

Aus der Bundesforschungsanstalt für Rebenzüchtung Geilweilerhof

Über Anthocyane in Trauben, Mosten und Weinen

Methoden zur Anreicherung und Trennung der Farbkomponenten

von

F. DRAWERT

Anthocyane von roten Trauben, Rotmosten und Rotweinen sind für Rebenzüchtung, Weinforschung und Weinkontrolle in vielfacher Hinsicht von Interesse. Während die Weinkontrolle eine Untersuchung von Rotweinen häufig vornimmt, um Verschnitte von Weinen aus *Vitis vinifera* mit solchen aus roten Hybriden*) zu erkennen, ist der Rebenzüchter u. a. an einer chemischen Analyse der Anthocyane von Sämlingsnachkommenschaften interessiert. Es kommt darauf an, eine hinsichtlich der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse befriedigende und möglichst unkomplizierte Methode zum Hybridennachweis anzuwenden, die es gestattet, unter den Rebensämlingen Genotypen zu selektieren, welche die typischen Hybridenmerkmale nicht aufweisen; sehr häufig ist mit diesen Merkmalen ein fremdartiger Geschmack verbunden. Wie aus Tab. 1 und 5 zu ersehen ist, können im Rahmen der Kombinationszüchtung aus entsprechenden Kreuzungsnachkommenschaften Sämlinge ausgelesen werden, welche jene Anthocyane, die dem Hybridencharakter zuzuordnen sind, kaum noch oder nicht mehr haben. Über den Erbgang der Anthocyane ist noch nichts endgültiges bekannt, jedoch kann aus den bisherigen Züchtungsarbeiten geschlossen werden, daß die einzelnen Anthocyane auf einer Reihe von verschiedenen dominanten Farb-Genen beruhen, die frei mendeln und daher eine große Variationsbreite und gute Kombinationsmöglichkeiten geben**). Um in Verbindung mit eigenen Ergebnissen eine Diskussion der verschiedenen Verfahren zum Hybridennachweis zu erleichtern, werden zunächst die einschlägigen Ergebnisse des umfangreichen Schrifttums über Anthocyane dargestellt.

Anthocyane und deren Vorkommen in verschiedenen Rebensorten

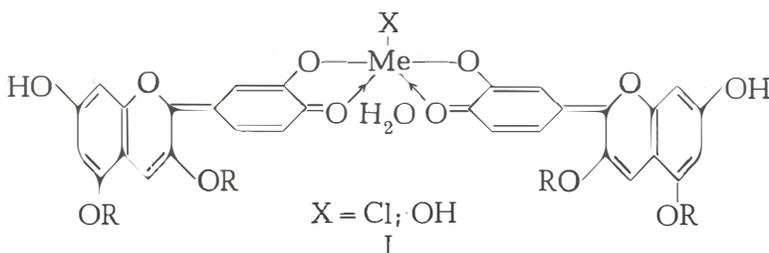
Anthocyane, die blauen, violetten und roten Farbstoffe vieler Blüten, Früchte und Pflanzen, stehen in enger biochemischer und pflanzenphysiologischer Beziehung zu den Flavonfarbstoffen. Sie liegen im Zellsaft hauptsächlich als Glycoside vor und können als solche bei schonender Aufarbeitung isoliert werden. Kenntnis über die chemische Konstitution der Anthocyane haben wir

*) Unter Hybriden werden Rebensämlinge verstanden, die aus Kreuzungsnachkommenschaften amerikanischer Wildreben wie *V. riparia*, *V. rupestris* etc. mit europäischen Kulturreben (*V. vinifera*) hervorgegangen sind.

***) Vgl. B. HUSFELD: Rebenzüchtung. Handb. Pflanzenz. Bd. V, 152 — 197 (1950)

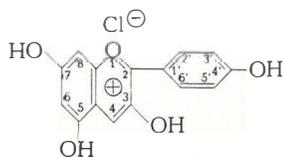
: Reben. ebenda 2. Aufl. im Druck. Verlag P. Parey, Berlin 1961.

vor allem durch die grundlegenden Arbeiten von R. WILLSTÄTTER (1 — 7), P. KARRER (8 — 14) und R. ROBINSON (15 — 24) erhalten. Im sauren Bereich des Zellsaftes (um pH 5) liegen die Anthocyane als 2-Phenyl-benzopyryliumsalze oder nach E. BAYER (25 — 27) als Protoanthocyane vor. Protocyanin, der blaue Farbstoff der Kornblume (25) konnte inzwischen synthetisiert werden (27). Die synthetischen Cyanin-Chelate (I) unterscheiden sich vom natürlichen Komplex nur dadurch, daß an Stelle des Polysaccharides Anionen gebunden sind. Die blaue Farbe wird durch Chelatbildung und Stabilisierung eines Anions der chinoiden Form des Cyanins bedingt. Protoanthocyane werden beim Überschreiten einer bestimmten H-Ionenkonzentration zerstört unter Bildung der roten Anthocyan-Oxoniumsalze.



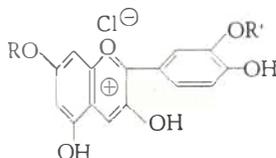
In der deutschsprachigen und angelsächsischen Literatur werden die Glycoside (Mono- oder Heteroside) als Anthocyane (-ine), die nach Hydrolyse erhältlichen Aglykone als Anthocyanidine bezeichnet. Abweichend davon werden im französischen Sprachgebrauch, in Anlehnung an die Genfer Nomenklatur, die Glycoside durch ein angehängtes „oside“ und die Aglykone durch „idol“ bezeichnet.

Die in der Natur vorkommenden Anthocyane können hinsichtlich ihres Aglykons fast ausnahmslos den Typen P, C und D zugeordnet werden.



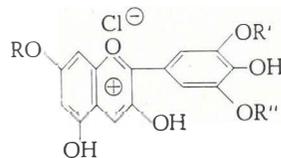
Typ P

Pelargonidin
(3, 5, 7, 4'-tetrahydroxy-
2-phenyl-benzopyrylium-
chlorid)



Typ C

R=R'=H, Cyanidin
R=H, R'=CH₃, Päonidin
R=R'=CH₃, Rosinidin



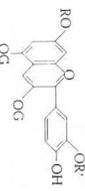
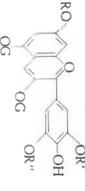
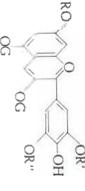
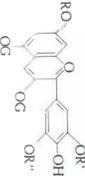
Typ D

R=R'=R''=H, Delphinidin
R=R''=H, R'=CH₃, Petunidin
R=H, R'=R''=CH₃, Malvidin,
Önidin, Syringidin.

