



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Allgemeine Lebensmitteltechnologie

Nachweis der Herkunft von Obstbränden mittels Analytik stabiler Isotope

Ron Baudler

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät
Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt
der Technischen Universität München zur Erlangung des Akademischen Grades
eines

Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Wilfried Schwab
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Karl-Heinz Engel
2. Univ.-Prof. Dr.-Ing., Dr.-Ing. habil. Werner Back

Die Dissertation wurde am 18.07.2007 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München am 31.08.2007 angenommen.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Karl-Heinz Engel meinen herzlichsten Dank für die Bereitstellung des Themas, seine wertvollen Ratschläge sowie seine bemerkenswerte Aufmerksamkeit während der gesamten Anfertigung meiner Arbeit aussprechen.

Bei Herrn Prof. Dr. Werner Back bedanke ich mich für die Übernahme des Koreferats. Herrn Prof. Dr. Wilfried Schwab sei an dieser Stelle für die Bereitschaft gedankt, den Prüfungsvorsitz zu übernehmen.

Außerdem danke ich besonders Herrn Dr. Ludwig Adam für die hervorragende fachliche Zusammenarbeit, sein ständiges Engagement und insbesondere für das äußerst angenehme Zwischenmenschliche. Ebenso danke ich Frau Catherine Delaporte für die unermüdliche und äußerst gewissenhafte Unterstützung im Labor. Herrn Brennmeister Alois Landstorfer sei für die tatkräftige Hilfe während der zahlreichen Destillationsversuche in der Versuchs- und Lehrbrennerei Weihestephan herzlich gedankt.

Des Weiteren gilt mein besonderer Dank Herrn Dr. Giuseppe Versini (Istituto Agrario di San Michele all'Adige, Italien), Herrn Dr. Andreas Roßmann (isolab GmbH, Schweitenkirchen), Frau Dr. Claudia Bauer-Christoph und Herrn Dr. Norbert Christoph (Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit Würzburg) sowie Frau Christina Preston (Lehrstuhl für Lebensmittelchemie, Universität Würzburg) für die Durchführung der Isotopenmessungen sowie die fachliche Unterstützung während meiner gesamten Arbeit. Danken möchte ich ebenfalls Frau Susanne Rummel für die Durchführung der Strontium-Isotopenmessungen sowie der Bayerischen Staatssammlung für Paläontologie und Geologie in München für die entsprechende Zurverfügungstellung der Messgeräte.

Bedanken möchte ich mich darüber hinaus bei Herrn Klaus Lindenmann (Verband Badischer Klein- und Obstbrenner e.V.), Frau Dr. Claudia Bauer-Christoph (Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit Würzburg) sowie Frau Andrea Bätz (Fränkischer Klein- und Obstbrennerverband e.V.) für die Beschaffung

zahlreicher Destillat- und Maischeproben. Gleichzeitig danke ich hiermit allen am Projekt beteiligten Brennern, die sich bereit erklärten, sowohl eigene Erzeugnisse als auch sämtliche Angaben über angewandte Herstellungsbedingungen zur Verfügung zu stellen.

Außerdem sei an dieser Stelle dem Bundesverband der Deutschen Klein- und Obstbrenner e.V., sowie den einzelnen Landesverbänden Fränkischer Klein- und Obstbrennerverband e.V., Verband Badischer Klein- und Obstbrenner e.V., Verband der Klein- und Obstbrenner Südwürttemberg-Hohenzollern e.V., Verband der Klein- und Obstbrenner in Nordwürttemberg e.V., Südostbayerischer Verband der Obst- und Kleinbrenner e.V., Verband Rheinischer und Saarländischer Klein- und Obstbrenner e. V., Kleinbrennerverband des Kreises Lindau e.V., Verband Pfälzer Klein- und Obstbrenner e.V. sowie den Unternehmen C. Schliessmann Kellerei-Chemie GmbH & Co.KG, Bockmeyer Kellereitechnik GmbH, Arnold Holstein GmbH und Christian Carl Ingenieur GmbH für die finanzielle Unterstützung ganz herzlich gedankt.

Zuletzt möchte ich mich aber ganz besonders bei meinen ehemaligen Kolleginnen und Kollegen Martina Denk, Marta Dregus, Alexandra Ehlert, Oxana Fasdovskaya, Thomas Frank, Carsten Lück, Bernhard Meier, Andreas Miller, Francisco Moreano, Tobias Müller, Iulia Poplacean, Hedwig Reder, Richard Röhlig, Bertrand Seumo Meuleye, Steffi Speiser, Ingrid Sperti, Gabriele Taubert sowie Ludwig Ziegler für das ausgezeichnete Arbeitsklima während meiner gesamten Zeit am Lehrstuhl bedanken.

Danke, sagt der Franke!

*Meiner Familie.
Und meinem Sternchen.*

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Zielsetzung	1
2	Grundlagen	3
2.1	Herstellung von Obstbränden	3
2.1.1	Maischebehandlung und Lagerung	3
2.1.2	Destillationsapparaturen	3
2.1.3	Destillationstechniken	6
2.2	Rechtliche Regelungen	7
2.3	Stabilisotope	9
2.3.1	Allgemeines	9
2.3.1.1	Vorkommen in der Natur	9
2.3.1.2	Nomenklatur	10
2.3.1.3	Natürliche Isotopenfraktionierungen	11
2.3.2	Anwendung der Stabilisotopenanalytik beim Nachweis der geographischen Herkunft von Wein	16
2.3.3	Isotopenfraktionierungen während der Destillation	17
2.3.4	Grundlagen der Messung von Stabilisotopenverhältnissen	22
2.3.4.1	Isotope Ratio Mass Spectrometry (IRMS)	23
2.3.4.2	Thermo Ionization Mass Spectrometry (TIMS)	24
2.3.4.3	Site-specific Natural Isotope Fractionation-Nuclear Magnetic Resonance (SNIF-NMR [®])	24
2.4	Statistische Grundlagen	26
2.4.1	Wiederholstandardabweichung und Wiederholgrenze	26
2.4.2	Lineare Diskriminanzanalyse	27
2.4.2.1	Erstellen der Diskriminanzfunktionen	27
2.4.2.2	Beurteilung der Trennkraft der Diskriminanzfunktionen	30
3	Material und Methoden	31
3.1	Untersuchungsmaterial	31
3.1.1	Authentische Proben	31
3.1.1.1	Herkunft der authentischen Proben	31
3.1.1.2	Klimatische Charakterisierung der Regionen Schwarzwald, Franken und Trentino	32
3.1.1.3	Geologische Charakterisierung der Regionen Schwarzwald, Franken und Trentino	36
3.1.2	Selbst hergestellte Destillate	37
3.2	Herstellungsbedingungen eigener Destillate	38
3.2.1	Einmischbedingungen	38
3.2.2	Destillationsbedingungen	40
3.2.2.1	Pilotanlage	40
3.2.2.2	Laboranlage	41

3.3	Geräte	41
3.4	Analyse flüchtiger Verbindungen sowie von Ethylcarbamat	42
3.4.1	Glaskolbendestillation der vergorenen Maischen	42
3.4.2	Ethanolbestimmung mittels Biegeschwinger	43
3.4.3	Gaschromatographische Analyse flüchtiger Verbindungen	43
3.4.3.1	Probenvorbereitung	44
3.4.3.2	GC-Bedingungen	45
3.4.4	Massenspektrometrische Bestimmung der Ethylcarbamat-konzentration	46
3.4.4.1	Probenvorbereitung	46
3.4.4.2	MS-Bedingungen	46
3.5	Messung der Stabilisotopenverhältnisse	47
3.5.1	Elemental Analysis Isotope Ratio Mass Spectrometry	47
3.5.1.1	Probenvorbereitung	47
3.5.1.2	Durchführung der Messung	48
3.5.2	Gas Chromatography combustion Isotope Ratio Mass Spectrometry (GC-c-IRMS)	48
3.5.2.1	Probenvorbereitung	48
3.5.2.2	GC-Bedingungen	49
3.5.2.3	Isotopenmessung mittels Massenspektrometer	49
3.5.3	$^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ -Isotope Ratio Mass Spectrometry (IRMS)	49
3.5.3.1	Probenvorbereitung für die $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ -Messung	50
3.5.3.2	Isotopenmessung mittels Massenspektrometer	50
3.5.4	Thermo Ionization Mass Spectrometry (TIMS)	50
3.5.4.1	Probenvorbereitung	50
3.5.4.2	Durchführung der Messung	51
3.5.5	SNIF-NMR [®] (Site-specific Natural Isotope Fractionation-Nuclear Magnetic Resonance)	51
3.5.5.1	Probenvorbereitung	51
3.5.5.2	Durchführung der Messung	52
3.6	Berechnung der Wiederholgrenze	53
4	Ergebnisse und Diskussion	54
4.1	Beschaffung authentischen Materials und Aufstellen eines Probenplans	55
4.2	Chemisch-analytische Untersuchungen der Proben	62
4.2.1	Typische Kenndaten der Destillatproben	62
4.3	Einfluss brennereitechnologischer Verfahren auf die Isotopensignaturen in Destillaten	68
4.3.1	Einfluss des Hefestamms auf die Isotopenverhältnisse von Ethanol und Wasser	69
4.3.2	Beeinflussung der Stabilisotopenverhältnisse am Ethanol durch den Destillationsschritt	71
4.3.2.1	Fraktionierung der Kohlenstoffisotopologe des Ethanols während der Destillation	72
4.3.2.2	Änderung der D/H-Verhältnisse am Ethanol im Verlauf der Destillation	74
4.3.2.3	Einfluss der Destillationstechnik auf die Isotopenverhältnisse am Ethanol	76

4.3.2.4	Abhängigkeit der Isotopenverhältnisse am Ethanol von den Grenzen der Mittelauffraktion	79
4.3.3	Vergleich der Kohlenstoff- und Wasserstoffisotopenverhältnisse von Original- und Pilotanlagendestillaten	82
4.3.4	Abhängigkeit des $\delta^{18}\text{O}$ -Wertes des Wassers eines Obstbrandes durch Destillation und Verschneiden auf Trinkstärke	84
4.3.4.1	Beeinflussung des $\delta^{18}\text{O}$ -Wertes des Wassers durch den Destillationsprozess	84
4.3.4.2	Beeinflussung der Aussagekraft des $\delta^{18}\text{O}$ -Wertes des Wassers eines Obstbrandes durch das Verschneiden des Mittellaufs auf Trinkstärke	86
4.4	Stabilisotopenverhältnisse unvergorener Kirschmaischen	88
4.4.1	Vergleich einzelner Stabilisotopenverhältnisse	88
4.4.2	Lineare Kombination einzelner Stabilisotopenverhältnisse der Fruchtpulpe mittels Diskriminanzanalyse	95
4.5	Stabilisotopenverhältnisse der Destillate	98
4.5.1	Vergleich einzelner Stabilisotopenverhältnisse	98
4.5.2	Lineare Kombination einzelner Stabilisotopenverhältnisse der Destillate mittels Diskriminanzanalyse	103
4.6	Vergleich der Stabilisotopenverhältnisse von Kirsch- und Zwetschgenwässern	107
5	Zusammenfassung	111
	Literatur	I
	Abbildungsverzeichnis	IX
	Tabellenverzeichnis	XII
	Formelverzeichnis	XIV
	Lebenslauf	XV
	Publikationen und Vorträge	XVI

Abkürzungsverzeichnis

α	fractionation factor
$\delta^{13}\text{C}$	relatives Stabilisotopenverhältnis des Kohlenstoffs $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ bezogen auf V-PDB
$\delta^2\text{H}$	relatives Stabilisotopenverhältnis des Wasserstoffs $^2\text{H}/^1\text{H}$ bezogen auf V-SMOW
$\delta^{15}\text{N}$	relatives Stabilisotopenverhältnis des Stickstoffs $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ bezogen auf das Stickstoffisotopenverhältnis von Luft
$\delta^{34}\text{S}$	relatives Stabilisotopenverhältnis des Schwefels $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ bezogen auf CDT
$\delta^{87}\text{Sr}$	relatives Stabilisotopenverhältnis des Strontiums $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ bezogen auf Ostseewasser
$\delta^{18}\text{O}$	relatives Stabilisotopenverhältnis des Sauerstoffs $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ bezogen auf V-SMOW
γ	Schwingungsfrequenz
σ	Standardabweichung
Γ	Diskriminanzkriterium
%-vol.	Volumenprozent
%-mas.	Massenprozent
A.	reiner Alkohol (Ethanol)
Bo	Bodensee
C_3	Pflanzen mit C_3 - Metabolismus (Calvinzyklus)
C_4	Pflanzen mit C_4 - Metabolismus (Hatch- Slack- Zyklus)
CAM	Crassulaceen Acid Metabolism – Pflanzen die sowohl über den C_3 als auch über den C_4 Weg metabolisieren
CDT	Canyon Diablo Troilite (internationaler Isotopenstandard)
Ch	Schweiz
c_v	Gehalt an flüchtigen Verbindungen in %-mas.
c_w	Wassergehalt in %-mas.
d	Deuteriumexzess
D/H	Stabilisotopenverhältnis des Deuteriums zu Wasserstoff allgemein

(D/H) _I	Stabilisotopenverhältnis des Deuteriums zu Wasserstoff in der Methylgruppe des Ethanols
(D/H) _{II}	Stabilisotopenverhältnis des Deuteriums zu Wasserstoff in der Methylen­gruppe des Ethanols
E	Energielevel
EC	Ethylcarbammat
f	kritischer Spannweitenfaktor
F	relative Häufigkeit
FB	Feinbrand
Fr	Franken
G	Gruppe
GC	Gaschromatographie
GC-c-IRMS	Gaschromatography-combustion-Isotope Ratio Mass Spectrometry
IAEA	Internationale Atomenergiebehörde
IRMS	Isotope Ratio Mass Spectrometry
It	Italien
k	Kraftkonstante
k _i	Diskriminanzkoeffizient
Ma	Mazedonien
ML	Mittellauf
MS	Massenspektrometrie
N	schweres Isotopolog
N'	leichtes Isotopolog
n.B.	nach Bestrahlung
NL	Nachlauf
NMR	Kernresonanzspektroskopie (Nuclear Magnetic Resonance)
NW	Nord Baden-Württemberg
R	Verhältnis schweres/leichtes Isotop
RB	Rauhbrand
S _A	Streuung zwischen einzelnen Gruppen
Se	Serbien
S _I	Streuung innerhalb einer Gruppe

SNIF [®]	Site-specific Isotope Fractionation
Sw	Schwarzwald
TIMS	Thermo Ionization Mass Spectrometry
t _m	Ethanolgehalt in %-mas.
Tü	Türkei
v.B.	vor Bestrahlung
VL	Vorlauf
VPIE	Vapor Pressure Isotope Effect
V-PDB	Vienna-Pee Dee Belemnite (internationaler Isotopenstandard)
V-SMOW	Vienna-Standard Mean Ocean Water (internationaler Isotopenstandard)

1 Einleitung und Zielsetzung

Obstbrände spielen mit 3,6 % am Pro-Kopf Spirituosenverbrauch auf dem deutschen Markt im Vergleich zu anderen Erzeugnissen, wie Kornbrand, Cognac oder Rum zwar eine bescheidene Rolle, haben aber in bestimmten Regionen, wie z.B. Schwarzwald oder Franken eine große Bedeutung (1). Deshalb gelten besondere rechtliche Vorschriften, durch welche diese Destillate geschützt sind. So gilt für Kirschwasser, welches unter der Bezeichnung „Schwarzwälder Kirschwasser“ oder einer ähnlichen Bezeichnung, die auf die regionale Herkunft dieses Produkts hinweist, dass es im Schwarzwald aus Kirschen des Schwarzwaldes und seines nahe gelegenen Vorlandes hergestellt werden muss. Ansonsten gelten Hinweise auf die Herkunft als irreführend (2). Voraussetzung für eine Kontrolle von Produktangaben ist jedoch die Möglichkeit, derartige Angaben zuverlässig nachprüfen zu können.

Die Stabilisotopenanalyse hat sich in den letzten Jahrzehnten als ein effizientes und routinemäßig anwendbares Werkzeug zum Authentizitätsnachweis für Lebensmittel und deren Inhaltsstoffe entwickelt (3). Besonders in der Weinanalytik haben sich die Isotopensignaturen am Ethanol sowie am Wasser als aussagekräftige Indikatoren zum Nachweis von Verfälschungen, z.B. einer unerlaubten Zuckering erwiesen. Darüber hinaus liefern sie verlässliche Informationen für einen Nachweis der regionalen Herkunft (4,5). Ausschlaggebende Messwerte sind hierbei der $\delta^{13}\text{C}$ -Wert des Ethanols sowie der $\delta^{18}\text{O}$ -Wert des Wassers, die beide mit Hilfe der so genannten Isotope Ratio Mass Spectrometry (IRMS) ermittelt werden. Darüber hinaus werden die beiden Wasserstoffisotopenverhältnisse $(\text{D}/\text{H})_{\text{I}}$ and $(\text{D}/\text{H})_{\text{II}}$ am Ethanol, welche sich mittels „Site-specific Natural Isotope Fractionation-Nuclear Magnetic Resonance“ (SNIF-NMR[®]) bestimmen lassen, zur Bewertung herangezogen (6-8).

Bei der Beurteilung von Spirituosen wurde die Stabilisotopenanalyse bisher eingesetzt, um die botanische Herkunft von Rohstoffen (Getreide, Obst) zu ermitteln (8-15). Systematische Untersuchungen bezüglich des Einflusses der einzelnen Herstellungsschritte auf die Isotopenverhältnisse in Obstbränden liegen jedoch noch nicht vor, so dass eine Herkunftsbestimmung dieser Produkte mit Hilfe der Stabilisotopenanalytik bisher nicht möglich war.

Ziel dieser Arbeit war es, auf der Basis der Analytik stabiler Isotope eine Methode zur Bestimmung der regionalen Herkunft von Obstbränden am Beispiel von Kirsch- und Zwetschgenwasser aus dem Schwarzwald, Franken sowie Norditalien (Alto Adige) zu erarbeiten. Die notwendige Datenerfassung sollte durch Untersuchung von Destillaten, die aus authentischem Material und unter bekannten, praxisüblichen Bedingungen hergestellt wurden, erfolgen. Zuverlässige Informationen für eine Zuordnung der regionalen Herkunft wurden von der Bestimmung der Kohlenstoff- und Wasserstoffisotopenverhältnisse des Ethanols sowie des $\delta^{18}\text{O}$ -Wertes des Wassers erwartet. Die Aussagekraft dieser Daten sollte durch Untersuchungen von authentischen Maischen, Rohdestillaten und Fertigprodukten bekannter Herkunft überprüft werden. Zusätzlich sollte exemplarisch das Isotopenverhältnis des schweren Elements Strontium, das von der Geochemie und/oder anthropogenen Immissionen am Herkunftsort abhängt, bezüglich einer Herkunftsinformation des Probenmaterials untersucht werden.

Durch Korrelation der aus der vorgeschlagenen Multielement- bzw. Multikomponentenanalyse erhaltenen Daten sollte der Möglichkeit einer Verfälschung durch gezielte "Einstellung" von Isotopendaten mittels Einzelverbindungen (z.B. durch Verschnitt mit Wässern mit geeigneten $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ -Verhältnissen) entgegengewirkt werden.

Zudem war es Ziel, durch die Herstellung eigener Destillate unter gezielter Variation einzelner Verfahrensschritte Einflüsse auf die Isotopensignaturen relevanter Verbindungen in den resultierenden Destillaten zu überprüfen. Hierfür wurden in der Versuchs- und Lehrbrennerei Weihenstephan und am Lehrstuhl für Allgemeine Lebensmitteltechnologie Kirschen vergoren und daraus Destillate mittels Labor- und Pilotanlage hergestellt. Für die Obstbrandherstellung relevante Parameter wie eingesetzter Hefestamm, Destillationstechnik, unterschiedlicher Einsatz von Verstärkereinrichtungen sowie typische Variationen beim Wechsel von Mittel- auf Nachlauf wurden variiert und die Auswirkungen auf die Isotopenverhältnisse im Destillat untersucht.

Durch diese umfassende Vorgehensweise sollte die Grundlage für eine Beurteilung von Kirsch- und Zwetschgenwässern verschiedener geographischer Herkunft auf Basis der Verhältnisse stabiler Isotopen geschaffen werden.

2 Grundlagen

2.1 Herstellung von Obstbränden

2.1.1 Maischebehandlung und Lagerung

Obstbrände sind Destillate aus vergorenem Kern- oder Steinobst. Um eine möglichst vollständige Gärung sicherzustellen, wird im ersten Schritt des Einmaischens das Obst zunächst vorsichtig zerquetscht und evtl. entsteint. Speziell bei Steinobstmaischen ist hierbei eine Beschädigung der Steine zu vermeiden, um den Gehalt an Amygdalin, der Ausgangssubstanz für die spätere Bildung von Blausäure, in der Maische möglichst gering zu halten (16).

Da aufgrund des in den Früchten enthaltenen hohen Gehaltes an Zuckern, Mineralstoffen und Aminosäuren die Maische einen idealen Nährboden für viele unerwünschte Mikroorganismen wie z.B. Essig-, Butter- oder Milchsäurebakterien darstellt, erfolgt anschließend eine Ansäuerung der Maische durch Zugabe von Schwefelsäure auf einen pH von ca. 3,0–3,2. Abschließend werden die Maischen in der Regel mit Reinzuchthefen der Hefeart *Saccharomyces cerevisiae* vergoren, die eine höhere Alkoholausbeute als eine Spontanvergärung erwarten lassen.

Nach einer Gärzeit von etwa zwei Wochen werden die vergorenen Maischen bis zum Zeitpunkt der Destillation meist noch mehrere Wochen bis höchstens drei Monate kühl gelagert (max. 18 °C) (16) und schließlich destilliert, wodurch Ethanol und flüchtige Inhaltsstoffe von den nichtflüchtigen Bestandteilen abgetrennt werden.

2.1.2 Destillationsapparaturen

Ein Brenngerät besteht grundsätzlich aus beheizbarer Blase, Helm, Geistrohr und Kühler (Abbildung 1).

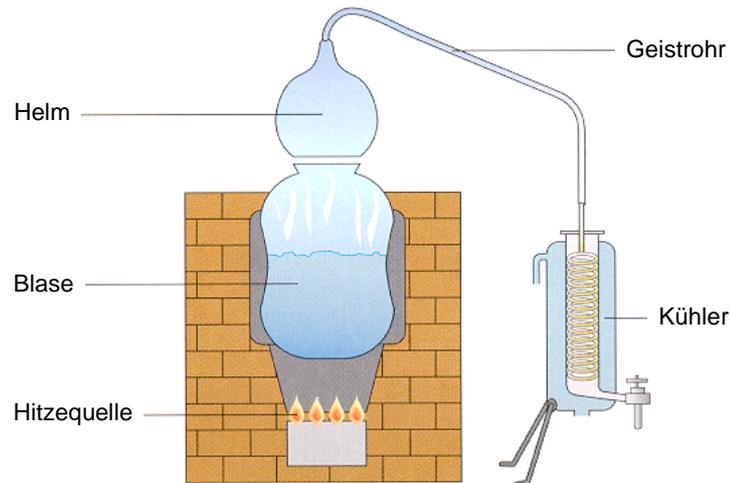


Abbildung 1: Klassischer Aufbau eines Brenngerätes (16)

Bei der klassischen Destillationseinrichtung besteht die Blase, die meist direkt durch Holzfeuer oder Ölbrenner erhitzt wird, aus Kupfer. Das aus Edelstahl bestehende Geistrohr verbindet Helm bzw. Verstärker mit dem Kühler, in dem Ethanol und die flüchtigen Inhaltsstoffe kondensieren. Um eine optimale Kühlung zu gewährleisten, fließt das Kühlwasser von unten nach oben und damit entgegengesetzt der Flussrichtung des Destillates. Am Kühlerende befindet sich die Vorlage, in der Menge, Ethanolgehalt, Klarheit und Temperatur des Destillates kontrolliert werden können. Moderne Brenngeräte sind darüber hinaus mit weiteren Bauteilen wie Verstärkereinrichtungen (Dephlegmator und Glockenböden) sowie einem Kupferkatalysator zur Cyanidabscheidung ausgestattet.

