

Besonderheiten des Anthocyanenspektrums der Rebsorte 'Pinotage'

RAINER MARX¹, MICHAEL ZIMMER¹, HERBERT OTTENEDER¹, BARBARA BRAKOWIECKA-SASSY², CARSTEN FAUHL² und RAINER WITTKOWSKI²

¹ Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz - Institut für Lebensmittelchemie Trier
D-54290 Trier, Maximineracht 11a
e-Mail: poststelle.ilctr@lua.rlp.de

² Bundesinstitut für Risikobewertung
D-14191 Berlin, Postfach 33 00 13
e-Mail: r.wittkowski@bfr.bund.de

Die Anthocyanenspektren sowie die Gehalte an Shikimisäure und Kaffeesäure von 26 authentischen Weinen und zwölf unauffälligen Handelsproben der Rebsorte 'Pinotage' wurden mittels standardisierter und validierter HPLC-Verfahren bestimmt. Mittelwerte und Schwankungsbreiten für Shikimisäure, Kaffeesäure, Summe der acylierten Anthocyane und das Verhältnis der acetylierten zu den cumarylierten Anthocyanen werden angegeben. Das als Pinotin A bezeichnete Malvidin-3-glucosid-4-vinylcatechol tritt in der Regel im Anthocyanenspektrum von Weinen der Rebsorte 'Pinotage' deutlich hervor. Untersuchungen an Modelllösungen haben gezeigt, dass dieses Anthocyanenderivat durch Reaktion des Malvidin-3-glucosids mit Kaffeesäure entstehen kann. Die Kaffeesäuregehalte von Weinen der Sorte 'Pinotage' sind gegenüber den Weinen anderer Rebsorten deutlich erhöht. Der mögliche Reaktionsweg für die Bildung von Malvidin-3-glucosid-4-vinylcatechol wird vorgestellt. Ob dieses Anthocyanenderivat ähnlich dem Vitisin eine Indikatorsubstanz für das Alter des Weins werden kann, bleibt abzuwarten.

Schlagwörter: Wein, 'Pinotage', Anthocyane, Alterung, Kaffeesäure, Pinotin A

Special characteristics of the anthocyanin spectrum of the grape cultivar 'Pinotage'. The anthocyanin spectra as well as the contents of shikimic acid and caffeic acid of 26 authentic wines and twelve inconspicuous commercial wines were determined by means of standardized and validated HPLC procedures. Mean values and deviations of shikimic acid and caffeic acid concentrations, totals of acylated anthocyanins and the ratio of acylated and coumarylated anthocyanins are given. Normally Pinotin A (malvidin-3-glucosid-4-vinylcatechol) stands out prominently in the anthocyanin spectrum of wines from the 'Pinotage' cultivar. Investigations with model solutions have shown, that this anthocyanin derivative can be formed by a reaction of malvidin-3-glucosid with caffeic acid. Caffeic acid contents are significantly higher in 'Pinotage' wines than in wines from other cultivars. A possible course of malvidin-3-glucosid-4-vinylcatechol formation is introduced. If this anthocyanin derivative - similar to vitisin - can become an indicator substance for age of the wine remains to be seen.

Key words: Wine, 'Pinotage', anthocyanins, ageing, caffeic acid, Pinotin A

Les spécificités du spectre de l'anthocyane du cépage «Pinotage». Les spectres de l'anthocyane ainsi que les teneurs en acide shikimique et en acide caféique de 26 vins authentiques et de douze échantillons commerciaux du cépage «Pinotage» ont été déterminés à l'aide de procédés HPLC standardisés et validés. Les valeurs moyennes et les différences pour l'acide shikimique, l'acide caféique, la somme des anthocyanes acylés et le rapport entre les anthocyanes acétylés et les anthocyanes coumarylés sont indiqués. En règle générale, le malvidine-3-glucoside-4-vinylcatecholé désigné comme Pinotin A apparaît nettement dans le spectre de l'anthocyane des vins du cépage «Pinotage». Des analyses de solutions type ont montré que ce dérivé d'anthocyane peut naître à la suite de la réaction du malvidine-3-glucoside avec l'acide caféique. Les teneurs des vins du cépage «Pinotage» en acide caféique sont nettement plus élevées que celles des vins d'autres cépages. Le processus réactionnel possible pour la formation du malvidine-3-gluco-

side-4-vinylcatechole est présenté. Il reste encore à éclaircir si ce dérivé d'anthocyane, tout comme le vitisin, pourra devenir un indicateur du vieillissement.