Die Mehrzahl aller Anthocyane kommt nach R. ROBINSON (22a) als 3-mono-glucosid, 3-monogalactosid, 3-rhamnoglucosid, 3-pentoseglycosid, 3-biosid,

Tabelle 1 Anthocyane in den Beeren verschiedener Traubensorten (nach P. RIBÉREAU-GAYON [29, 34])

Die Zahlen geben den Prozentanteil einzelner Anthocyane am Gesamtanthocyanengehalt an.

Traubensorte	Typ C (Cyanin)				Typ D (Delphinin)				
									
	R=R'=H Cyanin	R=H, R'=CH ₃ Päonin	R=R'=R''=H Delphinin	R=R''=H, R'=CH ₃ Petunin	R=H, R'=R''=CH ₃ Malvin, Öhn, Syringin				
<i>V. vinifera</i> - Kultur-Sorten									
1 Merlot 1958	3	15	12	12	36				
2 Muscat de Hamburg	20	45	6	9	20				
3 Cabernet-Sauvignon 1956 (Premier: Cotes Bordeaux)		15	12	12	39*				
4 Merlot 1957 (Medoc)		14	17	11	36*				
5 Merlot 1957 (Saint Emilion)		10	21	15	37*				
6 Merlot 1957 (Graves)		11	19	14	36*				
7 Merlot 1957 (Premières Cotes Bordeaux)		12	23	14	35*				
8 Merlot 1958 (Premières Cotes Bordeaux)		9	18	12	37*				
Wildformen									
9 <i>V. riparia</i>	2	5	2	14	12	10	17	6	21
10 <i>V. rotundifolia</i>		2	8	9	34	3	22	2	8
11 <i>V. labrusca</i>		5	1	21		15	1	34	2
12 <i>V. arizonica</i>		8	1	13		20	1	29	10
13 <i>V. berlandieri</i>		8	1	23		20	1	25	10
14 <i>V. monticola</i>		3		36		26	2	27	5
15 <i>V. cordifolia</i>		10		15		18	2	30	5
16 <i>V. vulpina</i>		20	1	30	1	20	2	16	2
17 <i>V. lincedumii</i>		29	2	17		8	1	4	2
18 <i>V. aestivalis</i>		3	3	31		10		6	1
19 <i>V. rotundifolia</i>	58	4	4	20		4			2
20 <i>V. rotundifolia</i>		9	6						18
21 <i>V. amurensis</i>		13	15		5		29	27	40
Hybriden**)									
22 Seyve-Villard 18315 (1958)			+						
23 Burdin 4503 (S 5455 x Gamay)				+					
24 Burdin 7061 (S 10878 x Gamay)				+					
25 Couderc 1 (<i>V. lincedumii</i> x <i>V. riparia</i>) x Pineau				+					
26 Couderc 14 (<i>V. lincedumii</i> x Aramon) x <i>V. aestivalis</i>				+					
27 Oberlin 595 (Gamma y x <i>V. riparia</i>)				+					

*) Σ D₃ + C₁ — monoglucosid. **) Interspezifische Kreuzungen zwischen *V. vinifera* und amerikanischen Wildformen.

3,5-diglucosid oder acyliert mit Malonsäure, p-Hydroxy-benzoesäure, p-Hydroxymzimtsäure u. a. vor. [vgl. F. BLANK (28)].

In der Weintraube treten vorwiegend die Anthocyane der Typen C und D auf. Während die Schalen roter oder blauer europäischer Trauben (*V. vinifera*) nach P. RIBÉREAU-GAYON (29) nur Monoglucoside (vgl. Tab. 1) enthalten, wurde gelegentlich auch das Vorkommen von Diglucosiden beobachtet (30, 31, 32, 7). P. RIBÉREAU-GAYON hat die Ergebnisse vorwiegend chromatographischer Untersuchungen an verschiedenen Traubensorten zusammenfassend dargestellt.

Die sichere Aussage von P. RIBÉREAU-GAYON, daß reine *V. vinifera*-Sorten nur Monoglucoside enthalten, wird durch Untersuchungen von A. FOUASSIN (33) gestützt. Danach sind in dunklen europäischen Trauben (Échantillons de raisin noir de serre, Royal Frankentael, Colman) neben Delphinidin- und Petunidin-monoglucosiden noch vier Malvidine, davon drei als Monoglucosid und ein viertes als acyliertes Heterosid, vorhanden. Weitere Untersuchungen von P. RIBÉREAU-GAYON und Mitarb. (34) zeigen eindrucksvoll, wie bei interspezifischen Kreuzungen zwischen europäischen Kulturreben mit amerikanischen Wildreben auch die Gehalte an Mono- und Diglucosiden dem Erscheinungsbild der genetischen Aufspaltung folgen (Tab. 1, Nr. 22 — 27). Bei den interspezifischen Hybriden *V. riparia* x *V. vinifera*, *V. rupestris* x *V. vinifera* *V. riparia* x *V. rupestris* dominiert der Typ H (mengenmäßiges Überwiegen der Diglucoside im 2-dimensionalen Chromatogramm). Von 71 untersuchten Hybriden gehören

45 (63,3 %) zum Typ H
17 (23,9 %) zum Typ F
und 9 (12,6 %) zum Typ X

(Typ F: Mengenmäßiges Überwiegen von Monoglucosiden; Typ X: Nicht genau zu definieren).

R. I. ANDERSON und F. P. NABENHAUER (35) sowie R. L. SCHRINER und R. I. ANDERSON (36) haben schon früher die Anthocyane der amerikanischen Traubensorten *V. aestivalis*, *V. riparia* und *V. labrusca* sowie deren Bastarde (35) untersucht. Danach soll Petunidin-monoglucosid charakteristisch für rassenreine amerikanische blaue Traubensorten sein, während Kreuzungen mit *V. vinifera* Malvidin-monoglucosid (Önin) enthalten. L. V. L. SASTRY und R. G. TISCHER (37) fanden papierchromatographisch bei *V. labrusca* (Concord) außer Önin noch Malvidin-diglucosid sowie freies Anthocyanidin. *V. rotundifolia* soll Petunidin-3,5-diglucosid (Muscadinin) enthalten, kalifornische Cabernet- und Carignanesorten außer Malvidin-3-glucosid noch Delphinidin-, Petunidin- und Malvidin-3,5-diglucosid (31). In roten, südafrikanischen Hanefoot-Trauben wurde Cyanidin-3-glycosid (37a), in *V. hypoglauca* F. Mull. (Austral.) neben wenig Delphinidin vorwiegend Önin nachgewiesen (38). Weitere Angaben sind den Übersichtsberichten von H. SUOMALAINEN und Ch. ERIKSON (39), M. A. AMERINE (40), E. C. BATHE-SMITH (41), F. BLANK (28), T. A. GEISSMAN (42) und P. RIBÉREAU-GAYON (29) zu entnehmen.

