

Über Inhaltsstoffe von Mosten und Weinen

III. Anwendung der Dünnschicht- und Säulen-Chromatographie zur Trennung der Anthocyane¹⁾

VON

F. DRAWERT

In einem vorausgehenden Bericht wurde die Bedeutung der Anthocyane zur Beurteilung von Rebsorten, Mosten und Weinen anhand der einschlägigen Literatur ausführlich diskutiert (1). Die dort bekanntgegebenen Methoden und Ergebnisse basierten auf einer schonenden Konzentrierung der Anthocyane durch Fällung mit Bleiacetat, und es wurde darauf hingewiesen, daß innerhalb verschiedener pH-Bereiche fraktionierte Farbstoff-Fällungen erhalten werden. Als eine der Möglichkeiten zur Zerlegung der Bleisalz-Niederschläge ist die Spaltung mit HCl genannt worden, die zu Farbkonzentraten führt, welche dann direkt chromatographiert werden können. Die auf- und absteigende papierchromatographische Methode ergibt grundsätzlich klare Farbstoffzonen und insbesondere kann schon mit relativ einfachen chromatographischen Mitteln die sog. „Hybridzone“ einerseits an einer betont ziegelroten UV-Fluoreszenz, andererseits nach Besprühen mit Pauly-Reagens, Benedict-Reagens oder einer Lösung von Echtblausalz B erkannt werden.

Inzwischen konnten während etwa 2 Jahren Erfahrungen hinsichtlich der Auftrennung der Anthocyane mit der vergleichsweise einfachen, zeitsparenden und im Trennvermögen leistungsfähigen Dünnschicht-Chromatographie (DC) gesammelt werden, so daß nunmehr gut reproduzierbare DC-Methoden bekannt gegeben werden können.

Fällung mit Bleiacetat

In der Regel wurden Blattauszüge, Moste oder Weine zur vollständigen Fällung der Anthocyane mit der doppelten Menge gesättigter basischer Bleiacetat-Lösung²⁾ (4—5%ig) versetzt und unter Rühren durch Zutropfen von 15%iger NaOH auf pH 8,2 gestellt (Glaselektrode). Die bei Weinen meist blau bis blaugrün gefärbten, dichten Niederschläge lassen sich leicht abzentrifugieren (3000 U/min, 5—10 min). Die Sedimente können entweder ohne Nachwaschen sofort zerlegt oder nach gleichzeitigem Waschen und Entwässern mit Aceton oder Methanol im Exsikkator getrocknet werden, wobei lagerfähige Präparate von Pigmentfarbencharakter anfallen, die jederzeit wieder als Referenzen zu verwenden sind.

Versetzte man z. B. einen intensiv blaurot gefärbten Hybridenwein vom pH 3,65 mit der gleichen Menge neutraler Bleiacetat-Lösung³⁾ (10%ig), so entstand ein stahlblauer Niederschlag, wobei sich der pH-Wert der Lösung auf 4,9 einstellte.

¹⁾ II. Mitt. Gaschromatographische Methoden zur Analyse von Aromastoffen, insbesondere Alkoholen, Vitis 3, 104—114 (1962).

²⁾ Plumbum subaceticum anhydricum (Bleiacetat einfach basisch, wasserfrei) Merck, Darmstadt.

³⁾ Plumbum aceticum puriss. cryst. (Bleiacetat [Bleizucker] reinst, krist. $\text{Pb}[\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2]_2 + 3 \text{H}_2\text{O}$) Merck, Darmstadt.

In Abhängigkeit vom pH-Wert entstanden folgende Fraktionen (Zugabe von 15%-iger NaOH):

1. pH 5 dunkelblau (Hauptmenge)
2. pH 6 blau (wenig)
3. pH 7 olivgrün (beträchtliche Menge)
4. pH 8 gelb (wenig)
5. pH 9 hellgelb (sehr wenig)

Beim Überschreiten von pH 6,3 bis 6,4 erfolgt ein Farbumschlag der Lösung von blau nach grün. Nach Abzentrifugieren der letzten Fällung bei pH 9 ergab eine Probe des Überstandes nach Ansäuern keine Rotfärbung mehr (vollständige Ausfällung der Anthocyane). Obwohl bei pH 9 im wesentlichen der Rest der noch in Lösung vorhandenen Bleiverbindungen ausfällt, hat sich diese letzte Fällungsstufe als notwendig erwiesen, wenn alle Anthocyane vollständig gewonnen werden sollen.