Mots clés: vin, «Pinotage» anthocyane, vieillissement, acide caféique, Pinotin A

Die Rebsorte 'Pinotage' ist eine südafrikanische Neuzüchtung ('Pinot Noir' x 'Cinsaut'). Der Name leitet sich ab von 'Pinot Noir' und 'Hermitage', einem in Südafrika für die Rebsorte 'Cinsaut' verwendeten Synonym (HILLEBRAND, 2002). Die Sorte wird fast ausschließlich in Südafrika kultiviert, kleine Bestände gibt es aber auch in Neuseeland und Zimbabwe. Die frühreifende, ertragreiche Rebe zeichnet sich durch einen hohen Zucker- und Säuregehalt aus. Der zumeist sortenrein hergestellte, purpurfarbige, fruchtige und vollmundige Wein hat weiche Tannine und ist lange lagerfähig, man sollte ihn nicht vor Ablauf von vier bis fünf Jahren genießen. Er besitzt ein charakteristisches, süßliches, lakritzartiges Bouquet und ist diesbezüglich mit einem Burgunder zu vergleichen. Wegen der früheren Lese reift der 'Pinotage' meist länger im Fass als andere Rotweine des gleichen Jahrgangs.

Etwa acht Prozent der gesamten südafrikanischen Rebfläche sind mit 'Pinotage' bepflanzt. Der Anbau dieser Rebsorte hat sich seit 1990 vervierfacht. Sie findet bei Weinfreunden international immer größeres Interesse, wie die zunehmende Präsenz in den Regalen des Einzelhandels eindrucksvoll belegt. Die Sortenreinheit der Weine wird oftmals mit einem entsprechenden Hinweis auf die Rebsorte am Flaschenetikett herausgestellt. Hieraus ergibt sich das Erfordernis, die Richtigkeit dieser Angabe zu überprüfen.

Bei Rotweinen kann über das gesamte Anthocyanenspektrum die Angabe einer Rebsorte des Weines überprüft werden (OTTENEDER et al., 2002). Zur Beurteilung herangezogen werden in der Praxis die Summe der acylierten Anthocyane und das Verhältnis der acetylierten zu den cumarylierten Anthocyanen (HOLBACH et al., 2001). Zur Bestimmung dieser Kennzahlen wurde 1997 ein standardisiertes Hochdruckflüssigkeitschromatographisches Verfahren entwickelt und veröffentlicht, wobei neun für die Identifizierung der einzelnen Rebsorten charakteristische Anthocyanenkomponenten ausgewertet werden. Für die Differenzierung von Rebsorten gewinnt darüber hinaus die Shikimisäure an Bedeutung. Sie eignet sich sowohl zur Unterscheidung von weißen Rebsorten der Burgundergruppe von anderen weißen Rebsorten als auch zur Charakterisierung von roten Rebsorten zusammen mit dem Anthocyanenspektrum. Kennzahlen verschiedener Rebsorten sowie das hoch-

druckflüssigkeitschromatographische Verfahren zur Bestimmung wurden veröffentlicht (HOLBACH et al., 2001). Die Zuverlässigkeit beider zur Ermittlung der Kennzahlen angewendeten Analyseverfahren wurde in internationalen Ringversuchen nach den Vorgaben des O.I.V. überprüft (OTTENEDER und MARX, 2003a; OTTENEDER und MARX, 2003b). Eine Rebsortenidentifizierung ist mittels dieser Kennzahlen nicht in jedem Fall möglich, da sich die natürlichen Schwankungsbreiten der relativen Anthocyananteile unterschiedlicher Rebsorten häufig überlagern, so dass eine klare Abgrenzung mittels einer einzelnen Analysenkennzahl nicht immer möglich ist. Neben standardisierten und validierten Untersuchungsverfahren, mit deren Hilfe die Rebsortenkenntzahlen reproduzierbar bestimmt werden können, ist eine ausreichend große Anzahl repräsentativer Vergleichsdaten von Weinen der verschiedenen Rebsorten erforderlich.

Material und Methoden

Zur Ermittlung von Kennzahlen der Rebsorte 'Pinotage' wurden im Jahr 2002 die Shikimisäuregehalte und die Anthocyanzusammensetzung von 38 Proben untersucht. 26 davon waren authentisch, sie wurden in Südafrika unter amtlicher Aufsicht entnommen und für die Untersuchungen zur Verfügung gestellt. Die übrigen waren handelsübliche Weine aus dem Handel.