Chromatographische Untersuchungen

Umfangreiche Untersuchungen über den Gehalt von Trauben, Weinen und Mosten an den verschiedenen Anthocyanen bzw. Anthocyanidinen konnten erst durchgeführt werden, als entsprechende chromatographische Methoden zur

Verfügung standen. E. C. BATE-SMITH (43, 45) hat 1948 chromatographische Verfahren bekanntgegeben, mit denen Flavonoide und Anthocyane gut aufgetrennt werden können. In der Folgezeit wurde eine Reihe von Methoden bekannt, mit deren Hilfe es möglich ist, Extrakte bzw. Preßsäfte aus Pflanzen, Blüten oder Beerenhülsen nach der ein- oder zweidimensionalen papierchromatographischen Technik zu untersuchen. Eine Arbeit von J. B. HARBORNE (46) gibt erschöpfend Auskunft über R_f -Werte von Anthocyanen, Anthocyanidinen, acylierten Anthocyanen und Glycosidanteilen bei Verwendung verschiedener Fließmittel sowie über die Farben im Sichtbaren und UV-Licht. Die derzeit am häufigsten angewandten Fließmittel sind:

FORESTAL: Eisessig/HCl konz./H₂O [30:3:10] (47, 48, 29).

PARTRIDGE: n-Butanol/Eisessig/H₂O [4:1:5] (46).

Pseudo-PARTRIDGE: n-Butanol/Eisessig/H₂O [4:1:1] bzw. [4:1:2].

n-Butanol/2n-HCl [1:1] (47, 46, 29).

m-Kresol/12n-Essigsäure/6n-HCl [2:1:1] (33, 49).

iso-Propanol/2n-HCl [1:1] (46).

Weitere Fließmittel sind der angegebenen Originalliteratur zu entnehmen. Es handelt sich vorwiegend um saure Chromatographiegemische. Bei der zweidimensionalen Methode wird bisweilen die Oberphase in der einen, die Unterphase in der anderen Richtung verwendet. In Tab. 2 sind die R_f -Werte einiger Anthocyane zusammengestellt.

Wie aus Tab. 2 zu ersehen ist, besteht eine Beziehung zwischen der Struktur der Anthocyane und dem R_f -Wert (45, 46, 50, 51, 29). Für die Systeme n-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:5) und m-Kresol/Eisessig/Wasser (48:2:50) gilt etwa, daß der R_f -Wert mit steigender Anzahl der OH-Gruppen sinkt, OCH₃-Gruppen den R_f -Wert erhöhen, Acylierung entweder Erhöhung oder Verminderung bewirkt und Glycoside eine Verminderung der R_f -Werte bedingen. Die Beziehungen zwischen R_f -Werten und Struktur wurden von Y. ABE und K. HAYASCHI (50) graphisch ausgewertet. Es ist auffällig, daß 3,5-Diglucoside im UV-Licht intensiv aufleuchten, wofür nach R. ROBINSON (52) Glycosid in Position 5 verantwortlich ist. Diejenigen Anthocyane oder Anthocyanidine, die zur Komplexbildung befähigt sind (Cyanin, Delphinin, Petunin) erfahren nach Versetzen mit Fe (III)- bzw. Al-Salzen eine Farbvertiefung. Besprühen der Chromatogramme mit einer 5 proz. äthanolischen Lösung von AlCl₃ (53) bzw. 2 proz. wässriger Lösung von FeCl₃ (54) bewirkt eine Farbvertiefung. Über die Stabilität der Schwermetallkomplexe im sauren pH-Bereich wurde von E. BAYER (25, 26, 27) berichtet. Zur präparativen Gewinnung von Anthocyanen wurde die Säulenchromatographie mit Erfolg angewandt. Neben Säulenfüllungen mit beschränktem Anwendungsbereich (12, 13, 55, 56, 57) ist Zellulosepulver in weiten Bereichen verwendbar (48, 56, 57, 58). Zur Gewinnung von Anthocyan-Extrakten wird häufig Wasser oder Methanol mit 1 proz. HCl verwendet. In vielen Fällen reichen die beschriebenen Verfahren in Verbindung mit Referenzpräparaten zur Identifizierung chromatographisch aufgetrennter Anthocyane oder Anthocyanidine aus. Häufig werden nach Säure-Hydrolyse die meist besser zu trennenden Anthocyanidine identifiziert.

Tabelle 2
R_F-Werte von Anthocyanen und Anthocyanidinen

Anthocyane Anthocyanidine	R _F -Werte							Farben	
	I	II [zit. 46]	III	IV	V	VI [zit. 47]	VII	sichtbar	UV
Cyanidin:									
3-monoglucosid	0.38	0.25	0.07	0.26	0.50	0.69	0.69	rot	dunkelrot
3-monogalaktosid	0.37	0.24	0.07	0.26					
3-rhamnoglucosid	0.37	0.25	0.19	0.43					
3-xyloglucosid	0.36	0.24	0.24	0.51					
3-diglucosid	0.33	0.22	0.34	0.61					
3,5-diglucosid	0.28	0.06	0.16	0.40					
3-rhamnoglucosido-5-glucosid	0.25	0.08	0.36	0.59					
Päonidin:									
3-monoglucosid	0.41	0.30	0.09	0.33	0.63	0.72	0.87	rosa	dunkelrosa
3,5-diglucosid	0.31	0.10	0.17	0.44				rosa	fluoresz. rosa
3-rhamnoglucosido-5-glucosid	0.29	0.12	0.37	0.60					
Delphinidin:									
3-monoglucosid	0.26	0.11	0.03	0.18	0.30	0.35	0.52	purpur	dunkelpurpur
3-rhamnoglucosid	0.30	0.15	0.11	0.37				purpur	dunkelpurpur
3,5-diglucosid	0.15	0.03	0.08	0.32				purpur	purpur
Petunidin:									
3-monoglucosid	0.35	0.14	0.04	0.22	0.45	0.45	0.75	purpur	dunkelpurpur
3-rhamnoglucosid	0.35	0.16	0.13	0.42				purpur	dunkelpurpur
3,5-diglucosid	0.24	0.04	0.08	0.32				purpur	leucht. purpur
3-rhamnoglucosido-5-glucosid	0.23	0.06	0.37	0.61					
Malvidin:									
3-monoglucosid	0.38	0.15	0.06	0.29	0.60	0.53	0.90	rotviolett	dunkelviolett
3,5-diglucosid	0.31	0.03	0.13	0.42				rotviolett	ziegelrot fluoresz.
3-rhamnoglucosido-5-glucosid	0.30	0.05	0.40	0.63					

I: n-Butanol/Eisessig/H₂O (4:1:5) — II: n-Butanol/2n-HCl (1:1) — III: H₂O/12n-HCl (97:3) — IV: Eisessig/12n-HCl/H₂O (15:3:82) —
V: Eisessig/HCl/H₂O (30:3:10) (Forestal) — VI: n-Butanol/HCl (1:1) — VII: m-Kresol/Eisessig/5,5n-HCl (1:1:1).