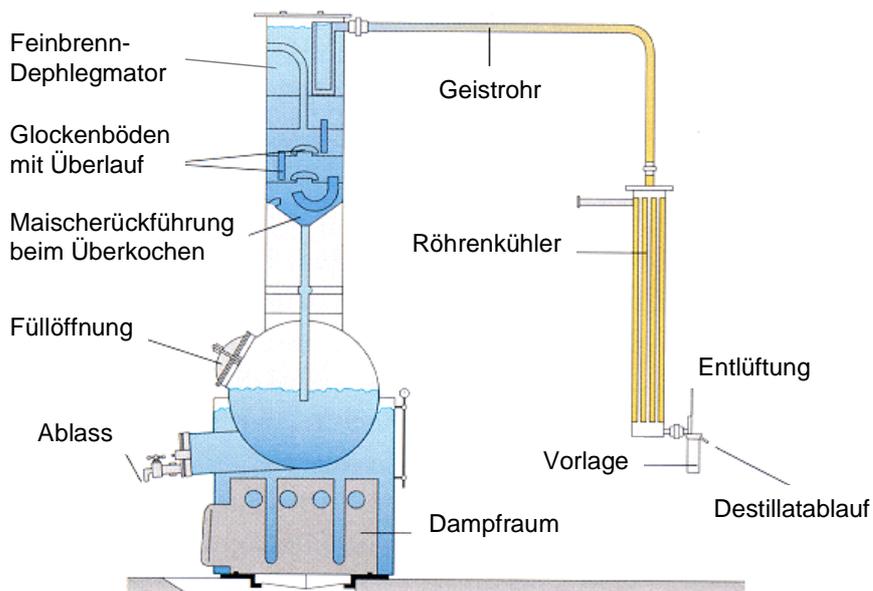


Abbildung 2: Aufbau eines modernen Brenngerätes (16)

Während mit Brenngeräten, wie sie Abbildung 1 zeigt, das Destillat meist ein zweites mal destilliert werden muss, wird durch den Einbau von so genannten Glockenböden eine weitaus höhere Konzentration an Ethanol und der übrigen leichter flüchtigen Substanzen im Destillat in nur einem Destillationsschritt erreicht. Der Vorteil liegt hierbei vor allem in der erheblichen Energieeinsparung. Physikalische Grundlage ist hierbei, dass der aufsteigende Dampf durch die Flüssigkeit auf den Böden strömen muss und dabei teilweise kondensiert. Die freiwerdende Kondensationswärme dient der teilweisen erneuten Verdampfung des Kondensats, wodurch es zu einer erneuten Anreicherung der Leichtsieder kommt.

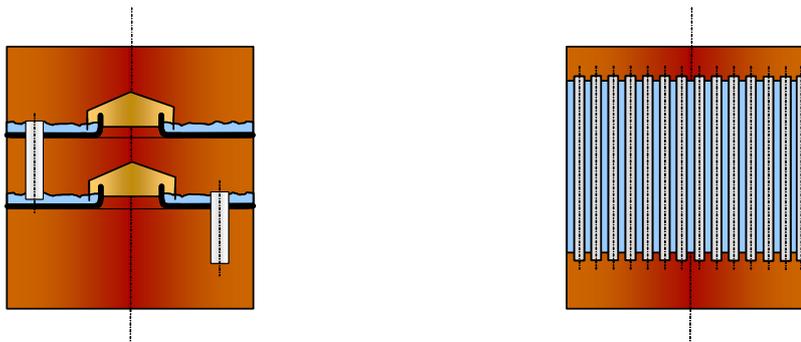


Abbildung 3: Glockenböden (links) und Dephlegmator (rechts)

Der Dephlegmator besteht aus einer Vielzahl kleiner Kupferrohre, die mit einem regelbaren Wasserstrom zur Kühlung umgeben sind. Ihm liegt das gleiche Prinzip zugrunde, jedoch werden hier nicht wie bei den Glockenböden die Leichtsieder verdampft sondern die Schwersieder durch das Abkühlen des Dampfes an der Rohroberfläche kondensiert. Dies bewirkt eine weitere Anreicherung der Leichtersieder in der Dampfphase.

Der Katalysator, der zwischen Dephlegmator und dem Geistrohr der Destillationsanlage eingebaut ist, dient zur Bindung flüchtiger Blausäure und ist ähnlich dem Dephlegmator aus einer Vielzahl einzelner Röhrchen mit geringem Durchmesser aufgebaut, um die Kupferoberfläche, an der der Dampf vorbei streichen muss, zu maximieren.

2.1.3 Destillationstechniken

Bei Brenngeräten ohne Verstärkereinrichtungen erfolgt die Herstellung des Obstbrandes in zwei Einzelschritten:

1. Herstellung von Rauhbränden aus vergorener Obstmaische
2. Destillation mehrerer Rauhbrände als Feinbrand

Bei der Herstellung des Rauhbrandes wird das gesamte Destillat gesammelt. Dieses weist zu Beginn einen Ethanolgehalt von 40–60 %–vol. auf, der bis zum Ende der Destillation auf ca. 2–3 %–vol. absinkt. Je nach Größe der Brennblase werden anschließend 2–4 Rauhbrände vereint und erneut destilliert. Neben der Verstärkung des Ethanolgehaltes dient dieser Schritt der Reinigung des Destillates (Rektifikation). Dabei erfolgt bei diesem so genannten Feinbrand eine Vorlaufabtrennung, die ca. 1 % des destillierten Rauhbrandvolumens entspricht. Hierdurch werden unerwünschte leichtflüchtige Verbindungen, wie z.B. Acetaldehyd und Ethylacetat abgetrennt. Unterschreitet das Destillat einen bestimmten Ethanolgehalt (in der Praxis meist zwischen 65 und 50 %–vol.), wird von Mittel- auf Nachlauf gewechselt, der ebenfalls abgetrennt wird. Dieser enthält vermehrt Verbindungen mit hohem Siedepunkt wie z.B. Benzylalkohol, 2-Phenylethanol oder Furfural und macht ca. 25 % des Rauhbrandes aus. Der Ethanolgehalt des Nachlaufs liegt bei 20–25 %–vol.

Bei Brenngeräten, die über Verstärkereinrichtungen verfügen, erfolgt die Obstbrandherstellung über eine einmalige Destillation. Hier wird ebenfalls ca. 1 % des Maischevolumens als Vorlauf abgetrennt; der Wechsel von Mittel- auf Nachlauf erfolgt meist zwischen 65 und 50 %-vol. Die Destillation wird beendet, wenn das ablaufende Destillat einen Ethanolgehalt von ca. 5–10 %-vol. unterschreitet.

Da der resultierende Mittellauf einen Ethanolgehalt zwischen 65 und 80 %-vol. aufweist, wird dieser nach einer gewissen Lagerzeit durch entsprechende Zugabe von Verschnittwasser auf 40–45 %-vol. herabgesetzt und ist somit trinkfertig. Die Herstellung von Obstbränden mit Verstärkereinrichtungen wird heute aus Energie- und Zeitgründen weitgehend bevorzugt (16).

Weiterführende Informationen zur Herstellung von Obstbränden können der Fachliteratur entnommen werden (16–19).

2.2 Rechtliche Regelungen

Für Obstbrände gelten Verordnungen, die den Höchstgehalt an bestimmten Inhaltsstoffen regeln. In der EG-Verordnung Nr. 1576/89 vom 29. Mai 1989 sind die allgemeinen Regeln für die Begriffsbestimmung, Bezeichnung und Aufmachung von Spirituosen festgehalten (20). So darf ein Obstbrand „ausschließlich durch alkoholische Gärung und Destillieren einer frischen fleischigen Frucht oder des frischen Mostes dieser Frucht ... mit oder ohne Steine...“ gewonnen werden. Weiterhin ist festgehalten, dass der Ethanolgehalt des Destillats weniger als 86 %-vol. aufweisen muss, sowie die Verbindungen Methanol und Blausäure (10 mg/100 ml A. für Steinobstbrände) bestimmten Höchstmengen unterliegen. Außerdem muss der Gehalt an flüchtigen Bestandteilen mindestens 200 mg/100 ml A. betragen (20).

Der hier vorgeschriebene Maximalgehalt an Methanol wurde jedoch bereits mehrmals geändert und ist abhängig vom Rohstoff. Laut Verordnung (EWG) Nr. 2626/95 der Kommission vom 10. November 1995 wurde der bereits durch mehrere vorhergehende Verordnungen auf 1500 mg/100 ml A. geänderte Methanol-Höchstgehalt ab 1. Januar 1998 auf 1350 mg/100 ml A. und ab 1. Januar 2000 auf 1200 mg/100 ml A. gesenkt, wobei dieser Wert für Destillate aus Pflaumen, Zwetschgen, Mirabellen, Äpfeln und Birnen (mit Ausnahme für Destillate aus

Williamsbirnen) gilt. Für alle übrigen Obstbrände, zu denen auch Kirschbrand zählt, gilt ein Höchstgehalt von 1000 mg/100 ml A. (21).

Für das als cancerogen geltende Ethylcarbammat (EC) wurde von der obersten Landesbehörde festgelegt, dass „eine Spirituose nach §17 Abs.1 Nr. 1 LMBG als für nicht zum Verzehr geeignet zu beurteilen ist, wenn der [...] von dem BGA empfohlene Höchstwert von 400 µg/l maßgeblich überschritten wird.“ (22). Als maßgeblich überschritten gilt der EC- Gehalt einer Spirituose bei der doppelten Konzentration, also bei 800 µg/l (22).

Für die Verderbnisindikatoren 1-Propanol, 2-Butanol, 2-Propenol (Allylalkohol), Ethyllactat und Ethylacetat gibt es zwar keine rechtlichen Vorschriften. Aus Erfahrungen am Lehrstuhl können jedoch die in Tabelle 1 aufgeführten „Orientierungswerte“, die für den mikrobiellen Verderb einer Kirsch- bzw. Zwetschgenmaische sprechen, genannt werden (23,24).

Tabelle 1: Orientierungswerte für untere Konzentrationsgrenzen von Verderbnisindikatoren für den Rückschluss auf den Verderb einer Obstmaische

Verbindung	1-Propanol	2-Butanol	2-Propenol	Ethyllactat	Ethylacetat
Konzentration [mg/100 ml A.]	800	50	5	100	300

Während die Einhaltung von Bestimmungen, die die zulässigen Höchst- bzw. Mindestgehalte bestimmter Inhaltsstoffe regeln, durch Routineanalysen kontrolliert werden können (22,25), ist eine Überprüfung der Herkunftsangabe mit herkömmlichen chemisch-analytischen Methoden nicht möglich. Gemäß Alkoholhaltige Getränkeverordnung (AGeV) müssen Obstbrände mit Bezeichnungen, die auf eine bestimmte geographische Herkunft schließen lassen, in dieser Region aus Früchten dieser Region hergestellt werden (2). So ist die Angabe „Schwarzwälder Kirschwasser“ nur zulässig, wenn dieses im Schwarzwald und seinem nahe gelegenen Vorland aus Kirschen dieser Region hergestellt wurde. Hierzu zählen rechtlich vom Regierungsbezirk Freiburg die Landkreise Breisgau-Hochschwarzwald, Emmendingen, Konstanz, Lörrach, Ortenaukreis, Rottweil, Schwarzwald-Baar-Kreis, Tuttlingen, Waldshut und die kreisfreien Städte Freiburg und Offenburg, und vom

Regierungsbezirk Karlsruhe die Landkreise Calw, Enzkreis, Freudenstadt, Karlsruhe, Rastatt und die kreisfreien Städte Baden-Baden und Karlsruhe.

Eine viel versprechende Methode zum Nachweis der Herkunft alkoholischer Getränke stellt die Stabilisotopenanalyse dar (3,26).

2.3 Stabilisotope

Isotope sind Elemente mit gleicher Kernladungs- und somit Ordnungszahl, aber unterschiedlicher Neutronen- und Massenzahl. Unterschieden werden stabile und nicht-stabile (radioaktive) Isotope (27). Während für Altersbestimmungen in der Geologie besonders die Verhältnisse radioaktiver Isotope von Interesse sind, trugen die Isotopenverhältnisse der so genannten leichten Bioelemente Wasserstoff, Kohlenstoff, Stickstoff, Sauerstoff und Schwefel maßgeblich zum Verständnis biochemischer Vorgänge bei (3). In den letzten beiden Jahrzehnten gewannen diese Verhältnisse zunehmend an Bedeutung in der Authentizitäts- und Herkunftskontrolle von Lebensmitteln (3).

2.3.1 Allgemeines

2.3.1.1 Vorkommen in der Natur

Biomasse besteht hauptsächlich aus den Elementen Kohlenstoff, Sauerstoff, Wasserstoff, Stickstoff und Schwefel. Während beim Kohlenstoff, Wasserstoff und Stickstoff ausschließlich zwei stabile Isotope vorkommen, existieren vom Sauerstoff drei, vom Schwefel sogar vier stabile Isotope, von denen jeweils ein Isotop vorrangig in der Natur vorliegt. Tabelle 2 zeigt die globalen mittleren relativen Häufigkeiten F der stabilen Isotope der genannten Elemente.

Tabelle 2: Bioelemente und die mittleren relativen Häufigkeiten (F) ihrer stabilen Isotope (26)

Element	Isotop	
	Symbol	F [Atom-%]
Wasserstoff	^1H	99.9855
	^2H bzw. D	0.0145
Kohlenstoff	^{12}C	98.892
	^{13}C	1.108
Stickstoff	^{14}N	99.6337
	^{15}N	0.3663
Sauerstoff	^{16}O	99.7587
	^{17}O	0.0375
	^{18}O	0.2039
Schwefel	^{32}S	95.018
	^{33}S	0.750
	^{34}S	4.215
	^{36}S	0.017

In der Stabilisotopenanalytik werden jeweils die Verhältnisse des schwereren zum leichteren Isotop eines Elements betrachtet. Im Fall von Sauerstoff und Schwefel sind dies aufgrund der höheren Häufigkeit der jeweiligen schwereren Isotope die Verhältnisse $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ bzw. $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$. Neben den genannten leichten Bioelementen wurde auch das Isotopenverhältnis des schweren Elements Strontium $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ bereits als Indikator für eine regionale Herkunft von Wein herangezogen (28–30). Durch den geringen relativen Massenunterschied unterliegt dieses Verhältnis keinen natürlichen Fraktionierungen (31) und ist somit fast ausschließlich abhängig von den geologischen Bedingungen der jeweiligen Anbauregion (32).

2.3.1.2 Nomenklatur

Die in Tabelle 2 angegebenen Häufigkeiten sind nicht als Konstanten zu verstehen, sondern schwanken in der Natur aufgrund von Isotopeneffekten thermodynamischer sowie kinetischer Art (26). Da sich diese Schwankungen erst in der vierten Nachkommastelle der relativen Häufigkeiten bemerkbar machen, werden Stabilisotopen-

verhältnisse (R) in der Praxis mit wenigen Ausnahmen gemäß Formel 1 als Abweichungen vom jeweiligen internationalen Standard angegeben (33).

Formel 1: Berechnung von δ -Werten (33)

$$\delta R_{\text{Probe}} [\text{‰}] = \left(\frac{R_{\text{Probe}} - R_{\text{Standard}}}{R_{\text{Standard}}} \right) \cdot 1000$$

R: Verhältnis schweres/leichtes Isotop

In Tabelle 3 sind die jeweiligen internationalen Standards, die von der Internationalen Atomenergiebehörde (IAEA) in Wien ausgegeben werden, und die zugehörigen Isotopenverhältnisse angegeben.

Tabelle 3: Internationale Isotopenstandards (26)

Element	Standard	R
Wasserstoff	Standard Mean Ocean Water (V-SMOW)	0,00015576
Kohlenstoff	Pee Dee Belemnite (V-PDB)	0,011237
Stickstoff	Air Nitrogen (AIR)	0,0036765
Sauerstoff	Standard Mean Ocean Water (V-SMOW)	0,00200520
Schwefel	Canyon Diablo Troilite (CDT)	0,0450045
Strontium	Ostseewasser	0,7093

R: Verhältnis schweres/leichtes Isotop

2.3.1.3 Natürliche Isotopenfraktionierungen

Aufgrund der unterschiedlichen Massen isotopologer Moleküle kommt es während physikalischer, chemischer und biochemischer Prozesse zu Isotopenfraktionierungen, die eine An- oder Abreicherung des leichteren Isotopologs in der Ausgangssubstanz zur Folge haben (34). Derartige Fraktionierungen können durch natürliche Vorgänge wie die CO₂-Fixierung in Pflanzen oder durch technische Verfahrensschritte wie Destillation oder Kondensation hervorgerufen werden (35). Natürlich auftretende Isotopenfraktionierungen bilden die Grundlage für einen Herkunftsnachweis biologischen Materials und sollen im Folgenden genauer erläutert werden.

Stabilisotopenverhältnisse $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ und $^2\text{H}/^1\text{H}$ in Zucker und Ethanol

Das Kohlenstoffisotopenverhältnis hängt zunächst generell von den Isotopenverhältnissen des Kohlendioxids und des Hydrogencarbonats ab, die der Pflanze als Hauptkohlenstoffquellen zur Verfügung stehen. Darüber hinaus kommt es durch die höhere Reaktionsgeschwindigkeit des leichteren $^{12}\text{CO}_2$ während der primären CO_2 -Fixierung im Verlauf der Photosynthese in der Pflanze zu einer ^{13}C -Anreicherung, deren Betrag abhängig vom Photosynthesewege der Pflanze ist. So binden C_3 -Pflanzen, zu denen auch Kirsch- und Zwetschgenbäume zählen, CO_2 im Calvin-Cyclus durch die Ribulosebiphosphat-Carboxylasereaktion im Primärprodukt 3-Phosphoglycerinsäure (36), während Oxaloesigsäure, das Primärprodukt der C_4 -Pflanzen, durch die Phosphoenolpyruvat-Carboxylasereaktion im Verlauf des Hatch-Slack-Cyclus gebildet wird (36, 37). Während Produkte von C_3 -Pflanzen $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von -32 bis -24 ‰ aufweisen, ist die ^{13}C -Diskriminierung bei C_4 -Pflanzen deutlich geringer. Dies spiegelt sich in $\delta^{13}\text{C}$ -Werten von -16 bis -10 ‰ wider. Produkte von CAM-Pflanzen, zu der beispielsweise die Agave zählt, decken mit Werten von -30 bis -12 ‰ hingegen beide Bereiche ab (38). In Abbildung 4 sind $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der Hauptkohlenstoffreservoirs der Erde gegenübergestellt.

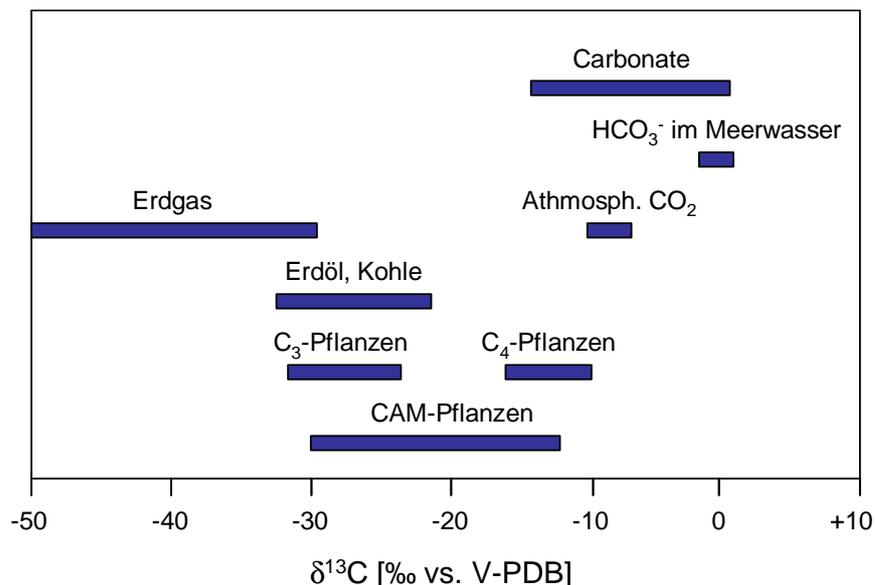


Abbildung 4: $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der Hauptkohlenstoffreservoirs der Erde (38)

Durch diese Isotopenfraktionierung ist eine Unterscheidung zwischen Rohrzucker,

der zur Gruppe der C₄-Pflanzen zählt, und Fruchtzucker aus heimischem Obst allein auf Basis des $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes zweifelsfrei möglich. Da der Einfluss der Fermentation auf das $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis zu vernachlässigen ist (38), können $\delta^{13}\text{C}$ -Werte am Ethanol bereits erfolgreich zum Nachweis einer unerlaubten Maischezuckerung mit Rohrzucker herangezogen werden (15,39). Neben der Art des Photosynthesewegs hängt die CO₂-Fixierung jedoch auch von klimatischen Faktoren ab (40). Dies ermöglicht des Weiteren eine Unterscheidung von Produkten wie Wein aus warmen und trocknen Regionen von denen aus kühleren und feuchteren Anbaugebieten (41). Analog zur Fraktionierung der Kohlenstoffisotope im Verlauf der Bildung des Fruchtzuckers durch die Pflanze hängt auch dessen $^2\text{H}/^1\text{H}$ -Verhältnis hauptsächlich vom Photosyntheseweg ab. So besitzen Produkte von C₄-Pflanzen die höchsten, C₃-Pflanzen die niedrigsten Wasserstoffisotopenverhältnisse. Während der Fermentation kommt es schließlich zur so genannten Site-specific Natural Isotope Fractionation (SNIF), wodurch das Deuterium des Zuckers in einem bestimmten Verhältnis auf die Methyl- und Methylengruppe des Ethanolmoleküls übertragen wird. So stammen 85 % des Deuteriums der Methylgruppe aus dem vergorenen Zucker, die restlichen 15 % aus dem von der Pflanze aufgenommenen Wasser. An der Methylengruppe beträgt dieser Anteil lediglich 25 % (42). Somit ist das Wasserstoffisotopenverhältnis an der Methylgruppe des Ethanols, das so genannte (D/H)_I-Verhältnis, charakteristisch für die botanische Herkunft des Zuckers, das (D/H)_{II}-Verhältnis an der Methylengruppe spiegelt hingegen die klimatischen Bedingungen am Anbauort wider, da dieses Wasserstoffisotopenverhältnis, wie im folgenden erläutert, im Besonderen auch von Lufttemperatur und Wasserverfügbarkeit während der Wachstumsphase der Frucht abhängt.

Stabilisotopenverhältnisse D/H und $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ im Wasser

Im Gegensatz zum $\delta^{13}\text{C}$ -Wert, bei dem der Stoffwechsel der Pflanze die entscheidende Rolle bei der Isotopenfraktionierung spielt, hängen die D/H und $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Werte im Fruchtzucker, der Fruchtpulpe und im Fruchtwasser in starkem Maße vom Niederschlag und somit bereits von der Fraktionierung der Isotopologe des Wassers in der Atmosphäre ab. Die Einflüsse, die das Ausmaß dieser Fraktionierungen bestimmen, sollen im Folgenden erläutert werden.

Grundlage ist die Modellvorstellung, dass Meerwasser in ozeanischen Gebieten mit den höchsten Oberflächentemperaturen verdunstet. Dieser Wasserdampf kondensiert schrittweise auf seinem Weg in höhere Breiten ohne zusätzliche Vermischungen und geht somit als Regen nieder. Aufgrund unterschiedlicher Dampfdrücke isotopologer Moleküle kondensieren vorrangig die schwereren Isotopologe des Wassers (43), was zunehmend zu einer Abreicherung der Wassermoleküle in der Dampfphase an schweren Wasserstoff- und Sauerstoffisotopen führt. Dabei besteht ein linearer Zusammenhang zwischen den $\delta^{18}\text{O}$ - sowie $\delta^2\text{H}$ -Werten, wie er durch die so genannte Niederschlagsgerade oder Meteoric Water Line (MWL) (Formel 2) beschrieben wird.

Formel 2: Meteoric Water Line (MWL) (44)

$$\delta^2\text{H} = 8 \cdot \delta^{18}\text{O} + d$$

d: Deuterium-Exzess

Neben diesem so genannten Breiteneffekt (4, 45) haben auch geologische Gegebenheiten des Anbaugbiets wie Entfernung von der Küste (Kontinentaleffekt) (46) und Höhe über dem Meeresspiegel (Höheneffekt) (47) einen Einfluss auf die Sauerstoff- und Wasserstoffisotopenverhältnisse im Regen und damit auch im Grundwasser. Eine weitere Einflussgröße, die ebenfalls ausschlaggebend für die Anwendung dieser Isotopenverhältnisse für einen Herkunftsnachweis ist, ist die Temperatur. Eine niedrigere Lufttemperatur bewirkt eine Kondensation größerer Wassermengen, wodurch die Isotopenverhältnisse im Niederschlag geringer werden (44).

