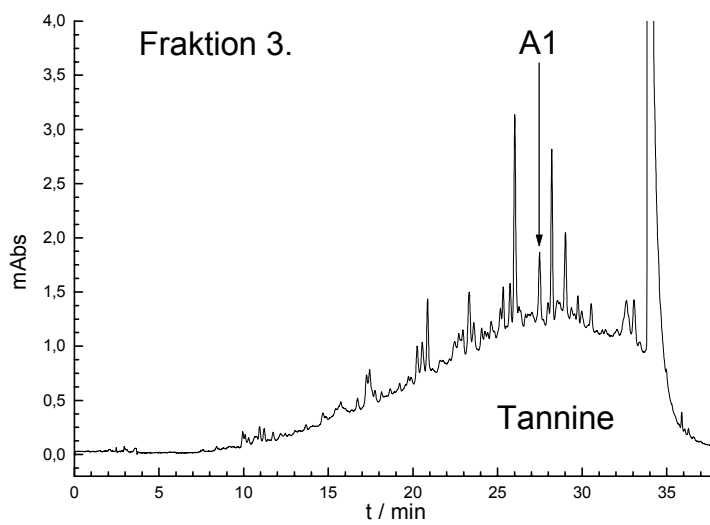
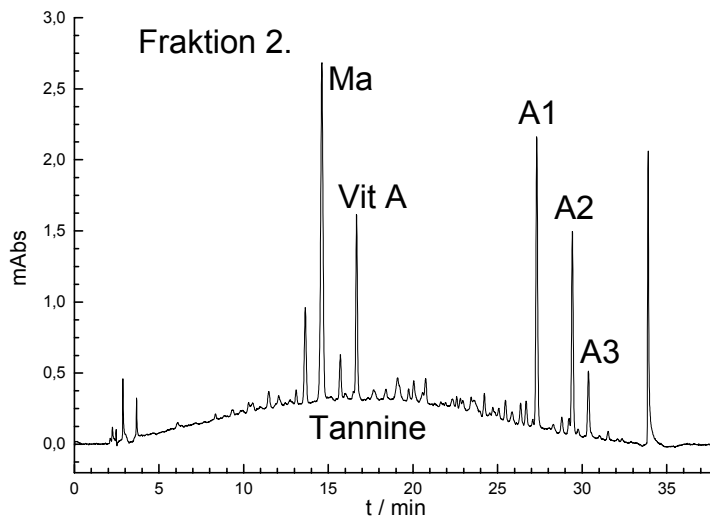
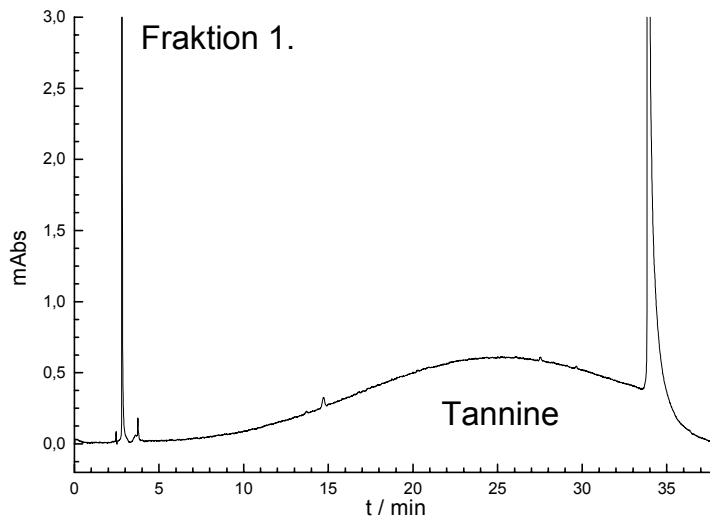
- 10 mL MeOH (Konditionierung I. – Benetzen der Phase)
- 10 mL Wasser (Konditionierung II. – Anpassen der Polarität zu den Proben)
- Probenaufgabe (bis die Beladbarkeit der Kartusche ausreicht)
- 10 mL Wasser (Entfernung von Salzen und Säuren, Neutralisierung)
- 10 mL MeOH (Entfernung hydrophober Tannine)
- 15 mL MeOH mit 0,1% TFA (pH ≈ 2) (Elution der Analyten)
- für nächste Extraktion zurück zu Konditionierung II.

8. Gelfiltration

- MPLC-Apparatur der Fa. Labomatic, mit analytischer HPLC-Pumpe der Fa. Shimadzu
- Gel: Sephadex LH-20 Gel, 171×18,5 mm, V ≈ 55 mL
- Eluent: 250 mL Wasser/Methanol=50/50 bei pH=2 mit TFA (Trennung)
100 mL Methanol bei pH=2 mit TFA (Spülung)
100 mL Wasser/Methanol=50/50 bei pH=2 mit TFA (Equilibrierung)
- Flussrate: 2,5-4 mL/min, bis $p < p_{max} = 2-3$ bar
- Probenvolumen: 5 mL
- Detektion: visuell bzw. bei $\lambda = 280$ nm, registriert mit einem Schreiber



HPLC-Chromatogramme der Fraktionen aus der Gelfiltration:



9. Semipräparative HPLC

- Säule: UltraSep ES RP18, 10 μm , 250 \times 32 mm
- Eluent: Wasser/Acetonitril=80/20 bei pH=2, isokratisch
- Raumtemperatur
- Flussrate: 50 mL/min
- Probenvolumen: 5 mL
- Detektion $\lambda=518$ nm
- manuelle Fraktionensammlung

10. Synthese des Addukts von Malvidin-3-glukosid und 4-Vinylphenol (A2)

Durchgeführt nach *Fulcrand et al.* [56]:

- Ma (als Oenin-chlorid): 1,012 mg gelöst in 2 mL Wasser, pH = 3 mit HCl
($n=1,9$ μmol)
- 4-Vinylphenol: 50 μL einer 10%igen Lösung (Lsgsm. Propylenglykol) dosiert
($n=43$ μmol)
- Reaktionszeit: 26 Stunden (entspricht [56])
- Ausbeute: mangels Responsefaktoren unbekannt.
(Die Peakfläche von A2 bei $\lambda=518$ nm erreichte nur 8,3% der von Ma vor der Reaktion.
Es stimmt sehr gut mit der geringen Ausbeute von 11,9% von [56] überein.)

11. Synthese des Addukts von Malvidin-3-glukosid und 4-Vinylguajakol (A3)

in Analogie mit Anhang B.10

- Ma (als Oenin-chlorid): 7,93 mg gelöst in 6 mL Wasser/MeOH (50/50), pH=3 mit HCl
($n=14,85$ μmol)
- 4-Vinylguajakol: 6,75 μL dosiert ($n=50$ μmol)
- Reaktionszeit: 27 Stunden
- Ausbeute: mangels Responsefaktoren unbekannt.
(Die Peakfläche von A3 bei $\lambda=518$ nm erreichte 8,4% der von Ma vor der Reaktion. Es stimmt sehr gut mit der Ausbeute von A2 [Anhang B.10] überein.)

12. Synthese von Vitisin A

Durchgeführt nach *Bakker et al.* [112, 113]:

- Ma (als Oenin-chlorid): 280 μL einer $c=250 \mu\text{g/mL}$ Lösung in Wasser, $\text{pH}=3$ mit HCl
($m=70 \mu\text{g}$, $n=0,13 \mu\text{mol}$)
- Brenztraubensäure: 2 μL ($m\approx 2 \text{ mg}$) in 220 μL Wasser gelöst, und dosiert
($n=26,5 \mu\text{mol}$)
- Temperatur: 4°C im Kühlschrank
- Reaktionszeit: nach 170 Tagen noch nicht beendet, 30% des Ma ist vorhanden [Abb. 3.30]
- Ausbeute: mangels Responsefaktoren unbekannt.

Kommentar: der sehr langsame Ablauf der Reaktion stimmt mit [112-113] gut überein. Es kann damit erklärt werden, dass nur die Enol-Form der Brenztraubensäure [Abb. 3.29] mit Ma in Reaktion treten kann [57].

Anhang C: Die Proben1. Untersuchungen bezüglich der Lagerfähigkeit der Proben

[Kapitel 3.4.1]

Lagerungszeit (Tag)	Gesamtpeakflächen von 9 Anthocyanen				
	frisch geöffnete Weinflasche	tiefgefroren, einmalige Analyse	tiefgefroren, wiederholte Analysen	4 °C	bei Raum- temperatur
0	17574372	↔	↔	↔	↔
14	17048934	17297669	↔	16899220	13425955
27	15382104	16901429	16216073	16011568	10353832
43	15108503	17452973	17402069	14765714	5753088
69	13362687	17180691	16565231	11801442	1594696

2. Beschreibung der Proben

[Kapitel 3.4.2 und 4.1.1]

Authentische Proben:

Störung: 1 – geringfügig: Spuren von sortenfremden Anthocyanen
 2 – mittelmäßig: deutliche Abweichung vom typischen Sorten-Fingerprint
 3 – stark: grobe Abweichung vom typischen Sorten-Fingerprint

FSUJ Nr.	Fallname	Jahr- Alter gang (Jahr)	Sorte	Anbaugebiet	Genauere Herkunft	Bemerkung	Störung
1	S96V1-1	1996 2,75	Spätburgunder	Pfalz	SLFA		-
2	S96V1-2	1996 2,75	Spätburgunder	Pfalz	SLFA		-
3	S96V2-1	1996 2,75	Spätburgunder	Pfalz	SLFA		-
4	S96V2-2A	1996 2,75	Spätburgunder	Pfalz	SLFA		-
5	S96V2-2B	1996 2,75	Spätburgunder	Pfalz	SLFA		-
6	S96V3-1	1996 2,75	Spätburgunder	Pfalz	SLFA		-
7	S96V3-2	1996 2,75	Spätburgunder	Pfalz	SLFA		-
8	S96V4-1	1996 2,75	Spätburgunder	Pfalz	SLFA		-
9	S96V4-2	1996 2,75	Spätburgunder	Pfalz	SLFA		-
10	S96V5-1	1996 2,75	Spätburgunder	Pfalz	SLFA		-
11	S96V5-2	1996 2,75	Spätburgunder	Pfalz	SLFA		-
12	S96V6-1	1996 2,75	Spätburgunder	Pfalz	SLFA		-
13	S96V6-2	1996 2,75	Spätburgunder	Pfalz	SLFA		-
14	S96V7-1	1996 2,75	Spätburgunder	Pfalz	SLFA		-
15	S96V7-2	1996 2,75	Spätburgunder	Pfalz	SLFA		-