Die Bleiniederschläge sind auf verschiedene Weise der DC zugänglich zu machen.

1. Durch Zerlegen z. B. mit HCl verschiedener Konzentrationen evtl. unter Beimischung von Lösungsmitteln wie Alkoholen als Lösungsvermittler, wobei Bleichlorid als gut filtrabler Niederschlag anfällt, oder mit anderen Säuren bzw. sauren Puffern. Die Art der Zerlegung richtet sich nach dem Analysen- bzw. Trennproblem. Es ist zu beachten, daß durch Zerlegen mit starken HCl-Konzentrationen beträchtliche Hydrolysegrade von nativem Material bewirkt werden.

2. Durch Lösen der Bleiniederschläge z. B. im weiter unten angegebenen Fließmittel 1.

Dünnschicht-Chromatographie

Angewandt wurde die von E. STAHL (2) standardisierte Methode unter Verwendung einer kommerziellen Beschichtungseinrichtung⁴⁾. Glasplatten der Dimensionen 20 × 20 bzw. 20 × 50 cm und einer Stärke von 3,7 bis 3,9 mm wurden mit Kieselgel, Papierpulver, Aluminiumoxyd, Gemischen hiervon und weiteren Materialien beschichtet. Zur DC der Anthocyane von Mosten und Weinen bewährten sich besonders Kieselgel, Papierpulver und Gemische davon: 30 g Kieselgel G⁵⁾ und 60 ml Wasser oder 15 g Cellulosepulver MN 300 G⁶⁾ und 85 ml Wasser bzw. 12 g Kieselgel G, 12 g Cellulosepulver MN 300 G und 80 ml Wasser werden 30 bis 60 sec homogenisiert⁷⁾ und damit die vorgereinigten (Chloroform, Aceton) Platten beschichtet. Anstelle von reinem Wasser als Suspensionsmedium eignet sich für manche Trennprobleme das Gemisch H₂O/Eisessig/HCl (32%) (100 : 18 : 2) besser. Die Platten trocknet man zweckmäßig bei Raumtemperatur etwa 10 min vor und dann 1 h bei 105 bis 110°. Die getrockneten und aktivierten Platten werden über Trockenmitteln gelagert. Es ist für eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wesentlich, daß die Platten immer gleich vorbehandelt werden, wobei vor allem bei Kieselgel Trocknungstemperatur und Aufbewahrung von Belang sind.

Die Proben werden am Start entweder punktförmig oder als Band von ca. 7 mm Breite aufgetragen, je nach der Farbstärke der Probe 2 bis 8 mal übereinander. Es ist darauf zu achten, daß die Startpunkte dabei nicht zu stark ausfließen. Ferner

⁴⁾ Fa. Desaga, Heidelberg.

⁵⁾ Fa. Merck, Darmstadt.

⁶⁾ Fa. Macherey, Nagel & Co., Düren.

⁷⁾ Hochtouriger Mixer (Starmix).

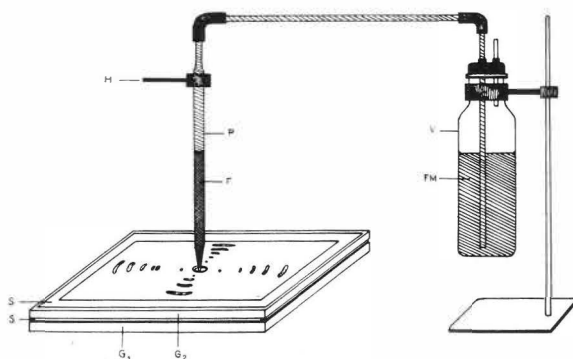


Abb. 1: Versuchsanordnung zur Zirkular-DC.