Die Bestimmung des Anthocyanenspektrums erfolgte mittels HPLC nach Direktinjektion und Trennung auf einer Umkehrphase (LiChrospher 100, 5 µm, Fa. Merck), Gradientenelution mit Wasser/Ameisensäure/Acetonitril und UV/VIS-Detektion bei 518nm. Die analytischen Details sind bei HOLBACH et al. (1997) beschrieben.

Die Gehalte an Kaffeesäure können bei der HPLC-Bestimmung des Anthocyanenspektrums unter Einsatz eines DAD-Detektors bei einer Wellenlänge von 320 nm mit erfasst werden.

Die Lagerversuche zur direkten Bildung von Anthocyanaddukten mit Kaffeesäure wurden wie folgt durchgeführt:

Je 10 mg Malvidin-3-glucosid bzw. Malvidin-3,5-diglucosid wurden in einem 100 ml Erlenmeyerkolben mit ameisenaurer Lösung (Wasser : Ameisensäure : Aceto-

nitril = 87 : 10 : 3; pH-Wert 1,4) aufgelöst. Je 50 ml hiervon wurden mit 10 mg Kaffeesäure versetzt und mit ameisensaurer Lösung erneut auf 100 ml aufgefüllt und unter normalen Laborbedingungen gelagert.

Ergebnisse

Rebsortenspezifische Kenndaten von 'Pinotage'

Die ermittelten Kenndaten der Rebsorte 'Pinotage' sind in Tabelle 1 dargestellt. Sie werden in der Weinüberwachung als Beurteilungsgrundlage herangezogen.

Tabelle 1:

Schwankungsbreiten der Shikimisäuregehalte der Summe acylierter und der Verhältnisse acetylierter zu cumarylierten Anthocyanen von authentischen und Handelsproben der Rebsorte 'Pinotage'

	Shikimisäure (mg/l)	Σ acylierter Anthocyane*	acetyl. A. / cumaryl. A.
Anzahl	38	35	35
Min.	10	12,46	1,39
Max.	49	30,72	3,32
Mittelwert	25,94	22,54	2,37
$\pm s$	9,02	3,95	0,41
t	2,026	2,032	2,032
VB (95 %)	18,27	8,03	0,84

*relative Peakflächenanteile

In Abbildung 1 ist das typische Chromatogramm eines Weines der Rebsorte 'Pinotage' dargestellt. Als besonderes Merkmal im Anthocyanenspektrum hat sich ein unbekannter Peak herausgestellt, der mittels der oben angeführten Analysenverfahren direkt hinter der letzten monoglucosidischen Anthocyan Komponente, dem Malvidin-3-cumarylglucosid, basisliniengetreunt eluiert. Das Absorptionsmaximum dieser unbekannt Komponente liegt bei ca. 510 nm, wohingegen das Absorptionsmaximum der monoglucosidischen Anthocyan Komponenten deutlich höher bei ca. 530 nm liegt.

SCHWARZ und WINTERHALTER (2003) isolierten den oben beschriebenen unbekannt Peak mittels „High-Speed Countercurrent Chromatography“ und Halb-Präparativer-HPLC. Die Strukturaufklärung wurde mittels

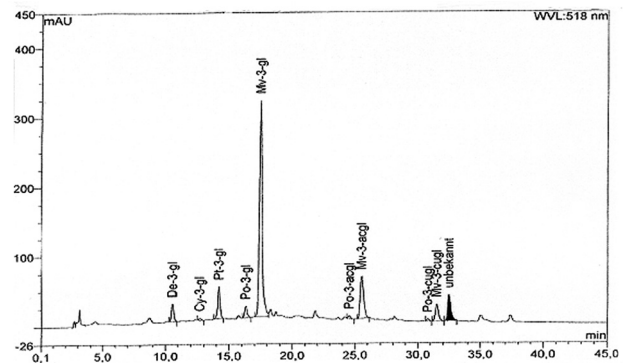


Abb. 1: HPLC-Chromatogramm eines Weines der Rebsorte 'Pinotage' („unbekannt“ = Malvidin-3-glucosid-4-vinylcatechol)

ein- und zweidimensionaler NMR-Spektroskopie und HPLC-ESI-MSⁿ durchgeführt.