Ergebnisse

Wie eingangs erwähnt, besteht aus den verschiedensten Gründen ein Bedürfnis nach einer raschen, zuverlässigen Methode zum Nachweis und möglichst auch zur Bestimmung der Anthocyane von roten Trauben, Rotmosten und Rotweinen. Aus der zitierten Literatur kann entnommen werden, daß dieses Ziel grundsätzlich mit Hilfe der eindimensionalen papierchromatographischen Methode erreicht wird. Abgesehen von einem viel größeren Zeit- und Materialaufwand, der mit der zweidimensionalen Methode verbunden ist, schließt diese Methode die Verwendung von Referenzsubstanzen aus. Ferner ist die zweidimensionale Methode viel stärker als die eindimensionale gegen eine Inkonzanz der Chromatographiebedingungen und -voraussetzungen anfällig; für den Hybridennachweis allein ist sie unangebracht und überflüssig.

Zur chromatographischen Auftrennung von Farbkonzentraten ist die eindimensionale Papierchromatographie, wie nachfolgend beschrieben, gut geeignet, wenn einige Bedingungen weitgehend konstant gehalten werden:

1. Wurde in einem auf 20° C temperaturgeregelten Raum chromatographiert.
2. Das Fließmittel muß entweder immer zu gleichen Zeiten nach der Vermischung verwandt oder gleichmäßig äquilibriert werden. Besonders Butanol/Säuregemische sind diesbezüglich sehr empfindlich.
3. Die Chromatographiekammern sollen dicht schließen und mit Lösungsmitteldampf gut gesättigt sein.
4. Hinsichtlich Papiersorte, Auftropfverfahren, Imprägnieren und Trocknen sind Standardbedingungen einzuhalten.

Sind diese Voraussetzungen erfüllt, so können sogar, wie V. JIRÁČEK und Mitarb. (64) gezeigt haben, ungereinigte, rohe Anthocyanextrakte auf langen Papierstreifen eindimensional absteigend mit gutem Erfolg chromatographiert werden.

In einer Mitteilung (59) wurden die Grundlagen unseres Verfahrens zur Anreicherung und Chromatographie von Anthocyanen kurz erörtert. Wir gingen dabei von der Voraussetzung aus, daß die Gehalte an Anthocyanen und Anthocyanidinen in Beerenextrakten, Mosten und Weinen grundsätzlich verschieden sind. Während bei schonender Aufarbeitung von Beerenhülsen fast vorwiegend Anthocyane anfallen, enthalten Weine erhebliche Anteile an freien Anthocyanidinen. Unsere Befunde stimmen gut überein mit Angaben von M. A. AMERINE (40, vgl. Tabelle 3).

Tabelle 3

Gehalt an Önin und Önidin in Weinen in Abhängigkeit von der Art der Vorbehandlung
[nach M. A. AMERINE (40)]

Weine	Behandlung	Önin mg/l	Önidin mg/l
Saperasi, 1946	keine	288	260
Saperasi, 1949	keine	317	300
Saperasi, 1949	1 h 95° C	245	190
Saperasi, 1949	Luft, 7 Tage 28° C	—	165
Saperasi, 1949	3 Monate offene Lagerung	81	134
Saperasi, 1949	Luft, 15 Tage 48° C	—	39
Dneprooskoe, 1949	keine	115	50
Dneprooskoe, 1949	Luft, 7 Tage 28° C	101	44
Dneprooskoe, 1949	Luft, 15 Tage 48° C	83	45

Aus dem Zahlenvergleich wird auch deutlich, daß eine der chromatographischen Analyse vorausgehende ungeeignete Behandlung (Konzentrieren unter Luftzutritt, langes Erhitzen, Erwärmen der Chromatogramme) zu falschen Ergebnissen führen kann. Da auch Extraktionen nicht hydrolysierter Weine mit Alkoholen, wie Butanolen oder Pentanolen, lediglich eine nennenswerte Anreicherung der vorliegenden freien Anthocyanidine bewirken, scheidet diese Methode dann ebenfalls aus, wenn vor der Extraktion Erhitzen und Hydrolyse vermieden werden soll. Das Verteilungsgleichgewicht von Anthocyanen zwischen n-Butanol/Wasser oder n-Butanol/Wein ist so stark auf die Seite der wässrigen Phase verschoben, daß eine quantitative Extraktion der Anthocyane in Praxi unmöglich ist. Dies wird, wie auch die R_f -Werte in Fließmitteln unterschiedlichen Wassergehaltes zeigen, durch den hydrophilen Charakter des Anthocyanmoleküls verständlich. Es ist daher nicht einzusehen, daß G. REUTHER (72), durch Papierchromatographie von Butanolextrakten überhaupt zu reproduzierbaren Ergebnissen gelangt. Nachdem aus den erwähnten Gründen weder ein Konzentrieren noch Extrahieren mit einfachen Mitteln anzuraten ist, befaßten wir uns vorwiegend mit Fällungsreaktionen im neutralen bzw. sauren Bereich.

Bekanntlich werden Verbindungen mit phenolischen OH-Gruppen durch Schwermetallsalze innerhalb eines bestimmten pH-Bereiches gefällt. Versetzt man Rotweine innerhalb ihres pH-Bereiches ($\sim 3,3$ - $4,0$) mit neutraler Bleiacetatlösung, so entstehen tiefgefärbte Niederschläge, die innerhalb von 3—5 Minuten (5000 U/min.) blank zu zentrifugieren sind. Die klaren Überstände sind bei diesem Vorgehen noch blaßrot gefärbt. Wie schon beschrieben (59), können die dichten Niederschläge mit HCl zerlegt und titriert werden.

Werden die Weine vor der Fällung auf pH 7,2 neutralisiert und dann mit heiß gesättigter und bei Zimmertemperatur aufbewahrter basischer Bleiacetatlösung versetzt*), so resultieren nach Zentrifugieren farblose, blanke Überstände, die nach Ansäuern kaum noch rot werden. Damit dürften die Voraussetzungen für eine schonende Konzentrierung der Farbstoffe gegeben sein.