G_1 und G_2 : Glasplatten; S: Schablone; P: Pipette; F: Papier(Cellulose)pulver-Füllung; H: Halterung; V: Vorratsgefäß; FM: Fließmittel.

sollten keine ungelösten Anteile mit aufgetragen werden, weil dadurch meist Streifenbildung und Verwischung der Farbzonen bewirkt wird.

Zur Zirkular-Chromatographie (Abb. 1 u. 3) trägt man die Proben in einem Abstand von 1 bis 2 cm vom Zentrum der Platte entfernt punktförmig auf. Die beschichtete Platte wird mit der Schichtseite nach oben waagrecht auf eine nivellierte Unterlage (Wasserwaage) gelegt. Sodann legt man eine Rahmenschablone von 5 bis 10 mm Breite und 2 bis 3 mm Rahmenstärke über die Schichtplatte und darauf eine Deckplatte mit einer Bohrung von 5 mm im Zentrum. Durch diese hindurch wird eine gehalterte Pipette auf die Schicht aufgesetzt. Verwendet kann eine normale Pipette werden, die zur Konstanthaltung der Fließmittelgeschwindigkeit etwa halb mit Papierpulver gestopft und an der Spitze mit einem Wattedocht versehen wird. Die Zufuhr des Fließmittels erfolgt durch einen Plastikschlauch aus einem Vorratsgefäß, welches zur Regulierung der Fließgeschwindigkeit verschieden hoch gestellt wird.

Fließmittel

Zur DC von Anthocyanen und verwandten Verbindungen wurden bereits verschiedene Schichten und Fließmittel angewandt (3). L. BIRKOFER (4) konnte vor kurzem Anthocyane mit Erfolg auf gepufferten Polyacrylnitril-Perlon-Schichten auftrennen und neuerdings gelang D. HESS und C. MEYER (5) die Trennung von Blütenextrakten auf Kieselgel G-Schichten unter Verwendung der Fließmittel Äthylacetat/Ameisensäure/Wasser (70 : 15 : 15), n-Butanol/Ameisensäure/Wasser (85 : 5 : 10) und Äthylacetat/Ameisensäure/Wasser (85 : 6 : 9). H. TANNER und H. RENTSCHLER (6) berichten über Trennungen auf Kieselgel G- (Kieselgel D-O)⁸⁾-Platten unter Bevorzugung des Fließmittels Ameisensäureäthylester/Methyläthylketon/Ameisensäure/Wasser (3 : 4 : 1 : 2).

Von den zahlreichen im eigenen Laboratorium geprüften Fließmitteln sind solche mit Phenolzusatz aus 2 Gründen vorzuziehen. Einmal bewirkt Phenol im abgestuften Mischungsverhältnis eine abgestufte und meist klare Trennung der ver-

⁸⁾ In Sonderdrucken, die von der Fa. CAMAG, Muttenz (Schweiz) verschickt werden, wird — unter aufgeklebtem Errata — angegeben, daß nicht Kieselgel G (wie im Text vermerkt) verwendet wurde, sondern stets Kieselgel D-O dieser Firma.

schiedenen Farbkomponenten (auch im präparativen Maßstab), zum anderen lösen sich die Bleiniederschläge darin auf, wodurch eine interessante Variante der DC von Anthocyanen eröffnet wird. In diesem Zusammenhang sind folgende einphasische phenolhaltige Fließmittel besonders hervorzuheben:

1. Essigsäureäthylester/Phenol/Eisessig/Wasser (3 : 3 : 2 : 2)⁹⁾
2. Essigsäureäthylester/Phenol/Eisessig/Ameisensäure/Wasser (3 : 4 : 1 : 1 : 1)⁹⁾

Gearbeitet wird bei den 20 × 20 cm-Platten in den üblichen Trögen mit Schliffdeckel¹⁰⁾ (22 × 22 × 10 cm) bzw. bei den 20 × 50 cm-Platten in Glaströgen 60 × 35 × 22 cm jeweils mit Kammersättigung durch Auskleiden der Wände mit Filtrierpapier (Schichtseite zur Wand). Es empfiehlt sich die DC bei konstanter Temperatur und zugfrei vorzunehmen.