Das unbekannt Molekül wurde als Malvidin-3-O- β -D-glucosid-4-vinylcatechol-Addukt beschrieben und als „Pinotin A“ bezeichnet (SCHWARZ und WINTERHALTER, 2003).

Bildungsweg von Pinotin A

Die Erkenntnis, dass Kaffeesäure (3,4-Dihydroxyzimtsäure) bei der Bildung von PinotinA eine entscheidende Rolle spielt, wurde zum Anlass genommen, sich näher mit dieser phenolischen Hydroxyzimtsäure zu befassen. Kaffeesäure ist eine weit verbreitete Pflanzensäure, die auch natürlich in Trauben vorkommt (RÖMPF, 1999). Sie liegt dort meist in gebundener Form vor. Mit Weinsäure verestert, bildet sie die Caftar Säure und durch Veresterung mit L-Chinasäure entsteht die Chlorogensäure, der am weitesten verbreitete Hydroxyzimtsäureester in Früchten. Ursprung dieser nicht-flavonoiden Polyphenolkomponente des Rotweins ist das Fruchtfleisch der Weinbeere. Die freie Kaffeesäure entsteht erst bei der Verarbeitung der Traube durch enzymatische und nicht-enzymatische Hydrolyse der Esterbindung. Als natürlicher Bestandteil der Traube gelangt sie in den Wein, wo sie in unterschiedlichen Gehalten nachweisbar ist. In der Literatur werden Gehalte zwischen 1 und 10 mg/l beschrieben (WÜRDIG und WOLLER, 1989).

Die Ergebnisse eigener Untersuchungen zur Bestimmung der Kaffeesäure in Weinen unterschiedlicher Rebsorten sind in Tabelle 2 dargestellt. Die Tabelle zeigt, dass die Rebsorte 'Pinotage' im Vergleich zu den

Tabelle 2:
Kaffeensäuregehalte von Weinen verschiedener roter Rebsorten

Rebsorte	n	Kaffeensäure (mg/l)				
		Min. (mg/l)	Max. (mg/l)	MW (mg/l)	$\pm s$ (mg/l)	VB 95 % (s.t)
Cabernet Sauvignon	19	1,7	12,8	7,47	3,12	6,55
Dornfelder	9	0,6	35,7	8,80	11,78	27,22
Kadarka	7	3,8	6,4	4,78	1,15	2,82
Merlot	12	0,4	8,8	4,71	3,12	6,55
Pinotage	29	4,3	63,4	29,89	18,43	37,77
Spätburgunder	22	0,4	32,7	9,81	9,10	18,89
Tempranillo	7	1,0	10,3	4,08	3,29	8,06

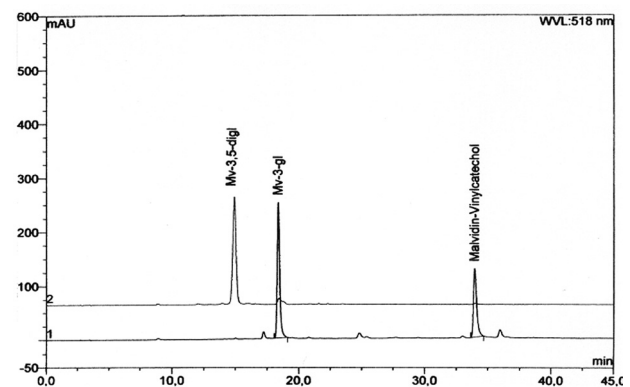
anderen Rotweinrebsorten einen signifikant höheren Gehalt an Kaffeensäure aufweist. Im Mittel lagen die Gehalte der 'Pinotage'-Weine bei ca. 30 mg/l und somit um ein Drei- bis Sechsfaches höher als in Weinen anderer Rebsorten. Der bei der Rebsorte 'Pinotage' festgestellte Maximalgehalt von über 63 mg/l lag um den Faktor 2 höher als die maximalen Gehalte, die bei anderen Rebsorten ermittelt wurden. Auffällig ist bei allen Rebsorten ein vergleichsweise hoher Variationskoeffizient, der vermuten lässt, dass die festgestellten Gehalte nicht normalverteilt sind (Tab. 2).