Bei der Anwendung der Bleiacetatfällung auf Rotmoste konnten innerhalb verschiedener pH-Bereiche fraktionierte Farbstoff-Fällungen erhalten werden, die mit dem Ziel weiterverarbeitet wurden, einzelne Anthocyane bzw. Anthocyanidine in präparativen Mengen zu gewinnen. Hierüber wird nach Abschluß der Arbeiten andernorts berichtet (60).

Mit wässriger Quecksilberacetatlösung entsteht ebenfalls ein Niederschlag, aus welchem indessen nach Zerlegen die Farbstoffe nur zu einem geringen Teil unzerstört freigesetzt werden können.

Im einzelnen wird wie folgt verfahren:

50 ml Rotwein werden mit 2n-NaOH auf pH 7,2 neutralisiert und unmittelbar darauf 100 ml heiß gesättigte, bei Zimmertemperatur aufbewahrte, basische Bleiacetatlösung eingegossen. Während sofort eine dichte Fällung entsteht, fällt der pH zunächst auf 6,3 und stellt sich dann auf einen Endwert von 8,3 ein. Damit ist die Fällung vollständig. Nach Zentrifugieren (5 Minuten bei

*) Herrn Ministerialrat Dr. F. WOBISCH, Wien, danke ich für wertvolle experimentelle Hinweise.

Portugieser Rotwein (1959) zeigte vor allem bei R_f 0.24 im Tageslicht eine rote, im UV-Licht eine satt samtrote Farbe.

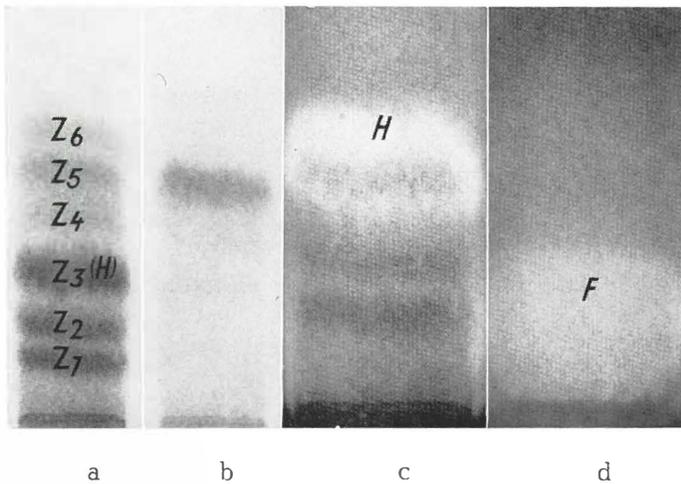


Abb. 1: Papierchromatogramm eines Bleiacetatkonzentrates aus einem Hybriden- (a) und einem Portugieser-Rotwein (b)

$Z_1 - Z_7$: Farbstoffzonen; c: Durchlicht-UV-Aufnahme von a (H = ziegelrote Fluoreszenz der Hybridenzone); d: Durchlicht-UV-Aufnahme von b (F = blaue Fluoreszenz)

Aus Abb. 1 wird die Farbauftrennung eines farbstarken Hybridenweines (1a) im Vergleich zu einem mittelstark gefärbten Portugieser Wein (1b) ersichtlich. Die Schwarz-Weiß-Aufnahme gibt nur annähernd die Brillanz der einzelnen Farbzonen des Hybridenweines wieder (Tab. 4). Die Farbzonen sind klar voneinander abgesetzt, so daß eine Elution der Farben zur nachfolgenden spektroskopischen Auswertung ohne weiteres möglich ist. Hierüber wird in Kürze berichtet (60). Die starke, helle Zone der UV-Durchlichtaufnahme (1c) läßt in etwa die Farbtintensität der ziegelroten Fluoreszenzzone erkennen, welche, wie Abb. 1d zeigt, beim Portugieser fehlt.

Neben den Farbunterschieden im sichtbaren und UV-Bereich können zur weiteren Unterscheidung der Farbzonen verschiedene, für den Nachweis von phenolischen Verbindungen geeignete Reagenzien angewandt werden*), z. B.:

1. Aluminiumammoniumsulfat (2 proz. wässrig) bzw. $AlCl_3$ (1 proz. wässrig).
2. PAULY-Reagens (nach BRAY): 25 ml salzsaure Sulfanilsäure-Lösung (300 mg Sulfanilsäure in 100 ml 8 proz. HCl) + 1,5 ml 5 proz. $NaNO_2$ -Lösung kurz vor dem Besprühen vermischen. Nach Trocknen des Chromatogramms Besprühen mit 20 proz. Na_2CO_3 -Lösung.
3. BENEDICT-Reagens: 1.73 g Kupfersulfat (krist.) + 17.3 g Na-citrat + 10 g Na_2CO_3 (wasserfrei) mit H_2O auf 100 ml auffüllen.

*) Vgl. L. M. HALLS und K. MACEK: Handb. der Papierchromatographie. Bd. I, 311 und 743. Verlag G. Fischer, Jena 1958.

4. Echtblausalz B: 500 mg in 100 ml Methanol. Nach Trocknen des Chromatogramms Besprühen mit 1 proz. alkoholischer KOH.
5. Vanillin: 1 g in 100 ml konz. HCl.

Vor dem Besprühen der Chromatogramme mit den genannten Reagenzien ist darauf zu achten, daß die Säure des Fließmittels weitgehend verdampft ist. Beidseitiges Besprühen ist vorzuziehen.

Aluminiumammonsulfat bzw. AlCl_3 erlaubt eine Unterscheidung der Farbzonen nach der Struktur. Blaue Farbzonen werden verstärkt, rote kaum beeinflusst. Fluoreszenzen treten brillanter in Erscheinung.

PAULY-Reagens erlaubt eine Unterscheidung der stark ziegelrot fluoreszierenden Hybridzone von den übrigen Farbzonen. Sie färbt sich nach Besprühen und Trocknen bei 60°C intensiv türkisgrün an, wogegen z. B. die satt samtrot fluoreszierende Zone des Portugiesers einen Farbumschlag nach olivgrün erfährt.

Mit BENEDICT-Reagens nimmt die Hybridzone eine türkisblaue Farbe an, wogegen die anderen Farbzonen mehr blau gefärbt sind (Abb. 2).