Während es beim Transport des Grundwassers durch die Pflanze in die Früchte nicht zu Fraktionierungen kommt (48), werden die Sauerstoff- und Wasserstoffisotopenverhältnisse des Fruchtwassers vor allem durch die Wasserversorgung und die Temperatur am Anbauort bestimmt. Durch diese beiden Faktoren wird direkt die Evapotranspiration an der Außenhaut der Früchte beeinflusst (49, 50), ein physikalischer Prozess, der zu einer Isotopendiskriminierung innerhalb der Frucht führt.

Somit spiegeln die $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ -Verhältnisse des Wassers die klimatischen Bedingungen am Anbaugbiet wider, die auch während einer Fermentation nicht signifikant verändert werden (49, 51). Dies macht sie zu einem aussagekräftigen Parameter für

die geographische Herkunftsbestimmung von Lebensmitteln (3,26). In der Praxis wird jedoch lediglich der $\delta^{18}\text{O}$ -Wert des Wassers bestimmt, da dessen D/H-Verhältnis durch den beschriebenen linearen Zusammenhang zwischen Wasserstoff- und Sauerstoffisotopenverhältnissen keine zusätzliche Information bezüglich Klima und somit geographischer Herkunft liefert.

Sonstige Stabilisotopenverhältnisse in der Pflanze

Neben den genannten Stabilisotopenverhältnissen liefern die Verhältnisse weiterer Isotope Hinweise auf eine geographische Herkunft von Naturprodukten.

So ist das Verhältnis $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ der von der Pflanze gebildeten Biomasse abhängig von der primären Stickstoffquelle. Während Stickstoff, der im Boden gebunden oder der Pflanze durch Naturdünger zur Verfügung gestellt wird, meist positive $\delta^{15}\text{N}$ -Werte aufweist, besitzen Naturdünger und Stickstoff, der durch Mikroorganismen im Boden fixiert wird, meist $\delta^{15}\text{N}$ -Werte im Bereich von Null (26). Erfolgreich angewandt wurde die Stickstoffisotopenanalyse bereits beim Herkunftsnachweis von Orangensaft (52). Das Schwefelisotopenverhältnis in pflanzlichen Produkten entspricht im Allgemeinen dem des Bodenschwefels, da keine Isotopenfraktionierung durch den Pflanzenstoffwechsel stattfindet (3). Des Weiteren kann anthropogenes SO_2 , sowie die Verwendung Schwefelhaltiger Düngemittel das Schwefelisotopenverhältnis von pflanzlicher Biomasse mitbestimmen (26,53). Jedoch verlieren die beiden letzten Faktoren durch einen Verzicht Schwefelhaltiger Düngemittel und die Begrenzung von SO_2 -Emissionen zunehmend an Bedeutung (3).

Eine weitere, für den Nachweis der regionalen Herkunft von Pflanzenprodukten viel versprechende Information liefert das Strontiumisotopenverhältnis $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$. Während die Isotopenverhältnisse der leichten Bioelemente durch unterschiedliche Einflüsse gewissen zeitlichen Schwankungen unterworfen sind, wird der $\delta^{87}\text{Sr}$ -Wert im Boden ausschließlich von den geologischen Begebenheiten am Wachstumsort bestimmt und bleibt somit über lange Zeiträume für eine bestimmte Region konstant (30). Auch während der Aufnahme durch die Pflanze ändert sich dieser Wert nicht signifikant (30,54). Beispiele für die Anwendung des $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ -Verhältnisses für den Herkunftsnachweis von Lebensmitteln sind Wein (28,55) oder Emmentaler Käse (56).

2.3.2 Anwendung der Stabilisotopenanalytik beim Nachweis der geographischen Herkunft von Wein

Besonders beim Nachweis der regionalen Herkunft von Wein spielt die Stabilisotopenanalyse seit beinahe 20 Jahren eine bedeutende Rolle. Da die Produktion von Wein und Obstbrand mit Ausnahme der Destillation aus vergleichbaren technologischen Verfahrensschritten besteht, werden im Folgenden die wesentlichen Arbeiten der Stabilisotopenanalyse zum Herkunftsnachweis von Wein aufgeführt. Bereits 1988 gelang es Martin et al. auf der Basis der Isotopenverhältnisse $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $(\text{D}/\text{H})_{\text{I}}$, und $(\text{D}/\text{H})_{\text{II}}$ des Ethanols und des $\delta^{18}\text{O}$ -Wertes des Wassers, 50 französische Weine den Anbaugebieten Elsass, Anjou und Gironde mit Klassifizierungsraten von 92 bis 100 % zuzuordnen (57). Ausgehend von diesen Ergebnissen wurden in den letzten zwei Jahrzehnten auf Basis der genannten Stabilisotopenverhältnisse zahlreiche Versuche unternommen, Weine aus unterschiedlichen Regionen zu differenzieren. So gelang Kosir et al. die Unterscheidung slowenischer Weine aus Küstennahen Anbaugebieten von Weinen aus dem Landesinneren (58). Mit Hilfe der Linearen Diskriminanzanalyse konnten letztere von Ogrinc et al. sogar den beiden Regionen Drava und Sava korrekt zugeordnet werden (59). Vergleichbare Untersuchungen wurden auch für Weine aus Deutschland (60), Spanien (61), Italien (62,63), Kroatien und Ungarn (64) durchgeführt. Breas et al. verglichen die Weine von mehreren europäischen Ländern (65). Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass eine zuverlässige geographische Trennung nur möglich ist, wenn sich die betreffenden Gebiete bezüglich Temperatur und Niederschlag signifikant unterscheiden. Die Abhängigkeit der Stabilisotopenverhältnisse von klimatischen Bedingungen zeigt sich auch in den Untersuchungen von Gremaud et al., die die Stabilisotopenverhältnisse $(\text{D}/\text{H})_{\text{I}}$, $(\text{D}/\text{H})_{\text{II}}$ von Ethanol und $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ von Wasser von 75 Weinproben aus 10 Kantonen der Schweiz analysierten. Während eine zuverlässige Trennung der Proben aus der Nordschweiz (Valais) von denen aus dem Süden des Landes (Tessin) möglich war, waren die Unterschiede zwischen den Stabilisotopen der Proben aus dem östlich gelegenen Teil der Schweiz und der westlich gelegenen Romandie weniger stark ausgeprägt. Der Grund hierfür liegt in der Lage der Alpen, die das Land in Ost-West Richtung in zwei Gebiete teilen, welche dadurch unterschiedlichen klimatischen Bedingungen ausgesetzt sind (66).

Day et al. gelang durch die Kombination der vier anfangs genannten Stabilisotopenverhältnisse mit den Konzentrationen der Elemente Al, Ba, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Rb, Sr und Zn eine korrekte Zuordnung von 165 Weinen der Anbaugebiete Beaujolais, Burgund, Elsass und Loire Valley, die sich von ihrer geographischen Lage und den klimatischen Bedingungen nur geringfügig unterscheiden. Die Fehlklassifikationsrate betrug dabei lediglich 1,2 % (67). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Martin et al. bei der Untersuchung von Weinen aus Bordeaux. Auch hier führte neben der Messung der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -, $(\text{D}/\text{H})_{\text{I}}$ -, und $(\text{D}/\text{H})_{\text{II}}$ -Isotopenverhältnisse des Ethanol und des $\delta^{18}\text{O}$ -Wertes des Wassers die zusätzliche Bestimmung der Konzentrationen der Elemente Al, Ba, Ca, K, Li, Mg, Na, Rb, Sr und Zn zu einer verbesserten regionalen Trennung der Weine (68).

Neben der Kombination von Stabilisotopen mit anderen chemisch-analytischen Kennzahlen verspricht auch die zusätzliche Betrachtung des Strontiumisotopenverhältnisses $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ eine Steigerung der regionalen Differenzierung. Da der $\delta^{87}\text{Sr}$ -Wert fast ausschließlich von geologischen Gegebenheiten abhängt, können mit dessen Hilfe auch Proben unterschieden werden, die sich bezüglich klimatischer Bedingungen am Wachstumsort nur geringfügig unterscheiden (30). Die Anwendbarkeit der Strontiumisotopenanalyse für den Nachweis der geographischen Herkunft von Weinen wurde bereits 1993 erstmals gezeigt (30,69). Erste Erfolg versprechende Ergebnisse beim Einsatz von Strontiumisotopenverhältnissen für den Herkunftsnachweis zeigen Arbeiten von Almeida et al. (28) sowie Barbaste et al. (55).

2.3.3 Isotopenfraktionierungen während der Destillation

Während natürliche Fraktionierungen die Basis für die Anwendbarkeit der Stabilisotopenanalyse für den Nachweis der geographischen Herkunft eines Lebensmittels bzw. Lebensmittelinhaltsstoffes bilden, können Isotopenfraktionierungen während des Herstellungsprozesses zu einer Veränderung der ursprünglichen Isotopensignatur des Ausgangsproduktes führen. Im Bereich der Obstbrandherstellung ist eine derartige Fraktionierung besonders während der Destillation zu erwarten, da isotope Moleküle stets unterschiedliche Dampfdrücke aufweisen (35).

Da die Destillation den essentiellen technologischen Verfahrensschritt im Verlauf der

Obstbrandproduktion darstellt und diese gleichzeitig von der Weinherstellung abgrenzt, werden im Folgenden die physikalischen Grundlagen dieser Art der Isotopenfraktionierung näher erläutert.

Isotopenfraktionierungen, die durch den so genannten Vapor Pressure Isotope Effect (VPIE) beim Phasenübergang flüssig-gasförmig hervorgerufen werden, konnten bereits vor über 60 Jahren messtechnisch erfasst werden und wurden in den letzten Jahrzehnten durch zahlreiche Arbeiten umfassend beschrieben (70). Quantifiziert wird diese Isotopenfraktionierung zwischen schwerem (N) und leichtem (N') Isotopolog durch den so genannten Isotopic Fractionation Factor α , der gemäß Formel 3 definiert ist.

Formel 3: Berechnung des Isotopic Fractionation Factors α (71)

$$\alpha = \frac{\left(\frac{N}{N'}\right)_{\text{Gasphase}}}{\left(\frac{N}{N'}\right)_{\text{Flüssigkeit}}}$$

N: schweres Isotopolog; N': leichtes Isotopolog

In Abhängigkeit des thermodynamischen Zustandes eines Systems kann α Werte kleiner oder größer als 1 annehmen. Im ersten Fall kommt es zu einer Anreicherung des leichteren Isotopologs in der Gasphase, ein Phänomen, das als „normal isotope effect“ bezeichnet wird (72) und grundsätzlich im Verlauf von irreversiblen, so genannten kinetischen Reaktionen zu beobachten ist (73).

Jedoch auch der gegenteilige Effekt, die Anreicherung des schwereren Isotopologs in der Gasphase, kann bei Reaktionen, die im thermodynamischen Gleichgewicht ablaufen, beobachtet werden. Dieses Phänomen wird in Anlehnung an den erstgenannten Effekt als „inverse isotope effect“ bezeichnet (72).

Isotopenfraktionierungen im Verlauf kinetischer Phasenübergänge

Isotopenfraktionierungen im Verlauf irreversibler, kinetischer Reaktionen haben ihren Ursprung in den unterschiedlichen Massen isotopologer Moleküle. Gemäß dem Energieerhaltungssatz besitzen zwei isotopologe Moleküle bei einer bestimmten Temperatur stets dieselbe kinetische Energie. Diese ist wiederum proportional zum Produkt aus Masse und dem Quadrat der Geschwindigkeit dieses Moleküls. Besitzt,

wie im Fall zweier Isotopologen, ein Molekül bei sonst gleichen chemischen Eigenschaften lediglich eine höhere Masse, so muss dessen Bewegung langsamer sein als die des leichteren Moleküls. Da beide Moleküle chemisch identisch sind, hängt die Wahrscheinlichkeit, dass eines dieser Moleküle an einer Reaktion beteiligt ist, nur von dessen Geschwindigkeit ab. Somit reagiert das leichtere Isotopolog stets schneller als das schwerere, wodurch es zu einer Anreicherung des leichteren Isotopologs im Reaktionsprodukt kommt. Dies ist z.B. bei der Verdampfung einer Ethanol-Wasser Mischung unter ständiger Entfernung des Ethanols aus der Gasphase zu beobachten, da sich hier kein Gleichgewichtszustand ausbilden kann (74). Bezogen auf den Phasenübergang flüssig-gasförmig bedeutet dies eine Anreicherung des leichteren Isotopologs in der Gasphase während eines Verdampfungsvorgangs oder entsprechend dessen Anreicherung in der flüssigen Phase im Falle einer Kondensation (73).

Isotopenfraktionierungen im Verlauf thermodynamischer Phasenübergänge

Eine Reaktion im thermodynamischen Gleichgewicht lässt sich praktisch als eine Überlagerung zweier irreversibler Einzelreaktionen beschreiben. Um eine qualitative Aussage über die resultierende Fraktionierung während dieser Gleichgewichtsreaktion machen zu können, müssen die Bindungsenergien der beteiligten Isotopologen im Ausgangs- und Endprodukt im Zustand des thermodynamischen Gleichgewichtes verglichen werden.

Im Folgenden soll beispielhaft die Verdampfung einer Flüssigkeit, die aus zwei isotopologen Molekülen besteht, betrachtet werden.

Die Bindungsenergie zweier Atome lässt sich mit Hilfe so genannter Potentialkurven darstellen (Abbildung 5).

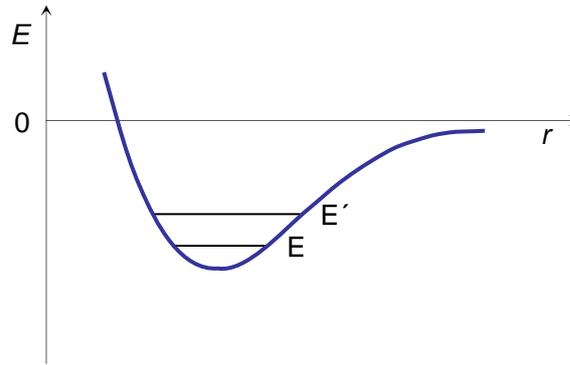


Abbildung 5: Potentialkurve zweier Moleküle
(E : Bindungsenergie; r : Abstand zweier Moleküle voneinander)

Die Potentialkurve zeigt die Energie E zwischen zwei Atomen in Abhängigkeit ihres Abstands r voneinander. Gemäß der Born–Oppenheimer Näherung kann die Bewegung der Kerne von der Bewegung der Elektronen getrennt betrachtet werden (72). Der Verlauf der Potentialkurve hängt wiederum nur von der Elektronenkonfiguration ab, so dass dieser unabhängig von der isotopologischen Zusammensetzung des Kerns ist. Folglich besitzen Isotope eines Elements dieselbe Potentialkurve (72).

Vergleicht man jedoch die jeweiligen Bindungsenergien zweier Isotope A und A' mit einem weiteren Atom B , so lässt sich ein geringer Unterschied nachweisen (72). Dieser Unterschied lässt sich durch die Bindungsenergie am absoluten Temperaturnullpunkt erklären. Während die Translations- und Rotationsenergie eines Atoms bei einer Temperatur von 0 K auf Null absinkt, besitzt es aufgrund der Heisenberg'schen Unschärferelation stets noch eine gewisse Vibrationsenergie, die so genannte Zero Point Energy (70). Da die Anziehungskraft zwischen zwei Atomen jedoch nur von deren jeweiligen elektrischen Ladungen abhängt, nimmt diese denselben Betrag für die beiden Bindungen $A-B$ und $A'-B$ an (75). Dies hat zur Folge, dass das leichtere Isotop A' im Vergleich zum schwereren Isotop A eine höhere Schwingungsfrequenz ν aufweisen muss, um bei geringerer Masse die gleiche Kraft auf B ausüben zu können. Die Bindungsenergie wiederum ist proportional zu dieser Schwingungsfrequenz (75). Somit besitzt das leichtere Molekül $A'-B$ ein höheres Energielevel E' im Vergleich zum Energielevel E des schwereren Moleküls $A-B$ (Abbildung 5).

Ausgehend von diesem Energieunterschied lässt sich die Isotopenfraktionierung im thermodynamischen Gleichgewicht für den Phasenübergang flüssig–gasförmig erläutern. Vereinfacht wird von der Annahme ausgegangen, dass sich Translation

und Rotation zweier Moleküle in einer Flüssigkeit durch die gegenseitige Beeinflussung der Moleküle energetisch wie Schwingungen verhalten (72). Die Änderung der Bindungsenergien zwischen zwei Molekülen während einer Verdampfung unter Gleichgewichtsbedingungen kann somit ebenfalls durch Potentialkurven dargestellt werden (Abbildung 6) (72).

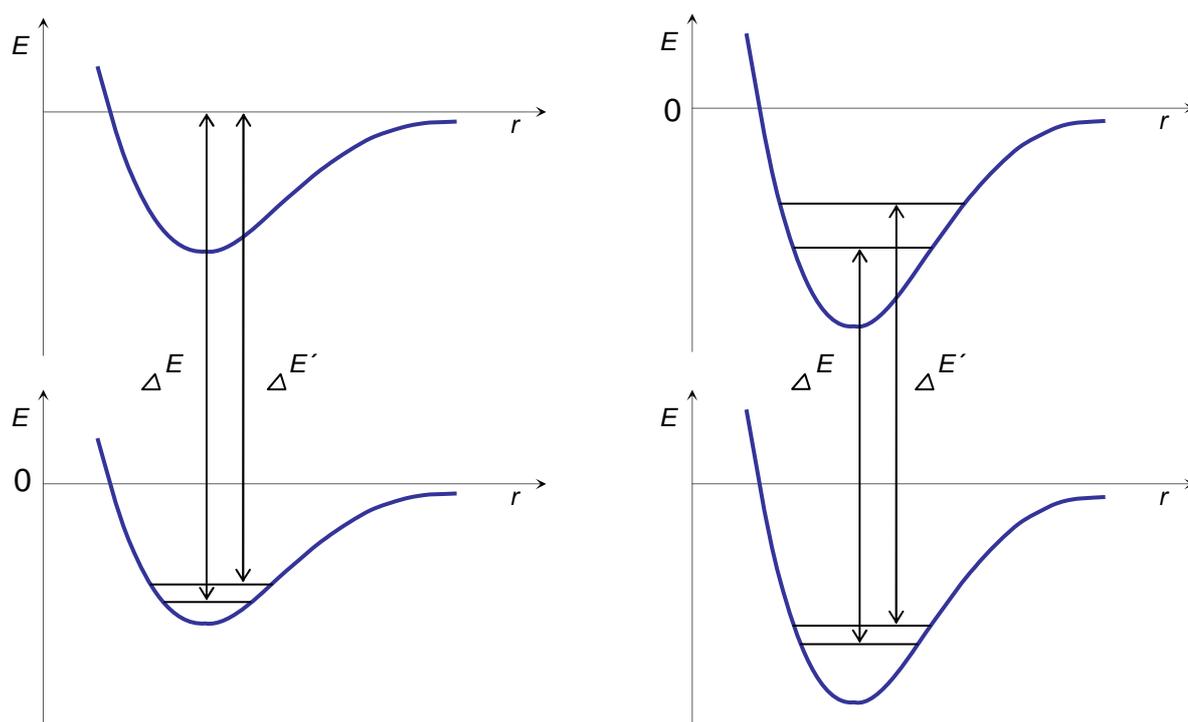


Abbildung 6: Änderung der Bindungsenergie beim Phasenübergang flüssig- (untere Kurvenverläufe) gasförmig (obere Kurvenverläufe); die linke Seite des Diagramms zeigt die Änderung der Bindungsenergie (E) bezüglich der externen Bewegungen Rotation und Translation eines Moleküls, die rechte Seite die Energieänderung hinsichtlich interner Vibrationen jeweils als Funktion des Abstandes (r) zweier Moleküle voneinander

Die linke Seite von Abbildung 6 zeigt die Änderung der Bindungsenergie bezogen auf die Translations- und Rotationsenergie eines Moleküls zwischen Gasphase (oberer Teil der Abbildung) und der flüssigen Phase (unterer Teil der Abbildung). Während beide Moleküle in der Gasphase nicht in Interaktion stehen ($E=0$), unterscheiden sich die Bindungsenergien gemäß oben beschriebener Herleitung in der Flüssigkeit in Abhängigkeit der isotopologischen Zusammensetzung der Bindungspartner. So nimmt die Bindungsenergie zwischen zwei leichten isotopologen Mole-

külen C'-C' einen höheren Betrag an als die zwischen einem leichten und einem schweren Isotopolog C'-C. Somit ist auch die Differenz der Bindungsenergien beim Phasenübergang flüssig-gasförmig für die Bindung C'-C' ($\Delta E'$) geringer als für die Bindung C'-C (ΔE). Dies bedeutet, jedoch nur auf die Translations- und Rotationsenergie bezogen, dass die Bindung zwischen zwei leichten Isotopologen leichter gebrochen werden kann, gleichbedeutend mit einem höheren Dampfdruck und somit einer Anreicherung des leichteren Isotopologs in der Gasphase. Translation und Rotation eines Moleküls bewirken somit immer einen normal isotope effect (72). Im Gegensatz dazu besitzen Moleküle stets auch in der Gasphase eine gewisse Vibrationsenergie, dargestellt auf der rechten Seite von Abbildung 6. IR- und Ramanuntersuchungen haben gezeigt, dass es beim Übergang flüssig-gasförmig zu einer Erhöhung der Schwingungsfrequenz der internen Vibrationen (blue-shift) kommt (72). Des Weiteren ist die Energiedifferenz proportional zum Quadrat der so genannten Kraftkonstante k einer Bindung (72). Da diese Kraftkonstante proportional zur Schwingungsfrequenz und der Masse der Bindungspartner ist, ist der Energieunterschied eines leichten Isotopologs zwischen Gasphase und Flüssigkeit größer als der eines schweren Isotopologs. Somit ist für den Phasenübergang flüssig-gasförmig für ein leichteres Isotopolog ein höherer Energiebetrag ($\Delta E'$) nötig, gleichbedeutend mit einem inverse isotope effect, der Anreicherung des schwereren Isotopologs in der Gasphase. Beobachtet wurde dieses Phänomen z.B. bei der Destillation einer Ethanol-Wasser Mischung mittels Drehbandkolonne für die Kohlenstoff- sowie Wasserstoffisotopenverhältnisse an der Methyl- bzw. Methylengruppe (74, 76). Die resultierende Fraktionierung der Gesamtreaktion ergibt sich folglich aus der Überlagerung des normal isotope effects, hervorgerufen durch die externen Bewegungen Rotation und Translation und dem inverse isotope effect, der durch die interne Vibration entsteht.

2.3.4 Grundlagen der Messung von Stabilisotopenverhältnissen

In der Routineanalytik werden Stabilisotopenverhältnisse mittels Massenspektrometrie (MS) sowie Kernresonanzspektroskopie (NMR) erfasst. Die Grundlagen beider Verfahren werden im Folgenden erläutert.

2.3.4.1 Isotope Ratio Mass Spectrometry (IRMS)

Unterschiede in der Atommasse eines Isotops konnten bereits vor über 50 Jahren mit Hilfe der so genannten Isotope Ratio Mass Spectrometry (IRMS), deren grundsätzliches Prinzip zur Messung von Stabilisotopenverhältnissen sich bis heute nicht geändert hat, detektiert werden (77).

Da sich mit Hilfe der Massenspektrometrie nur gasförmige Proben analysieren lassen, wurden parallel zur Entwicklung der IRMS Methoden etabliert, wodurch sich organische Materialien in messbare Gase (H_2 , CO_2 , N_2 , SO_2) überführen lassen (33, 78–81).

Die am häufigsten verbreitete Methode ist die Verbrennung der gesamten Probe (fest oder flüssig) unter Sauerstoffzufuhr, wobei als Verbrennungsprodukte CO_2 , N_2 , NO_x , SO_2 und H_2O entstehen (3). Nach der Reduktion des entstandenen NO_x zu N_2 gelangen die Gase direkt in das Massenspektrometer. Diese Probenaufbereitung im so genannten Elementaranalysator wird bei der Messung der Isotopenverhältnisse von Kohlenstoff, Stickstoff und Schwefel angewandt. Für die Messung des $\delta^{18}\text{O}$ -Wertes organischer Substanzen müssen diese jedoch ohne externe Sauerstoffzufuhr verbrannt werden, da sonst die Messwerte verfälscht würden. Dies geschieht durch die so genannte Pyrolyse, der Verbrennung bei Temperaturen von ca. 1300 °C unter Kohlenstoffüberschuss. Hierbei entsteht Kohlenmonoxid (CO) und H_2 , das wiederum mittels MS analysiert werden kann (3).