Um der Frage nachzugehen, welcher Bildungsmechanismus zu dem als Pinotin A bezeichneten Malvidin-3-glucosid-4-vinylcatechol führt, wurden eigene Laborversuche durchgeführt, da die genaue Entstehung dieses Anthocyanderivates bislang unbekannt ist. Als ein möglicher Weg wird eine enzymatische Decarboxylierung mit anschließender Reaktion während der Gärung diskutiert (SCHWARZ und WINTERHALTER, 2003). Auch die direkte Reaktion zwischen Kaffeensäure nach deren enzymatischer bzw. nicht-enzymatischer hydrolytischen Freisetzung aus den entsprechenden Estern und Malvidin-3-glucosid ist denkbar.

Um die letztgenannte These zu überprüfen, wurden in zwei Reaktionsansätzen die möglichen Reaktionspartner Malvidin-3-glucosid und Malvidin-3,5-diglucosid jeweils mit Kaffeensäure in ameisenaurer Lösung (pH-Wert = 1,4) und Raumtemperatur gelagert. Bei der Analyse nach einer sechswöchigen Standzeit war bei der Variante mit Malvidin-3-glucosid das Derivat Malvidin-3-glucosid-4-vinylcatechol bereits im Chromatogramm zu erkennen, während die Variante mit Malvidin-3,5-diglucosid das Derivat Malvidin-3-glucosid-4-vinylcatechol nicht aufwies.

In Abbildung 2 sind die Chromatogramme bei den vorgenannten Varianten nach einer Standzeit von sechs Monaten übereinandergelegt. Die Spur 1 zeigt, dass bei der Variante mit Malvidin-3-glucosid der Anthocyanabkömmling Malvidin-3-glucosid-4-vinylcatechol in erheblichen Mengen gebildet wurde, wohingegen dieses Anthocyanderivat bei der Variante mit Malvidin-3,5-diglucosid auch nach sechs Monaten offensichtlich nicht entsteht (Spur 2).

Abb. 2: HPLC-Chromatogramme



- 1 = Versuchsansatz Malvidin-3-glucosid mit Kaffeensäure in wässriger Lösung (pH-Wert = 1,4)
2 = Versuchsansatz Malvidin-3,5-diglucosid mit Kaffeensäure in wässriger Lösung (pH-Wert = 1,4)

Das Ergebnis dieser Versuche lässt die Schlussfolgerung zu, dass die bei der Verarbeitung der Trauben aus ver-

schiedenen Esterverbindungen freigesetzte Kaffeesäure offensichtlich direkt mit dem zur Verfügung stehenden Anthocyan unter Bildung von Malvidin-3-glucosid-4-vinylcatechol entsteht. Den möglichen Reaktionsweg gibt Abbildung 3 wieder.

1 = Malvidin, 2 = Kaffeesäure, 3 = Pinotin A,
R = beta-D-Glucose

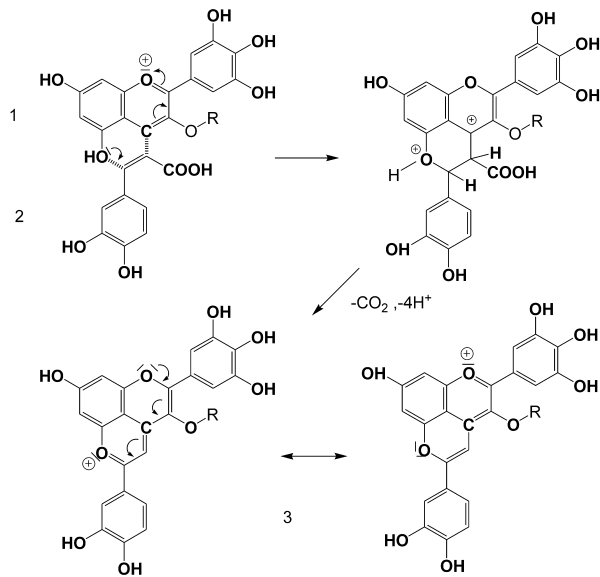


Abb. 3: Möglicher Bildungsweg von Pinotin A aus Malvidin-3-glucosid und Kaffeesäure

Dass unter gleichen Bedingungen kein Malvidin-3-glucosid-4-vinylcatechol in der Variante mit Malvidin-3,5-diglucosid gebildet wurde, bestätigt den vorgeschlagenen Reaktionsweg, der eine freie OH-Gruppe in der 5-Position voraussetzt.

