

# **Untersuchungen zum Einsatz von PVI/PVP bei Bier und Wein**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades  
DOCTOR RERUM NATURALIUM  
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät II – Chemie, Physik und Mathematik  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Herrn Diplom-Lebensmittelchemiker Martin Schubert  
geb. am 28. April 1982 in Leipzig

1. Gutachter: Prof. Dr. Marcus Glomb (Halle)
2. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Simat (Dresden)

Halle (Saale), 3. November 2011

---

## ABSTRACT

Schubert

Untersuchungen zum Einsatz von PVI/PVP bei Bier und Wein

Polyvinylimidazol-Polyvinylpyrrolidon-Copolymere (PVI/PVP) sind Polymere, die selektiv Übergangsmetalle binden. Anwendung sollen sie in der Bier- und Weinherstellung finden, bei der zu hohe Metallkonzentrationen zu Fehlparomen, Trübungen oder beschleunigter Alterung führen.

Während der Anwendung dieser Polymere migrieren Restmonomere und Abbauprodukte in den Wein. So wurden mit der dafür entwickelten und validierten LC-MS-Methode bis zu 35 mg/kg Imidazol aus PVI/PVP nachgewiesen. 2-Pyrrolidon, welches mit bis zu 109 mg/kg aus PVPP bestimmt wurde, wird in Wein auch natürlich aus Glutamin sowie Glutaminsäure über die biogenen Amine 4-Aminobuttersäureamid und 4-Aminobuttersäure gebildet. Der Nachweis dafür wurde über getrennte Inkubationen der Einzelverbindungen und die statistische Auswertung 140 verschiedener Weinproben erbracht. *N*-Vinylpyrrolidon, ein Monomer aus der PVI/PVP-Herstellung, reagierte bei den sauren Bedingungen von Wein mit Wasser und Ethanol zu den entsprechenden Addukten.

Neben der Adsorption von Metallionen hatte PVI/PVP Einfluss auf das Anthocyanprofil. Polyphenole reagierten mit der reaktiven  $\alpha$ -Dicarbonyl-Verbindung Methylglyoxal analog zur aldehydvermittelten Kondensation und bildeten einfache Addukte bis hin zu tanninähnlichen Strukturen unterschiedlicher Kettenlänge.

Die Reduzierung der Metallkonzentration in Bier hatte zusätzlich einen direkten Einfluss auf die Alterung in Form der gebildeten bzw. abgebauten Verbindungen, darunter 2-Furfural. Über den eigens dafür entwickelten Alterungsquotienten (AQ) wurde der Einfluss der etablierten Stabilisierungsmittel PVPP und Kieselgel im Vergleich zu PVI/PVP untersucht und miteinander verglichen. Es konnte bewiesen werden, dass durch die Behandlung mit PVI/PVP vorrangig metallkatalysierte radikalische und oxidative Reaktionen reduziert werden. Die Bildung aromaaktiver Alterungsverbindungen und des damit verbundenen Alterungsaromas wird verzögert. Dies trägt direkt zur Geschmacksstabilität und längeren Haltbarkeit von Bier bei.

---

## ABSTRACT

Schubert

Application of PVI/PVP in beer and wine

Polyvinylimidazole-polyvinylpyrrolidone-copolymers (PVI/PVP) are able to selectively bind transition metal ions. These polymers are aimed for the production of beer and wine, where high concentrations of metals lead to off-flavors, haze or accelerated aging.

During usage, monomers and degradation products migrate from polymer to wine. With a validated LC-MS-method, developed for the specific determination of these migrants, up to 35 mg/kg imidazole were detected from PVI/PVP. 2-Pyrrolidon, determined with up to 109 mg/kg in PVPP, is formed endogenously in wine from glutamine and glutamic acid via 4-aminobutyramide and 4-aminobutyric acid as intermediates. The postulated reaction pathway was established by incubations of single compounds and statistical analysis of 140 wine samples. *N*-vinylpyrrolidone, a monomer from the production of PVI/PVP, reacted to the respective water and ethanol adducts under acidic wine conditions (pH 3.2).

In addition to adsorption of metal ions PVI/PVP modified the anthocyanin profile of red wines. Polyphenols reacted with the  $\alpha$ -dicarbonyl compound methylglyoxal in line to the aldehyde mediated condensation, and monomeric adducts up to tannin-like structures with variable chainlength were formed.

Reduction of metal concentrations in beer had direct influence on formation and degradation of substances during beer aging, e. g. 2-furfural. The new defined aging quotient (AQ) permits the comparison of the influence of established stabilizing agents (PVPP or silica gel) and PVI/PVP. It could be proved, that treatment with PVI/PVP reduces metal catalysed radical and oxidative reactions. This decelerates formation of flavor active staling compounds and thereby the aging flavor. Thus, flavour stability and shelf life of beer will be increased.

---

**TEILE DIESER ARBEIT WURDEN BEREITS VERÖFFENTLICHT:****Veröffentlichungen**

Schubert, M., Glomb M. A.

Analysis and Chemistry of Migrants from Wine Fining Polymers

*Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2010**, 58, 8300–8304

**Tagungsvorträge**

Schubert, M.

Bestimmung und Reaktion von Imidazol, 2-Pyrrolidon, *N*-Vinylimidazol und *N*-Vinylpyrrolidon in Wein und Most

19. Arbeitstagung der Regionalverbände Nord, Nordost und Südost der Lebensmittelchemischen Gesellschaft der GDCh, 02.-03.04.2009, Berlin

(Abstract in: *Lebensmittelchemie* **2009**, 63 (6), 159)

**Posterbeiträge**

Schubert, M., Glomb M. A.

Entwicklung einer Methode zur Bestimmung von Imidazol, 2-Pyrrolidon, *N*-Vinylimidazol und *N*-Vinylpyrrolidon in Wein und Most

37. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 08.-10.09.2008, Kaiserslautern

(Abstract in: *Lebensmittelchemie* **2009**, 63 (3), 59)

Seeburg N., Schubert, M., Glomb M. A.

Isolierung und Reaktion von Anthocyanen aus Wein

38. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 14.-16.09.2009, Berlin

(Abstract in: *Lebensmittelchemie* **2010**, 64 (2), 27)

Schubert, M., Jordanland K., Glomb M. A.

Bildung tanninähnlicher Strukturen bei der Lagerung von Wein

39. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 20.-22.09.2008, Stuttgart-Hohenheim

(Abstract in: *Lebensmittelchemie* **2011**, 65 (2), 20)

## **DANKSAGUNG**

In erster Linie möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Marcus Glomb für die Überlassung des sehr interessanten Themas, die ständige Diskussionsbereitschaft und die fachliche Betreuung bedanken.

Bei Herrn Dr. Helmut Meffert sowie Herrn Dr. Nikolaj Schmid von BASF SE bedanke ich mich für die stets sehr angenehme Zusammenarbeit während des Projektes.

Mein Dank geht außerdem an meine ehemaligen Diplomanden Nicole Seeburg, Michael Stephany und Kirsten Jordanland, die sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich danke Lutz Viehweger vom Landesamt für Verbraucherschutz Sachsen-Anhalt für die Anfertigung der Schwermetall-Analysen.

Ein besonderer Dank geht auch an alle Kollgen in meinem Arbeitskreis für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die vielen anregenden Diskussionen und die schöne verbrachte Zeit außerhalb des Labors. Besonderer Dank geht an Christian Henning, der sich wenn nötig auch in seiner Freizeit die Zeit nahm und mir besonders in technischer Hinsicht sehr viel beibrachte.

Vielen Dank an meine Familie und Freunde, die mich in der zum Teil stressigen Zeit immer unterstützten und so auch ihren Teil zum Gelingen der Arbeit beitrugen.

---

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Theoretischer Teil</b> .....	<b>3</b>
2.1	Schönung und Stabilisierung .....	3
2.1.1	Die Schönung von Wein .....	3
2.1.2	Organische Schönungsmittel .....	4
2.1.3	Anorganische Schönungsmittel .....	4
2.1.4	Polymere .....	5
2.1.5	Stabilisierung von Bier .....	7
2.1.6	Migration aus Polymeren in Lebensmitteln .....	7
2.2	Polyphenole in Wein .....	10
2.2.1	Aldehyd-vermittelte Kondensationsreaktion von (+)-Catechin und Malvidin-3-O-glucosid .....	13
2.2.2	Entstehung von Methylglyoxal in Wein .....	15
2.2.3	Multilayer Countercurrent Chromatography (MLCCC).....	16
2.3	Das Aroma von Bier.....	19
2.3.1	Veränderung des Aromas während der Alterung von Bier.....	20
2.3.2	Strecker-Abbau.....	22
2.3.3	Maillard-Reaktion.....	23
2.3.4	Oxidation ungesättigter Fettsäuren.....	25
2.3.5	Abbau von Hopfenbittersäuren .....	28
2.3.6	Bildung und Abbau flüchtiger Ester .....	30
2.3.7	Solvent assisted flavor evaporation (SAFE) .....	30
<b>3</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b> .....	<b>33</b>
3.1	Entwicklung und Validierung einer Methode zur Bestimmung von Migranten aus PVI/PVP .....	33
3.2	Migration aus PVI/PVP und PVPP.....	35
3.3	Entstehung von 2-Pyrrolidon in Wein.....	36
3.3.1	Inkubation von 4-Aminobuttersäure, 4-Aminobuttersäureamid und 2-Pyrrolidon .....	37

---

3.3.2	Gehalte von 4-Aminobuttersäure, 4-Aminobuttersäureamid, 2-Pyrrolidon, Glutamin, Glutaminsäure in Wein.....	39
3.4	Reaktion von <i>N</i> -Vinylpyrrolidon in Weinsimulanzien.....	40
3.5	Einfluss von Schönungsmitteln auf das Anthocyanprofil.....	41
3.6	Reaktion ausgewählter Polyphenole während der Lagerung von Wein.....	43
3.6.1	Reaktion von (+)-Catechin und Malvidin-3- <i>O</i> -glucosid mit Methylglyoxal unter weinähnlichen Bedingungen .....	43
3.6.2	Reaktion von (+)-Catechin mit Methylglyoxal unter weinähnlichen Bedingungen .....	54
3.6.3	Vergleichende Reaktion von (+)-Catechin mit Glyoxylsäure unter weinähnlichen Bedingungen .....	62
3.7	Einfluss von Stabilisierungsmitteln auf die Alterung von Bier .....	65
3.7.1	Entwicklung einer Methode zur Aufnahme des Aromaprofils von Bier.....	65
3.7.2	Vorversuche zur Bestimmung des Einflusses von PVI/PVP auf die Alterung von Bier .....	70
3.7.3	Einfluss von Stabilisierungsmitteln auf ausgewählte Bierinhaltsstoffe .....	75
3.7.4	Einfluss von Stabilisierungsmitteln auf die Lagerstabilität von Bier .....	76
<b>4</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>83</b>
<b>5</b>	<b>Experimenteller Teil.....</b>	<b>87</b>
5.1	Chemikalien.....	87
5.2	Geräte.....	88
5.3	Bestimmung von Imidazol, 2-Pyrrolidon, <i>N</i> -Vinylimidazol, <i>N</i> -Vinylpyrrolidon, 4-Aminobuttersäure, 4-Aminobuttersäureamid, Glutaminsäure und Glutamin mittels LC-MS <sup>n</sup> .....	89
5.4	Validierung der LC-MS/MS-Methode.....	90
5.5	Weinsimulanz .....	91
5.6	Migration.....	91
5.7	Inkubation von 4-Aminobuttersäure, 4-Aminobuttersäureamid und 2-Pyrrolidon .....	92
5.8	Inkubation von <i>N</i> -Vinylpyrrolidon .....	92
5.9	Weinproben für die statistische Analyse .....	92
5.10	Multivariate Datenanalyse .....	92

---

5.11	Isolierung von Malvidin-3-O-glucosid aus Spätburgunder mittels Multilayer Countercurrent Chromatography (MLCCC).....	93
5.12	HPLC-Methode zur Bestimmung von Anthocyanen in Wein.....	94
5.13	Einfluss von Polymeren auf das Anthocyanprofil von Wein.....	95
5.14	Reaktion von (+)-Catechin, Malvidin-3-O-glucosid und Methylglyoxal.....	96
5.15	Reaktion von (+)-Catechin und Methylglyoxal .....	96
5.16	Bestimmung der Veränderung der Absorptionsmaxima .....	97
5.17	Isolierung der Addukte von (+)-Catechin und Methylglyoxal.....	97
5.18	Bierproben .....	98
5.19	Beschleunigte Alterung von Bier.....	99
5.20	Analyse der flüchtigen Verbindungen mittels Headspace.....	99
5.21	Analyse der flüchtigen Verbindungen mittels SPME.....	99
5.22	Isolierung der neutralen Aromastoffe mittels SAFE .....	99
5.23	Isolierung der sauren Aromastoffe.....	100
5.24	Bestimmung von Eisen-, Kupfer-, Mangan-, Polyphenol- und Proteinkonzentration in Bier.....	100
5.25	Messung am GC-FID.....	101
5.26	Messung am GC-MS .....	102
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>103</b>
<b>7</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>110</b>
<b>8</b>	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>114</b>
<b>9</b>	<b>Formelverzeichnis .....</b>	<b>115</b>
<b>10</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>116</b>
<b>11</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>117</b>
<b>12</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>121</b>
<b>13</b>	<b>Eigenständigkeitserklärung.....</b>	<b>122</b>

## 1 Einleitung

Bier und Wein sind untrennbar mit der Kulturgeschichte des Menschen verbunden. Bereits die Ägypter, Babylonier und Sumerer erzeugten Bier, später auch Wein. Bier und Wein waren über die Jahrtausende hinweg sowohl Nahrungsmittel als auch wichtige Flüssigkeitsquelle, unverzichtbar wegen der oftmals unsaubereren Wasservorräte. Bis heute sind Bier und Wein äußerst beliebte Getränke.

Die Grundprinzipien des Bierbrauens und Weinkelterns sind seit mehreren hundert Jahren weitgehend unverändert geblieben. Die sich an den Herstellungsprozess anschließende Behandlung jedoch befindet sich in ständiger Weiterentwicklung. Unbehandelte Produkte sind nicht lange haltbar oder weisen nach kurzer Zeit Verfärbungen, Trübungen oder Fehlgeschmäcker auf. Die moderne Massenproduktion und die zunehmende Globalisierung erfordern jedoch eine längere Lagerdauer von Bier und Wein und eine gleichbleibende Qualität, also einheitliche Produkte. Um dies zu erreichen, werden Wein und Bier heute vor der Abfüllung geschönt.

Neben den traditionell eingesetzten anorganischen und organischen Schönungs- und Stabilisierungsmitteln wurden in neuerer Zeit verschiedene Polymere entwickelt, die industriell weniger gut einsetzbare Mittel ersetzen sollen und/oder neue Eigenschaften aufweisen. Diese Polymere beeinflussen nicht nur die Zusammensetzung der Getränke, sondern haben auch weit reichende Auswirkungen auf die Veränderungen, welche während der Aufbewahrung und Alterung bzw. Reifung von Bier und Wein stattfinden. Eines dieser neu entwickelten Schönungs- bzw. Stabilisierungsmittel ist Polyvinylimidazol-Polyvinylpyrrolidon-Copolymer (PVI/PVP), dessen Einfluss auf Wein und Bier Gegenstand dieser Arbeit ist.

In unbehandeltem Bier und Wein laufen Reaktionen ab, welche eine kontinuierliche Umwandlung der in frischem Wein oder Bier vorkommenden Inhaltsstoffe bewirken: Farbe, aber auch Aroma verändern sich mit der Zeit immer stärker, störende Niederschläge treten auf. Die Behandlung mit polymeren Stabilisierungsmitteln kann die Bildung unerwünschter Substanzen wirkungsvoll verringern oder sogar ganz verhindern.

Bei der Zugabe solcher Stoffe muss jedoch beachtet werden, dass die künstlich hergestellten Polymere ihrerseits Stoffe an die Biere und Weine abgeben können,

in denen sie verwendet werden. Daher sind Kenntnisse darüber wichtig, welche Verbindungen aus dem Stabilisierungsmittel in das Bier/den Wein übergehen und ob es sich dabei um Mengen handelt, die auf den Menschen schädliche Auswirkungen haben können. Solche Kenntnisse sind Voraussetzung für die Entscheidung, ob und wie derartige Schönungs- und Stabilisierungsmittel eingesetzt werden können.

## 2 Theoretischer Teil

### 2.1 Schönung und Stabilisierung

#### 2.1.1 Die Schönung von Wein

Die Schönung von Wein ist heute ein wichtiger Schritt bei der Herstellung, um dem Verbraucher über eine möglichst lange Zeit eine gleichbleibende Qualität garantieren zu können. Dazu werden Schönungsmittel entweder behandelnd, um beispielsweise Weinfehler zu reduzieren, oder vorbeugend gegen spätere Trübungen eingesetzt. Diese Trübungen werden durch die Reaktion von Polysacchariden, Proteinen und/oder Tanninen verursacht. Sie bilden zum Teil schon während der Herstellung oder nach kurzer Zeit schwer- bis unlösliche Verbindungen und damit einen störenden Niederschlag. [Harbertson 2009]

Fehlaromen sind im Gegensatz dazu meist schon während der Herstellung vorhanden. Eine zu große Konzentration an Schwefelwasserstoff verursacht einen Gestank nach faulen Eiern, während hohe Mengen an Tanninen oder (+)-Catechinen adstringierend oder bitter schmecken. Auch kann es zu Verfärbungen des Produktes kommen. Die häufigsten Probleme und die zu ihrer Beseitigung eingesetzten Schönungsmittel sind in Tab. 1 zusammengefasst aufgeführt.

**Tab. 1:** Probleme bei der Wein-Herstellung, die durch Schönung beseitigt werden können  
[Harbertson 2009]

<b>Problem</b>	<b>Auswirkungen</b>	<b>Schönungsmittel</b>
H <sub>2</sub> S, Thiole	Fehlaromen (faule Eier, stehendes Wasser, Zwiebeln)	Kupfersulfat (CuSO <sub>4</sub> )
Polysaccharide	Trübung (gallertartige Masse)	enzymatische Behandlung
Proteine	Trübung (grau-weiße Flocken)	Bentonit
Tannine (übermäßig)	adstringierend	Protein
Catechine	bitter	PVPP
Bräunung, Fehlaroma	Fehlfarbe und Fehlaroma	Aktivkohle, PVPP

Die verwendeten Mittel können auch selbst negative Auswirkungen auf das behandelte Lebensmittel haben. So können bei Überdosierung Farb- und Aromaveränderungen auftreten; das Lebensmittel kann vollkommen ungenießbar werden. [Scholten 2001]

---

Schönungsmittel lassen sich grob in organische, anorganische und künstliche Verbindungen unterteilen. Sie sollen im Folgenden genauer besprochen werden.

### **2.1.2 Organische Schönungsmittel**

Bei organischen Schönungsmitteln handelt es sich um verschiedene Arten von Proteinen. Bei der Herstellung von Wein werden neben Gelatine auch die zermahlene Schwimmblase des Störs (Hausenblase), Blutproteine, Eiweiß, Kaseine und Gluten eingesetzt. [Arvanitoyannis 1991] Die Proteine binden dabei vor allem höher molekulare Tannine, welche vorrangig für die Adstringenz verantwortlich sind und diese damit reduzieren. Sie fallen mit den Proteinen aus und können dann abfiltriert werden.

Zum Abbau von Polysacchariden, welche vorrangig aus den Zellwänden stammen, werden hingegen Enzyme eingesetzt. Um möglichst viele unterschiedliche Polysaccharide gleichzeitig abbauen zu können, wird häufig ein Gemisch aus verschiedenen Enzymen eingesetzt. Dieses besteht aus Cellulasen, Hemi-Cellulasen, Proteasen, Pectinasen und/oder  $\beta$ -Glucosidasen. Der Nachteil von zum Beispiel  $\beta$ -Glucosidasen ist jedoch, dass sie auch die glycosidischen Bindungen der Anthocyane spalten können und diese damit destabilisieren. [Harbertson 2009]

### **2.1.3 Anorganische Schönungsmittel**

Zu den anorganischen Schönungsmitteln gehören neben reinen Filterhilfsmitteln wie Kieselgur auch proteinbindende Substanzen wie Kieselgel oder Bentonit und anorganische Salze, welche Metalle oder unerwünschte Schwefelverbindungen entfernen.

Kieselgel und Bentonit werden für die Entfernung von Proteinen aus Wein eingesetzt, welche während der Aufbewahrung unter anderem mit Polyphenolen reagieren und zu Trübungen führen. Solche Ausfällungen sind auch bei Schwermetallen wie Kupfer oder Eisen möglich, welche mit Polyphenolen unlösliche Komplexe, den so genannten „Schwarzen Bruch“ bilden. Um dies zu

verhindern, müssen die Konzentrationen an Eisen unter 3 mg/l und an Kupfer unter 0,5 mg/l liegen. [Fussnegger 1992] Die traditionelle Variante zur Reduzierung der meist durch Pflanzenschutzmittel eingetragenen Kupfergehalte ist die Blauschönung. [Würdig 1989] Dazu wird der Wein mit einer genau berechneten Menge Kaliumhexacyanoferrat(II) versetzt, welches vorhandenes Kupfer, aber auch Eisen als unlösliches Berliner Blau entfernt. Bentonite und Proteine binden ebenfalls Metalle, können jedoch auch Metalle wie Calcium oder Zink in das Lebensmittel eintragen. [Arvanitoyannis 1991, Soulis 1989]

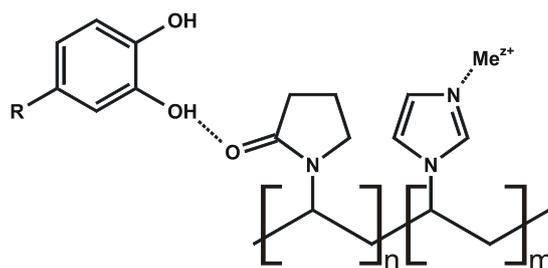
Während der Fermentation der Weintrauben entsteht durch den Abbau von schwefelhaltigen Aminosäuren und die Reduktion von Sulfat oder Sulfit nach faulen Eiern riechender Schwefelwasserstoff ( $H_2S$ ). Dieser kann in höheren Konzentrationen ein Fehlaroma im Wein verursachen. Zur Entfernung können dem Wein kleine Mengen Kupfersulfat (max. 0,5 mg/l) zugegeben werden, der überschüssiges  $H_2S$  als Kupfersulfid ausfällt. Das so eingebrachte Kupfer kann sich aber negativ auf die Trubstabilität auswirken und muss wiederum entfernt werden. Andere schwefelhaltige Verbindungen (Methan-/Ethanthiol), die häufig ebenfalls schon in geringen Konzentrationen Fehlaromen verursachen, können mit Kupfer äquivalent entfernt werden. [Harbertson 2009]

#### **2.1.4 Polymere**

Zusätzlich zu den oben genannten Schönungsmitteln werden in neuerer Zeit Polymere zur Schönung von Wein eingesetzt. Gebräuchlich ist vor allem Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP). Es ist in der Lage, ebenso wie die zur Schönung eingesetzten Proteine, unerwünschte Tannine und andere Polyphenole zu binden, welche dann zusammen mit dem Polymer abgetrennt werden können. Die wertgebenden Bestandteile wie Aromastoffe und Farbe werden dabei nur unwesentlich beeinflusst. [Gorinstein 1990, Mitchell 2005]

Bisher noch nicht auf dem Markt frei erhältlich sind Polyvinylimidazol-Polyvinylpyrrolidon-Copolymere (PVI/PVP) (siehe Abb. 1). PVI/PVP wurde in den 1990-er Jahren von der Firma BASF SE entwickelt. Es besteht aus *N*-Vinylimidazol und *N*-Vinylpyrrolidon im Verhältnis 9:1 und bindet über den elektronen-

reichen Imidazol-Ring selektiv Schwermetalle. [Fussnegger 1992, Mira 2007] Dieses neuartige Polymer ist zugleich durch die enthaltenen *N*-Vinylpyrrolidon-Gruppen ebenso wie PVPP in der Lage, Tannine zu entfernen. Zusätzlich zu Schwermetallen bindet PVI/PVP über den Imidazol-Ring in geringem Maße auch andere polare Weinhaltstoffe wie Säuren oder Zucker. Dadurch verändert sich unter anderem der pH-Wert des Lebensmittels. [Eder 2001, Eder 2003, Mattivi 2000, Nicolini 2004, Scholten 2001]



**Abb. 1:** Bindung von Polyphenolen und Metallen an PVI/PVP ( $n = 1$ ,  $m = 9$ )

PVI/PVP soll die bisher gebräuchliche Blauschönung des Weines ersetzen, die eine Reihe Nachteile besitzt. So muss bei der Blauschönung der genaue Bedarf an Kaliumhexacyanoferrat(II) vorher in Tests von einer speziell ausgebildeten Person bestimmt werden. Eine Überschönung würde zu freien Cyanoverbindungen im Wein führen, was die Ungenießbarkeit und ein Verkaufsverbot zur Folge hätte. Der wichtigste Nachteil der Blauschönung besteht jedoch darin, dass Weine, die einen hohen Kupfer-, jedoch niedrigen Eisengehalt besitzen, nur schwer behandelt werden können. Bei der Verwendung von kupferhaltigen Spritzmitteln und gleichzeitig von Stahltanks bei der späteren Weinherstellung ist dies ein häufig auftretendes Problem. Während die Konzentration an Kupfer im Wein steigt, bleibt der Eisengehalt durch die inerten Stahltanks sehr gering. Für die erfolgreiche Verringerung der Kupferkonzentration ist jedoch eine bestimmte Konzentration an Eisen notwendig. Diese kann nur durch die direkte Zugabe von Eisen, welche aber nicht zulässig ist, oder durch den Verschnitt mit einem eisenreichen Wein erreicht werden. [Eder 2001] Hier stellt PVI/PVP eine Alternative dar.

Das Polymer kann darüber hinaus bei Lebensmitteln Anwendung finden, bei denen enthaltene Metalle zu Fehlgerüchen führen (Trinkwasser) oder unerwünschte Reaktionen begünstigen können (z. B. Bier). [Zufall 2008]

### **2.1.5 Stabilisierung von Bier**

Auch in Bier können hohe Protein-Konzentrationen im Zuge der späteren Aufbewahrung beim Kunden zu Trübungen führen. Zudem stellen, ähnlich wie bei Wein, Polyphenole und hohe Konzentrationen an Übergangsmetallen ein Qualitätsproblem dar. Es kann zu Fehlparomen, Trübungen oder der verstärkten Bildung von Alterungsverbindungen kommen. Um dieser Problematik entgegen zu wirken, werden einige der oben genannten Substanzen zur Stabilisierung in Bier eingesetzt. Neben Kieselgur als Filtrationshilfsmittel wird Kieselgel analog zu Wein zur Entfernung von Proteinen und PVPP zur Verringerung der Polyphenolkonzentration angewendet. Zur Reduzierung der Metallkonzentrationen kann eine Behandlung mit PVI/PVP erfolgen.

### **2.1.6 Migration aus Polymeren in Lebensmitteln**

Polymere finden in der Lebensmittelherstellung und besonders bei der Verpackung von Lebensmitteln vielseitige Anwendung. Hier ersetzen sie immer häufiger „traditionelle“ Materialien wie Papier, Karton, Metall oder Glas.

Polymere besitzen jedoch den Nachteil, dass bestimmte Inhaltsstoffe, wie z. B. Weichmacher oder Restmonomere, in das Lebensmittel übergehen können. [Arvanitoyannis 2004] Beim Verzehr des Lebensmittels werden die Verbindungen vom Menschen aufgenommen und können unter Umständen negative Auswirkungen auf die Gesundheit haben. Die regelmäßige Anwendung dieser Polymere in Industrie und Haushalt bedingt daher die genaue Untersuchung, Bestimmung und Regulierung der potenziellen Migranten.

Die Untersuchung auf potenzielle Migranten erfolgt nach EU-standardisierten Verfahren. Das zu untersuchende Polymer wird dazu mit einem Lebensmittelsimulanz in Verbindung gebracht, für eine bestimmte Zeit in Kontakt belassen und anschließend mittels Gas- oder Flüssigchromatographie auf mögliche Migranten untersucht. Die Wahl des Lebensmittelsimulanz richtet sich dabei nach dem Lebensmittel, welchem das Polymer in seinem normalen Einsatzzweck ausgesetzt ist. Für die Schönung bzw. Stabilisierung verwendetes PVPP bzw. PVI/PVP kann, da es in Wein, Saft und Bier eingesetzt wird, mit sauren und auch sauer-

alkoholischen Lösungen in Kontakt kommen. Das genau zu verwendende Simulanzlösemittel kann der EU-Richtlinie 97/48/EG entnommen werden. In dieser Richtlinie sind auch die Dauer und die Temperatur, bei der die Migration stattfinden muss, aufgeführt (siehe Tab. 2 und Tab. 3).

**Tab. 2:** Lebensmittelkategorien und Simulanzlösemittel laut [EU 1997]

<b>Lebensmittelkategorie</b>	<b>Simulanzlösemittel</b>
wässrige Lebensmittel (pH > 4,5)	destilliertes Wasser oder Wasser von gleicher Qualität
saure Lebensmittel (wässrige Lebensmittel mit einem pH-Wert < 4,5)	3 %ige Essigsäure (G/V)
alkoholische Lebensmittel	10 %iges Ethanol (V/V) Diese Konzentration ist dem Alkoholgehalt des jeweiligen Lebensmittels anzupassen, wenn dieser 10 % überschreitet (V/V).
fetthaltige Lebensmittel	rektifiziertes Olivenöl oder andere fetthaltige Lösemittel
trockene Lebensmittel	keines

**Tab. 3:** Bedingungen für Migrationsprüfungen mit Simulanzlösemitteln [EU 1997]

<b>Kontaktbedingungen bei der ungünstigsten vorhersehbaren Verwendung</b>	<b>Prüfbedingungen</b>
<b>Kontaktzeit</b>	<b>Prüfzeit</b>
t ≤ 5 Minuten	< 0,5 Stunden, entsprechend Kontaktzeit
5 Minuten < t ≤ 0,5 Stunden	0,5 Stunden
0,5 Stunden < t ≤ 1 Stunde	1 Stunde
1 Stunden < t ≤ 2 Stunden	2 Stunden
2 Stunden < t ≤ 4 Stunden	4 Stunden
4 Stunden < t ≤ 24 Stunden	24 Stunden
t > 24 Stunden	10 Tage
<b>Kontakttemperatur</b>	<b>Prüftemperatur</b>
T ≤ 5 °C	5 °C
5 °C < T ≤ 20 °C	20 °C
20 °C < T ≤ 40 °C	40 °C
40 °C < T ≤ 70 °C	70 °C
70 °C < T ≤ 100 °C	100 °C oder Rückflusstemperatur
100 °C < T ≤ 121 °C	121 °C
121 °C < T ≤ 130 °C	130 °C
130 °C < T ≤ 150 °C	150 °C
T > 150 °C	175 °C

Die Richtlinie legt z. B. für PVPP, welches bei der Herstellung von Wein oder Bier bei einer Temperatur unter 5 °C und für maximal 30 Minuten verwendet wird, fest, dass die Migration bei 5 °C für 30 Minuten in den Simulanzlösemitteln ‚3 %ige Essigsäure‘ sowie ‚10 %iges Ethanol‘ durchzuführen ist.

Die Migration selbst ist ein Diffusionsprozess und kann in einem durchmischten Medium durch das 1. Fick'sche Gesetz beschrieben werden:

$$\frac{dn}{dt} = -D \cdot A \cdot \frac{dc}{dx}$$

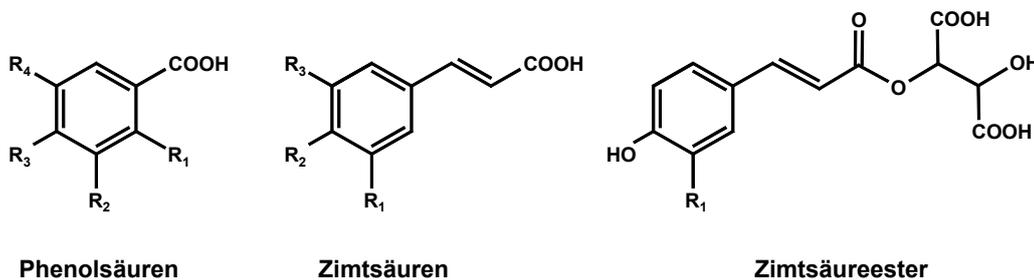
**Formel 1:** 1. Fick'sches Gesetz

Die Menge an diffundierenden Teilchen je Zeiteinheit ( $dn/dt$ ) ergibt sich in einer durchmischten Lösung aus dem mediumspezifischen Diffusionskoeffizienten ( $D$ ), der Oberfläche des Polymers ( $A$ ) sowie dem Konzentrationsgefälle an der Oberfläche ( $dc/dx$ ). Je größer also die Oberfläche des Polymers ist, desto schneller migrieren die Verbindungen aus dem Kunststoff in das Lebensmittel. Die Dauer der Anwendung wird daher aufgrund der großen Oberfläche von PVI/PVP und PVPP nur eine geringe Rolle spielen. [Arvanitoyannis 2004]

## 2.2 Polyphenole in Wein

Phenolische Verbindungen gehören zu den wichtigsten Verbindungen in Rotwein. Sie sind für Farbe, Adstringens sowie Bitterkeit verantwortlich und beeinflussen das Aroma. Ihre antioxidativen und anti-inflammatorischen Eigenschaften führen außerdem zu einer Verringerung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Eine anti-karzinogene Wirkung von phenolischen Weininhaltsstoffen konnte ebenfalls nachgewiesen werden. [Frankel 1993, Stoclet 1999]

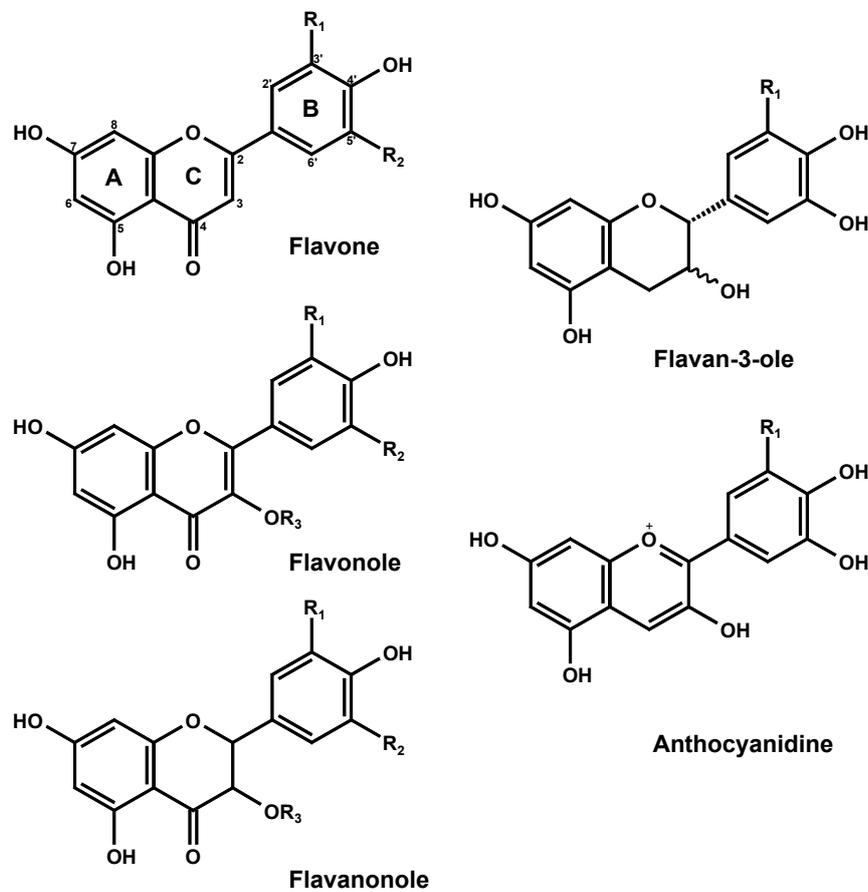
Die phenolischen Inhaltsstoffe in Wein können in die beiden Hauptklassen der flavonoiden und nicht-flavonoiden Verbindungen eingeteilt werden. Die nicht-flavonoide Klasse besteht hauptsächlich aus Phenolsäuren und Stilbenen. Die Phenolsäuren sind Benzoesäurederivate (z. B. Salicylsäure, Gallussäure), Hydroxyzimtsäuren (Kaffeensäure, Ferulasäure) oder deren Ester (Caftar säure, Cutarsäure) (Abb. 2). Die Stilbene werden von der Pflanze zur Abwehr von Mikroorganismen und Pilzen gebildet. [Korhammer 1995] Dazu gehören zum Beispiel *trans*-Resveratrol und *trans*-Viniferin.



**Abb. 2:** Struktur nicht-flavonoider Polyphenole

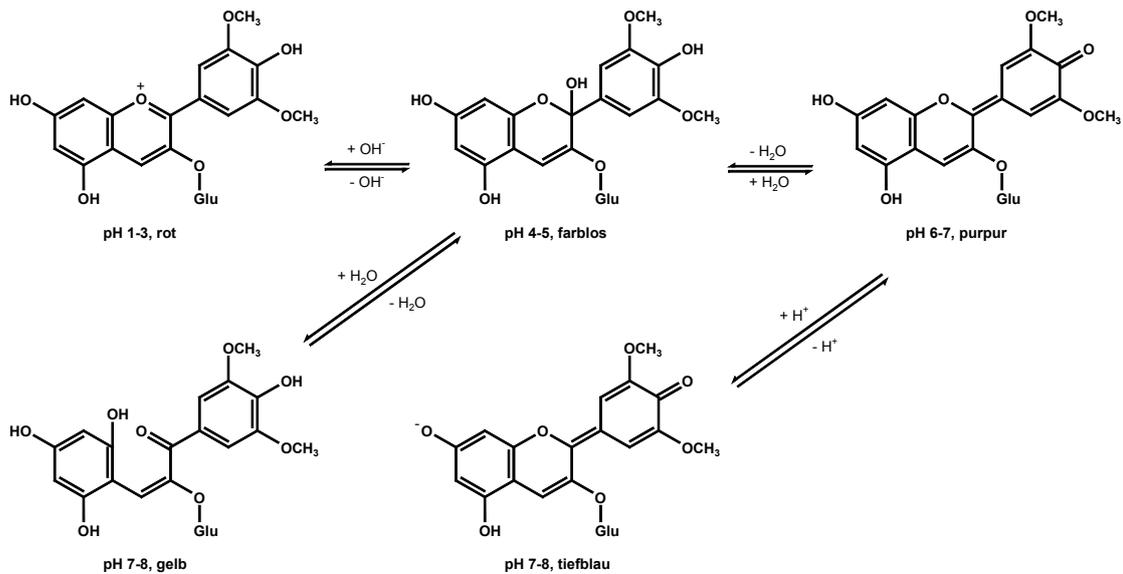
Die flavonoiden Verbindungen lassen sich in Flavone, Flavonole, Flavanonole, Flavan-3-ole und Anthocyanidine einteilen (Abb. 3). Sie besitzen einen aromatischen A- und B-Ring, wobei die Anzahl der OH- bzw. Methoxy-Gruppen am B-Ring variiert. Je nach Sättigungsgrad und dem Vorkommen einer Keto- bzw. OH-Funktion im C-Ring handelt es sich um die unterschiedlichen Substanzklassen. Flavone besitzen dabei eine Keto-Funktion an C<sub>4</sub> sowie eine zusätzliche Doppelbindung zwischen C<sub>2</sub> und C<sub>3</sub>. Die Flavonole haben zusätzlich an C<sub>3</sub> eine OH-Funktion. Flavanonole besitzen Keto- und OH-Funktion, jedoch nicht die Doppelbindung zwischen C<sub>2</sub> und C<sub>3</sub>, Flavan-3-ole nur die OH-Funktion an C<sub>3</sub>. Anthocyanidine sind strukturell ähnlich zu den Flavan-3-olen, wobei der C-Ring

maximal ungesättigt ist. Natürlich vorkommende Polyphenole sind häufig mit der OH-Funktion an C<sub>3</sub> an Zucker gebunden. [Monagas 2005]



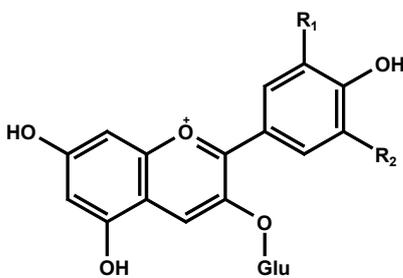
**Abb. 3:** Struktur flavonoider Polyphenole

Durch die vollständig durchkonjugierte Struktur sind Anthocyanidine stark farbig und damit unter anderem für die Farbe von Rotwein verantwortlich. Je nach pH-Wert der Lösung verändert sich die Farbe zwischen tiefrot über farblos zu blau (siehe Abb. 4). [Belitz 2001] Bei einem pH-Wert von 3,0-3,5 liegen in Wein hauptsächlich die rote Flavylumform sowie die farblose Halbacetalform vor. Diese stehen dann auch für Reaktionen mit anderen Weininhaltsstoffen wie Aldehyden zur Verfügung.



**Abb. 4:** pH-Abhängigkeit von Anthocyanen am Beispiel von Malvidin-3-O-glucosid

Die verschiedenen Anthocyanidine unterscheiden sich in der Anzahl der OH- bzw. Methoxy-Gruppen am B-Ring. In der Natur kommen sie fast ausschließlich glycosidisch gebunden als so genannte Anthocyane vor. Der Zucker ist dabei an C<sub>3</sub> gebunden. Diglycoside sind ebenfalls möglich, wobei das zweite Zuckermolekül an C<sub>5</sub> gebunden ist. Die Zucker selbst können zusätzlich an C<sub>6</sub> mit Essigsäure, Coumarsäure oder Caffeensäure verestert sein (siehe Abb. 5). [Monagas 2005]



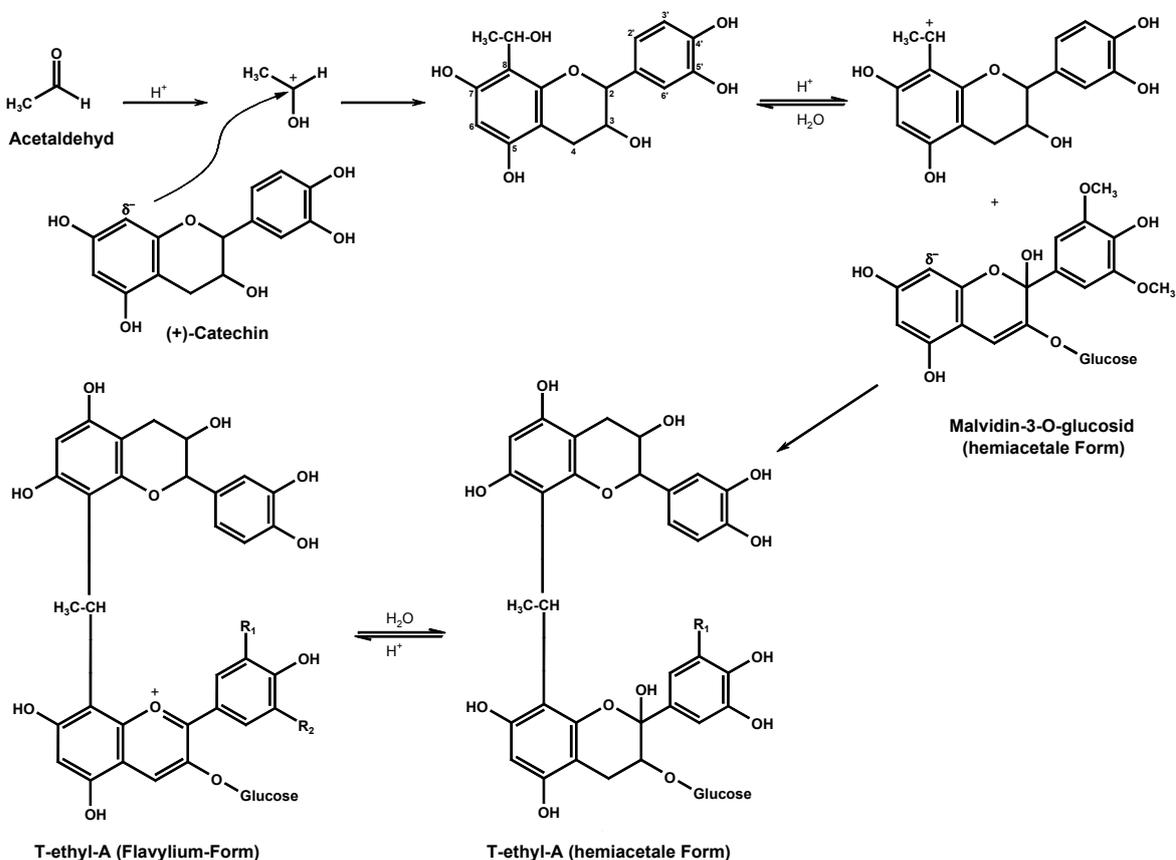
Anthocyan	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Farbe
Cyanidin-3-O-glu	OH	H	orange-rot
Delphinidin-3-O-glu	OH	OH	violett
Peonidin-3-O-glu	OCH <sub>3</sub>	H	orange-rot
Petunidin-3-O-glu	OCH <sub>3</sub>	OH	violett
Malvidin-3-O-glu	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	violett
Pelargonidin-3-O-glu	H	H	orange-rot

**Abb. 5:** Struktur verschiedener Anthocyane

## 2.2.1 Aldehyd-vermittelte Kondensationsreaktion von (+)-Catechin und Malvidin-3-O-glucosid

Während der Lagerung und Alterung des Weines gehen die verschiedenen Inhaltsstoffe eine Vielzahl von Reaktionen ein. So reagieren die bei jungen Weinen hauptsächlich vorkommenden monomeren phenolischen Verbindungen zu polymeren tannin-ähnlichen Strukturen. Das führt unter anderem zu einer Veränderung der Farbe, aber auch von Geschmack und Adstringens. Während monomere Anthocyane eine leuchtend rote Farbe und geringe Adstringens besitzen, bilden sich durch verschiedene Reaktionsmechanismen die polymeren Verbindungen, die violett bis blau sind und stärker adstringierend wirken. [Monagas 2005]

Eine wichtige Reaktion, welche in Wein zu polymeren Polyphenolen führt, ist die Aldehyd-vermittelte Kondensationsreaktion von Flavan-3-olen mit anderen Flavan-3-olen und/oder Anthocyanen. [Timberlake 1976] Beispielhaft ist in Abb. 6 die Acetaldehyd-vermittelte Reaktion von (+)-Catechin mit einem Molekül Malvidin-3-O-glucosid dargestellt.