Die Fließmittel 1 und 2 benötigen für eine Laufstrecke von 15 bis 20 cm bei 20° Raumtemperatur durch die Kieselschicht ca. 150 min, durch die Celluloseschicht ca. 170 min. Obwohl die Farbstoffe auch nach Trocknen der Platten bei Raumtemperatur gut erkennbar sind, empfiehlt sich ein Trocknen während 20 bis 30 min bei 80 bis 100°. Dadurch wird die Brillanz der Farben erhöht.

Zur Dokumentation besonders interessanter Trennergebnisse ist die Farbphotographie einem Besprühen¹¹⁾ und Abziehen der Schichten vorzuziehen.

Ergebnisse

Hier wird im wesentlichen über Ergebnisse der DC von Anthocyanen in Weinen berichtet. Eine ausführliche Darstellung über die DC der Anthocyane aus Blättern, Blüten und Beeren erfolgt andernorts.

Werden die in den pH-Bereichen 5 bis 9 erhaltenen Fällungen aus Hybridenweinen mit HCl zerlegt und die erhaltenen Farbkonzentrate wie beschrieben aufsteigend chromatographiert, so zeigen die Chromatogramme, daß die Fällung bei pH 5 den überwiegenden Teil der Anthocyane sowie beträchtliche Mengen des Malvinkomplexes enthält (1 A, B, Abb. 2). Zusätze von Alkoholen wie Methanol oder Äthanol zur salzsauren Anthocyan-Lösung bewirken im übrigen eine Farbvertiefung. Die Fällungen der pH-Bereiche 7, 8 und 9 enthalten vorwiegend den für den Hybridennachweis charakteristischen, im UV-Licht ziegelrot fluoreszierenden Malvin-Farbkomplex. Eine weitere Identifizierung der getrennten Substanzen wird wie früher beschrieben (1) durch Besprühen mit Reagentien wie Echtblausalz B, Pauly-Reagens, Benedict-Reagens u. a. bewirkt.

Wird die DC auf 20 cm breiten und 50 cm langen Platten bei einer Laufstrecke von 40 bis 45 cm vorgenommen, so tritt eine bessere räumliche Trennung einzelner Farbzonen auf; damit kann in Zweifelsfällen die Hybridenzonen besser erkannt werden.

Für die Erkennung von Hybriden ist folgendes Verfahren besonders interessant: Die bei pH 8,2 aus einem farbstarke Hybridenwein erhaltene Bleiacetat-Fällung wurde nach Waschen und Trocknen in dem phenolhaltigen Fließmittel 1 gelöst, wobei ein intensiv violettblau gefärbtes Farbkonzentrat entstand. Wird dieses mit demselben Fließmittel chromatographiert, so erscheint auf dem Chromato-

⁹⁾ Gewichtangaben.

¹⁰⁾ Fa. Desaga, Heidelberg.

¹¹⁾ Neatan, Fa. Merck, Darmstadt.