In der Regel liegt in Weinen das monoglucosidische Malvidin-3-glucosid vorrangig als Reaktionspartner vor. Die speziell in der Rebsorte 'Pinotage' nachgewiesenen hohen Gehalte an Kaffeesäure erklären auch, weshalb Pinotin A in anderen roten Sorten nicht in nennenswerten Mengen festgestellt werden konnte.

Wird Pinotin A im Anthocyanprofil von 'Pinotage' detektiert, muss der Wein eine Lagerung erfahren haben. Ob Pinotin A ähnlich dem Anthocyanabkömmling Vitisin, das aus der Reaktion eines Anthocyan mit Pyruvat hervorgeht, eine Indikatorsubstanz für das Alter des Weins werden kann, bleibt abzuwarten. Aus Abbildung 4 geht jedoch bereits hervor, dass der prozentuale Anteil von Pinotin A am Gesamtanthocyanprofil mit zunehmendem Alter in seiner Tendenz eben-

falls zunimmt. Für den jüngsten untersuchten Jahrgang (2001) wurde ein Pinotin A-Anteil von 0,9 %, für die älteren Weine (<1998) ein Anteil von bereits 18,8 % (jeweils der Median) ermittelt (siehe Abbildung 4). Allerdings werden die Anthocyane mit zunehmendem Alter des Weines abgebaut und sind deshalb eingeschränkt zu erfassen.

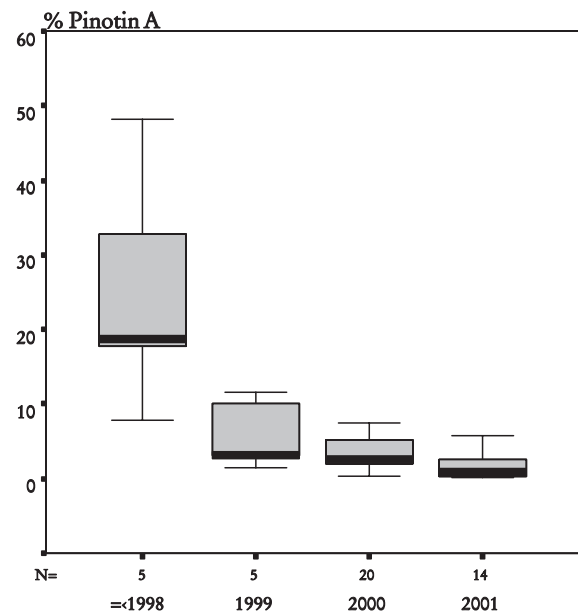


Abb. 4: Pinotin A-Gehalte in Abhängigkeit vom Alter der Weine

Literatur

- HILLEBRAND, W. (2002): Taschenbuch der Rebsorten. - Mainz: Fraund, 2002
- HOLBACH, B., MARX, R. und ACKERMANN, M. 1997: Bestimmung der Anthocyanzusammensetzung von Rotweinen mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie. Lebensmittelchemie 51: 78-80
- HOLBACH, B., MARX, R. und ZIMMER, M. 2001: Bedeutung der Shikimisäure und des Anthocyanprofils für die Charakterisierung von Rebsorten. Lebensmittelchemie 55: 32-34
- OTTENEDER, H., HOLBACH, B., MARX, R. und ZIMMER, M. 2002: Rebsortenbestimmung in Rotwein anhand der Anthocyanprofile. Mitt. Klosterneuburg 52: 187-194
- OTTENEDER, H. und MARX, R. 2003a: Method-performance study on the determination of nine characteristic anthocyanins in red wine by HPLC. Vitic. Enol. Sci 56/57: 17-21 (im Druck)
- OTTENEDER, H. und MARX, R. 2003b: Determination of Shikimic acid in wine. O.I.V. F.V. N° 1177
- RÖMPF, (1999): Lexikon Chemie - Version 2.0. - Stuttgart: Thieme, 1999

SCHWARZ, M., JERZ, G. and WINTERHALTER, P. 2003: Isolation and structure of Pinotin A, a new anthocyanin derivative from Pinotage wine. *Vitis* (im Druck)

SCHWARZ, M. und WINTERHALTER, P., 2003: Eignen sich Anthocyaninderivate als Alterungsindikatoren in Rotwein? *Der Öenologe* 31(5): 37-38

WÜRDIG, G. und WOLLER, R. (1989): *Chemie des Weines*. - Stuttgart: Ulmer, 1989

Manuskript eingelangt am 12. August 2003