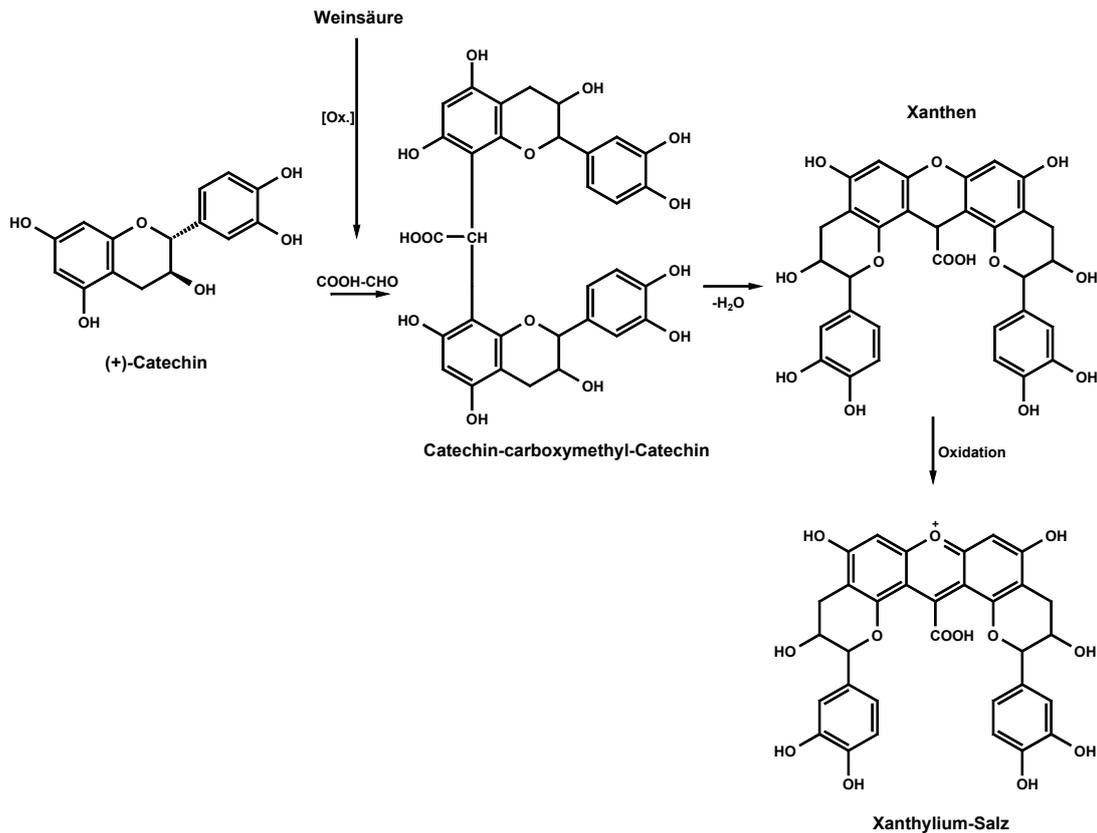


**Abb. 6:** Acetaldehyd-vermittelte Kondensation von (+)-Catechin und Malvidin-3-O-glucosid

---

Zuerst bildet sich durch Protonierung des Acetaldehyds ein Carbokation. Dieses kann durch (+)-Catechin nucleophil angegriffen werden. Dafür kommen die beiden elektronenreichen Positionen C<sub>6</sub> und C<sub>8</sub> infrage. Es resultiert ein Acetaldehyd-(+)-Catechin-Addukt. Dies kann nun äquivalent zum ersten Schritt weiterreagieren. Es bildet sich wiederum das Carbokation, welches dann nucleophil von einem weiteren (+)-Catechin-Molekül angegriffen wird. Es resultiert ein (+)-Catechin-ethyl-Catechin-Dimer, welches über die C<sub>8</sub>-Kohlenstoffatome beider Moleküle verknüpft ist. Eine 6-8-Verknüpfung ist ebenso möglich wie eine 6-6-Verknüpfung. Durch die noch freien Positionen an C<sub>6</sub> bzw. C<sub>8</sub> kann es zu einer weiteren Reaktion mit Aldehyden und Flavan-3-olen zu beispielsweise Trimeren und Tetrameren bis hin zu Hexameren kommen. Die Reaktion von Anthocyanen mit Flavanolen bzw. von zwei Anthocyanmolekülen verläuft äquivalent. [Es-Safi 1999a, Fulcrand 1996, Saucier 1997b, Saucier 1997a, Timberlake 1976] Weitere wichtige Aldehyde für diese Reaktion sind Isovaleraldehyd, Benzaldehyd, Propionaldehyd, Isobutyraldehyd, Formaldehyd und 2-Methylbutyraldehyd. [Pissarra 2003]

Eine zweite ähnliche Reaktion findet mit Glyoxylsäure statt. Diese wird im Wein durch Oxidation aus Weinsäure gebildet und reagiert dann analog dem Acetaldehyd (siehe Abb. 7).

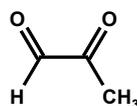


**Abb. 7:** Bildung des Xanthylum-Salzes aus (+)-Catechin und Weinsäure

(+)-Catechin reagiert mit Glyoxylsäure zum (+)-Catechin-carboxymethyl-(+)-Catechin-Dimer. Unter Wasserabspaltung reagieren nun die OH-Gruppen an C<sub>7</sub> und bilden ein Xanthen, welches unter Oxidation zum gelben Xanthylum-Salz weiterreagiert. [Fulcrand 1997, Oszmianski 1996]

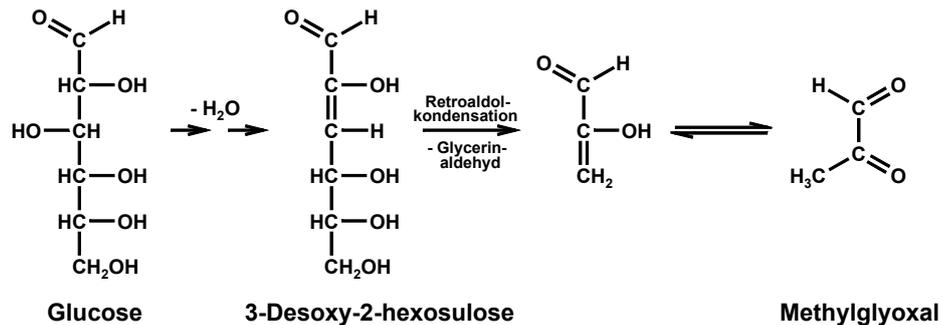
### 2.2.2 Entstehung von Methylglyoxal in Wein

Methylglyoxal (Abb. 8) ist eine sehr reaktive Verbindung, die im Wein in Konzentrationen zwischen 0,1 und 1 mg/l vorkommt. [De Revel 2000] Sie stellt mit den vorhandenen Carbonylfunktionen für die Aldehyd-vermittelte Kondensation einen potenziellen Reaktionspartner dar.



**Abb. 8:** Struktur von Methylglyoxal

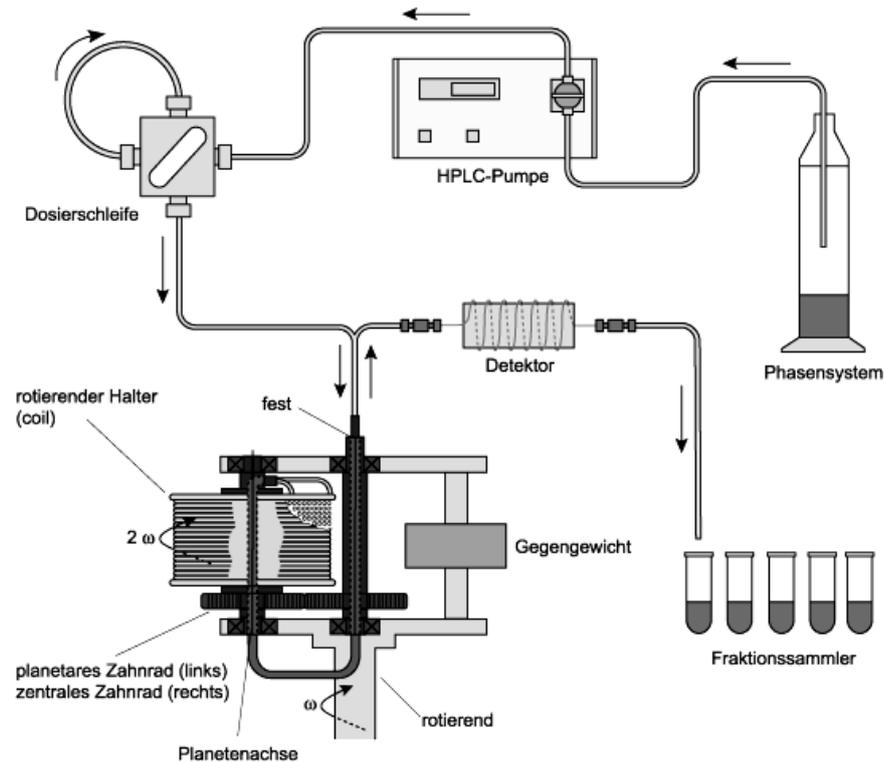
Es gibt zahlreiche Wege, auf denen diese Substanz in Wein gebildet wird. Eine Quelle sind Hefen und Milchsäurebakterien, die Methylglyoxal während der alkoholischen bzw. malolaktischen Gärung produzieren. Während der Glycolyse wird Methylglyoxal aus Triosephosphaten durch Abspaltung eines Phosphatrestes gebildet. Zusätzlich entstehen nennenswerte Mengen im Zuge der Maillard-Reaktion (Abb. 9). [Nemet 2006, Thornalley 1999]



**Abb. 9:** Bildung von Methylglyoxal aus Glucose während der Maillard-Reaktion [Thornalley 1999]

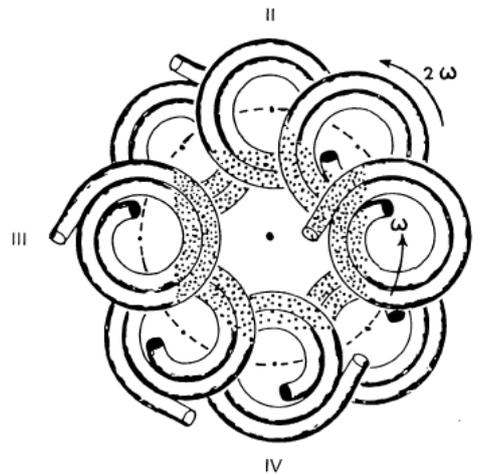
### 2.2.3 Multilayer Countercurrent Chromatography (MLCCC)

Eine einfache und schnelle Methode zur Isolierung von Polyphenolen aus beispielsweise Wein stellt die Multilayer Countercurrent Chromatography dar. Es handelt sich um eine Gegenstrom-Chromatographie, die zur Trennung der verschiedenen Analyten deren unterschiedliche Verteilungskoeffizienten zwischen zwei nicht mischbaren flüssigen Phasen nutzt. In Abb. 10 wird der schematische Aufbau einer solchen MLCCC-Anlage gezeigt.



**Abb. 10:** Schematischer Aufbau einer MLCCC

Zur Trennung wird der „coil“ (spulenartig gewickelter Teflonschlauch) mit der organischen, stationären Phase gefüllt. Anschließend wird das System in Rotation gebracht, wobei sich der „coil“ auf einer planetenähnlichen Kreisbahn um die Zentralachse bewegt. Durch das System wird nun die wässrige, mobile Phase gepumpt, wodurch ein Teil der stationären Phase aus dem „coil“ verdrängt wird. Es stellt sich ein Gleichgewicht beider Phasen ein. Im Teflonschlauch gibt es Bereiche, in denen es durch die Aufhebung der Rotationskräfte (in der Nähe der Zentralachse) zu einer Mischung beider Phasen kommt. Auf der äußeren Seite kommt es hingegen zu Entmischungen beider Phasen (Abb. 11). Dieser ständige Wechsel beider Zustände ermöglicht die Trennung aufgrund des Verteilungskoeffizienten. Die mobile Phase mit den getrennten Analyten kann mittels Fraktionssammler aufgefangen und weiter aufgearbeitet werden.



**Abb. 11:** Planetenbewegung der MLCCC-Spule und Ausbildung der verschiedenen Mischungszone

Der Vorteil dieser Trennmethode ist, dass es gegenüber herkömmlichen Trennverfahren, wie beispielsweise der präparativen HPLC, keine feste stationäre Phase gibt, an der es zu irreversiblen Absorptionen von Analyten kommen kann. Die stationäre Phase der MLCCC kann aus dem System ausgeblasen werden und steht damit verlustfrei zur Gewinnung weiterer Substanzen bereit. Zudem ist es möglich, vergleichsweise sehr große Probemengen in nur einem Durchlauf zu trennen. [Ito 1986]

## 2.3 Das Aroma von Bier

Erst das Zusammenwirken einer Vielzahl von Verbindungen ergibt das typische Aroma eines Lebensmittels. Viele dieser Verbindungen sind nur in sehr geringen Konzentrationen enthalten, beeinflussen das Gesamtaroma aber beträchtlich. Ab welcher Menge eine Substanz vom Menschen wahrgenommen werden kann, hängt von ihrer Schwellenkonzentration ab, der Konzentration, bei der die Verbindung gerade noch wahrnehmbar ist. Die Schwellenkonzentration wird von Temperatur, pH-Wert und Matrix beeinflusst. Durch Synergieeffekte mit anderen aromaaktiven Verbindungen kann es zu einem Absinken der Schwellenkonzentration oder auch zu ganz anderen Aromanoten kommen.

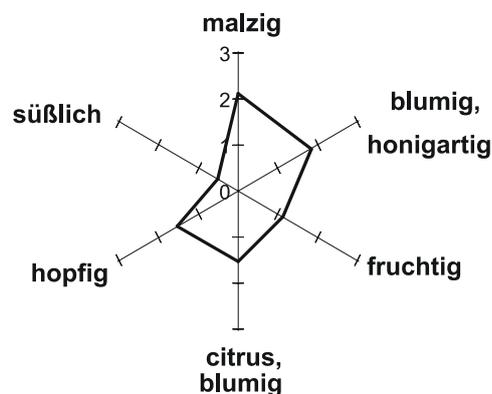
Inwieweit eine Verbindung am Gesamtaroma eines Lebensmittels beteiligt ist, kann mit dem Aromawert  $A_x$  beschrieben werden:

$$A_x = \frac{c_x}{a_x}$$

$c_x$     Konzentration der Verbindung im Lebensmittel  
 $a_x$     Geruchsschwelle der Verbindung

Erst ab einem Aromawert größer 1, also wenn die Konzentration der Verbindung deren Geruchsschwelle übersteigt, ist die betreffende Substanz am Gesamtaroma des Lebensmittels beteiligt. [Belitz 2001]

Das Aroma von Bier wird in verschiedenen Noten beschrieben. Es gibt fruchtige, malzige, hopfige, aber auch blumige Aromanoten (siehe Abb. 12).



**Abb. 12:** Aromaprofil eines frischen Pilsener Bieres [Fritsch 2005]

Diese verschiedenen Aromen kommen durch unterschiedliche Substanzklassen zustande. „Fruchtig“ ist beispielsweise auf Ester wie Buttersäure- oder Hexansäureethylester zurückzuführen, die während der Fermentation von Hefen gebildet werden. (R)-Linalool, welches aus dem Hopfen stammt, hat dahingegen ein blumig-zitrusartiges Aroma. „Malzig“ wird durch Alkohole und Aldehyde wie 2-Methylpropanol und 3-Methylbutanal verursacht. [Fritsch 2005]

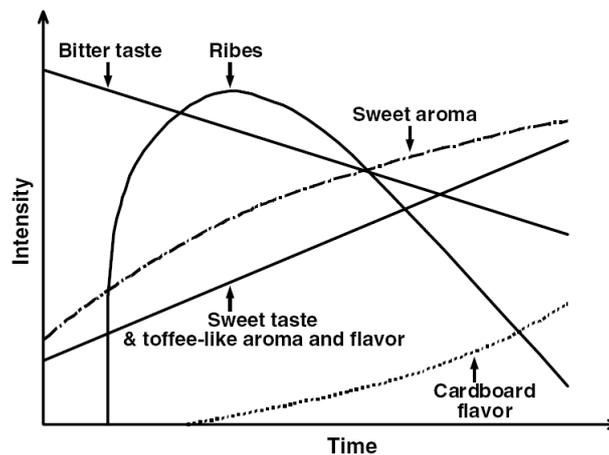
Das Gesamtaroma wird von vielen Faktoren während der Herstellung, aber auch durch die verwendeten Rohstoffe beeinflusst. So führen unter anderem unterschiedliche Hopfensorten und Zuchthefen zu für jede Biersorte einzigartigen Aromaprofilen. [Chen 2010, Kishimoto 2006] Diese müssen vom Hersteller bzw. Braumeister bei jedem neuen Brauvorgang möglichst genau nachgebildet werden, da der Kunde ein immer gleichbleibendes Produkt mit dem jeweils speziellen Geschmack erwartet.

### **2.3.1 Veränderung des Aromas während der Alterung von Bier**

Während der Aufbewahrung nach der Abfüllung und damit auch der Alterung des Bieres verändert sich dessen Aroma stetig. Dies stellt das Hauptqualitätsproblem bei Bier dar, da die entstehenden Alterungsaromen, im Gegensatz zu Wein, vom Verbraucher häufig als negativ bewertet werden. Es entstehen so genannte „off-flavor“, deutlich wahrnehmbare Fehlgerüche, die Bier je nach Intensität ungenießbar machen können.

Die Kontrolle und Verzögerung der Alterung ist sehr schwierig, da dabei viele unterschiedliche Substanzen zusammenwirken, von denen nur ein Teil bekannt ist. Zusätzlich wird die Geschwindigkeit der Alterung durch Temperatur, pH-Wert und auch Lichtintensität beeinflusst. [Kaneda 1997, Vanderhaegen 2005b]

Die Veränderung des Aromas von Bier während der Alterung zeigt die folgende Abb. 13 schematisch.



**Abb. 13:** Sensorische Veränderungen während der Alterung von Bier

Während des Brauens gehen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Säuren aus dem Hopfen in das Bier über und werden zum Großteil in Iso- $\alpha$ -Säuren umgewandelt. Diese Hopfenbittersäuren, welche den typisch bitteren Geschmack des Bieres hervorrufen, werden während der Aufbewahrung abgebaut, was sich in einer Verringerung der Bitterkeit auswirkt. Gleichzeitig werden im Zuge der Maillard-Reaktion Verbindungen gebildet, die ein süßes, karamelliges Aroma hervorrufen. Zudem werden zwei typische Fehlgerüche beschrieben. Zum einen die Ausbildung eines Aromas nach schwarzer Johannisbeere (ribes), welches in höheren Konzentrationen auch katzenartig (catty) oder nach Katzenurin riecht. Zum anderen der so genannte „cardboard flavor“, der als Papp-Geschmack oder auch als ranzig und fettig beschrieben wird. [Dalglish 1977] Zu dieser Verbindung sind bisher vorliegende Untersuchungen jedoch widersprüchlich. Während in einigen Veröffentlichungen [Gijs 2002, Santos 2003, Techakriengkrai 2006] eine direkte Korrelation zur Alterung und zu auftretenden Fehlgerüchen festgestellt wurde, berichten andere Untersuchungen [Malfliet 2008, Schieberle 1991, Vanderhaegen 2003], dass die für diesen „off-flavor“ verantwortliche Verbindung (*E*)-2-Nonenal kaum nachweisbar war.

Zusätzlich zu den im Schema enthaltenen Aromaveränderungen können weitere auftreten. Erwünschte „fruchtige“ und „blumige“ Aromastoffe nehmen im Zuge der Alterung an Intensität ab, während vor allem stärker gehopfte Lagerbiere einen an alten Hopfen erinnernden Geruch aufweisen können. [Vanderhaegen 2007]

Die wichtigsten während der Alterung stattfindenden und für die Aromaveränderungen verantwortlichen Reaktionen sind Strecker-Abbau, Maillard-Reaktion, Fettoxidation, Hydrolyse und Bildung von Estern sowie Abbau der

Hopfenbittersäuren. Auf diese Reaktionsmechanismen soll im Folgenden genauer eingegangen werden.

### 2.3.2 Strecker-Abbau

Durch den Strecker-Abbau werden aus Aminosäuren Aldehyde und Säuren gebildet, welche einen starken Einfluss auf das Aroma haben können oder mit anderen Bier-Inhaltsstoffen reagieren und dadurch eine Veränderung des Aromas bewirken. Der schematische Ablauf des Strecker-Abbaus ist in Abb. 14 dargestellt.

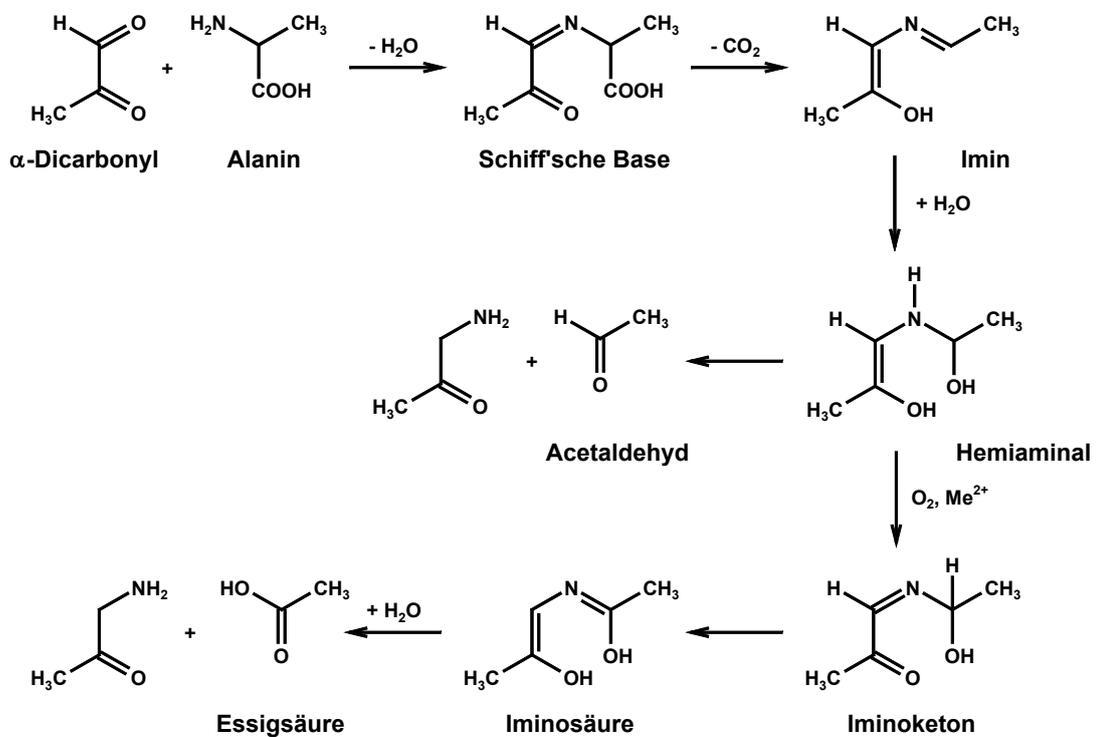
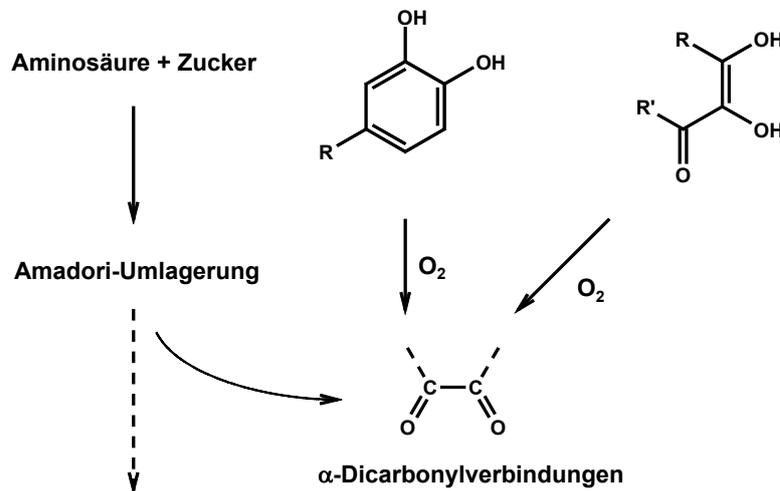


Abb. 14: Bildung von Aldehyden und Säuren durch den Strecker-Abbau [Hofmann 2000]

Für den Beginn des Strecker-Abbaus sind neben Aminosäuren auch  $\alpha$ -Dicarbonyle notwendig. Beide Moleküle reagieren unter Bildung der Schiff'schen Base und anschließender Abspaltung von Kohlenstoffdioxid zum Imin. Dieses wird zum Hemi-Aminal hydratisiert und zerfällt unter Bildung des entsprechenden Strecker-Aldehyds. Die Oxidation des Hemi-Aminals, welche durch Übergangsmetalle katalysiert wird, führt zum Iminoketon, lagert sich zur Iminosäure um und hydrolysiert unter Bildung der Strecker-Säure. [Hofmann 2000]

Die an der Reaktion beteiligten  $\alpha$ -Dicarbonyle können auf verschiedenen Wegen gebildet werden. Hauptsächlich stammen sie aus der Maillard-Reaktion [Glomb 2009], können aber auch durch die (Übergangsmetall-katalysierte) Oxidation von Reduktonstrukturen und Polyphenolen gebildet werden (siehe Abb. 15).



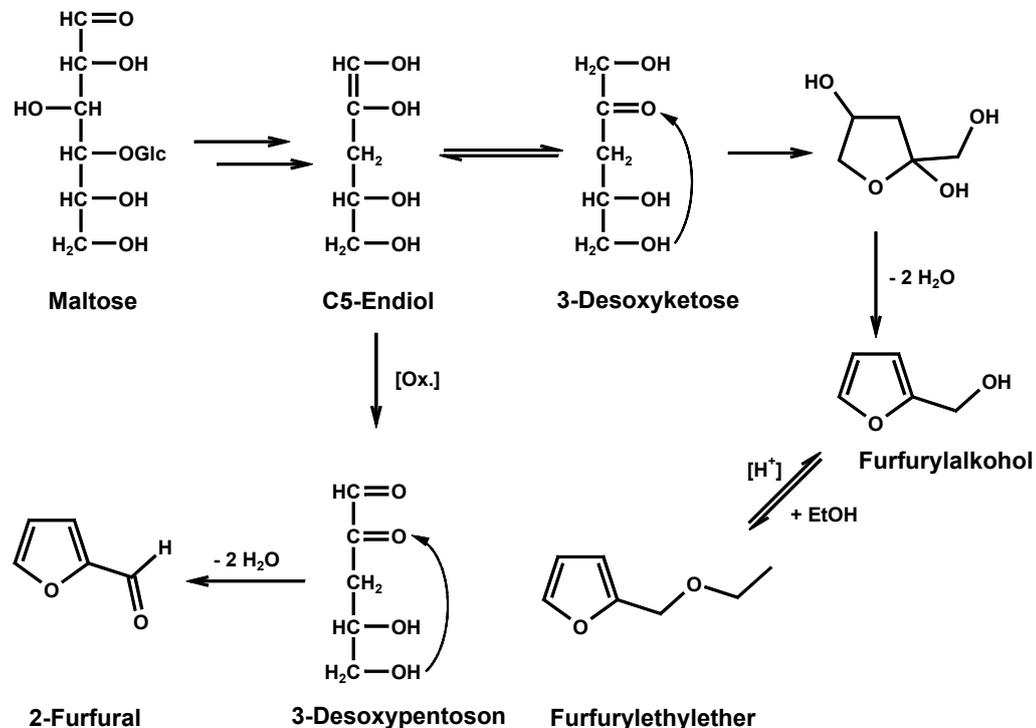
**Abb. 15:** Bildungswege von  $\alpha$ -Dicarbonylen [Vanderhaegen 2005b]

Bedeutende Strecker-Aldehyde in Bier sind 2-Methylpropanal aus Valin, 3-Methylbutanal aus Leucin, Acetaldehyd aus Alanin, 2-Methylbutanal aus Isoleucin sowie 3-(Methylthio)-propanal (Methional) aus Methionin. [Fritsch 2005]

### 2.3.3 Maillard-Reaktion

Unter der Maillard-Reaktion werden alle Reaktionen zwischen reduzierenden Zuckern, Aminosäuren, Aminen, Proteinen und Peptiden und deren Folgereaktionen zusammengefasst. [Glomb 2002] Es bilden sich im Zuge der Alterung des Bieres zahlreiche heterocyclische Verbindungen. Diese besitzen zum Teil sehr niedrige Geruchsschwellen, sind daher schon in sehr geringen Konzentrationen wahrnehmbar und beeinflussen das Gesamtaroma erheblich. Die Geschwindigkeit ihrer Bildung hängt neben der Konzentration der Ausgangsstoffe insbesondere von der Temperatur ab. So kommt es schon bei einer Lagertemperatur von 40 °C zu einer deutlich vermehrten Bildung. [Bravo 2001, Vanderhaegen 2003]

2-Furfural als eine der wichtigsten heterozyklischen Verbindungen wird im Zuge der Maillard-Reaktion über mehrere Zwischenschritte aus Maltose gebildet. Der Reaktionsweg ist in Abb. 16 dargestellt.



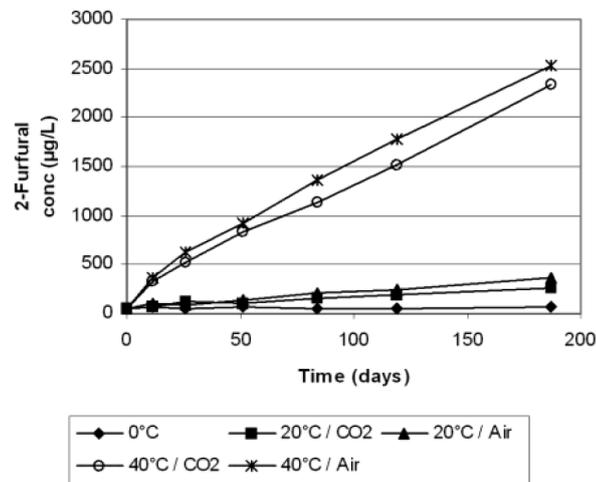
**Abb. 16:** Bildungswege von Furfurylalkohol, Furfurylethylether und 2-Furfural aus Maltose [Hollnagel 2000, Vanderhaegen 2004b]

Demnach reagiert Maltose über ein durch Retro-Claisen-Kondensation gebildetes C5-Endiol durch Oxidation zum 3-Desoxypentosen. Dieses wiederum zyklisiert unter Wasserabspaltung zum 2-Furfural. [Hollnagel 2000]

Eine zweite wichtige Verbindung, die aus diesem Reaktionsweg hervorgeht, ist Furfurylalkohol. Das C5-Endiol lagert sich zur 3-Desoxyketose um und zyklisiert unter Wasserabspaltung zum Furfurylalkohol. Eine anschließend säurekatalysierte Veretherung mit dem in Bier in großen Mengen vorhandenen Ethanol führt zu Furfurylethylether, welcher ein lösemittelartiges, altes Aroma besitzt. [Vanderhaegen 2004b] 2-Acetylfuran, eine nach Marzipan riechende Substanz, bildet sich aus Glucose äquivalent zu Furfurylalkohol über 1,4-Didesoxyglucoson. [Wang 2009]

Die Bildung dieser Verbindungen ist wie oben beschrieben stark temperaturabhängig. In Abb. 17 ist die Bildung von 2-Furfural in Bier in Abhängigkeit von der Temperatur dargestellt. Bei einer Erhöhung der Temperatur um 20 K auf 40 °C

steigt die Konzentration auf etwa das Zehnfache der Konzentration im Vergleich zu 20 °C. Dies verdeutlicht die Bedeutung der Lagertemperatur bei der Bildung der Alterungsverbindungen von Bier. [Vanderhaegen 2003]



**Abb. 17:** Bildung von 2-Furfural bei unterschiedlichen Temperaturen [Vanderhaegen 2003]

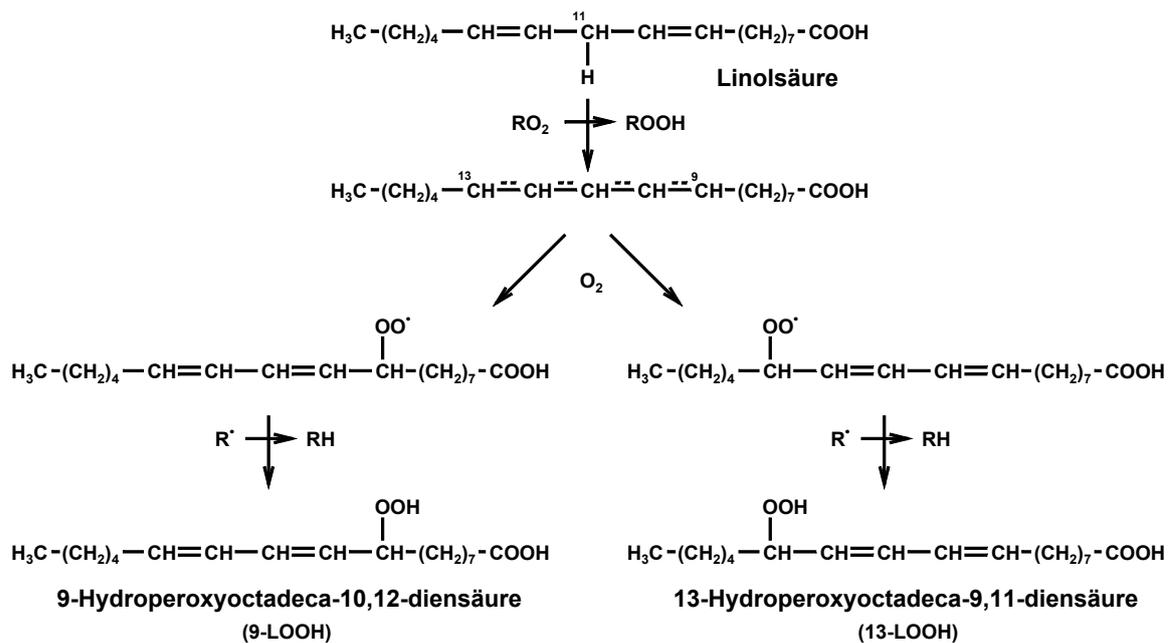
Während der Maillard-Reaktion bilden sich in Bier darüber hinaus zahlreiche weitere Verbindungen, welche unter anderem für die Aromenoten süß, brotig oder wein-artig verantwortlich sind. [Bravo 2001]

### 2.3.4 Oxidation ungesättigter Fettsäuren

In Bier kommen nur die beiden Fettsäuren Linolsäure (18:2) sowie Linolensäure (18:3) in aromarelevanten Konzentrationen vor. Diese stammen aus der gemälzten Gerste und werden besonders während des Maischens durch Lipasen aus den Triglyceriden freigesetzt. [Baxter 1984, Schwarz 2002] Die Folge der Oxidation dieser Fettsäuren ist die Bildung verschiedener Carbonylverbindungen wie gesättigte und ungesättigte Aldehyde, und damit ein ranziges Aroma. Eine wichtige Verbindung ist (*E*)-2-Nonenal, welche der Verursacher des Cardboard-Fehlaromas ist. Es wurde jedoch nachgewiesen, dass eine Fettoxidation nach der Abfüllung nicht mehr stattfindet, auch aufgrund des niedrigen Sauerstoffgehaltes in der Flasche. Die Sauerstoffkonzentration im abgefüllten Bier hatte keinen Einfluss auf die gebildete Menge an (*E*)-2-Nonenal. [Lermusieau 1999, Noel 1999] Es wird daher heute angenommen, dass während des Brauprozesses durch die Oxidation von Linolsäure ein „(*E*)-2-Nonenal-Potential“ gebildet wird, welches

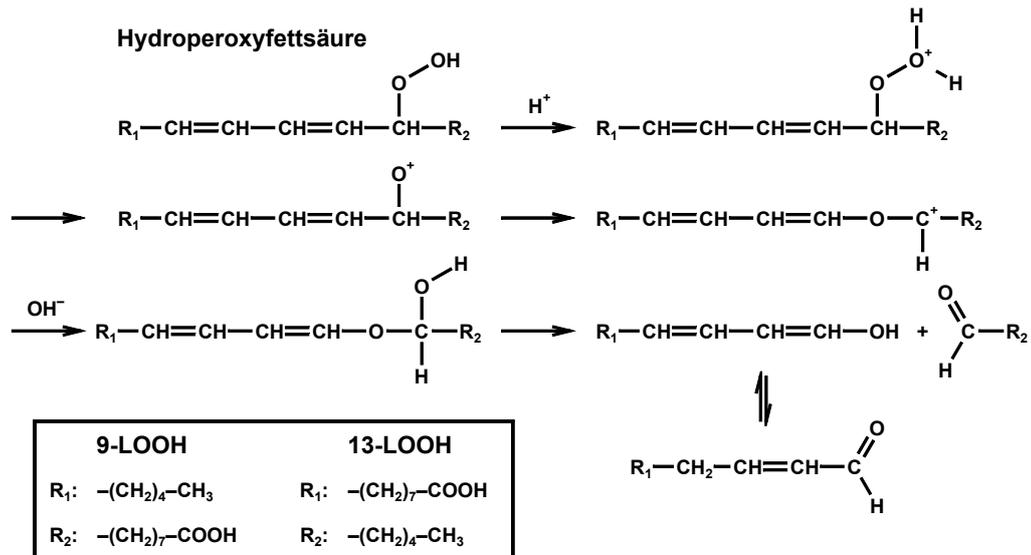
dann (*E*)-2-Nonenal während der Alterung freisetzt. Die Stärke der während dem Maischen und Würzekochen stattfindenden Oxidation der Fettsäuren beeinflusst daher die während der Alterung freigesetzte Konzentration an (*E*)-2-Nonenal. [Lermusieau 1999, Noel 1995]

Es gibt zwei mögliche Oxidationsmechanismen: Autoxidation und enzymatische Oxidation durch Lipoxygenasen. Abb. 18 zeigt den Verlauf der Autoxidation von Fettsäuren am Beispiel der Linolsäure.



**Abb. 18:** Autoxidation von Linolsäure zu Hydroperoxyfettsäuren [Belitz 2001]

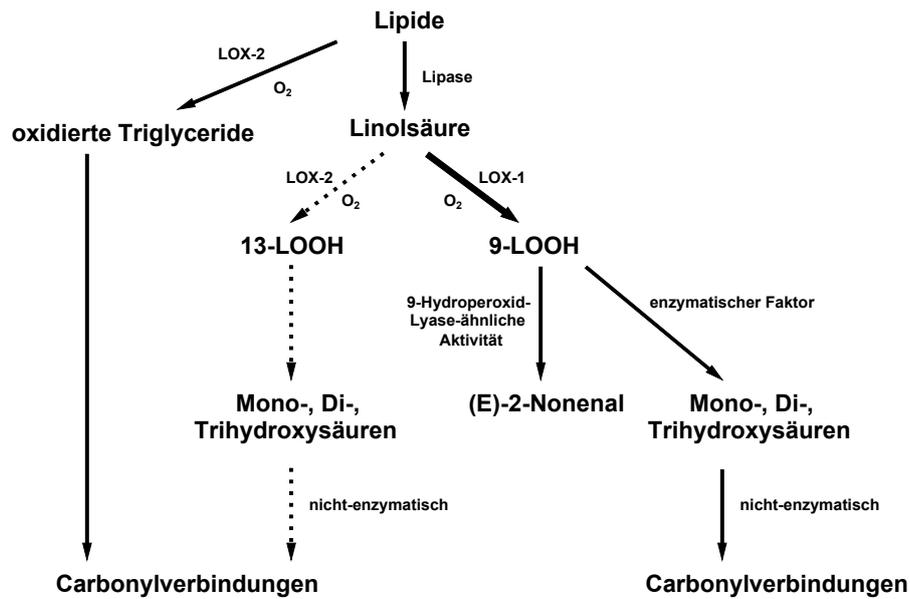
Die Autoxidation beginnt mit der Abstraktion eines H-Atoms durch freie Radikale, wie beispielsweise Peroxiradikale ( $\text{ROO}^\bullet$ ). Bei Linolsäure ist die Methylengruppe an Position 11 durch die beiden benachbarten Doppelbindungen aktiviert. Es bildet sich durch die Abspaltung von Wasserstoff ein Pentadienylradikal, welches durch die Bildung von Hydroperoxiden stabilisiert wird.



**Abb. 19:** Proton-katalysierte Spaltung der Hydroperoxysäuren von Linolsäure [Ohloff 1978]

Diese Hydroperoxide können anschließend zu Aldehyden gespalten werden. Es kommt zur Bildung eines Oxo-Kations, welches sich in ein Carbeniumion umlagert. Hydroxylierung führt zu einem Aldehyd sowie einem ungesättigten Aldehyd, darunter 2-Nonenal (Abb. 19). [Ohloff 1978]

Die Lipoxygenasen (LOX-1, LOX-2) der Gerste können Fettsäuren wie Linol- und Linolensäure ebenfalls in ihre Hydroperoxide überführen. Enzymatische, aber auch nicht-enzymatische Reaktionen führen dann zum weiteren Abbau und zur Bildung von (*E*)-2-Nonenal sowie weiterer Carbonylverbindungen. [Kobayashi 1994, Tressl 1979] Ein Überblick über den enzymatischen Abbau von Fettsäuren und die daraus resultierenden Verbindungen zeigt Abb. 20.

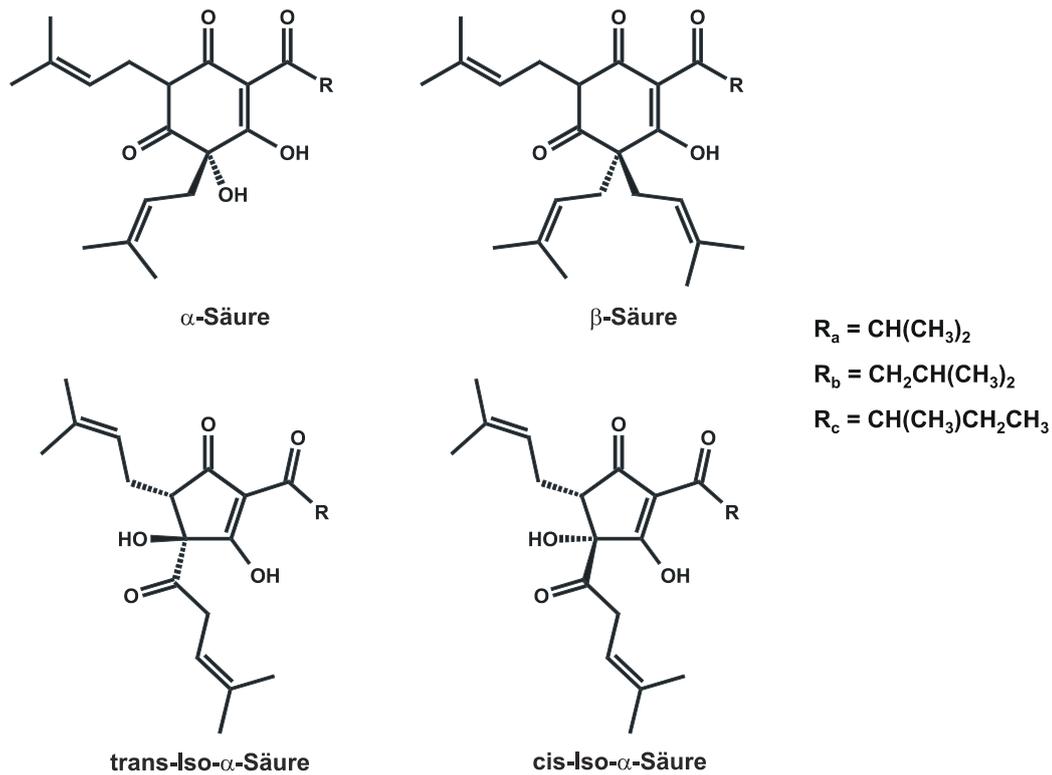


**Abb. 20:** Überblick über die Bildung von Carbonylverbindungen durch enzymatische Oxidation von Linolsäure [Vanderhaegen 2005b]

Nach Pfirsich bzw. Kokos riechendes  $\gamma$ -Nonalacton, eine weitere wichtige Alterungsverbindung in Bier, wird durch die Hefe während der Fermentation gebildet. Dabei setzen die Hefe-Enzyme ebenfalls Linolsäure über mehrere Oxidationsschritte in  $\gamma$ -Nonalacton um. [Garbe 2001] Aber nicht nur während der Fermentation, sondern auch während der Alterung steigt die Konzentration dieser Alterungsverbindung stetig an. Bei der beschleunigten oxidativen Alterung von Kakaobutter konnte ebenfalls die Bildung von  $\gamma$ -Nonalacton nachgewiesen werden, was auf einen äquivalenten radikalischen bzw. oxidativen Bildungsweg in Bier schließen lässt. [Hashim 1997]

### 2.3.5 Abbau von Hopfenbittersäuren

Der Abbau von Hopfenbittersäuren hat nicht nur eine Verringerung der Bitterkeit des Bieres zur Folge, sondern ist auch verantwortlich für die Bildung verschiedenster bisher noch nicht enthaltener aromaaktiver Substanzen. Es konnte nachgewiesen werden, dass hopfenfrei gebrautes Bier auch nach langer Lagerdauer nahezu kein typisches Alterungsaroma aufweist. [Hashimoto 1979b] Die wichtigsten Hopfenbittersäuren sind in Abb. 21 dargestellt.