Während durch die beschriebene Probenvorbereitung lediglich die Isotopenverhältnisse der gesamten Probe bestimmt werden können, wurde die Stabilisotopenanalyse einzelner Verbindungen durch die Kopplung der IRMS-Apparatur mit einem Gaschromatographen (GC) möglich (82–84).

Darüber hinaus liefert auch der $\delta^{18}\text{O}$ -Wert von Wasser in einer Probe nützliche Informationen beim Einsatz der Stabilisotopenanalytik im Bereich von Lebensmitteln. Da dieser mit den herkömmlichen Methoden nicht direkt messbar ist, muss die Sauerstoffisotopensignatur vor der massenspektrometrischen Messung auf ein messbares Medium übertragen werden. Hierfür wird die Probe mehrere Stunden mit CO_2 überschichtet, wodurch das Kohlendioxid durch eine Austauschreaktion, der so genannten Äquilibration, das $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ -Verhältnis des Wassers annimmt, welches anschließend massenspektrometrisch bestimmt werden kann (7).

Da die relativen Häufigkeiten der einzelnen Isotope erst in der vierten Nachkommastelle variieren, werden in der Stabilisotopenanalytik nicht absolute Massen, sondern immer Abweichungen der gemessenen Masse eines Gases von einem Standardgas gemessen. Dieses wird mittels eines dualen Einlasssystems im Wechsel mit dem eigentlichen Messgas in das Stabilisotopenmassenspektrometer eingeleitet und analysiert. Somit wird gewährleistet, dass anlagenbedingte Schwankungen egalisiert werden und eine hohe Messgenauigkeit sichergestellt werden kann (77). Außerdem besitzen zur Messung von Isotopenverhältnissen eingesetzte Massenspektrometer im Gegensatz zu herkömmlichen Geräten, die Anwendung in der Strukturaufklärung finden, mindestens zwei, teilweise bis zu acht Faraday-Auffänger, wodurch eine parallele Detektion der Massen isotopologer Gase gewährleistet wird. Im Falle der Messung von CO_2 zur Bestimmung des $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes sind dies die Massen 44 ($^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2$), 45 ($^{13}\text{C}^{16}\text{O}_2$, $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{17}\text{O}$) und 46 ($^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$).

Manifestiert sind die genauen Bestimmungen für die Stabilisotopenanalytik zur Messung der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von Ethanol und $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ -Verhältnissen von Wasser mittels IRMS in Verordnungen der Europäischen Kommission (85, 86).

2.3.4.2 Thermo Ionization Mass Spectrometry (TIMS)

Im Gegensatz zur IRMS-Messung ist für die Bestimmung des Strontiumisotopenverhältnisses mittels Thermoionisationsmassenspektrometer eine aufwendige Probenvorbereitung in einem Reinlabor nötig. Nach der Trocknung der Probe muss diese zunächst verascht werden. Anschließend muss die Asche über mehrere chemische und mechanische Schritte aufgeschlossen und gereinigt werden. Der so erhaltene getrocknete Rückstand wird schließlich nach Aufnahme durch ein Lösungsmittel auf einen Metallfaden (Filament) aufgebracht und bei Temperaturen von über $1200\text{ }^\circ\text{C}$ teilweise verdampft und ionisiert und anschließend bezüglich des Verhältnisses $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ mit Hilfe eines Stabilisotopenmassenspektrometers analysiert.

2.3.4.3 Site-specific Natural Isotope Fractionation–Nuclear Magnetic Resonance (SNIF–NMR[®])

Die Kernresonanzspektroskopie wird in der Stabilisotopenanalytik für die stellungsspezifische Bestimmung des Wasserstoffisotopenverhältnisses an der Methyl- bzw.

der Methylengruppe ((D/H)_I bzw. (D/H)_{II}) des Ethanolmoleküls angewandt (87). Die Atomkerne zahlreicher Atome besitzen einen bestimmten Eigendrehimpuls (Spin), der ein magnetisches Moment μ induziert. Dadurch besitzt dieser Atomkern die Eigenschaft eines Stabmagneten und richtet sich folglich in einem äußeren Magnetfeld aus. Diese Ausrichtung lässt sich durch eine pulsartige Einstrahlung einer für das Atom typischen Energiemenge (Energiequant), die proportional zur Anzahl der absorbierenden Atomkerne einer Probe ist, umkehren. Aus der Gesamtenergie, die die Probe nach der Einstrahlung wieder emittiert, lässt sich schließlich im Fall der ²H-NMR die Gesamtanzahl der Deuteriumisotope der Methyl- bzw. Methylengruppe der Ethanolmoleküle ermitteln (87).

Voraussetzung für die Berechnung der D/H-Verhältnisse ist eine exakte Bestimmung des Ethanolgehalts (t_m) der für die NMR-Messung eingewogenen Probe. Dieser wird nach Formel 4 (88) über die Massenkonzentrationen des sich in der Probe befindlichen Wassers (c_w) und der flüchtigen Verbindungen (c_v) berechnet, deren chemische Verschiebung (87) von der des Ethanols abweicht. Zu diesen Verbindungen zählen beispielsweise Acetaldehyd, Methanol, 2-Methyl-1-propanol und die Isoamylalkohole 2-Methyl-1-butanol und 3-Methyl-1-butanol. Da die NMR-Signale von Verbindungen, die die gleiche chemische Verschiebung aufweisen wie Ethanol, nicht von dessen Signalen getrennt werden können, werden diese in Formel 4 nicht berücksichtigt. Beispiele für derartige, in Spirituosen vorkommende Verbindungen sind Diethoxyethan oder Ethylacetat (10).

Formel 4: Berechnung des Ethanolgehalts (88)

$$t_m[\%-\text{mas.}] = 100 - c_w[\%-\text{mas.}] - c_v[\%-\text{mas.}]$$

t_m : Ethanolgehalt; c_w : Wassergehalt; c_v : Gehalt an flüchtigen Verbindungen

Die beschriebene Korrektur wurde in dieser Arbeit für Methanolkonzentrationen ab 0,25 %-vol. und Konzentrationen der höheren Alkohole von über 500 mg/100 ml A. durchgeführt (89). Die quantitative Bestimmung der genannten Verbindungen erfolgte im Rahmen der allgemeinen chemisch-analytischen Routineuntersuchungen der Proben mittels Gaschromatographie.

2.4 Statistische Grundlagen

2.4.1 Wiederholstandardabweichung und Wiederholgrenze

Die Wiederholstandardabweichung ist definiert als Maß für die Streuung der Messergebnisse, die unter Wiederholbedingungen ermittelt wurden, d.h. vom selben Benutzer unter identischen Messbedingungen an einer Probe. Für die praktische Anwendung in der Routineanalytik ist es jedoch zweckmäßig, eine kritische Differenz zweier Messergebnisse unter Wiederholbedingungen anzugeben.

Allgemein berechnet sich die Standardabweichung einer resultierenden Größe aus n unabhängigen Messungen mit der Einzelstandardabweichung σ zu $\sigma \cdot \sqrt{n}$. Somit hat die Wiederholstandardabweichung, die aus der zweifachen Messung einer Messgröße resultiert, den Wert $\sigma \cdot \sqrt{2}$. Die maximale Differenz, die zwischen diesen beiden Messwerten zu erwarten ist, die so genannte Wiederholgrenze r , ist f -mal so groß, wobei f der kritische Spannweitenfaktor ist. Dieser Faktor ist abhängig von der zugrunde gelegten Verteilung der Messgrößen, die im Falle der hier angewandten Analytik als normalverteilt angenommen werden kann, und dem der Wiederholgrenze zugeordneten Wahrscheinlichkeitsniveau. Für ein entsprechendes Niveau von 95 % ergibt sich für f ein Wert von 1,96. Somit erhält man für die Berechnung der Wiederholgrenze, innerhalb der zwei Messergebnisse unter Wiederholbedingungen liegen müssen, Formel 5 (90).

Formel 5: Berechnung der Wiederholgrenze r (90)

$$r = 1,96 \cdot \sigma \cdot \sqrt{2}$$

σ : Standardabweichung

Die Einzelstandardabweichung σ in Formel 5 wird in der Praxis durch eine 10-fach-Analyse einer Standardprobe unter Wiederholbedingungen ermittelt (89).

2.4.2 Lineare Diskriminanzanalyse

2.4.2.1 Erstellen der Diskriminanzfunktionen

Abbildung 7 zeigt beispielhaft ein Streudiagramm zweier Messgrößen von Vertretern zweier Gruppen (Δ und \bullet) mit den jeweiligen Häufigkeitsverteilungen der beiden Messgrößen.

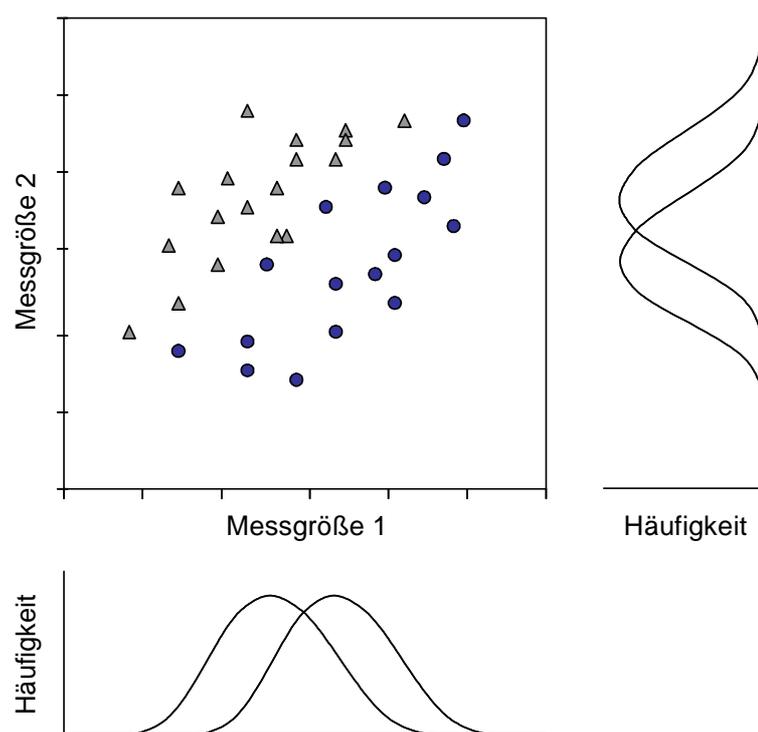


Abbildung 7: Häufigkeitsverteilungen von Messwerten

Aus Abbildung 7 wird ersichtlich, dass keine der beiden Messgrößen allein zur Trennung der Proben bezüglich ihrer Gruppenzugehörigkeit geeignet ist.

Eine bessere Trennkraft verspricht jedoch die Projektion aller Messpunkte auf eine neue Achse Z mit der Vorgabe einer möglichst geringen Überschneidung der Häufigkeitsverteilungen der resultierenden Diskriminanzwerte, wie es Abbildung 8 zeigt (91).

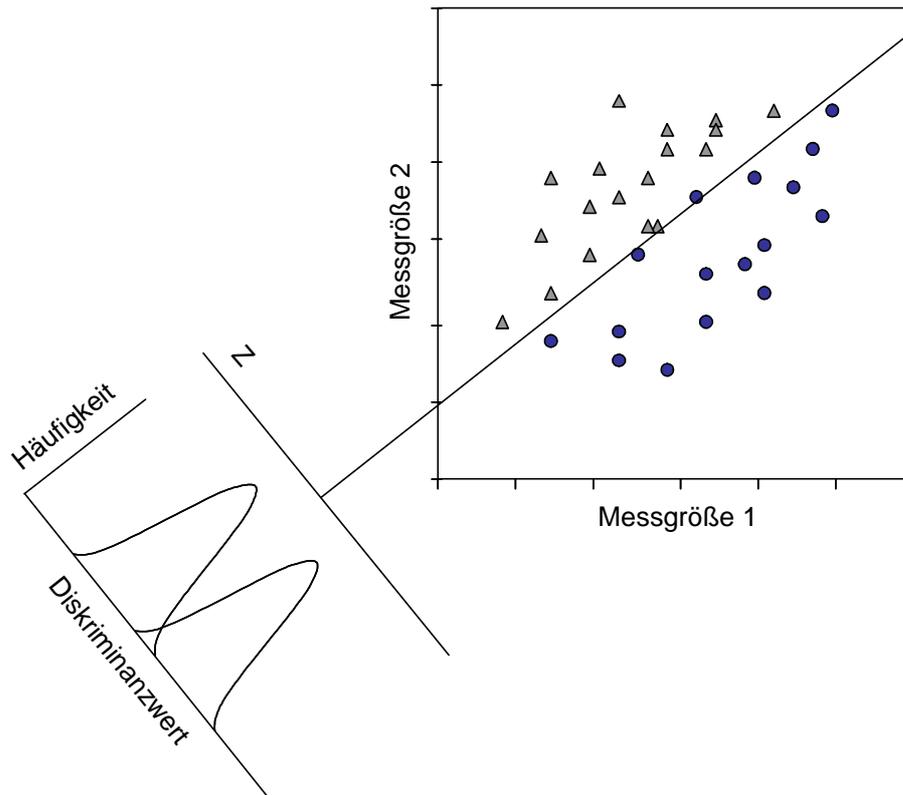


Abbildung 8: Häufigkeitsverteilung der Diskriminanzwerte

Mathematisch lässt sich diese Projektion durch eine lineare Kombination beider Messgrößen jeder Probe mittels der so genannten Diskriminanzfunktion gemäß Formel 6 durchführen (92).

Formel 6: Allgemeine Darstellung einer Diskriminanzfunktion auf Basis zweier Messgrößen

$$D = k_0 + k_1 \cdot \text{Messgröße 1} + k_2 \cdot \text{Messgröße 2}$$

k_i : Diskriminanzkoeffizient

Die Diskriminanzkoeffizienten k_i müssen so gewählt werden, dass die Streuung zwischen den beiden Gruppen (S_A) einen maximalen und jene innerhalb der Gruppen (S_i) einen minimalen Betrag annehmen (93). Eine Größe, die die Güte der Trennung bezüglich der Gruppenzugehörigkeit der einzelnen Proben beschreibt, ist das so genannte Diskriminanzkriterium Γ , der Quotient aus S_i und S_A . Diese beiden Quotienten lassen sich wiederum aus den Abständen der einzelnen Diskriminanzwerte einer Gruppe vom mittleren Diskriminanzwert dieser Gruppe (Centroid) und den beiden Centroiden voneinander ermitteln (93). Der maximale Betrag, den Γ anneh-

men kann, wird Eigenwert genannt und ist ein Maß für die Trennkraft der berechneten Diskriminanzfunktion. Je höher dieser Eigenwert ist, desto geringer ist die Streuung innerhalb einer Gruppe im Vergleich zur Streuung zwischen den Gruppen. Somit ist ein hoher Eigenwert gleichbedeutend mit einer hohen Trennkraft der zugehörigen Diskriminanzfunktion und einer entsprechend hohen Trennung der Proben bezüglich ihrer Gruppenzugehörigkeit (93). Eine weitere Verbesserung der Trennkraft ist durch die Aufnahme weiterer Messgrößen in die Diskriminanzfunktion zu erzielen, wodurch Formel 6 durch weitere Messgrößen und deren zugehörige Koeffizienten ergänzt wird. Besteht die Gesamtheit der Proben aus Vertretern, die sich in mehr als zwei Gruppen (G) aufteilen lassen, so ergeben sich $G-1$ Diskriminanzfunktionen, wobei die Koeffizienten einer jeden Funktion so gewählt werden, dass sie einen maximalen Anteil derjenigen Streuung erklären, die nach Berechnung der vorangegangenen Diskriminanzfunktion verbleibt (91). Da der Eigenwert und somit die Trennkraft einer jeden weiteren Funktion in der Regel sehr schnell abnimmt, genügt in den meisten Anwendungsfällen die grafische Darstellung der ersten beiden Diskriminanzfunktionen, wodurch eine anschauliche Trennung möglich wird (91). Beispielhaft zeigt dies Abbildung 9.

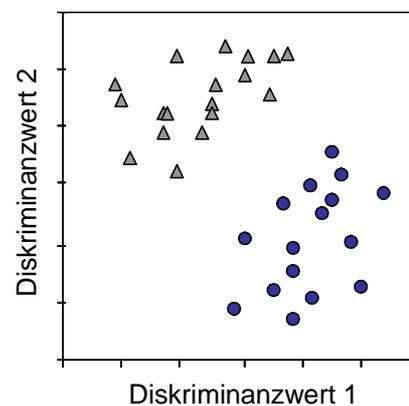


Abbildung 9: Graphische Darstellung zweier Diskriminanzfunktionen

Die Hauptaufgabe der Diskriminanzanalyse ist jedoch neben der Trennung von Proben bezüglich einer Gruppenzugehörigkeit die Zuordnung von Proben unbekannter Gruppenzugehörigkeit zu einer dieser Gruppen. Grundlage für eine derartige Zuordnung ist die Ermittlung von Diskriminanzfunktionen auf Basis von Messwerten

authentischer Proben, deren Gruppenzugehörigkeit bekannt ist. Ein anschließender Vergleich der Diskriminanzwerte, die sich für eine unbekannte Probe aus den entsprechenden Messwerten in Verbindung mit den jeweiligen Diskriminanzkoeffizienten nach Formel 6 ergeben, ermöglicht eine Zuordnung dieser Probe zu einer der Gruppen. Diese basiert auf dem so genannten Mahalanobisabstand, ein Maß für die Distanz zwischen der unbekannt Probe und dem Centroid der jeweiligen Gruppen, welches zusätzlich die Korrelation der Variablen untereinander berücksichtigt. Eine Zuordnung der unbekannt Probe erfolgt schließlich zu der Gruppe, deren Centroid den geringsten Abstand zur Probe aufweist (93,94).

2.4.2.2 Beurteilung der Trennkraft der Diskriminanzfunktionen

Während durch den Betrag des Eigenwerts lediglich ein qualitativer Unterschied zwischen zwei Diskriminanzfunktion ermittelt werden kann, stellt die Angabe einer so genannten Klassifikationsfehlerrate ein quantitatives Gütemaß zur Beurteilung des gesamten berechneten Diskriminanzmodells dar (93). Die einfachste Berechnung einer solchen Fehlerrate stellt die rückwirkende Gruppenzuordnung aller ursprünglichen Lernobjekte auf Basis der ermittelten Diskriminanzfunktionen dar. Da jedoch in diesem Fall alle Testobjekte als Grundlage für die Berechnung des Diskriminanzmodells dienten, liefert diese als Resubstitution bezeichnete Methode häufig Ergebnisse, die eine zu hohe Einschätzung der tatsächlichen Trennkraft bewirken können (93).

Eine verlässlichere Beurteilung der Trennkraft berechneter Diskriminanzfunktionen ermöglicht die Leave-one-out Methode, die auch als Kreuzvalidierung bezeichnet wird (93,94). Die Berechnung einer Fehlklassifikationsrate erfolgt im Rahmen dieser Methode aus der Vielzahl neuer Diskriminanzfunktionen auf Basis des Lerndatensatzes, wobei jeweils eine der Lernproben unberücksichtigt bleibt. Diese Probe kann anschließend als Blindprobe durch das Diskriminanzmodell einer Gruppe zugeordnet werden. Da die wahre Gruppenzugehörigkeit bekannt ist, kann daraus eine aussagekräftige Fehlklassifikationsrate ermittelt werden. Zwar treten leichte Variationen in den Koeffizienten der einzelnen Diskriminanzfunktionen durch die variierenden Lernobjekte auf. Diese sind bei ausreichender Probenanzahl jedoch nicht signifikant, so dass alle Diskriminanzfunktionen vergleichbar sind (93).

3 Material und Methoden

3.1 Untersuchungsmaterial

3.1.1 Authentische Proben

3.1.1.1 Herkunft der authentischen Proben

Insgesamt standen 33 Proben (je 1 kg) unvergorener Kirschen und 22 vergorene Kirschmaischen (je 10 kg) aus dem Jahrgang 2003, sowie 41 unvergorene Kirschproben und 15 vergorenen Kirschmaischen der Ernte 2004 zur Verfügung. Des Weiteren wurden 29 authentische Kirschdestillate (Jahrgang 2003) sowie 31 Kirsch- und 13 Zwetschgenwässer des Jahrgangs 2004 analysiert.

Abbildung 10 zeigt die Standorte der Kirsch- und Zwetschgenbäume der drei Hauptanbaugebiete der Jahrgänge 2003 und 2004. Die durch die Alkoholhaltige Getränke-Verordnung festgelegten Grenzen für die Regionen Franken und Schwarzwald (2) sind hervorgehoben.

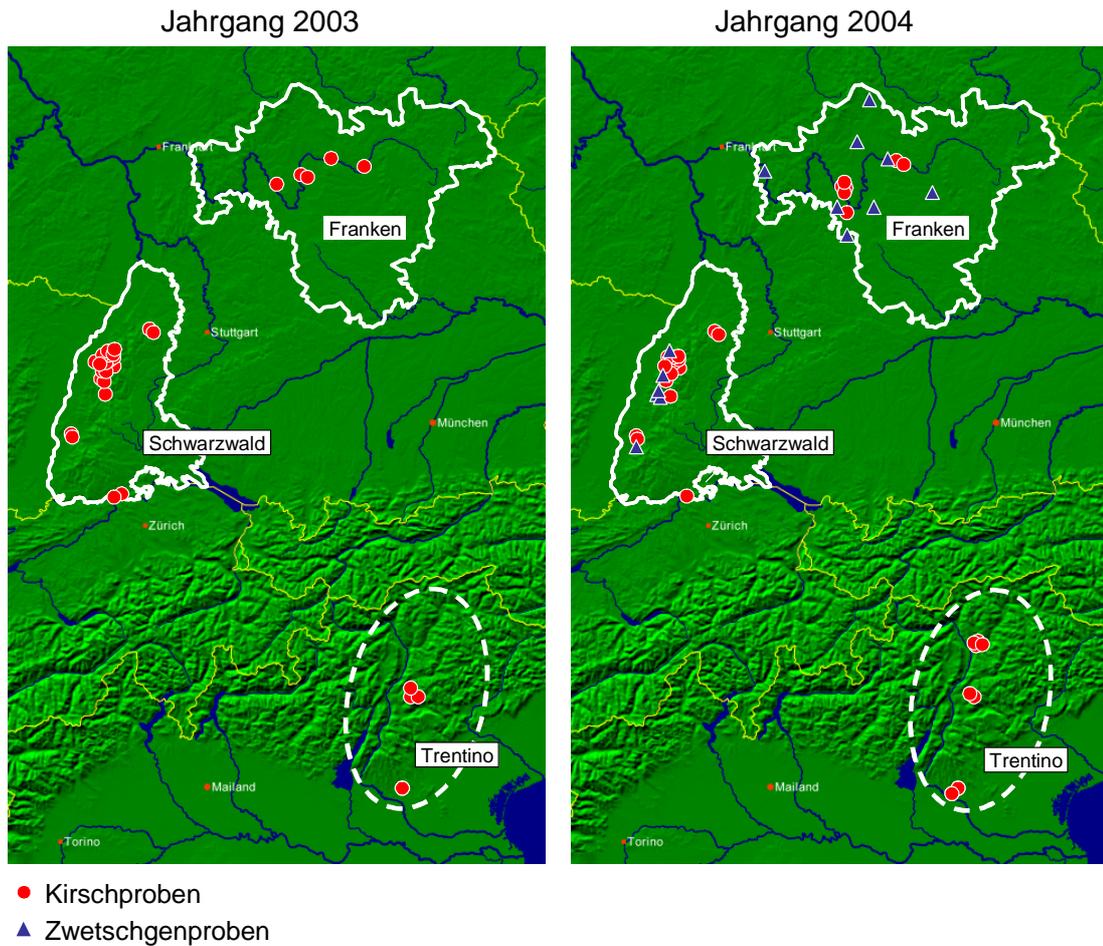


Abbildung 10: Herkunft der Kirsch- und Zwetschgenproben

Neben Proben aus dem Schwarzwald, Franken und Norditalien wurden auch Muster (Rohfrüchte und/oder Destillate) aus den Gebieten nordöstlich des Bodensees, aus dem nordöstlichen Teil Baden-Württembergs, jeweils ein Muster aus der Pfalz und der Türkei sowie unvergorene Kirschen aus Serbien und Mazedonien analysiert. Art und Anzahl der jeweiligen Muster sind Tabelle 5 bis Tabelle 8 (siehe 4.1) zu entnehmen.