FSUJ Nr.	Fallname	Jahr- gang	Alter (Jahr)	Sorte	Anbaugebiet	Genauere Herkunft	Bemerkung	Störung
16	S96V8-1	1996	2,75	Spätburgunder	Pfalz	SLFA		-
17	S96V8-2	1996	2,75	Spätburgunder	Pfalz	SLFA		-
18	S96V9-1	1996	2,75	Spätburgunder	Pfalz	SLFA		-
19	S96V9-2	1996	2,75	Spätburgunder	Pfalz	SLFA		-
20	S96V10-1	1996	2,75	Spätburgunder	Pfalz	SLFA		-
21	S97V1-1	1997	1,75	Spätburgunder	Pfalz	SLFA		-
22	S97V1-2	1997	1,75	Spätburgunder	Pfalz	SLFA	Diglukoside	2
23	S97V2-1	1997	1,75	Spätburgunder	Pfalz	SLFA		-
24	S97V2-2	1997	1,75	Spätburgunder	Pfalz	SLFA		-
25	S97V3-1	1997	1,75	Spätburgunder	Pfalz	SLFA		-
26	S97V3-2	1997	1,75	Spätburgunder	Pfalz	SLFA		-
27	S97V4-1	1997	1,75	Spätburgunder	Pfalz	SLFA		-
28	S97V4-2	1997	1,75	Spätburgunder	Pfalz	SLFA		-
29	S97V5-1	1997	1,75	Spätburgunder	Pfalz	SLFA		-
30	S97V5-2	1997	1,75	Spätburgunder	Pfalz	SLFA		-
31	S97V6-1	1997	1,75	Spätburgunder	Pfalz	SLFA		-
32	S97V6-2	1997	1,75	Spätburgunder	Pfalz	SLFA		-
33	S97V7-1	1997	1,75	Spätburgunder	Pfalz	SLFA		-
34	S97V7-2	1997	1,75	Spätburgunder	Pfalz	SLFA		-
35	S97V8-1	1997	1,75	Spätburgunder	Pfalz	SLFA		-
36	S97V8-2	1997	1,75	Spätburgunder	Pfalz	SLFA		-
37	S97V9-1	1997	1,75	Spätburgunder	Pfalz	SLFA	viel Diglukoside	3
38	S97V9-2	1997	1,75	Spätburgunder	Pfalz	SLFA	Diglukoside	2
39	S97V10-1	1997	1,75	Spätburgunder	Pfalz	SLFA		-
40	S97V10-2	1997	1,75	Spätburgunder	Pfalz	SLFA		-
41	S97V11-1	1997	1,75	Spätburgunder	Pfalz	SLFA		-
42	S97V11-2	1997	1,75	Spätburgunder	Pfalz	SLFA		-
43	S97R-1	1997	1,75	Spätburgunder	Pfalz	SLFA		-
44	S97R-2	1997	1,75	Spätburgunder	Pfalz	SLFA		-
45	S97R-3	1997	1,75	Spätburgunder	Pfalz	SLFA		-
46	S97R-4	1997	1,75	Spätburgunder	Pfalz	SLFA		-
47	D96V1-1	1996	2,75	Dornfelder	Pfalz	SLFA		-
48	D96V1-2	1996	2,75	Dornfelder	Pfalz	SLFA		-
49	D96V2-1	1996	2,75	Dornfelder	Pfalz	SLFA	viel Diglukoside	3
50	D96V2-2	1996	2,75	Dornfelder	Pfalz	SLFA		-
51	D96V3-1	1996	2,75	Dornfelder	Pfalz	SLFA		-
52	D96V3-2	1996	2,75	Dornfelder	Pfalz	SLFA		-
53	D96V4-1	1996	2,75	Dornfelder	Pfalz	SLFA		-
54	D96V5-1	1996	2,75	Dornfelder	Pfalz	SLFA		-
55	D96V5-2	1996	2,75	Dornfelder	Pfalz	SLFA		-
56	D96V6-1	1996	2,75	Dornfelder	Pfalz	SLFA		-
57	D96V6-2	1996	2,75	Dornfelder	Pfalz	SLFA		-
58	D96V7-1	1996	2,75	Dornfelder	Pfalz	SLFA		-
59	D96V7-2	1996	2,75	Dornfelder	Pfalz	SLFA		-
60	D96V8-1	1996	2,75	Dornfelder	Pfalz	SLFA		-

FSUJ Nr.	Fallname	Jahr- Alter gang (Jahr)	Sorte	Anbaugebiet	Genauere Herkunft	Bemerkung	Störung
61	D96V8-2	1996 2,75	Dornfelder	Pfalz	SLFA		-
62	D98053	1998 0,75	Dornfelder	Pfalz	SLFA	Diglukosid-Spuren	1
63	D98054	1998 0,75	Dornfelder	Pfalz	SLFA	Diglukosid-Spuren	1
64	D98055	1998 0,75	Dornfelder	Pfalz	SLFA	Diglukosid-Spuren	1
65	D98056	1998 0,75	Dornfelder	Pfalz	SLFA	keine acetylierte A.	3
66	D98162	1998 0,75	Dornfelder	Pfalz	SLFA		-
67	D98163	1998 0,75	Dornfelder	Pfalz	SLFA		-
68	D98164	1998 0,75	Dornfelder	Pfalz	SLFA		-
69	P97R-19	1997 1,75	Portugieser	Pfalz	SLFA		-
70	P97R-20	1997 1,75	Portugieser	Pfalz	SLFA		-
71	P97R-21	1997 1,75	Portugieser	Pfalz	SLFA		-
72	P97R-22	1997 1,75	Portugieser	Pfalz	SLFA		-
73	P97R-23	1997 1,75	Portugieser	Pfalz	SLFA		-
74	P97R-27A	1997 1,75	Portugieser	Pfalz	SLFA		-
75	P97R-27	1997 1,75	Portugieser	Pfalz	SLFA		-
76	P97R-28	1997 1,75	Portugieser	Pfalz	SLFA	wenig Pā und wenig acetylierte Anth.	2
77	P98058?	1998 0,75	Portugieser	Pfalz	SLFA	Diglukosid-Spuren	1
78	P98059	1998 0,75	Portugieser	Pfalz	SLFA	Diglukosid-Spuren	1
79	P98099	1998 0,75	Portugieser	Pfalz	SLFA	Diglukosid-Spuren	1
80	P98100	1998 0,75	Portugieser	Pfalz	SLFA	Diglukosid-Spuren	1
81	R96 Bar.	1996 2,75	Regent	Pfalz	SLFA		-
82	R97 Bar.	1997 1,75	Regent	Pfalz	SLFA		-
83	R976-1ba	1997 1,75	Regent	Pfalz	SLFA		-
84	R976-2ba	1997 1,75	Regent	Pfalz	SLFA		-
85	R977-12	1997 1,75	Regent	Pfalz	SLFA		-
86	R977-34	1997 1,75	Regent	Pfalz	SLFA		-
87	R978-1ab	1997 1,75	Regent	Pfalz	SLFA		-
88	R978-2ab	1997 1,75	Regent	Pfalz	SLFA		-
89	R98030	1998 0,75	Regent	Pfalz	SLFA		-
90	C95125K	1995 4,5	C. Sauvignon	Pfalz	SLFA		-
91	C95125M	1995 4,5	C. Sauvignon	Pfalz	SLFA		-
92	C96227	1996 3,5	C. Sauvignon	Pfalz	SLFA		-
93	C96228	1996 3,5	C. Sauvignon	Pfalz	SLFA		-
94	C96229	1996 3,5	C. Sauvignon	Pfalz	SLFA		-
95	C97218	1997 2,5	C. Sauvignon	Pfalz	SLFA		-
96	C97220	1997 2,5	C. Sauvignon	Pfalz	SLFA		-
97	C97221	1997 2,5	C. Sauvignon	Pfalz	SLFA		-
98	C97222	1997 2,5	C. Sauvignon	Pfalz	SLFA		-
99	C97223	1997 2,5	C. Sauvignon	Pfalz	SLFA		-
100	C98232	1998 1,5	C. Sauvignon	Pfalz	SLFA		-
101	C98234	1998 1	C. Sauvignon	Pfalz	SLFA		-
102	C98235	1998 1,5	C. Sauvignon	Pfalz	SLFA		-
103	C98236	1998 1,5	C. Sauvignon	Pfalz	SLFA		-
104	C98237	1998 1,5	C. Sauvignon	Pfalz	SLFA		-
105	D96113	1996 3,5	Dornfelder	Pfalz	SLFA	Diglukoside	2