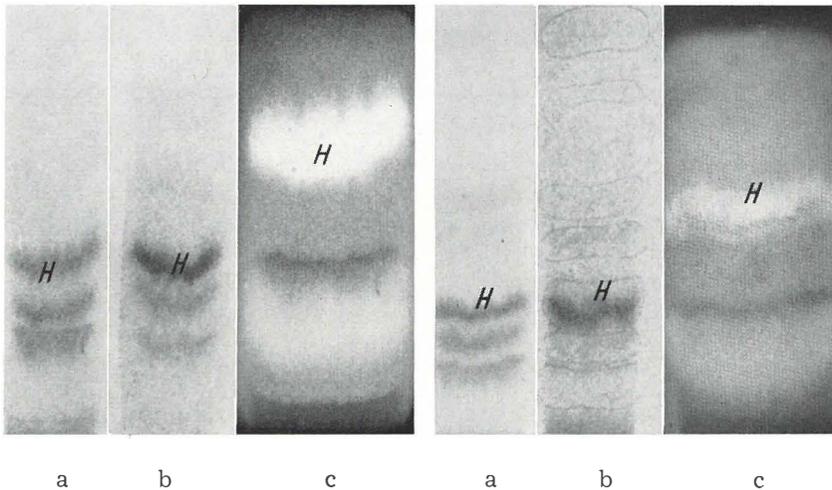


Abb. 2: Papierchromatogramm eines Farbkonzentrates aus Hybridwein

a: unbeeinflusst; b: nach Besprühen mit Benedict-Reagens (H = Hybridzone);
c: Durchlicht-UV-Aufnahme von a

Abb. 3: Papierchromatogramm eines Farbkonzentrates aus Hybridwein

a: unbeeinflusst; b: nach Besprühen mit Echtblausalz B (H = Hybridzone);
c: Durchlicht-UV-Aufnahme von a

Echtblausalz B bewirkt ebenfalls einen Farbumschlag der Hybridzone nach türkisgrün.

Mit Vanillin, sowie mit weiteren Reagenzien wie z. B. Ammonvanadat und FeCl_3 , treten andere phenolische Verbindungen, die bei der Bleiacetatfällung zusammen mit den Farbstoffen niedergeschlagen werden, in Erscheinung. Hierüber wird ebenfalls andernorts berichtet.

Die Fällung der Rotweinanthocyane mit 1 proz. methanolischer CaCl_2 -Lösung*) nach M. M. MARICHAL (61), wie sie auch von H. GROHMANN und E. GILBERT (62) bei hellfarbigen Weinen oder solchen mit mehr als 15 g/l Zucker angewandt wird, führt nach unseren Versuchen zu einer unvollständigen Fällung der Farbstoffe. Der optisch dichte, smaragdgrüne Überstand hat einen pH-Wert von 9,7 und gibt mit HCl noch eine intensiv rote Färbung (nicht gefällte Farbstoffanteile).

Besser geeignet scheint die von H. BIEBER (63) angewandte Fällung mit CARREZ-Lösung**) zu sein. Nach Zentrifugieren verbleibt über dem dichten, intensiv gefärbten Niederschlag ein fast wasserklarer Überstand, der nach Ansäuern mit HCl nur eine schwache Rosafärbung gibt. Zur Gewinnung eines Farbkonzentrates kann der Niederschlag mit HCl zerlegt und mit Isopropylalkohol extrahiert werden.

Zum Hybridennachweis ist auch die Rundfiltermethode zwischen Glasplatten geeignet wie sie z. B. von E. BAYER beschrieben wurde (65).

Eine interessante und ausbaufähige Methode zur Untersuchung von Rotweinen wurde von F. WOBISCH und J. SCHNEYDER (66) beschrieben. Sie beruht auf der Messung von Farbveränderungen nach Zusatz von basischen Puffern (Glycin bzw. Borat).

Eine weitere Möglichkeit zur Anreicherung von Farbstoffen ergibt sich aus den Experimenten von H. RENTSCHLER und H. TANNER (67). Nach Adsorption der Farbstoffe an Aktivkohle wird mit alkoholischer Ameisensäure bzw. alkoholischer Ammoniaklösung eluiert und eingedampft.

Da Aktivkohle im allgemeinen Farbstoffe sehr stark festhält, empfiehlt sich nach unseren Erfahrungen zur Elution das Gemisch Methanol/Pyridin/ H_2O (1:1:1) bzw. Dimethylformamid. Zur Entfernung der Lösungsmittel ist ein Einengen bei Temperaturen unter 0°C dem Eindampfen vorzuziehen (Oxydations- und Lichtempfindlichkeit im alkalischen Bereich).

Was für die Desorption der Farbstoffe von Aktivkohle gilt, ist sinngemäß auf Adsorbate an Bentonit***), das sich, unseren Experimenten zufolge, ebenfalls gut zur Adsorption der Rotweinfarbstoffe eignet, zu übertragen.

Schlußbetrachtung

Wie schon eingangs angedeutet wurde, erlaubt eine Untersuchung der Beeren, Moste und Weine von Reben auf Anthocyane bzw. Anthocyanidine anhand der geschilderten Erkenntnisse und Methoden eine Aussage sowohl über die Abstammung der untersuchten Sorten als auch über den Erbgang der Anthocyane, soweit dieser noch nicht bekannt ist.

Die vorliegende Arbeit ist Teil einer Untersuchungsreihe, die es sich zur Aufgabe gemacht hat, Inhaltsstoffe durch exakte und reproduzierbare Analysemethoden zu erfassen.

*) 20 ml Wein + 20 ml 1 proz. methanolische CaCl_2 -Lösung + 1 ml Ammoniak (25 %).

**) 10 ml Wein + 0,5 ml Ammoniak (25 %) + 5 ml CARREZ-I-Lösung (7,5 g Kaliumferrocyanid in 50 ml H_2O) + 5 ml CARREZ-II-Lösung (15 g Zinksulfat in 50 ml H_2O).

***) Bentonit der Fa. Boehringer & Söhne, Ingelheim/Rhein.

Genauere Angaben über den chemischen Charakter der bei Hybriden und *vinifera*-Kreuzungen aufgefundenen Farbzonen bleiben weiteren Arbeiten vorbehalten. Im Widerspruch zu der erwähnten und in der Literatur weit verbreiteten Auffassung, die ziegelrote Fluoreszenz der sog. Hybridenzonen rühre von 3,5-Diglucosiden her, wird diese Fluoreszenz von uns auch nach Hydrolyse bzw. in Bleiacetatkonzentraten beobachtet. Dies gilt auch für andere, ebenfalls fluoreszierende Farbzonen. Es wird Gegenstand weiterer Untersuchungen sein, auf der Basis der beschriebenen Verfahren festzustellen, ob noch weitere Farbzonen auf die Abstammung aus amerikanischen Wildformen schließen lassen und inwieweit sie auch in *vinifera*-Formen gefunden werden.