3.1.1.2 Klimatische Charakterisierung der Regionen Schwarzwald, Franken und Trentino

Während die Unterscheidung verschiedener Rohstoffe vor allem auf den Isotopenfraktionierungen im Verlauf unterschiedlicher Stoffwechselwege beruht, bildet die Abhängigkeit der Stabilisotopenverhältnisse von geologischen und vor allem klimati-

schen Bedingungen am Wachstumsort die Basis für den Nachweis der geographischen Herkunft eines Lebensmittels (siehe 2.3.1.3).

Der folgende Abschnitt gibt einen Überblick über Höchsttemperatur und Niederschlagsmengen der Regionen Schwarzwald, Franken und Trentino, aus denen der Großteil der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Proben stammte. Diese Daten bilden anschließend die Grundlage der Diskussion gemessener Stabilisotopenverhältnisse bezüglich ihrer Verwendung für einen Herkunftsnachweis.

Aufgetragen sind jeweils die Temperatur- und Niederschlagsverteilungen im mehrjährigen Mittel (aufgezeichnet über 10 Jahre), sowie die der untersuchten Jahrgänge 2003 und 2004. Exemplarisch wurden hierfür die Daten von Freiburg für die Region Schwarzwald ausgewählt. Die Region Franken wird durch die Werte von Würzburg, das Trentino durch die Klimadaten von Bozen charakterisiert.

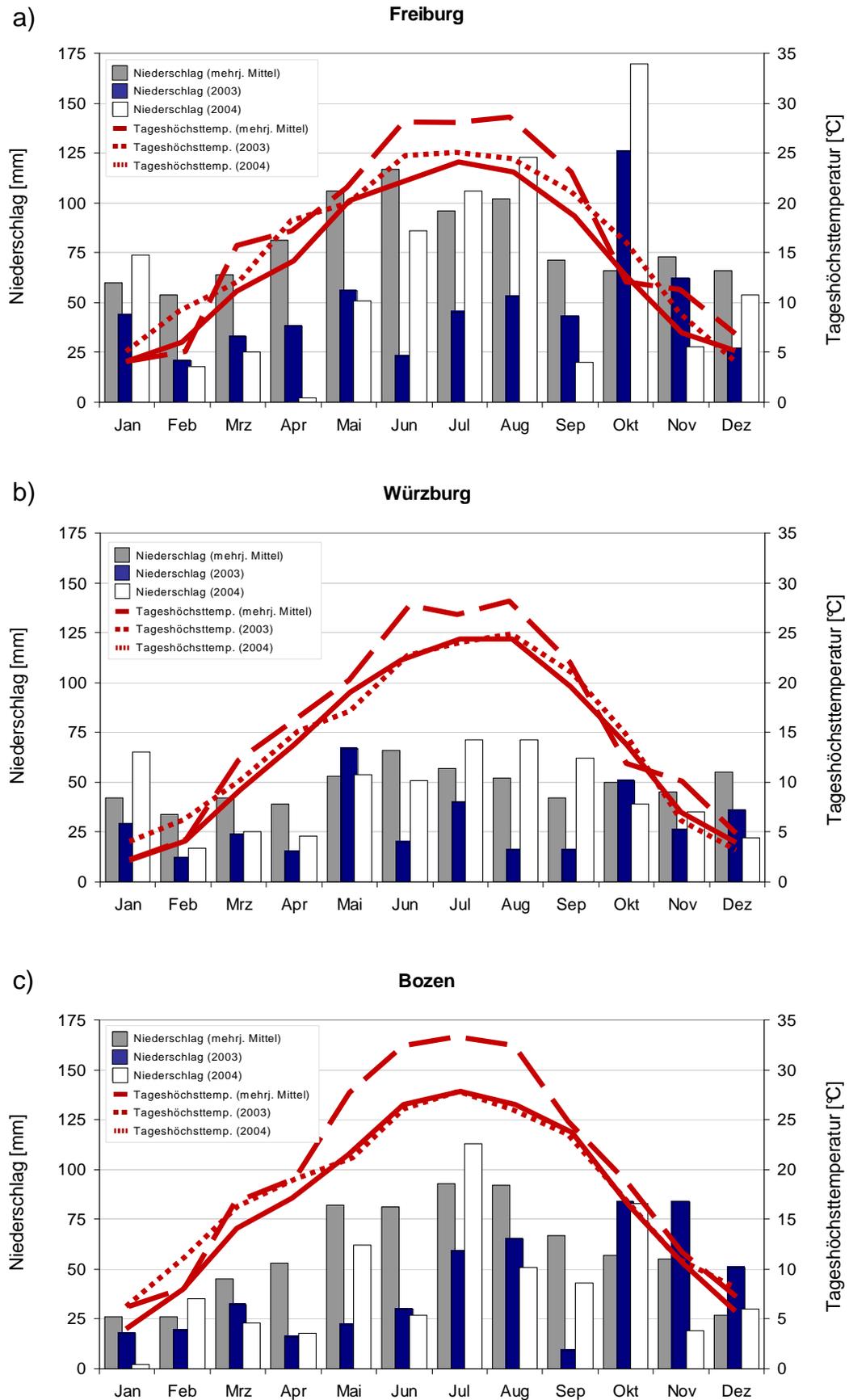


Abbildung 11: Klimadiagramme von a) Freiburg b) Würzburg und c) Bozen (95,96)

Aus dem Vergleich der Klimadiagramme der drei Regionen ergeben sich zwei für die Interpretation gemessener Isotopenverhältnisse entscheidende regionale und jahrgangsabhängige Unterschiede in den Temperaturverläufen. Zum einen zeigt sich, dass die Region Trentino im mehrjährigen Mittel in den für die Kirschenreife relevanten Monaten Mai bis Juni um durchschnittlich 4 °C höhere Tageshöchsttemperaturen aufweist als die Gebiete nördlich der Alpen. Zum anderen spiegelt sich in den Temperaturverläufen der einzelnen Regionen die europaweite Ausnahmestellung des Sommers 2003 wider. So lagen die Tageshöchsttemperaturen in den genannten Monaten dieses Jahres in den Regionen Schwarzwald und Franken um bis zu 5°C, in Bozen sogar um bis zu 7°C über denen der langjährigen Mittel. Im Gegensatz dazu kam es in den Monaten Mai und Juni des Jahres 2004 nur zu geringen Temperaturabweichungen von den jeweiligen 10-jährigen Mittelwerten, wodurch die Ergebnisse der Proben aus dem Jahrgang 2004 als typisch für die entsprechenden Regionen angesehen werden können.

Weniger systematisch ausgeprägt sind die jahrgangs- und regionalbedingten Unterschiede der Niederschlagsmengen. Zwar sind auch hier die Auswirkungen der anhaltenden Hochdrucklage über Mitteleuropa besonders an den Werten der Regionen Schwarzwald und Norditalien der Monate April und Mai des Sommers 2003 zu erkennen. Der Standort Würzburg (Franken) weist im Monat Mai jedoch eine höhere Niederschlagsmenge auf als im langjährigen Mittel, wobei der folgende Monat wieder durch ein sehr trockenes Klima gekennzeichnet ist. Auch die entsprechenden Messwerte der genannten Monate des Jahres 2004 zeigen größtenteils geringere Niederschlagsmengen als im mehrjährigen Mittel, so dass bezüglich dieses Kriteriums nicht von einem Durchschnittsjahrgang ausgegangen werden kann.

Während die Temperaturverläufe einzelner Messstationen jedoch als durchaus charakteristisch für eine größere Region angesehen werden können, spiegelt die Niederschlagsverteilung meist ausschließlich die entsprechenden Bedingungen der jeweiligen Messstation wider, wodurch eine Übertragung dieser Werte auf eine gesamte Region nicht zweckmäßig erscheint. Da Isotopenverhältnisse in einer Frucht jedoch durch die tatsächliche Niederschlagsmenge am Anbauort beeinflusst werden, lassen sich somit auch aus der Bildung von durchschnittlichen Niederschlagsmengen aus mehreren Wetterstationen einer Region keine zuverlässigen

Rückschlüsse ziehen. Bei auffälligen Anomalien der Isotopenverhältnisse einer Probe muss deshalb die Niederschlagsmenge des genauen Wachstumsstandorts verfügbar sein, um Abweichungen interpretieren zu können. Darüber hinaus hat neben der Niederschlagsmenge das Wasserspeichervolumen von grundwasserfernen Böden einen Einfluss auf die der Pflanze tatsächlich zur Verfügung stehende Wassermenge. Systematische Untersuchungen der Beeinflussung von Stabilisotopenverhältnissen durch die resultierende Wasserversorgung über Boden oder Grundwasser liegen jedoch noch nicht vor.

3.1.1.3 Geologische Charakterisierung der Regionen Schwarzwald, Franken und Trentino

Während die untersuchten Kohlenstoff-, Wasserstoff- und Sauerstoffisotopenverhältnisse besonders von der Art des Pflanzenstoffwechsels und den klimatischen Bedingungen am Standort der Pflanze beeinflusst werden, hängen die Strontiumisotopenverhältnisse sowie die $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ -Werte der analysierten Maischeprobe hauptsächlich von der Zusammensetzung des Bodens am jeweiligen Standort ab (3,30). Der folgende Abschnitt gibt einen kurzen Überblick über Aufbau und Alter der Gesteinsschichten der Anbauggebiete Schwarzwald, Franken und Norditalien.

Schwarzwald

Der Schwarzwald setzt sich zusammen aus variszischem Grundgebirge, das von mesozoischen Sedimenten überlagert wird. Das Grundgebirge ist in der Gegend um Freiburg aufgeschlossen, die von (früh-)variszischen (Devon-Perm) Paragneisen und Graniten, sowie vereinzelt auftretenden Quarzporphyren aus dem oberen Perm geprägt ist. Diese Kristallinvorkommen werden überlagert von terrestrischen und marinen Sedimenten aus der Trias, die stellenweise von kleinen devonischen und permischen Sedimentvorkommen durchsetzt sind. Der Schwarzwald wird nach Westen durch den Abbruch zum Oberrheingraben scharf abgegrenzt, nach Osten ist der Übergang in die Schwäbische Alb fließend (97).

Franken

Die Geologie von Unter-, Mittel- und Oberfranken wird dominiert vom fränkischen Schichtstufenland. Die Landschaft wird geprägt von mesozoischen Sedimentgesteinen wobei es sich hauptsächlich um Ablagerungen aus der Trias und dem Jura und am südöstlichen Rand der fränkischen Alb aus der Kreide handelt. Die Abfolge beginnt im Nordwesten Frankens mit den ältesten Schichten aus dem Buntsandstein (untere Trias) und wird nach Südosten bis zur Donau stetig jünger. Die jüngsten Schichten stammen aus dem oberen Jura (Malm). Es handelt sich um kontinentale und marine Ablagerungen des Germanischen Beckens, d.h. die Gesteinszusammensetzung zeigt einen Wechsel von toniger, sandiger und karbonatischer Fazies (98).

Norditalien

Von Meran bis zum Südende des Gardasees sind mesozoische Sedimente, d.h. vorwiegend Kalke und Dolomite von der Trias bis zur Jura aufgeschlossen. Östlich davon sind zwischen Bozen und Meran großflächig saure Magmatite (Granite, „Bozener Quarzporphyr“) aus der variszischen Orogenese vorzufinden. Südlich von Trient werden diese ebenfalls von karbonatischen Sedimenten des Mesozoikums überlagert. Das Etschtal selber ist auf einer Breite von wenigen Kilometern westlich und östlich des Flusses mit fluviatilen Ablagerungen verfüllt. Nach Jungmoränenablagerungen (Weichsel/Würm-Eiszeit) am Südufer des Gardasees prägen die monotonen pleistozänen und holozänen Flussablagerungen der Poebene das Landschaftsbild (99).

3.1.2 Selbst hergestellte Destillate

In der Versuchs- und Lehrbrennerei Weihenstephan wurden insgesamt ca. 2850 kg Kirschen aus Achern/Mösbach (Schwarzwald) der Jahrgänge 2003 (1300 kg) und 2004 (1550 kg) vergoren und anschließend destilliert. Die selbst hergestellten Destillate umfassen je 22 Vor-, Mittel- und Nachläufe, 3 Rauhbrände sowie 291 Teilfraktionen (à 500 ml) aus 6 fraktionierten Destillationsverläufen. Von ausgewählten authentischen vergorenen Kirschmaischeproben wurden am Lehrstuhl für Allgemeine Lebensmitteltechnologie mittels Labordestillationsanlage 18 Destillate (Vor-,

Mittel- und Nachlauf) hergestellt. Zusätzlich wurden 38 Destillatfraktionen (à 100 ml) durch die Destillation von Ethanol-Wasser Mischungen gewonnen.

3.2 Herstellungsbedingungen eigener Destillate

Zur Beurteilung technologischer Verfahrensschritte auf die Isotopensignaturen eines Steinobstdestillates wurden in der Versuchs- und Lehrbrennerei Weihenstephan ca. 2850 kg Kirschen mit teilweise unterschiedlichen Hefestämmen vergoren und unter Variation der Destillationsbedingungen destilliert.

3.2.1 Einmischbedingungen

Insgesamt wurden 22 Chargen (jeweils 130 kg) Kirschmaische mit Hilfe von Schwefelsäure auf einen pH-Wert von 3,0 eingestellt und in Plastikfässern nach Zusatz von 6 verschiedenen Hefestämmen (15 g/100 kg Maische) vergoren. Die Einmisch- und Lagerbedingungen sind Tabelle 4 zu entnehmen.

Tabelle 4: Einmisch- und Lagerbedingungen der Kirschmaischen

Charge	Einmisch- datum	Hefestamm	Gärtemp. [°C]	Gärende	Lagertemp. [°C]	Destillations- datum	Destillationsart ^{a)}
1	01.07.03	Uvaferm CM	18	10.07.03	7	09.09.03	Aufteilung in VL,ML,NL
2	01.07.03	Uvaferm CM	18	10.07.03	7	09.09.03	Rauhbrand
3	01.07.03	Uvaferm CM	18	10.07.03	7	10.09.03	Rauhbrand
4	01.07.03	Uvaferm CM	18	10.07.03	7	10.09.03	Rauhbrand
5	01.07.03	Uvaferm CM	18	10.07.03	7	12.09.03	fraktioniert
6	01.07.03	Uvaferm CM	18	10.07.03	7	15.09.03	fraktioniert
7	01.07.03	Uvaferm CM	18	10.07.03	7	15.09.03	Aufteilung in VL,ML,NL
8	01.07.03	Uvaferm CM	18	10.07.03	7	16.09.03	fraktioniert
9	01.07.03	Uvaferm CM	18	10.07.03	7	11.09.03	Aufteilung in VL,ML,NL
10	01.07.03	Uvaferm CM	18	10.07.03	7	11.09.03	fraktioniert
11	13.07.04	Uvaferm CM	18	24.07.04	7	06.10.04	Aufteilung in VL,ML,NL
12	13.07.04	Uvaferm CM	18	24.07.04	7	06.10.04	fraktioniert
13	13.07.04	Uvaferm CEG	18	24.07.04	7	07.10.04	Aufteilung in VL,ML,NL
14	13.07.04	Uvaferm CEG	18	24.07.04	7	07.10.04	Aufteilung in VL,ML,NL
15	13.07.04	Uvaferm CGC 62	18	24.07.04	7	11.10.04	Aufteilung in VL,ML,NL
16	13.07.04	Uvaferm CGC 62	18	24.07.04	7	11.10.04	Aufteilung in VL,ML,NL
17	13.07.04	Spiriform	18	24.07.04	7	12.10.04	Aufteilung in VL,ML,NL
18	13.07.04	Spiriform	18	24.07.04	7	12.10.04	Aufteilung in VL,ML,NL
19	13.07.04	Spiriform Classic	18	24.07.04	7	13.10.04	Aufteilung in VL,ML,NL
20	13.07.04	Spiriform Classic	18	24.07.04	7	13.10.04	Aufteilung in VL,ML,NL
21	13.07.04	SIHA Brennereihefe Nr. 6	18	24.07.04	7	14.10.04	Aufteilung in VL,ML,NL
22	13.07.04	SIHA Brennereihefe Nr. 6	18	24.07.04	7	14.10.04	Aufteilung in VL,ML,NL

^{a)} siehe 3.2.2.1; VL: Vorlauf; ML: Mittellauf; NL: Nachlauf

3.2.2 Destillationsbedingungen

Um den Einfluss des Destillationsschritts auf die Stabilisotopenverhältnisse im Destillat zu untersuchen, wurden die vergorenen Kirschmaischen mittels Pilotanlage und ausgewählte authentische Kirschmaischen sowie Ethanol-Wasser Mischungen mit Hilfe der Laboranlage unter definierten Bedingungen destilliert.

3.2.2.1 Pilotanlage

Die Destillationen der vergorenen Kirschmaischen wurden in der Versuchs- und Lehrbrennerei Weihenstephan mit Hilfe eines praxisüblichen Abfindungsbrenngeräts der Firma Arnold Holstein durchgeführt. Dies ist ähnlich Abbildung 2 (siehe 2.1.2) mit drei Glockenböden, einem Feinbrenndephlegmator sowie einem Rührwerk für die Destillation besonders dickflüssiger Maischen ausgestattet.

Die Destillationen, bei denen das Destillat, wie in der Praxis üblich, in Vor-, Mittel- und Nachlauf getrennt wurde, fanden unter folgenden Geräteeinstellungen statt:

- Destillationsverfahren: Feinbrand aus Maische (130 kg pro Destillation)
- Anzahl der aktivierten Böden: zwei
- Vorlaufabtrennung: 1,3 l (1 % des Maischevolumens)
- Ethanolgehalt beim Umschalten auf Nachlauf: 60 %-vol.
- Ende der Destillation bei einem Ethanolgehalt von: 10 %-vol.
- Verwendung von Vor- und Nachläufen: keine
- Dephlegmator: $\frac{1}{3}$ gefüllt

Während der Destillation von fünf Chargen der vergorenen Kirschmaische wurde das Destillat in 500 ml-Fractionen aufgeteilt, um Konzentrationsänderungen der analysierten Inhaltsstoffe sowie Änderungen der relevanten Stabilisotopenverhältnisse im Verlauf der Destillation verfolgen und charakterisieren zu können.

Des Weiteren sollte der Einfluss der Destillationstechnik überprüft werden. Hierzu wurden aus drei Chargen vergorener Kirschmaische Rauhbrände ohne Einsatz von Dephlegmator und Glockenböden und ohne Abtrennung von Vorlauf- und Nachlauf (Destillationsende: 5 %-vol.) hergestellt. Diese wurden anschließend vereint und erneut ohne Einsatz von Verstärkereinrichtungen destilliert (Feinbrand aus Rauhbrand). Hierbei wurde wie bei der einmaligen Destillation üblich 1 % der Aus-

gangsmenge als Vorlauf abgetrennt. Der Wechsel von Mittel- auf Nachlauf erfolgte bei 60 %-vol. in der Vorlage.

3.2.2.2 Laboranlage

Die Laboranlage verfügt analog zur Pilotanlage über drei Glockenböden, einen Feinbrenndephlegmator sowie ein elektrisch angetriebenes Rührwerk. Die Destillationen der Kirschmaischen fanden unter folgenden Bedingungen statt:

- o Destillationsverfahren: Feinbrand aus Maische (5 l pro Destillation)
- o Anzahl der aktivierten Böden: zwei
- o Vorlaufabtrennung: 50 ml (1 % des Maischevolumens)
- o Ethanolgehalt beim Umschalten auf Nachlauf: 60 %-vol.
- o Ende der Destillation bei einem Ethanolgehalt von: 10 %-vol.
- o Verwendung von Vor- und Nachläufen: keine
- o Dephlegmator: $\frac{1}{3}$ gefüllt

Bei der Destillation der Ethanol-Wasser Mischungen wurde der Einsatz von Glockenböden und Dephlegmator variiert sowie das Destillat in 100 ml Fraktionen aufgefangen.

3.3 Geräte

Pilotdestillationsanlage (130 l Nutzvolumen, Arnold Holstein GmbH, Markdorf), Labordestillationsanlage (6,0 l Nutzvolumen, Arnold Holstein GmbH, Markdorf), Gaschromatograph mit FID und splitless Injektor (HP 5890) mit gepackter CB-Säule, Gaschromatographen Agilent Technologies mit FID und split/splitless Injektor (6890 N) mit FFAP/SE- Kapillarsäulen, Einspritzautomaten Agilent 6890, Massenspektrometer (HP 5973), multidimensionalem Gaschromatographiesystem (Gerstel MCS), Elementaranalysator Vario EL III (Elementar Analysensysteme GmbH, Hanau), IRMS Massenspektrometer AP 2003 (GVI Instruments Ltd. Manchester, UK), IRMS Massenspektrometer Finnigan delta S (Finnigan Corporation, San Jose, USA), Varian Gaschromatograph (GC) (Varian Inc. Corporate, Palo Alto, USA) mit Poraplot U Kapillarsäule, IRMS Massenspektrometer Finnigan Delta XL mit high temperature pyrolysis unit (Thermo Instruments GmbH, Dortmund),

Massenspektrometer Finnigan MAT 261 TIMS, ^2H -Kernspinresonanzspektrometer Bruker AMX 400 (Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten) mit selektivem Deuterium-Probenkopf, Protonenentkopplungskanals sowie einem ^{19}F -Locksystem, Bullo-Destillationskolonne, Biegeschwinger (Anton Paar Density Meter DMA 4500), Handbiegeschwinger (Anton Paar Density Meter DMA 35N), geeichte Analysenwaage (Ablesegenauigkeit 0,001 g), Cyan EC-Test (Merck KGaA, Darmstadt, Messbereich 0,0–0,7 mg/l), Spectralphotometer Uvikon 941 (Kontron Instruments), UV-Kosmetikbräuner (Philips, Typ HP 3153/A), temperierbares Wasserbad (Einstellgenauigkeit $\pm 0,1$ °C), Pasteurpipetten, Faltenfilter (Schleicher und Schüll 595 $^{1/2}$, \varnothing 240 mm), Merck Spezialindikator (pH 2,0–9,0).

3.4 Analyse flüchtiger Verbindungen sowie von Ethylcarbamat

Um die authentischen sowie selbst hergestellten vergorenen Maischen und Destillate vor der eigentlichen Isotopenanalyse qualitativ beurteilen zu können, wurden neben der Bestimmung des Ethanolgehalts auch die Konzentrationen typischer flüchtiger Verbindungen mittels Gaschromatographie und Massenspektrometrie analysiert. Während die Destillate nach entsprechender Einstellung des Ethanolgehalts und der Zugabe des jeweiligen internen Standards direkt analysiert werden können, muss die vergorene Maische zu Beginn destilliert werden, um flüchtige und nichtflüchtige Verbindungen voneinander zu trennen.

3.4.1 Glaskolbendestillation der vergorenen Maischen

Destillationen der vergorenen Maischen wurden gemäß den in der Fachliteratur beschriebenen Bedingungen mit Hilfe einer Glaskolbendestillationsapparatur durchgeführt (16–18). Diese besteht aus einer Pilzheizhaube, einem 500 ml Rundkolben mit Glasschliff, einer Glasbrücke, einem Liebigkühler und einem Auffangbehälter (25- bzw. 50 ml Messkolben).

1. Destillation zur Bestimmung des Ethanolgehaltes

50 ml Maische werden mit 50 ml dest. Wasser verdünnt und in einen 50 ml-Messkolben überdestilliert. Der Ethanolgehalt wird mittels Biegeschwinger am Destillat bestimmt.

2. Destillation für die anschließende GC-Analyse

100 ml Maische werden in einen Rundkolben eingewogen. Anschließend wird entsprechend des zuvor bestimmten Ethanolgehalts der Maische Ethanol zugegeben, so dass die Maische einen Ethanolgehalt von 10 %-vol. aufweist. Nach Zugabe der entsprechenden Menge Inneren Standards und einiger Tropfen Antischaummittel wird der Kolbeninhalt auf 25 ml überdestilliert, so dass das Destillat einen Ethanolgehalt von 40 %-vol. besitzt und direkt gaschromatographisch analysiert werden kann.

3. Destillation der Eichlösung

Da bei der Glaskolbendestillation der vergorenen Maische nicht alle Verbindungen vollständig in das Destillat übergehen, muss eine Eichlösung analog zur Destillation der vergorenen Maische mittels Glaskolbendestillation destilliert werden. Das Destillat dient schließlich als Kalibrierlösung, wodurch ein Verlust bestimmter Inhaltsstoffe durch die Destillation egalisiert wird.