**Abb. 21:** Struktur wichtiger Hopfenbittersäuren

Die Reaktionen, die beim Abbau dieser Hopfenverbindungen ablaufen, sind bisher nicht genau bekannt. Sicher ist, dass Iso- $\alpha$ -Säuren in Gegenwart reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) abgebaut werden, wobei *trans*-Isomere empfindlicher sind als *cis*-Isomere. [De Cooman 2000, Kaneda 1989] Aber auch in Abwesenheit von Sauerstoff ist eine Autoxidation der Hopfenbittersäuren und damit der Abbau möglich. [Intelmann 2010]

Aus dem Abbau der Iso- $\alpha$ -Säuren resultieren Carbonylverbindungen unterschiedlicher Kettenlänge, darunter C3-C11 2-Alkanone, C2-C10 Alkanale, C4-C7 2-Alkenale sowie C6-C7 2,4-Alkediene. Außerdem konnten unter anderem Aceton, 2-Methyl-3-buten-2-ol oder 3-Methylbutan-2-on identifiziert werden. Der Abbau der Seitenketten führt außerdem zu 2-Methylpropionsäure bzw. 3-Methylbuttersäure, welche Verstufen von Alterungsestern darstellen. [Burns 2001, Hashimoto 1979a, Williams 1979]

### 2.3.6 Bildung und Abbau flüchtiger Ester

Während der Alterung des Bieres werden von Hefen fermentativ gebildete Ester (z. B. Essigsäureisopentylester) durch Hydrolyse und Enzyme, welche in geringen Konzentrationen auch in filtriertem, unpasteurisiertem Bier vorhanden sind, abgebaut. Diese Ester rufen in frischem Bier ein fruchtiges Aroma hervor, welches mit dem Alter abnimmt. Die Hydrolyse ist säurekatalysiert und damit direkt abhängig vom pH-Wert. Die Aktivität der Enzyme hängt hingegen zusätzlich von den Herstellungsbedingungen sowie der Aufbewahrungstemperatur ab. [Neven 1997, Szwajgier 2006]

Im Zuge der Alterung werden jedoch nicht nur Ester abgebaut, sondern auch neue gebildet. Dazu gehören zum Beispiel 2- und 3-Methylbuttersäureethylester. Diese gehen aus der Veresterung von Ethanol und 2- bzw. 3-Methylbuttersäure hervor, welche aus dem oben diskutierten Abbau von Hopfeninhaltsstoffen stammen. [Vanderhaegen 2007]

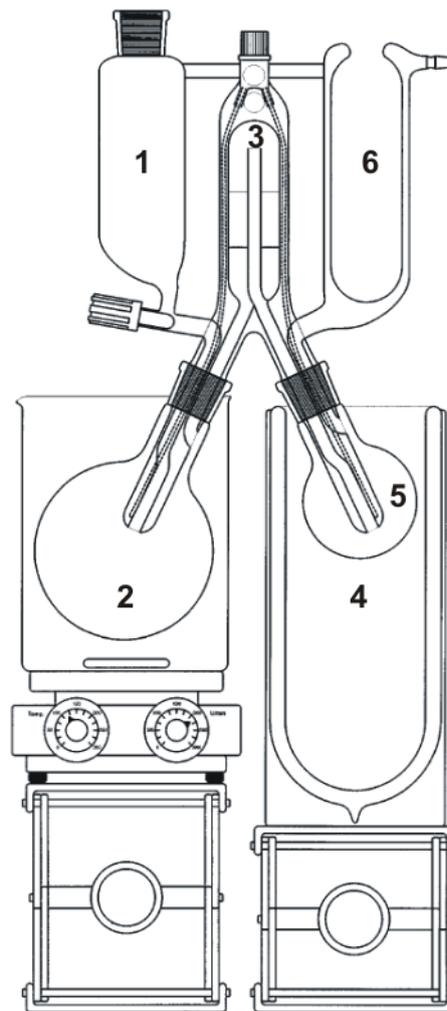
### 2.3.7 Solvent assisted flavor evaporation (SAFE)

Die Analyse aromaaktiver Substanzen aus Lebensmitteln birgt unterschiedliche Probleme. Neben den flüchtigen Verbindungen, die mittels Gaschromatograph (GC) untersucht werden sollen, enthalten Lebensmittel auch zahlreiche nicht-flüchtige Verbindungen, welche die spätere Analyse beeinflussen können. Diese müssen vorher vollständig abgetrennt werden. Zudem behindern sie die Aufkonzentrierung der Aromastoffe, welche für die Analyse unerlässlich ist. Vor allem Verbindungen mit niedriger Geruchsschwelle kommen in nur sehr geringen Konzentrationen im Lebensmittel vor und können in ihrer ursprünglichen Konzentration nicht mittels GC analysiert werden.

Die älteste Form der Trennung flüchtiger und nicht-flüchtiger Verbindungen ist die Wasserdampfdestillation. Nickerson und Likens entwickelten als Alternative dazu eine Apparatur, die Wasserdampfdestillation und Extraktion vereint. [Likens 1964] Dieses Verfahren zur Isolierung flüchtiger Aromastoffe hat jedoch den Nachteil, dass durch die thermische Belastung Artefakte gebildet werden können und einzelne Stoffe bei der Extraktion diskriminiert werden. [Majcher 2009,

Pickenhagen 1981] Bei Anwesenheit von Zuckern und Aminosäuren ist es außerdem möglich, dass durch die ablaufende Maillard-Reaktion neue Aromastoffe während der Isolierung gebildet werden. [Schieberle 1995]

Zur genauen Untersuchung der Zusammensetzung von flüchtigen Verbindungen ist daher eine Methode notwendig, bei der die zu isolierenden Aromastoffe während der Aufarbeitung nicht verändert werden. Dazu entwickelte Weurman eine Apparatur, bei der alle flüchtigen Verbindungen im Hochvakuum verdampft und dann in einer Kühlfalle wieder aufgefangen werden. [Weurman 1970] Engel, Bahr und Schieberle haben diese Apparatur weiterentwickelt. [Engel 1999] Der schematische Aufbau der SAFE ist in Abb. 22 dargestellt.



**Abb. 22:** Schematischer Aufbau der SAFE [Engel 1999]

Die gesamte Apparatur (2+3) wird mit Wasser auf 25 °C temperiert. Anschließend wird die Anlage unter Hochvakuum (ca. 50 µbar) gesetzt, die Kühlfallen (4+6)

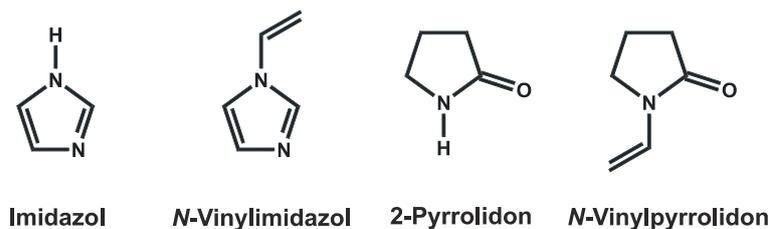
werden mit flüssigem Stickstoff befüllt. Aus dem Reservoir werden nun kleine Mengen des Lebensmittels oder Lebensmittelextraktes (1) in die Anlage gebracht. Direkt am Ventil verdampfen die flüchtigen Bestandteile der Probe und werden in der Vorlage (5) wieder ausgefroren. Die nicht verdampfbaren Verbindungen verbleiben im Rundkolben (2). Nach Beendigung der Destillation kann die Apparatur belüftet, der flüssige Stickstoff entfernt und das Destillat zur weiteren Aufarbeitung verwendet werden.

Die Destillation findet bei max. 35 °C statt, wodurch Bildung und Weiterreaktion einzelner Inhaltsstoffe verhindert werden. Außerdem ist die Ausbeute der destillierten Verbindungen deutlich höher als bei der Destillation nach Weurman. Mit dieser Methode ist es möglich, einfach und schnell unverfälschte Aromaeextrakte aus Lebensmitteln zu gewinnen. [Engel 1999]

### 3 Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1 Entwicklung und Validierung einer Methode zur Bestimmung von Migranten aus PVI/PVP

Bevor Polyvinylimidazol-Polyvinylpyrrolidon-Copolymere in der Lebensmittelindustrie eingesetzt werden können, ist es notwendig, die aus diesem Polymer migrierenden Substanzen zu identifizieren und zu quantifizieren. Zur Herstellung von PVI/PVP wird *N*-Vinylimidazol sowie *N*-Vinylpyrrolidon eingesetzt. Als mögliche Verunreinigungen bzw. Abbauprodukte der Ausgangsstoffe sind zusätzlich Imidazol sowie 2-Pyrrolidon von Interesse (Abb. 23). Diese entstehen durch Abspaltung von Acetaldehyd aus den entsprechenden *N*-Vinyl-Verbindungen.

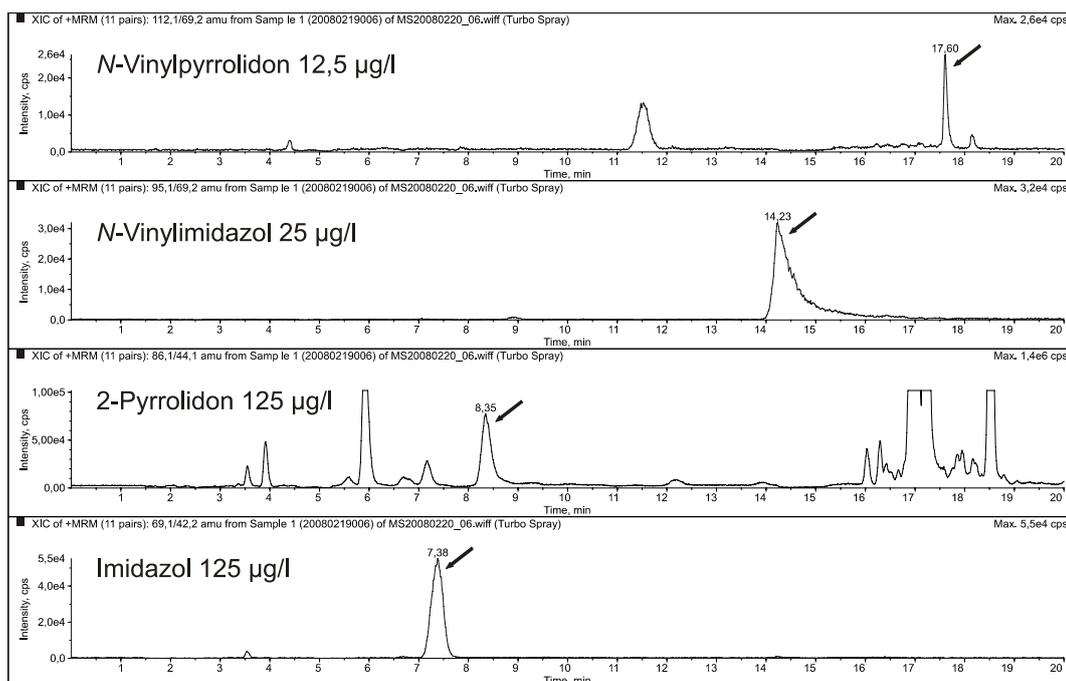


**Abb. 23:** Mögliche Migranten aus PVI/PVP

Da die Substanzen in nur sehr geringen Gehalten im Lebensmittel zu erwarten sind, wurde eine LC-MS<sup>2</sup>-Methode (MRM) entwickelt. Der Vorteil dieser Methode ist, dass die Proben trotz komplizierter Matrix nicht aufgearbeitet werden müssen. Um alle Verbindungen mit der gleichen HPLC-Säule und dem gleichen Laufmittel messen zu können, war es nötig, das Ionenpaarreagenz Heptafluorbuttersäure zuzusetzen. Imidazol hätte sonst weder qualifiziert noch quantifiziert werden können, da es nicht retiniert wird.

Für jede zu quantifizierende Verbindung wurden zwei Massenübergänge ausgewählt, ein Übergang für die Quantifizierung und ein anderer für die Qualifizierung der Verbindung. Imidazol gab als einzige Substanz nur eine Massenspur. Für eine Identifizierung ist daher ein authentischer Standard sowie der Vergleich der Retentionszeiten notwendig.

Ein Beispielchromatogramm von dotiertem Weißwein ist in Abb. 24 dargestellt.



**Abb. 24:** LC-MS/MS-Chromatogramm eines dotierten trockenen Weißweines (MRM-Modus)

Die entwickelte Methode wurde Inhouse-validiert. Dazu wurden, angelehnt an den späteren Einsatzzweck, die verschiedenen Matrices ‚Weißwein trocken‘, ‚Rotwein trocken‘, ‚Rotwein lieblich‘ sowie Traubensaft verwendet. Die entsprechenden Validierungsdaten finden sich in Tab. 4. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze wurde nach der Leerwertmethode nach OENO 7-2000 bestimmt, welche die dreifache Rauschhöhe als Nachweisgrenze und die zehnfache Rauschhöhe zur Retentionszeit der Verbindung als Bestimmungsgrenze definiert.

**Tab. 4:** Validierungsdaten

Verbindung	Nachweisgrenze [µg/l]	Bestimmungsgrenze [µg/l]	Reproduzierbarkeit [%]	Wiederholbarkeit [%]	Wiederfindung [%]	Linearität
Imidazol	5	12	5	3	101	0,9996
2-Pyrrolidon	25	83	16	9	102	0,9988
N-Vinylimidazol	2	6	4	3	102	0,9993
N-Vinylpyrrolidon	2	6	29	24	65	0,9993

Die schlechteren Nachweis- und Bestimmungsgrenzen von 2-Pyrrolidon im Gegensatz zu Imidazol und N-Vinylimidazol sind dadurch begründet, dass in allen Weinen, die für die Validierung verwendet wurden, bereits 2-Pyrrolidon in hohen Konzentrationen enthalten war (siehe 3.3).

Die Wiederfindung von *N*-Vinylpyrrolidon war mit 65 % erheblich schlechter als bei den restlichen Verbindungen, welche eine Wiederfindungsrate von fast 100 % aufwiesen. Dies ist auf den Abbau bzw. die Folgereaktionen von *N*-Vinylpyrrolidon unter sauren Bedingungen zurückzuführen (siehe 3.4).

### 3.2 Migration aus PVI/PVP und PVPP

Die Migrationsexperimente wurden mit zwei von BASF SE zur Verfügung gestellten PVI/PVP-Proben und zum Vergleich mit sechs im Handel erhältlichen PVPP-Proben durchgeführt.

Für die Bestimmung der Menge an migrierenden Substanzen wurde ein Wein-simulanz verwendet. Die Bedingungen der Migration richteten sich nach der EU-Richtlinie 97/48/EG. Der spätere Einsatzzweck sieht eine Verwendungsdauer von unter 30 Minuten bei einer Temperatur < 5°C vor. Demnach waren die Migrations-tests 30 Minuten bei 5 °C durchzuführen. Die ermittelten Werte finden sich in Tab. 5.

**Tab. 5:** Ergebnisse der Migration von PVI/PVP und PVPP (mg/kg)

Kontaktzeit	PVI/PVP 1		PVI/PVP 2	
	Imidazol	2-Pyrrolidon	Imidazol	2-Pyrrolidon
5 min	31	< 8	34	< 8
15 min	33	< 8	35	< 8
30 min	34	< 8	36	< 8
Kontaktzeit	PVPP 1		PVPP 2	
	Imidazol	2-Pyrrolidon	Imidazol	2-Pyrrolidon
5 min	n. n.	64	n. n.	112
15 min	n. n.	68	n. n.	109
30 min	n. n.	69	n. n.	108
Kontaktzeit	PVPP 3		PVPP 4	
	Imidazol	2-Pyrrolidon	Imidazol	2-Pyrrolidon
5 min	n. n.	104	n. n.	96
15 min	n. n.	105	n. n.	101
30 min	n. n.	103	n. n.	103

Kontaktzeit	PVPP 5		PVPP 6	
	Imidazol	2-Pyrrolidon	Imidazol	2-Pyrrolidon
5 min	n. n.	78	n. n.	61
15 min	n. n.	78	n. n.	82
30 min	n. n.	77	n. n.	79

Aus den gemessenen Werten ist ersichtlich, dass die Migration nach bereits fünf Minuten nahezu abgeschlossen war. Danach erhöhten sich die Gehalte nur noch in sehr geringem Maße, was auf die geringe Korngröße und die deshalb sehr große Oberfläche des Polymers zurückzuführen ist.

In keiner Probe konnte *N*-Vinylimidazol nachgewiesen werden. Wie bereits bemerkt, reagiert *N*-Vinylpyrrolidon in Weinsimulanzlösung; es war aus diesem Grund im Gegensatz zu dessen Abbauprodukten nicht nachweisbar.

Wie aufgrund der Zusammensetzung der Polymere zu erwarten war, migrierten aus PVPP (100 % *N*-Vinylpyrrolidon) deutlich höhere Mengen 2-Pyrrolidon als aus PVI-PVP (10 % *N*-Vinylpyrrolidon). Die niedrigste Konzentration innerhalb der PVPP-Polymere zeigte nach 30 Minuten PVPP 1 mit 69 mg/kg. Der höchste Wert wurde bei PVPP 2 mit 108 mg/kg gemessen. Dies zeigt, dass die Konzentration an migrierbaren Substanzen nicht bei allen PVPP-Proben gleich ist, sondern von der Herstellung und eventuell der Aufbewahrung abhängt. Die 2-Pyrrolidon-Gehalte der PVI/PVP-Proben befanden sich mit weniger als 8 mg/kg unterhalb der Bestimmungsgrenze.

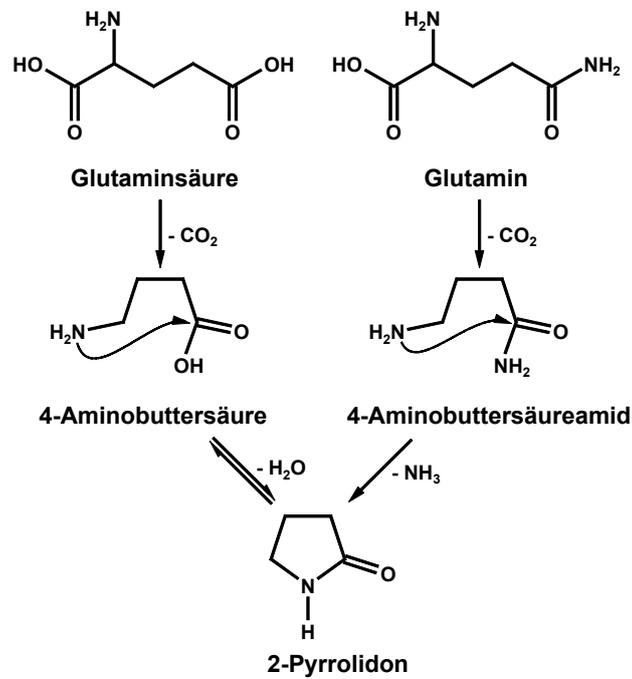
In den Migrationslösungen der beiden PVI/PVP-Proben wurden identische Imidazol-Gehalte von 34 bzw. 36 mg/kg gemessen, während erwartungsgemäß in keiner der PVPP-Proben Imidazol nachweisbar war.

### 3.3 Entstehung von 2-Pyrrolidon in Wein

Während der Validierung der Methode zur Bestimmung der Monomere aus PVI/PVP stellte sich heraus, dass 2-Pyrrolidon natürlicherweise in Wein vorkommt. Wie oben bemerkt, werden während der Herstellung der Weine heute häufig Filtrationshilfsmittel mit PVPP eingesetzt. Um den Eintrag von 2-Pyrrolidon in den Wein aus verwendetem PVPP auszuschließen, wurden zum Vergleich einige EcoVin-Weine untersucht. Diese dürfen während der Herstellung nicht mit PVPP

behandelt werden. [EcoVin 2005] Auch in diesen Weinen wurden vergleichbare 2-Pyrrolidon-Gehalte ermittelt, was das natürliche Vorkommen beweist.

Für die Bildung von 2-Pyrrolidon wurden zwei mögliche Reaktionswege postuliert, die in Abb. 25 dargestellt sind.

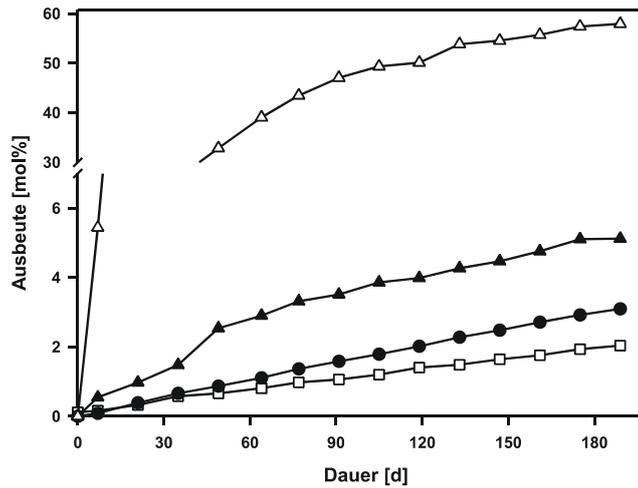


**Abb. 25:** Postulierter Bildungsweg von 2-Pyrrolidon in Wein

Durch enzymatische Decarboxylierung entsteht aus Glutaminsäure das entsprechende biogene Amin 4-Aminobuttersäure [Dixon 1961], welches unter Wasserabspaltung zu 2-Pyrrolidon zyklisiert. Der zweite postulierte Reaktionsweg geht von Glutamin aus. Es bildet ebenfalls das entsprechende biogene Amin 4-Aminobuttersäureamid, welches unter Ammoniakabspaltung zu 2-Pyrrolidon reagiert.

### 3.3.1 Inkubation von 4-Aminobuttersäure, 4-Aminobuttersäureamid und 2-Pyrrolidon

Für den Nachweis eines oder auch beider postulierter Reaktionswege wurden 4-Aminobuttersäure, 4-Aminobuttersäureamid und 2-Pyrrolidon jeweils einzeln in Weinsimulanzlösung für 190 Tage bei 50 °C inkubiert.



**Abb. 26:** Bildung von 2-Pyrrolidon (□) aus 4-Aminobuttersäure, 4-Aminobuttersäure (●) aus 2-Pyrrolidon, 2-Pyrrolidon (△) und 4-Aminobuttersäure (▲) aus 4-Aminobuttersäureamid (Weinsimulanz, pH 3,2, 50 °C)

Wie aus Abb. 26 deutlich wird, bildete sich während der Inkubation aus 4-Aminobuttersäure zu 2 mol% 2-Pyrrolidon. Ebenso bildete sich umgekehrt in der gleichen Zeit zu 3 mol% aus 2-Pyrrolidon 4-Aminobuttersäure. Zwischen diesen beiden Verbindungen besteht somit ein chemisches Gleichgewicht, welches sich jedoch nur sehr langsam einstellt. In Inkubationen von 4-Aminobuttersäureamid konnten nach 190 Tagen 58 mol% 2-Pyrrolidon nachgewiesen werden. Dieser Mechanismus ist somit der Hauptbildungsweg von 2-Pyrrolidon in Wein. Durch die in Wein hohe Konzentration an 4-Aminobuttersäure (5-215 mg/l) wird jedoch auch hier ein erheblicher Beitrag zur Bildung von 2-Pyrrolidon erwartet.

In 4-Aminobuttersäureamid-Inkubationen konnte neben 2-Pyrrolidon auch zu 5 mol% 4-Aminobuttersäure nachgewiesen werden. Aufgrund der ähnlichen Reaktionsgeschwindigkeiten ist anzunehmen, dass 4-Aminobuttersäureamid nicht direkt zu 4-Aminobuttersäure reagiert, sondern dass zuerst 2-Pyrrolidon gebildet wird, welches anschließend (entsprechend des chemischen Gleichgewichtes) zu 4-Aminobuttersäure hydrolysiert (siehe Abb. 25).

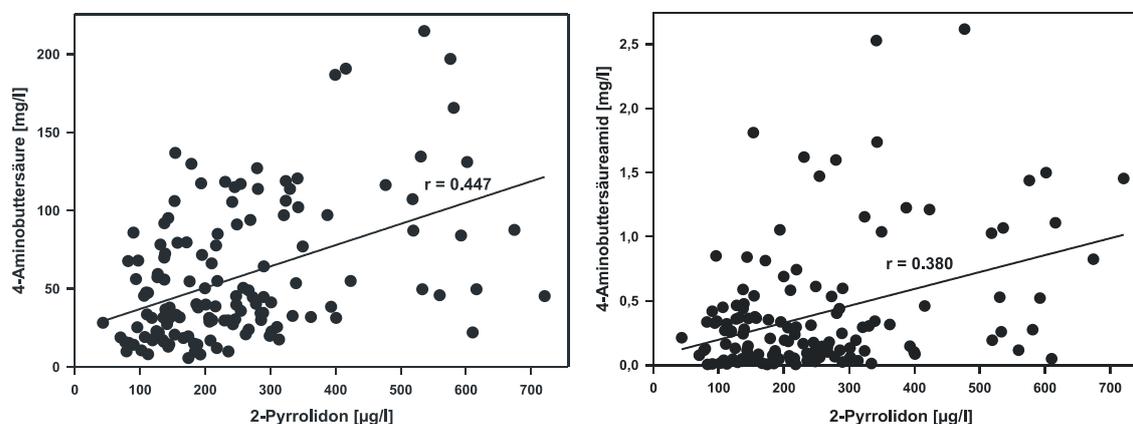
### 3.3.2 Gehalte von 4-Aminobuttersäure, 4-Aminobuttersäureamid, 2-Pyrrolidon, Glutamin, Glutaminsäure in Wein

Zur Bestätigung dieser beiden Reaktionswege in Wein wurden 140 verschiedene Weinproben auf die Gehalte an 2-Pyrrolidon, 4-Aminobuttersäure, 4-Aminobuttersäureamid, Glutamin sowie Glutaminsäure untersucht (siehe Tab. 6).

**Tab. 6:** Gehalte der vermessenen Parameter in Wein ( $\mu\text{g/l}$ ) ( $n = 140$ )

	Minimum	Maximum	Mittelwert	Median	Standardabweichung
Glutaminsäure	6636	163603	50295	47645	24500 (49 %)
Glutamin	6	13998	837	222	1620 (194 %)
4-Aminobuttersäure	5711	214831	59287	45003	45453 (77 %)
4-Aminobuttersäureamid	4	2616	402	219	510 (127 %)
2-Pyrrolidon	43	1910	274	213	239 (87 %)

In Abb. 27 ist die direkte Korrelation zwischen 2-Pyrrolidon mit 4-Aminobuttersäure ( $r = 0,447$ ) und 4-Aminobuttersäureamid ( $r = 0,380$ ) dargestellt.



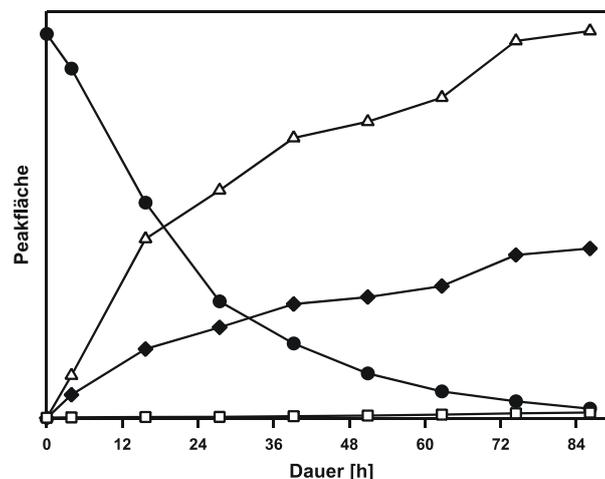
**Abb. 27:** Korrelation zwischen 2-Pyrrolidon und 4-Aminobuttersäure (links) bzw. 4-Aminobuttersäureamid (rechts)

Mittels multivariater Datenanalyse wurden die Korrelationen zwischen den verschiedenen Parametern bestätigt. Weine mit höheren 2-Pyrrolidon-Konzentrationen enthielten auch höhere Gehalte an 4-Aminobuttersäure ( $\beta = 0,291$ ) bzw. 4-Aminobuttersäureamid ( $\beta = 0,191$ ). In Verbindung mit der starken Korrelation zwischen 4-Aminobuttersäure und 4-Aminobuttersäureamid ( $\beta = 0,444$ ) sowie dem Zusammenhang zwischen der Konzentration an

2-Pyrrolidon und dem Alter des Weines ( $\beta = 0,325$ ) bestätigen diese Ergebnisse den oben aus den Modellreaktionen postulierten Bildungsweg von 2-Pyrrolidon. Ein Zusammenhang zwischen dem Alter des Weines und den Konzentrationen von 4-Aminobuttersäure sowie 4-Aminobuttersäureamid konnte nicht nachgewiesen werden. Es gab jedoch den erwarteten Zusammenhang zwischen Glutaminsäure und dem entsprechenden biogenen Amin 4-Aminobuttersäure ( $\beta = 0,338$ ).

### 3.4 Reaktion von *N*-Vinylpyrrolidon in Weinsimulanzien

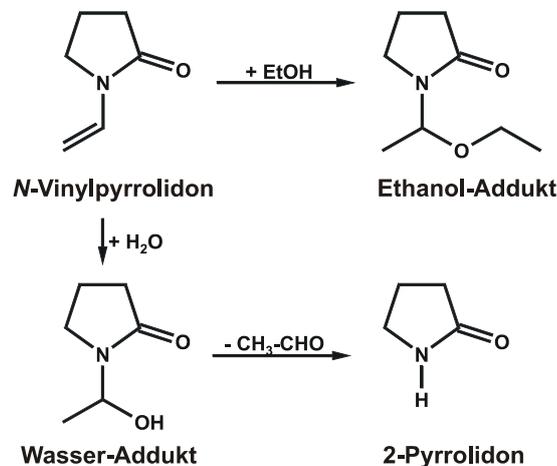
Während der Validierung der Methode zur Bestimmung der Migranten in Wein zeigte sich, dass *N*-Vinylpyrrolidon Reaktionen mit verschiedenen Inhaltsstoffen eingeht. Abb. 28 zeigt den Abbau von *N*-Vinylpyrrolidon sowie die Bildung der Folgeprodukte in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.



**Abb. 28:** Reaktion von *N*-Vinylpyrrolidon (●) zu: Wasser-Addukt (Δ), Ethanol-Addukt (◆), 2-Pyrrolidon (□)

Innerhalb von 86 h wurde *N*-Vinylpyrrolidon nahezu vollständig abgebaut, während sich drei neue Verbindungen bildeten. 2-Pyrrolidon konnte mittels authentischen Standards als eine der drei Verbindungen identifiziert werden. Mittels massenspektrometrischer Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass die anderen beiden Substanzen in ihrer Struktur weiterhin den Pyrrolidon-Ring besitzen müssen. Aufbauend auf den Untersuchungen von Denisov, welcher die

Reaktion von Methanol mit *N*-Vinylpyrrolidon in sauren Lösungen beschrieben, ergibt sich folgendes Schema für die Reaktionen in Wein (Abb. 29). [Denisov 1989]



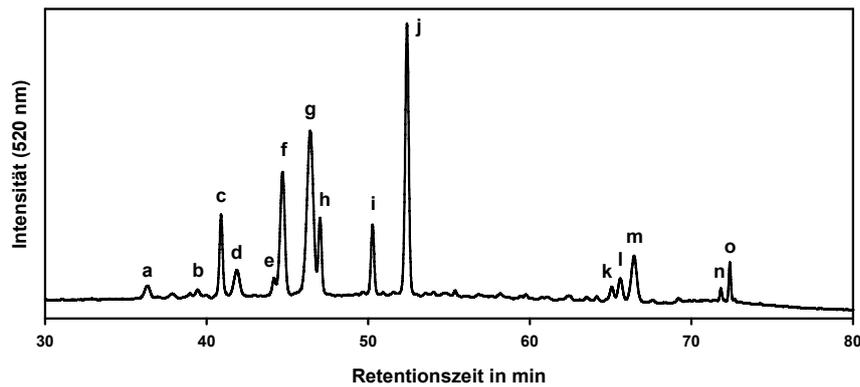
**Abb. 29:** Reaktion von *N*-Vinylpyrrolidon in Weinsimulanz

*N*-Vinylpyrrolidon reagiert an der Vinyl-Funktion einerseits mit Ethanol und andererseits mit Wasser. Während das Ethanol-Addukt stabil ist, zerfällt das Wasser-Addukt unter Abspaltung von Acetaldehyd zu 2-Pyrrolidon.

Eine quantitative Aussage über die Konzentrationen der gebildeten Verbindungen konnte nicht getroffen werden, da die hierfür erforderlichen authentischen Standards nicht käuflich erhältlich waren.

### 3.5 Einfluss von Schönungsmitteln auf das Anthocyanprofil

Während der Behandlung von Rotwein mit PVPP oder PVI/PVP adsorbieren diese Schönungsmittel auch Anthocyane. [Mcmurrough 1995, Mitchell 2005, Scholten 2001] Da beide Polymere unterschiedliche funktionelle Gruppen aufweisen, konnte auch ein unterschiedlicher Einfluss auf das Anthocyanprofil nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der Behandlung eines Rotweines (Spätburgunder/Dornfelder) (siehe Abb. 30) mit PVPP bzw. PVI/PVP sind in Tab. 7 aufgeführt.



**Abb. 30:** HPLC-Chromatogramm eines Dornfelder/Spätburgunders  
(l Peo-3-O-(6-O-p-coumaryl)-5-O-diglu; m Mv-3-O-(6-O-p-coumaryl)-5-O-diglu;  
sonstige Zuordnung siehe Tab. 7)

**Tab. 7:** Peakflächen der einzelnen Anthocyane in behandeltem und unbehandeltem Wein

Anthocyan	unbehandelt	PVI/PVP	%	PVPP	%
Delphinidin-3,5-O-diglucosid (a)	7,21E+07	6,52E+07	91	6,62E+07	92
Cyanidin-3,5-O-diglucosid (b)	1,73E+07	1,30E+07	76	1,51E+07	88
Petunidin-3,5-O-diglucosid (d)	7,34E+07	7,06E+07	96	7,25E+07	99
Peonidin-3,5-O-diglucosid (f)	1,57E+08	1,55E+08	98	1,55E+08	99
Malvidin-3,5-O-diglucosid (g)	5,11E+08	5,62E+08	110	5,64E+08	111
Delphinidin-3-O-glucosid (c)	1,44E+09	1,45E+09	101	1,52E+09	106
Cyanidin-3-O-glucosid (e)	1,25E+08	1,24E+08	99	1,29E+08	103
Petunidin-3-O-glucosid (h)	2,45E+09	2,52E+09	103	2,64E+09	108
Peonidin-3-O-glucosid (i)	1,21E+09	1,35E+09	111	1,30E+09	108
Malvidin-3-O-glucosid (j)	7,49E+09	7,85E+09	105	7,74E+09	103
Delphinidin-3-O-(6-O-acetyl)glucosid	3,73E+08	3,03E+08	81	3,16E+08	85
Cyanidin-3-O-(6-O-acetyl)glucosid	7,18E+07	6,62E+07	92	6,40E+07	89
Petunidin-3-O-(6-O-acetyl)glucosid	4,81E+08	4,41E+08	92	4,57E+08	95
Peonidin-3-O-(6-O-acetyl)glucosid	4,11E+08	3,71E+08	90	3,69E+08	90
Malvidin-3-O-(6-O-acetyl)glucosid (k)	2,21E+09	2,32E+09	105	2,34E+09	106
Delphinidin-3-O-(6-O-p-coumaryl)glucosid	1,62E+08	1,52E+08	94	1,34E+08	83
Cyanidin-3-O-(6-O-p-coumaryl)glucosid	5,53E+07	5,14E+07	93	4,55E+07	82
Petunidin-3-O-(6-O-p-coumaryl)glucosid	2,22E+08	1,92E+08	86	1,83E+08	82
Peonidin-3-O-(6-O-p-coumaryl)glucosid (n)	2,41E+08	2,32E+08	96	2,09E+08	87
Malvidin-3-O-(6-O-p-coumaryl)glucosid (o)	6,07E+08	5,93E+08	99	5,69E+08	95

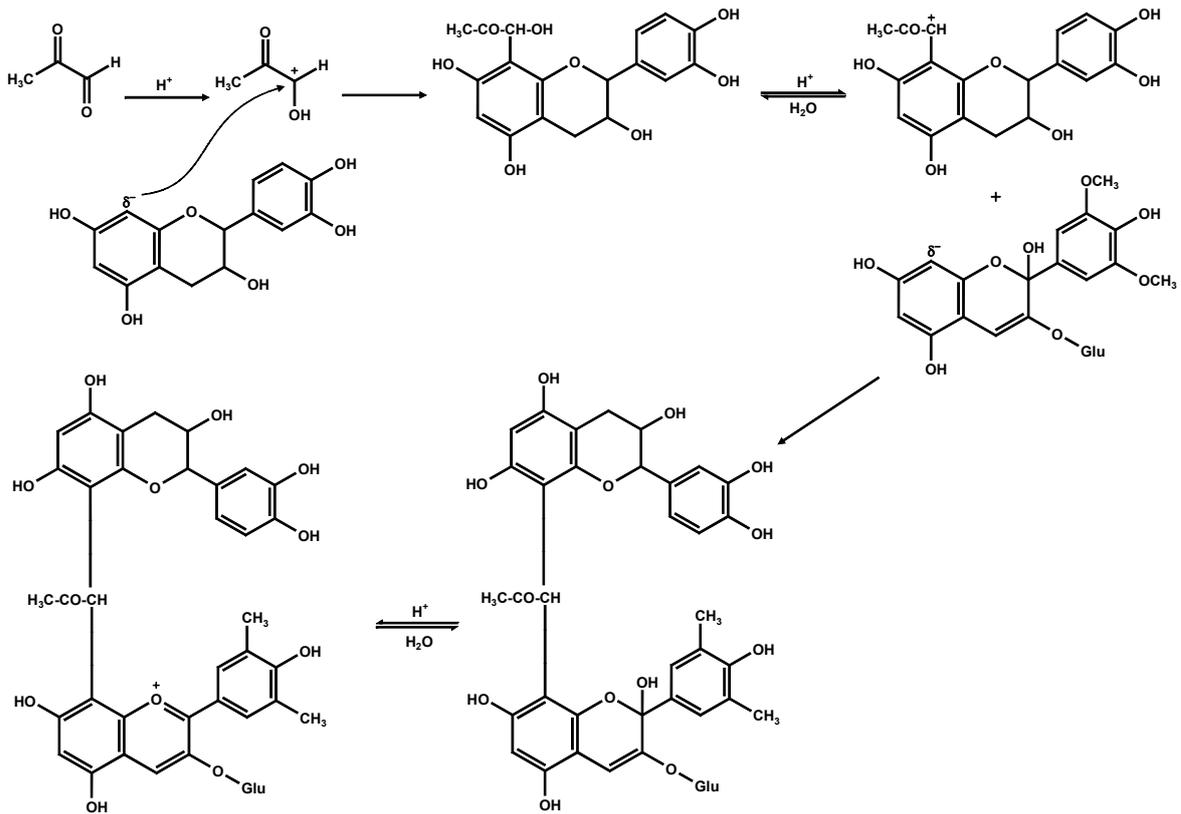
Für eine signifikante Veränderung wurden Abweichungen von mehr als 10 % festgelegt. Es ist eindeutig zu erkennen, dass das klassisch verwendete PVPP hauptsächlich unpolare, coumarylierte Anthocyane wie Cyanidin-3-O-(6-O-p-coumaryl)glucosid oder Petunidin-3-O-(6-O-p-coumaryl)glucosid adsorbiert. PVI/PVP mit seinem polareren Charakter adsorbiert hingegen vorrangig polare Anthocyane ohne weitere Seitenketten, beispielsweise Delphinidin-3,5-O-diglucosid und Cyanidin-3,5-O-diglucosid. Damit hat die Anwendung verschiedener Schönungsmittel gleichzeitig auch Einfluss auf das Anthocyanprofil von Rotweinen. Da das Verhältnis acetylierter zu coumarylierter Anthocyane für die Authentizitätsbestimmung von Wein herangezogen wird, ist zu beachten, dass es bereits durch die Verwendung entsprechender Schönungsmittel verändert wird. [Otteneder 2004]

### **3.6 Reaktion ausgewählter Polyphenole während der Lagerung von Wein**

Während der Lagerung verändert sich die Polyphenol-Zusammensetzung von Wein kontinuierlich. In jungen Weinen sind hauptsächlich monomere Polyphenole wie Flavan-3-ole und Anthocyane enthalten, welche im Zuge der Lagerung zu polymeren Strukturen reagieren. Die vielen dabei ablaufenden Reaktionsmechanismen sind bis heute nur teilweise bekannt. [Monagas 2005]

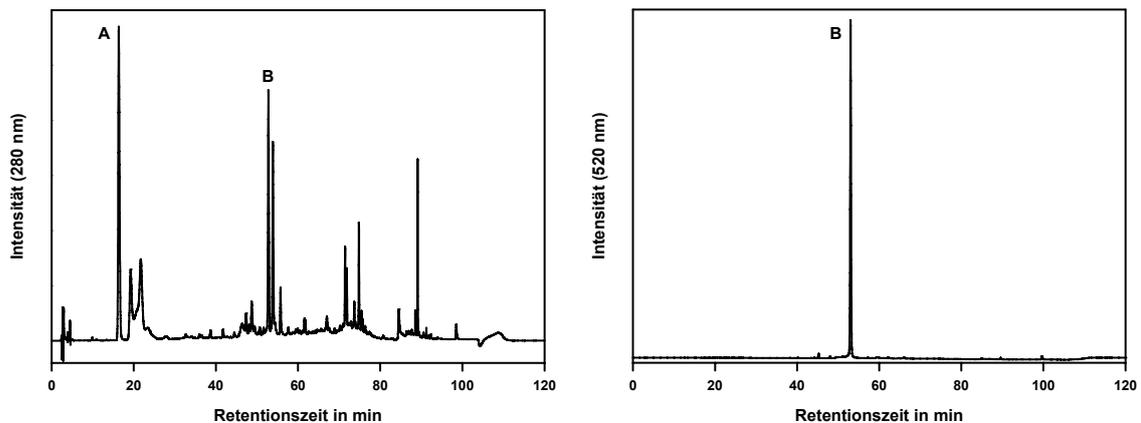
#### **3.6.1 Reaktion von (+)-Catechin und Malvidin-3-O-glucosid mit Methylglyoxal unter weinähnlichen Bedingungen**

Analog zur bereits bekannten Reaktion von (+)-Catechin und Malvidin-3-O-glucosid unter Anwesenheit von Acetaldehyd wurde die äquivalente Reaktion mit Methylglyoxal postuliert (siehe Abb. 31). Die dabei entstandenen Reaktionsprodukte sollten mittels Modellinkubationen untersucht und identifiziert werden.



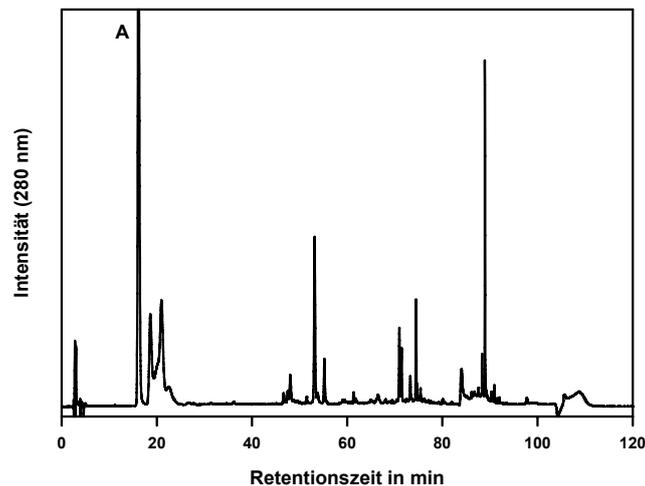
**Abb. 31:** Postulierter Mechanismus der Methylglyoxal-vermittelten Reaktion von (+)-Catechin und Malvidin-3-O-glucosid

Als Modell-Reaktion wurden (+)-Catechin und Malvidin-3-O-glucosid in Gegenwart von Methylglyoxal in einer Weinsimulanzlösung für mehrere Tage bei 37 °C inkubiert. Bereits nach 72 h zeigten sich zahlreiche neue Reaktionsprodukte (Abb. 32)



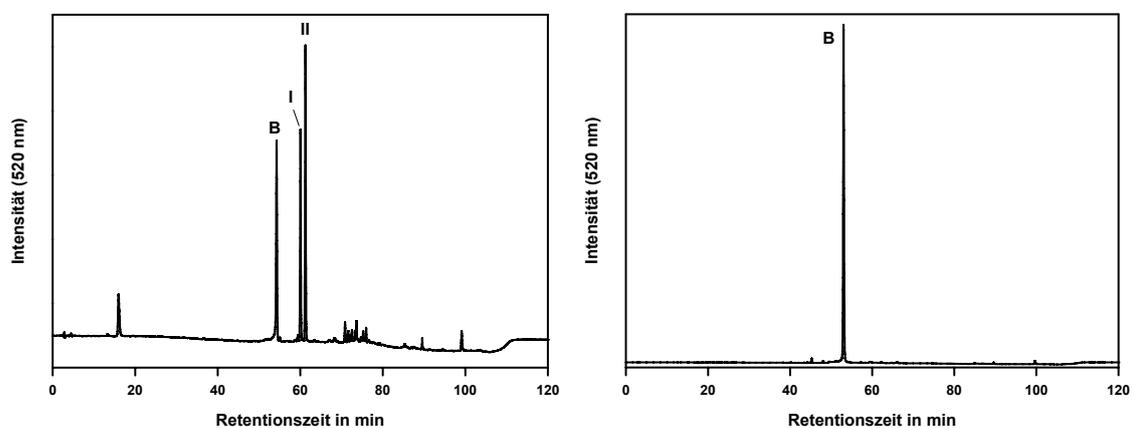
**Abb. 32:** HPLC-Chromatogramm einer Inkubation von Malvidin-3-O-glucosid, (+)-Catechin, Methylglyoxal (72 h, 37 °C, pH 3,2); links: 280 nm, rechts: 520 nm

Den Vergleich bildeten Reaktionslösungen mit (+)-Catechin und Methylglyoxal ohne Malvidin-3-O-glucosid. Diese wiesen nach gleicher Inkubationszeit zum Großteil identische Peaks auf. Unterschiede sind bei einer Retentionszeit von ca. 45 min sowie 55 min erkennbar, wobei es sich bei Peak A um (+)-Catechin und bei Peak B um Malvidin-3-O-glucosid handelt (siehe Abb. 33).