FSUJ Nr.	Fallname	Jahr- gang	Alter (Jahr)	Sorte	Anbaugebiet	Genauere Herkunft	Bemerkung	Störung
106	D96114	1996	3,5	Dornfelder	Pfalz	SLFA		-
107	D96115	1996	3,5	Dornfelder	Pfalz	SLFA		-
108	D97120	1997	2,5	Dornfelder	Pfalz	SLFA		-
109	D97121	1997	2,5	Dornfelder	Pfalz	SLFA	viel Diglukoside	3
110	D97122	1997	2,5	Dornfelder	Pfalz	SLFA		-
111	D98124	1998	1,5	Dornfelder	Pfalz	SLFA		-
112	D98125	1998	1,5	Dornfelder	Pfalz	SLFA	keine acetylierte A.	3
113	D98126	1998	1,5	Dornfelder	Pfalz	SLFA		-
114	P95110	1995	4,5	Portugieser	Pfalz	SLFA		-
115	P95111	1995	4,5	Portugieser	Pfalz	SLFA		-
116	P95112	1995	4,5	Portugieser	Pfalz	SLFA		-
117	P95113	1995	4,5	Portugieser	Pfalz	SLFA		-
118	P95114	1995	4,5	Portugieser	Pfalz	SLFA		-
119	P98105	1998	1,5	Portugieser	Pfalz	SLFA	viel Diglukoside	3
121	S95158	1995	4,5	Spätburgunder	Pfalz	SLFA		-
122	S95180	1995	4,5	Spätburgunder	Pfalz	SLFA	acylierte Anth.	3
123	S95181	1995	4,5	Spätburgunder	Pfalz	SLFA		-
124	S96169	1996	3,5	Spätburgunder	Pfalz	SLFA		-
125	S96170	1996	3,5	Spätburgunder	Pfalz	SLFA		-
126	S96171	1996	3,5	Spätburgunder	Pfalz	SLFA		-
127	S96219	1996	3,5	Spätburgunder	Pfalz	SLFA		-
128	S96220	1996	3,5	Spätburgunder	Pfalz	SLFA		-
129	S97137	1997	2,5	Spätburgunder	Pfalz	SLFA	acylierte Anth.	3
130	S97171	1997	2,5	Spätburgunder	Pfalz	SLFA		-
131	S97172	1997	2,5	Spätburgunder	Pfalz	SLFA		-
132	S97185	1997	2,5	Spätburgunder	Pfalz	SLFA		-
133	S97186	1997	2,5	Spätburgunder	Pfalz	SLFA		-
134	S97187	1997	2,5	Spätburgunder	Pfalz	SLFA	acylierte Anth.	3
135	S97191	1997	2,5	Spätburgunder	Pfalz	SLFA		-
136	S97193	1997	2,5	Spätburgunder	Pfalz	SLFA		-
137	S98175	1998	1,5	Spätburgunder	Pfalz	SLFA		-
138	S98182	1998	1,5	Spätburgunder	Pfalz	SLFA		-
139	S98197	1998	1,5	Spätburgunder	Pfalz	SLFA		-
140	S98229	1998	1,5	Spätburgunder	Pfalz	SLFA		-
141	S98230	1998	1,5	Spätburgunder	Pfalz	SLFA		-
142	Sr96176	1996	3,5	Schwarzriesling	Pfalz	SLFA	acylierte Anth.	3
143	Sr98195	1998	1,5	Schwarzriesling	Pfalz	SLFA	acylierte Anth.	3
144	T98181	1998	1,5	Trollinger	Pfalz	SLFA		-
148	Sa99-1-2	1999	1,5	Samtrot	Württemberg	SLVWO		-
149	Sa99-1-3	1999	1,5	Samtrot	Württemberg	SLVWO	Diglukoside	2
150	Sa99-1-4	1999	1,5	Samtrot	Württemberg	SLVWO		-
151	Sr99-9-2	1999	1,5	Schwarzriesling	Württemberg	SLVWO		-
152	Sr99-9-3	1999	1,5	Schwarzriesling	Württemberg	SLVWO		-
153	L99-11-1	1999	1,5	Lemberger	Württemberg	SLVWO		-
154	L99-11-2	1999	1,5	Lemberger	Württemberg	SLVWO		-
155	L99-11-3	1999	1,5	Lemberger	Württemberg	SLVWO		-

FSUJ Nr.	Fallname	Jahr- gang	Alter (Jahr)	Sorte	Anbaugebiet	Genauere Herkunft	Bemerkung	Störung
156	L99-11-4	1999	1,5	Lemberger	Württemberg	SLVWO		-
157	L99-11-5	1999	1,5	Lemberger	Württemberg	SLVWO		-
158	L00-11-1	2000	0,5	Lemberger	Württemberg	SLVWO		-
159	L00-11-2	2000	0,5	Lemberger	Württemberg	SLVWO		-
160	L00-11-3	2000	0,5	Lemberger	Württemberg	SLVWO		-
161	L00-11-4	2000	0,5	Lemberger	Württemberg	SLVWO		-
162	L00-11-5	2000	0,5	Lemberger	Württemberg	SLVWO		-
163	Sr0-16-1	2000	0,5	Schwarzriesling	Württemberg	SLVWO	acylierte Anth.	3
164	Sr0-16-2	2000	0,5	Schwarzriesling	Württemberg	SLVWO		-
165	Sr0-16-3	2000	0,5	Schwarzriesling	Württemberg	SLVWO		-
166	Sr0-16-4	2000	0,5	Schwarzriesling	Württemberg	SLVWO		-
167	Sr97-3-1	1997	3,5	Schwarzriesling	Württemberg	SLVWO		-
168	Sr97-3-2	1997	3,5	Schwarzriesling	Württemberg	SLVWO		-
169	Sr97-3-3	1997	3,5	Schwarzriesling	Württemberg	SLVWO		-
170	Sr97-3-4	1997	3,5	Schwarzriesling	Württemberg	SLVWO		-
171	Sr97-5-1	1997	3,5	Schwarzriesling	Württemberg	SLVWO		-
172	Sr97-5-2	1997	3,5	Schwarzriesling	Württemberg	SLVWO		-
173	Sr97-5-3	1997	3,5	Schwarzriesling	Württemberg	SLVWO		-
174	Sr97-5-4	1997	3,5	Schwarzriesling	Württemberg	SLVWO		-
175	T97-6-1	1997	3,5	Trollinger	Württemberg	SLVWO		-
176	T97-6-2	1997	3,5	Trollinger	Württemberg	SLVWO		-
177	T97-6-3	1997	3,5	Trollinger	Württemberg	SLVWO		-
178	T97-6-4	1997	3,5	Trollinger	Württemberg	SLVWO		-
179	T97-7-1	1997	3,5	Trollinger	Württemberg	SLVWO		-
180	T97-7-2	1997	3,5	Trollinger	Württemberg	SLVWO		-
181	T97-7-3	1997	3,5	Trollinger	Württemberg	SLVWO		-
182	T97-7-4	1997	3,5	Trollinger	Württemberg	SLVWO		-
183	Sr97-8-1	1997	3,5	Schwarzriesling	Württemberg	SLVWO		-
184	Sr97-8-2	1997	3,5	Schwarzriesling	Württemberg	SLVWO		-
185	Sr97-8-3	1997	3,5	Schwarzriesling	Württemberg	SLVWO		-
186	T97-10-1	1997	3,5	Trollinger	Württemberg	SLVWO		-
187	T97-10-2	1997	3,5	Trollinger	Württemberg	SLVWO		-
188	T97-10-3	1997	3,5	Trollinger	Württemberg	SLVWO		-
189	T97-10-4	1997	3,5	Trollinger	Württemberg	SLVWO		-
190	T97-11-1	1997	3,5	Trollinger	Württemberg	SLVWO		-
191	T97-11-2	1997	3,5	Trollinger	Württemberg	SLVWO		-
192	T97-11-3	1997	3,5	Trollinger	Württemberg	SLVWO		-
193	T97-11-4	1997	3,5	Trollinger	Württemberg	SLVWO		-
194	L98-3-1	1998	2,5	Lemberger	Württemberg	SLVWO	Diglukoside	2
195	L98-3-3	1998	2,5	Lemberger	Württemberg	SLVWO	Diglukoside	2
196	L98-4-2	1998	2,5	Lemberger	Württemberg	SLVWO		-
197	L98-4-4	1998	2,5	Lemberger	Württemberg	SLVWO		-
198	L98-8-2	1998	2,5	Lemberger	Württemberg	SLVWO		-
199	L98-8-3	1998	2,5	Lemberger	Württemberg	SLVWO		-
200	L98-8-4	1998	2,5	Lemberger	Württemberg	SLVWO		-

FSUJ Nr.	Fallname	Jahr-gang	Alter (Jahr)	Sorte	Anbaugebiet	Genauere Herkunft	Bemerkung	Störung
201	T98-9-1	1998	2,5	Trollinger	Württemberg	SLVWO		-
202	T98-9-2	1998	2,5	Trollinger	Württemberg	SLVWO	Diglukosid-Spuren	1
203	L00-6-1	2000	0,5	Lemberger	Württemberg	SLVWO		-
204	L00-6-2	2000	0,5	Lemberger	Württemberg	SLVWO		-
205	L00-6-5	2000	0,5	Lemberger	Württemberg	SLVWO		-
206	L00-6-6	2000	0,5	Lemberger	Württemberg	SLVWO		-
207	T00-14-1	2000	0,5	Trollinger	Württemberg	SLVWO		-
208	T00-14-3	2000	0,5	Trollinger	Württemberg	SLVWO		-
209	T00-14-4	2000	0,5	Trollinger	Württemberg	SLVWO		-
210	T00-14-5	2000	0,5	Trollinger	Württemberg	SLVWO		-

Kommerzielle Weine:

FSUJ Nr.	Fallname	Jahr-gang	Alter (Jahr)	Sorte	Anbaugebiet	Genauere Herkunft / Abfüller	Bemerkung
145	Kcandes	2000	0,5	C. Sauvignon	Chile	Valle Central	
146	Kcpays	1999	1,5	C. Sauvignon	Frankreich	Pays d'Oc	
147	Kmpays	1999	1,5	Merlot	Frankreich	Pays d'Oc	
211	KR99SLV	1999	2,25	Regent	Württemberg	SLVWO	
212	KD99	1999	2,25	Dornfelder	Pfalz	Hambacher Pfaffengrund	
213	KP99-2	1999	2,25	Portugieser	Pfalz	Lorch Weinkellerei	
214	KD00-1	2000	1,5	Dornfelder	Pfalz	Niederkirchen	
215	KD00-2	2000	1,5	Dornfelder	Pfalz	Peter Mertes Weinkellerei	
216	KD00-3	2000	1,5	Dornfelder	Pfalz	-	
217	KS99-1	1999	2,5	Spätburgunder	Pfalz	Lorch Weinkellerei	viel acylierte Anth.
218	KD00-4	2000	1,5	Dornfelder	Pfalz	Ilbesheim	
219	KTL99SLV	1999	2,5	Trollinger mit Lemberger	Württemberg	SLVWO	Diglukoside
220	KS99-2	1999	2,5	Spätburgunder	Baden	-	viel Diglukoside
221	KL98SLV	1998	3,5	Lemberger	Württemberg	SLVWO	
222	KL99SLV	1999	2,5	Lemberger	Württemberg	SLVWO	
223	KS99-3	1999	2,5	Spätburgunder	Pfalz	Peter Mertes Weinkellerei	viel acylierte Anth.
224	KP99-3	1999	2,5	Portugieser	Pfalz	Privatkellerei Franz Wilh. Langguth	Weißherbst
225	KP98	1998	3,5	Portugieser	Pfalz	Privatkellerei Franz Wilh. Langguth	Weißherbst
226	KP00-3	2000	1,5	Portugieser	Pfalz	Lorch Weinkellerei	Weißherbst
227	KP99-1	1999	2,5	Portugieser	Pfalz	Lorch Weinkellerei	Weißherbst
228	KSr99SLV-2	1999	2,5	Schwarzriesling	Württemberg	SLVWO	
229	KT00SLV	2000	1,5	Trollinger	Württemberg	SLVWO	
230	KP00-1	2000	1,5	Portugieser	Pfalz	Lorch Weinkellerei	Weißherbst