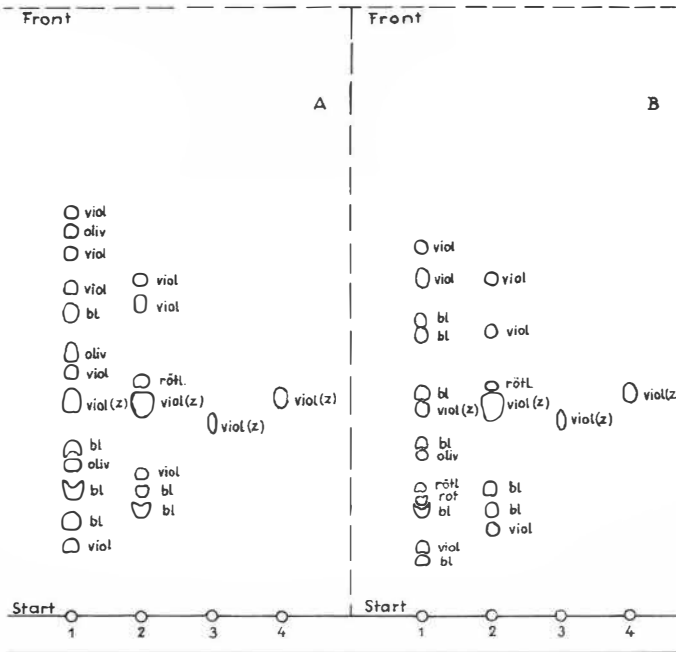


Abb. 2: Dünnschicht-Chromatogramme von 1: Farbkonzentrat nach HCl-Zerlegen der pH 5-Fällung aus dem Wein des Zuchtstammes Sbl. 3-39-51, Jahrgang 1962 (Geilweilerhof); 2: Lösung der pH 8,2-Fällung desselben Weines in Fließmittel 1; 3: Mit HCl angesäuerte, methanolische Malvin-Lösung (Malvin-3,5-diglucoside, Fa. Roth, Karlsruhe); 4: Malvin-Fraktion aus der präparativen Trennsäule.

Farbbezeichnungen: viol: violett; bl: blau; br: braun; (z): ziegelrote Fluoreszenz im UV.
A: Kieselgel G; B: Kieselgel G-Cellulosepulver MN 300 G.

gramm neben vergleichsweise wenig blauen bis violetten Farbflecken eine farbstarke violette bis rotviolette Zone (2 A, B, Abb. 2) mit kräftiger ziegelroter Fluoreszenz.

Zur Säulen-Chromatographie der Anthocyane des Weines wurden die Ergebnisse der DC entsprechend übertragen. Ein Gemisch von 12 g Kieselgel H¹²⁾ und 12 g Cellulosepulver MN 300¹³⁾ wurde in 100 ml Fließmittel I homogenisiert und mit diesem Gemisch eine Chromatographiesäule eingeschlemmt. Läßt man nach Sedimentieren der stationären Phase und Ablaufen des Fließmittels ein Anthocyan-gemisch, gewonnen aus der pH 8,2-Fällung eines Hybridenweines, in schmaler Zone in die Oberfläche der stationären Phase einsickern, so erfolgt nach Entwickeln mit Fließmittel I eine Zonentrennung der Farbstoffe. Nach einer geringen diffusen Vorfraktion erscheint eine Fraktion von violetter Farbe. Diese zeigt nach DC eine kräftige ziegelrote Fluoreszenz (4 A, B, Abb. 2). Die Fließmittelgeschwindigkeit auf der so präparierten Säule ist gering. Über weitere Säulenpräparationen wird andernorts berichtet.

¹²⁾ Fa. Merck, Kieselgel ohne Gipszusatz.

¹³⁾ Fa. Macherey, Nagel & Co., Cellulosepulver ohne Gipszusatz.

Zirkular-Chromatographie (DC)

Die Methode mit der in Abbildung 1 dargestellten Versuchsanordnung ist relativ variationsfähig und führt meist zu befriedigenden Trennergebnissen, die zumindest für den Hybridennachweis völlig ausreichen. Wie auch bei den eindimensionalen Chromatogrammen in Längsrichtung ist hier die Trennung der im Fließmittel gelösten Bleisalze besonders interessant (IV Abb. 3). Die Geschwindigkeit des Fließmittelszulaufes kann durch Heben und Senken des Niveaugefäßes in weiten Grenzen variiert werden. Die Geschwindigkeit der mobilen Phase ist in der Chromatographie eine wesentliche Komponente. Ihre Variation bedeutet im vorliegenden Fall eine optimale Anpassung an das Trennproblem. Die Versuchsanordnung erlaubt ferner eine gute Beobachtung des Trennvorganges.