**Abb. 33:** HPLC-Chromatogramm einer Methylglyoxal-(+)-Catechin-Inkubation (72 h, 37 °C, pH 3,2)

Die Aldehyd-vermittelte Reaktion von (+)-Catechin und Malvidin-3-O-glucosid ist besonders gut für Acetaldehyd untersucht. Es ist bekannt, dass bei dieser Reaktion hauptsächlich zwei Strukturen gebildet werden, welche bei 520 nm absorbieren. [Es-Safi 1999b] Im Rahmen der vorliegenden Arbeit hatte Malvidin-3-O-glucosid in Inkubationen nach drei Tagen zur Hälfte zu den Folgestrukturen (I, II) reagiert. Der Vergleich zweier HPLC-Chromatogramme für 72 h-Inkubationen mit Acetaldehyd bzw. Methylglyoxal ist in Abb. 34 dargestellt.

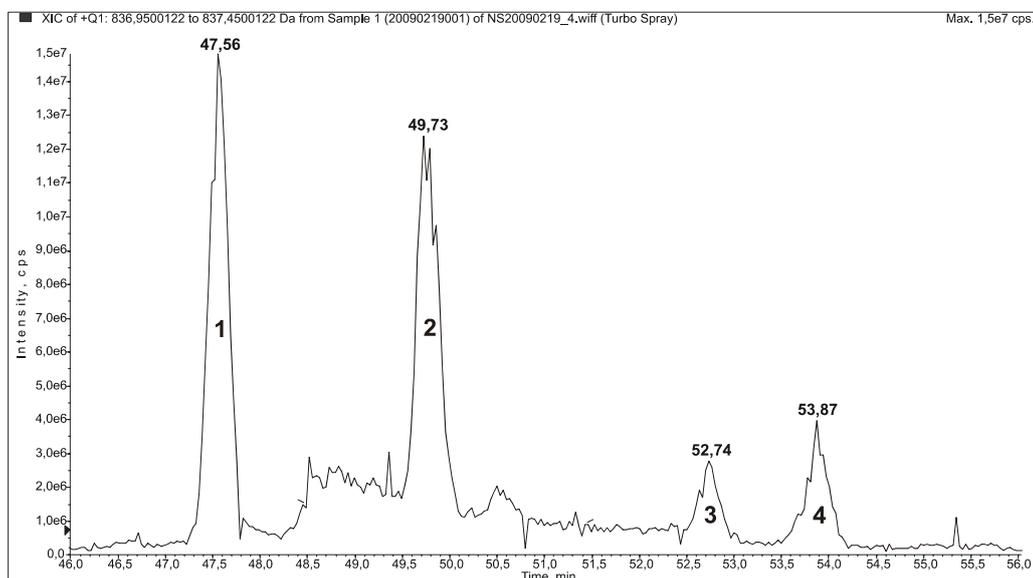


**Abb. 34:** HPLC-Chromatogramme der Acetaldehyd- (links) und Methylglyoxal-Inkubationen (rechts) (72 h, 37 °C)

In den Reaktionslösungen mit Methylglyoxal wurden nur Spuren neuer Strukturen gebildet. Da gleichzeitig Malvidin-3-O-glucosid nur langsam abgebaut wurde und keine polymeren Strukturen gebildet wurden, muss geschlussfolgert werden, dass Methylglyoxal im Vergleich zu Acetaldehyd deutlich weniger reaktiv ist.

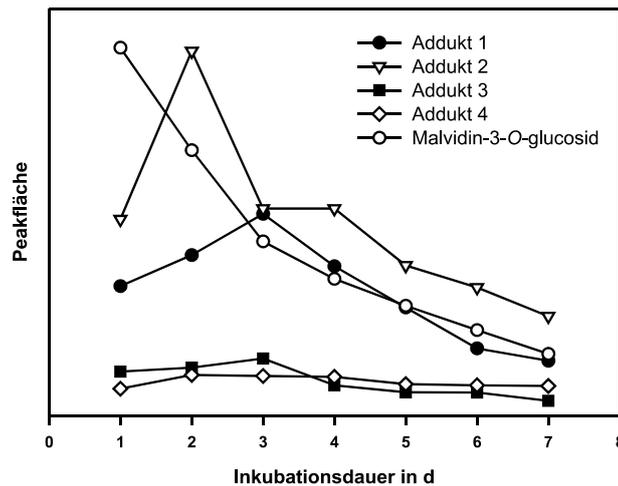
Zur Detektion der ggf. in sehr geringen Konzentrationen gebildeten postulierten acetonyl-verbrückten (+)-Catechin-Malvidin-3-O-glucosid-Dimere ( $[M^+] = 837$  Da) in dem entstandenen komplexen Reaktionsgemisch war eine Analyse mittels LC-MS<sup>2</sup> notwendig. Die Identifizierung mittels UV-Detektor bei der in Acetaldehydinkubationen spezifischen Wellenlänge von 520 nm war aufgrund zu geringer Gehalte sowie zahlreicher Störpeaks nicht erfolgreich.

Mittels LC-MS<sup>2</sup> konnten vier neue Verbindungen mit den Retentionszeiten 47,6 min, 49,7 min, 52,6 min und 53,9 min identifiziert werden, welche eine Molekülmasse von 837 Da aufwiesen (Abb. 35). Dies entspricht der Molekülmasse des postulierten Reaktionsproduktes aus (+)-Catechin, Malvidin-3-O-glucosid und Methylglyoxal. (siehe Abb. 40)



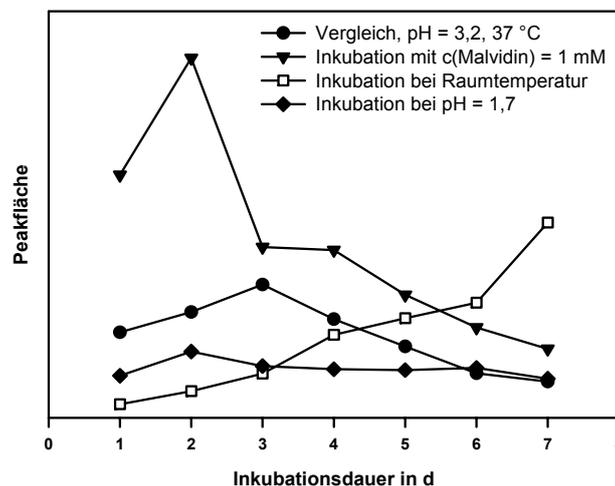
**Abb. 35:** LC-MS-Chromatogramm der Addukte aus Malvidin-3-O-glucosid und (+)-Catechin (Q1, 837 Da)

Die Bildung dieser Addukte wurde über einen Zeitraum von 7 Tagen beobachtet. Das entsprechende Zeit-Umsatz-Diagramm ist in Abb. 36 dargestellt.



**Abb. 36:** Bildung der Addukte mit der Masse 837 Da und Abbau von Malvidin-3-O-glucosid (37 °C, pH 3,2)

Die Konzentrationen an Malvidin-3-O-glucosid sowie (+)-Catechin (nicht dargestellt) verringern sich, während die Peakflächen der vier Addukte am Tag 2-3 ihr Maximum erreichen und anschließend wieder abnehmen. Es ist möglich, dass die gebildeten Reaktionsprodukte zu höher polymeren Strukturen weiterreagieren. Die gebildete Konzentration der Addukte in den Reaktionslösungen hängt insbesondere von drei Faktoren ab: von der Konzentration an Malvidin-3-O-glucosid, von der Temperatur und vom pH-Wert (Abb. 37).

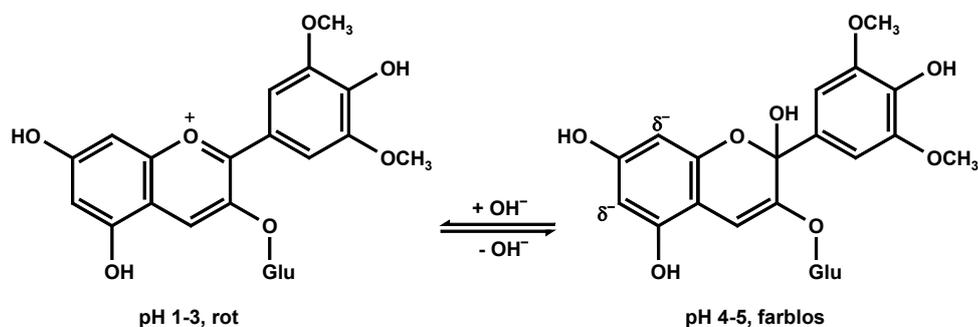


**Abb. 37:** Bildung von Addukt 1 bei unterschiedlichen Bedingungen

Die Standard-Inkubationen enthielten 0,51 mM Malvidin-3-O-glucosid, 2,3 mM (+)-Catechin sowie 5,7 mM Methylglyoxal. Diese Zusammensetzung war an die in anderen Veröffentlichungen verwendeten Konzentrationen angelehnt. [Pissarra 2003] Eine Verdopplung der Malvidin-3-O-glucosid-Konzentration führte

erwartungsgemäß zu einer verstärkten Bildung der Addukte. Die höchste Konzentration ist bei einem äquimolaren Verhältnis von (+)-Catechin und Malvidin-3-O-glucosid zu erwarten. Der zweite Einflussfaktor ist die Temperatur, bei der die Inkubationen durchgeführt werden. So verliefen die Reaktionen bei Raumtemperatur deutlich langsamer und die Addukte erreichten ihr Maximum bis Tag 16 nicht. Gleichzeitig führte dies aber auch zur Bildung höherer Konzentrationen der zu untersuchenden Dimere. Dies ist auf die durch die niedrigere Temperatur gleichzeitig verlangsamte Folgereaktion zurückzuführen. Zusätzlich wird der Abbau an Malvidin-3-O-glucosid verlangsamt, sodass es für die Reaktion mit Methylglyoxal und (+)-Catechin zur Verfügung stand.

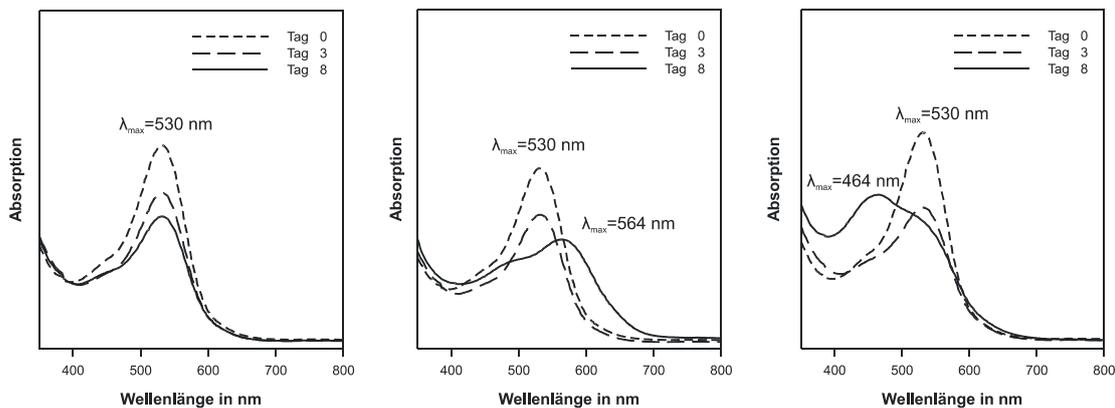
Der pH-Wert wirkt sich unterschiedlich auf die verschiedenen Reaktionspartner aus. Ein niedriger pH-Wert begünstigt die Protonierung des Aldehyds und damit die Bildung des Carbokations, welches anschließend mit (+)-Catechin bzw. Malvidin-3-O-glucosid reagiert. Bei vergleichenden Untersuchungen der Reaktion bei einem pH-Wert von 3,2 sowie 1,7 wurde jedoch ein umgekehrter Zusammenhang festgestellt. Die Konzentration an gebildeten Addukten verringerte sich mit sinkendem pH-Wert. Die Ursache dieses Verhaltens liegt in der pH-Abhängigkeit des Reaktionspartners Malvidin-3-O-glucosid (siehe Abb. 38).



**Abb. 38:** Bildung der Partialladung in Abhängigkeit vom pH-Wert

Bei einem pH-Wert von 1,7 liegt Malvidin-3-O-glucosid vorrangig in der Flavylium-Form vor, bei welcher die positive Ladung über den A- und C-Ring delokalisiert ist. Für die Reaktion mit dem aus Methylglyoxal gebildeten Carbokation ist jedoch die neutrale Chromenol-Form Voraussetzung. Erst die Hydratisierung ermöglicht die für die Phenolreaktion erforderliche negativen Partialladungen in *o*-Position und macht so den Weg frei für den nucleophilen Angriff der Positionen C<sub>6</sub> und C<sub>8</sub> am Carbokation.

Während der Reaktion von (+)-Catechin mit Malvidin-3-O-glucosid in Anwesenheit von Methylglyoxal ändert sich die Farbe der Reaktionslösung von rot-violett nach rot-braun. Eine Reaktionslösung mit Acetaldehyd verändert dagegen ihre Farbe nach violett. In Abb. 39 ist die Veränderung der Absorptionsmaxima über die Reaktionsdauer dargestellt.

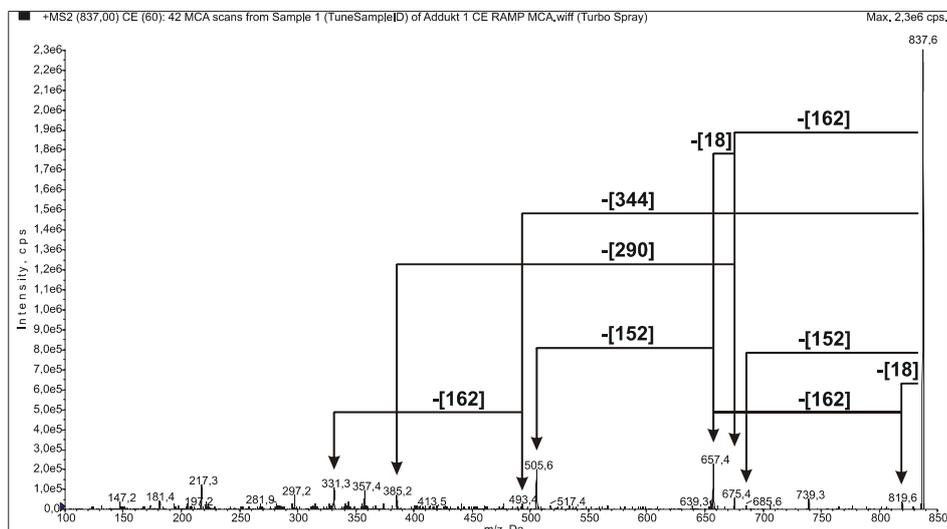
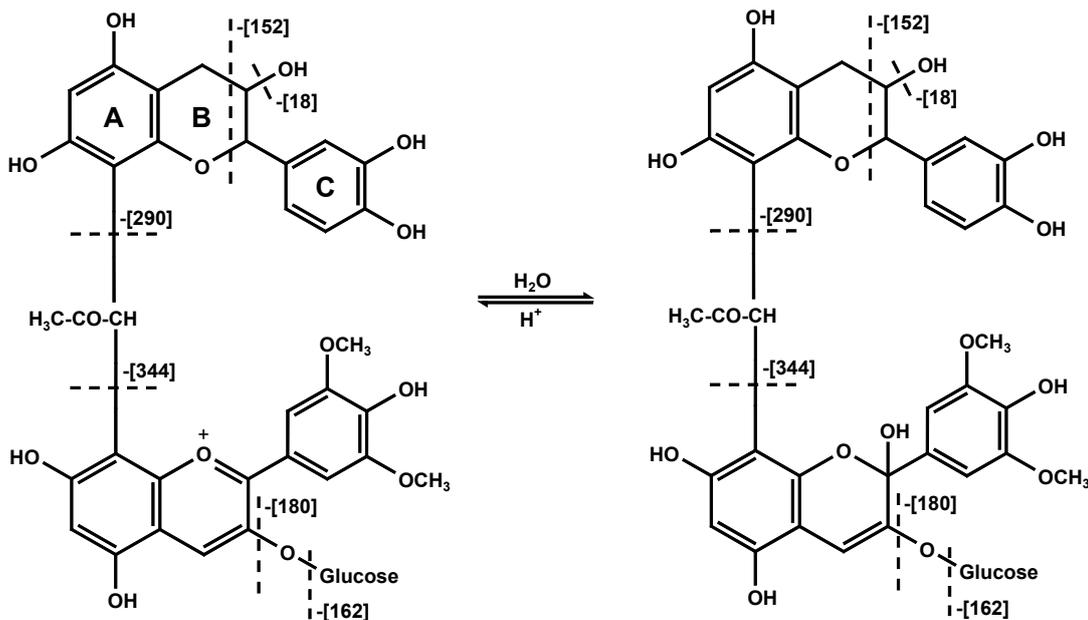


**Abb. 39:** Veränderung der Absorptionsmaxima von Inkubationslösungen (RT, pH 3,2):  
 Links: Malvidin-3-O-glucosid (0,51 mM), (+)-Catechin (2,3 mM),  
 Mitte: Malvidin-3-O-glucosid (0,51 mM), (+)-Catechin (2,3 mM) + Acetaldehyd (5,7 mM),  
 Rechts: Malvidin-3-O-glucosid (0,51 mM), (+)-Catechin (2,3 mM) + Methylglyoxal (5,7 mM)

Das Absorptionsmaximum einer Lösung von (+)-Catechin und Malvidin-3-O-glucosid in Abwesenheit eines Aldehyds verändert sich innerhalb von 8 Tagen nicht. Nur die Intensität nimmt durch den Abbau des Malvidin-3-O-glucosids ab. In einer Lösung, die zusätzlich Acetaldehyd enthält, verschiebt sich das Absorptionsmaximum von anfänglich 530 nm auf 564 nm und damit in Richtung violett. Den gegensätzlichen Effekt zeigt die Zugabe von Methylglyoxal. Das Absorptionsmaximum liegt hier nach 8 Tagen bei 460 nm (orange-braun). Dies ist vor allem durch die Bildung farbiger Verbindungen aus (+)-Catechin und Methylglyoxal zu erklären. Verbindungen mit einer Absorption über 500 nm werden wie oben gezeigt nur in sehr geringen Gehalten gebildet. (Abb. 34)

Bekanntere Verbindungen mit einem Absorptionsmaximum von 460 nm gehen auch aus der Reaktion von (+)-Catechin und Glyoxylsäure hervor – die so genannten Xanthylium-Salze (siehe 2.2.1). Diese Reaktion findet nicht in Anwesenheit von Acetaldehyd statt. Sie benötigt demnach eine Aldehyd-Verbindung, die in  $\alpha$ -Stellung eine weitere Carbonylfunktion besitzt. Dies ist bei Methylglyoxal ebenso wie bei Glyoxylsäure der Fall (vgl. Abb. 8). Weiterführende Untersuchungen zur Reaktion von (+)-Catechin mit Methylglyoxal bzw. Glyoxylsäure finden sich unter Punkt 3.6.2.

Die Aufklärung der postulierten Struktur der (+)-Catechin-Malvidin-3-O-glucosid-Addukte (siehe Abb. 31) sollte mittels LC-MS<sup>2</sup> und hoch auflösender Massenspektrometrie erfolgen. Eine Isolierung der Addukte für eine anschließende Aufklärung mittels Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) war aufgrund der sehr geringen Konzentrationen in den Inkubationslösungen sowie der Bildung zahlreicher Nebenprodukte nicht möglich.



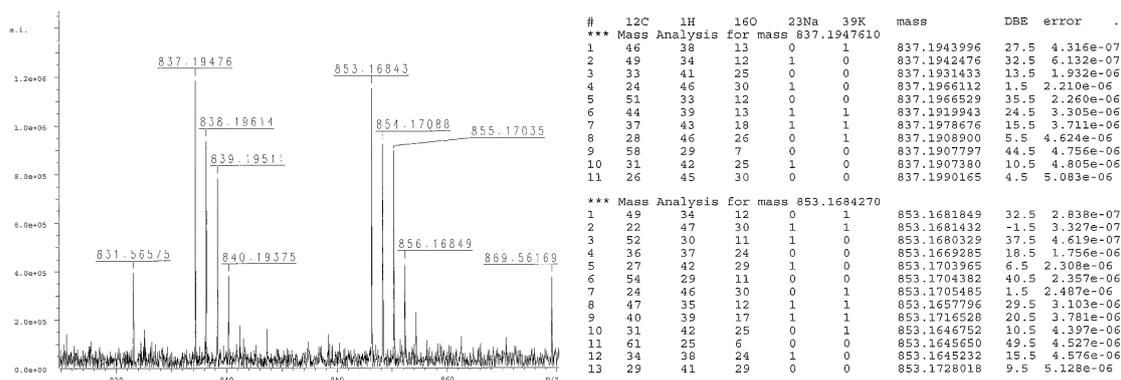
**Abb. 40:** MS<sup>2</sup>-Spektrum und zugeordnete Fragmentierungen des Adduktes 1

Abb. 40 zeigt das MS<sup>2</sup>-Spektrum des Adduktes 1 nach Spritzeninfusion. Die Verbindung wurde zuvor mittels analytischer HPLC angereichert. Der Molpeak [M<sup>+</sup>] entspricht mit m/z 837 im positiven Ionisierungs-Modus der Masse der postulierten Struktur. Der Verlust von m/z 162 weist auf die Abspaltung des

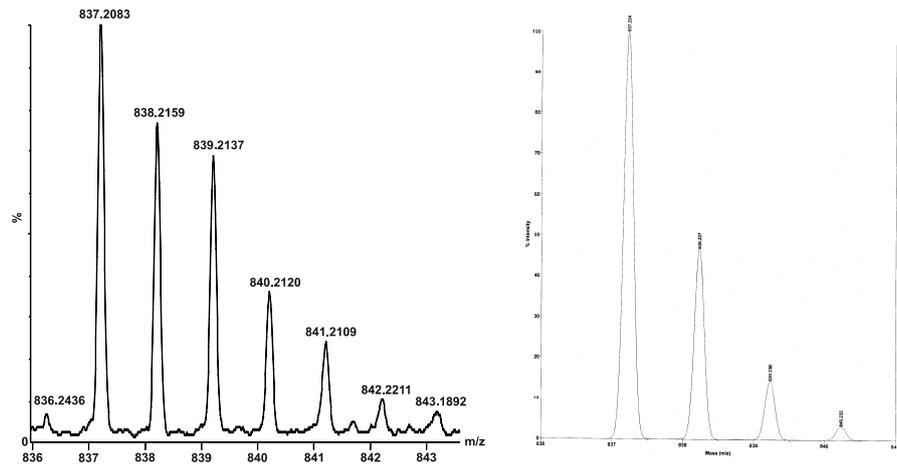
Glucoseresrestes hin und bildet die Fragmente bei  $m/z$  657 bzw.  $m/z$  675. Die Abspaltung eines Fragments  $m/z$  152 ist typisch für Flavan-3-ole. [Duenas 2006, Laurie 2006] Die erklärende Retro-Diels-Alder-Spaltung findet dabei am C-Ring des Moleküls statt. Die Fragmentierungen erlauben die Aussage, dass in dem Molekül neben (+)-Catechin auch Malvidin-3-O-glucosid enthalten sein muss, da es die einzige Glucose enthaltende Struktur im Reaktionsansatz war. Außerdem konnten auch Abspaltungen des (+)-Catechins als Fragment mit  $m/z$  290 zum Fragment  $m/z$  385 sowie die Abspaltung von  $m/z$  344 zu einem Fragment mit  $m/z$  493 beobachtet werden, welches der Molekularmasse von Malvidin-3-O-glucosid entspricht. Die Abspaltung von Wasser erzeugte einen Masseverlust von  $m/z$  18.

Die Zerfallsspektren der anderen drei Addukte (2-4) wiesen ein äquivalentes Fragmentierungsmuster auf (siehe Anhang).

Die Strukturbestätigung mittels hoch auflösender Massenspektrometrie erwies sich bei den geringen Konzentrationen als äußerst schwierig. Die zu untersuchenden Verbindungen wurden in mehreren Trennungen mittels analytischer HPLC abgesammelt. Die erhaltene Lösung wurde aufkonzentriert und dann mittels HR-MS vermessen.



**Abb. 41:** Hoch aufgelöste Masse und mögliche Summenformeln von Addukt 1

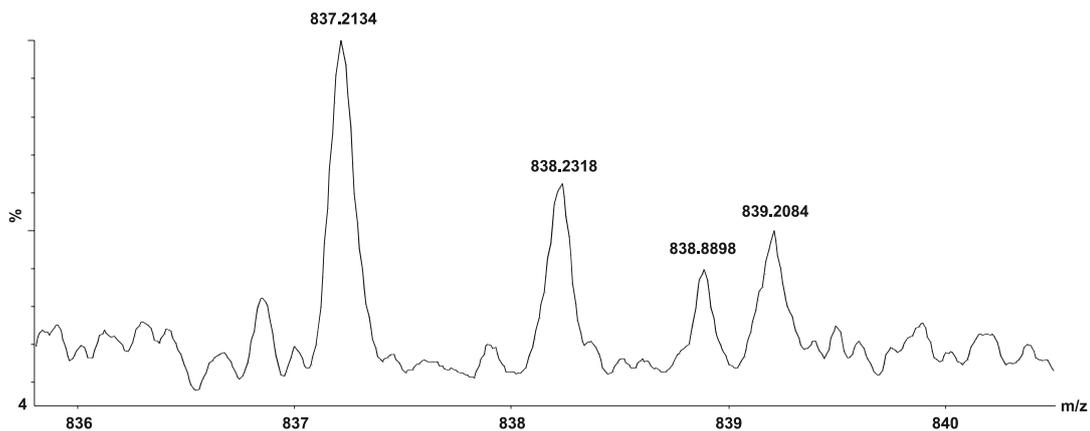


**Abb. 42:** Gemessenes (links) und berechnetes (rechts) Isotopenmuster von Addukt 1

In Abb. 41 ist das hoch aufgelöste Massenspektrum des Adduktes 1 mit der Molekülmasse 837 Da sowie die möglichen errechneten Summenformeln für ein Molekül mit der Masse 837,1948 Da und in Abb. 42 das gemessene und berechnete Isotopenverhältnis dargestellt. Wie zu erkennen, stimmt das reale Isotopenverhältnis nicht mit dem berechneten überein. Die errechnete genaue Molekülmasse beträgt zudem 837,223 Da.

Die Isotopenverhältnisse lassen auf ein chloriertes Derivat mit der Masse 837 Da schließen. Da jedoch der Inkubationslösung weder Chlorid zugesetzt wurde, noch die Bedingungen für eine Chlorierung gegeben waren, kann das Isotopenverhältnis nicht erklärt werden. Es ist deshalb davon auszugehen, dass andere Substanzen die Peaks überlagern und damit das Verhältnis verfälschen. Die Untersuchung der Original-Inkubation ergab keine Verbindungen mit den Massen 838 und 839 Da, die als Verunreinigungen in Frage kommen konnten. Die Kontamination musste daher während der Aufarbeitung erfolgt sein.

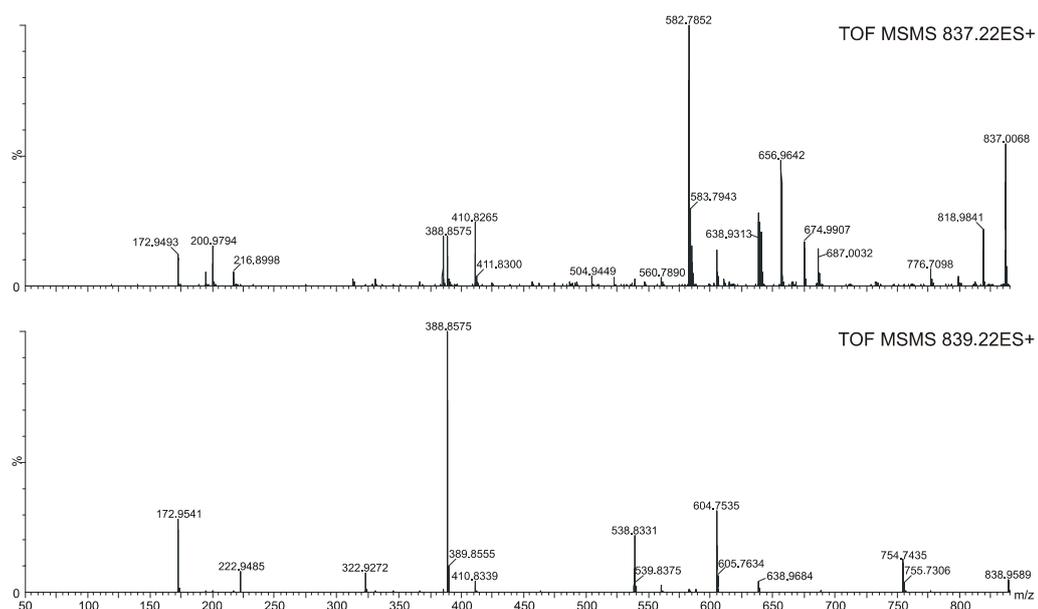
Die Bestimmung der exakten Molekülmasse direkt aus der Inkubationslösung konnte aufgrund der fehlenden Trennung nicht für jedes Addukt einzeln erfolgen. Das resultierende Isotopenverhältnis für alle Verbindungen mit der Masse 837 Da ist in Abb. 43 dargestellt.



**Abb. 43:** Isotopenverhältnis aller Verbindungen von  $m/z = 837$  amu direkt aus einer Malvidin-3-O-glucosid-(+)-Catechin-Inkubation

Die so ermittelte Molekülmasse von 837,2134 Da stimmt mit der theoretisch berechneten Masse von 837,223 Da deutlich besser überein. Zusätzlich entspricht auch das Isotopenverhältnis für  $[M+1]$  dem Berechneten. Wie jedoch an der Peakschulter zu erkennen ist, wird der Peak für  $[M+2]$  durch einen anderen überlagert und es ergeben sich Abweichungen in Peakgröße und Molekülmasse.

Zur Absicherung wurde eine Fragmentierung der Peaks 837,2134 Da sowie 839,2054 Da durchgeführt. Bei identischen Verbindungen dürfen sich die erhaltenen Zerfallsspektren nur unwesentlich unterscheiden. Wie in Abb. 44 dargestellt, entspricht das Spektrum der Masse 839 Da in keiner Weise dem Spektrum der Masse 837 Da, was nur den Schluss zulässt, dass es sich um zwei unterschiedliche Verbindungen handelt.

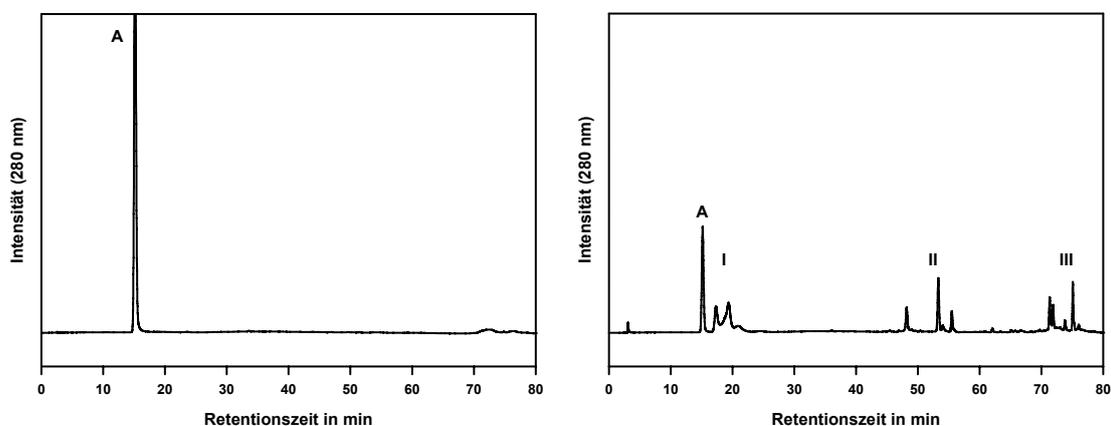


**Abb. 44:** Zerfallsspektren ( $MS^2$ ) der Massen  $m/z = 837$  amu (oben) und  $m/z = 839$  amu (unten)

Die Aufkonzentrierung der Addukte ohne Kontamination war letztendlich nicht erfolgreich. Damit konnte die exakte Molekülmasse und folgend auch die Summenformel nicht bestimmt werden. Die Absicherung der postulierten Struktur der identifizierten Addukte steht daher noch aus.

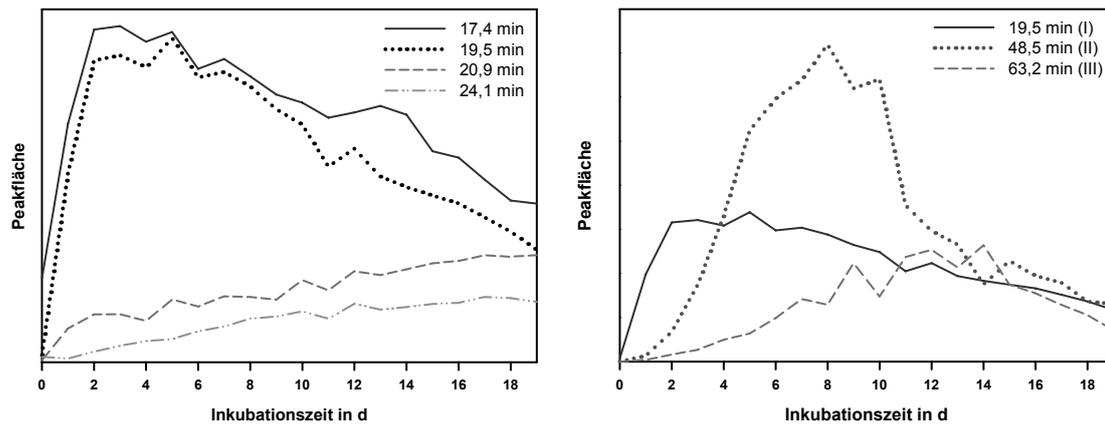
### 3.6.2 Reaktion von (+)-Catechin mit Methylglyoxal unter weinähnlichen Bedingungen

Äquivalent zu den (+)-Catechin/Malvidin-3-O-glucosid/Methylglyoxal-Inkubationen wurden auch Inkubationen, welche nur (+)-Catechin sowie Methylglyoxal enthielten, untersucht. Dazu wurden zwei (+)-Catechin-Inkubationen durchgeführt, einerseits mit Methylglyoxal und zum Vergleich in Abwesenheit von Methylglyoxal. Beide Proben wurden für drei Tage bei 50 °C inkubiert. Abb. 45 zeigt die HPLC-Chromatogramme der beiden Proben bei 280 nm.



**Abb. 45:** HPLC-Chromatogramme der Inkubation von (+)-Catechin (A) (links) und (+)-Catechin und Methylglyoxal (rechts) (3 d, 50 °C, pH 3,2)

In Anwesenheit von Methylglyoxal sind nach drei Tagen Inkubationszeit zahlreiche neue Strukturen zu erkennen. Diese können grob nach ihrer Polarität in drei Klassen (I, II, III) eingeteilt werden. Die polareren Substanzen der Klasse I eluieren deutlich früher als die unpolaren Verbindungen der Klassen II und III. Die (+)-Catechin-Methylglyoxal-Inkubationen wurden über einen Zeitraum von 19 Tagen mittels HPLC-UV untersucht. Abb. 46 zeigt die Entwicklung ausgesuchter Verbindungen während der gesamten Inkubationszeit.



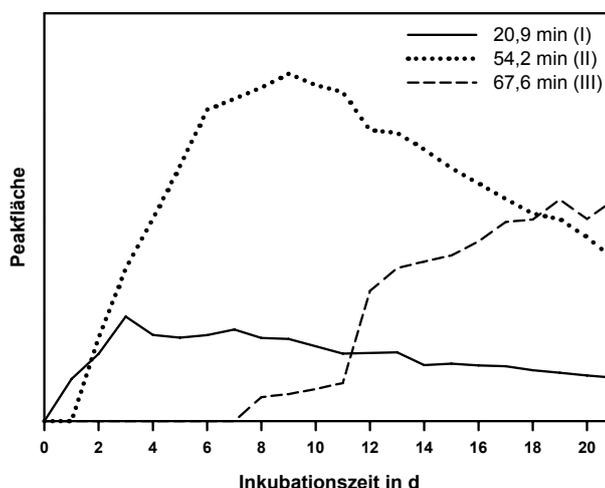
**Abb. 46:** Bildung der verschiedenen Verbindungen der Klasse I (links) und je einer Verbindung der Klassen I–III (rechts) (50 °C, pH 3,2,  $c(\text{Mv-3-O-glu})=0,52 \text{ mM}$ ,  $c((+)\text{-Catechin})=2,3 \text{ mM}$ ,  $c(\text{Methylglyoxal})=5,7 \text{ mM}$ )

Anhand des Verlaufes der Konzentrationen der verschiedenen Verbindungen können mehrere Aussagen abgeleitet werden. Die Verbindungen der Klasse I unterscheiden sich hinsichtlich ihres Bildungsverhaltens. So stieg die Konzentration der Strukturen mit den Retentionszeiten 17,4 min und 19,5 min innerhalb der ersten drei Tage schnell an und fiel dann durch Folgereaktionen langsam ab. Nach 19 Tagen betrug die Konzentration noch ca. die Hälfte des Maximums. Im Gegensatz dazu stiegen die Gehalte der Verbindungen mit den Retentionszeiten 20,9 min sowie 24,1 min kontinuierlich an und erreichten ihr Maximum auch nach 19 Tagen nicht.

Abb. 46 zeigt außerdem den Gehalt je einer Substanz der Klasse I, II und III über die vollständige Inkubationszeit. Jede der drei Verbindungen steigt im Laufe der 19 Tage bis zu einem Maximum und fällt dann wieder ab. Die Substanz der Klasse I hat ihr Maximum bereits nach ca. 3 Tagen, die der Klasse II nach etwa 8 Tagen und die Verbindung der Klasse III nach 13 Tagen. Die drei Kurven sind zeitlich verschoben und die Bildung der nächsten Klasse geht mit dem Abbau der vorangegangenen Klasse einher. Daraus kann geschlossen werden, dass die drei Substanzklassen mechanistisch in Verbindung stehen und zumindest ein Teil der Strukturen Folgeprodukte darstellt. Zuerst werden die niedermolekularen Verbindungen der Klasse I gebildet, durch Folgereaktionen mit (+)-Catechin oder sich selbst bildet sich dann Klasse II, welche anschließend zu den höhermolekularen Substanzen der Klasse III weiterreagiert.

Diese Schlussfolgerung wird durch die Beobachtungen an Inkubationen mit einem Überschuss (1 mM) an Methylglyoxal bestätigt. Es ist davon auszugehen, dass

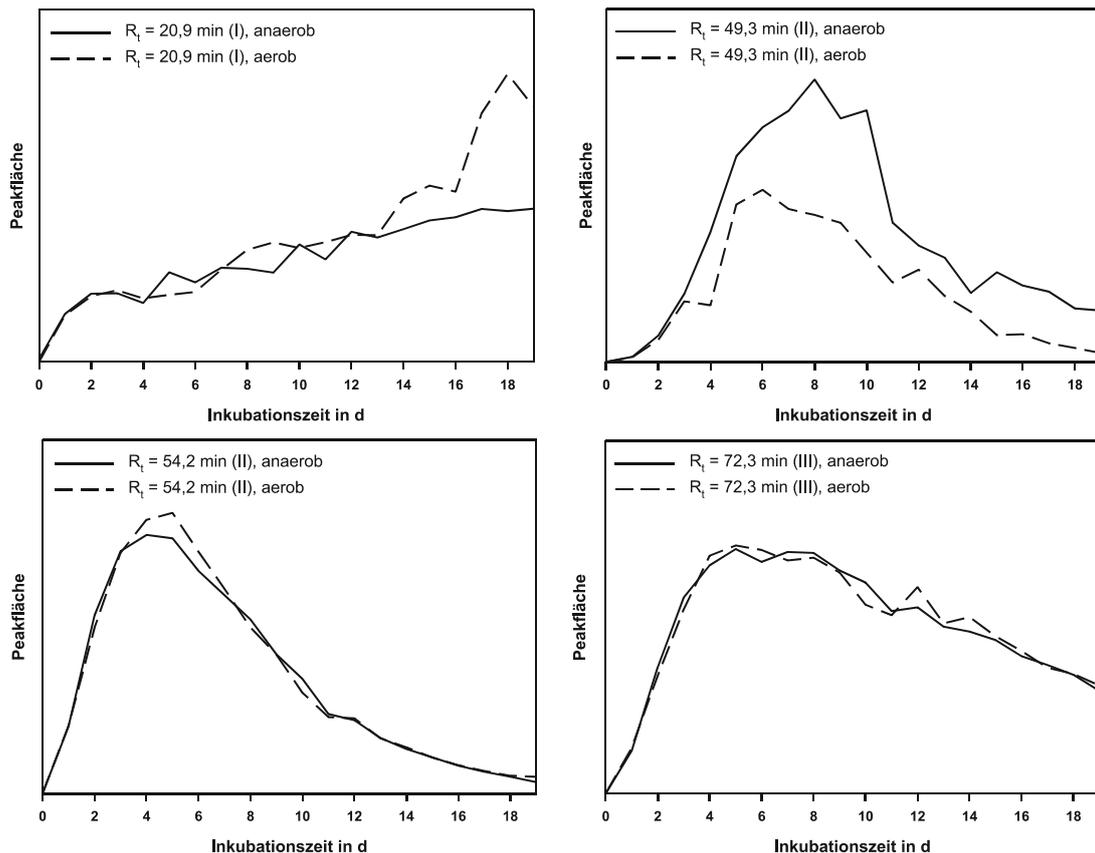
Methylglyoxal schon innerhalb weniger Tage durch Abbau und Reaktion mit (+)-Catechin verbraucht ist und nicht mehr frei für Reaktionen zur Verfügung steht.



**Abb. 47:** Zeitlicher Verlauf der Bildung der Verbindungen der Klassen I–III bei geringer Methylglyoxal-Konzentration ( $c = 1 \text{ mM}$ ) ( $50 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH } 3,2$ )

Die Veränderung der Methylglyoxal-Konzentration hatte nur geringen Einfluss auf den Verlauf der Reaktion (Abb. 47). Die Bildung der Substanz der Klasse I blieb unverändert. Substanzklasse II (54,2 min) wurde ebenfalls unverändert schnell gebildet, jedoch langsamer abgebaut. Die Bildung der Struktur der Klasse III war deutlich verzögert. War das Maximum bei einem Überschuss an Methylglyoxal bereits nach 13 Tagen erreicht, wurde die Verbindung unter den hier genannten Bedingungen erst ab etwa Tag 7 gebildet und stieg bis Tag 21 kontinuierlich an. Das bestätigt, dass zumindest für die Bildung der Klasse III Methylglyoxal nicht zwingend erforderlich ist und dass es sich dabei um Folgestrukturen der Klassen I und/oder II handelt.

Alle Inkubationen wurden unter anaeroben Bedingungen unter Argon-Atmosphäre durchgeführt. Dies sollte die Bedingungen in einer Weinflasche simulieren, in der Wein nach dem Verschließen nur einer kleinen Menge Sauerstoff ausgesetzt ist. Um jedoch den Einfluss von Sauerstoff auf die Reaktion beurteilen zu können, wurden Vergleichsinkubationen vermessen, welche während der Reaktion mit Luft überschichtet waren. Die Auswirkungen auf die Bildung der verschiedenen Substanzklassen ist beispielhaft an einigen Verbindungen in Abb. 48 dargestellt.

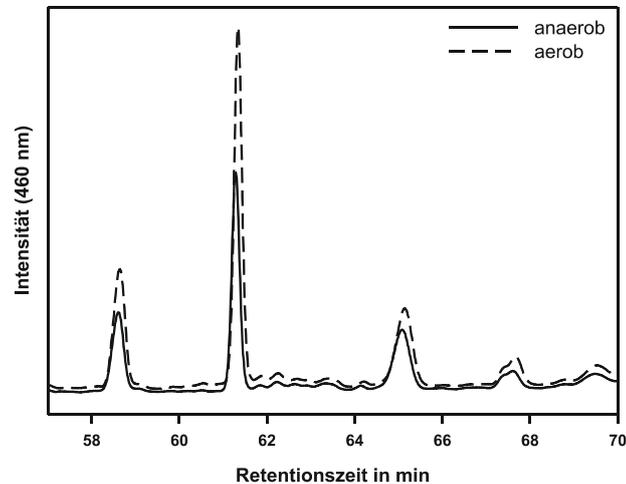


**Abb. 48:** Bildung der Addukte der Klassen I-III unter aeroben und anaeroben Bedingungen (50 °C, pH 3,2)

Unter aeroben Bedingungen wurde erwartet, dass die Konzentration der gebildeten Verbindungen abnimmt, da Nebenreaktionen und Oxidationen zu weiteren Reaktionsprodukten führen sollten. Die Anwesenheit von Sauerstoff beeinflusste die Reaktionen jedoch kaum. Von den in Abb. 48 dargestellten Substanzen verringerte sich allein die maximale gebildete Konzentration der Verbindung mit der Retentionszeit von 49,3 min in aeroben Inkubationen um etwa 40 %. Die Verbindung oder deren Precursor sind daher als oxidationsempfindlich einzustufen.