FSUJ Nr.	Fallname	Jahr- gang	Alter (Jahr)	Sorte	Anbaugebiet	Genauere Herkunft / Abfüller	Bemerkung
231	K1a99	1999	2,5	Labrusca	Saale-Unstrut	Jenaer Sonnenberg	
232	KD00-5	2000	1,5	Dornfelder	Pfalz	Rietburg	
233	KSr99SLV-1	1999	2,5	Schwarzriesling	Württemberg	SLVWO	
234	KP00-2	2000	1,5	Portugieser	Pfalz	Peter Mertes Weinkellerei	Weißherbst
235	K96Sra	1996	1,5	Spätburgunder	Franken	Sommerach	viel acylierte Anth.
236	K96DmRb	1996	1,5	Domina	Franken	Obernbreit	
237	K96FR	1996	1,5	Frühburgunder	Franken	Randersacker	Spätlese
238	K94Sra	1994	3,5	Spätburgunder	Franken	Großheubach	Auslese, stark abgebaute Anth.
239	K96SRb	1996	1,5	Spätburgunder	Franken	Frickenhausen	acylierte Anth.
240	K95SR	1995	2,5	Spätburgunder	Franken	Karlstadt	viel acylierte Anth.
241	K95SrR	1995	2,5	Schwarzriesling	Franken	Nordheim	viel acylierte Anth.
242	K96Pra	1996	1,5	Portugieser	Franken	-	keine acylierte Anth.
243	K96SRc	1996	1,5	Spätburgunder	Franken	Nordheim	
244	K96SRd	1996	1,5	Spätburgunder	Franken	Bürgstadt	acylierte Anth.
245	K96Sre	1996	1,5	Spätburgunder	Franken	Klingenberg	stark abgebaute Anthocyane
246	K93SR	1993	4,5	Spätburgunder	Franken	Nordheim	viel acylierte Anth.
247	K97DmRa	1997	0,5	Domina	Franken	Kitzingen	
248	K96SrR	1996	1,5	Schwarzriesling	Franken	Nordheim	viel Diglukoside
249	K96PRb	1996	1,5	Portugieser	Franken	Dingolshausen	
250	K96SRf	1996	1,5	Spätburgunder	Franken	Altmannsdorf	stark abgebaute Anthocyane
251	K96SRg	1996	1,5	Spätburgunder	Franken	Nordheim	acylierte Anth.
252	K96SRh	1996	1,5	Spätburgunder	Franken	Bürgstadt	acylierte Anth.
253	K94SRb	1994	3,5	Spätburgunder	Franken	Würzburg	
254	K96DmRc	1996	1,5	Domina	Franken	Thüngersheim	
255	K93ZR	1993	4,5	Zweigeltrebe	Franken	Erlabrunn	Kabinett
256	K96SRi	1996	1,5	Spätburgunder	Franken	Markt Einersheim	viel acylierte Anth.
257	K96PRc	1996	1,5	Portugieser	Franken	Erlenbach	keine acylierte Anth.
258	K96SRj	1996	1,5	Spätburgunder	Franken	Nordheim	stark abgebaute Anthocyane
259	K96DmRd	1996	1,5	Domina	Franken	Obernbreit	
260	K97SRa	1997	0,5	Spätburgunder	Franken	Nordheim	viel acylierte Anth.
261	K97SRb	1997	0,5	Spätburgunder	Franken	Großheubach	Spätlese
262	K94SRc	1994	3,5	Spätburgunder	Franken	Thüngersheim	Kabinett, acylierte Anthocyane
263	K97DmRb	1997	0,5	Domina	Franken	Erlabrunn	Kabinett
264	K97SRc	1997	0,5	Spätburgunder	Franken	Obervolkach	Kabinett, acylierte Anthocyane
265	K97SRd	1997	0,5	Spätburgunder	Franken	Iphof	Spätlese, acylierte Anthocyane
266	K97DmRc	1997	0,5	Domina	Franken	Thüngersheim	
267	K97ZR	1997	0,5	Zweigeltrebe	Franken	Erlabrunn	
268	K97SRe	1997	0,5	Spätburgunder	Franken	Erlabrunn	
269	K97SrR	1997	0,5	Schwarzriesling	Franken	Retzbach	viel acylierte Anth.
270	K97DR	1997	0,5	Dornfelder	Franken	Thüngersheim	
271	K96SRk	1996	1,5	Spätburgunder	Franken	Randersacker	acylierte Anth.

3. Beschreibung der Weine von bekannter Kellertechnologie

[Kapitel 4.2.3.1]

MG = Maischegärung,
 ME X°C = Maischeerwärmung auf X°C
 KHE X/Y°C = Kurzzeithocherhitzung auf X°C mit rascher Rückkühlung auf Y°C

Dornfelder Weine von der SLFA Neustadt a. d. W. (Pfalz):

FSUJ Nr.	Fallname	Jahr- gang	Alter (Jahr)	Versuch	Varianten	Wärme- behandlung
47	D96V1-1	1996	2,75	Variation der Maischegärung	7 Tage Maischegärung	MG
48	D96V1-2	1996	2,75		7 Tage Maischegärung	MG
50	D96V2-2	1996	2,75		7 Tage Maischegärung -20% Saft	MG
51	D96V3-1	1996	2,75		7 Tage Maischegärung +1% Rappen	MG
52	D96V3-2	1996	2,75		7 Tage Maischegärung +1% Rappen	MG
53	D96V4-1	1996	2,75		14 Tage Maischegärung	MG
54	D96V5-1	1996	2,75		5 Tage Kaltmazeration, 9 Tage Gärung	MG
55	D96V5-2	1996	2,75		5 Tage Kaltmazeration, 9 Tage Gärung	MG
56	D96V6-1	1996	2,75		7 Tage, lineare Erwärmung von 20 auf 38°C	ME 38°C
57	D96V6-2	1996	2,75		7 Tage, lineare Erwärmung von 20 auf 38°C	ME 38°C
58	D96V7-1	1996	2,75		7 Tage, Erwärmung am Ende auf 38°C	ME 38°C
59	D96V7-2	1996	2,75		7 Tage Erwärmung am Ende auf 38°C	ME 38°C
60	D96V8-1	1996	2,75		2x täglich 25% Most überschwallen	MG
61	D96V8-2	1996	2,75		2x täglich 25% Most überschwallen	MG

Lemberger Weine von der SLVWO Weinsberg (Württemberg)

FSUJ Nr.	Fallname	Jahr- gang	Alter (Jahr)	Versuch	Varianten	Wärme- behandlung
153	L99-11-1	1999	1,5	Hefenvergleich (15 g/hL Hefe)	SIHA-Aktivhefe 3 (Fa. Begerow)	MG
154	L99-11-2	1999	1,5		NT 50 Constantiavin (Fa. Anchor)	MG
155	L99-11-3	1999	1,5		Lalvin 2056 (Fa. Lallemand)	MG
156	L99-11-4	1999	1,5		Lalvin 2323 (Fa. Lallemand)	MG
157	L99-11-5	1999	1,5		Oenoferm rouge (Fa. Erbslöh)	MG
158	L00-11-1	2000	0,5	Hefenvergleich (15 g/hL Hefe)	Uvaferm BDX (Fa. Uvaferm)	MG
159	L00-11-2	2000	0,5		NT 50 Constantiavin (Fa. Anchor)	MG
160	L00-11-3	2000	0,5		Lalvin 2056 (Fa. Lallemand)	MG
161	L00-11-4	2000	0,5		SIHA-Aktivhefe 10 (Fa. Begerow)	MG
162	L00-11-5	2000	0,5		SIHA-Aktivhefe 8 (Fa. Begerow)	MG
196	L98-4-2	1998	2,5	Teil- konzentrierung	Umkehrosiose	KHE 85/45°C
197	L98-4-4	1998	2,5		ohne Anreicherung	KHE 85/45°C
198	L98-8-2	1998	2,5	Hefenvergleich (10 g/hL Hefe)	NT 50 Constantiavin (Fa. Anchor)	MG
199	L98-8-3	1998	2,5		Lalvin 2056 (Fa. Lallemand)	MG
200	L98-8-4	1998	2,5		Oenoferm rouge (Fa. Erbslöh)	MG
203	L00-6-1	2000	0,5	Teil- konzentrierung	keine Anreicherung	KHE 85/45°C
204	L00-6-2	2000	0,5		Anreicherung mit Saccharose	KHE 85/45°C
205	L00-6-5	2000	0,5		Anreicherung mit Sacch. + Umkehrosiose	KHE 85/45°C
206	L00-6-6	2000	0,5		Anreicherung mit Sacch. + Umkehrosiose	KHE 85/45°C

Schwarzriesling Weine von der SLVWO Weinsberg (Württemberg)