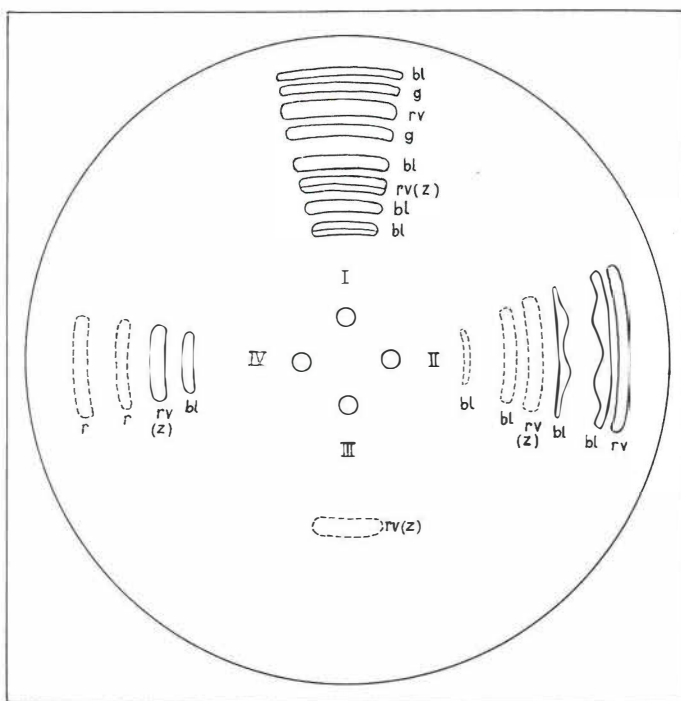


Abb. 3: Zirkular-Dünnschicht-Chromatogramm von I: pH 5-Fällung (wie 1 Abb. 2);

II: Beerenhautpreßsaft; III: Malvin (wie 3 Abb. 2); IV: (wie 2 Abb. 2).

Fließmittel 1. Laufzeit 70 min. Kieselgel G

Farbbezeichnungen: bl: blau; r: rot; rv: rotviolett; g: grünoliv; (z): ziegelrote Fluoreszenz im UV.

Zusammenfassung

Die hohe Trennleistung dünner Absorptionsschichten, bestehend aus Kieselgel, Cellulosepulver oder Gemischen davon, wurde zur Trennung der Anthocyane von Mosten und Weinen benutzt. Zur Anreicherung der Farbstoffe hat sich die fraktionierte Fällung mit Bleiacetat in verschiedenen pH-Bereichen bewährt. Gute Trenn-

erfolge konnten mit phenolhaltigen Fließmitteln erzielt werden, in welchen sich auch die Bleifällungen auflösen, so daß diese direkt zu chromatographieren sind, was für den Hybridennachweis von Interesse ist. Gute Trennergebnisse lassen sich auch mit der relativ einfachen Zirkulartechnik erzielen, die besonders variationsfähig ist. Eine präparative Trennung ist sowohl auf verstärkten Schichten (Platten) möglich als auch durch Übertragung der Bedingungen der DC in präparative Säulen.

Herrn Prof. Dr. B. HUSFELD bin ich für stete Förderung dankbar verbunden sowie meinem Mitarbeiter A. ZIEGLER für die Durchführung von Versuchen.

Literaturverzeichnis

1. DRAWERT, F.: Über Anthocyane in Trauben, Mosten und Weinen. *Vitis* 2, 288—304 (1961).
2. STAHL, E.: *Dünnschichtchromatographie*. Springer-Verlag, Heidelberg 1962.
3. Vgl. *Zit.* 2, daselbst S. 386 ff.
4. BIRKOFER, L., u. C. KAISER: Dünnschicht-Chromatographie an Polyacrylnitril-Perlon. *Z. Naturforschg.* 17b, 352—355 (1962).
5. HESS, D., u. C. MEYER: Dünnschichtchromatographie von Anthocyanen. *Z. Naturforschg.* 17b, 853—854 (1962).
6. TANNER, H., u. H. RENTSCHLER: Über die Charakterisierung von Anthocyanfarbstoffen mittels Dünnschicht-Chromatographie. *Mitt. Klosterneuburg* 13, 156—161 (1963).

Eingegangen am 1. 8. 1963

Dr. F. DRAWERT
Forschungs-Institut f. Rebenzüchtung
Geilweilerhof
Siebeldingen/Landau, Pfalz