Inkubationen, welche unter aeroben Bedingungen durchgeführt wurden, zeigten auch eine andere Farbveränderung als Reaktionsansätze, welche mit Argon überschichtet wurden. Aerobe Lösungen zeigten deutlich intensivere Verfärbungen von farblos zu goldgelb. Dies kann nur durch die verstärkte Bildung neuartiger Strukturen erklärt werden. Für die Farbänderung der Lösungen sind Substanzen verantwortlich, welche bei einem Maximum von 460 nm absorbierten, eine Retentionszeit zwischen 54 und 70 Minuten besitzen und auch in den Inkubationen aus (+)-Catechin, Methylglyoxal und Malvidin-3-O-glucosid identifiziert werden konnten. Es handelt sich sehr wahrscheinlich, wie unter 3.6.1

beschrieben, um Xanthylium-Salze aus der Reaktion von (+)-Catechin mit Methylglyoxal. Abb. 49 zeigt einen Vergleich der Chromatogramme beider Reaktionslösungen zur entsprechenden Retentionszeit.



**Abb. 49:** Vergleich der HPLC-Chromatogramme einer anaeroben und einer aeroben Inkubation von (+)-Catechin und Methylglyoxal (12 d, 50 °C, pH 3,2)

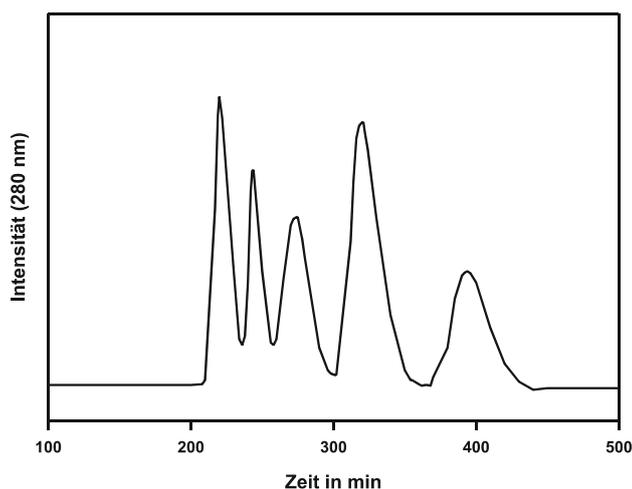
Untersuchungen zur Kinetik und zum Sauerstoffeinfluss auf die Bildung der verschiedenen gebildeten Verbindungen bestätigten, dass erwartungsgemäß nicht alle Reaktionsprodukte dem gleichen Bildungsmechanismus unterliegen. Als mögliche Vorläuferstrukturen der gefärbten Verbindungen kommen Addukte mit den Retentionszeiten 20,9 min und 24,1 min infrage. Diese zeigten ein zu den anderen Addukten abweichendes Reaktionsverhalten und bildeten sich unter Einfluss von Sauerstoff geringfügig stärker.

Auch bei der Reaktion von (+)-Catechin mit Methylglyoxal sollte der Einfluss des pH-Wertes auf die Bildungsgeschwindigkeit der Addukte bestimmt werden. Sang führte vergleichbare Reaktionen mit Epigallocatechingallat und Methylglyoxal bei einem pH-Wert von 7,4 durch. Bei diesen Versuchen war bereits nach 5 Minuten 90 % des Methylglyoxals verbraucht. Aus diesem Grund wurde die Reaktion von (+)-Catechin mit Methylglyoxal ebenfalls bei einem pH-Wert von 7,4 in Phosphatpuffer durchgeführt. Unter diesen Bedingungen bildeten sich die Addukte mit deutlich höherer Geschwindigkeit, sodass die Addukte der Klasse I bereits nach 60 Minuten nachweisbar waren. Diese Reaktion benötigte bei einem pH-Wert von 3,2 mehrere Stunden. Der leicht alkalische pH-Wert von 7,4 erhöht

offensichtlich die Nucleophilie an Position C<sub>6</sub> und C<sub>8</sub> des A-Rings von (+)-Catechin und begünstigt somit die Reaktion mit Methylglyoxal. [Sang 2007]

Die Substanzen der Klasse I sollten unter Verwendung von präparativer HPLC getrennt und anschließend mittels NMR sowie hoch auflösender Massenspektrometrie aufgeklärt werden. Die MLCCC wurde ebenfalls zur Isolierung und Aufreinigung der Addukte eingesetzt, was ebenfalls letztlich nicht erfolgreich war. Es wurden verschiedene Laufmittel für dieses Trennproblem getestet, wobei sich das Laufmittel Wasser/Ethylacetat/n-Butanol im Verhältnis 2:1:1 am besten eignete. Hier war die Verteilung der zu isolierenden Verbindungen zwischen der organischen und wässrigen Phase ideal. Eine Trennung der verschiedenen Addukte war dennoch nicht erfolgreich. Die Analyse des einzigen getrennten Peaks mittels HPLC ergab, dass alle Addukte in dem isolierten Material vorhanden waren. Eine vollständige Trennung wäre nur bei deutlich späterer Retention der Substanzen auf der MLCCC denkbar, wurde aber als unwirtschaftlich eingeschätzt und daher nicht weiter verfolgt.

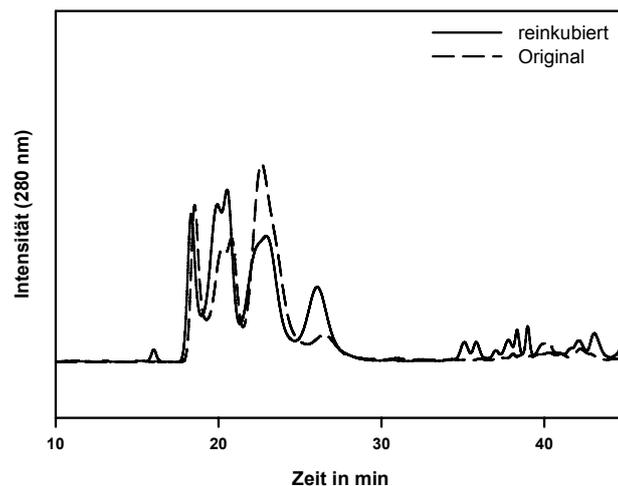
Die Isolierung der zu untersuchenden Verbindungen wurde deshalb mit der präparativen HPLC durchgeführt. Nach Optimierung der Chromatographie-Bedingungen konnte im Vergleich zur MLCCC eine deutlich bessere Trennung erzielt werden. (siehe Abb. 50)



**Abb. 50:** Chromatogramm der präparativen HPLC der Addukte der Klasse I

Mit dieser Methode wurde die Auftrennung in fünf Peaks erreicht. Zum Teil bestehen diese aber aus mehreren koeluiierenden Verbindungen. Insgesamt war es möglich, pro Peak ca. 15-45 mg Substanz zu isolieren, die zum Teil aber

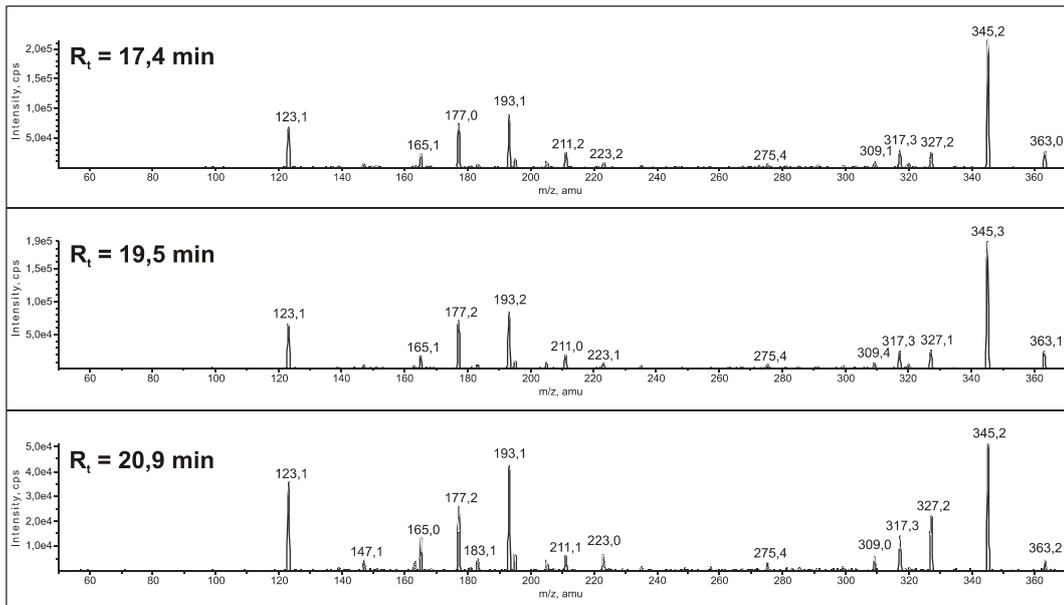
verunreinigt waren. Eine abschließende Aufreinigung der vereinigten HPLC-Läufe führte nicht zur gewünschten Reinheit, sondern zu ebenfalls komplexen Mischungen. Die Frage der Stabilität der einzelnen Verbindungen wurde durch folgenden Versuch beantwortet. Ein aufgereinigter Peak wurde vom Lösemittel befreit, in Wasser aufgenommen und in mehrere Ansätze geteilt. Der eine Teil wurde direkt eingefroren, der andere für 3 Tage bei 50 °C reinkubiert. Abb. 51 zeigt die HPLC-Chromatogramme beider Probelösungen im Vergleich.



**Abb. 51:** Vergleich einer reinkubierten Probe von vorgereinigten Addukten der Klasse I im Vergleich zur Ausgangslösung

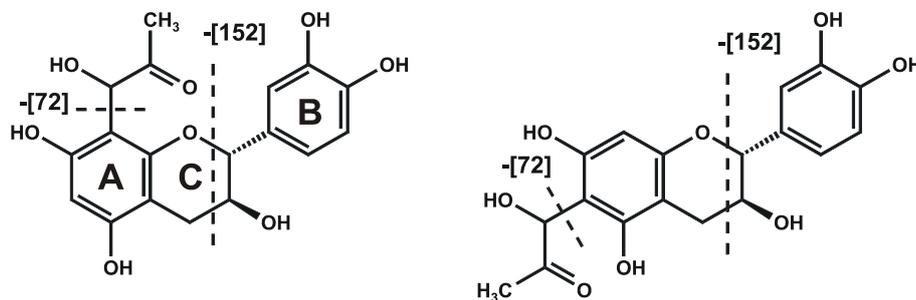
Es konnte beobachtet werden, dass sich die Verhältnisse zwischen den verschiedenen Verbindungen verändern, sie sich also ineinander umlagerten. Während ein Teil der Verbindungen während der Reinkubation abgebaut wurde, nahmen benachbarte Signale zu. In Konsequenz machte dies eine Aufreinigung für NMR sowie HR-MS mittels präparativer HPLC unmöglich.

Die Aufklärung der Struktur der zu untersuchenden Verbindungen konnte aufgrund dessen alleinig mittels LC-MS<sup>n</sup> erfolgen. Dieses Verfahren kann aber nur Hinweise auf die Struktur der Substanzen geben. Es wurden mindestens fünf verschiedene Verbindungen der Klasse I identifiziert, die jedoch nicht vollständig getrennt werden konnten. Für die Aufklärung der Struktur wurden MS<sup>2</sup>-Spektren aufgenommen und ausgewertet. Alle untersuchten Verbindungen hatten dieselbe Molekülmasse von 362 Da ( $[M+H]^+ = 363$  Da). Dies entspricht den Addukten aus einem Molekül (+)-Catechin und einem Molekül Methylglyoxal, welche schon von Sang nachgewiesen werden konnten. [Sang 2007] Abb. 52 zeigt die MS<sup>2</sup>-Spektren dreier ausgewählter Verbindungen.



**Abb. 52:** MS<sup>2</sup>-Spektren der (+)-Catechin-Methylglyoxal-Addukte der Klasse I

Alle drei Verbindungen wiesen ein identisches Fragmentierungsmuster mit charakteristischen Zerfällen auf. In Abb. 53 sind die typischen Fragmentierungen der postulierten Verbindungen aufgezeigt.



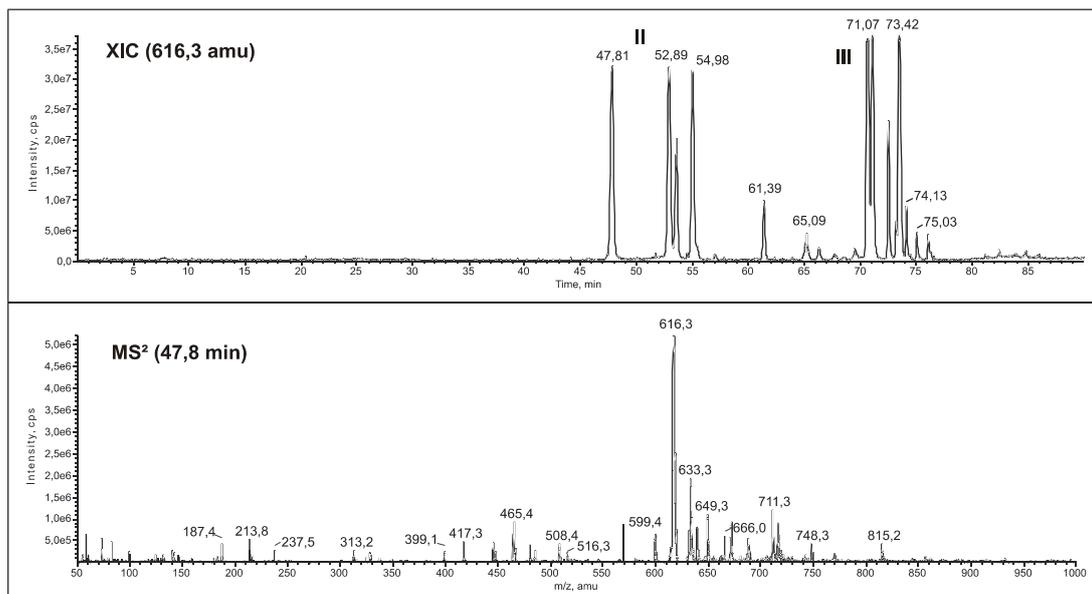
**Abb. 53:** Fragmentierungen der (+)-Catechin-Methylglyoxal-Addukte

Die Abspaltung von m/z 152 durch die Retro-Diels-Alder-Spaltung des C-Ringes von (+)-Catechin konnte bei allen Verbindungen beobachtet werden (Fragmentmasse m/z 211 und 193). Eine Reaktion des Methylglyoxals am B-Ring kann damit ausgeschlossen werden. Die Abspaltung des Methylglyoxals mit der Masse 72 Da war hingegen nicht eindeutig nachweisbar.

Das identische Zerfallsmuster sowie das gleiche kinetische Verhalten der ersten beiden Verbindungen (Retentionszeit 17,4 min und 19,5 min) lässt wie erwartet auf isomere Strukturen schließen. Trotz eines abweichenden Bildungsverhaltens wie die dritte Verbindung (R<sub>t</sub> = 20,9 min) eine identische Fragmentierung auf. Es

handelt sich offenbar um ein weiteres Isomer, welches jedoch durch einen abweichenden Reaktionsmechanismus gebildet wird.

Die Molekülmassen der Folgestrukturen konnten im Zuge dieser Arbeit nicht ermittelt werden. Jedoch besitzt ein Großteil der Verbindungen das identische Fragment bei  $m/z$  616 (siehe Abb. 54), was auf eine Strukturverwandtschaft schließen lässt.



**Abb. 54:** Massenspur  $m/z = 616,3$  (oben) und beispielhaftes  $MS^2$  der Verbindung mit  $R_t = 47,8$  min (unten)

Dieses Fragment konnte nur bei den höher polymeren Strukturen der Klassen II und III gemessen werden. Die zuvor erwähnten farbigen Strukturen mit dem Absorptionsmaximum von 460 nm sowie einer Retentionszeit von beispielsweise 59 min erzeugten nicht dieses Fragment, was zusätzlich zu Farbe und Kinetik beweist, dass es sich bei diesen Verbindungen um grundsätzlich andere Strukturklassen handelt.

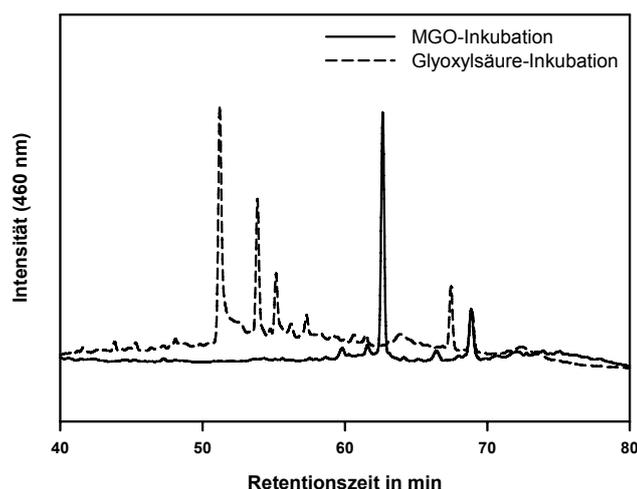
### 3.6.3 Vergleichende Reaktion von (+)-Catechin mit Glyoxylsäure unter weinähnlichen Bedingungen

Die Reaktionslösungen aus (+)-Catechin und Methylglyoxal veränderten ihre Farbe während der Inkubation von farblos zu goldgelb. Unter Sauerstoff-

Atmosphäre inkubierte Proben zeigten eine stärkere Färbung als jene, die unter Argon reagierten. Zur Identifizierung der Verbindungen, die für die Färbung verantwortlich waren, wurde jeweils eine 5- und 12-Tages-Inkubation mittels HPLC-DAD vermessen. Alle farbigen Strukturen wiesen ein gemeinsames Wellenlängen-Maximum von 460 nm auf und eluierten bei Retentionszeiten zwischen 54 und 70 Minuten.

In der Literatur sind bereits Verbindungen beschrieben, die bei der Reaktion von (+)-Catechin gebildet werden und bei einer Wellenlänge von 460 nm ein Maximum besitzen. Es handelt sich dabei um so genannte Xanthylium-Salze (siehe Abb. 7) aus der Reaktion von zwei Molekülen (+)-Catechin mit einem Molekül Glyoxylsäure. Glyoxylsäure entsteht in Wein durch Oxidation von Weinsäure. [Es-Safi 2000, Fulcrand 1997]

Um eine Oxidation der im Inkubationsansatz enthaltenen Weinsäure zu Glyoxylsäure auszuschließen, wurden zwei Vergleichsinkubationen durchgeführt. Zum einen wurde die Inkubation von (+)-Catechin mit Methylglyoxal wiederholt. In diesem Ansatz wurde jedoch der Komplexbildner DTPA (Diethylentriaminpentaessigsäure) zugesetzt, um in der Lösung vorhandene Metallionen zu komplexieren und damit die Katalyse einer möglichen Oxidation zu verhindern. Zusätzlich wurde der verwendete Puffer vor der Verwendung mit Helium entgast. Der zweite Inkubationsansatz enthielt statt Methylglyoxal Glyoxylsäure.



**Abb. 55:** HPLC-Chromatogramme der (+)-Catechin-Inkubationen mit Methylglyoxal bzw. Glyoxylsäure

Wie aus Abb. 55 ersichtlich wird, werden die farbigen Verbindungen auch dann gebildet, wenn die Reaktion unter vollständigem Ausschluss von Sauerstoff stattfindet und mögliche katalytisch wirkende Metalle komplexiert wurden. Es kann

also ausgeschlossen werden, dass es sich hierbei um die bereits bekannten Verbindungen der Reaktion von (+)-Catechin mit Glyoxylsäure handelt.

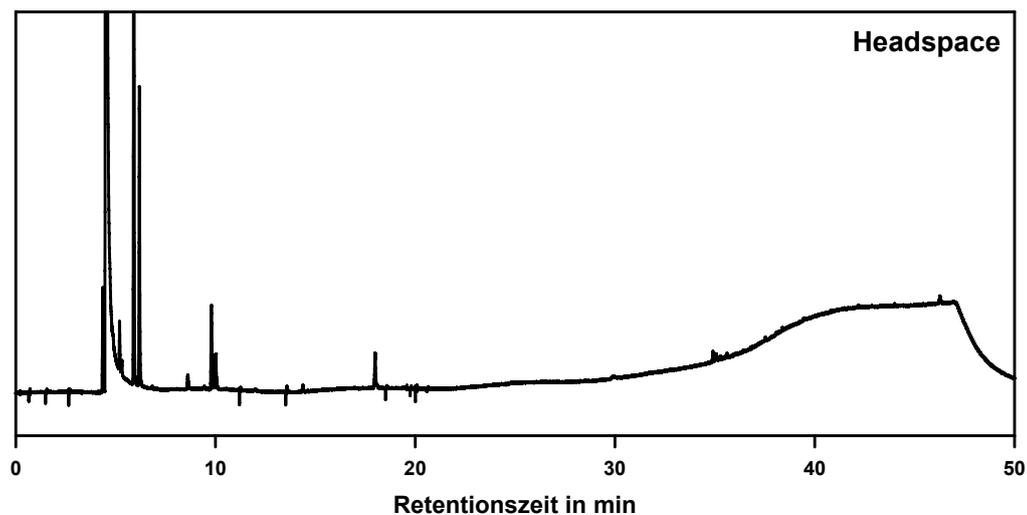
Dies bestätigt auch die Inkubation von (+)-Catechin mit Glyoxylsäure, welche bereits nach zwei Tagen orange-braun gefärbt war. Es bildeten sich innerhalb dieser Zeit große Mengen an farbigen Verbindungen, welche wie erwartet bei 460 nm absorbierten. Ein Vergleich der Retentionszeiten mit den Signalen aus den (+)-Catechin-Methylglyoxal-Inkubationen zeigt jedoch, dass es sich hierbei um unterschiedliche Reaktionsprodukte handelte.

### 3.7 Einfluss von Stabilisierungsmitteln auf die Alterung von Bier

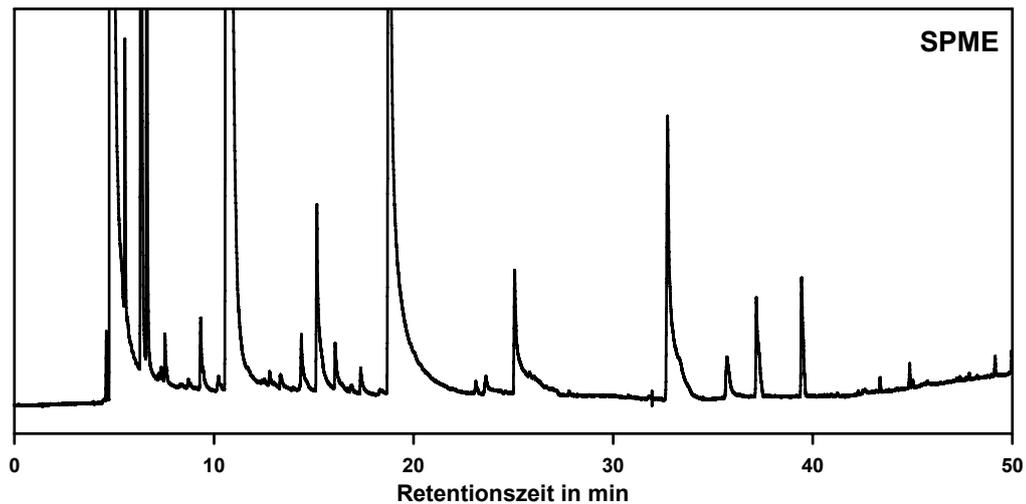
#### 3.7.1 Entwicklung einer Methode zur Aufnahme des Aromaprofils von Bier

Für die Untersuchung von flüchtigen Verbindungen standen verschiedene gaschromatographische Methoden zur Verfügung: Headspace, „solid phase micro extraction“ (SPME) oder die direkte Injektion eines Aromaextraktes. Bei der Analyse mittels Headspace und SPME war nahezu keine Aufarbeitung der Probe notwendig. Die Herstellung eines Aromaextraktes war jedoch mit erheblichem Aufarbeitungsaufwand verbunden. Die flüchtigen Verbindungen mussten zunächst von den nicht-flüchtigen Verbindungen getrennt und anschließend extrahiert und aufkonzentriert werden.

In den folgenden Abb. 56 und Abb. 57 sind die Chromatogramme einer Headspace- und einer SPME-Analyse von frischem Bier dargestellt.



**Abb. 56:** GC-FID-Chromatogramm der Analyse der flüchtigen Verbindung mittels HS

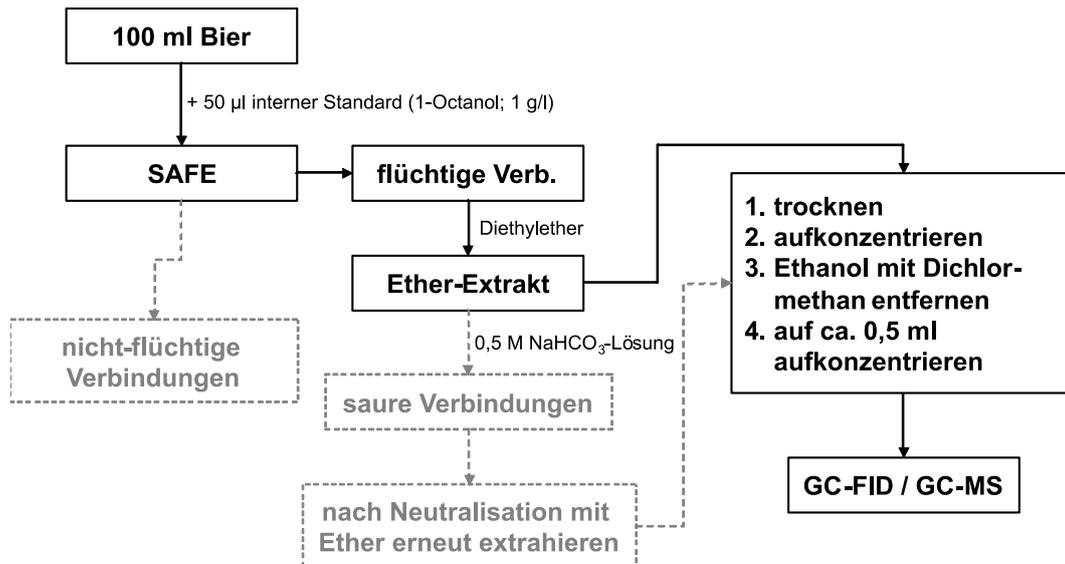


**Abb. 57:** GC-FID-Chromatogramm der Analyse der flüchtigen Verbindung mittels SPME

Die Headspace-Analyse war für die geplante Untersuchung nicht geeignet, da die Nachweisempfindlichkeit dieser Methode bei weitem nicht ausreichte. Wie im Chromatogramm dargestellt, waren nur Verbindungen messbar, die in hohen Konzentrationen im Bier vorkommen.

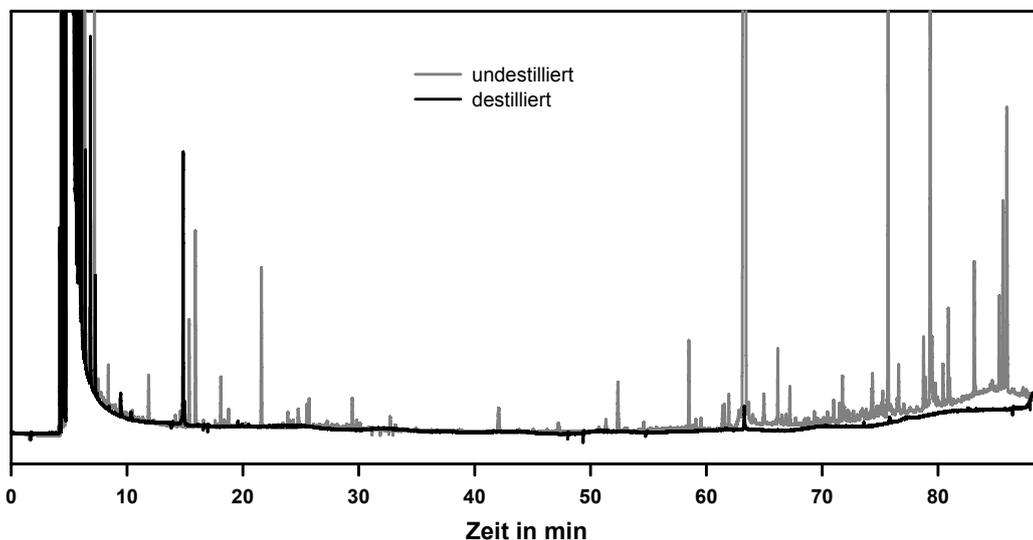
Ähnliches zeigte sich bei der Analyse der flüchtigen Verbindungen mittels SPME. Dazu wurde eine SPME-Faser in den Dampfraum eines verschlossenen und temperierten Vials mit der zu untersuchenden Probe gebracht und dort bis zur Gleichgewichtseinstellung belassen. Anschließend erfolgte die Desorption und Analyse der an die Faser gebundenen Verbindungen mittels GC. Dabei ergab sich zwar eine deutlich bessere Nachweisempfindlichkeit, jedoch wurden je nach verwendeter SPME-Faser unterschiedliche Verbindungen diskriminiert. So reichert polarere Fasern (Carboxen/PDMS) eher polare Substanzen und entsprechend unpolare Fasern (PDMS) vorrangig unpolare Verbindungen an. Für die Analyse besonders aromaaktiver und damit häufig extrem gering konzentrierter Verbindungen war die Analyse mittels SPME ebenfalls nicht empfindlich genug.

Als einzige Alternative blieb die Isolierung und Aufkonzentrierung der flüchtigen Verbindungen mittels „solvent assisted flavor evaporation“ (SAFE). Dazu wurde das aus der SAFE erhaltene Destillat nach dem in Abb. 58 gezeigten Schema aufgearbeitet.



**Abb. 58:** Aufarbeitungsschema der flüchtigen Verbindungen mittels SAFE

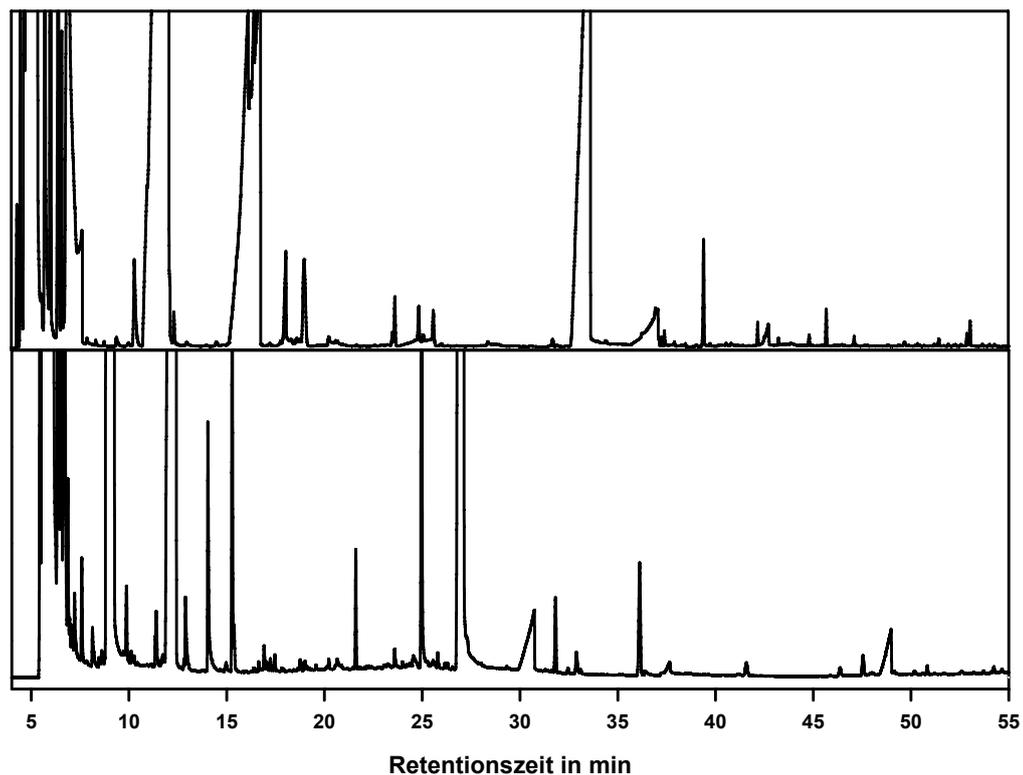
Käuflich erhältlicher Diethylether erwies sich für diese Aufarbeitung als zu stark verunreinigt. Durch die Aufkonzentrierung von ca. 400 ml auf 0,5 ml erschwert jede Verunreinigung die Analyse der Aromastoffe. Daher musste der Diethylether vordestilliert werden. Der Reinheits-Unterschied ist anhand eines Extraktionsblindwertes in der folgenden Abb. 59 dargestellt.



**Abb. 59:** GC-FID-Chromatogramme der Blindwerte mit destilliertem und undestilliertem Diethylether

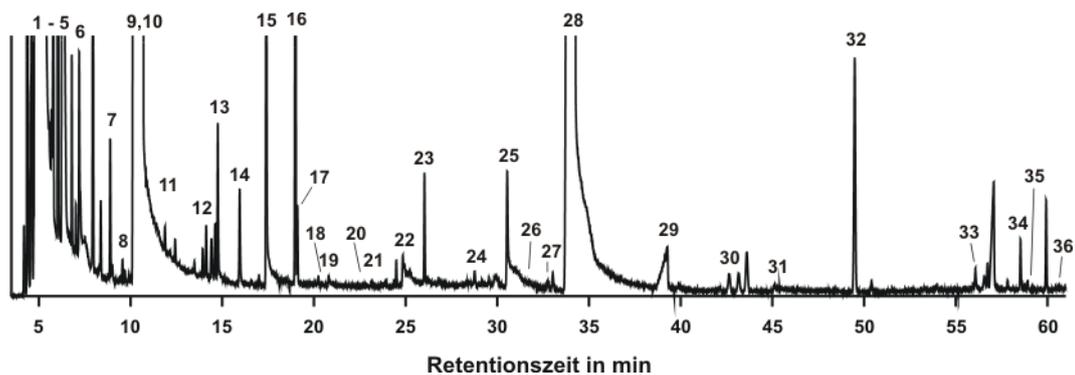
Der Diethylether-Extrakt enthielt alle flüchtigen Verbindungen des Bieres. Die spätere Analyse des Konzentrats wurde jedoch durch enthaltene saure

Verbindungen gestört. Dies äußerte sich in breiten, andere Signale überdeckenden Peaks im Chromatogramm. Diese Verbindungen wurden durch Extraktion mit Natriumhydrogencarbonatlösung entfernt (Abb. 60). Der erhaltene saure Extrakt konnte anschließend getrennt aufgearbeitet und analysiert werden. Vorrangig wurden so Substanzen entfernt, die Keilpeaks (z. B.  $R_t = 25$  min) verursachten, andere Substanzen überlagerten und damit deren Identifizierung und Quantifizierung erschwerten oder sogar unmöglich machten.



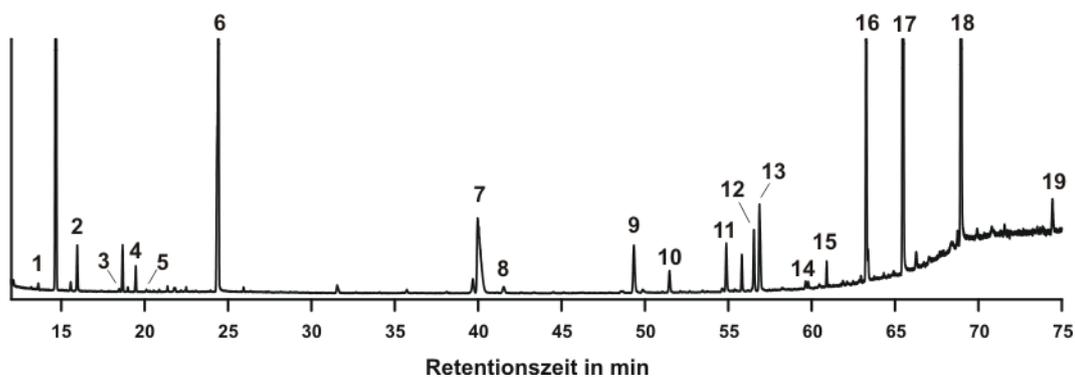
**Abb. 60:** GC-FID-Chromatogramme der flüchtigen Verbindungen ohne (oben) und mit (unten) Entfernung saurer Verbindungen

Die Identifizierung der Substanzen erfolgte anschließend mittels GC-MS im Vergleich zu authentischen Standards. Die im neutralen und sauren Bierextrakt identifizierten Verbindungen sind in Abb. 61 und Abb. 62 dargestellt.



1 2-Butanon	10 2-Methylbutanol	19 2-Acetylfuran	28 2-Phenylethanol
2 Ethylacetat	11 Essigsäureisobutylester	20 5,5-Dimethyl-2(5H)-furanon	29 Octansäure
3 3-Methylbutanal	12 Buttersäureethylester	21 Benzaldehyd	30 Octansäureethylester
4 2-Methylpropanol	13 Milchsäureethylester	22 4-Methyl-3-pentensäure	31 Nicotinsäureethylester
5 2-Methyl-2-butanol	14 2-Furfural	23 Hexansäureethylester	32 Essigsäurephenylethylester
6 1-Butanol	15 Furfurylalkohol	24 Phenylacetaldehyd	33 $\gamma$ -Nonalacton
7 Propansäureethylester	16 Essigsäureisopentylester	25 1-Octanol (int. Standard)	34 $\beta$ -Damascenon
8 1,1-Diethoxyethan	17 Essigsäure-2-methyl-1-butylester	26 Guajacol	35 Vanillin
9 3-Methylbutanol	18 Furfurylethylether	27 Linalool	36 Decansäureethylester

**Abb. 61:** GC-Chromatogramm des neutralen Aromaextraktes



1 1-Butoxy-1-ethoxyethan	6 1-Pentanol	11 Buttersäure	16 Hexansäure
2 1-Propanol	7 Essigsäure	12 Furfurylalkohol	17 Phenethylalkohol
3 2-Methyl-2-butenal	8 2-Furfural	13 3-Methylbuttersäure	18 Octansäure
4 1-Pentoxy-1-ethoxyethan	9 Propionsäure	14 Pentansäure	19 Decansäure
5 Essigsäureisopentylester	10 2-Methylpropionsäure	15 1,1-Diphenethoxyethan	

**Abb. 62:** GC-Chromatogramm des sauren Aromaextraktes

### 3.7.2 Vorversuche zur Bestimmung des Einflusses von PVI/PVP auf die Alterung von Bier

Vorversuche sollten den Einfluss von PVI/PVP auf die Veränderung der Aromastoffe und damit die Bieralterung klären. Dazu wurden verschiedene Biersorten, welche jeweils unbehandelt und mit PVI/PVP behandelt waren, künstlich beschleunigt gealtert und dann auf die Zusammensetzung der flüchtigen Verbindungen untersucht.

Zur Durchführung einer beschleunigten Alterung gibt es in der Literatur sehr unterschiedliche Herangehensweisen. So arbeiteten Vanderhaegen et al. mit langen Zeiträumen von 1 bis 4 Jahren bei Raumtemperatur [Vanderhaegen 2004a, Vanderhaegen 2007], Malfliet et al. alterten für 60 Tage bei 30 °C [Malfliet 2008], während Vanderhaegen et al. auch bei 40 °C für 6 Wochen [Vanderhaegen 2005a] und Mcmurrough et al. 7 Tage bei 60 °C [Mcmurrough 1996] alterten. Die verschiedenen Alterungsbedingungen zeigen, dass es bisher kein etabliertes, allgemein verwendetes Alterungsmodell für Bier gibt.

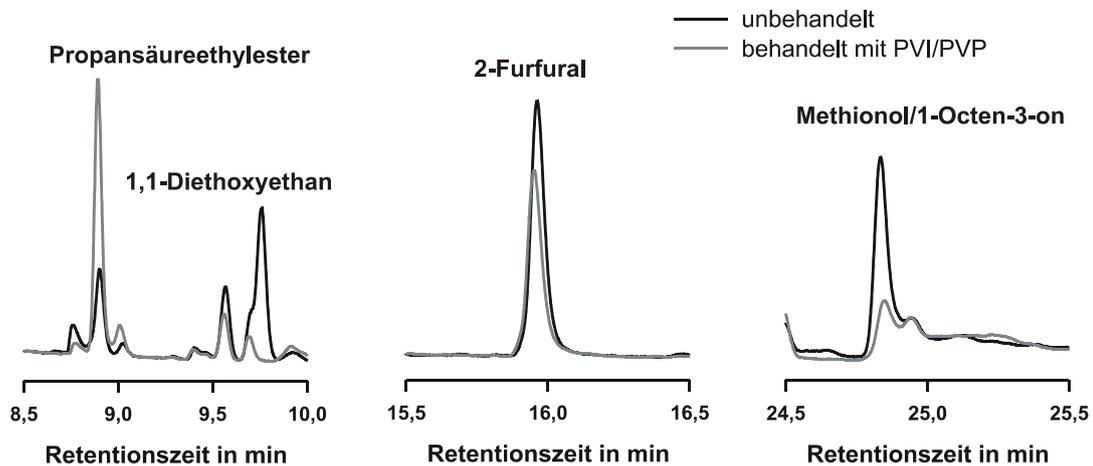
Im Zuge der Arbeit fiel die Entscheidung auf spezielle Stress-Alterungsbedingungen. Die Proben wurden für zwei Wochen alle 24 h abwechselnd bei 4 °C und 40 °C gelagert. Dieser ständige Wechsel sollte die Bedingungen simulieren, welchen Bier während der Aufbewahrung, beim Transport und beim Kunden typischerweise ausgesetzt ist. Durch unterschiedliche Temperaturen von Außen- und z. B. Lagerbereichen oder auch wechselnden Temperaturen beim Verkauf und zu Hause kommt es zu beträchtlichen Schwankungen, die in dem vorliegenden Alterungsmodell wirklichkeitsnah dargestellt werden.

Für die Voruntersuchungen standen die in Tab. 8 aufgeführten Proben zur Verfügung.

**Tab. 8:** Verwendete Bierproben für die Vorversuche

<b>Probe</b>	<b>Behandlung</b>	<b>Alterung</b>
Bierprobe A	0 g/hl PVI/PVP	natürlich + künstlich (14 Tage)
	50 g/hl PVI/PVP	natürlich + künstlich (14 Tage)
Bierprobe B	0 g/hl PVI/PVP	künstlich (14 Tage)
	50 g/hl PVI/PVP	künstlich (14 Tage)
Bierprobe C	0 g/hl PVI/PVP	künstlich (14 Tage)
	36 g/hl PVI/PVP	künstlich (14 Tage)
	46 g/hl PVI/PVP	künstlich (14 Tage)

Nach der künstlichen Alterung wurden aus allen Proben die flüchtigen Verbindungen isoliert und mittels GC-FID bzw. GC-MS analysiert. Zwischen den behandelten und unbehandelten Proben konnten in den Vorversuchen erste Unterschiede nachgewiesen werden.



**Abb. 63:** Ausschnitte aus GC-FID-Chromatogrammen der flüchtigen Verbindungen von behandelter (50 g/hl PVI/PVP) und un behandelter Bierprobe A (natürlich + 14 d künstlich gealtert)

Wie Abb. 63 zeigt, wurden während der Alterung einzelne zum Teil unerwünschte Verbindungen (1,1-Diethoxyethan, 2-Furfural, Methionol/1-Octen-3-on) im behandelten Bier in geringerem Maße gebildet als in unbehandeltem Bier. Umgekehrt verhielt es sich bei einigen Estern, die im Gesamtaroma als positiv bewertet werden. So wurde beispielsweise Propansäureethylester bei Bierprobe A im unbehandelten Bier stärker abgebaut als im behandelten.

Nicht alle Veränderungen konnten gleichermaßen in den verschiedenen Bierproben nachgewiesen werden. Während einige Verbindungen in allen Proben eine verringerte Zunahme nach Behandlung mit PVI/PVP zeigten, verhielten sich andere Verbindungen bei den verschiedenen Bieren unterschiedlich. In der folgenden Tabelle (Tab. 9) sind alle identifizierten Verbindungen und deren Veränderung durch PVI/PVP-Behandlung dargestellt. Zusätzlich sind entsprechende Literaturangaben zur Alterung ergänzt. Die hervorgehobenen Verbindungen zeigen ein einheitliches Verhalten für alle Proben.

Teilweise waren die Konzentrationsunterschiede in einem nicht messbaren Bereich. So konnte in allen drei Bierproben (Bierprobe A, B und C) nachgewiesen werden, dass die Bildung von 2-Furfural, 3-Methylbutanal oder Milchsäureethylester durch die Behandlung mit PVI/PVP reduziert wird. Ein Einfluss auf

2-Methylpentanal, Furfurylalkohol oder Octansäureethylester konnte hingegen nur in natürlich gealtertem Bioprodukt A bestätigt werden.