3.4.2 Ethanolbestimmung mittels Biegeschwinger

Im Destillat wird mittels Biegeschwinger die Dichte bestimmt und daraus der Ethanolgehalt errechnet. Extraktfreie Proben (Originaldestillate und Destillate der Pilotanlage) können ohne weitere Vorbereitung direkt mit dem Biegeschwinger analysiert werden.

Die vergorene Maische wird zur Bestimmung des Ethanolgehaltes zunächst mittels Glaskolbendestillation destilliert und der Ethanolgehalt des Destillats wie oben beschrieben bestimmt.

3.4.3 Gaschromatographische Analyse flüchtiger Verbindungen

Die Bestimmung der Konzentrationen typischer flüchtiger Verbindungen in vergorenen Kirsch- und Zwetschgenmaischen und daraus hergestellter Destillate erfolgte nach entsprechender Probenvorbereitung mittels Gaschromatographie.

3.4.3.1 Probenvorbereitung

Da die Retentionszeiten der einzelnen Substanzen abhängig vom Ethanolgehalt der Probe sind, müssen die Proben für die gaschromatographische Analyse auf den Ethanolgehalt der Eichlösung eingestellt werden. Diese weist einen Ethanolgehalt von 40,0 %–vol. auf, entsprechend dem typischen Wert eines Obstdestillates.

Wird Ethanol mit Wasser vermischt, tritt eine Volumenminderung ein. Diese wird als Kontraktion bezeichnet und muss beim Herabsetzen des Ethanolgehaltes berücksichtigt werden. Um die nötige Wassermenge zu ermitteln, stehen Kontraktionstabellen zur Verfügung (100). Diese beziehen sich auf eine Temperatur von 20 °C und geben an, wie viel Liter Wasser zu 100 Liter Branntwein beliebiger Stärke zuzusetzen ist, um einen gewünschten Ethanolgehalt zu erhalten.

Der Ethanolgehalt des Nachlaufs liegt in der Regel unter 40 %–vol. Dementsprechend wird dem Destillat reines Ethanol zugegeben, um den Gehalt auf 40 %–vol. zu erhöhen. Das Mischungsverhältnis von Nachlauf und Ethanol kann über das so genannte Mischungskreuz bestimmt werden, wobei die Kontraktion vernachlässigt wird (25).

30 ml der auf einen Ethanolgehalt von 40 %–vol. eingestellten und auf 20 °C temperierten Probe werden in einen 50ml Messkolben vorgelegt, 1,0 ml interner Standard (Pelargonsäuremethylester) dazu pipettiert und mit der Probe auf 50 ml aufgefüllt (22). 1 µl des Kolbeninhalts werden in den Gaschromatographen injiziert.

Zur Herstellung der Eichlösung werden 20 ml Ethanol–Wasser Mischung (40,0 %–vol.; 15 min auf 20 °C temperiert) in einen 50 ml Messkolben vorgelegt, 1 ml Stammlösung, die alle zu untersuchenden Inhaltsstoffe mit bekannten Konzentrationen, wie sie auch in den untersuchten Proben zu erwarten sind, beinhalten, sowie 1 ml Interner Standard (Pelargonsäuremethylester) zugesetzt und mit einer Ethanol–Wasser Mischung (40 %–vol.) auf 50 ml aufgefüllt (22).

Damit enthält die Eichlösung alle in den Proben zu untersuchenden Inhaltsstoffe, ausgenommen Acetaldehyd, Acrolein und 1,1–Diethoxyethan. Wegen der Instabilität dieser Verbindungen ist eine zusätzliche Eichlösung nötig. Die Eichlösungen werden unter den gleichen Bedingungen wie das zu untersuchende Destillat zur Injektion in den GC vorbereitet.

3.4.3.2 GC-Bedingungen

Die Bestimmung der flüchtigen Inhaltsstoffe erfolgte mit drei Gaschromatographen auf drei unterschiedlichen Trennsäulen:

Säule 1: Gepackte Glassäule 5 %-mas. Carbowax 20M auf Carbowax B 80/120 mesh

Abmessungen: Länge 2,5 m, Innendurchmesser 2,0 mm, Außendurchmesser $\frac{1}{4}$ Zoll

Trägergas: Stickstoff, nachgereinigt, ca. 25 ml/min

Brenngas: Wasserstoff, nachgereinigt, 35 ml/min

Luft: 250 ml/min

Temperaturen: Injektor 180 °C, Detektor 220 °C

Ofenprogramm: 2 min 80 °C isotherm, dann 10 °C/min bis 190 °C, Haltezeit: 7 min.

Injektionsmenge: 1 µl

Analysendauer: ca. 20 min

Säule 2: Fused Silica Crosslinked 5 % Phenyl Methyl Silicone (SE)

Abmessungen: Länge 50 m, Innendurchmesser 0,32 mm,

Filmdicke: 0,52 µm

Trägergas: Wasserstoff, nachgereinigt, 2,9 ml/min bei 92 kPa

Hilfsgas: Stickstoff, nachgereinigt, 25 ml/min

Brenngas: Wasserstoff, nachgereinigt, 30 ml/min

Luft: 400 ml/min

Temperaturen: Injektor 230 °C, Detektor 250 °C

Ofenprogramm: 4 min 50 °C isotherm, dann 12,5 °C/min bis 240 °C, Haltezeit: 10 min.

Injektionsmenge: 1 µl, mit einem Split von 1:5

Analysendauer: ca. 30 min

Säule 3: Fused Silica Crosslinked FFAP (HP 19095F-123)

Abmessungen: Länge 50 m, Innendurchmesser 0,32 mm,

Filmdicke: 0,50 µm

Trägergas:	Wasserstoff, nachgereinigt, 2,3 ml/min bei 77 kPa
Hilfsgas:	Stickstoff, nachgereinigt, 25 ml/min
Brenngas:	Wasserstoff, nachgereinigt, 30 ml/min
Luft:	400 ml/min
Temperaturen:	Injektor 230 °C, Detektor 250 °C
Ofenprogramm:	2 min 60 °C isotherm, dann 7,5 °C/min bis 230 °C, Haltezeit: 10 min.
Injektionsmenge:	1 µl, mit einem Split von 1:12,5
Analysendauer:	ca. 35 min

Die quantitative Auswertung erfolgt durch die Software GC ChemStation (22). Durch den Vergleich der Peakhöhen oder -flächen von Probe und Eichlösung werden die in der Probe enthaltenen Konzentrationen der jeweiligen Stoffe berechnet.

3.4.4 Massenspektrometrische Bestimmung der Ethylcarbamat- konzentration

3.4.4.1 Probenvorbereitung

Die Destillate werden, analog zur Probenvorbereitung für die gaschromatographische Analyse, auf einen Ethanolgehalt von 40 %-vol. herabgesetzt bzw. verstärkt.

Als Interner Standard für die Analyse im Massenspektrometer dient Propylcarbamat, welches der Probe in einer Konzentration von 10 mg/l zugegeben wird.

Die Eichlösung besteht aus einer Ethanol-Wasser Mischung (40,0 %-vol.) und einer bekannten Menge Ethylcarbamat (1000 µg/l) (22). Der Eichlösung wird analog der zu untersuchenden Probe die entsprechende Menge Interner Standard zugegeben.

3.4.4.2 MS-Bedingungen

Vorsäule MCS:	Fused Silica Crosslinked FFAP (HP 19095F-123)
Abmessungen:	Länge 25 m, Innendurchmesser 0,32 mm,
Filmdicke:	0,52 µm
Monitor:	FID (MCS)
Injektionsmenge:	1 µl
Trägergas:	Helium, ca. 2,0 ml/min

Hilfsgas:	Stickstoff, nachgereinigt, 20 ml/min
Brenngas:	Wasserstoff, nachgereinigt, 20 ml/min
Luft:	Lebensmittelreine Luft, 250 ml/min
Kaltaufgabesystem:	12 °C/min von 100 °C bis 220 °C, Rückkühlen nach 300 s
Temperaturen:	Detektor 250 °C, Transferleitung von MCS zu GC-MS 280 °C
Ofenprogramm:	Starttemperatur: 70 °C, dann 10,0 °C/min bis 220 °C
<u>Hauptsäule GC-MS:</u>	Fused Silica Crosslinked INNOWAX (HP 19091N-236)
Abmessungen:	Länge 50 m, Innendurchmesser 0,25 mm,
Filmdicke:	0,50 µm
Trägergas:	Helium, ca. 2,0 ml/min
Temperaturen:	Transferleitung zum MS 230 °C
Ofenprogramm:	5 min 70 °C isotherm, dann 10,0 °C/min bis 270 °C

Die Ethylcarbamatkonzentration kann mit einer relativen Standardabweichung von $\pm 0,8$ % bestimmt werden.

3.5 Messung der Stabilisotopenverhältnisse

3.5.1 Elemental Analysis Isotope Ratio Mass Spectrometry

3.5.1.1 Probenvorbereitung

Für die Messung des $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes von Ethanol wird die zu untersuchenden Destillatprobe mit einer Mikroliterspritze in gasdichte Zinnkapseln gefüllt (3 µl reiner Ethanol bzw. eine entsprechend größere Menge an wasserhaltigem Destillat in Kapseln mit 25 oder 70 µl Fassungsvermögen) und unter Verwendung einer speziellen Kapselpresse (Elementar-Analysensysteme GmbH, Hanau) dicht verschlossen.

Zur Bestimmung der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ - und $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ -Verhältnisse der Pulpe wird die Maische durch Zentrifugation und anschließendes Auswaschen des Rückstandes mit Wasser und Aceton von löslichen Bestandteilen getrennt. 12 mg der Probe werden schließlich in Zinnkapseln eingewogen und diese verschlossen.

3.5.1.2 Durchführung der Messung

Die Zinnkapseln können dem Elementaranalysator Vario EL III (Elementar Analysensysteme GmbH, Hanau) über das Probenaufgabesystem direkt zugeführt werden. Zur Messung der Stabilisotopenverhältnisse wird die Probe bei einer Temperatur von 1150 °C verbrannt und die Verbrennungsgase dem Isotopenverhältnismassenspektrometer AP 2003 (GVI Instruments Ltd. Manchester, UK) zugeführt. Das $^2\text{H}/^1\text{H}$ -Verhältnis der Pulpe wird mittels Delta XL plus IRMS gemessen, der mit einer Hochtemperatur-Pyrolyseeinheit (Thermo Instruments GmbH, Dortmund) gekoppelt ist. Als Referenzsubstanz diente ein Standard Casein (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), das in einem Europäischen Forschungsprojekt (SMT4-CT2236-1998) gegenüber den offiziellen Referenzmaterialien (PE F-1, NIST-22, V-CDT und Silbersulfid) kalibriert wurde.

Alle Isotopenverhältnisse werden gemäß Formel 7 als Abweichungen von den entsprechenden Internationalen Isotopenstandards (siehe Tabelle 3) angegeben

Formel 7: Berechnung des $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes

$$\delta R_{\text{Probe}} [\text{‰}] = \left(\frac{R_{\text{Probe}} - R_{\text{Standard}}}{R_{\text{Standard}}} \right) \cdot 1000$$

R: Verhältnis schweres/leichtes Isotop

3.5.2 Gas Chromatography combustion Isotope Ratio Mass Spectrometry (GC-c-IRMS)

Vor der Einführung der Elementaranalyse-IRMS wurden die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte des Ethanol flüssiger Proben mittels GC-c-IRMS bestimmt, bestehend aus einem Finnigan delta S Isotopenverhältnismassenspektrometer, welches über einen open-split mittels combustion interface mit einem Varian Gaschromatographen gekoppelt ist.

3.5.2.1 Probenvorbereitung

100 ml Destillat werden in einem 500 ml Rundkolben mittels einer mit Raschigringen gefüllten Kolonne (30 cm) langsam destilliert, bis am Ausgang der Kolonne eine

Temperatur von 98 °C erreicht ist. Das so erhaltene Destillat wird anschließend in Methanol verdünnt (1:100). Destillate mit einem Ethanolgehalt von mehr als 40 %–vol. können ohne vorherige Destillation direkt verdünnt werden. Die verdünnte Probe wird anschließend dem GC zugeführt.

3.5.2.2 GC-Bedingungen

<u>GC-Säule:</u>	Poraplot U fused silica Kapillarsäule
Abmessungen:	Länge 25 m, Innendurchmesser 0,32 mm, Filmdicke 0,10 µm
Trärgas:	Helium, 3 ml/min
Temperaturen:	Injektor 250 °C, combustion interface 940 °C, Reduktionsofen 600 °C
Ofenprogramm:	60 bis 190 °C, 10 °C/min
Injektionsmenge:	0,5 µl

3.5.2.3 Isotopenmessung mittels Massenspektrometer

Mittels Isotopenmassenspektrometer werden im Anschluss an die gaschromatographische Trennung der Probe die Massen 44 ($^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2$), 45 ($^{13}\text{C}^{16}\text{O}_2$) and 46 ($^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$) des durch die Verbrennung des Ethanols entstandenen Kohlendioxids simultan erfasst. Zur Kontrolle der Systemstabilität wurde eine regelmäßige Analyse eines Ethanolstandards vom Joint Research Centre of the EU in Ispra, Italien analysiert. Das Stabilisotopenverhältnis $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ wird als Abweichung in ‰ vom internationalen Standard Vienna Pee Dee Belemnite (V-PDB) gemäß der Berechnung nach Formel 1 angegeben.

3.5.3 $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ -Isotope Ratio Mass Spectrometry (IRMS)

Die $\delta^{18}\text{O}$ -Werte von Wasser wurden mit Hilfe eines Finnigan delta S Isotopenverhältnismassenspektrometers gemäß EU-Vorschrift 822/97 (86) bestimmt. Analysiert wird hierbei ebenfalls CO_2 , welches nach einer gewissen Reaktionszeit durch Isotopenaustausch im thermodynamischen Gleichgewicht das gleiche Sauerstoffisotopenverhältnis wie das zu analysierende Wasser aufweist.

3.5.3.1 Probenvorbereitung für die $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ -Messung

2–5 ml der Probe werden in ein Fläschchen gefüllt und dieses anschließend evakuiert. Nach Füllen des Fläschchens mit CO_2 wird dieses für 4–12 h in ein Wasserbad gegeben (Wassertemperatur: 25 °C). Nach vollständiger Äquilibration (Austauschreaktion: $^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2 + \text{H}_2^{18}\text{O} \leftrightarrow ^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{18}\text{O} + \text{H}_2^{16}\text{O}$) wird das CO_2 über eine Tieftemperaturfalle (–80 °C) in das Massenspektrometer geleitet, wodurch Wasser- und Ethanol dampf entfernt werden. Als Vergleichssubstanz dient Wasser, dessen Sauerstoffisotopenverhältnis gegen den internationalen Standard V-SMOW kalibriert wurde.

3.5.3.2 Isotopenmessung mittels Massenspektrometer

Nach Bestimmung der Massen 44 und 46 des CO_2 werden die $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ -Verhältnisse als relative Abweichungen vom internationalen Standard V-SMOW ($\delta^{18}\text{O}$) angegeben.

3.5.4 Thermo Ionization Mass Spectrometry (TIMS)

3.5.4.1 Probenvorbereitung

Alle Schritte des Probenaufschlusses für die anschließende Strontiumisotopenanalyse müssen in einem Reinraumlabor bzw. in einer "clean-box" erfolgen, um jede Kontamination mit Fremdstrontium zu vermeiden. Alle verwendeten Chemikalien (z.B. Salpetersäure) müssen von höchstmöglicher Reinheit sein (Ultrapur) und müssen vor der Verwendung im Labor redestilliert werden.

Für den Aufschluss werden 100–500 mg der Probe in Abhängigkeit ihres Strontiumgehalts in einen Quarztiegel eingewogen. Während flüssige Proben mittels Rotlichtbestrahlung getrocknet werden müssen, können Maischeproben direkt verascht werden. Hierfür wird die Probe in einem Simon-Müller Ofen langsam auf 850 °C erhitzt. Nach einer Haltezeit von ungefähr 5 h wird der anorganische Rückstand abgekühlt und anschließend in HNO_3 (konz.) gelöst. Nachdem das Lösungsmittel verdampft ist, wird der Rückstand erneut in 3 ml HNO_3 (3 N) gelöst und alle nichtlöslichen Bestandteile mittels Zentrifuge abgetrennt. Für die Abtrennung der Strontiumfraktion wird eine selbst erstellte Trennsäule aus Teflonschrumpfschlauch, gefüllt mit Sr-Spec (Eichrom[®] SR-B25-S), einem Sr-spezifischen Kronenether,

verwendet. Nach der Probenaufgabe auf die Trennsäule wird diese zweimal mit 0,1 ml und dreimal mit 0,3 ml 3 N HNO₃ gespült, um Elemente wie Ba oder Rb, die die Ergebnisse der anschließenden massenspektrometrischen Analyse verfälschen, auszuwaschen. Die Strontiumfraktion, die nach einer weiteren Zugabe von 0,4 ml HNO₃ (0,05 N) eluiert, wird in einem kleinen Teflongläschen aufgefangen und eingedampft.

3.5.4.2 Durchführung der Messung

Für Sr-Isotopen-Messungen werden Wolfram-Einbandquellen verwendet. Um die Ionisation von Sr während der Messung zu verbessern, wird 1 µl Ta-Fluorid ("Birk'sche Lösung") auf die Filamente aufgebracht, bevor die Probe in 2 µl 2N HCl gelöst und auf die Filamente geladen wird.

Die Isotopenverhältnismessung wird mit Hilfe eines MAT 261 Thermo-Ionen-Massen-Spektrometers der Firma Thermo Finnigan durchgeführt. Um die Richtigkeit (accuracy) der Ergebnisse zu gewährleisten, wird bei jedem Messdurchgang zur Kontrolle ein internationaler Sr-Standard (SrCO₃, NIST SRM 987) unter den gleichen Bedingungen wie die Probe (30 Einzelmessungen pro Isotopenverhältnis) gemessen. Fraktionierungseffekte während der Messung werden durch eine Korrektur bezüglich des invarianten Verhältnisses ⁸⁸Sr/⁸⁶Sr eliminiert. Der δ⁸⁷Sr-Wert kann mit der hier beschriebenen Methode mit einem 95 %-Konfidenzintervall von 0,003 % bestimmt werden.

3.5.5 SNIF-NMR[®] (Site-specific Natural Isotope Fractionation-Nuclear Magnetic Resonance)

3.5.5.1 Probenvorbereitung

Um das (D/H)_I- bzw. (D/H)_{II}-Verhältnis einer Probe mittels NMR bestimmen zu können, muss diese einen Ethanolgehalt von mindestens 95 %-vol. aufweisen. Nach der Bestimmung des Ethanolgehalts (Messgenauigkeit: 0,05 %-vol.) nach Karl-Fischer werden hierfür 40–60 ml der im Temperaturbereich 78,0–78,2 °C siedenden Destillatprobe (Ausgangsvolumen: 500 ml) vor der eigentlichen Messung mittels Bullio-Kolonnen (konstantes Rücklaufverhältnis: 0,9) in einen 125 ml

Schliffenmeyerkolben überdestilliert. Übersteigt die Siedetemperatur das angegebene Maximum, so wird die Destillatentnahme für 5 Minuten unterbrochen. Nach einer Destillationszeit von ungefähr 5 Stunden werden auf diese Weise 98,0–98,5 % des Gesamtethanols der Probe gewonnen, wodurch die auftretende Isotopenfraktionierung vernachlässigt werden kann.

7 ml des aufgefangenen Destillats werden in den NMR-Probenkopf (Durchmesser: 15 mm) gegeben. Nach der Zugabe von 3 ml des internen Standards N,N-Tetramethylharnstoff (Referenzprobe, Generaldirektion Wissenschaft, Forschung und Entwicklung der Kommission der EG, Brüssel; D/H-Verhältnis: 135,04 ppm) wird die Probe mit einer ausreichenden Menge Hexafluorbenzol (C_6F_6) zur Stabilisierung der Feldfrequenz versetzt.

3.5.5.2 Durchführung der Messung

Die Aufnahme der NMR-Spektren der Proben findet nach Einstellung der Homogenität und Empfindlichkeit gemäß den Anweisungen des Herstellers unter folgenden Bedingungen statt:

Durchmesser des Probenkopfes:	10 mm
Mittleres S/N-Verhältnis:	> 150
Spektrenanzahl je Probe:	8
Anzahl der Scans:	Stabilisierung: 32 Messwerterfassung: 200
Frequenzfenster:	19,615 ppm
Aufnahmezeit (Acquisition time, ACS):	6,8 s
Sektralbreite (Sween with, SW):	1200 Hz
Spektralgröße (Sween size, SI):	16 K
Pulswinkel:	90°
Quadratur-Detektion:	Einstellen des Offset 01 (Einstrahlfrequenz zur Anregung der Deuteriumspinsysteme) zwischen die Referenzsignale OD und CHD für Ethanol;

Bestimmung des Offset 02 (Einstrahlfrequenz des Entkopplers) anhand eines Protonenspektrums der aktuellen Probe

Die Probenvorbereitung sowie die Durchführung der NMR-Messung erfolgte gemäß EU-Vorschrift 2676/90 (88).

3.6 Berechnung der Wiederholgrenze

Die Wiederholgrenzen der einzelnen Methoden zur Bestimmung von Isotopenverhältnissen wurden gemäß Formel 5 aus den entsprechenden Standardabweichungen berechnet, die durch 10-fache Messung der jeweiligen Isotopenverhältnisse bestimmt wurden.

4 Ergebnisse und Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Erarbeitung einer Methode zur Bestimmung der regionalen Herkunft von Obstbränden auf Basis der Analytik stabiler Isotope am Beispiel von Schwarzwälder Kirsch- und Zwetschgenwasser. Grundlage dieser Methode stellen die Stabilisotopenverhältnisse $(D/H)_I$, $(D/H)_{II}$ und $^{13}C/^{12}C$ von Ethanol sowie der $\delta^{18}O$ -Wert des Wassers dar. Ergänzt werden sollten diese Daten durch die Messung des $\delta^{87}Sr$ -Wertes ausgewählter Proben, der typisch für die geologischen Bedingungen in der Anbauregion ist.

Für die Entwicklung dieser Methode war die Prüfung authentischer Rohstoffe und daraus hergestellter Destillate Voraussetzung. Hierfür wurden Muster (Rohfrüchte, vergorene Maische, Destillate und Verschnittwässer) aus mehreren Regionen des Schwarzwalds beschafft, die vom Bundesverband der Deutschen Klein- und Obstbrenner festgelegt wurden. Als Vergleichsproben dienten Muster aus norditalienischen Obstanbaugebieten (Trentino), die vom Istituto Agrario San Michele all'Adige zur Verfügung gestellt wurden, sowie Muster aus Franken, einer Region, in der ebenfalls Kirsch- und Zwetschgendestillate hoher Qualität hergestellt werden. Letztere wurden vom Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) Würzburg sowie dem Fränkischen Klein- und Obstbrennerverband e.V. bereitgestellt.

Um aus den für diese Muster ermittelten Stabilisotopenverhältnissen ein Modell zur regionalen Einordnung unbekannter Handelsproben erstellen zu können, musste die Abhängigkeit dieser Verhältnisse von brennereitechnologischen Verfahrensschritten überprüft werden. Hierzu wurden am Lehrstuhl für Allgemeine Lebensmitteltechnologie und an der Versuchs- und Lehrbrennerei Weihenstephan eigene Destillate unter definierten Bedingungen hergestellt. Variiert wurden neben dem verwendeten Hefestamm die Destillationsbedingungen hinsichtlich der Destillationstechnik und des unterschiedlichen Einsatzes von Glockenböden und Dephlegmator. Des Weiteren wurden authentische vergorene Kirschmaischen mittels Laboranlage unter konstanten Bedingungen destilliert und bezüglich der relevanten Stabilisotopenverhältnisse analysiert. Diese Ergebnisse wurden anschließend mit den entsprechenden Isotopenverhältnissen der Originaldestillate verglichen, die von den teilnehmenden

Brennern unter Bedingungen hergestellt wurden, die praxisübliche Variationen im Verlauf des Herstellungsprozesses abdecken.

4.1 Beschaffung authentischen Materials und Aufstellen eines Probenplans

Grundlage der Arbeit bildete eine statistisch auswertbare Zahl authentischer Proben aus den Gebieten Schwarzwald, Franken und Trentino. Die Proben umfassten neben den Rohfrüchten auch die vergorenen Maischen, die fertigen Destillate und die jeweiligen Verschnittwässer zum Herabsetzen der Destillate auf Trinkstärke. Zur Erstellung eines detaillierten Probenplans erhielten alle beteiligten Brenner Fragebögen, um Daten über Herkunft und Art des Rohstoffs, sowie Einmisch- und Destillationsverfahren zu erheben. Einen diesbezüglichen Überblick der analysierten Proben geben Tabelle 5 bis Tabelle 12. Neben Proben aus dem Schwarzwald, Franken und Norditalien wurden auch Muster (Rohfrüchte und/oder Destillate) aus den Gebieten nordöstlich des Bodensees, aus dem nordöstlichen Teil Baden-Württembergs, der Schweiz, jeweils ein Muster aus der Pfalz und der Türkei sowie unvergorene Kirschen aus Serbien und Mazedonien analysiert.