FSUJ Nr.	Fallname	Jahr- Alter gang (Jahr)	Versuch	Varianten	Wärme- behandlung
151	Sr99-9-2	1999 1,5	Teil- konzentrierung	Anreicherung mit Saccharose	KHE 82/45°C
152	Sr99-9-3	1999 1,5		Konzentration durch Vakuumverdampfung	KHE 82/45°C
164	Sr0-16-2	2000 0,5	Kohle- behandlung	30 g/hL auf Maische	KHE 85/45°C
165	Sr0-16-3	2000 0,5		60 g/hL auf Maische	KHE 85/45°C
166	Sr0-16-4	2000 0,5		100 g/hL auf Maische	KHE 85/45°C
167	Sr97-3-1	1997 3,5	Fülligkeit der Rotweine - Diacetylbildung	Abstich und Klärung nach BSA ohne Luft	MG
168	Sr97-3-2	1997 3,5		Abstich und Klärung nach BSA mit Luft	MG
169	Sr97-3-3	1997 3,5		Abst. und Klär. 6 Wochen nach BSA	MG
170	Sr97-3-4	1997 3,5		Abst. und Klär. 18 Wochen nach BSA	MG
171	Sr97-5-1	1997 3,5	Maische- bewegung	Kontrolle ohne Bewegung	KHE 80/45°C
172	Sr97-5-2	1997 3,5		Gasrühren Luft nach 7 Stunden	KHE 80/45°C
173	Sr97-5-3	1997 3,5		Gasrühren Luft nach 4, 8, 12 Stunden	KHE 80/45°C
174	Sr97-5-4	1997 3,5		Gasrühren CO ₂ nach 4, 8, 12 Stunden	KHE 80/45°C
183	Sr97-8-1	1997 3,5	Maischegärung Optimierung	Maischegärung Kontrolle	MG
184	Sr97-8-2	1997 3,5		2x täglich 50% Most überschwallen	MG
185	Sr97-8-3	1997 3,5		bei 50°Oe Most abziehen, Maische allein vergären lassen, nach Abpressen vereinigen	MG

Trollinger Weine von der SLVWO Weinsberg (Württemberg)

FSUJ Nr.	Fallname	Jahr- Alter gang (Jahr)	Versuch	Varianten	Wärme- behandlung
176	T97-6-2	1997 3,5	Tanningabe im Frühstadium	2 g/hL Tannin zum Most	KHE 80/45°C
177	T97-6-3	1997 3,5		2 g/hL Tannin zum Most und 10 min Luft	KHE 80/45°C
178	T97-6-4	1997 3,5		70°C, Standzeit 14 h, 3 g/hL Tannin z. Most	ME 70°C
179	T97-7-1	1997 3,5	Maische- erwärmung: Optimal- temperatur	Maischegärung, bei 20° Oe abpressen	MG
180	T97-7-2	1997 3,5		60°C, Standzeit 14 h, Gasrühren mit CO ₂	ME 60°C
181	T97-7-3	1997 3,5		70°C, Standzeit 14 h, Gasrühren mit CO ₂	ME 70°C
182	T97-7-4	1997 3,5		80°C, Standzeit 14 h, Gasrühren mit CO ₂	ME 80°C
186	T97-10-1	1997 3,5	Maische- erwärmung: Zusatz Panzym Extrakt	Kontrolle ME 55°C, 5 h	ME 55°C
187	T97-10-2	1997 3,5		Panz. Extr. 2g/100kg Maische, ME 55°C, 5 h	ME 55°C
188	T97-10-3	1997 3,5		Kontrolle ME 75°C, 5 h	ME 75°C
189	T97-10-4	1997 3,5		Panz. Extr. 2g/100kg Maische, ME 75/55°C, 5h, Mostenzymierung 1 g/hL Panzym Clair	ME 75/55°C
190	T97-11-1	1997 3,5	KHE und MG: Zusatz Panzym Extrakt	4 g/hL Panz. Rubin zur Maische, Mostenzymierung 1 g/hL Panzym Clair	KHE 80/45°C
191	T97-11-2	1997 3,5		2 g/hL Panz. Rubin zur Maische, Mostenzymierung 1 g/hL Panzym Clair	KHE 80/45°C
192	T97-11-3	1997 3,5		Kontrolle: normale MG, 4 Tage	MG
193	T97-11-4	1997 3,5		MG, 3 g/hL Panzym Extrakt, 5 Tage	MG
201	T98-9-1	1998 2,5	Teil- konzentrierung	Anreicherung um 28 g/L Alkohol	KHE 85/45°C
202	T98-9-2	1998 2,5		Umkehrosiose	KHE 85/45°C
207	T00-14-1	2000 0,5	Flotation	Sedimentation	KHE 85/45°C
208	T00-14-3	2000 0,5		Flotation mit Luft	KHE 85/45°C
209	T00-14-4	2000 0,5		Flotation mit CO ₂	KHE 85/45°C
210	T00-14-5	2000 0,5		Flotation mit Luft und Umkehrosiose	KHE 85/45°C

Spätburgunder Weine von der SLFA Neustadt a. d. W. (Pfalz):

FSUJ Nr.	Fallname	Jahr- Alter gang (Jahr)	Versuch	Varianten	Wärme- behandlung
1	S96V1-1	1996 2,75	Variation der Maischegärung	7 Tage Maischegärung	MG
2	S96V1-2	1996 2,75		7 Tage Maischegärung	MG
3	S96V2-1	1996 2,75		7 Tage Maischegärung -20% Saft	MG
4	S96V2-2A	1996 2,75		7 Tage Maischegärung -20% Saft	MG
5	S96V2-2B	1996 2,75		7 Tage Maischegärung -20% Saft	MG
6	S96V3-1	1996 2,75		7 Tage Maischegärung +1% Rappen	MG
7	S96V3-2	1996 2,75		7 Tage Maischegärung +1% Rappen	MG
8	S96V4-1	1996 2,75		14 Tage Maischegärung	MG
9	S96V4-2	1996 2,75		14 Tage Maischegärung	MG
10	S96V5-1	1996 2,75		5 Tage Kaltmazeration, 9 Tage Gärung	MG
11	S96V5-2	1996 2,75		5 Tage Kaltmazeration, 9 Tage Gärung	MG
12	S96V6-1	1996 2,75		7 Tage, lineare Erwärmung von 20 auf 38°C	ME 38°C
13	S96V6-2	1996 2,75		7 Tage, lineare Erwärmung von 20 auf 38°C	ME 38°C
14	S96V7-1	1996 2,75		7 Tage, Erwärmung am Ende auf 38°C	ME 38°C
15	S96V7-2	1996 2,75		7 Tage Erwärmung am Ende auf 38°C	ME 38°C
16	S96V8-1	1996 2,75		2x täglich 25% Most überschwallen	MG
17	S96V8-2	1996 2,75		2x täglich 25% Most überschwallen	MG
18	S96V9-1	1996 2,75		Abwirzen bei 20°Oe (3 Tage)	MG
19	S96V9-2	1996 2,75		Abwirzen bei 20°Oe (3 Tage)	MG
20	S96V10-1	1996 2,75		Kurzzeithocherhitzung	KHE 75°C
21	S97V1-1	1997 1,75	Variation der Maischegärung	7 Tage Maischegärung	MG
23	S97V2-1	1997 1,75		7 Tage Maischegärung -20% Saft	MG
24	S97V2-2	1997 1,75		7 Tage Maischegärung -20% Saft	MG
25	S97V3-1	1997 1,75		7 Tage MG mit Enzym (Fa. Novo Ferm)	MG
26	S97V3-2	1997 1,75		7 Tage MG mit Enzym (Fa. Novo Ferm)	MG
27	S97V4-1	1997 1,75		14 Tage Maischegärung	MG
28	S97V4-2	1997 1,75		14 Tage Maischegärung	MG
29	S97V5-1	1997 1,75		14d MG (7d Luftzufuhr)	MG
30	S97V5-2	1997 1,75		14d MG (7d Luftzufuhr)	MG
31	S97V6-1	1997 1,75		7 Tage Kaltmazeration, 7 Tage Gärung	MG
32	S97V6-2	1997 1,75		7 Tage Kaltmazeration, 7 Tage Gärung	MG
33	S97V7-1	1997 1,75		7 Tage, Erwärmung am Ende auf 38°C	ME 38°C
34	S97V7-2	1997 1,75		7 Tage Erwärmung am Ende auf 38°C	ME 38°C
35	S97V8-1	1997 1,75		2x täglich 50% Most überschwallen	MG
36	S97V8-2	1997 1,75		2x täglich 50% Most überschwallen	MG
39	S97V10-1	1997 1,75		Abwirzen bei 20°Oe (3 Tage)	MG
40	S97V10-2	1997 1,75		Abwirzen bei 20°Oe (3 Tage)	MG
41	S97V11-1	1997 1,75		Kurzzeithocherhitzung	KHE 75°C
42	S97V11-2	1997 1,75		Kurzzeithocherhitzung	KHE 75°C

Anhang D: Ergebnisse der statistischen Auswertungen

1. Statistik der prozentualen Peakflächen aus allen untersuchten Weinen, sortiert nach Größe

[Kapitel 4.1.1]

Anthocyan	\bar{x} (%)	x_{min} (%)	x_{max} (%)	s_x (%)
Ma	61,16	8,21	87,81	18,12
Pe	8,07	1,49	15,29	3,02
Pä	7,83	0,40	44,12	8,63
De	5,67	0,36	20,00	3,77
Ma2	2,90	0,00	62,13	12,10
A1	2,41	0,03	22,24	3,39
Maac	2,13	0,00	10,96	3,04
Macu	1,81	0,00	7,00	1,82
A2	1,52	0,01	21,86	2,55
VitA	1,47	0,03	9,54	1,54
Cy	1,14	0,00	12,23	1,70
Päcu	0,63	0,00	5,81	1,06
Pä2	0,62	0,00	16,78	2,59
Päac	0,47	0,00	2,21	0,64
A3	0,46	0,01	5,11	0,62
Pe2	0,45	0,00	11,88	1,94
Deac	0,41	0,00	2,75	0,73
Peac	0,40	0,00	2,38	0,67
De2	0,17	0,00	4,77	0,78
Cyac	0,17	0,00	1,15	0,26
Cy2	0,12	0,00	3,44	0,48

2. Ausschnitte aus der Korrelationsmatrix der prozentualen Peakflächen

[Kapitel 4.1.1]

	De2	Cy2	Pe2	Pä2	Ma2
De2	1,00	0,97	0,99	0,84	0,90
Cy2	0,97	1,00	0,99	0,91	0,94
Pe2	0,99	0,99	1,00	0,89	0,94
Pä2	0,84	0,91	0,89	1,00	0,97
Ma2	0,90	0,94	0,94	0,97	1,00