**Tab. 9:** Bildung flüchtiger Verbindungen in unbehandeltem Bier im Vergleich zum behandelten während der Alterung (neutrale Fraktion)

Aromaverbindung	Bierprobe A	Bierprobe B	Bierprobe C	Literatur	Aroma
3-Methylbutanal	+	+	+	+	malzig
2-Methylpropanol	–	+	+	o	malzig, alkoholisch
1-Butanol	o	+	+	o	alkoholisch
2-Methylbutanal	o	+	+	+	Mandel, malzig, Apfel
Propansäureethylester	–	o	o	+	fruchtig
1,1-Diethoxyethan	+	+	+	+	fruchtig
3-Methylbutanol	–	o	+	o	malzig, ranzig, Banane,
2-Methylbutanol	–	o	+	o	süß, weinartig
Buttersäureethylester	o	o	+	–	fruchtig
Milchsäureethylester	+	+	+	+	fruchtig, butterig
2-Furfural	+	+	+	+	Karamell, Brot, gekochtes Fleisch
2-Methylpentanal	+	o	o	+	bitter, weinig
2-Methylbuttersäureethylester	+	o	o	+	fruchtig
Furfurylalkohol	+	o	o	+	holzig, Zuckerrohr
Essigsäureisopentylester	–	o	o	–	Banane, Ester, Apfel, Lösemittel
Essigsäure-2-methylbutylester	–	o	o	–	fruchtig, Banane
4-Methylpentansäureethylester	o	+	o		fruchtig
Methionol	+	o	+	o	kartoffelartig
1-Octen-3-on	+	o	+		pilzig
Hexansäureethylester	–	+	+	–	fruchtig
Linalool	o	+	o	o	blumig, zitrusartig
2-Phenylethanol	–	+	o	o	blumig, honigartig, bitter, Parfüm
Octansäureethylester	–	o	o	–	fruchtig
Essigsäurephenylester	–	+	o	o	blumig
$\gamma$ -Nonalacton	o	+	o	+	Kokos, Pfirsich
Vanillin	+	+	+	+	Vanille
$\beta$ -Damascenon	+	o	o	+	honigartig

Legende: in unbehandeltem Bier höhere (+), gleiche (o), kleinere (–) Konzentration; nicht auswertbar (o)

Die Verbindungen der sauren Fraktion (Tab. 10) geben ein deutlich uneinheitlicheres Bild. Es konnten nur wenige Verbindungen identifiziert werden, welche bei allen Proben das gleiche Verhalten zeigten bzw. sich überhaupt während der Alterung veränderten.

**Tab. 10:** Bildung flüchtiger Verbindungen in unbehandeltem Bier im Vergleich zum behandelten während der Alterung (saure Fraktion)

Aromaverbindung	Bierprobe A	Bierprobe B	Bierprobe C	Literatur	Aroma
1-Butoxy-1-ethoxyethan	+	+	+		--
1-Propanol	–	o	+	o	alkoholisch
2-Methyl-2-butenal	o	o	o	o	grüne Frucht
1-Pentoxy-1-ethoxyethan	–	+	+		--
Essigsäure-isopentylester	o	o	o	–	Banane, Ester, Apfel, Lösemittel
1-Pentanol	–	o	+	o	alkoholisch
Essigsäure	+	–	–	o	sauer, Essig
2-Furfural	+	+	o	+	Karamell, Brot, gekochtes Fleisch
Propionsäure	–	o	+	o	sauer, käsig, wenig
2-Methylpropionsäure	o	o	o	+	süß, butterig, bitter
Buttersäure	o	o	o	o	butterig, Butter, Käse, ranzig
Furfurylalkohol	+	–	+	+	holzig, Zuckerrohr
3-Methylbuttersäure	+	–	+	+	käsig, alter Hopfen, schweißig
Pentansäure	o	o	o	o	käsig
1,1-Diphenethoxyethan	–	o	o		--
Hexansäure	o	–	+	o	schweißig, Pflanzenöl
Phenethylalkohol	–	–	+	o	blumig, honigartig, bitter, Parfüm
Octansäure	o	–	+	o	fettig, ranzig, Gemüse, käsig
Decansäure	o	o	o	o	fettig, ranzig, käsig, zitrus

Legende: in unbehandeltem Bier höhere (+), gleiche (o), kleinere (–) Konzentration; nicht auswertbar (o)

Für diese in den Vorversuchen beobachteten Auswirkungen der Behandlung mit PVI/PVP gibt es verschiedene Ursachen. Zahlreiche Reaktionen, die während der Alterung ablaufen, besitzen einen radikalischen oder oxidativen Zwischenschritt. So ist für die Bildung von 2-Furfural und einigen Dicarbonylen eine Oxidation notwendig. [Hollnagel 2002] Oxidationen werden durch Übergangsmetalle katalysiert und hängen demzufolge unmittelbar von der Konzentration dieser Metalle ab. PVI/PVP verringert den Metallgehalt. Der zweite Grund ist die Veränderung des pH-Wertes durch die Anwendung von PVI/PVP. Wie unter 2.1.3 beschrieben, bindet das Polymer auch organische Säuren, was zu einem leichten Anstieg des pH-Wertes führt und einen Einfluss auf die Hydrolyse von Estern haben kann.

Eine Erhöhung der Konzentration an Übergangsmetallen sollte die gegenteilige Wirkung erzielen wie die Behandlung mit PVI/PVP. Dafür wurden mehrere Bierproben ohne Zusatz und mit einem Zusatz von 200 ppb Eisen bzw. von 200 ppb Mangan für zwei Wochen gealtert. Bei der anschließenden Analyse ergaben sich für einige Substanzen deutliche vom Blindwert abweichende Bildungsraten. Die Unterschiede sind in Tab. 11 aufgeführt.

**Tab. 11:** Veränderungen einiger Verbindungen durch erhöhte Metallgehalte

<b>Verbindung</b>	<b>Eisen</b>	<b>Mangan</b>
3-Methylbutanal	–	–
1,1-Diethoxyethan	++	+
Propansäureethylester	–	–
Furfurylalkohol	++	+
( <i>E</i> )- $\beta$ -Damascenon	++	+
$\gamma$ -Nonalacton	+	+
Hydroxymethylsäureethylester	++	+
Hexansäureethylester	--	–
Phenylacetaldehyd	+	+
Essigsäureisopentylester	–	–
Essigsäure-2-methyl-1-butylester	–	–
3-(Methylthio)-propanol (Methionol)	+	o
Milchsäureethylester	+	++
Essigsäurephenethylester	++	+

Legende: ++ starke Zunahme, + Zunahme, o unverändert, – Abnahme, -- starke Abnahme

Beispielsweise wurden 1,1-Diethoxyethan, welches das Acetal von Acetaldehyd und Ethanol ist, sowie Phenylacetaldehyd und  $\beta$ -Damascenon verstärkt gebildet. Dies korreliert mit den Beobachtungen, die bei der Behandlung mit PVI/PVP gemacht wurden, und dort zu einer verringerten Bildung führte. Im Gegensatz dazu wurden vereinzelt Ester deutlich stärker abgebaut. So wurden in den mit Eisen dotierten Proben kleinere Konzentrationen an Hexansäureethylester und Propansäureethylester als in Vergleichsproben nachgewiesen. Dieser Effekt kann nicht erklärt werden, da ein Einfluss von Übergangsmetallen auf die Hydrolyse von Estern bisher nicht nachgewiesen wurde.

### 3.7.3 Einfluss von Stabilisierungsmitteln auf ausgewählte Bierinhaltsstoffe

Der Einsatz verschiedener Stabilisierungsmittel hat unterschiedliche Auswirkungen auf die Zusammensetzung von Bier. Wie unter 2.1 beschrieben, werden Kieselgel und PVPP zur Entfernung von Proteinen bzw. Polyphenolen verwendet.

Zum Vergleich der Auswirkung verschiedener etablierter Stabilisierungsmittel gegenüber PVI/PVP wurde Bierprobe F unterschiedlich geschönt. Die Behandlung erfolgte nach der Filtration über Kieselgur entweder mit 50 g/hl PVI/PVP, 35 g/hl Kieselgel oder 20 g/hl Kieselgel in Kombination mit 15 g/hl PVPP. Als Vergleich wurde ein unbehandeltes Kieselgur-filtriertes Bier analysiert. Damit standen vier Bierproben zur Verfügung.

Die Proben wurden auf ihre Gehalte an Übergangsmetallen (Eisen, Kupfer, Mangan), Polyphenolen und sensitiven Proteinen sowie den pH-Wert untersucht. Sensitive Proteine können besonders leicht mit Tanninen reagieren und Ausflockungen im Produkt hervorrufen. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Tab. 12 aufgeführt.

**Tab. 12:** Einfluss der unterschiedlichen Stabilisierungsvarianten auf Bierparameter

	Vergleich	PVI/PVP	Kieselgel	Kieselgel + PVPP
Eisen [ $\mu\text{g/l}$ ] ( $\pm$ SD)	80 ( $\pm$ 16)	24 ( $\pm$ 5)	40 ( $\pm$ 8)	44 ( $\pm$ 9)
Kupfer [ $\mu\text{g/l}$ ] ( $\pm$ SD)	39 ( $\pm$ 8)	41 ( $\pm$ 8)	23 ( $\pm$ 5)	46 ( $\pm$ 9)
Mangan [ $\mu\text{g/l}$ ] ( $\pm$ SD)	58 ( $\pm$ 12)	54 ( $\pm$ 11)	52 ( $\pm$ 10)	51 ( $\pm$ 10)
Totale Polyphenole [mg/l]	208	164	207	152
pH-Wert	4,23	4,45	4,22	4,22
Sensitive Proteine	13,31	14,53	5,62	6,23

Die Metallkonzentrationen reduzierten sich bei allen drei Stabilisierungsvarianten. Für PVI/PVP ist die Fähigkeit zur Bindung von Übergangsmetallen bereits bekannt. [Mira 2007] Der Vergleich zur Kontroll-Probe zeigte auch, dass ausschließlich Eisen (auf ca. 30 %), nicht aber Kupfer und Mangan adsorbiert wurden. Die Stabilisierung mittels Kieselgel hatte eine Verringerung des Eisen- sowie Kupfer-Gehaltes auf ca. 50 % zur Folge, was auf die Bindung von Metallen an die entfernten Proteine zurückzuführen ist. [Arvanitoyannis 1991] Durch die zusätzliche Verwendung von PVPP und damit eine geringere eingesetzte Menge Kieselgel kam es auch zu einer etwas geringeren Reduzierung der Proteine und

damit der Metallgehalte gegenüber reinem Kieselgel. So fiel der Gehalt an sensitiven Proteinen durch die Kieselgel-Stabilisierung von 13,3 auf 5,6 bzw. 6,2 je nach verwendeter Kieselgel-Menge.

Auf den Gehalt an Polyphenolen hatte wie erwartet gleichermaßen PVI/PVP sowie PVPP Einfluss. Dabei wurden die Polyphenole durch die Verwendung von PVPP etwas stärker verringert als durch PVI/PVP. Der Grund ist die unterschiedliche Zusammensetzung der Polymere. Für die Adsorption von Polyphenolen sind hauptsächlich die Pyrrolidon-Gruppen im Polymer verantwortlich. Während PVPP nahezu ausschließlich daraus besteht, enthält PVI/PVP lediglich 10 % Pyrrolidon-Gruppen.

PVI/PVP bindet zusätzlich zu Metallen auch andere polare Substanzen, wie z. B. organische Säuren. Diese werden bei Behandlung adsorbiert und abfiltriert. Dadurch steigt der pH-Wert des Bieres leicht an. Dies konnte auch in unseren Analysen bestätigt werden. Der pH-Wert stieg bei der Verwendung von PVI/PVP von 4,23 auf 4,45 an, während er bei der Behandlung mit Kieselgel bzw. PVPP unverändert blieb.

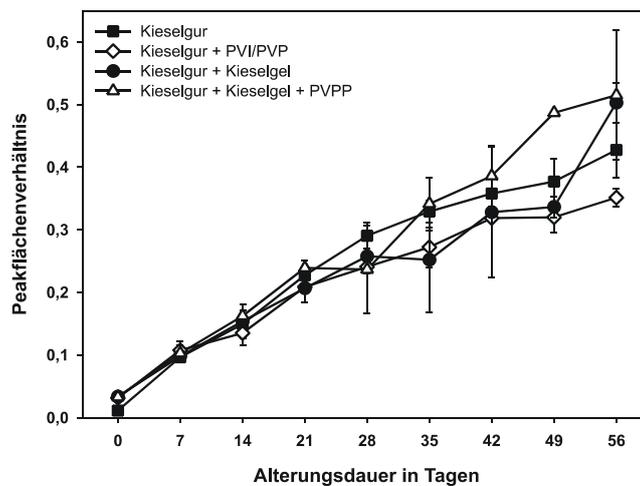
#### **3.7.4 Einfluss von Stabilisierungsmitteln auf die Lagerstabilität von Bier**

Die vier oben genannten Bierproben (Vergleich, PVI/PVP, Kieselgel, Kieselgel + PVPP) wurden äquivalent dem Schema unter 3.7.2 zum Herausarbeiten von klaren Unterschieden für acht statt zwei Wochen gealtert. Nach jeweils sieben Tagen wurden je zwei Flaschen jeder Probe direkt filtriert und zur späteren Aufarbeitung eingefroren. Nach der Aufarbeitung wurden alle Alterungspunkte mittels GC-MS vermessen und die Peakflächen (PF) bestimmt. In Tab. 13 sind die Peakflächenverhältnisse (Quotient aus PF Substanz und PF int. Standard) aller identifizierten Verbindungen in frischem und in acht Wochen gealtertem Bier aufgeführt.

Tab. 13: Peakflächenverhältnisse der identifizierten flüchtigen Verbindungen in Bierproben

Verbindung	Vergleich		PVI/PVP		Kieselgel		Kieselgel + PVPP	
	0 d	56 d	0 d	56 d	0 d	56 d	0 d	56 d
<b>2-Acetylfuran</b>	<b>0,013</b>	<b>0,055</b>	<b>0,015</b>	<b>0,048</b>	<b>0,011</b>	<b>0,063</b>	<b>0,018</b>	<b>0,060</b>
Benzaldehyd	0,012	0,015	0,010	0,012	0,010	0,015	0,011	0,022
<b>β-Damascenon</b>	<b>0,002</b>	<b>0,009</b>	<b>0,002</b>	<b>0,008</b>	<b>0,001</b>	<b>0,009</b>	<b>0,003</b>	<b>0,009</b>
1,1-Diethoxyethan	0,115	0,066	1,436	0,097	1,518	0,068	1,851	0,052
5,5-Dimethyl-2(5H)-furanon	0,031	0,034	0,035	0,034	0,027	0,041	0,029	0,042
<b>Essigsäure-ethylester</b>	<b>16,126</b>	<b>11,990</b>	<b>34,237</b>	<b>12,324</b>	<b>30,217</b>	<b>16,240</b>	<b>33,471</b>	<b>13,046</b>
Buttersäure-ethylester	0,152	0,140	0,172	0,138	0,126	0,179	0,137	0,137
<b>Decansäure-ethylester</b>	<b>0,128</b>	<b>0,032</b>	<b>0,155</b>	<b>0,009</b>	<b>0,212</b>	<b>0,052</b>	<b>0,131</b>	<b>0,035</b>
Hexansäure-ethylester	0,418	0,327	0,514	0,329	0,371	0,429	0,385	0,348
<b>Nicotinsäure-ethylester</b>	<b>0,015</b>	<b>0,182</b>	<b>0,018</b>	<b>0,187</b>	<b>0,011</b>	<b>0,199</b>	<b>0,024</b>	<b>0,186</b>
<b>Octansäure-ethylester</b>	<b>0,751</b>	<b>0,286</b>	<b>0,927</b>	<b>0,200</b>	<b>0,812</b>	<b>0,416</b>	<b>0,798</b>	<b>0,361</b>
Propansäure-ethylester	0,126	0,105	0,136	0,113	0,099	0,136	0,130	0,120
<b>Furfurylalkohol</b>	<b>0,402</b>	<b>0,551</b>	<b>0,525</b>	<b>0,571</b>	<b>0,260</b>	<b>0,601</b>	<b>0,432</b>	<b>0,589</b>
<b>2-Furfural</b>	<b>0,011</b>	<b>0,428</b>	<b>0,031</b>	<b>0,351</b>	<b>0,034</b>	<b>0,503</b>	<b>0,033</b>	<b>0,515</b>
<b>Furfurylethylether</b>	<b>0,000</b>	<b>0,015</b>	<b>0,000</b>	<b>0,014</b>	<b>0,000</b>	<b>0,018</b>	<b>0,001</b>	<b>0,014</b>
Guajacol	0,006	0,009	0,000	0,008	0,000	0,008	0,003	0,009
Essigsäure-isopentylester	2,726	2,297	3,190	2,437	2,240	2,784	2,501	2,404
Essigsäure-isobutylester	0,033	0,029	0,037	0,029	0,034	0,037	0,031	0,031
Linalool	0,018	0,012	0,010	0,011	0,008	0,013	0,035	0,013
4-Methyl-pentensäure	0,005	0,021	0,006	0,016	0,005	0,023	0,007	0,020
Essigsäure-2-methyl-1-butylester	0,255	0,197	0,260	0,227	0,228	0,239	0,245	0,220
2-Methyl-2-butanol	0,659	0,325	0,537	0,319	0,316	0,411	0,305	0,321
2/3-Methylbutanol	324,441	337,849	363,233	333,859	245,281	393,644	318,575	347,666
2-Methylpropanol	4,518	5,094	5,308	5,270	3,626	5,620	4,905	4,699
<b>γ-Nonalacton</b>	<b>0,093</b>	<b>0,188</b>	<b>0,100</b>	<b>0,160</b>	<b>0,080</b>	<b>0,199</b>	<b>0,108</b>	<b>0,207</b>
Phenylacetaldehyd	0,041	0,096	0,188	0,081	0,188	0,102	0,097	0,103
2-Phenylethanol	12,851	12,659	15,462	11,868	12,827	15,059	13,363	13,166
Essigsäure-phenylester	1,871	1,866	2,422	1,737	1,776	2,093	1,805	1,845
Vanillin	0,028	0,029	0,004	0,022	0,004	0,075	0,009	0,029

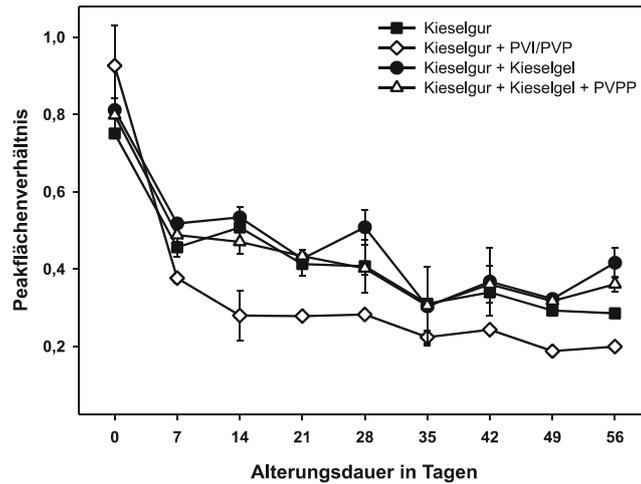
Nicht für alle Verbindungen, die in den Vorversuchen Unterschiede aufwiesen, konnte dieses Verhalten in der 8-Wochen-Alterung bestätigt werden. So zeigte 1,1-Diethoxyethan starke Schwankungen während des Untersuchungszeitraums. Einen kontinuierlichen Anstieg wiesen die Verbindungen 2-Acetylfuran,  $\beta$ -Damascenon, Nicotinsäureethylester, 2-Furfurylalkohol, 2-Furfural, Furfuryl-ethylether sowie  $\gamma$ -Nonalacton auf. Die Ester Milchsäureethylester, Decansäureethylester sowie Octansäureethylester wurden dagegen während der Alterung abgebaut. Der Verlauf der 2-Furfural-Konzentration ist in Abb. 64 dargestellt.



**Abb. 64:** Bildung von 2-Furfural in behandelten Bierproben während der Alterung

Die Konzentrationen unterscheiden sich klar in Abhängigkeit der Behandlung. So ist der 2-Furfural-Gehalt im PVI/PVP-behandelten Bier im Vergleich zur Kontrollprobe am niedrigsten. Die Behandlung mit Kieselgel bzw. Kieselgel und PVPP hatte, bedingt durch die großen Messunsicherheiten, keinen signifikanten Einfluss auf die Konzentration an 2-Furfural. Es zeigt sich jedoch der Trend, dass in Kieselgel+PVPP-behandeltem Bier höhere Gehalte gebildet werden als im unbehandelten Bier, während in Kieselgel-behandeltem Bier ähnliche Gehalte gebildet werden wie in PVI/PVP-behandeltem Bier.

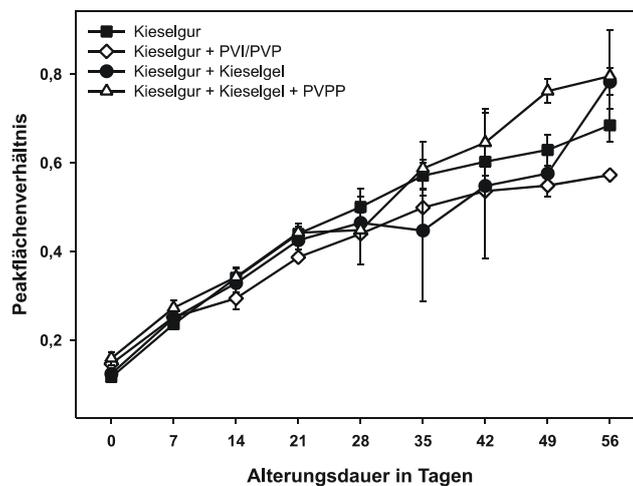
Als Vergleich ist in Abb. 65 der Abbau von Octansäureethylester während der Alterung dargestellt.



**Abb. 65:** Abbau von Octansäureethylester in behandelten Bierproben während der Alterung

Die Abbaurrate von Octansäureethylester veränderte sich durch die Behandlung mit Kieselgel bzw. Kieselgel und PVPP im Vergleich zum unbehandelten Bier nicht. Das mit PVI/PVP behandelte Bier zeigte jedoch in den ersten 7 Tagen eine klar stärkere Esterhydrolyse, danach verlief die Abbaurrate auf einem niedrigeren Konzentrationsniveau nahezu identisch.

Zur Beurteilung des Einflusses der verschiedenen Stabilisierungsmittel auf die radikalische und oxidative Bildung von Alterungsverbindungen, wurden die Peakflächenverhältnisse aller Parameter, deren Konzentration über die Zeit zunahm und die sich in Abhängigkeit der Stabilisierung deutlich unterschiedlich verhielten, ungewichtet addiert.

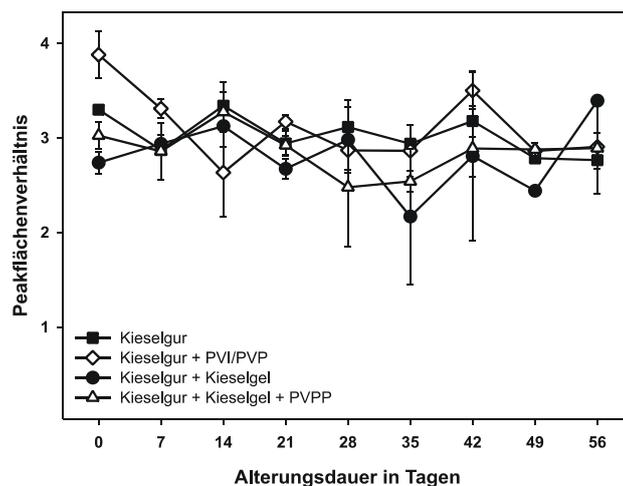


**Abb. 66:** Summe der während der Alterung gebildeten Verbindungen

Abb. 66 zeigt in Summe die Zunahme der ausgewählten Verbindungen 2-Furfural, 2-Acetylfuran,  $\gamma$ -Nonalacton sowie Furfurylethylether. Allen vier Verbindungen liegt ein radikalischer oder oxidativer Bildungsmechanismus zugrunde (vgl. 2.3).

Bei der Analyse der einzelnen Bierproben ergaben sich teilweise große Unterschiede zwischen den Doppelbestimmungen. Der Einfluss der Aufarbeitung wurde durch die Einberechnung des internen Standards ausgeglichen. Es handelt sich also hauptsächlich um Unterschiede, die während der Alterungsbehandlung oder der Probennahme aufgetreten sind.

Um die Schwankungen auszugleichen, wurden Verbindungen bestimmt, die sich während der Alterung nicht oder kaum veränderten und auch nicht durch die verschiedenen Stabilisierungsmittel beeinflusst wurden. Ausgewählt wurden die Substanzen Essigsäureisopentylester, Buttersäureethylester und Hexansäureethylester. In Abb. 67 ist die Summe der Peakflächenverhältnisse dieser Verbindungen dargestellt.



**Abb. 67:** Summe der während der Alterung stabilen Verbindungen

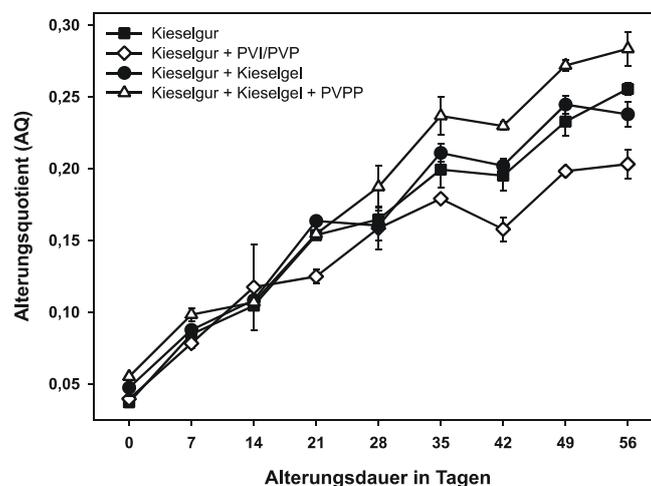
Auch hier zeigten sich sehr große Standardabweichungen, jedoch konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Behandlungsmethoden nicht beobachtet werden.

Das Verhältnis der Summen der im Alterungsprozess gebildeten und der dabei unverändert gebliebenen Verbindungen bildet den Alterungsquotienten (AQ):

$$AQ = \frac{\sum \text{gebildet}}{\sum \text{unverändert}}$$

**Formel 2:** Alterungsquotient

Für die Beurteilung eines Bieres hinsichtlich des Einflusses von Stabilisierungsmitteln muss damit nicht immer eine gesamte Alterungskurve aufgenommen werden. Der Alterungsquotient gleicht gravierende Aufarbeitungs-Schwankungen aus und kann als Maß für die oxidative und radikalische Alterung eines Bieres betrachtet werden. Es ist also ausreichend, den Alterungsquotienten nach beispielsweise acht Wochen zu bestimmen und mit dem einer unbehandelten Bierprobe zu vergleichen. Die Auswirkungen eines Stabilisierungsmittels auf Reaktionen dieser Art ist damit relativ einfach zu beurteilen. Biere mit einem geringeren oxidativen oder radikalischen Stress zeigen nach gleicher Dauer einen kleineren Alterungsquotienten. Die Veränderung des AQ während der Alterung ist für die vier untersuchten Bierproben in Abb. 68 dargestellt.

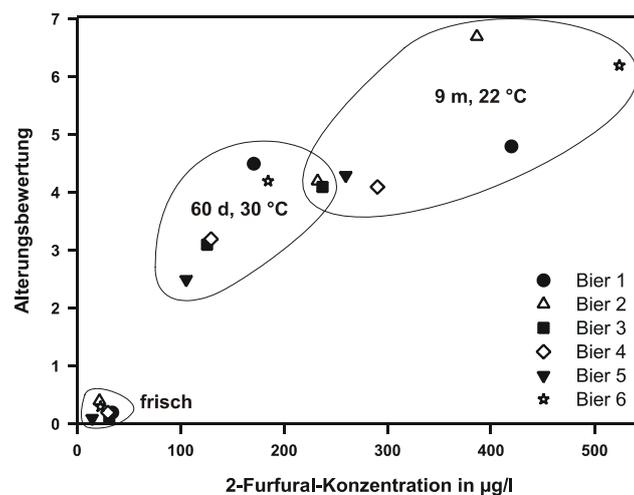


**Abb. 68:** Veränderung des Alterungsquotienten der untersuchten Bierproben während der Alterung

Von den vier untersuchten und unterschiedlich behandelten Bierproben zeigten zwei Proben deutliche Unterschiede von der Vergleichsprobe. Kein signifikanter Unterschied ist zwischen der Kontrolle und dem Kieselgel-behandelten Bier feststellbar. Wurde das Bier hingegen mit PVI/PVP behandelt, konnte eine deutliche Reduzierung des AQ nachgewiesen werden. Genau Gegenteiliges ergab sich für die Behandlung mit Kieselgel + PVPP.

Die Erhöhung des AQ durch PVPP muss über die Verringerung des Polyphenolgehaltes erklärt werden. PVPP bindet polyphenolische Strukturen, welche antioxidativ und radikal-bindend wirken, und begünstigt damit radikalische Reaktionen. [Paixao 2007] PVI/PVP reduziert zwar fast in gleichem Umfang den Polyphenolgehalt, setzt aber gleichzeitig die Übergangsmetallkonzentration deutlich herab. Dies hat insgesamt betrachtet eine Reduzierung der radikalischen und oxidativen Reaktionen zur Folge.

Die Bildung von Alterungsverbindungen sowie der Abbau oxidationsempfindlicher Substanzen wie Iso- $\alpha$ -Säuren und Proanthocyanidinen kann direkt mit der Aroma-Veränderung und Ausbildung eines typischen Alterungsgeschmackes in Verbindung gebracht werden. Eine verstärkte Bildung von Aldehyden wie 2-Furfural korreliert direkt mit einem stärker ausgeprägten Alterungsaroma. [Malfliet 2008, Saison 2009, Techakriengkrai 2006]



**Abb. 69:** Zusammenhang von 2-Furfural-Konzentration und Alterungsgeschmack, erstellt aus Daten von [Malfliet 2008]

Wie in Abb. 69 deutlich zu erkennen ist, gibt es eine direkte positive Korrelation zwischen beiden Parametern. Je höher die Konzentration an 2-Furfural im Bier ist, desto ausgeprägter ist auch die Intensität des Alterungsgeschmackes. Die verringerte Bildung von 2-Furfural während der Aufbewahrung, z. B. durch die Behandlung des frischen Bieres mit PVI/PVP und die damit verbundene Reduzierung radikalischer und oxidativer Reaktionen ist damit ein Maß für eine verlängerte Stabilität und Haltbarkeit des Bieres.

## 4 Zusammenfassung

Als Schönungs- bzw. Stabilisierungsmittel sind Polyvinylimidazol-Polyvinylpyrrolidon-Copolymere (PVI/PVP) in der Lage, selektiv Übergangsmetalle zu binden und damit die Stabilität von Bier und Wein positiv zu beeinflussen. Darüber hinaus verändern sie die Gehalte an zahlreichen anderen Inhaltsstoffen wie Säuren oder Polyphenolen. Dies führt im Vergleich zu unbehandelten Lebensmitteln vor allem bei der Aufbewahrung zu einem unterschiedlichen Alterungsverhalten, indem z. B. Trübungen verhindert oder die Bildung unerwünschter Aromastoffe verlangsamt werden. Gleichzeitig können Polymere, die zur Schönung und Stabilisierung mit Wein oder Bier in Kontakt gebracht werden, während des Kontaktes enthaltene Monomere oder Verunreinigungen an das Lebensmittel abgeben.

Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurde eine LC-MS-Methode zur Bestimmung der infrage kommenden Substanzen Imidazol, 2-Pyrrolidon, *N*-Vinylimidazol sowie *N*-Vinylpyrrolidon ohne weitere Aufarbeitung direkt in Wein, Bier und Most entwickelt. Die Methode wurde validiert und ergab für Imidazol, 2-Pyrrolidon und *N*-Vinylimidazol sehr gute Wiederfindungsraten von nahezu 100 %.

2-Pyrrolidon kam unerwarteterweise auch natürlich in Wein vor. Der Verlauf der Biosynthese wurde ausgehend von Glutamin und Glutaminsäure über deren biogene Amine 4-Aminobuttersäure bzw. 4-Aminobuttersäureamid zu 2-Pyrrolidon bestätigt und abgesichert. Einzelinkubationen von 4-Aminobuttersäure, 4-Aminobuttersäureamid und 2-Pyrrolidon ergaben eindeutige chemische Zusammenhänge zwischen den Verbindungen. So bilden 4-Aminobuttersäure und 2-Pyrrolidon ein chemisches Gleichgewicht und lagern sich ineinander um. Etwa 30-mal schneller reagierte 4-Aminobuttersäureamid zu 2-Pyrrolidon, wobei diese Reaktion nicht umkehrbar war. Mit der Analyse von 140 verschiedenen Weiß-, Rosé- und Rotweinen wurden diese Erkenntnisse statistisch mittels multivariater Datenanalyse bestätigt. So konnten Korrelationen einerseits zwischen dem Alter der Weine und dem 2-Pyrrolidon-Gehalt und andererseits zwischen 2-Pyrrolidon und 4-Aminobuttersäure sowie 4-Aminobuttersäureamid nachgewiesen werden.

*N*-Vinylpyrrolidon ergab bei der Validierung eine Wiederfindung von nur 65 %. Grund dafür war die Reaktion der Vinylfunktion mit Wasser sowie Ethanol in

sauren Medien zu den entsprechenden Addukten. Diese konnten zum Teil auch bei den durchgeführten Migrationsversuchen bestätigt werden. Es wurden neben zwei PVI/PVP-Proben auch sechs Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP)-Proben untersucht. Die Dauer der Migrationen (30 min) sowie die Versuchsbedingungen (5 °C) leiteten sich vom späteren Einsatzzweck ab und sind in der EU-Richtlinie 97/48/EG festgelegt. Während in den PVI/PVP-Proben Gehalte von 34-36 mg Imidazol je Kilogramm Polymer nachgewiesen wurden, befanden sich die Konzentrationen an 2-Pyrrolidon unterhalb der Bestimmungsgrenze. In PVPP konnten 2-Pyrrolidon-Gehalte zwischen 69 und 108 mg/kg bestimmt werden. Aufgrund der großen Oberfläche der Polymere verlief die Migration sehr schnell und die Konzentrationen änderten sich bereits ab fünf Minuten kaum.

Polyvinylimidazol-Polyvinylpyrrolidon-Copolymere (PVI/PVP) binden in Wein aufgrund ihrer funktionellen Gruppen neben Übergangsmetallen beispielsweise auch Polyphenole und organische Säuren. So verringerte sich durch die Anwendung von PVI/PVP die Konzentrationen der verschiedenen in Wein enthaltenen Anthocyane deutlich in Abhängigkeit der Polarität. Die Anthocyane reagieren während der Lagerung und Reifung des Weines zu polymeren Verbindungen und verursachen somit eine Veränderung von Farbe und Geschmack. In Modellinkubationen wurde gezeigt, dass Methylglyoxal als sehr reaktives  $\alpha$ -Dicarbonyl mit Polyphenolen reagieren kann und so zu neuartigen polymeren Strukturen führt. Analysen mittels LC-MS<sup>n</sup> lassen darauf schließen, dass es neben der Reaktion von einem (+)-Catechin-Molekül mit einem Molekül Methylglyoxal auch zu Methylglyoxal-vermittelten Verknüpfungen zwischen (+)-Catechin und Malvidin-3-O-glucosid kommt. Diese postulierten acetonyl-verbrückten (+)-Catechin-Malvidin-3-O-glucosid-Dimere wurden im Gegensatz zu Dimeren, die bei der Reaktion mit Acetaldehyd entstanden, jedoch nur in sehr geringen Konzentrationen gebildet.

Die Farbveränderung der Modell-Inkubationslösungen zu rot-braun ließ auf weitere Verbindungen aus der Reaktion von (+)-Catechin mit Methylglyoxal schließen. Es bildeten sich neben zahlreichen farblosen auch farbige Verbindungen, deren Absorptionsmaximum bei 460 nm (gelb-braun) lag. Die farblosen Verbindungen konnten in drei Klassen eingeteilt werden, welche sich zeitlich versetzt und zum Teil auch ohne Anwesenheit von Methylglyoxal bildeten.

Es wurde nachgewiesen, dass die Verbindungen der Klasse I, welche als (+)-Catechin-Methylglyoxal-Addukte identifiziert werden konnten, zu höher polymeren Verbindungen der Klassen II und III reagieren können. Inkubationen unter Sauerstoff-Atmosphäre zeigten eine Zunahme von farbigen Verbindungen, welche aufgrund ihres Absorptionsmaximums von 460 nm den Xanthylium-Salzen zugeordnet wurden. Diese entstehen ebenso bei der Reaktion von Glyoxylsäure, welche durch Oxidation aus Weinsäure gebildet wird, mit (+)-Catechin und stellen das Hauptbräunungsprodukt in Weißwein dar. Die Verwendung von Komplexbildnern unterdrückte diese Reaktion in den Inkubationslösungen vollständig. Reaktionslösungen mit Glyoxylsäure anstelle von Methylglyoxal bestätigten die Bildung neuartiger Xanthylium-Salz-ähnlicher Verbindungen bei der Reaktion von (+)-Catechin mit Methylglyoxal.

Der Einsatz von PVI/PVP in Bier beeinflusste zahlreiche Inhaltsstoffe und führte insgesamt zu einer verringerten Bildung von aromaaktiven Alterungsverbindungen und damit einer längeren Haltbarkeit. Das dazu verwendete Alterungsmodell wurde möglichst realitätsnah ausgewählt und sollte durch einen ständigen Temperaturwechsel die Bedingungen simulieren, denen Bier während Aufbewahrung und Transport ausgesetzt ist. Vorrangig zeigte sich eine Verringerung der Konzentration oxidativ oder radikalisch gebildeter Verbindungen wie 2-Furfural oder  $\gamma$ -Nonalacton. Aber auch ein im Rahmen dieser Untersuchungen nicht klärbarer Einfluss auf Bildung und Abbau flüchtiger Ester war zu verzeichnen. Der häufig in der Literatur erwähnte Alterungsparameter (*E*)-2-Nonenal konnte in keiner Probe nachgewiesen werden.

Durch den Vergleich konventioneller Stabilisierungsmethoden (Kieselgel bzw. Kieselgel + PVPP) mit dem Einsatz von PVI/PVP konnte die Ursache für die verringerte Bildung typischer Alterungsparameter bei Verwendung von PVI/PVP herausgearbeitet werden. Die unterschiedlichen Behandlungsmethoden hatten einen deutlichen Einfluss auf die verschiedenen Inhaltsstoffe von Bier. Während die Konzentrationen der Übergangsmetalle Eisen, Kupfer und Mangan durch alle drei Stabilisierungsmittel unterschiedlich stark verringert wurden, führte die Behandlung mit Kieselgel zur Abnahme an sensitiven und damit leicht trübungsverursachenden Proteinen. Beide Polymere, PVI/PVP und PVPP, hatten eine

---

Reduzierung der Polyphenolkonzentration zur Folge, während der pH-Wert durch PVI/PVP durch das Binden organischer Säuren erhöht wurde.

Im Verlauf der Arbeit sollte ein Indikator entwickelt werden, welcher mit dem Alterungszustand bzw. der Alterungsstabilität von Bier korreliert. Dazu wurden die Verbindungen 2-Furfural, 2-Acetylfuran,  $\gamma$ -Nonalacton sowie Furfurylethylether ausgewählt, die nach der Alterung einen Einfluss der verschiedenen Stabilisierungsmittel zeigten. Die Verbindungen beinhalten in ihrem Bildungsweg gemeinsam einen oxidativen, radikalischen oder säurekatalysierten Schritt, welcher unmittelbar von der Konzentration an Übergangsmetallen bzw. dem pH-Wert abhängt. Die Peakflächen wurden addiert und durch die Summe der Peakflächen von Substanzen, welche keine Veränderung zeigten, dividiert. Zu den stabilen Verbindungen gehörten Essigsäureisopentylester, Buttersäureethylester sowie Hexansäureethylester. Schwankungen aus der Probenahme oder dem Alterungsprotokoll wurden so ausgeglichen. Der Quotient der addierten Peakflächenverhältnisse (Alterungsquotient AQ) stellt ein Maß für den oxidativen und radikalischen Stress dar, welchem das Bier während der Alterung ausgesetzt ist.

Die Behandlung mit Kieselgel hatte im Vergleich zu einem unbehandelten Bier keinen Einfluss auf den Alterungsquotienten (AQ). Die Stabilisierung mittels PVI/PVP zeigte im Gegensatz zum Einsatz von PVPP eine Abnahme des AQ und indirekt klar eine Unterdrückung oxidativer und radikalischer Reaktionen parallel zu einer Verringerung der Übergangsmetall-Konzentrationen. Die Entfernung von Polyphenolen bei gleichzeitig hoher Metall-Konzentration führte bei PVPP hingegen zur Erhöhung des Alterungsquotienten.

Da die verstärkte Bildung typischer Alterungsverbindungen wie 2-Furfural direkt mit einem intensiveren Alterungsaroma korreliert, kann eine selektive Unterdrückung der Bildung dieser Substanzen die Haltbarkeit von Bier verlängern. Es konnte nachgewiesen werden, dass der Einsatz von PVI/PVP genau diese Eigenschaften aufweist. Das Auftreten eines Aromaalterungsprofils wird eindeutig unterdrückt und die Lagerstabilität unter Erhalt des erwünschten typischen Biergeschmacks verlängert.

## 5 Experimenteller Teil

### 5.1 Chemikalien

*Acros Organics*: Heptafluorbuttersäure

*AlphaAesar*: Linalool, Nicotinsäureethylester, 1-Octanol, 1-Octen-3-on

*BASF SE*: Imidazol, PVI-PVP 1 + 2, PVPP 1, 2-Pyrrolidon, *N*-Vinylimidazol, *N*-Vinylpyrrolidon

*Enamine*: 4-Aminobuttersäureamid

*Fluka*: Essigsäure, Glyoxylsäure

*Grüssing*: Ameisensäure, Natriumhydroxid

*Jarchem Industries Inc.*: PVPP 2 - 6

*Merck*: 4-Aminobuttersäure, Benzaldehyd, 2-Butanon, Buttersäure, Glutaminsäure, 2-Methylpropanol, 1-Pentanol, Weinsäure

*Riedel-de Haën*: 2-Furfural, Tetrahydrofuran

*Roth*: 1-Butanol, Dichlormethan, Diethylether, Ethanol, Ethylacetat, Glutamin, Hydroxyzimtsäureethylester, Kaliumhydroxid, Natriumchlorid, Natriumhydrogencarbonat, Natriumsulfat, Tert-Butylmethylether, Trifluoressigsäure

*SAFC*:  $\beta$ -Damascenon,  $\gamma$ -Nonalacton, (*E*)-2-Nonenal

*Sigma Aldrich*: Acetaldehyd, Acetonitril, 2-Acetylfuran, Buttersäureethylester, (+)-Catechin, Decansäure, Decansäureethylester, 1,1-Diethoxyethan, Essigsäureisobutylester, Essigsäureisopentylester, Essigsäurephenylethylester, Furfurylalkohol, Guajacol, Salzsäure, Hexansäure, Hexansäureethylester, Methanol, Methionol, 3-Methylbutanal, 2-Methylbutanol, 2-Methyl-2-butanol, 3-Methylbutanol, 3-Methylbuttersäure, 2-Methylbuttersäureethylester, Methylglyoxal, 4-Methylpentansäureethylester, 2-Methylpropansäure, Milchsäureethylester, Octansäure, Octansäureethylester, Phenylacetaldehyd, 2-Phenylethanol, 1-Propanol, Propansäure, Propansäureethylester, Valeriansäure, Vanillin, XAD-7

## 5.2 Geräte

<i>HPLC-UV:</i>	Jasco PU 2089 Plus Intelligent HPLC Pump Jasco AS 2055 Plus Intelligent Sampler Jasco UV 2075 Plus UV-Detector
<i>HPLC-DAD:</i>	Jasco PU 2080 Plus Intelligent HPLC Pump Jasco LG 2080-04 Quarternary Gradient Unit Jasco DG 2080-54 4-Line-Degasser Jasco AS 2055 Plus Intelligent Sampler Jasco MD 2015 Plus Multiwavelength Detector
<i>HPLC-MS/MS:</i>	Applied Biosystems Linear Ion Trap Quadrupole LC/MS/MS Mass Spectrometer 4000 Q Trap Jasco PU 2080 Plus Intelligent HPLC Pump Jasco LG 2080-04 Quarternary Gradient Unit Jasco DG 2080-54 4-Line-Degasser Jasco AS 2057 Plus Intelligent Sampler Jasco MD 2015 Plus Multiwavelength Detector
<i>GC-FID (Headspace):</i>	Perkin Elmer 8500 (Perkin Elmer, Westham, CA) mit Headspace-Einheit Perkin Elmer HS-6
<i>GC-FID:</i>	Agilent 6890N (Agilent Technologies, Palo Alto, CA)
<i>GC-MS:</i>	Thermo Electron Corporation, Finnigan Trace GC Ultra mit Trace DSQ (Thermo Fisher Scientific GmbH, Bremen)
 <i>Sonstige Geräte:</i>	
Gefriertrocknungsanlage:	VirTis, Benchtop SLC
Vakuumkonzentrator:	Savant Speed Vac Plus SC 110 A Savant Refrigerated Vapor Trap RVT 400
Hochauflösendes MS:	Bruker Apex III FT-ICR Waters (Micromass) Q-TOF-2
Microtiterplatten-Reader:	TECAN infinite M 200
NMR:	Varian Unity Inova 500
Reinstwasseranlage:	Seral, Seralpur PRO 90 CN

### 5.3 Bestimmung von Imidazol, 2-Pyrrolidon, *N*-Vinylimidazol, *N*-Vinylpyrrolidon, 4-Aminobuttersäure, 4-Aminobuttersäureamid, Glutaminsäure und Glutamin mittels LC-MS<sup>n</sup>

Die Bestimmung von Imidazol, 2-Pyrrolidon, *N*-Vinylimidazol, *N*-Vinylpyrrolidon, Glutaminsäure, Glutamin, 4-Aminobuttersäure und 4-Aminobuttersäureamid erfolgte mittels HPLC-MS/MS im MRM-Modus. Die HPLC-Parameter sind in Tab. 14, die entsprechenden MS-Parameter in Tab. 15 aufgeführt.