Tabelle 5: Herkunfts- und Einmischdaten der Kirschproben (Jahrgang 2003)

Nr.	Region	Standort	Sorte	Ernte	Extrakt [g/l]	Einmisch- datum	Hefe	Dosierung [g/100 kg]	Verflüssigungs- enzym	Dosierung [ml/100 kg]	angesäuert mit	Dosierung [ml/100 kg]	Lagertemp. [°C]
1	SW	Sommenhardt	Wildkirsche	28.06.03	208	30.06.03	SIHA Nr.6	25	-	-	Schwefels.	80	18
2	SW	Sommenhardt	unbek.	28.06.03	244	01.07.03	-	-	-	-	Schwefels.	80	18
3	SW	Birkingen	Lanastiel	28.06.03	217	30.06.03	SIHA-Destarome	9	Pectinex Ultra	5	SIHA-Combis.	90	20
4	SW	Kadelburg	Dolleseppler	03.07.03	293	05.07.03	SIHA-Destarome	13	Pectinex Ultra SP-L	5	SIHA-Combis.	100	17
5	SW	Nimbura	Dolleseppler	26.06.03	235	26.06.03	Spirifer Arom	10	-	-	Schwefels.	70	27
6	SW	Nimbura	Beniaminler	26.06.03	294	26.06.03	Spirifer Arom	10	-	-	Schwefels.	70	27
7	SW	Ödsbach	Dolleseppler	07.07.03	295	07.07.03	Aroma plus	15	Pectinex Ultra	5	Schwefels.	100	28
8	SW	Ödsbach	Lokalsorte	09.07.03	250	09.07.03	Aroma plus	15	Pectinex Ultra	7	Schwefels.	120	28
9	SW	Sasbach	Beniaminler	07.07.03	226	07.07.03	Spirifer Arom	18	Pectinex Ultra SP-L	8	Schwefels.	80	16
10	SW	Oberharmersbach	Doll's Lanastiel	01.07.03	229	01.07.03	Gärfix	60	Gärfix	60	Schwefels.	100	20-28
11	SW	Oberharmersbach	Beniaminler	01.07.03	252	01.07.03	-	-	-	-	Schwefels.	100	25
12	SW	Oberkirch	Beniaminler	28.06.03	252	28.06.03	-	-	-	-	Schwefels.	100	25
13	SW	Erlach	Erlacher	18.06.03	256	18.06.03	Brennerei. Forte	16	Pectinex forte I	15	Schwefels.	85	23
14	SW	Seebach	Beniaminler	07.07.03	259	07.07.03	unbek.	20	Distizym FM	20	Schwefels.	90	20
15	SW	Waldulm	Beniaminler	02.07.03	252	02.07.03	Spirifer	11	Distizym FM-TOP	4	Schwefels.	170	16
16	SW	Sasbachwalden	Doll's Lanastiel	09.07.03	290	09.07.03	Spirifer Classic	20	-	-	Schwefels.	100	20-27
17	SW	Sasbach	Beniaminler	07.07.03	268	07.07.03	Destarom	8	Panzym MK	10	Schwefels.	80	20-27
18	SW	Sasbachwalden	Dolleseppler	04.07.03	206	04.07.03	Spirifer Classic	20	-	-	Schwefels.	100	20-25
19	SW	Waldulm	Schwarze	23.06.03	306	23.06.03	Aroma plus	3	-	-	SIHA-Combis.	100	23
20	SW	Obersasbach	Dolleseppler	07.07.03	217	07.07.03	Spirifer Classic	16	Distizym FM-TOP	6	Schwefels.	100	19
21	SW	Oberachern	Schwarze	22.06.03	220	22.06.03	Spirifer Classic	15	-	-	Schwefels.	100	24
22	SW	Oberkirch	Beniaminler	30.06.03	249	01.07.03	Spirifer Classic	10	Distizym FM	20	Schwefels.	100	19
23	Fr	Thündaersheim	Van	16.06.03	197	17.06.03	Uvaferm CM	15	-	-	Schwefels.	100	20
24	Fr	Thündaersheim	Hedelfinger	23.06.03	218	25.06.03	Uvaferm CM	15	-	-	Schwefels.	100	20
25	Fr	Nassach	unbekannt	17.06.03	195	18.06.03	Uvaferm CM	15	-	-	Schwefels.	100	20
26	Fr	Neuses am Berg	Hedelfinger	23.06.03	160	24.06.03	Uvaferm CM	15	-	-	Schwefels.	100	20
27	Fr	Obererhrehnbach	Geissenheimer	25.06.03	189	26.06.03	Uvaferm CM	15	-	-	Schwefels.	100	20
28	It	Viaolo-Vattaro	Schattenmorelle	18.07.03	192	18.07.03	-	20	-	-	-	-	24-30
29	It	Viaolo-Vattaro	Stevenberg	18.07.03	219	18.07.03	-	-	-	-	-	-	-
30	It	Pergine Valsugana	Durone	15.07.03	182	15.07.03	SIHA Nr.6	20	-	-	Schwefels.	100	20-25
31	It	Nördl. Verona	unbekannt	19.06.03	199	19.06.03	Uvaferm	8	Extrared I	2	Schwefels.	90	22-26
32	Se	unbekannt	unbekannt	unbek.	unbek.	-	-	-	-	-	-	-	-
33	Se	unbekannt	unbekannt	unbek.	unbek.	-	-	-	-	-	-	-	-
34	Tü	unbekannt	unbekannt	17.07.04	180	15.07.03	-	-	-	-	-	-	24
35	Ch	Wintersingen	Regina	14.07.03	238	14.07.03	SIHA Nr.6	31	Ultrazym	62.5	Milchs./Pho.s.	300	20

Sw: Schwarzwald; Fr: Franken; It: Norditalien; Se: Serbien; Tü: Türkei; Ch: Schweiz

Tabelle 6: Herkunfts- und Einmischdaten der Kirschproben (Jahrgang 2004; Teil 1)

Nr.	Region	Standort	Sorte	Ernte	Extrakt [g/l]	Einmisch- datum	Hefe	Dosierung [g/100 kg]	Verflüssigungs- enzym	Dosierung [ml/100 kg]	angesäuert mit [ml/100 kg]	Dosierung [°C]	Lagertemp.
36	SW	Sommenhardt	unbek.	20.07.04	190	21.07.04	-	-	-	-	-	-	20-25
37	SW	Sommenhardt	unbek.	26.07.04	173	26.07.04	-	-	-	-	-	-	20-25
38	SW	Birkingen	Doll's Lanastiel	22.07.04	191	23.07.04	SIHA-Destarome	20	Pectinex Ultra SP-I	5	SIHA-Combis.	100	23
39	SW	Nimbura am	Benjaminler	21.07.04	225				nur Rohfrüchte vorhanden				
40	SW	Nimbura am	Dollenseppler	21.07.04	210				nur Rohfrüchte vorhanden				
41	SW	Ödsbach	Dollenseppler	12.07.04	246	12.07.04	Spiriferm Arom	15	Distizvm FM-TOP	6	Schwefels.	100	20
42	SW	Ödsbach	unbekannt	15.07.04	236	15.07.04	Spiriferm Arom	20	Distizvm FM-TOP	6	Schwefels.	100	22
43	SW	Sasbach	Paulis	21.07.04	200				nur Rohfrüchte vorhanden				
44	SW	Oberharmersbach	Benjaminler	10.07.04	234	10.07.04	Gärfix	50	Gärfix		Schwefels.	90	25-28
45	SW	Renchen-Ulm	Stolzen	08.07.04	277	08.07.04	Spiriferm Classic	15	-	-	Schwefels.	100	18-20
46	SW	Waldulm	Benjaminler	16.07.04	301	16.07.04	Spiriferm Classic	10	-	-	Schwefels.	90	20-25
47	SW	Waldulm	Schw. Schüttler	03.07.04	304	03.07.04	V 13	4	-	-	Schwefels.	100	23
48	SW	Obersasbach	Benjaminler	05.07.04	303	05.07.04	Aroma Plus	10	Pectinex Ultra	3	Schwefels.	100	25
49	SW	Obersasbach	unbek.	unbek.	232	08.09.04	Uvaferm CM	13	-	-	Schwefels.	-	7
50	SW	Obersasbach	Benjaminler	05.07.04	303	05.07.04	Aroma Plus	10	Pectinex Ultra	3	Schwefels.	100	25
51	Fr	laensdorf	Sommet	04.07.04	169	05.06.04	Uvaferm CM	13	-	-	Schwefels.	unbek.	16
52	Fr	Thüngaersheim	Hedelfinaer	06.07.04	182	07.07.04	Uvaferm CM	21	-	-	Schwefels.	unbek.	7
53	Fr	Thüngaersheim	Junius	06.07.04	174	07.07.04	Uvaferm CM	21	-	-	Schwefels.	unbek.	7
54	Fr	Oberehrenbach	Geissenheimer	06.07.04	148	22.07.04	Uvaferm CM	20	-	-	Schwefels.	unbek.	7
55	Fr	Neuses am Bera	Schwarze	05.07.04	192	08.07.04	Uvaferm CM	21	-	-	Schwefels.	unbek.	7
56	Fr	Am Hausberg	Sam	13.07.04	166	14.07.04	Uvaferm CM	21	-	-	Schwefels.	unbek.	7
57	Fr	Günsfeld	unbek.	02.07.04	173	02.07.04	Uvaferm	10	-	-	Schwefels.	130	unbek.
58	Fr	Schönderling	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
59	Fr	Unterleinach	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
60	It	Mezzocorona	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
61	It	Lana	unbek.	24.06.04	153	24.08.04	Uvaferm CM	12.5	-	-	Schwefels.	unbek.	7
62	It	Lana	unbek.	24.06.04	150	25.08.04	Uvaferm CM	12.5	-	-	Schwefels.	unbek.	7
63	It	Lana	unbek.	24.06.04	150	24.08.04	Uvaferm CM	12.5	-	-	Schwefels.	unbek.	7
64	It	Lana	unbek.	24.06.04	150	24.08.04	Uvaferm CM	12.5	-	-	Schwefels.	unbek.	7
65	It	Trento	unbek.	Juni	167	26.08.04	Uvaferm CM	12.5	-	-	Schwefels.	unbek.	7
66	It	Verona	unbek.	Juni	176	21.12.04	Uvaferm CM	12.5	-	-	Schwefels.	unbek.	7
67	It	Verona	unbek.	Juni	172	21.12.04	Uvaferm CM	12.5	-	-	Schwefels.	unbek.	7
68	Bo	Lochenried	unbek.	unbek.					nur Rohfrüchte vorhanden				
69	Bo	Allingau	unbek.	unbek.					nur Rohfrüchte vorhanden				
70	Bo	Allingau	unbek.	unbek.					nur Rohfrüchte vorhanden				
71	Bo	Kreßbronn	unbek.	unbek.					nur Rohfrüchte vorhanden				
72	Bo	Allingau	unbek.	unbek.					nur Rohfrüchte vorhanden				
73	Bo	Lochenried	unbek.	unbek.					nur Rohfrüchte vorhanden				
74	Bo	Lochenried	unbek.	unbek.					nur Rohfrüchte vorhanden				
75	Pf	Meckenheim	unbek.	08.07.04	152	12.07.04	Uvaferm CM	12.5	-	-	Schwefels.	100	16
76	NW	Gammelshausen	Moser	Juni 2004	unbek.	Juni 2004	-	-	-	-	-	-	unbek.
77	NW	Göppingen	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
78	NW	Göppingen	unbek.	Juli	unbek.	Juli 2004	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
79	NW	Eschenbach	Benjaminler	20.07.20	unbek.	20.07.2004	SIHA Aktiv	40	-	-	SIHA-Combis.	unbek.	unbek.
80	NW	Bad Boll	Ritterkirsche	20.07.04	unbek.	03.10.2004	SIHA	20	-	-	Schwefels.	90	23

Sw: Schwarzwald; Fr: Franken; It: Norditalien; Bo: Bodensee; Pf: Pfalz; NW: Nord Baden-Württemberg

Tabelle 7: Herkunfts- und Einmischdaten der Kirschproben (Jahrgang 2004; Teil 2)

Nr.	Region	Standort	Sorte	Ernte	Extrakt [g/l]	Einmisch- datum	Hefe	Dosierung [g/100 kg]	Verflüssigungs- enzym	Dosierung [ml/100 kg]	angesäuert mit	Dosierung [ml/100 kg]	Lagertemp. [°C]
81	Ch	Wintersinaen	Regina	06.08.04	227	06.08.04	Danstill		50Ultrazym	3	Milchs./Pho.s.	unbek.	20
82	Se	Belusic	unbek.	unbek.					nur Rohfrüchte vorhanden				
83	Se	Sabac	unbek.	unbek.					nur Rohfrüchte vorhanden				
84	Se	Blace	unbek.	unbek.					nur Rohfrüchte vorhanden				
85	Se	Arilie	unbek.	unbek.					nur Rohfrüchte vorhanden				
86	Se	Arilie	unbek.	unbek.					nur Rohfrüchte vorhanden				
87	Se	Belgrad	unbek.	unbek.					nur Rohfrüchte vorhanden				
88	Se	Belgrad	unbek.	unbek.					nur Rohfrüchte vorhanden				
89	Se	Macav	unbek.	unbek.					nur Rohfrüchte vorhanden				
90	Ma	Skopje	unbek.	unbek.					nur Rohfrüchte vorhanden				

Ch: Schweiz; Se: Serbien; Ma: Mazedonien

Tabelle 8: Herkunfts- und Einmischdaten der Zwetschgenproben (2004)

Nr.	Region	Standort	Sorte	Ernte	Extrakt [g/l]	Einmisch- datum	Hefe	Dosierung [g/100 kg]	Verflüssigungs- enzym	Dosierung [ml/100 kg]	angesäuert mit	Dosierung [ml/100 kg]	Lagertemp. [°C]
91	SW	Obersasbach	Presenta	24.09.04	252	24.09.04	Aroma Plus	20	Pectinex Ultra SP-I	5	Schwefels.	50	12-17
92	SW	Durbach	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
93	SW	Gengenbach	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
94	SW	Ebringen	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
95	SW	Ohlsbach	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
96	SW	Simmozheim	unbek.	17.10.04	206	17.10.04	VIN 13	10	Ultra "Fruit"	unbek.	Schwefels.	unbek.	unbek.
97	Fr	Nordheim/Rhön	unbekannt	10.04	unbek.	Okt.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	Schwefels.	unbek.	unbek.
98	Fr	Büttard	Fränk. Hauszw.	10.10.04	unbek.	10.10.04	-	-	-	-	-	-	unbek.
99	Fr	Haßfurt-Prappach	Fränk. Hauszw.	10.04	252	Okt.	SIHA	20	Pectinex Forte L	30	Schwefels.	unbek.	unbek.
100	Fr	Erlabrunn	unbek.	10.04	206	Okt.	Spiriferm	15	Distizym	unbek.	Schwefels.	unbek.	unbek.
101	Fr	Volkach/Fahr	unbek.	10.04	unbek.	Okt.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	Schwefels.	unbek.	unbek.
102	Fr	Pettstadt	unbek.	10.04	259	Okt.	Spiriferm Arom	20	Pectinex	15	Schwefels.	unbek.	unbek.
103	Fr	Alzenau-Albstadt	Fränk. Feldzw.	09.04	unbek.	Ende Sept.	Aroma Plus	15	-	-	-	-	unbek.
104	Fr	Bad Kissingen	unbek.	10.04	unbek.	Okt.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	Schwefels.	unbek.	unbek.

Sw: Schwarzwald; Fr: Franken

Tabelle 9: Destillationsbedingungen der Kirschdestillate (Jahrgang 2003)

Nr.	Geräte-hersteller	Anzahl Böden	Dephlegmator	Blausäure-abscheidung	Wechsel ML-NL [%-vol.]	abgetrieben bis [%-vol.]	Art der Destillation	Anzahl Rauhbr. pro Feinbrand	Vorlauf-Wiederverw.	Nachlauf-Wiederverw.
1	U. Kothe	3	fest inst.	fest inst.	40	8	Feinbr. aus Maische	-	-	-
2	U. Kothe	3	fest inst.	fest inst.	40	8	Feinbr. aus Maische	-	-	-
3	Holstein	2	-	-	50	10	Feinbr. aus Maische	-	-	-
4	Holstein	2	-	-	50	8	Feinbr. aus Maische	-	-	-
5	Gürtner	3	fest inst.	-	65	5	Feinbr. aus Maische	-	-	-
6	Gürtner	3	fest inst.	-	65	5	Feinbr. aus Maische	-	-	-
7	Müller	2	fest inst.	-	60	15	Feinbr. aus Maische	-	-	-
8	Müller	-	fest inst.	-	52	15	Feinbr. aus Maische	-	-	-
9	Müller	unbek.	-	-	58	5	Feinbr. aus Maische	-	-	-
10	Holstein	3	-	fest inst.	60	20	Feinbr. aus Maische	-	-	extra Feinbr.
11	Müller	-	fest inst.	-	52	5	Feinbr. aus Maische	-	-	ja
13	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	Feinbr. aus Maische	-	-	-
14	Müller	-	fest inst.	Dampfsw.	55	5	Feinbr. aus Maische	-	-	-
15	Müller	-	fest inst.	-	60	10	Feinbr. aus Maische	-	-	-
16	Müller	-	-	-	55	6	Feinbr. aus Maische	-	-	-
17	unbek.	-	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
18	Müller	-	-	-	55	6	Feinbr. aus Rauhbr.	6	-	-
19	Holstein	2	fest inst.	-	72	10	Feinbr. aus Maische	-	-	-
20	Holstein	2	-	fest inst.	70	20	unbek.	unbek.	-	-
21	Chr. Carl	3	-	fest inst.	60	20	unbek.	unbek.	-	-
22	Müller	-	fest inst.	-	50	5	Feinbr. aus Maische	-	-	extra Feinbr.
23	Holstein	3	fest inst.	fest inst.	60	10	Feinbr. aus Maische	-	-	-
24	Holstein	3	fest inst.	fest inst.	60	10	Feinbr. aus Maische	-	-	-
25	Holstein	3	fest inst.	fest inst.	60	10	Feinbr. aus Maische	-	-	-
26	Holstein	3	fest inst.	fest inst.	60	10	Feinbr. aus Maische	-	-	-
27	Holstein	3	fest inst.	fest inst.	60	10	Feinbr. aus Maische	-	-	-
28	Cadalpe	4	unbek.	-	unbek.	unbek.	Feinbr. aus Maische	-	-	-
29										
30	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
31	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
32							nur Rohfrüchte vorhanden			
33							nur Rohfrüchte vorhanden			
34	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
35	Holstein	2	fest inst.	fest inst.	70	10	Feinbr. aus Maische	-	-	-

Tabelle 10: Destillationsbedingungen der Kirschdestillate (Jahrgang 2004; Teil 1)

Nr.	Geräte-hersteller	Anzahl Böden	Dephlegmator	Blausäure- abscheidung	Wechsel ML- NL [%-vol.]	abgetrieben bis [%-vol.]	Art der Destillation	Anzahl Rauhbr. pro Feinbrand	Vorlauf- Wiederverw.	Nachlauf- Wiederverw.
36	Kothe	3	fest inst.	fest inst.	52	10	Feinbr. aus Maische	-	-	-
37	Kothe	3	fest inst.	fest inst.	52	10	Feinbr. aus Maische	-	-	-
38	Holstein	2	-	-	53	10	Feinbr. aus Maische	-	-	-
39							nur Rohfrüchte vorhanden			
40							nur Rohfrüchte vorhanden			
41	Müller	2	-	-	60	10	Feinbr. aus Maische	-	-	extra Feinbr.
42	Müller	-	fest inst.	-	60	15	Feinbr. aus Maische	-	-	extra Feinbr.
43							nur Rohfrüchte vorhanden			
44	Holstein	2	-	fest inst.	60	20	Feinbr. aus Maische	-	-	extra Feinbr.
45	Bäuchle	-	fest inst.	-	52	5	Feinbr. aus Maische	-	-	-
46	Müller	-	fest inst.	CuCl ₂	60	10	Feinbr. aus Rauhbr.	8	-	-
47	Holstein	2	fest inst.	-	75	10	Feinbr. aus Maische	-	extra Feinbr.	extra Feinbr.
48	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
49	Müller	-	-	-	55	4	Feinbr. aus Maische	-	-	-
50	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
51	Holstein	2	fest inst.	ia	60	10	Feinbr. aus Maische	-	-	-
52	Holstein	3	fest inst.	fest inst.	60	10	Feinbr. aus Maische	-	-	-
53	Holstein	3	fest inst.	fest inst.	60	10	Feinbr. aus Maische	-	-	-
54	Holstein	3	fest inst.	fest inst.	60	10	Feinbr. aus Maische	-	-	-
55	Holstein	3	fest inst.	fest inst.	60	10	Feinbr. aus Maische	-	-	-
56	Holstein	3	fest inst.	fest inst.	60	10	Feinbr. aus Maische	-	-	-
57	Kothe	3	fest inst.	fest inst.	68	10	Feinbr. aus Maische	-	-	-
58	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
59	Adrian	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	Feinbr. aus Maische	-	unbek.	unbek.
60	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
61	Holstein	2	fest inst.	ia	60	10	Feinbr. aus Maische	-	-	-
62	Holstein	2	fest inst.	ia	60	10	Feinbr. aus Maische	-	-	-
63	Holstein	2	fest inst.	ia	60	10	Feinbr. aus Maische	-	-	-
64	Holstein	2	fest inst.	ia	60	10	Feinbr. aus Maische	-	-	-
65	Holstein	2	fest inst.	ia	60	10	Feinbr. aus Maische	-	-	-
66	Holstein	2	fest inst.	ia	60	10	Feinbr. aus Maische	-	-	-
67	Holstein	2	fest inst.	ia	60	10	Feinbr. aus Maische	-	-	-
68							nur Rohfrüchte vorhanden			
69							nur Rohfrüchte vorhanden			
70							nur Rohfrüchte vorhanden			
71							nur Rohfrüchte vorhanden			
72							nur Rohfrüchte vorhanden			
73							nur Rohfrüchte vorhanden			
74							nur Rohfrüchte vorhanden			
75	Holstein	2	fest inst.	ia	60	10	Feinbr. aus Maische	-	-	-
76	C. Carl	3	fest inst.	-	50	20	Feinbr. aus Maische	-	-	-
77	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
78	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	Feinbr. aus Maische	-	-	-
79	Kothe	2	fest inst.	-	45	10	Feinbr. aus Maische	-	-	-
80	Kothe	3	-	unbek.	60	10	Feinbr. aus Maische	-	-	-

Tabelle 11: Destillationsbedingungen der Kirschdestillate (Jahrgang 2004; Teil 2)

Nr.	Geräte-hersteller	Anzahl Böden	Dephlegmator	Blausäure-abscheidung	Wechsel ML-NL [%-vol.]	abgetrieben bis [%-vol.]	Art der Destillation	Anzahl Rauhbr. pro Feinbrand	Vorlauf-Wiederverw.	Nachlauf-Wiederverw.
81	Holstein	2	fest inst.	fest inst.	70	10	Feinbr. aus Maische	-	-	-
82							nur Rohfrüchte vorhanden			
83							nur Rohfrüchte vorhanden			
84							nur Rohfrüchte vorhanden			
85							nur Rohfrüchte vorhanden			
86							nur Rohfrüchte vorhanden			
87							nur Rohfrüchte vorhanden			
88							nur Rohfrüchte vorhanden			
89							nur Rohfrüchte vorhanden			
90							nur Rohfrüchte vorhanden			

Tabelle 12: Destillationsbedingungen der Zwetschgendestillate (Jahrgang 2004)

Nr.	Geräte-hersteller	Anzahl Böden	Dephlegmator	Blausäure-abscheidung	Wechsel ML-NL [%-vol.]	abgetrieben bis [%-vol.]	Art der Destillation	Anzahl Rauhbr. pro Feinbrand	Vorlauf-Wiederverw.	Nachlauf-Wiederverw.
91	Müller	-	-	-	55	5	Feinbr. aus Maische	-	-	-
92	Müller	-	-	-	60	10	Feinbr. aus Maische	-	-	-
93	Holstein	3	fest inst.	fest inst.	65	5	Feinbr. aus Maische	-	-	-
94	Müller	2	-	-	60	15	Feinbr. aus Maische	-	-	-
95	Müller	-	-	-	55	10	Feinbr. aus Maische	-	-	-
96	Kothe	3	fest inst.	-	65	20	Feinbr. aus Maische	-	-	-
97	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
98	Kothe	3	fest inst.	fest inst.	70	10	Feinbr. aus Maische	-	-	-
99	Hans	-	-	unbek.	unbek.	20	Feinbr. aus Rauhbr.	unbek.	unbek.	-
100	Adrian	3	fest inst.	-	40	10	Feinbr. aus Maische	-	-	-
101	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.
102	Adrian	2	fest inst.	-	65-70	10	Feinbr. aus Maische	-	-	-
103	Adrian	-	-	-	unbekannt	20	Feinbr. aus Rauhbr.	unbek.	unbek.	ja
104	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.	unbek.