Diese Untersuchungen sind von einer gewissen Tragweite, weil mit dem Begriff „Hybride“ bisher voreingenommene Ansichten verbunden waren. Diese Ansichten resultieren aus den allgemein bekannten Eigenschaften der „alten“ Hybriden wie unzureichende Qualität, ungünstige ökologische Anpassung u. a. m. Die aus der konsequenten Weiterentwicklung der Züchtungsarbeiten auf Grund moderner genetischer Erkenntnisse hervorgegangenen Ertragskreuzungen zeigen aber ausgeprägte Qualitätsmerkmale. In diesem Zusammenhang sei an die Resistenzeigenschaften neuer Ertragskreuzungen gegenüber pilzlichen wie auch tierischen Schädlingen (Reblaus) erinnert. Durch Wahl geeigneter Kreuzungspartner sind sowohl die Qualitäts- als auch die Ertragsleistungen europäischer Sorten durch interspezifische Neuzuchten zu erreichen bzw. zu übertreffen. Wie schon nachgewiesen werden konnte, verfügen Weine von Neuzuchten über eine wesentlich reichhaltigere Folge von Inhaltsstoffen z. B. Vitaminen (68, 69) und Bukettstoffen, wie sie sonst nur in bekannten Qualitätsweinen bei guten Jahrgängen oder in qualifizierten Lagen gefunden werden (65, 70, 71).

Aus diesen Beispielen wird die Wichtigkeit der Untersuchungen für eine Neubewertung des Begriffes „Hybride“ deutlich, den man unter Berücksichtigung der Genetik und Züchtungsforschung unter veränderten und neuen Gesichtspunkten zu betrachten hat.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. B. HUSFELD für viele, wertvolle Anregungen und für sein stetes Interesse an dieser Arbeit. Herrn Dr. KOEPECHEN danke ich sehr für zahlreiche Diskussionen und Herrn G. KUPFER für seine unermüdliche Einsatzbereitschaft bei der Durchführung von Experimenten.

Literaturverzeichnis

1. WILLSTÄTTER, R.: Über Pflanzenfarbstoffe. Ber. dt. chem. Ges. **47**, 2831 (1914).
2. — — und A. E. EVERST: Untersuchungen über Anthocyane I. Über den Farbstoff der Kornblume. Liebigs Ann. Chem. **401**, 189 (1913).
3. — — und H. MALLISON: Über die Verwandtschaft der Anthocyane und Flavone. Sitzungsber. Akad. Wiss. Berlin **1914**, S. 769.
4. — — und — — : Untersuchungen über Anthocyane III. Über den Farbstoff der Preiselbeere. Liebigs Ann. Chem. **408**, 15 (1915).
5. — — und — — : Untersuchungen über Anthocyane X. Über Variationen der Blütenfarben. Liebigs Ann. Chem. **408**, 147 (1915).
6. — — und E. K. BOLTEN: Untersuchungen über Anthocyane XI. Über das Anthocyan der rotblühenden *Salvia*arten. Liebigs Ann. Chem. **412**, 113 (1917).

7. — — und E. H. ZOLLINGER: Untersuchungen über Anthocyane XVI. Über die Farbstoffe der Weintraube und der Heidelbeere. *Liebigs Ann. Chem.* **412**, 195 (1917).
8. KARRER, P. und Mitarb.: Über Pflanzenfarbstoffe. IV. Zur Kenntnis der Anthocyane und Anthocyanidine. *Helv. chim. Acta* **10**, 729 (1927).
9. — — und R. WIDMER: Untersuchungen über Pflanzenfarbstoffe. I. Über die Konstitution einiger Anthocyanidine. *Helv. chim. Acta* **10**, 5 (1927).
10. — — und — — : II. *Helv. chim. Acta* **10**, 67 (1927).
11. — — und — — : XII. Zur Konstitution des Monardeins und Salvanins. *Helv. chim. Acta* **12**, 292 (1929).
12. — — und H. M. WEBER: Zerlegung natürlicher Anthocyanmische durch chromatographische Adsorptionsanalyse. II. Über „Althaein“. *Helv. chim. Acta* **19**, 1025 (1936).
13. — — und F. M. STRONG: Reindarstellung von Anthocyanen durch chromatographische Analyse. *Helv. chim. Acta* **19**, 25 (1936).
14. — — , C. TRUGENBERGER und G. HAMDI: Umwandlungsprodukte einfacher Benzopyryliumverbindungen. *Helv. chim. Acta* **26**, 2116 (1943)
15. ROBERTSON, A. und R. ROBINSON: Note on the characterisation of anthocyanins and anthocyanidins by means of their colour reactions in alkaline solutions. *Biochem. J.* **23**, 35 (1929).
16. ROBINSON, G. M. und R. ROBINSON: A survey of anthocyanins. I. *Biochem. J.* **25**, 1687 (1931).
17. — — und — — : A survey of anthocyanins. III. Notes on the distribution of leuco-anthocyanins. *Biochem. J.* **27**, 206 (1933).
18. — — und — — : A survey of anthocyanins. IV. *Biochem. J.* **28**, 1712 (1934).
19. — — und — — : Leuco-anthocyanins and leuco-anthocyanidins. Part. I. The isolation of peltogynol and its molecular structure. *J. Chem. Soc. (London)* **1935**, 744.
20. ROBINSON, R.: The genesis of plant pigments and related substances. *Rep. Brit. Assoc.*, 89 Meet., 417 (1921).
21. — — : Richard Willstätters investigation of the anthocyanins. *Naturwiss.* **20**, 612 (1932).
22. — — : Chemistry of anthocyanins. *Nature* **135**, 732 (1935).
- 22a. — — : *Nature* **132**, 625 (1933).
23. — — : Formation of anthocyanins in plants. *Nature* **137**, 172 (1936).
24. — — und A. R. TODD: Experiments on the synthesis of anthocyanins. Part. XV. A synthesis of hirsutin chloride. *J. Chem. Soc.* **1933**, 2293.
25. BAYER, E.: Über den blauen Farbstoff der Kornblume I. Natürliche und synthetische Anthocyan-Metallkomplexe. *Chem. Ber.* **91**, 1115 (1958).
26. — — : Über Anthocyankomplexe. II. Farbstoffe der roten, violetten und blauen Lupinenblüten. *Chem. Ber.* **92**, 1062 (1959).
27. — — , K. NETHER und H. EGETER: Natürliche und synthetische Anthocyankomplexe, III.: Synthese der blauen, im Kornblumenfarbstoff enthaltenen Chelate. *Chem. Ber.* **93**, 2871 — 2879 (1960).
28. BLANK, F.: Anthocyanins, flavons, xanths. *Hdb. Pflanzenphysiol.* Bd. X, 300 — 353. Springer-Verlag, 1958.
29. RIBÉREAU-GAYON, P.: Recherches sur les Anthocyanes des végétaux. Application au genre *Vitis*. *Libr. Gén. de l'Enseignement*, Paris 1959.
30. BROWN, W. L.: *J. Amer. Chem. Soc.* **62**, 2808 (1940).
31. BOCKIAN, A. H., R. E. KEPNER und A. D. WEBB: *J. Agric. Food Chem.* **3**, 695 (1955).
32. STASUNAS, V. J.: The anthocyan pigments of zinfandel grapes and wine. *Chem. Abstr.* **50**, 527c (1956).
33. FOUASSIN, A.: *Rev. Fermentat. Ind. aliment.* **11**, 173 (1956).
34. RIBÉREAU-GAYON, P., P. SUDRAUD und P. M. DURQUETY: Relations entre génétique et nature chimiques des pigments anthocyaniques de la baie dans le genre *Vitis*. *Rev. gén. Bot.* **62**, 667 (1955).