	De	Pe	Deac	Peac	Maac	Macu
De	1,00	0,93	0,53	0,48	0,28	0,23
Pe	0,93	1,00	0,51	0,49	0,29	0,27
Deac	0,53	0,51	1,00	0,94	0,81	0,56
Peac	0,48	0,49	0,94	1,00	0,89	0,59
Maac	0,28	0,29	0,81	0,89	1,00	0,69
Macu	0,23	0,27	0,56	0,59	0,69	1,00

	Cy	Pä	Cyac	Päac	Päcu
Cy	1,00	0,92	0,73	0,61	0,60
Pä	0,92	1,00	0,70	0,59	0,70
Cyac	0,73	0,70	1,00	0,90	0,62
Päac	0,61	0,59	0,90	1,00	0,65
Päcu	0,60	0,70	0,62	0,65	1,00

	VitA	A1	A2	A3
VitA	1,00	0,58	0,71	0,70
A1	0,58	1,00	0,76	0,80
A2	0,71	0,76	1,00	0,97
A3	0,70	0,80	0,97	1,00

3. Ergebnisse der Sortenklassifizierung mittels LDA

[Kapitel 4.2.2]

Variablenselektion gemäß Minimierung des Wilks' Lambda

Standardisierte Koeffizienten der Variablen für die Bildung der kanonischen Variablen

	KV 1	KV 2	KV 3	KV 4	KV 5	KV 6
Ma2	1,0096	-0,0058	0,0699	-0,0436	0,0083	0,0340
Maac	0,0433	0,8981	0,1285	0,1265	0,8457	0,3001
Päcu	-0,0389	-0,2589	0,9082	-0,1421	0,2159	-0,3995
Macu	0,0887	0,6807	0,0105	0,5124	-0,7479	0,3959
Peac	-0,0430	-0,2814	-0,2316	-0,9294	-0,5326	-0,1227
Pä	-0,1009	-0,3617	0,4786	-0,4932	0,0640	1,2840
Cyac	0,1056	0,5701	0,3412	0,6850	-0,2009	-1,2629
De	0,1012	0,1719	-0,0162	-0,5961	-0,1940	0,3124

Variablenselektion gemäß Maximierung der Reklassifizierungsrate

Standardisierte Koeffizienten der Variablen für die Bildung der kanonischen Variablen

	KV 1	KV 2	KV 3	KV 4	KV 5	KV 6
Päcu	-0,4922	0,6542	0,8410	0,0280	-0,1141	0,1659
Maac	1,0435	0,2731	0,1825	0,0458	-0,6423	-0,3006
Macu	0,7025	0,0859	-0,4785	-0,5758	0,6071	0,1339
Pe	0,3279	-0,2789	0,4977	0,2770	0,3321	-0,7780
VitA	0,1844	-0,7331	0,4931	0,1511	0,0659	0,6961
Ma	0,2421	-1,0556	0,7805	-0,3075	-0,0543	0,1855
Deac	-0,3513	-0,4383	0,1460	0,5554	0,5678	0,8419

Korrelationen zwischen den Originalvariablen und den kanonischen Variablen

	KV 1	KV 2	KV 3	KV 4	KV 5	KV 6
Päcu	-0,0681	0,5961	0,6872	-0,2792	0,2272	0,1955
Maac	0,7186	0,2439	0,1252	0,3899	-0,3689	0,2006
Macu	0,3992	0,2960	0,0699	-0,5181	0,6615	0,2051
Pe	0,1170	-0,0453	0,2872	0,4259	0,5889	-0,5887
VitA	0,0091	-0,1287	0,0259	0,2650	-0,0303	0,3839
Ma	0,0127	-0,4227	0,3423	-0,6585	-0,1702	-0,0628
Deac	0,3042	0,0802	0,0667	0,5962	0,3250	0,3406

Mittelwerte der kanonischen Variablen bei den einzelnen Sorten

	KV 1	KV 2	KV 3	KV 4	KV 5	KV 6
Spätburgunder	-2,7451	-2,8265	0,0496	0,1586	-0,6422	0,3211
Portugieser	9,7330	1,8360	-0,0260	-1,2191	-1,9883	-0,2262
Dornfelder	5,7737	-0,0576	0,6496	1,9180	1,1766	0,2169
Trollinger	-4,2017	6,5241	2,6325	-0,2836	0,0959	0,0490
Schwarzriesling	-2,3895	-2,0168	-0,0391	0,5232	0,1997	-1,6113
Lemberger	1,1656	-1,5837	-0,7701	-2,5986	1,8626	0,1083
Regent	-2,8524	6,3153	-7,1987	0,8320	-0,0435	0,1099

Klassifizierungsmatrix der Sorten

	korrekt (%)	Spätburg.	Portug.	Dornfeld.	Trollinger	Schwarzr.	Lemberg.	Regent
Spätburg.	93,44	57				4		
Portug.	100		16					
Dornfeld.	100			26				
Trollinger	95,65				22		1	
Schwarzr.	56,25	7				9		
Lemberg.	100						19	
Regent	100							9
Gesamt	92,94	64	16	26	22	13	20	9

4. Ergebnisse der Sortenklassifizierung mittels Methode der 3-nächsten Nachbarn

[Kapitel 4.2.2]

Variablenselektion gemäß Minimierung des Wilks' Lambda

Klassifizierungsmatrix der Sorten

	korrekt (%)	Spätburg.	Portug.	Dornfeld.	Trollinger	Schwarzr.	Lemberg.	Regent
Spätburg.	95,08	58				3		
Portug.	100		16					
Dornfeld.	100			26				
Trollinger	100				23			
Schwarzr.	87,5	2				14		
Lemberg.	100						19	
Regent	100							9
Gesamt	97,06	60	16	26	23	17	19	9

Variablenselektion gemäß Maximierung der Reklassifizierungsrate

Klassifizierungsmatrix der Sorten

	korrekt (%)	Spätburg.	Portug.	Dornfeld.	Trollinger	Schwarzr.	Lemberg.	Regent
Spätburg.	93,44	57				4		
Portug.	100		16					
Dornfeld.	100			26				
Trollinger	100				23			
Schwarzr.	100					16		
Lemberg.	100						19	
Regent	100							9
Gesamt	97,65	57	16	26	23	20	19	9

5. Ergebnisse der Sortenklassifizierung mittels Klassifikationsbäumen

[Kapitel 4.2.2]

Variablenselektion gemäß Minimierung des Wilks' Lambda

Standardisierte Koeffizienten der Variablen für die multivariaten Entscheidungen

	Knoten 1	Knoten 2	Knoten 4	Knoten 5	Knoten 8	Knoten 9
Ma2	0,077	0,010	-0,664	-0,246	-0,922	1,104
Maac	0,004	0,055	0,461	0,071	0,062	-0,134
Päcu	-0,002	-0,011	-0,225	-0,025	-0,058	-0,322
Macu	0,003	0,031	0,484	0,021	0,113	0,038
Peac	0,002	0,004	-0,766	-0,011	-0,165	0,090
Pä	-0,002	-0,010	0,183	-0,029	-0,099	0,197
Cyac	0,002	0,015	0,086	0,013	0,110	-0,042
De	0,002	0,007	0,068	0,006	0,003	0,030
Deac	-0,004	-0,021	0,000	-0,014	0,002	0,029
A3	-0,001	-0,004	-0,040	0,040	-0,028	-0,099
Konstant	-0,047	0,052	0,022	-0,091	-0,222	0,310

Klassifizierungsmatrix der Sorten

korrekt (%)	Spätburg.	Portug.	Dornfeld.	Trollinger	Schwarzr.	Lemberg.	Regent
Spätburg.	93,44	57	1		3		
Portug.	100		16				
Dornfeld.	100			26			
Trollinger	95,65				22		1
Schwarzr.	62,5	3			3	10	
Lemberg.	100						19
Regent	100						
Gesamt	93,53	60	17	26	25	13	20

6. Ergebnisse der Sortenklassifizierung mittels zweistufiger LDA

[Kapitel 4.2.2.1]

Gruppentrennung:

Standardisierte Koeffizienten der Variablen für die Bildung der kanonischen Variablen

	KV 1	KV 2	KV 3	KV 4
Ma2	-1,0008	0,0122	-0,0409	-0,0181
Maac	0,0121	-0,6695	-0,3665	-0,6723
Päcu	0,0497	0,6899	-0,9423	-0,1885
Macu	-0,0889	-0,7153	0,0787	0,9573

Korrelationen zwischen den Originalvariablen und den kanonischen Variablen

	KV 1	KV 2	KV 3	KV 4
Ma2	-0,9973	0,0450	-0,0080	-0,0584
Maac	0,0181	-0,7381	-0,4366	-0,5140
Päcu	0,0363	0,2460	-0,9320	0,2638
Macu	0,0010	-0,4691	-0,4904	0,7345

Mittelwerte der kanonischen Variablen bei den einzelnen Gruppen

	KV 1	KV 2	KV 3	KV 4
Burgunder	2,0926	1,6775	2,0695	-0,4821
Trollinger	2,2394	4,3970	-5,2447	0,1443
Lemberger	1,7319	-1,2826	1,0171	3,1027
„Gleich“	1,7214	-4,9674	-1,3800	-0,5914
Regent	-35,3160	0,3002	-0,0094	-0,0343

Burgundertrennung:

Standardisierte Koeffizienten der Variablen für die Bildung der kanonischen Variablen

	KV 1
De	0,4013
Pä	0,8546
A2	0,8149
A3	-0,8811

Korrelationen zwischen den Originalvariablen und den kanonischen Variablen

	KV 1
De	0,5267
Pä	0,8717
A2	-0,2577
A3	-0,2878

Mittelwerte der kanonischen Variablen bei den einzelnen Sorten

	KV 1
Spätburgunder	-0,5692
Schwarzriesling	2,1702

„Gleich“-Trennung:

Standardisierte Koeffizienten der Variablen für die Bildung der kanonischen Variablen