**Tab. 14:** HPLC-Parameter für die LC-MS/MS-Methode

<b>HPLC-Säule:</b>	Knauer Eurospher-100 C18, 250*4,6 mm, 5 µm; mit Vorsäule
<b>Gradient:</b>	85 : 15 (A : B) (10 min) $\xrightarrow{5\text{ min}}$ 0 : 100 (10 min) $\xrightarrow{5\text{ min}}$ 85 : 15 (15 min)
<b>Laufmittel:</b>	A: H <sub>2</sub> O + 0,6 ml/l Heptafluorbuttersäure (HFBA) B: MeOH:H <sub>2</sub> O 70:30 + 0,6 ml/l HFBA
<b>Fluß:</b>	1,0 ml/min

**Tab. 15:** Parameter des Massenspektrometers (MRM-Modus)

<b>Modus:</b>	MRM
<b>Polarität:</b>	positiv
<b>Curtain Gas:</b>	40 psi
<b>Ionspray Voltage:</b>	2500 V
<b>Temperatur:</b>	550 °C
<b>Source Gas 1:</b>	60 psi
<b>Source Gas 2:</b>	60 psi
<b>Entrance Potential:</b>	10 V

Verbindung	Q1 Mass (amu)	Q3 mass (amu)	Dwell (ms)	Parameter	Wert
Imidazol	69,08	42,20	75	DP	81
				CE	31
				CXP	2
2-Pyrrolidon	86,10	44,10	75	DP	66
				CE	31
				CXP	6
2-Pyrrolidon	86,10	69,00	75	DP	66
				CE	23
				CXP	4
<i>N</i> -Vinylimidazol	95,09	41,10	75	DP	71
				CE	33
				CXP	0
<i>N</i> -Vinylimidazol	95,09	69,20	75	DP	71
				CE	29
				CXP	12

N-Vinylpyrrolidon	112,08	69,20	75	DP	51
				CE	21
				CXP	4
N-Vinylpyrrolidon	112,08	84,00	75	DP	51
				CE	17
				CXP	14
Glutamin	147,10	130,10	75	DP	55
				CE	19
				CXP	11
Glutamin	147,10	84,00	75	DP	65
				CE	24
				CXP	15
Glutaminsäure	148,10	130,10	75	DP	40
				CE	20
				CXP	10
Glutaminsäure	148,10	102,10	75	DP	40
				CE	21
				CXP	10
4-Aminobuttersäure	104,10	86,10	75	DP	35
				CE	13
				CXP	7
4-Aminobuttersäure	104,10	68,90	75	DP	35
				CE	20
				CXP	12
4-Aminobutter- säureamid	103,10	75,00	75	DP	55
				CE	19
				CXP	11
4-Aminobutter- säureamid	103,10	57,10	75	DP	65
				CE	24
				CXP	15

Die Weinproben wurden entsprechend verdünnt und anschließend vermessen. Die Quantifizierung erfolgte mittels Matrixkalibrierung für Rot- und Weißwein getrennt, wobei für Rosé-Weine die Kalibrierung für Weißwein verwendet wurde. Für die Vermessung von Reaktionsansätzen in Weinsimulanz wurden die Kalibrierlösungen ebenfalls in Weinsimulanz hergestellt. Jede Probe wurde doppelt injiziert; jeweils der Mittelwert der Peakflächen wurde für die Berechnung der Konzentrationen herangezogen.

#### 5.4 Validierung der LC-MS/MS-Methode

Für die Verbindungen Imidazol, 2-Pyrrolidon, N-Vinylimidazol sowie N-Vinylpyrrolidon wurden Nachweisgrenze, Bestimmungsgrenze, Wiederfindung, laborinterne Reproduzierbarkeit, Wiederholbarkeit sowie Linearität bestimmt. Kalibrierungen wurden immer als Matrix-Kalibrierung in Weiß- oder Rotwein

durchgeführt. Die Bestimmung von Nachweis- sowie Bestimmungsgrenze erfolgte nach dem Signal-Rausch-Verhältnis nach der Resolution OENO-7-2000 der internationalen Organisation für Rebe und Wein (OIV). Dazu wurden 20 Blindwerte (Rot- und Weißweine) vermessen und die Rauschhöhe zur Retentionszeit bestimmt. Über eine Kalibrierung über die Peakhöhe wird nun Nachweisgrenze (dreifache Rauschhöhe) und Bestimmungsgrenze (zehnfache Rauschhöhe) berechnet.

Die Wiederfindung wurde über dotierte Weinproben berechnet. Es erfolgte eine siebenfach Bestimmung. Die Dotierungen betragen für Imidazol 20, 50, 80 µg/l, für 2-Pyrrolidon 90, 150, 250 µg/l und für *N*-Vinylimidazol sowie *N*-Vinylpyrrolidon 8, 12 und 16 µg/l. Über die Bestimmung der Reproduzierbarkeit und Wiederholbarkeit in den verschiedenen Matrices an verschiedenen Tagen wurden die Reproduzierbarkeit berechnet.

## **5.5 Weinsimulanz**

4 bzw. 5 g Weinsäure wurden in 850 ml dest. Wasser gelöst und mit 100 ml Ethanol (100 %ig) sowie 0,1 g Eisessig versetzt. Es wurde mit Natriumhydroxidlösung (2 M) auf pH = 3,2 eingestellt und anschließend auf 1 l aufgefüllt.

## **5.6 Migration**

In 25 ml-Schraubgläser wurden ca. 150 mg Polymer eingewogen und mit 15 ml Weinsimulanzlösung versetzt. Die Gläser wurden verschlossen und bei 5 °C geschüttelt. Nach 5, 10, 15, 30 bzw. 60 Minuten wurde bei 4500 U/min für 2 min zentrifugiert, die überstehende Lösung abgenommen und analysiert.

### **5.7 Inkubation von 4-Aminobuttersäure, 4-Aminobuttersäureamid und 2-Pyrrolidon**

Es wurden 500 mg 2-Pyrrolidon, 500 mg 4-Aminobuttersäure bzw. 2 mg 4-Aminobuttersäureamid in je 1 l Weinsimulanzlösung gelöst und bei 50 °C für 190 Tage inkubiert.

### **5.8 Inkubation von N-Vinylpyrrolidon**

2 mg N-Vinylpyrrolidon wurden in 1 l Weinsimulanzlösung gelöst und bei Raumtemperatur inkubiert. In regelmäßigen Abständen wurde die Lösung unverdünnt mittels LC-MS/MS analysiert.

### **5.9 Weinproben für die statistische Analyse**

Für die statistische Analyse wurden 140 Weinproben mit folgenden Parametern vermessen:

*Farbe:* weiß (72), rot (62), rosé (6)

*Süße (lt. Etikett):* trocken (92), halbtrocken (22), lieblich (26)

*Herkunftsländer:* Australien (3), Bulgarien (1), Chile (5), Deutschland (70), Frankreich (14), Italien (20), Mazedonien (1), Mexiko (1), Österreich (1), Portugal (1), Rumänien (1), Spanien (7), Südafrika (4), Ungarn (7), Vereinigte Staaten von Amerika (4)

*Jahrgänge:* 1991 (1), 1995 (1), 1997 (1), 2000 (1), 2001 (2), 2002 (2), 2003 (2), 2004 (4), 2005 (10), 2006 (33), 2007 (66), 2008 (11), unbekannt (4)

*sonstige Parameter:* aus biologischem Anbau – EcoVin (3), Qualitätswein (79)

### **5.10 Multivariate Datenanalyse**

Die multivariate Datenanalyse wurden mit SPSS 17.0 durchgeführt. Es wurden die Korrelationen zwischen den Weinparametern (Farbe, Jahrgang, Herkunftsgebiet, Alkoholgehalt, Zuckergehalt (lt. Etikett), Qualitätswein) und den Konzentrationen

der bestimmten Verbindungen (2-Pyrrolidon, 4-Aminobuttersäure, 4-Aminobuttersäureamid, Glutamin, Glutaminsäure) berechnet. Der Beta-Koeffizient drückt den Einfluss aus, welchen eine Variable auf eine andere hat, wenn alle andere Variablen adjustiert werden. Die Maxima sind +1,000 bzw. -1,000 für eine positive bzw. negative Korrelation. Alle dargestellten Korrelationen sind signifikant ( $p < 0,05$ ).

### 5.11 Isolierung von Malvidin-3-O-glucosid aus Spätburgunder mittels Multilayer Countercurrent Chromatography (MLCCC)

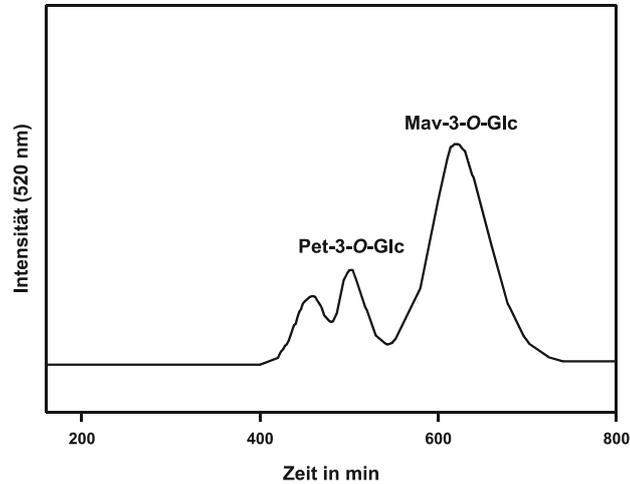
Für die Isolierung von Malvidin-3-O-glucosid wurde möglichst junger Spätburgunder verwendet, da dieser nur wenige andere störende Anthocyane enthält. 0,7 l Wein wurden mittels Rotationsverdampfer bei 30 °C auf etwa 200-300 ml aufkonzentriert. Zur Entfernung aller nicht-phenolischen Verbindungen wurde das Konzentrat über eine Amberlite XAD-7-Säule (30 cm\*6 cm) gegeben. Es wurde mit 1 l dest. Wasser gewaschen und anschließend mit Methanol/Eisessig (19:1) eluiert. Nach Abziehen des Methanols wurde die wässrige Lösung zweimal mit je 300 ml Ethylacetat extrahiert, um höher polymere Polyphenole abzutrennen. Die wässrige Phase wurde anschließend zur Trockne einrotiert, in etwas Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Es konnten ca. 300 mg Anthocyan-Rohextrakt erhalten werden.

Dieses Rohextrakt musste nun mittels MLCCC aufgereinigt werden, um reines Malvidin-3-O-glucosid zu erhalten. In Tab. 16 sind die verwendeten Trennbedingungen aufgeführt.

**Tab. 16:** MLCCC-Parameter zur Isolierung von Malvidin-3-O-glucosid

<b>Laufmittel:</b>	tert-Butylmethylether:	0,5
	n-Butanol:	3,5
	Acetonitril:	1
	1,25 M NaCl-Lösung:	5
	+ 0,5 % Trifluoressigsäure	
<b>Rotationsgeschwindigkeit:</b>	800 U/min	
<b>Fluss:</b>	2 ml/min	
<b>Elutionsmodus:</b>	head to tail	
<b>Detektion:</b>	$\lambda = 520 \text{ nm}$	

Etwa 150 mg Rohextrakt wurden in 5 ml organischer und wässriger Phase (50:50) gelöst, zentrifugiert und zur Isolierung eingesetzt. Abb. 70 zeigt ein MLCCC-Chromatogramm bei 520 nm.



**Abb. 70:** MLCCC-Chromatogramm des Anthocyanrohextraktes

Um möglichst reines Malvidin-3-O-glucosid (Mal-3-O-glu) zu erhalten, wurden die Fraktionen, die zu Petunidin-3-O-glucosid (Pet-3-O-glu) und Malvidin-3-O-glucosid gehören, mittels HPLC vermessen; die entsprechenden reinen Fraktionen wurden vereinigt. Das Lösemittel wurde abgezogen und der NaCl-haltige Rückstand in möglichst wenig Wasser aufgenommen. Für die Entfernung des Salzes wurde eine kleine XAD-7-Säule verwendet (10 cm\*2 cm). Der gelöste Rückstand wurde auf die Säule gegeben und mit Wasser chloridfrei gewaschen (Test mittels  $\text{AgNO}_3$ -Lsg.). Eluiert wurde äquivalent zur großen Säule mit Methanol/Eisessig (19:1). Das Lösemittel wurde ebenfalls abgezogen, der Rückstand in Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet. Es ergab sich ein rot-violettes Pulver.

## 5.12 HPLC-Methode zur Bestimmung von Anthocyanen in Wein

Die Bestimmung von Anthocyanen in Wein erfolgte mittels HPLC-UV sowie HPLC-MS. In Tab. 17 sind die HPLC-Bedingungen aufgeführt.

**Tab. 17:** HPLC-Bedingungen zur Analyse von Anthocyanen in Wein

<b>Säule:</b>	Knauer Eurospher 100-5 C18, 250*4 mm, 5 µm; mit Vorsäule
<b>Gradient</b>	98 : 2(A : B) (20 min) $\xrightarrow{40 \text{ min}}$ 75 : 25 $\xrightarrow{15 \text{ min}}$ 50 : 50 $\xrightarrow{5 \text{ min}}$ 0 : 100 (15 min) $\xrightarrow{5 \text{ min}}$ 98 : 2 (20 min)
<b>Laufmittel:</b>	A: Ameisensäure (10 %ig) B: Ameisensäure (10 %ig):Acetonitril (1:9)
<b>Fluss:</b>	0,8 ml/min
<b>Temperatur</b>	40 °C
<b>Detektion:</b>	$\lambda = 520 \text{ nm}$

Die Messung am HPLC-MS erfolgte im Q1-Modus im Massenbereich von 300-700 Da mit einer Scanzeit von 0,5 s (MS-Parameter siehe Tab. 18).

**Tab. 18:** Parameter des Massenspektrometers zur Analyse von Anthocyanen in Wein

<b>Modus:</b>	Q1
<b>Polarität:</b>	positiv
<b>Curtain Gas:</b>	40 psi
<b>Ionspray Voltage:</b>	4500 V
<b>Temperatur:</b>	500 °C
<b>Source Gas 1:</b>	50 psi
<b>Source Gas 2:</b>	60 psi
<b>Declustering Potential:</b>	60 V
<b>Entrance Potential:</b>	10 V

### 5.13 Einfluss von Polymeren auf das Anthocyanprofil von Wein

Jeweils 10 mg des zu untersuchenden Polymers wurden in 25 ml-Schraubgläser eingewogen und mit 20 ml Dornfelder Rotwein versetzt. Um eine Veränderung des Anthocyanprofils durch Reaktionen während der Inkubation auszugleichen, wurden Blindwerte ohne die Zugabe der 10 mg Polymer mitgeführt. Alle Versuche wurden in einer Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Schraubgläser wurden bei Raumtemperatur für 30 Minuten geschüttelt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation mit 4500 U/min für 2 Minuten. Der Überstand wurde abgenommen und bis zur Messung eingefroren. Die Bestimmung der Anthocyankonzentrationen erfolgte mittels LC-MS/MS mit der Methode 5.12.

#### 5.14 Reaktion von (+)-Catechin, Malvidin-3-O-glucosid und Methylglyoxal

(+)-Catechin-hydrat sowie Malvidin-3-O-glucosid wurden in Weinsimulanz in einem Braunglas-Vial gelöst (siehe Tab. 19). Nach der Zugabe von Methylglyoxal wurde die Lösung mit Argon entgast und überschichtet. Die Proben wurden lichtgeschützt bei der entsprechenden Temperatur inkubiert. Zum entsprechenden Zeitpunkt wurden 300 µl Lösung entnommen, die Inkubationslösung wurde anschließend wieder mit Argon überschichtet und weiter inkubiert. Die entnommene Lösung wurde eingefroren und später mittels LC-MS/MS (siehe 5.12) und HPLC-UV vermessen.

**Tab. 19:** Zusammensetzung der verschiedenen Malvidin-3-O-glucosid-(+)-Catechin-Inkubationen

Versuch	Konzentration Malvidin-3-O-glucosid	Konzentration (+)-Catechin	Konzentration Acetaldehyd/ Methylglyoxal	pH-Wert	Temperatur
Methylglyoxal-Inkubation	0,51 mM	2,3 mM	5,7 mM MGO	3,2	37 °C
Acetaldehyd-Inkubation	0,51 mM	2,3 mM	5,7 mM AA	3,2	37 °C
Inkubation mit erhöhter Mal-3-O-glu-Konz.	1,00 mM	2,3 mM	5,7 mM MGO	3,2	37 °C
Inkubation bei pH = 1,7	0,51 mM	2,3 mM	5,7 mM MGO	1,7	37 °C
Inkubation bei Raumtemperatur	0,51 mM	2,3 mM	5,7 mM MGO	3,2	22 °C

#### 5.15 Reaktion von (+)-Catechin und Methylglyoxal

(+)-Catechin-hydrat wurde im entsprechenden Lösemittel in einem Braunglas-Vial gelöst (siehe Tab. 20). Nach der Zugabe von Methylglyoxal wurde die Lösung mittels Argon entgast und überschichtet. Die Proben wurden lichtgeschützt inkubiert. Zum entsprechenden Zeitpunkt wurden 300 µl Lösung entnommen, die Inkubationslösung wurde anschließend wieder mit Argon überschichtet und weiter inkubiert. Die entnommene Lösung wurde eingefroren und später mittels LC-MS/MS und HPLC-UV vermessen.

**Tab. 20:** Zusammensetzung der verschiedenen (+)-Catechin-Inkubationen

Versuch	Lösemittel	Konzentration (+)-Catechin	Konzentration Methylglyoxal/ Glyoxylsäure	pH-Wert	Temperatur
(+)-Catechin-Inkubation	Weinsimulanz	2,3 mM	-	3,2	50 °C
Methylglyoxal-Inkubation	Weinsimulanz	2,3 mM	5,7 mM MGO	3,2	50 °C
Methylglyoxal-Inkubation mit DTPA	Weinsimulanz mit 1 mM DTPA	2,3 mM	5,7 mM MGO	3,2	50 °C
Glyoxylsäure-Inkubation	Weinsimulanz	2,3 mM	5,7 mM AA	3,2	50 °C
Inkubation unter physiologischen Bedingungen (pH 7,4)	Phosphatpuffer	2,3 mM	5,7 mM MGO	7,4	37 °C
Inkubation mit Methylglyoxal-Unterschuss	Weinsimulanz	2,3 mM	1 mM MGO	1,7	50 °C
Inkubationen mit Sauerstoff (Proben nicht entgast und mit Luft überschichtet)	Weinsimulanz	2,3 mM	5,7 mM MGO	3,2	50 °C

### 5.16 Bestimmung der Veränderung der Absorptionsmaxima

Je 300 µl einer (+)-Catechin-Malvidin-3-O-glucosid-Inkubation, einer (+)-Catechin-Malvidin-3-O-glucosid-Methylglyoxal-Inkubation und einer (+)-Catechin-Malvidin-3-O-glucosid-Acetaldehyd-Inkubation wurden in eine 96-Well-Microtiterplatte (Polystyrol) pipettiert, mit einer chemikalienbeständigen Folie verschlossen und bei 37 °C für 8 Tage im Mikrotiterplattenreader inkubiert. Das Absorptionsspektrum wurden täglich vermessen.

### 5.17 Isolierung der Addukte von (+)-Catechin und Methylglyoxal

Die Isolierung der (+)-Catechin-Methylglyoxal-Addukte erfolgte mittels präparativer HPLC. Die dafür verwendeten Reaktionsansätze wiesen eine (+)-Catechin-Konzentration von 50 mM und eine Methylglyoxal-Konzentration von 120 mM auf. Die Bedingungen der präparativen HPLC sind in der folgenden Tabelle dargestellt (Tab. 21).

**Tab. 21:** Bedingungen der präp. HPLC zur Isolierung der (+)-Catechin-Methylglyoxal-Addukte

<b>Säule:</b>	Knauer Eurospher 100-10 C18, 250*20 mm, 10 µm; mit Vorsäule
<b>Laufmittel:</b>	isokratisch: MeOH:H <sub>2</sub> O (2,8:97,2) + 0,1 % Ameisensäure
<b>Fluss:</b>	19 ml/min
<b>Temperatur</b>	22 °C
<b>Detektion:</b>	λ = 280 nm

Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt, am Rotationsverdampfer bei 30 °C abgezogen, mit Wasser aufgenommen und anschließend lyophilisiert.

Für die Aufkonzentrierung der (+)-Catechin-Malvidin-3-O-glucosid-Methylglyoxal-Addukte sowie der (+)-Catechin-Methylglyoxal-Addukte mittels analytischer HPLC wurden 100 µl Probe in die analytische HPLC injiziert. Das Laufmittel wurde zur entsprechenden Retentionszeit aufgefangen und mittels Vakuumzentrifuge getrocknet. Die Isolierung mittels LC-MS verlief äquivalent. Zur entsprechenden Retentionszeit wurde die HPLC vom Detektor getrennt, das Laufmittel aufgefangen und die Kapillare anschließend wieder mit dem Massenspektrometer verbunden.

## 5.18 Bierproben

*Vorversuche (beschleunigte Alterung für 14 Tage):*

Bierprobe A: 0 g/hl und 50 g/hl PVI/PVP, ca. 6 Monate bei RT gealtert

Bierprobe B: 0 g/hl und 50 g/hl PVI/PVP

Bierprobe C: 0 g/hl, 36 g/hl und 46 g/hl PVI/PVP

Bierprobe D: 0 g/hl und 50 g/hl PVI/PVP

Bierprobe E: unbehandelt und behandelt mit PVI/PVP

*Alterungskurve (beschleunigte Alterung für 56 Tage):*

alle Proben wurden mit Kieselgur filtriert

Bierprobe F, unbehandelt

Bierprobe F, behandelt mit 50 g/hl PVI/PVP

Bierprobe F, behandelt mit 35 g/hl Kieselgel

Bierprobe F, behandelt mit 20 g/hl Kieselgel + 15 g/hl PVPP

### **5.19 Beschleunigte Alterung von Bier**

Alle Proben wurden während der Alterung unterschiedlichen Temperaturen ausgesetzt. Dazu wurde alle 24 h zwischen 4 °C und 40 °C gewechselt. Für die Temperatur von 4 °C wurde ein Kühlschrank verwendet, für 40 °C ein Trockenschrank mit Umlufffunktion. Die Proben wurden anschließend über einen Faltenfilter CO<sub>2</sub>-frei filtriert und danach eingefroren. Vor Durchführung der Analyse wurde die jeweilige Probe bei Raumtemperatur aufgetaut, so lange geschüttelt, bis alle Trübungen gelöst waren, und anschließend zur Destillation eingesetzt.

### **5.20 Analyse der flüchtigen Verbindungen mittels Headspace**

In ein 5ml-Headspace-Vial wurden 1 g Natriumsulfat, 50 µl internem Standard (THF, 250 µl/l) sowie 2 ml Probe gegeben und verschlossen. Die Probe wurde im Injektor für 15 Minuten auf 50 °C temperiert und dann vermessen.

### **5.21 Analyse der flüchtigen Verbindungen mittels SPME**

In ein 10ml-Vial wurden 2,5 g Natriumsulfat, 50 µl internem Standard (THF, 250 µl/l) sowie 5 ml Probe gegeben und verschlossen. Das Vial wurde bei einer Rührgeschwindigkeit von 700 rpm bei 50 °C für 5 Minuten im Wasserbad temperiert. Anschließend wurde die SPME-Faser in den Dampfraum des Vials gebracht und für 15 Minuten dort belassen. Die Desorptionsdauer im Injektor betrug 5 Minuten.

### **5.22 Isolierung der neutralen Aromastoffe mittels SAFE**

100 ml Probe wurden mit 50 µl int. Standard (1,0 g/l 1-Octanol in Diethylether) versetzt und mittels SAFE destilliert. Das gefrorene Destillat wurde anschließend aufgetaut, mit 35 g Natriumchlorid versetzt und dreimal mit jeweils 125 ml Diethylether extrahiert. Der verwendete Diethylether musste vor der Benutzung bei 42 °C

destilliert werden, um enthaltene Verunreinigungen abzutrennen. Die Lagerung des vordestillierten Diethylethers erfolgte über Kaliumhydroxid-Plätzchen (85%ig). Der Diethylether-Extrakt wurde anschließend mit 0,5 M Natriumhydrogencarbonatlösung extrahiert (2\*200 ml), um saure Verbindungen zu entfernen. Die Diethylether-Phase wurde nun über 10 g CaSO<sub>4</sub> im Kühlschrank über Nacht getrocknet. Die Aufkonzentrierung erfolgte über eine Vigreux-Kolonne (60 cm\*2 cm) bei 41 °C. Zur Entfernung eventuell mitextrahierten Ethanol wurden 25 ml Dichlormethan zugefügt und ebenfalls bei 46 °C abdestilliert. Das erhaltene Konzentrat wurde mit Diethylether in einen Fingerkolben überführt und auf 0,5 ml aufkonzentriert (Vigreux-Kolonne, 15 cm\*1 cm).

### **5.23 Isolierung der sauren Aromastoffe**

Zur Isolierung der sauren Fraktion der Aromastoffe wurde das Natriumhydrogencarbonat-Extrakt mit konz. Salzsäure auf pH = 4 gebracht und anschließend äquivalent zur neutralen Fraktion dreifach mit je 125 ml Diethylether extrahiert, getrocknet, aufkonzentriert, mit Dichlormethan versetzt und auf 0,5 ml einreduziert.

### **5.24 Bestimmung von Eisen-, Kupfer-, Mangan-, Polyphenol- und Proteinkonzentration in Bier**

Die Konzentrationen an Eisen, Kupfer sowie Mangan wurde von Hr. Viehweger am Landesamt für Verbraucherschutz des Landes Sachsen-Anhalt mittels ICP-OES durchgeführt.

Die Bestimmung des Gesamtpolyphenolgehaltes (Analytica EBC, Sektion 9, Methode 9.11) sowie der Konzentration an sensitiven Proteinen (Tannometer, EBC-Methode) wurden von BASF SE durchgeführt.

## 5.25 Messung am GC-FID

Gerät: Agilent 6890N (AgilentTechnologies, Palo Alto, CA)  
 Injektor: split: 1:10, 220 °C  
 Säule: DB-5ms (J&W Scientific, AgilentTechnologies, Palo Alto, CA);  
 60 m \* 0,32 mm \* 0,1 µm, 3 m desaktivierte Vorsäule  
 Flussrate: constant flow, 1,2 ml/min, 20 cm/s  
 Trägergas: Helium 4.6  
 Detektor: FID  
 Temp.-Programm: 40 °C (10 min)  $\xrightarrow{4\text{ K/min}}$  100 °C (20 min)  $\xrightarrow{5\text{ K/min}}$  250 °C (10 min)

### Headspace:

Gerät: Perkin Elmer 8500 (Perkin Elmer, Westham, CA)  
 Injektor: Perkin Elmer HS-6  
 Injektionsmodus: splitless, Dampfraumspülung: 6 s  
 Säule: DB-5ms (J&W Scientific, AgilentTechnologies, Palo Alto, CA);  
 60 m \* 0,32 mm \* 0,25 µm, 3 m desaktivierte Vorsäule  
 Fluss: constant pressure, 15 psi, 20 cm/s  
 Trägergas: Helium 4.6  
 Detektor: FID  
 Temp.-Programm: 40 °C (10 min)  $\xrightarrow{5\text{ K/min}}$  100 °C  $\xrightarrow{10\text{ K/min}}$  250 °C (10 min)

### SPME:

Gerät: Perkin Elmer 8500 (Perkin Elmer, Westham, CA)  
 Injektor: splitless, 250 °C; Split 1:10 geöffnet nach 30 s,  
 Säule: DB-5ms (J&W Scientific, AgilentTechnologies, Palo Alto, CA);  
 60 m \* 0,32 mm \* 0,25 µm, 3 m desaktivierte Vorsäule  
 Flussrate: constant pressure, 15 psi, 20 cm/s  
 Trägergas: Helium 4.6  
 Detektor: FID  
 Temp.-Programm: 40 °C (10 min)  $\xrightarrow{4\text{ K/min}}$  100 °C (20 min)  
 $\xrightarrow{5\text{ K/min}}$  250 °C (10 min)

## 5.26 Messung am GC-MS

Gerät: Thermo Electron Corporation, Finnigan Trace GC Ultra mit Trace DSQ (Thermo Fisher Scientific GmbH, Bremen)

### *neutrale Verbindungen:*

Injektor: 220 °C, split: 1:10  
Trennsäule: DB-5ms (J&W Scientific, AgilentTechnologies, Palo Alto, CA), 60 m \* 0,32 mm \* 0,1 µm, 3 m desaktivierte Vorsäule  
Fluss: constant flow, 1 ml/min, 28 cm/s  
Trärgas: Helium 5.0  
Temp.-Programm: 40 °C (10 min)  $\xrightarrow{4\text{K/min}}$  100 °C (20 min)  $\xrightarrow{5\text{K/min}}$  270 °C (10 min)  
MS-Modus: EI (70 eV), Full-Scan 25-250 m/z

### *saure Verbindungen:*

Injektor: 200 °C, split: 1:20  
Trennsäule: DB-WAX (J&W Scientific, AgilentTechnologies, Palo Alto, CA), 60 m \* 0,25 mm \* 0,25 µm, 3 m desaktivierte Vorsäule  
Fluss: constant pressure, 15 psi, 20 cm/s  
Trärgas: Helium 5.0  
Temp.-Programm: 40 °C (10 min)  $\xrightarrow{4\text{K/min}}$  100 °C (20 min)  $\xrightarrow{5\text{K/min}}$  220 °C (10 min)  
MS-Modus: EI (70 eV), Full-Scan 30-650 m/z

## 6 Literaturverzeichnis

- [1] Arvanitoyannis, I., Fronimos, P., Embeoglou, I., Influence of Some Proteins on the Contents of Several Metals in Red Wines. *Nahrung-Food* **1991**, 35 (4), 373-378
- [2] Arvanitoyannis, I. S. und Bosnea, L., Migration of substances from food packaging materials to foods. *Crit.Rev.Food Sci.Nutr.* **2004**, 44 (2), 63-76
- [3] Baxter, E. D., Recognition of 2 Lipases from Barley and Green Malt. *J.Inst.Brew.* **1984**, 90 (4), 277-281
- [4] Belitz, H. D., Grosch, W., Schieberle, P. *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*; 5. Auflage; Berlin, **2001**
- [5] Bravo, A., Scherer, E., Madrid, J., Herrera, J. C., Virtanen, H., Rangel-Aldao, R., Identification of  $\alpha$ -dicarbonylic compounds in aged beers: Their role in beer aging process. *Proceedings of the European Brewery Convention Congress* **2001**, 602-611
- [6] Burns, C. S., Heyerick, A., De, K. D., Forbes, M. D., Mechanism for formation of the lightstruck flavor in beer revealed by time-resolved electron paramagnetic resonance. *Chemistry* **2001**, 7 (21), 4553-4561
- [7] Chen, S. und Xu, Y., The influence of yeast strains on the volatile flavour compounds of Chinese rice wine. *J.Inst.Brew.* **2010**, 116 (2), 190-196
- [8] Dalglish, C. E., Flavour stability. *Proceedings of the European Brewery Convention Congress* **1977**, 623-659
- [9] De Cooman, L., Aerts, G., Overmeire, H., De Keukeleire, D., Alterations of the profiles of iso-alpha-acids during beer ageing, marked instability of trans-iso-alpha-acids and implications for beer bitterness consistency in relation to tetrahydroiso-alpha-acids. *J.Inst.Brew.* **2000**, 106 (3), 169-178
- [10] De Revel, G., Pripis-Nicolau, L., Barbe, J. C., Bertrand, A., The detection of alpha -dicarbonyl compounds in wine by formation of quinoxaline derivatives. *J.Sci.Food Agric.* **2000**, 80 (1), 102-108
- [11] Denisov, V. M., Ushakova, V. N., Kol'tsov, A. I., Panarin, E. F., Reaction of N-vinylpyrrolidinone with a solvent in the presence of acid in aqueous and alcoholic solutions. *Zh.Prikl.Khim.(Leningrad)* **1989**, 62 (3), 660-664
- [12] Dixon, R. O. D. und Fowden, L., 4-Aminobutyric acid metabolism in plants. II. Metabolism in higher plants. *Ann.Bot.(Oxford, U.K.)* **1961**, 25, 513-530
- [13] Duenas, M., Fulcrand, H., Cheynier, V., Formation of anthocyanin-flavanol adducts in model solutions. *Analytica Chimica Acta* **2006**, 563 (1-2), 15-25
- [14] EcoVin, Richtlinien des EcoVin Bundesverbandes ökologischer Weinbau e. V., [http://www.bund-frankfurt.de/fileadmin/inhalte/Biolebensmittel\\_Rhein-Main/ecovin-richtlinien.pdf](http://www.bund-frankfurt.de/fileadmin/inhalte/Biolebensmittel_Rhein-Main/ecovin-richtlinien.pdf), **2005**, 7. Fassung

- 
- [15] Eder, R., Schlager, G., Wendelin, S., Metal reduction of wines by means of selective resins. *Bull.O.I.V.* **2003**, 76 (865-866), 242-260
- [16] Eder, R., Schreiner, A., Schlager, G., Pischinger, K., Wendelin, S., Reduction of metal contents of wines by means of selective resins. *Mitt.Klosterneuburg* **2001**, 51 (5), 182-193
- [17] Engel, W., Bahr, W., Schieberle, P., Solvent assisted flavor evaporation. A new and versatile technique for the careful and direct isolation of aroma compounds from complex food matrixes. *Z.Lebensm.-Unters.Forsch.A* **1999**, 209 (3-4), 237-241
- [18] Es-Safi, N. E., Fulcrand, H., Cheynier, V., Moutounet, M., Competition between (+)-catechin and (-)-epicatechin in acetaldehyde-induced polymerization of flavanols. *J.Agric.Food Chem.* **1999a**, 47 (5), 2088-2095
- [19] Es-Safi, N. E., Fulcrand, H., Cheynier, V., Moutounet, M., Studies on the Acetaldehyde-Induced Condensation of (-)-Epicatechin and Malvidin 3-O-Glucoside in a Model Solution System. *J.Agric.Food Chem.* **1999b**, 47 (5), 2096-2102
- [20] Es-Safi, N. E., Le Guerneve, C., Fulcrand, H., Cheynier, V., Moutounet, M., Xanthylum salts formation involved in wine colour changes. *International Journal of Food Science and Technology* **2000**, 35 (1), 63-74
- [21] EU, RL 97/48/EG, Grundregeln für die Ermittlung der Migration von Materialien und Gegenständen aus Kunststoff, die dazu bestimmt sind, mit Lebensmitteln in Berührung zu kommen, **29.07.1997**
- [22] Frankel, E. N., Kanner, J., German, J. B., Parks, E., Kinsella, J. E., Inhibition of Oxidation of Human Low-Density-Lipoprotein by Phenolic Substances in Red Wine. *Lancet* **1993**, 341 (8843), 454-457
- [23] Fritsch, H. T. und Schieberle, P., Identification based on quantitative measurements and aroma recombination of the character impact odorants in a Bavarian Pilsner-type beer. *J Agric Food Chem* **2005**, 53 (19), 7544-7551
- [24] Fulcrand, H., Cheynier, V., Oszmianski, J., Moutounet, M., An oxidized tartaric acid residue as a new bridge potentially competing with acetaldehyde in flavan-3-ol condensation. *Phytochemistry* **1997**, 46 (2), 223-227
- [25] Fulcrand, H., Doco, T., Essafi, N. E., Cheynier, V., Moutounet, M., Study of the acetaldehyde induced polymerisation of flavan-3-ols by liquid chromatography ion spray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1996**, 752 (1-2), 85-91
- [26] Fussnegger, B., Maurer, R., Detering, J., Insoluble, complex-forming polymers as potential substitutes for potassium hexacyanoferrate(II) for the diminution of heavy metals in wine. *Wein-Wiss.* **1992**, 47 (1), 8-23
- [27] Garbe, L. A., Lange, H., Tressl, R., Biosynthesis of  $\gamma$ -nonalactone in yeast. *ACS Symp.Ser.* **2001**, 794 (Aroma Active Compounds in Foods), 176-182

- 
- [28] Gijs, L., Chevance, F., Jerkovic, V., Collin, S., How low pH can intensify beta-damascenone and dimethyl trisulfide production through beer aging. *J.Agric.Food Chem.* **2002**, *50* (20), 5612-5616
- [29] Glomb, M. A., Dicarbonyls from Maillard degradation of mono- and disaccharides, 238th ACS National Meeting; Washington, DC, **2009**
- [30] Glomb, M. A. und Lederer, M. O., Food chemistry 2001. Reactions of amino acids in foods. *Nachr.Chem.* **2002**, *50* (3), 358-360
- [31] Gorinstein, S., Moshe, R., Wolfe, F. H., Berliner, M., Rotenstreich, A., Tilis, K., Characterization of stabilized and unstabilized beers. *J.Food Biochem.* **1990**, *14* (2), 161-172
- [32] Harbertson, J. F., A Guide of the Fining of Wine. *Washington State University Extension* **2009**, (EM016)
- [33] Hashim, L., Hudiyono, S., Chaveron, H., Volatile compounds of oxidized cocoa butter. *Food Research International* **1997**, *30* (3-4), 163-169
- [34] Hashimoto, N. und Eshima, T., Oxidative-Degradation of Isohumulones in Relation to Flavor Stability of Beer. *J.Inst.Brew.* **1979a**, *85* (3), 136-140
- [35] Hashimoto, N. und Eshima, T., Oxidative degradation of isohumulones in relation to flavor stability of beer. *Journal of the Institute of Brewing* **1979b**, *85* (3), 136-140
- [36] Hofmann, T., Munch, P., Schieberle, P., Quantitative model studies on the formation of aroma-active aldehydes and acids by strecker-type reactions. *J Agric Food Chem* **2000**, *48* (2), 434-440
- [37] Hollnagel, A. und Kroh, L. W., 3-Deoxypentosulose: An alpha-dicarbonyl compound predominating in nonenzymatic browning of oligosaccharides in aqueous solution. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2002**, *50* (6), 1659-1664
- [38] Hollnagel, A. und Kroh, L. W., Degradation of Oligosaccharides in Nonenzymatic Browning by Formation of alpha -Dicarbonyl Compounds via a "Peeling Off" Mechanism. *J.Agric.Food Chem.* **2000**, *48* (12), 6219-6226
- [39] Intelmann, D. und Hofmann, T., On the Autoxidation of Bitter-Tasting Iso- $\alpha$ -acids in Beer. *J.Agric.Food Chem.* **2010**, *58* (8), 5059-5067
- [40] Ito, Y., High-speed countercurrent chromatography. *CRC Crit.Rev.Anal.Chem.* **1986**, *17* (1), 65-143
- [41] Kaneda, H., Kano, Y., Osawa, T., Kawakishi, S., Kamada, K., The role of free radicals in beer oxidation. *J.Am.Soc.Brew.Chem.* **1989**, *47* (2), 49-53
- [42] Kaneda, H., Takashio, M., Tamaki, T., Osawa, T., Influence of pH on flavor staling during beer storage. *J.Inst.Brew.* **1997**, *103* (1), 21-23

- 
- [43] Kishimoto, T., Wanikawa, A., Kono, K., Shibata, K., Comparison of the Odor-Active Compounds in Unhopped Beer and Beers Hopped with Different Hop Varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2006**, *54* (23), 8855-8861
- [44] Kobayashi, N., Kaneda, H., Kano, Y., Koshino, S., Behavior of lipid hydroperoxide during mashing. *J.Am.Soc.Brew.Chem.* **1994**, *52* (4), 141-145
- [45] Korhammer, S., Reniero, F., Mattivi, F., An Oligostilbene from Vitis Roots. *Phytochemistry* **1995**, *38* (6), 1501-1504
- [46] Laurie, V. F. und Waterhouse, A. L., Glyceraldehyde Bridging between Flavanols and Malvidin-3-glucoside in Model Solutions. *J.Agric.Food Chem.* **2006**, *54* (24), 9105-9111
- [47] Lermusieau, G., Noel, S., Liegeois, C., Collin, S., Nonoxidative mechanism for development of trans-2-nonenal in beer. *J.Am.Soc.Brew.Chem.* **1999**, *57* (1), 29-33
- [48] Likens, S. T. und Nickerson, G. B., Detection of certain hop oil constituents in brewing products. *Proc.Am.Soc.Brew.Chem.* **1964**, 5-13
- [49] Majcher, M. und Jelen, H. H., Comparison of suitability of SPME, SAFE and SDE methods for isolation of flavor compounds from extruded potato snacks. *Journal of Food Composition and Analysis* **2009**, *22* (6), 606-612
- [50] Malfliet, S., Van Opstaele, F., De Clippeleer, J., Stryn, E., Goiris, K., De Cooran, L., Aerts, G., Flavour instability of pale lager beers: Determination of analytical markers in relation to sensory ageing. *J.Inst.Brew.* **2008**, *114* (2), 180-192
- [51] Mattivi, F., Versini, G., Nicolini, G., Interesting side-effects of the use of a PVI-PVP copolymer for removing heavy metals in white and red wines on polyphenols and colour characteristics. *Wein-Wiss.* **2000**, *55* (2), 73-79
- [52] Mcmurrough, I., Madigan, D., Kelly, R. J., Smyth, M. R., The role of flavanoid polyphenols in beer stability. *J.Am.Soc.Brew.Chem.* **1996**, *54* (3), 141-148
- [53] Mcmurrough, I., Madigan, D., Smyth, M. R., Adsorption by Polyvinylpyrrolidone of Catechins and Proanthocyanidins from Beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1995**, *43* (10), 2687-2691
- [54] Mira, H., Leite, P., Catarino, S., Ricardo-Da-Silva, J. M., Metal reduction in wine using PVI-PVP copolymer and its effects in chemical and sensory characters. *Vitis* **2007**, *46* (3), 138-147
- [55] Mitchell, A. E., Hong, Y. J., May, J. C., Wright, C. A., Bamforth, C. W., A comparison of polyvinylpyrrolidone (PVPP), silica xerogel and a polyvinyl pyrrolidone (PVP)-silica co-product for their ability to remove polyphenols from beer. *J.Inst.Brew.* **2005**, *111* (1), 20-25

- 
- [56] Monagas, M., Bartolome, B., Gomez-Cordoves, C., Updated Knowledge About the Presence of Phenolic Compounds in Wine. *Crit.Rev.Food Sci.Nutr.* **2005**, 45 (2), 85-118
- [57] Nemet, I., Varga-Defterdarovic, L., Turk, Z., Methylglyoxal in food and living organisms. *Molecular Nutrition & Food Research* **2006**, 50 (12), 1105-1117
- [58] Neven, H., Delvaux, F., Derdelinckx, G. S., Flavor evolution of top fermented beers. *Tech.Q.- Master Brew.Assoc.Am.* **1997**, 34 (2), 115-118
- [59] Nicolini, G., Larcher, R., Mattivi, F., Experiments concerning metal depletion in must and wine by Divergan HM. *Mitt.Klosterneuburg* **2004**, 54 (1-2), 25-32
- [60] Noel, S. und Collin, S., *trans*-2-Nonenal degradation products during mashing. *Proceedings of the European Brewery Convention Congress* **1995**, 483-490
- [61] Noel, S., Metais, N., Bonte, S., Bodart, E., Peladan, F., Dupire, S., Collin, S., The use of Oxygen 18 in appraising the impact of oxidation process during beer storage. *J.Inst.Brew.* **1999**, 105 (5), 269-274
- [62] Ohloff, G., Recent developments in the field of naturally-occurring aroma components. *Fortschr.Chem.Org.Naturst.* **1978**, 35, 431-527
- [63] Oszmianski, J., Cheynier, V., Moutounet, M., Iron-catalyzed oxidation of (+)-catechin in model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1996**, 44 (7), 1712-1715
- [64] Otteneder, H., Marx, R., Zimmer, M., Analysis of the anthocyanin composition of Cabernet Sauvignon and Portugieser wines provides an objective assessment of the grape varieties. *Aust.J.Grape Wine Res.* **2004**, 10 (1), 3-7
- [65] Paixao, N., Perestrelo, R., Marques, J. C., Camara, J. S., Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rose and white wines. *Food Chem.* **2007**, 105 (1), 204-214
- [66] Pickenhagen, W., Velluz, A., Passerat, J. P., Ohloff, G., Estimation of 2,5-Dimethyl-4-Hydroxy-3(2H)-Furanone (Furaneol) in Cultivated and Wild Strawberries, Pineapples and Mangoes. *J.Sci.Food.Agric.* **1981**, 32 (11), 1132-1134
- [67] Pissarra, J., Mateus, N., Rivas-Gonzalo, J., Buelga, C. S., De Freitas, V., Reaction between malvidin 3-glucoside and (+)-catechin in model solutions containing different aldehydes. *J.Food Sci.* **2003**, 68 (2), 476-481
- [68] Saison, D., De Schutter, D. P., Uyttenhove, B., Delvaux, F., Delvaux, F. R., Contribution of staling compounds to the aged flavour of lager beer by studying their flavour thresholds. *Food Chem.* **2009**, 114 (4), 1206-1215
- [69] Sang, S., Shao, X., Bai, N., Lo, C., Yang, C. S., Ho, C., Tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate: a new trapping agent of reactive dicarbonyl species. *Chem Res Toxicol* **2007**, 20 (12), 1862-1870