35. ANDERSON, R. J. und F. P. NABENHAUER: *J. Amer. Chem. Soc.* **48**, 2997 (1926).
36. SCHRINER, R. L. und R. J. ANDERSON: *J. biol. Chem.* **80**, 743 (1928).
37. SASTRY, L. V. L. und R. G. TISCHER: *Food Techn.* **6**, 264 (1952).
- 37a. ROBINSON, G. M. und R. ROBINSON: *Biochem. J.* **26**, 1647 (1932).
38. CORNFORTH, J. W.: *J. Proc. roy. Soc. N. S. Wales* **72**, 325 (1939).
39. SUOMALAINEN, H. und CH. ERIKSON: Anthocyanine in nordischen und einigen anderen Beerenfrüchten. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **112**, 197 — 212 (1960).
40. AMERIE, M. A.: Composition of wines. I. Organic constituents. *Adv. Food Res.* Vol. **V**, 353 — 510, Academic Press, 1954.
41. BATE-SMITH, E. C.: Flavonoid compounds in foods. *Adv. Food Res.* Vol. **V**, 261 — 300, Academic Press, 1954.
42. GEISSMAN, T. A.: Anthocyanins, Chalcones, Aurones, Flavones and related water-soluble plant pigments. *Mod. Meth. Pflanzenanal.* Bd. **III**, 450 — 498, Springer-Verlag, 1955.
43. BATE-SMITH, E. C.: *Nature* **161**, 835 (1948).
44. — — : *Biochem. Soc. Symp.* **3**, 62 (1949).
45. — — und R. G. WESTALL: *Biochem. Biophys. Acta* **4**, 527 (1950).
46. HARBORNE, J. B.: The chromatographic identification of anthocyanin pigments. *J. Chromatog.* **1**, 473 — 488 (1958).
47. BATE-SMITH, E. C.: Leuco-anthocyanins. I. Detection and identification of anthocyanidins formed from leuco-anthocyanins in plant tissues. *Biochem. J.* **58**, 122 (1954).
48. KERÄNEN, A. J. A. and H. SUOMALAINEN: Anthocyanins of arctic bramble, *Rubus arcticus* L. *Suomen Kemistilehti B* **33**, 155 (1960).
49. FOUASSIN, A.: *Bull. Ferment.* **4**, 1 (1956).
50. ABE Y. und K. HAYASCHI: *Bot. Mag. (Tokyo)* **69**, 577 (1956).
51. REZNIK, H.: *Sitzungsber. Akad. Wiss., Math.-Naturw. Kl. Heidelberg* 1956, S. 125.
52. ROBINSON, R.: *Nature* **137**, 94 (1936).
53. DUPUIS, P. und J. PUISAIS: *C. R. Acad. Sci (Paris)* **240**, 1802 (1955).
54. FORSYTH, F. G. und N. W. SIMMONDS: *Proc. Roy. Soc. (London) B* **142**, 549 (1954).
55. LI, K. C. und A. C. WAGENKNECHT: *J. Amer. Chem. Soc.* **78**, 979 (1956).
56. FORSYTH, F. G.: *Biochem. J.* **51**, 511 (1952).
57. CHANDLER, B. V. und K. A. HARPER: *Nature* **181**, 131 (1958).
58. ENDO, T.: *Nature* **179**, 378 (1957).
59. DRAWERT, F.: Eine Methode zum papierchromatographischen Nachweis der Anthocyane, insbesondere Hybridenanthocyane in Rotmosten und Rotweinen. *Vitis* **2**, 179 — 180 (1960).
60. — — und G. KUPFER: In Vorbereitung.
61. MARICHAL, M. M.: *Ann. Fals. Fraudes* **49**, 155 (1956); *Progr. Agr. Vitic.* **73**, Nr. 27/28 (1956).
62. GROHMANN H. und E. GILBERT: Zum papierchromatographischen Nachweis von roten Hybridenfarbstoffen. *Dtsch. Weinztg.* **95**, 346 (1959).
63. BIEBER, H.: Der papierchromatographische Nachweis von rotem Hybridenfarbstoff. *Dtsch. Weinztg.* **96**, 104 (1960).
64. JIRÁČEK, V., J. NETUŠIL und R. IVŠINOVÁ: Zur Papierchromatographie der Pflanzenfarbstoffe. *J. Chromatog.* **2**, 659 (1959).
65. BAYER, E.: Anwendung chromatographischer Methoden zur Qualitätsbeurteilung von Weinen und Mosten. *Vitis* **1**, 298 — 312 (1958).
66. WOBISCH, F. und J. SCHNEYDER: Kolorimetrischer Nachweis von Holunderbeerfarbstoff im Wein. *Monatsh. Chem.* **83**, 478 (1952).
67. RENTSCHLER, H. und H. TANNER: Beitrag zur Charakterisierung der Farbstoffe von blauen Trauben und zum Nachweis von Hybridenweinen. *Mitt. Lebensm. Untersuch. Hygiene* **50**, 533 (1959); vgl. ebenda **51**, 130 (1960).

68. RADLER, F.: Untersuchungen über den Gehalt der Moste einiger Rebensorten und -arten an den Vitaminen Pyridoxin, Pantothensäure, Nicotinsäure und Biotin. *Vitis* **1**, 96 — 108 (1957).
69. — — : Der Vitamingehalt der Moste verschiedener Rebenarten und -sorten. *Experientia* **13**, 318 (1957).
70. BAYER, E.: Aromastoffe des Weines. Die Carbonsäureester des Weines und der Trauben. *Vitis* **1**, 34 — 41 (1957).
71. — — : II. Aliphatische Aldehyde des Weines und der Trauben. *Vitis* **1**, 93 — 95 (1957).
72. REUTHER, G.: Untersuchungen zum Nachweis roter Hybriden-Charaktere in Säften und Weinen. *Z. Lebensm. Unters. Forschg.* **113**, 480 — 484 (1960).

eingegangen am 7. 2. 1961