	KV 1
Pe	1,4384
Päcu	-0,8166
A1	-0,7587

Korrelationen zwischen den Originalvariablen und den kanonischen Variablen

	KV 1
Pe	0,5681
Päcu	-0,1460
A1	-0,0838

Mittelwerte der kanonischen Variablen bei den einzelnen Sorten

	KV 1
Portugieser	-3,6816
Dornfelder	2,2656

Klassifizierung gesamt:

korrekt (%)		Spätburg.	Portug.	Dornfeld.	Trollinger	Schwarzr.	Lemberg.	Regent
Spätburg.	96,72	59				2		
Portug.	100		16					
Dornfeld.	100			26				
Trollinger	95,65				22		1	
Schwarzr.	68,75	5				11		
Lemberg.	100						19	
Regent	100							9
Gesamt	95,29	64	16	26	22	13	20	9

7. Ergebnisse der zweistufigen Sortenklassifizierung mittels 3-nächsten Nachbarn

[Kapitel 4.2.2.1]

Klassifizierungsmatrix der Sorten

korrekt (%)		Spätburg.	Portug.	Dornfeld.	Trollinger	Schwarzr.	Lemberg.	Regent
Spätburg.	95,08	58				3		
Portug.	100		16					
Dornfeld.	100			26				
Trollinger	100				23			
Schwarzr.	100					16		
Lemberg.	100						19	
Regent	100							9
Gesamt	98,24	58	16	26	23	19	19	9

8. Ergebnisse der zweistufigen Sortenklassifizierung mittels Klassifikationsbäumen

[Kapitel 4.2.2.1]

Gruppentrennung:

Standardisierte Koeffizienten der Variablen für die multivariaten Entscheidungen

	Knoten 1	Knoten 3	Knoten 4	Knoten 5
Ma2	-0,077	0,033	1,337	-0,164
Maac	0,000	0,043	0,236	0,122
Päcu	0,001	-0,042	0,052	-0,083
Macu	-0,002	0,040	0,004	0,011
Konstant	0,001	0,032	0,449	-0,072

9. Eigenwerte und Ladungen der extrahierten Hauptkomponenten

[Kapitel 4.2.3.1]

Dorfelder Weine, HKA von 16 Variablen (ohne Anthocyanidin-diglukoside)

HK	Eigenwert	% gesamt Varianz	kumul. Eigenwert	kumul. %
1	8,03	50,21	8,03	50,21
2	3,56	22,26	11,60	72,47
3	1,95	12,17	13,54	84,64
4	1,12	7,01	14,66	91,65
5	0,67	4,19	15,34	95,85
6	0,33	2,08	15,67	97,92

Ladungen der Hauptkomponenten:

	HK1	HK2	HK3	HK4	HK5	HK6
De	-0,54	0,70	-0,36	0,22	-0,11	0,10
Cy	-0,45	-0,33	-0,65	0,38	0,14	-0,29
Pe	-0,60	0,73	0,10	-0,03	-0,23	0,10
Pä	0,25	-0,49	-0,74	0,05	-0,36	-0,05
Ma	0,43	-0,75	0,33	-0,33	-0,10	-0,08
Deac	-0,78	0,53	0,17	-0,02	-0,21	-0,06
VitA	0,96	0,13	-0,04	0,15	0,15	0,05
Cyac	0,27	0,30	-0,60	-0,63	0,22	0,14
Peac	0,41	0,79	-0,20	-0,21	0,24	-0,20
Päac	-0,80	-0,29	0,31	-0,29	0,13	-0,16
Maac	-0,82	0,43	0,17	-0,06	0,11	-0,26
A1	0,94	0,25	-0,08	0,00	0,13	-0,03
Päcu	-0,92	-0,26	0,02	0,15	0,21	0,11
Macu	-0,80	-0,30	-0,06	0,22	0,40	0,20
A2	0,89	0,16	0,25	0,29	0,15	-0,04
A3	0,82	0,33	0,31	0,33	-0,02	-0,03

Lemberger Weine, HKA von 16 Variablen (ohne Anthocyanidin-diglukoside)

HK	Eigenwert	% gesamt Varianz	kumul. Eigenwert	kumul. %
1	7,93	49,58	7,93	49,58
2	4,80	29,99	12,73	79,56
3	1,36	8,53	14,09	88,09
4	1,05	6,58	15,15	94,68

Ladungen der Hauptkomponenten:

	HK1	HK2	HK3	HK4
De	0,85	-0,41	-0,31	0,08
Cy	0,77	0,25	-0,53	-0,07
Pe	0,81	-0,55	-0,10	0,07
Pä	0,18	-0,66	-0,66	0,09
Ma	-0,78	0,57	0,21	0,08
Deac	-0,49	-0,69	0,03	-0,19
VitA	0,91	0,03	0,33	-0,16
Cyac	0,73	-0,50	0,37	-0,17
Peac	-0,29	-0,92	0,21	-0,03
Päac	-0,33	-0,89	0,07	-0,12
Maac	-0,25	-0,93	0,14	-0,03
A1	0,96	0,10	0,04	0,02
Päcu	-0,83	-0,24	-0,17	-0,41
Macu	-0,48	0,38	-0,29	-0,72
A2	0,89	0,09	0,26	-0,33
A3	0,91	0,21	0,06	-0,33

Schwarzriesling Weine, HKA von 9 Variablen (nur freie Anthocyane und Addukte)

HK	Eigenwert	% gesamt Varianz	kumul. Eigenwert	kumul. %
1	4,33	48,15	4,33	48,15
2	2,91	32,39	7,25	80,54
3	1,09	12,11	8,34	92,65

Ladungen der Hauptkomponenten:

	HK1	HK2	HK3
De	0,69	0,68	0,23
Cy	0,67	0,55	-0,41
Pe	0,78	0,57	0,25
Pä	-0,31	0,37	-0,86
Ma	-0,93	-0,35	0,08
VitA	0,32	-0,82	-0,08
A1	0,66	-0,63	-0,16
A2	0,80	-0,54	-0,12
A3	0,80	-0,48	-0,06

Spätburgunder Weine, HKA von 9 Variablen (nur freie Anthocyane und Addukte)

HK	Eigenwert	% gesamt Varianz	kumul. Eigenwert	kumul. %
1	5,46	60,66	5,46	60,66
2	2,02	22,46	7,48	83,13
3	0,74	8,24	8,22	91,37

Ladungen der Hauptkomponenten:

	HK1	HK2	HK3
De	0,26	0,94	0,13
Cy	0,71	0,19	-0,60
Pe	-0,29	0,90	0,25
Pä	-0,63	0,48	-0,47
Ma	-0,97	-0,23	-0,04
VitA	0,94	0,04	-0,20
A1	0,89	-0,05	0,08
A2	0,95	0,00	0,12
A3	0,95	-0,04	0,13

Trollinger Weine, HKA von 16 Variablen (ohne Anthocyanidin-diglukoside)

HK	Eigenwert	% gesamt Varianz	kumul. Eigenwert	kumul. %
1	7,59	47,41	7,59	47,41
2	3,67	22,96	11,26	70,37
3	2,27	14,18	13,53	84,55
4	7,59	47,41	7,59	47,41

Ladungen der Hauptkomponenten:

	HK1	HK2	HK3
De	0,14	-0,81	0,27
Cy	0,92	0,21	0,04
Pe	-0,73	-0,65	0,05
Pä	0,93	0,23	-0,20
Ma	-0,95	-0,07	0,16
Deac	0,19	-0,86	-0,09
VitA	-0,29	-0,39	0,63
Cyac	0,93	-0,06	-0,29
Peac	0,26	-0,88	-0,31
Päac	0,85	-0,04	-0,45
Maac	0,18	-0,77	-0,46
A1	0,60	-0,11	0,57
Päcu	-0,54	0,42	-0,52
Macu	-0,91	0,17	0,07
A2	0,74	0,05	0,59
A3	0,76	0,11	0,42

10. Klassifizierungen von authentischen Weinen und kommerziellen Weinen

[Kapitel 4.3.1]

Authentische Weine, die aufgrund ihres abweichenden Fingerprint in die Modellbildung nicht einbezogen wurden:

(mit Störung 2 und 3: mittelmäßig, bzw. stark; vgl. Anhang C.2)

FSU Nr.	Sorte	Vorhersage						Gruppe*
		LDA		3-nächsten Nachbarn		Klassifikationsbaum		
		einstufig	zweistufig	einstufig	zweistufig	einstufig	zweistufig	
22	Spätburgunder	sicher	sicher	sicher	sicher	gut	Trollinger	1)
38	Spätburgunder	sicher	sicher	sicher	sicher	gut	Trollinger	
105	Dornfelder	sicher	sicher	sicher	sicher	gut	Regent	
194	Lemberger	sicher	sicher	sicher	sicher	gut	gut	
195	Lemberger	sicher	sicher	sicher	sicher	gut	gut	
37	Spätburgunder	Lemberg.	Lemberg.	Lemberg.	Lemberg.	Lemberg.	Regent	2)
119	Portugieser	Lemberg.	Lemberg.	gut	sicher	gut	Regent	
49	Dornfelder	sicher	„Burgunder“	gut	gut	Lemberg.	Regent	
109	Dornfelder	sicher	sicher	sicher	sicher	gut	Regent	
76	Portugieser	Lemberg.	Lemberg.	Lemberg.	Lemberg.	gut	Lemberg.	3)
65	Dornfelder	Lemberg.	Lemberg.	Lemberg.	Lemberg.	Lemberg.	Lemberg.	4)
112	Dornfelder	Lemberg.	Lemberg.	Portug.	Lemberg.	Portug.	Lemberg.	
122	Spätburgunder	sicher	sicher	sicher	sicher	gut	„Gleich“	6)
129	Spätburgunder	Lemberg.	Lemberg.	Portug.	Lemberg.	Lemberg.	Lemberg.	
134	Spätburgunder	gut	sicher	sicher	-	Lemberg.	Lemberg.	
142	Schwarzriesling	Dornfeld.	gut	Dornfeld.	„Gleich“	Lemberg.	„Gleich“	
143	Schwarzriesling	Lemberg.	Lemberg.	Lemberg.	Lemberg.	Lemberg.	Lemberg.	
163	Schwarzriesling	gut	Spätburg.	Lemberg.	Lemberg.	Trollinger	Lemberg.	