- [70] Santos, J. R., Carneiro, J. R., Guido, L. F., Almeida, P. J., Rodrigues, J. A., Barros, A. A., Determination of E-2-nonenal by high-performance liquid chromatography with UV detection - Assay for the evaluation of beer ageing. *Journal of Chromatography A* **2003**, 985 (1-2), 395-402
- [71] Saucier, C., Bourgeois, G., Vitry, C., Roux, D., Glories, Y., Characterization of (+)-catechin-acetaldehyde polymers: A model for colloidal state of wine polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1997a**, 45 (4), 1045-1049
- [72] Saucier, C., Guerra, C., Pianet, I., Laguerre, M., Glories, Y., (+)-Catechin-acetaldehyde condensation products in relation to wine-ageing. *Phytochemistry* **1997b**, 46 (2), 229-234
- [73] Schieberle, P., Primary odorants of pale lager beer. Differences to other beers and changes during storage. *Z.Lebensm.-Unters.Forsch.* **1991**, 193 (6), 558-565
- [74] Schieberle, P., Quantitation of Important Roast-Smelling Odorants in Popcorn by Stable Isotope Dilution Assays and Model Studies on Flavor Formation during Popping. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1995**, 43 (9), 2442-2448
- [75] Scholten, G., Possibilities for heavy metal reduction in wine. *Mitt.Klosterneuburg* **2001**, 51 (5), 200-212
- [76] Schwarz, P., Stanley, P., Solberg, S., Activity of lipase during mashing. *J.Am.Soc.Brew.Chem.* **2002**, 60 (3), 107-109
- [77] Soulis, T., Eleftheriadis, I., Kavlentis, E., Arvanitoyanis, I., Influence of A Few Bentonites on the Contents of Several Metals in Red Wines. *Nahrung-Food* **1989**, 33 (9), 859-865
- [78] Stoclet, J. C., Kleschyov, A., Andriambelason, E., Diebolt, M., Andriantsitohaina, R., Endothelial NO release caused by red wine polyphenols. *Journal of Physiology and Pharmacology* **1999**, 50 (4), 535-540
- [79] Szwajgier, D., Wasko, A., Targonski, Z., Influence of pH and temperature on ferulic acid esterase and acetic acid esterase activities during malting and mashing. *Pol.J.Food Nutr.Sci.* **2006**, 15 (2), 183-191
- [80] Techakriengkrai, I., Paterson, A., Taidi, B., Relationship of sensory staleness in two lagers to headspace concentrations of trans-2-nonenal and three staling aldehydes. *J.Inst.Brew.* **2006**, 112 (1), 36-40
- [81] Thornalley, P. J., Langborg, A., Minhas, H. S., Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. *Biochem.J.* **1999**, 344, 109-116
- [82] Timberlake, C. F. und Bridle, P., Interactions Between Anthocyanins, Phenolic Compounds, and Acetaldehyde and Their Significance in Red Wines. *American Journal of Enology and Viticulture* **1976**, 27 (3), 97-105

- 
- [83] Tressl, R., Bahri, D., Silwar, R., Bildung von Aldehyden durch Lipidoxidation und deren Bedeutung als "off-flavor"-Komponenten in Bier. *Proceedings of the European Brewery Convention Congress* **1979**, 27-41
- [84] Vanderhaegen, B. und Derdelinckx, G., Characterization of flavour compounds in fresh and aged beer by purge and trap-gas chromatography-mass spectrometry. *Monatsschr.Brauwiss.* **2005a**, (Dec.), 1-9
- [85] Vanderhaegen, B., Delvaux, F., Daenen, L., Verachtert, H., Delvaux, F. R., Aging characteristics of different beer types. *Food Chem.* **2007**, 103 (2), 404-412
- [86] Vanderhaegen, B., Neven, H., Coghe, S., Verstrepen, K. J., Verachtert, H., Derdelinckx, G., Evolution of chemical and sensory properties during aging of top-fermented beer. *J.Agric.Food Chem.* **2003**, 51 (23), 6782-6790
- [87] Vanderhaegen, B., Neven, H., Daenen, L., Verstrepen, K. J., Verachtert, H., Derdelinckx, G., Furfuryl Ethyl Ether: Important Aging Flavor and a New Marker for the Storage Conditions of Beer. *J.Agric.Food Chem.* **2004a**, 52 (6), 1661-1668
- [88] Vanderhaegen, B., Neven, H., Verachtert, H., Derdelinckx, G., The chemistry of beer aging - a critical review. *Food Chem.* **2005b**, 95 (3), 357-381
- [89] Vanderhaegen, B., Neven, H., Verstrepen, K. J., Delvaux, F. R., Verachtert, H., Derdelinckx, G., Influence of the brewing process on furfuryl ethyl ether formation during beer aging. *J.Agric.Food Chem.* **2004b**, 52 (22), 6755-6764
- [90] Wang, Y., Rodolfo Juliani, H., Simon, J. E., Ho, C. T., Amino acid-dependent formation pathways of 2-acetylfuran and 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3[2H]-furanone in the Maillard reaction. *Food Chemistry* **2009**, 115 (1), 233-237
- [91] Weurman, C., Groenen, P. J., Van Gemert, L. J., Experiments on high-vacuum transfer in food odor research. *Nahrung* **1970**, 14 (7), 607-616
- [92] Williams, R. S. und Wagner, H. P., Contribution of hop bitter substances to beer staling mechanisms. *J.Am.Soc.Brew.Chem.* **1979**, 37 (1), 13-19
- [93] Würdig, G., Woller, R. *Chemie des Weines*; Ulmer (Eugen): **1989**
- [94] Zufall, C. und Tyrell, T., The influence of heavy metal ions on beer flavour stability. *J.Inst.Brew.* **2008**, 114 (2), 134-142

## 7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Bindung von Polyphenolen und Metallen an PVI/PVP (n = 1, m = 9) .....	6
Abb. 2: Struktur nicht-flavonoider Polyphenole .....	10
Abb. 3: Struktur flavonoider Polyphenole .....	11
Abb. 4: pH-Abhängigkeit von Anthocyanen am Beispiel von Malvidin-3-O-glucosid .....	12
Abb. 5: Struktur verschiedener Anthocyane .....	12
Abb. 6: Acetaldehyd-vermittelte Kondensation von (+)-Catechin und Malvidin-3-O-glucosid .....	13
Abb. 7: Bildung des Xanthylium-Salzes aus (+)-Catechin und Weinsäure .....	15
Abb. 8: Struktur von Methylglyoxal .....	15
Abb. 9: Bildung von Methylglyoxal aus Glucose während der Maillard-Reaktion [Thornalley 1999] .....	16
Abb. 10: Schematischer Aufbau einer MLCCC .....	17
Abb. 11: Planetenbewegung der MLCCC-Spule und Ausbildung der verschiedenen Mischungszonen .....	18
Abb. 12: Aromaprofil eines frischen Pilsener Bieres [Fritsch 2005] .....	19
Abb. 13: Sensorische Veränderungen während der Alterung von Bier .....	21
Abb. 14: Bildung von Aldehyden und Säuren durch den Strecker-Abbau [Hofmann 2000] .....	22
Abb. 15: Bildungswege von $\alpha$ -Dicarbonylen [Vanderhaegen 2005b] .....	23
Abb. 16: Bildungswege von Furfurylalkohol, Furfurylethylether und 2-Furfural aus Maltose [Hollnagel 2000, Vanderhaegen 2004b] .....	24
Abb. 17: Bildung von 2-Furfural bei unterschiedlichen Temperaturen [Vanderhaegen 2003] .....	25
Abb. 18: Autoxidation von Linolsäure zu Hydroperoxyfettsäuren [Belitz 2001] .....	26
Abb. 19: Proton-katalysierte Spaltung der Hydroperoxysäuren von Linolsäure [Ohloff 1978] .....	27
Abb. 20: Überblick über die Bildung von Carbonylverbindung durch enzymatische Oxidation von Linolsäure [Vanderhaegen 2005b] .....	28
Abb. 21: Struktur wichtiger Hopfenbittersäuren .....	29
Abb. 22: Schematischer Aufbau der SAFE [Engel 1999] .....	31
Abb. 23: Mögliche Migranten aus PVI/PVP .....	33

Abb. 24: LC-MS/MS-Chromatogramm eines dotierten trockenen Weißweines (MRM-Modus).....	34
Abb. 25: Postulierter Bildungsweg von 2-Pyrrolidon in Wein .....	37
Abb. 26: Bildung von 2-Pyrrolidon (□) aus 4-Aminobuttersäure, 4-Aminobuttersäure (●) aus 2-Pyrrolidon, 2-Pyrrolidon (△) und 4-Aminobuttersäure (▲) aus 4-Aminobuttersäureamid (Weinsimulanz, pH 3,2, 50 °C).....	38
Abb. 27: Korrelation zwischen 2-Pyrrolidon und 4-Aminobuttersäure (links) bzw. 4-Aminobuttersäureamid (rechts).....	39
Abb. 28: Reaktion von <i>N</i> -Vinylpyrrolidon (●) zu: Wasser-Addukt (△), Ethanol-Addukt (◆), 2-Pyrrolidon (□) .....	40
Abb. 29: Reaktion von <i>N</i> -Vinylpyrrolidon in Weinsimulanz.....	41
Abb. 30: HPLC-Chromatogramm eines Dornfelder/Spätburgunders (l Peo-3- O-(6-O- <i>p</i> -coumaryl)-5-O-diglu; m Mv-3-O-(6-O- <i>p</i> -coumaryl)-5-O- diglu; sonstige Zuordnung siehe Tab. 7).....	42
Abb. 31: Postulierter Mechanismus der Methylglyoxal-vermittelten Reaktion von (+)-Catechin und Malvidin-3-O-glucosid.....	44
Abb. 32: HPLC-Chromatogramm einer Inkubation von Malvidin-3-O- glucosid, (+)-Catechin, Methylglyoxal (72 h, 37 °C, pH 3,2); links: 280 nm, rechts: 520 nm.....	44
Abb. 33: HPLC-Chromatogramm einer Methylglyoxal-(+)-Catechin-Inkubation (72 h, 37 °C, pH 3,2).....	45
Abb. 34: HPLC-Chromatogramme der Acetaldehyd- (links) und Methylglyoxal-Inkubationen (rechts) (72 h, 37 °C).....	45
Abb. 35: LC-MS-Chromatogramm der Addukte aus Malvidin-3-O-glucosid und (+)-Catechin (Q1, 837 Da) .....	46
Abb. 36: Bildung der Addukte mit der Masse 837 Da und Abbau von Malvidin-3-O-glucosid (37 °C, pH 3,2) .....	47
Abb. 37: Bildung von Addukt 1 bei unterschiedlichen Bedingungen .....	47
Abb. 38: Bildung der Partialladung in Abhängigkeit vom pH-Wert .....	48
Abb. 39: Veränderung der Absorptionsmaxima von Inkubationslösungen (RT, pH 3,2): Links: Malvidin-3-O-glucosid (0,51 mM), (+)-Catechin (2,3 mM), Mitte: Malvidin-3-O-glucosid (0,51 mM), (+)-Catechin (2,3 mM) + Acetaldehyd (5,7 mM), .....	49

---

Abb. 40: MS <sup>2</sup> -Spektrum und zugeordnete Fragmentierungen des Adduktes 1 .....	50
Abb. 41: Hoch aufgelöste Masse und mögliche Summenformeln von Addukt 1.....	51
Abb. 42: Gemessenes (links) und berechnetes (rechts) Isotopenmuster von Addukt 1.....	52
Abb. 43: Isotopenverhältnis aller Verbindungen von m/z = 837 amu direkt aus einer Malvidin-3-O-glucosid-(+)-Catechin-Inkubation.....	53
Abb. 44: Zerfallsspektren (MS <sup>2</sup> ) der Massen m/z = 837 amu (oben) und m/z = 839 amu (unten).....	53
Abb. 45: HPLC-Chromatogramme der Inkubation von (+)-Catechin (A) (links) und (+)-Catechin und Methylglyoxal (rechts) (3 d, 50 °C, pH 3,2) .....	54
Abb. 46: Bildung der verschiedenen Verbindungen der Klasse I (links) und je einer Verbindung der Klassen I–III (rechts) (50 °C, pH 3,2, c(Mv-3- O-glu)=0,52 mM, c((+)-Catechin)=2,3 mM, c(Methylglyoxal)=5,7 mM).....	55
Abb. 47: Zeitlicher Verlauf der Bildung der Verbindungen der Klassen I–III bei geringer Methylglyoxal-Konzentration (c = 1 mM) (50 °C, pH 3,2)....	56
Abb. 48: Bildung der Addukte der Klassen I-III unter aeroben und anaeroben Bedingungen (50 °C, pH 3,2).....	57
Abb. 49: Vergleich der HPLC-Chromatogramme einer anaeroben und einer aeroben Inkubation von (+)-Catechin und Methylglyoxal (12 d, 50 °C, pH 3,2).....	58
Abb. 50: Chromatogramm der präparativen HPLC der Addukte der Klasse I .....	59
Abb. 51: Vergleich einer reinkubierten Probe von vorgereinigten Addukten der Klasse I im Vergleich zur Ausgangslösung.....	60
Abb. 52: MS <sup>2</sup> -Spektren der (+)-Catechin-Methylglyoxal-Addukte der Klasse I.....	61
Abb. 53: Fragmentierungen der (+)-Catechin-Methylglyoxal-Addukte .....	61
Abb. 54: Massenspur m/z = 616,3 (oben) und beispielhaftes MS <sup>2</sup> der Verbindung mit R <sub>t</sub> = 47,8 min (unten) .....	62
Abb. 55: HPLC-Chromatogramme der (+)-Catechin-Inkubationen mit Methylglyoxal bzw. Glyoxylsäure .....	63
Abb. 56: GC-FID-Chromatogramm der Analyse der flüchtigen Verbindung mittels HS .....	65

---

Abb. 57: GC-FID-Chromatogramm der Analyse der flüchtigen Verbindung mittels SPME .....	66
Abb. 58: Aufarbeitungsschema der flüchtigen Verbindungen mittels SAFE.....	67
Abb. 59: GC-FID-Chromatogramme der Blindwerte mit destilliertem und undestilliertem Diethylether.....	67
Abb. 60: GC-FID-Chromatogramme der flüchtigen Verbindungen ohne (oben) und mit (unten) Entfernung saurer Verbindungen .....	68
Abb. 61: GC-Chromatogramm des neutralen Aromaextraktes.....	69
Abb. 62: GC-Chromatogramm des sauren Aromaextraktes.....	69
Abb. 63: Ausschnitte aus GC-FID-Chromatogrammen der flüchtigen Verbindungen von behandelter (50 g/hl PVI/PVP) und unbehandelter Bierprobe A (natürlich + 14 d künstlich gealtert) .....	71
Abb. 64: Bildung von 2-Furfural in behandelten Bierproben während der Alterung .....	78
Abb. 65: Abbau von Octansäureethylester in behandelten Bierproben während der Alterung .....	79
Abb. 66: Summe der während der Alterung gebildeten Verbindungen .....	79
Abb. 67: Summe der während der Alterung stabilen Verbindungen .....	80
Abb. 68: Veränderung des Alterungsquotienten der untersuchten Bierproben während der Alterung .....	81
Abb. 69: Zusammenhang von 2-Furfural-Konzentration und Alterungsgeschmack, erstellt aus Daten von [Malfliet 2008].....	82
Abb. 70: MLCCC-Chromatogramm des Anthocyanrohextraktes.....	94

## 8 Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Probleme bei der Wein-Herstellung, die durch Schönung beseitigt werden können [Harbertson 2009] .....	3
Tab. 2:	Lebensmittelkategorien und Simulanzlösemittel laut [EU 1997] .....	8
Tab. 3:	Bedingungen für Migrationsprüfungen mit Simulanzlösemitteln [EU 1997] .....	8
Tab. 4:	Validierungsdaten.....	34
Tab. 5:	Ergebnisse der Migration von PVI/PVP und PVPP (mg/kg) .....	35
Tab. 6:	Gehalte der vermessenen Parameter in Wein ( $\mu\text{g/l}$ ) (n = 140).....	39
Tab. 7:	Peakflächen der einzelnen Anthocyane in behandeltem und unbehandeltem Wein .....	42
Tab. 8:	Verwendete Bierproben für die Vorversuche.....	70
Tab. 9:	Bildung flüchtiger Verbindungen in unbehandeltem Bier im Vergleich zum behandelten während der Alterung (neutrale Fraktion) .....	72
Tab. 10:	Bildung flüchtiger Verbindungen in unbehandeltem Bier im Vergleich zum behandelten während der Alterung (saure Fraktion).....	73
Tab. 11:	Veränderungen einiger Verbindungen durch erhöhte Metallgehalte .....	74
Tab. 12:	Einfluss der unterschiedlichen Stabilisierungsvarianten auf Bierparameter.....	75
Tab. 13:	Peakflächenverhältnisse der identifizierten flüchtigen Verbindungen in Bierproben.....	77
Tab. 14:	HPLC-Parameter für die LC-MS/MS-Methode .....	89
Tab. 15:	Parameter des Massenspektrometers (MRM-Modus).....	89
Tab. 16:	MLCCC-Parameter zur Isolierung von Malvidin-3-O-glucosid .....	93
Tab. 17:	HPLC-Bedingungen zur Analyse von Anthocyanen in Wein .....	95
Tab. 18:	Parameter des Massenspektrometers zur Analyse von Anthocyanen in Wein .....	95
Tab. 19:	Zusammensetzung der verschiedenen Malvidin-3-O-glucosid-(+)-Catechin-Inkubationen.....	96
Tab. 20:	Zusammensetzung der verschiedenen (+)-Catechin-Inkubationen .....	97
Tab. 21:	Bedingungen der präp. HPLC zur Isolierung der (+)-Catechin-Methylglyoxal-Addukte .....	98

---

## 9 Formelverzeichnis

Formel 1: 1. Fick'sches Gesetz .....	9
Formel 2: Alterungsquotient .....	81

## 10 Abkürzungsverzeichnis

AQ	Alterungsquotient
BW	Blindwert
DTPA	Diethylentriaminpentaessigsäure
GABA	gamma-Aminobuttersäure/4-Aminobuttersäure
GABAmid	gamma-Aminobuttersäureamid/4-Aminobuttersäureamid
GC-FID	Gaschromatograph mit gekoppeltem Flammenionisationsdetektor
GC-MS	Gaschromatograph mit gekoppeltem Massenspektrometer
HPLC-DAD	Hochleistungsflüssigkeitschromatograph mit gekoppeltem Dioden-Array-Detektor
HPLC-MS	Hochleistungsflüssigkeitschromatograph mit gekoppeltem Massenspektrometer
HPLC-UV	Hochleistungsflüssigkeitschromatograph mit gekoppeltem UV/VIS-Detektor
HS	Headspace
MLCCC	Multilayer countercurrent chromatography
NMR-Spektroskopie	Kernspinresonanz-Spektroskopie
PDMS	Polydimethylsiloxan
PF	Peakfläche
PVI/PVP	Polyvinylimidazol-Polyvinylpyrrolidon-Copolymere
PVPP	Polyvinylpolypyrrolidon
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
SAFE	Solvent assisted flavor evaporation
SPME	Solid phase micro extraction

# 11 Anhang

## zu 3.3.2: Übersicht über Weinproben

Nr.	Name	Rebsorte	Jahrgang	Region	Alkoholgehalt	Süßegrad	Farbe	Bio	ÖA	Pyrolyticon	GABA	GABAamid	Glutamin	Glutaminsäure
1	Rosetta	Tempranillo	2004	Spanien	13,5	trocken	rot		x	236	29765	92	100	52934
2	Dornfelder	<	2007	Rheinhausen	13,0	trocken	rot		x	242	103520	310	418	36912
3	Bordeaux	<	2006	Italien	11,5	trocken	rot			312	17151	33	177	26612
4	Primitivo/Marzemino	Blauer Portugieser	2007	Italien	9,5	halbtrocken	rot		x	248	34292	638	416	21457
5	Chardonnay	<	2007	Italien	13,0	trocken	weiß			141	31745	33	368	52355
6	Merzling	Chardonnay/Ferula	2007	Italien	11,0	halbtrocken	weiß		x	289	34686	248	138	34253
7	Merzling	<	2007	Italien	11,5	trocken	weiß			137	91862	242	259	34653
8	Leithamer	<	2007	Rheinhausen	8,2	halbtrocken	weiß		x	144	13819	62	618	6935
9	Welschbacher Spätburgunder	<	2006	Rheinhausen	9,5	trocken	weiß		x	71	4826	149	53	4658
10	Chardonnay	Chardonnay	2006	Italien	12,0	trocken	weiß			171	4826	149	53	4658
11	Chardonnay	<	2006	Rheinhausen	12,5	trocken	weiß		x	443	4872	121	25	5311
12	Rotkäppchen Spätburgunder	Blanco	2008	Portugal	12,5	trocken	weiß		x	186	1635	107	618	5335
13	Chardonnay	<	2006	Italien	12,5	trocken	weiß			262	2821	107	618	5335
14	Chardonnay	<	2007	Italien	12,5	trocken	weiß		x	139	3686	279	173	4042
15	Rosé	<	2007	Rheingau	11,5	halbtrocken	weiß		x	146	3798	282	3742	3719
16	Spätburgunder/Dornfelder	<	2006	Italien	11,0	halbtrocken	weiß		x	616	49703	106	69	3793
17	Bianca d'Assi	Bianca (85:100 %)	2005	Italien	12,5	trocken	weiß			207	23712	101	85	2941
18	Stave	<	2006	Italien	12,0	trocken	weiß			145	14355	148	60	27431
19	Villa	Primitivo	2002	Italien	12,0	trocken	weiß			207	28921	184	411	28027
20	L'Amia Jigla La Corte	<	2002	Italien	13,5	trocken	weiß			302	22867	101	27	51880
21	Bianco	Sauvignon Blanc	2001	Frankreich	13,0	halbtrocken	weiß		x	245	11698	173	36	51939
22	Bianco	Dornfelder	2005	Italien	11,5	halbtrocken	weiß			610	22061	49	70	23076
23	Moskato	Mosé	2007	Italien	11,5	halbtrocken	weiß			143	95163	840	418	97610
24	Koster Fiora	Bacchus	2007	Italien	12,0	trocken	weiß		x	219	54712	295	345	39769
25	Primitivo	<	2007	Italien	12,0	trocken	weiß			243	27201	47	114	3271
26	Chardonnay	<	2001	Italien	11,5	trocken	weiß		x	1910	14594	1011	38	67638
27	Traminer	Reisling Alle Rebem	2007	Italien	12,0	trocken	weiß		x	342	12023	258	124	5278
28	Traminer	Reisling Eswan	2007	Italien	6,0	halbtrocken	weiß			477	11670	2016	1088	5815
29	Shiraz	<	2007	Rheinhausen	12,0	halbtrocken	weiß			219	85069	742	804	78624
30	Chardonnay	<	2007	Rheinhausen	12,0	trocken	weiß		x	179	12882	207	91	21983
31	Müller-Thurgau (Brenner/Adberg)	<	2007	Rheinhausen	12,0	trocken	weiß		x	339	5596	440	1157	59341
32	Comar (Gras Vorellasse C.M.D.)	DOCC-OMD	2005	Rumänien	12,0	trocken	weiß			137	5357	341	30	42635
33	Cabaleto de Measubast (Joven)	<	2006	Spanien	13,0	trocken	weiß		x	167	18486	12	185	28518
34	Mazzonecker Rotwein	<	2007	Mazedonien	10,0	trocken	rot			216	38737	243	181	46812
35	Dornfelder	<	2006	Italien	12,0	halbtrocken	rot		x	321	97091	293	1881	74428
36	Cabernet Sauvignon (South Green)	<	2005	Italien	13,0	halbtrocken	rot		x	280	44718	23	32	34741
37	Nero d'Avola	Pied Nero	2006	Sizilien	13,0	trocken	rot			246	30477	55	98	70182
38	Reisling	Reisling Rheingau	2007	Rheingau	11,5	halbtrocken	weiß			131	78255	368	239	78100
39	Huxelrebe	<	2007	Nabe (Gaarand)	10,0	trocken	weiß		x	43	28239	212	248	46707
40	Les Capelles	Synth Grenach	2004	Frankreich	14,5	trocken	rot			129	21904	21	72	54878
41	Dornfelder/Spätburgunder	<	2005	Italien	11,0	halbtrocken	rot		x	247	45288	111	158	56944
42	Rio Arago	Bobal	2007	Spanien	11,0	halbtrocken	rot			122	18144	45	177	36536
43	Spätlese	Merlot/Chardonnay	2007	Spanien	10,5	trocken	weiß			127	57367	358	297	52980
44	Montepulciano d'Abuzzo	<	2006	Rheinhausen	9,5	süß	weiß		x	280	127124	1597	1903	94563
45	Spätlese	<	2006	Italien	12,0	trocken	weiß		x	189	38025	55	136	34855
46	Wingut Thuringer	Müller-Thurgau	2007	Rheinhausen	9,5	süß	weiß		x	350	77053	1037	167	62787
47	Wingut Wöbling	Kemling	2007	Stalk-Unität	12,0	trocken	weiß		x	97	68054	340	1192	59724
48	Wingut Wöbling	Bacchus	2007	Stalk-Unität	11,5	halbtrocken	weiß		x	231	116393	1619	2687	86651
49	Wingut Wöbling	Igualto	2007	Stalk-Unität	11,5	trocken	weiß		x	194	117436	1052	999	97243
50	Blanchet	Cabernet-Sauvignon, Merlot	2005	Italien	12,5	trocken	rot			278	40304	64	29	47780
51	Wingut Thuringer	Dornfelder	2006	Rheinhausen	12,0	trocken	rot		x	362	31901	315	86	40480
52	Montepulciano d'Abuzzo	Reisling	2007	Stalk-Unität	12,0	trocken	weiß		x	90	69200	418	613	67638
53	Propriété Caimi Giacom	Chardonnay	2006	Italien	12,5	trocken	weiß		x	255	35888	59	47	57174
54	Groszer Steinberg	Müller-Thurgau	2005	Stalk-Unität	12,0	trocken	weiß		x	775	15886	115	101	59153
55	Merlot de C'Ecres	<	2006	Spanien	12,5	trocken	weiß		x	531	134576	527	67	98349
56	Mezza Corona Trentino	Chardonnay	1991	Italien	12,0	trocken	weiß			176	54725	352	95	44793
57	Dornfelder (Barrique)	<	2007	Rheinhausen	12,0	trocken	rot		x	202	52775	113	19	38403
58	Wingut Paves	Welscher Burgunder	2006	Stalk-Unität	13,5	trocken	weiß		x	290	64326	697	1283	57847
59	Lauffener Katzenweiser	Samtrot	2006	Württemberg	12,0	halbtrocken	rot		x	153	178677	1994	35	163603
60	Terre du Moulin	<	2004	Italien	11,0	trocken	rot		x	416	190795	460	212	60389
61	Valmaduro	Cabernet-Sauvignon	2008	Chile	13,0	trocken	rot			153	20679	49	1477	37368
62	Lot Pagos	Cabernet-Sauvignon	2008	Chile	13,0	trocken	rot			83	15381	4	41	28881
63	Rosenhaller Rotwein	<	2006	Bulgarien	10,5	halbtrocken	rot		x	145	31181	83	3590	58951
64	Dornfelder	<	2006	Italien	10,5	halbtrocken	rot		x	136	31181	48	3593	61108
65	Portugieser RW	Pinot Noir	2007	Italien	14,0	trocken	rot		x	102	10610	13	84	24859
66	Francis Dubac	Reisling	2007	Italien	13,0	halbtrocken	weiß		x	188	10610	13	84	24859
67	Reisling	<	2007	Italien	14,0	trocken	rot		x	324	118988	110	114	46993
68	Shiraz	<	2006	Italien	13,0	trocken	rot		x	70	18870	75	768	47530
69	Shiraz	<	2007	Italien	11,5	halbtrocken	weiß		x	218	12048	4	168	18828
70	Synth	<	2006	Australien	13,0	trocken	rot		x	127	59410	464	645	57172
71	Synth	<	2006	Australien	13,0	trocken	rot		x	560	48588	115	50	39567
72	Synth	<	2006	Australien	13,0	trocken	rot		x	286	30050	115	63	48219

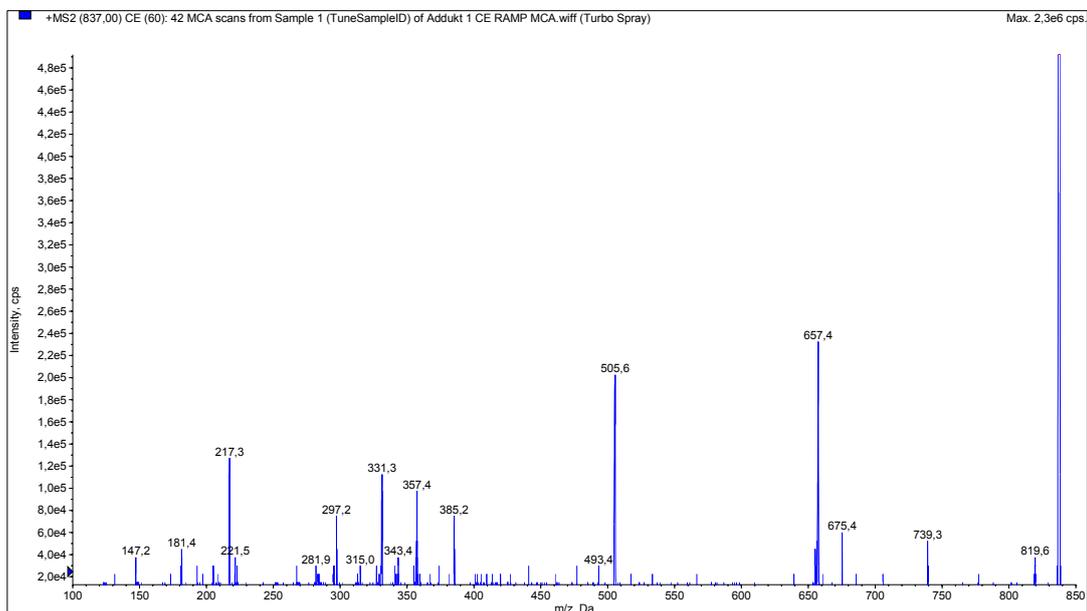
Nr.	Name	Rebsorte	Jahrgang	Region	Alkoholgehalt	Süßegrad	Farbe	Bio	ÖGA	Pyroton	GABA	CABAmid	Glutamin	Glutaminsäure
72	Mosel-Schöpschen	Tafelwein	2007	Mosel	11,0	trocken	weiß	x	x	82	877,14	334	312	24384
74	Domfelder		2007	Pfalz	13,0	trocken	rot	x	x	401	31331	85	45	24882
75	Ruby Cabernet		2006	USA	13,0	trocken	rot	x	x	286	48911	140	99	30855
76	Spätburgunder		2005	Pfalz	13,0	trocken	rot	x	x	289	94023	178	128	128470
77	Domfelder	Spätburgunder	2007	Mosel	12,5	trocken	rot	x	x	238	50558	145	198	48152
78	Domfelder	Spätburgunder	2005	Mosel-Saar-Ruwer	12,0	halbtrocken	rot	x	x	183	14854	76	80	24489
79	Domfelder	Spätburgunder	2008	Pfalz	10,5	lieblich	rot	x	x	155	33252	275	1398	59944
80	Cabernet Sauvignon		2002	Chile	13,0	trocken	rot	x	x	174	19562	6	15	23895
81	Resling Hoogewaters (Thu)		2006	Mosel	12,5	trocken	weiß	x	x	387	97069	1224	61	29121
82	Regent		2008	Mosel	11,5	halbtrocken	rot	x	x	310	28564	192	714	51433
83	Grimmer Veltner		2007	Ungarn	11,5	halbtrocken	weiß	x	x	94	59786	526	1306	42410
84	Landauer Müller		2008	Mosel	10,5	halbtrocken	weiß	x	x	137	69590	888	411	58978
85	Domfelder		2006	Mosel-Saar-Ruwer	12,5	trocken	rot	x	x	193	8004	82	53	15888
86	Rokkupchen Spätburgunder		2006	Rheinhesen	12,0	trocken	rot	x	x	324	102296	1754	1261	80774
87	Rottapfchen	Resling	2006	Rheinhesen	12,0	trocken	weiß	x	x	106	45488	449	1985	48860
88	Resling	Resling	2006	Pfalz	12,0	feinherb	weiß	x	x	139	72505	477	535	97939
89	Tollinger	Classic	2007	Württemberg	12,0	trocken	rot	x	x	299	19695	41	380	11366
90	Neul Fontyn		2006	Sturaria	13,0	trocken	rosé	x	x	389	18840	102	65	44361
91	Herdy's Valenti Range	Chardonnay	2003	Australien	13,0	trocken	weiß	x	x	581	165666	274	33	70564
92	Blanchet Blanc de Blancs (Tafelwein)		2007	Frankreich	11,5	trocken	weiß	x	x	109	47579	269	367	49137
93	Königer Hofrat	Müller-Thurgau	2007	Franken	11,0	halbtrocken	weiß	x	x	112	47417	321	415	54623
94	Resling Hoogewaters		2007	Spanien	11,5	trocken	rot	x	x	211	29807	34	161	30975
95	Resling Hoogewaters		2007	Mosel	9,5	lieblich	weiß	x	x	602	131063	1488	78	30065
96	Resling Hoogewaters		2007	Rheinhesen	11,5	trocken	weiß	x	x	273	44576	534	479	54648
97	Spätburgunder Weibsbühl		2006	Rheinhesen	10,5	lieblich	rosé	x	x	281	113657	403	352	13072
98	Blauer Zweigelt		2006	Saale-Unstrut	12,5	trocken	rot	x	x	674	87667	824	45	16004
99	Müller-Thurgau		2007	Rheinhesen	11,5	halbtrocken	weiß	x	x	249	91137	611	1357	87927
100	Domfelder		2007	Rheinhesen	12,0	trocken	rot	x	x	206	31331	290	152	38072
101	Deier Reserve		2006	Frankreich	12,5	trocken	rot	x	x	90	14142	8	70	31526
102	Weingut Wöbling	Spätburgunder	2006	Frankreich	12,0	trocken	rot	x	x	576	197031	1437	443	60669
103	Winevereinig Freiburg-Unstrut	Portugieser	2007	Saale-Unstrut	12,0	trocken	rot	x	x	592	84051	821	226	51883
104	Lambrusco Puglia		2007	Italien	10,0	lieblich	rot	x	x	187	40161	81	3545	84644
105	Grand Sud Merlot		2007	Frankreich	13,5	trocken	rot	x	x	113	8132	8	393	15252
106	Le Fleu Rouge Vin de Pays de Garde	Merlot	2007	Frankreich	13,0	trocken	rot	x	x	174	5711	4	42	12812
107	Ernest-Jules Gallé Family	Pied d'Grigo	2006	USA (Kalifornien)	13,5	trocken	rot	x	x	208	16890	71	82	19855
108	Lamberte Saintpierre		2007	Italien	12,5	trocken	weiß	x	x	195	71653	335	116	47855
109	Eagle Ridge		2007	USA (Kalifornien)	11,5	trocken	weiß	x	x	125	22913	130	214	17007
110	Domfelder		2007	Rheinhesen	11,5	halbtrocken	rot	x	x	201	38876	192	1090	58265
111	Thukund Freyburger Edelacker	Shaner	2005	Saale-Unstrut	12,0	trocken	weiß	x	x	217	77722	238	99	71847
112	Comte del Pazo Reserva	Tempranillo-Bobal	1997	Spanien	12,5	trocken	rot	x	x	334	32613	12	29	31526
113	Schneider Ursprung		2007	Pfalz	14,0	trocken	rot	x	x	518	107292	1027	400	102167
114	Pflzer Landwein	Domfelder	2008	Pfalz	11,5	halbtrocken	rot	x	x	118	31331	267	3896	41973
115	Giolino Scave		2004	Italien	11,5	trocken	weiß	x	x	143	12928	115	32	27069
116	Gordano Ramato Toscano Bianco		2003	Italien	12,0	trocken	weiß	x	x	229	28684	165	20	28333
117	Martin Schongauer	Weißer Burgunder	2006	Baden	14,0	trocken	weiß	x	x	519	87186	193	18	34465
118	Cote de Roussillon Vilages		2007	Frankreich	14,0	trocken	rot	x	x	184	9699	11	38	22017
119	Sattlese		2007	Rheinhesen	9,0	süß	weiß	x	x	343	102183	1736	416	100830
120	Grüner Veltner		2008	Ostereich	12,0	trocken	weiß	x	x	96	23855	849	4974	28647
121	Pater Metters Resling		2007	Pfalz	11,5	halbtrocken	weiß	x	x	210	66215	882	254	68217
122	Portugieser Roivan		2007	Pfalz	9,5	süß	rot	x	x	533	49703	259	226	53720
123	Oestlicher Lanchen Kabinett	Resling	2000	Rheingau	10,0	halbtrocken	weiß	x	x	393	38485	148	6	38713
124	Ebling-Windisch	Resling	1995	Rheinhesen	11,5	trocken	weiß	x	x	1162	124805	225	46	73952
125	Domfelder		2007	Saale-Unstrut	12,0	trocken	rot	x	x	301	41301	132	1295	50745
126	Müller Thurgau	Cabernet Shiraz	2007	Saale-Unstrut	11,5	trocken	weiß	x	x	330	113875	303	1631	60965
127	Harry's Bin 343 Vintage	Garganega Trebbiao	2008	Australien	13,5	trocken	weiß	x	x	248	39734	27	112	42547
128	Gabbia d'Oro Scave		2007	Italien	11,5	trocken	weiß	x	x	111	33614	103	1411	42267
129	California Zinfandel Rose		2007	USA (Kalifornien)	10,5	lieblich	rosé	x	x	536	214831	1067	286	34189
130	Donauherbst Pinot Grigio		2007	Ungarn	12,0	lieblich	weiß	x	x	254	117052	1471	1425	74683
131	Donauherbst Muskot Ottonel		2007	Ungarn	11,0	lieblich	weiß	x	x	157	79433	365	531	55577
132	Donauherbst Lindelblätiger		2007	Ungarn	10,5	lieblich	weiß	x	x	153	106123	1810	4980	58439
133	Adess Cabernet Sauvignon		2008	Chile	13,0	trocken	rot	x	x	141	27401	141	359	44201
134	Le Fleu Sweet (Tafelwein)		2008	Frankreich	11,5	süß	rosé	x	x	236	9884	33	1428	29643
135	Vocanni Chianti		2007	Italien	12,5	feinherb	rot	x	x	135	17133	36	71	40688
136	Winzerland Domfelder		2007	Pfalz	11,5	halbtrocken	rot	x	x	119	17004	284	3464	37840
137	Donauherbst Könliche Mädchenreube		2008	Ungarn	11,0	lieblich	weiß	x	x	200	50940	689	1107	46680
138	Donauherbst Gewurztraminer		2008	Ungarn	11,0	lieblich	weiß	x	x	171	79867	613	839	59005
139	Le Fleu Rouge		2008	Frankreich	12,0	lieblich	rot	x	x	108	19126	37	1911	42095
140	Francois Dubic		2007	Frankreich	13,0	lieblich	rot	x	x	136	16136	29	1571	32536

Alle Werte in [ppm]

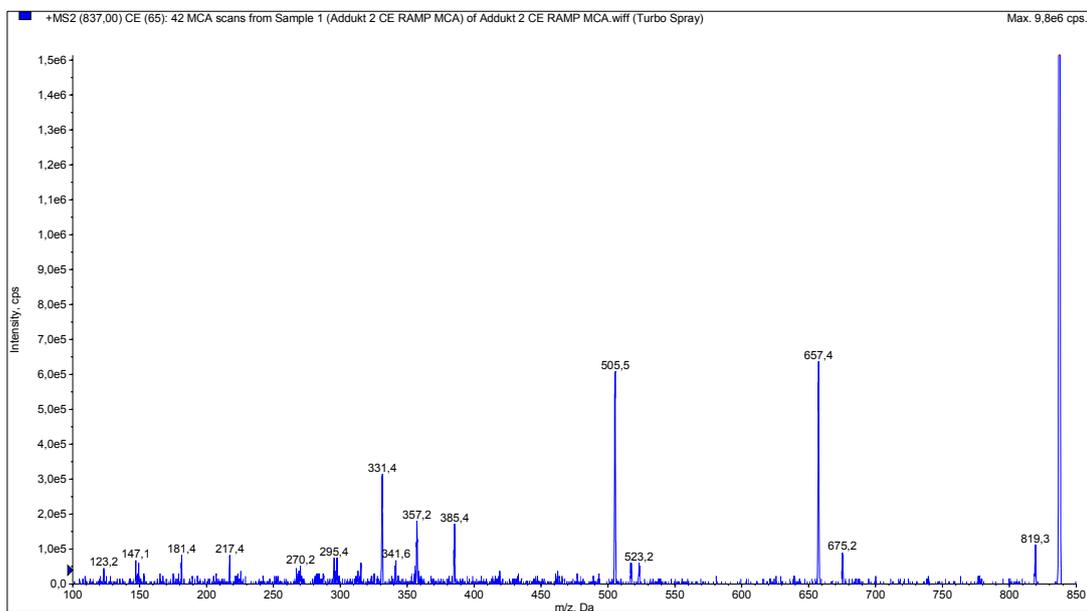
Vol%

zu Abb. 40: MS/MS-Spektrum von Addukte 1 bis 4 ([837]; CE RAMP; MCA)

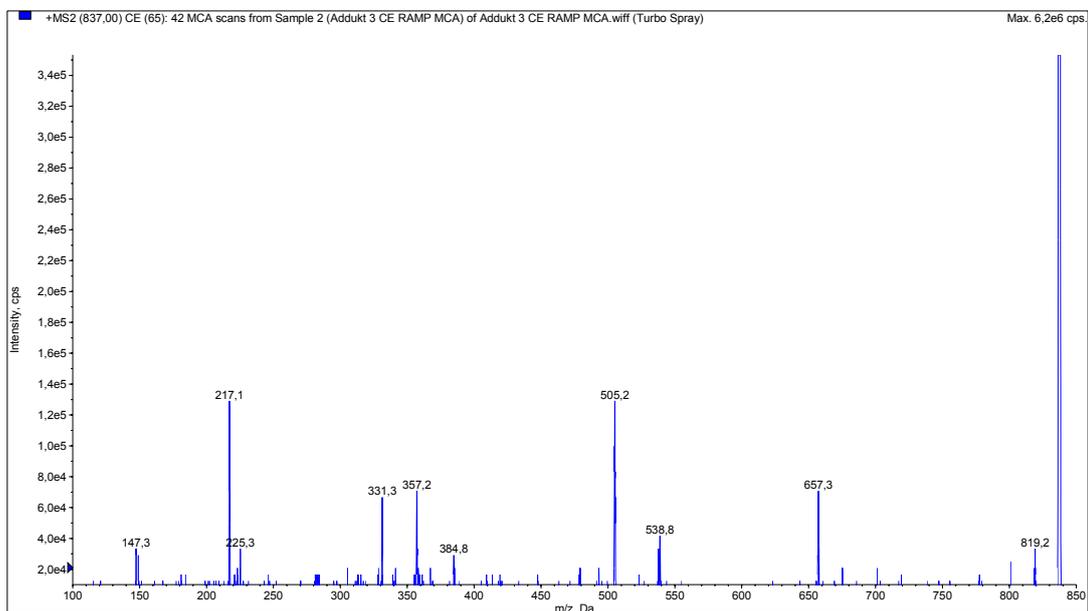
### Addukt 1:



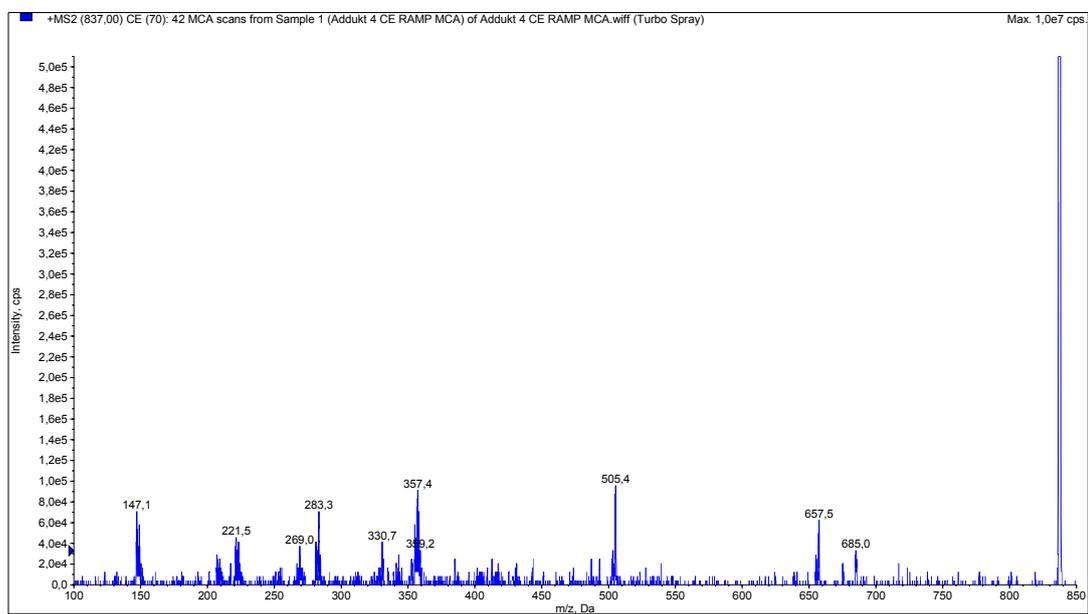
### Addukt 2:



## Addukt 3:



## Addukt 4:



---

## 12 Lebenslauf

### Persönliche Daten

---

Martin Schubert

geboren am 28. April 1982 in Leipzig

ledig

### Wissenschaftlicher Werdegang

---

*10/2007 - 05/2011* Wiss. Mitarbeiter und Promotion an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Lebensmittel- und Umweltchemie in Kooperation mit BASF SE  
Betreuung durch: Prof. Dr. Marcus A. Glomb

### Bildungsweg

---

*05/2006 - 05/2007* Ausbildung zum staatlich geprüften Lebensmittelchemiker (2. Staatsexamen) am LAVES Niedersachsen

*10/2001 - 04/2006* Studium der Lebensmittelchemie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Abschluss: Diplom-Lebensmittelchemiker

Titel der Diplomarbeit:

„Untersuchungen zur Bildung eines neuartigen Furanons beim Abbau von 1-Desoxy-2,3-glucodiulose“

*1998 – 2000* Abitur am Theodor-Mommsen-Gymnasium, Leipzig

*1992 – 1998* Nikolaus-Kopernikus-Gymnasium, Leipzig

### Sonstige Tätigkeiten

---

*09/2000 - 08/2001* Zivildienst

---

### 13 Eigenständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst wurde. Andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel wurden nicht benutzt. Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen wurden als solche kenntlich gemacht.

.....  
Datum, Unterschrift