- * 1) Diglukoside bei Sorten anders als Regent (Störung 2)
 2) viel Diglukoside bei Sorten anders als Regent (Störung 3)
 3) wenig acetylierte Anthocyane bei Dornfelder oder Portugieser (Störung 2)
 4) keine acetylierte Anthocyane bei Dornfelder oder Portugieser (Störung 3)
 5) acylierte Anthocyane bei Spätburgunder oder Schwarzriesling (Störung 2)
 6) viel acylierte Anthocyane bei Spätburgunder oder Schwarzriesling (Störung 3)

Kommerzielle Weine mit untypischem Fingerprint:

FSU Nr.	Sorte	Vorhersage						Gruppe*
		LDA		3-nächsten Nachbarn		Klassifikationsbaum		
		einstufig	zweistufig	einstufig	zweistufig	einstufig	zweistufig	
219	Trollinger mit Lemberger	Lemberg.	Lemberg.	Lemberg.	gut	Lemberg.	Regent	1)
220	Spätburgunder	Schwarzr.	gut	Schwarzr.	gut	Lemberg.	Regent	2)
248	Schwarzriesling	sicher	Spätburg.	Dornfeld.	sicher	Lemberg.	Regent	
242	Portugieser	Lemberg.	„Burgunder“	Schwarzr.	„Burgunder“	Schwarzr.	„Burgunder“	4)
257	Portugieser	Schwarzr.	„Burgunder“	Dornfeld.	„Burgunder“	Schwarzr.	„Burgunder“	
239	Spätburgunder	Lemberg.	Schwarzr.	Schwarzr.	Lemberg.	Schwarzr.	Lemberg.	6)
244	Spätburgunder	sicher	sicher	sicher	sicher	gut	„Gleich“	
251	Spätburgunder	sicher	gut	Dornfeld.	Schwarzr.	Schwarzr.	Trollinger	
252	Spätburgunder	sicher	gut	Schwarzr.	sicher	Schwarzr.	Trollinger	
262	Spätburgunder	Schwarzr.	gut	Schwarzr.	gut	Schwarzr.	gut	
264	Spätburgunder	Schwarzr.	Schwarzr.	Schwarzr.	Schwarzr.	Trollinger	Trollinger	
265	Spätburgunder	gut	Schwarzr.	Schwarzr.	Schwarzr.	Schwarzr.	Lemberg.	
271	Spätburgunder	Schwarzr.	Schwarzr.	Schwarzr.	Schwarzr.	gut	Lemberg.	
217	Spätburgunder	Lemberg.	Lemberg.	Portug.	Lemberg.	Lemberg.	Lemberg.	
223	Spätburgunder	Lemberg.	„Gleich“	Portug.	„Gleich“	Portug.	„Gleich“	
235	Spätburgunder	Dornfeld.	„Gleich“	Dornfeld.	„Gleich“	Portug.	„Gleich“	
240	Spätburgunder	sicher	gut	Dornfeld.	gut	Schwarzr.	„Gleich“	
246	Spätburgunder	Schwarzr.	gut	Dornfeld.	Schwarzr.	gut	„Gleich“	
256	Spätburgunder	sicher	gut	Schwarzr.	Schwarzr.	gut	„Gleich“	
260	Spätburgunder	Dornfeld.	gut	Dornfeld.	„Gleich“	Lemberg.	„Gleich“	
241	Schwarzriesling	Portug.	gut	sicher	„Gleich“	Spätburg.	„Gleich“	
269	Schwarzriesling	Spätburg.	Spätburg.	Portug.	„Gleich“	Trollinger	„Gleich“	
238	Spätburgunder	sicher	Schwarzr.	sicher	gut	Portug.	„Gleich“	7)
245	Spätburgunder	sicher	sicher	sicher	sicher	gut	gut	
250	Spätburgunder	sicher	gut	sicher	sicher	gut	Schwarzr.	
258	Spätburgunder	sicher	gut	sicher	sicher	gut	Schwarzr.	

- * 1) Diglukoside bei Sorten anders als Regent (Störung 2)
2) viel Diglukoside bei Sorten anders als Regent (Störung 3)
3) wenig acetylierte Anthocyane bei Dornfelder oder Portugieser (Störung 2)
4) keine acetylierte Anthocyane bei Dornfelder oder Portugieser (Störung 3)
5) acylierte Anthocyane bei Spätburgunder oder Schwarzriesling (Störung 2)
6) viel acylierte Anthocyane bei Spätburgunder oder Schwarzriesling (Störung 3)
7) stark abgebaute Anthocyane

Kommerzielle Weine ohne auffallende Abweichungen vom typischen Fingerprint

FSU Nr.	Sorte	Vorhersage						Gruppe*
		LDA		3-nächsten Nachbarn		Klassifikationsbaum		
		einstufig	zweistufig	einstufig	zweistufig	einstufig	zweistufig	
243	Spätburgunder	sicher	gut	Schwarzr.	Schwarzr.	Schwarzr.	gut	0)
253	Spätburgunder	Schwarzr.	Schwarzr.	Schwarzr.	Schwarzr.	Schwarzr.	Schwarzr.	
261	Spätburgunder	gut	Schwarzr.	Schwarzr.	Schwarzr.	gut	Schwarzr.	
268	Spätburgunder	gut	gut	gut	gut	Schwarzr.	gut	
213	Portugieser	Dornfeld.	sicher	sicher	sicher	gut	gut	
224	Portugieser	sicher	sicher	Lemberg.	sicher	gut	gut	
225	Portugieser	Lemberg.	gut	Dornfeld.	sicher	gut	gut	
226	Portugieser	sicher	sicher	sicher	sicher	gut	gut	
227	Portugieser	sicher	sicher	Lemberg.	sicher	gut	gut	
230	Portugieser	sicher	sicher	sicher	sicher	gut	gut	
234	Portugieser	sicher	sicher	Dornfeld.	sicher	gut	gut	
249	Portugieser	sicher	sicher	Lemberg.	gut	Lemberg.	gut	
212	Dornfelder	sicher	sicher	Portug.	Portug.	Portug.	Portug.	
214	Dornfelder	sicher	sicher	sicher	sicher	gut	gut	
215	Dornfelder	sicher	Portug.	Portug.	Portug.	Portug.	Portug.	
216	Dornfelder	sicher	Portug.	gut	Portug.	Portug.	Portug.	
218	Dornfelder	sicher	sicher	sicher	sicher	Portug.	gut	
232	Dornfelder	Lemberg.	gut	Portug.	gut	Portug.	Portug.	
270	Dornfelder	sicher	sicher	sicher	sicher	gut	gut	
229	Trollinger	sicher	sicher	sicher	sicher	gut	gut	
228	Schwarzriesling	gut	sicher	Spätburg.	Spätburg.	gut	gut	
233	Schwarzriesling	gut	sicher	Spätburg.	Spätburg.	Lemberg.	gut	
221	Lemberger	sicher	sicher	sicher	sicher	gut	gut	
222	Lemberger	sicher	sicher	sicher	sicher	gut	gut	
211	Regent	sicher	sicher	sicher	sicher	Trollinger	gut	

* 0) keine Abweichung vom typischen Fingerprint

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von September 1998 bis Dezember 2003 unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Klaus Danzer am Institut für Anorganische Chemie der Friedrich-Schiller-Universität Jena angefertigt.

An dieser Stelle möchte ich mich beim Herrn Prof. Dr. Klaus Danzer für die Unterstützung und die interessante Problemstellung bedanken.

Ich danke Herrn Dr. Manfred Reichenbacher für die Betreuung meiner Dissertation und die gewährleistete Hilfe in fachlichen und auch sprachlichen Fragen.

Ferner möchte ich Herrn DC Ralf Wege für die geleistete Arbeit während seiner Diplomarbeit danksagen.

Für die wertvolle Unterstützung während der Laborarbeiten sei Frau Susanne Spangenberg gedankt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Karl Wagner, Herrn Dr. Ulrich Fischer, Frau Lilli Mayer und Herrn Eckhard Holderrieth für die Bereitstellung der Weinproben.

Ich danke Herrn Dr. Wolfgang Poppitz und Herrn Dr. Wolfgang Günther für die Durchführung der MS- bzw. NMR-Messungen und für die Hilfe bei der Interpretation der Spektren.

Danken möchte ich auch Herrn DC Luis Mariano Gonzalez Reche, Herrn DC Gerhard Nimmerfall, Herrn DC Uwe Köhn und *allen* Kollegen und Mitarbeitern des Instituts für Analytische Chemie für die angenehme Arbeitsklima und die Unterstützung der Arbeit durch fachliche Diskussionen und Anregungen.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern, meiner Schwester Mariann, meiner Freundin Bozenka, meinen Freunden Szilvia Mammel und Thomas Scheffler, sowie meinem Freundeskreis und dem Jenaer Ungarischen Stammtisch für ihre Unterstützung danksagen.

Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen angefertigt habe.

Jena, den 12. Dezember 2003

Lebenslauf

Name: Bálint Berente

geboren: am 14. 12. 1974 in Jászberény (Ungarn)

1981 - 1989 Dr-Gyvetvai-János-Grundschule Jászberény

1989 - 1993 Abitur am Lehel-Vezér-Gymnasium Jászberény

1993 - 1998 Studium im Fach Chemie Diplom an der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Eötvös-Loránd-Universität Budapest

1993 - 1997 Studium im Fach Fachübersetzer für Deutsch an der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Eötvös-Loránd-Universität Budapest

1997 - 1998 TEMPUS-Stipendium an der Chemisch-Geowissenschaftlichen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Lehrstuhl Analytische Chemie
- Diplomarbeit

1998 - 2002 Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Chemisch-Geowissenschaftlichen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Lehrstuhl Analytische Chemie
- Promotion;
- Industrieprojekt mit Bayer AG, Krefeld: „Chromatographische Polyamid-6(PA-6)-Oligomeren-Trennung und Isolierung im präparativen Maßstab“

2002 - 2003 Zivildienst in Ungarn

Ende 2003 Fortsetzung und Abschluss der Promotion

Jena, den 12. Dezember 2003