4.2 Chemisch-analytische Untersuchungen der Proben

Sowohl die von den Brennern zur Verfügung gestellten unvergorenen Maischen und die daraus hergestellten Obstbrände als auch die in der Versuchs- und Lehrbrennerei Weihenstephan hergestellten Destillate wurden analysiert. Während für unvergorene Früchte besonders der Extraktgehalt (siehe Tabelle 5 bis Tabelle 8) eine wichtige Kenngröße für die Einschätzung der Alkoholausbeute darstellt, bildet die qualitative und quantitative Bestimmung typischer flüchtiger Verbindungen der jeweiligen Destillate eine wichtige Grundlage für deren qualitative Beurteilung.

4.2.1 Typische Kenndaten der Destillatproben

Neben der Bestimmung des Ethanolgehalts mittels Biegeschwinger umfasst die gaschromatographische Analyse der Destillate die quantitative Bestimmung des für die Verkehrsfähigkeit bedeutsamen Inhaltsstoffs Methanol, der höheren Alkohole, Carbonylverbindungen und Ester. Diese Daten sind für die chemisch-analytische Charakterisierung und die qualitative Beurteilung des ausgewählten Probenmaterials von Bedeutung. Des Weiteren liefern diese Untersuchungen die Basisdaten, die zur Korrektur der Messergebnisse der nachfolgenden Isotopenmessungen mittels Kernresonanzspektroskopie (^2H -NMR) am Wasserstoff des Ethanols erforderlich sind.

Um bei der gaschromatographischen Analyse eine genaue Identifizierung der Inhaltsstoffe der Destillate zu sichern, wurden neben einer gepackten Glassäule (Carbo-pack B) zwei Kapillarsäulen unterschiedlicher Polarität (FFAP und SE) eingesetzt. Die Carbo-pack B-Glassäule dient zur Identifizierung von Inhaltsstoffen, die in hohen Konzentrationen in der Probe zu erwarten sind. Dies sind Methanol, die höheren Alkohole 1-Propanol, 2-Methyl-1-propanol, 2-Methyl-1-butanol und 3-Methyl-1-butanol sowie die Ester Ethyllactat und Ethylacetat. Insgesamt konnten 14 Verbindungen nachgewiesen werden, davon 10 Alkohole, eine Carbonylverbindung und 2 Ester.

Während auf der gepackten Glassäule nur Komponenten mit relativ hohen Konzentrationen reproduzierbar nachgewiesen werden können, ist die quantitative Bestimmung flüchtiger Inhaltsstoffe auf den beiden Kapillarsäulen mit einer Nachweisgren-

ze von kleiner 1 mg/l möglich. Jedoch liefern diese nur bis zu einer maximalen Konzentration von etwa 400 mg/l reproduzierbare Ergebnisse (101), da höhere Konzentrationen Peakflächen ergeben, die außerhalb des Linearitätsbereichs der Kalibrierung liegen.

Auf der FFAP-Kapillarsäule konnten 66 Komponenten (19 Alkohole, 30 Ester, 9 Carbonylverbindungen und 8 Terpene) nachgewiesen werden, während auf der SE-Kapillarsäule insgesamt 62 Komponenten (16 Alkohole, 30 Ester, 8 Carbonylverbindungen und 8 Terpene) erfasst werden konnten. Tabelle 13 gibt einen Überblick über die auf den eingesetzten Säulen erfassten flüchtigen Verbindungen.

Tabelle 13: Auf den eingesetzten GC- Säulen erfasste Verbindungen
(X: nachweisbar, (X): in Abhängigkeit der Konzentration nachweisbar, -: nicht nachweisbar)

Verbindung	CB	SE	FFAP	Verbindung	CB	SE	FFAP
Methanol	X			Octanal	-	X	-
1-Propanol	X	X	X	Nonanal	-	X	-
2-Propanol	(X)	X	-	Benzaldehyd	-	X	X
Allylalkohol	(X)	X	X	Furfural	-	X	X
1-Butanol	(X)	X	X	Acetoin	-	-	X
2-Butanol	(X)	X	X	1,1,3-Triethoxypropan	-	X	X
2-Methyl-1-propanol	X	X	X	1,1-Diethoxyethan	-	X	-
2-Methyl-1-butanol	X	X	-				
3-Methyl-1-butanol	X	X	-	Methylacetat	-	X	-
Isoamylalkohole			X	Methylcaprylat	-	(X)	X
1-Pentanol	-	X	X	Methylcaprinat	-	X	X
3-Methyl-1-pentanol	-	-	X	Methylaurat	-	X	X
1-Hexanol	(X)	X	-	Methylmyristat	-	X	X
trans-3-Hexen-1-ol	-	-	X	Methylpalmitat	-	X	X
cis-3-Hexen-1-ol	-	-	X	Ethylformiat	-	X	-
trans-2-Hexen-1-ol	-	-	X	Ethylacetat	X	X	-
2-Heptanol	-	(X)	X	Ethylpropionat	-	X	(X)
1-Heptanol	-	(X)	X	Ethyllactat	X	X	-
1-Octanol	-	-	X	Ethylbutyrat	-	X	-
1-Nonanol	-	(X)	(X)	Ethyl-2-methylbutyrat	-	-	X
1-Decanol	-	X	X	Ethyl-3-methylbutyrat	-	-	X
Dodecanol	-	-	X	Ethylcapronat	-	X	X
Benzylalkohol	-	X	X	Ethylheptanoat	-	X	X
2-Phenylethanol	-	X	X	Ethylcaprylat	-	X	X
Furfurylalkohol	-	-	X	Ethylnonanoat	-	X	X
				Ethylcaprinat	-	X	X
Linalool	-	X	X	Ethyllaurat	-	X	X
cis-Linalooloxid	-	X	X	Ethylmyristat	-	X	X
trans-Linalooloxid	-	X	X	Ethylpalmitat	-	X	X
α -Terpineol	-	X	X	Ethylphenylacetat	-	X	(X)
Citronellol	-	X	X	Ethylbenzoat	-	(X)	X
Geraniol	-	X	(X)	Diethylsuccinat	-	(X)	X
γ -Decalacton	-	X	X	Propylacetat	-	X	X
Eugenol	-	X	-	Isobutylacetat	-	X	X
				Butylacetat	-	-	X
Acetaldehyd	X	-	(X)	Isoamylacetat	-	X	X
Acrolein	-	-	X	Isoamyllactat	-	-	X
Propanal	-	-	X	Isoamylcaprylat	-	(X)	(X)
Isobutanal	-	-	X	Isoamylcaprinat	-	(X)	X
Isovaleraldehyd	-	X	-	Hexylacetat	-	X	X
Hexanal	-	-	X	Benzylacetat	-	(X)	X
Heptanal	-	X	-	2-Phenylethylacetat	-	X	(X)

Von den in Tabelle 13 aufgeführten Verbindungen wurden in den Kirschbränden insgesamt 50 Verbindungen analysiert: 13 Alkohole, 7 Terpene, 7 Carbonylverbindungen und 23 Ester.

Die Bestimmung der Konzentration an Ethylcarbammat (EC) erfolgte mittels GC-MS. Aufgrund der toxischen Wirkung des lichtabhängig gebildeten Ethylcarbammats auf den menschlichen Organismus ist der Lichteinfluss auf das Destillat während der Lagerung von größter Bedeutung (102). Die Originaldestillate werden deshalb für fünf bis sieben Tage mit UV-Licht bestrahlt und erneut bezüglich ihrer Ethylcarbammatkonzentration mittels MS analysiert. Hierdurch wird eine unsachgemäße Lagerung simuliert und eine möglichst vollständige Umwandlung der Blausäure in EC bewirkt. Aus den Ethylcarbammatkonzentrationen vor (EC v.B.) und nach der Bestrahlung (EC n.B.) können Rückschlüsse gezogen werden, inwiefern der zulässige Höchstwert im Destillat bereits überschritten wurde bzw. welcher Obstbrand durch unsachgemäße Lagerung gefährdet ist.

Einen Überblick über die in den Destillaten analysierten Verbindungen geben Tabelle 14 sowie Tabelle 15. Messergebnisse in roter Fettschrift deuten auf ein Überschreiten der zulässigen Ethylcarbammatkonzentration hin. Fett und kursiv formatierte Werte in blau überschreiten die entsprechenden Grenzwerte von Verbindungen, die auf einen bakteriellen Verderb der Maische schließen lassen (siehe 2.2).

Tabelle 14: Konzentrationen flüchtiger Verbindungen sowie von Ethylcarbamat in den Destillaten (Teil 1)

Nr.	Methanol [mg/100ml A.]	Höhere Alkohole [mg/100ml A.]	Carbonylverb. [mg/100ml A.]	Ester [mg/100ml A.]	1- Propanol [mg/100ml A.]	2-Propenol [mg/100ml A.]	2-Butanol [mg/100ml A.]	Ethylactat [mg/100ml A.]	Ethylacetat [mg/100ml A.]	EC (v.B.) ^{a)} [[µg/l]]	EC (n.B.) ^{b)} [[µg/l]]
1	541	368	25	174	214	17.4	1.8	109	51	59	154
2	453	1037	13	207	834	1.0	10.4	91	85	96	356
3	776	365	17	255	156	3.0	0.6	90	142	417	10357
4	389	259	18	85	85	0.0	0.1	18	53	388	3399
5	385	409	24	183	209	2.2	7.2	43	121	143	6524
6	400	326	17	132	113	0.1	0.2	34	82	104	326
7	406	378	14	210	181	0.0	0.3	82	113	52	577
8	370	283	41	262	144	0.1	0.4	58	188	222	2286
9	432	165	11	84	84	0.1	0.3	6	71	563	5413
10	367	329	24	65	84	0,0	0,1	11	40	198	387
11											
12	440	990	12	404	826	2.0	11.5	140	235	315	1663
13	339	474	8	321	217	0.6	2.5	40	260	2046	2943
14	497	309	33	195	110	0.1	0.3	73	97	207	3787
15	405	320	11	145	94	0.3	0.5	64	60	203	7210
16	355	240	22	164	103	0.1	0.2	37	113	288	3700
17	367	220	13	152	80	0.0	0.1	92	46	108	1866
18	485	249	20	274	85	0.5	0.3	111	145	301	3094
19	300	313	21	153	91	0.0	0.4	26	108	367	6121
20	482	326	15	337	227	1.2	4.6	21	302	173	200
21	466	469	22	345	317	1.7	7.0	53	270	1079	3563
22	620	421	32	217	290	1.3	3.2	75	120	144	1663
23	514	433	61	47	95	0.0	0.0	<1	29	23	45
24	481	420	29	52	98	0.0	0.1	<1	36	54	67
25	492	564	15	33	50	0.0	0.2	<1	20	36	58
26	432	432	13	184	124	0.0	0.0	43	43	99	110
27	385	398	61	46	105	0.0	0.0	2	30	32	78
28	562	562	53	91	224	0,1	0,1	4	72	220	231
29											
30	493	240	90	140	75	0.1	0.3	80	48	18	29
31	454	375	42	115	141	0.8	1.1	59	40	51	74
34	420	324	50	24	104	0.0	0.2	4	14	89	150
35	517	598	28	100	117	0.0	0.2	10	64	15	12
36	521	1266	14	289	846	87.6	225.0	97	177	53	67
37	495	296	14	143	120	1.7	4.1	70	59	84	98
38	455	297	96	137	125	0.1	0.3	53	68	2100	2100
41	338	492	86	149	217	0.5	3.5	48	86	69	134
42	321	320	109	103	111	0.0	0.2	58	32	123	342
44	407	411	90	58	75	0.0	0.1	20	20	173	1670
45	437	353	144	249	191	0.2	3.0	57	168	1118	15000
46	370	358	16	119	98	0.1	0.4	45	59	275	277
47	351	326	33	124	88	0.0	0.2	8	91	1225	7656
48	388	287	32	92	85	0.3	1.3	37	39	1460	12822
49	326	288	22	84	146	0.0	0.0	32	42	452	4708

a) Ethylcarbamatkonzentration (vor UV-Bestrahlung)

b) Ethylcarbamatkonzentration (nach UV-Bestrahlung)

Tabelle 15: Konzentrationen flüchtiger Verbindungen sowie von Ethylcarbammat in den Destillaten (Teil 2)

Nr.	Methanol [mg/100ml A.]	Höhere Alkohole [mg/100ml A.]	Carbonylverb. [mg/100ml A.]	Ester [mg/100ml A.]	1- Propanol [mg/100ml A.]	2-Propenol [mg/100ml A.]	2-Butanol [mg/100ml A.]	Ethyllactat [mg/100ml A.]	Ethylacetat [mg/100ml A.]	EC (v.B.) ^a [[µg/l]	EC (n.B.) ^b [[µg/l]
50	440	357	38	177	182	5.3	0.5	18	19	1348	1545
51	464	334	9	46	87	0.0	0.1	<1	30	26	112
52	541	632	216	143	156	0.0	0.3	8	109	52	67
53	515	581	29	94	125	0.0	0.2	<1	69	47	86
54	587	456	66	252	139	0.0	0.3	13	222	23	44
55	506	501	54	122	114	0.0	0.2	2	101	32	36
56	537	542	91	153	133	0.0	0.2	6	125	14	86
57	536	1280	9	142	106	7.4	9.5	43	85	63	77
58	474	577	30	155	79	0.0	0.9	17	125	1871	1849
59	567	295	15	107	128	2.8	4.6	43	50	11	30
60	515	485	57	41	252	0.1	0.7	15	15	412	417
61	585	318	19	37	93	0.0	0.3	4	21	13	23
62	559	321	10	38	100	0.0	1.3	1	24	32	66
63	627	324	10	35	103	0.0	1.1	<1	16	21	54
64	658	326	13	36	117	0.0	0.7	1	22	13	35
65	492	342	28	135	119	2.4	0.6	60	52	16	68
66	475	368	14	95	128	1.4	1.5	55	22	54	99
67	450	319	12	104	120	0.5	0.2	39	39	89	123
75	825	494	36	72	141	0.0	0.0	<1	50	12	45
76	544	283	20	399	153	3.6	4.4	200	180	92	124
77	462	336	60	399	66	42.1	3.9	128	227	341	544
78	478	149	28	298	36	0.0	0.4	98	183	77	92
79	665	205	11	328	67	5.3	1.2	178	132	1681	1979
80	302	270	16	114	51	0.1	0.4	40	63	42	2314
81	474	232	71	894	97	0.1	0.4	1	861	32	66
Zwetschaendestillate											
91	934	422	46	208	57	0.1	0.1	107	72	313	5139
92	869	295	26	160	68	0.1	0.1	46	94	457	896
93	736	355	25	447	161	0.1	1.4	119	303	36	98
94	851	569	23	221	172	2.9	10.8	36	163	124	230
95	799	475	203	58	280	0.1	0.0	15	23	441	596
96	827	538	3	170	373	0.0	0.2	95	66	344	1560
97	1020	404	31	262	142	0.3	7.4	56	176	1464	1987
98	805	361	14	124	117	0.0	0.4	63	41	2334	6662
99	912	361	24	86	66	0.1	0.1	12	53	625	682
100	822	430	28	149	100	0.3	1.4	36	90	1444	7108
101	1047	502	19	331	203	0.6	22.3	92	209	210	235
102	812	363	37	65	95	0.1	0.1	7	41	15	16
103	976	254	17	137	94	0.2	0.1	25	97	420	534
104	721	599	38	123	50	0.0	0.0	2	87	555	575

a) Ethylcarbammatkonzentration (vor UV-Bestrahlung)

b) Ethylcarbammatkonzentration (nach UV-Bestrahlung)

Keine der Proben überschreitet die zulässige Höchstkonzentration bezüglich Methanol von 1000 mg/100 ml A. für Kirsch- bzw. 1200 mg/100 ml A. für Zwetschgendestillate (21). Bezüglich der Verderbnisindikatoren 1-Propanol, 2-Propanol, 2-Butanol, Ethyllactat sowie Ethylacetat weist lediglich eine Probe (Nr. 36) Konzentrationen auf, die auf eine bakterielle Infektion der Maische schließen lassen. Die Proben 1, 2, 12 und 77 zeigen zwar noch keine vergleichbar hohen Werte, können jedoch auf Basis der erhöhten Werte einzelner Verderbnisindikatoren als verderbnisgefährdet angesehen werden. Die teilweise erhöhten Konzentrationen der Verbindungen Ethyllactat und Ethylacetat einzelner Proben lassen sich durch eine späte Umschaltung von Mittel- auf Nachlauf erklären und sind als Einzelverbindungen kein Indiz für einen bakteriellen Verderb der Maische (103).

Im Gegensatz dazu weisen bereits 16 % der Destillate vor und über 40 % nach Bestrahlung mit UV-Licht Ethylcarbamatkonzentrationen auf, die über dem zulässigen Höchstwert von 800 µg/l (22) liegen. Dieser hohe Anteil verdeutlicht das immer noch geringe Bewusstsein der Klein- und Obstbrenner bezüglich der Wichtigkeit der Umsetzung Blausäuremindernder Empfehlungen (104–106).

4.3 Einfluss brennereitechnologischer Verfahren auf die Isotopensignaturen in Destillaten

Voraussetzung für die Anwendbarkeit der Stabilisotopenanalytik zum Nachweis der geographischen Herkunft eines Lebensmittels ist die Variation ausgewählter Isotopenverhältnisse, bedingt durch klimatische und geologische Bedingungen am Ursprungsort. Fraktionierungsvorgänge während der Produktion können diese Isotopenverhältnisse verändern, so dass eine korrekte geographische Zuordnung nicht mehr möglich ist. Um eine zuverlässige Interpretation gemessener Stabilisotopenverhältnisse am Fertigprodukt „Kirsch“- bzw. „Zwetschgenwasser“ zu gewährleisten, wurden relevante Schritte der Obstbrandherstellung bezüglich einer Isotopenfraktionierung untersucht.

4.3.1 Einfluss des Hefestamms auf die Isotopenverhältnisse von Ethanol und Wasser

Der erste Prozessschritt im Verlauf der Obstbrandproduktion, der mit der Biotransformation des Ausgangsmaterials verbunden ist, ist die Vergärung des Fruchtzuckers zu Ethanol. Da biochemische Prozesse in der Regel mit Fraktionierungsvorgängen der beteiligten Stabilisotopen verbunden sind, wurde ein Einfluss des Hefestamms auf die Kohlenstoff- bzw. Wasserstoffisotopenverhältnisse am Ethanol sowie auf den $\delta^{18}\text{O}$ -Wert des Fruchtwassers überprüft.

Hierfür wurden ca. 1600 kg Kirschen der Sorte „Benjaminler“ aus der Region Schwarzwald (Jahrgang 2004) bezogen. Um Variationen der Isotopenmuster aufgrund unterschiedlicher Rohfrüchte ausschließen zu können, wurde das gesamte Material einer Ernte entnommen. Die Kirschen wurden mit Hilfe von Schwefelsäure auf einen pH-Wert von 3,0 eingestellt, in 12 Chargen zu je 130 kg aufgeteilt und anschließend mit 6 unterschiedlichen Hefestämmen der Art *Saccharomyces cerevisiae* versetzt (Tabelle 4). Die Hefemenge betrug jeweils 15 g/100 kg Maische; Verflüssigungsenzym wurde nicht zugesetzt.

Um sicherzustellen, dass die Bandbreite der in der Praxis verwendeten Hefestämme und deren Einfluss auf die Isotopenmuster der gewonnenen Destillate durch die Untersuchungen abgedeckt sind, wurden Hefen mit unterschiedlicher Verflüssigungswirkung ausgewählt. Während der Hefestamm Uvaferm CM eine mittlere Verflüssigungswirkung aufweist, ist der Stamm Uvaferm CEG stark verflüssigend. Die Stämme Uvaferm CGC 62, SIHA Aktivhefe 6 (Brennereihefe), Spirifer und Spirifer Classic besitzen annähernd keine Maischeverflüssigende Wirkung.

Alle Chargen wurden unter konstanten Gärbedingungen in einer Klimakammer vergoren, um Beeinflussungen durch Temperaturschwankungen auszuschließen. Die Raumtemperatur wurde nach der Hauptgärphase von ca. einer Woche von 18 °C auf 7 °C verringert und über eine Lagerzeit von zwei Monaten konstant gehalten.

Anschließend wurden die $\delta^{18}\text{O}$ -Werte direkt an der vergorenen Maische gemessen. Die $(\text{D}/\text{H})_I$ bzw. $(\text{D}/\text{H})_{II}$ -Verhältnisse sowie der $\delta^{13}\text{C}$ -Wert des Ethanols wurden im jeweiligen Mittellauf der Destillate bestimmt, die unter Standardbedingungen (siehe 3.2.2.1) in der Versuchs- und Lehrbrennerei Weihenstephan hergestellt wurden.

In Tabelle 16 sind die Mittelwerte der Wasserstoff- und Kohlenstoffisotopenverhältnisse des Ethanol sowie der $\delta^{18}\text{O}$ -Werte des Wassers der jeweiligen Chargen eines Hefestamms gegenübergestellt.

Tabelle 16: Einfluss des Hefestamms auf Stabilisotopenverhältnisse ^{a)}

Charge	Hefestamm	$\delta^{13}\text{C}$ [‰ vs. V-PDB]	(D/H) _I [ppm]	(D/H) _{II} [ppm]	$\delta^{18}\text{O}$ [‰ vs. V-SMOW]
1/2	Uvaferm CM	-27,35	99,36	127,45	3,35
3/4	Uvaferm CEG	-27,36	99,19	127,74	3,28
5/6	Uvaferm CGC 62	-27,34	99,06	127,29	3,30
7/8	Spiriform	-27,33	99,21	127,71	3,30
9/10	Spiriform Classic	-27,42	99,00	127,63	3,17
11/12	SIHA Aktivhefe 6	-27,27	99,31	127,80	3,30
	Maximale Differenz	0,15	0,36	0,51	0,18
	Wiederholgrenze	0,17	0,55	0,64	0,42

^{a)} Die angegebenen Isotopenverhältnisse sind Mittelwerte aus den Messwerten der jeweiligen Chargen

Die Ergebnisse stehen in Einklang mit vorangegangenen Untersuchungen, die zeigen, dass der Fermentationsprozess grundsätzlich keine signifikante Veränderung der Kohlenstoffisotopenverhältnisse bei der Umwandlung des vergärbaren Zuckers zu Ethanol sowie des $\delta^{18}\text{O}$ -Wertes des Wassers bewirkt (15, 107). Vergleicht man die maximalen Differenzen der entsprechenden Isotopenverhältnisse $\delta^{13}\text{C}$ und $\delta^{18}\text{O}$, die zwischen den einzelnen Chargen eines Hefestamms auftreten, mit den jeweiligen Wiederholgrenzen, so ist kein signifikanter Einfluss des Hefestamms zu beobachten. Im Gegensatz dazu bewirkt die Fermentation eine deutliche Deuteriumanreicherung der Methyl- bzw. Methylengruppe des Ethanol im Vergleich zu den Ausgangssubstanzen Zucker und Wasser (42). Untersuchungen von Faul und Wittkowski (108) sowie Vallet et al. (109) zeigten, dass das (D/H)_I-Verhältnis unabhängig vom Hefestamm ist, was auch durch die Ergebnisse in Tabelle 16 bestätigt wird. Im Gegensatz dazu scheint das (D/H)_{II}-Verhältnis von Ethanol durch die Verwendung unterschiedlicher Hefestämme beeinflussbar. So konnten bei der Vergärung von

Weintrauben durch unterschiedliche Stämme der Hefeart *Saccharomyces cerevisiae* signifikante Differenzen im Wasserstoffisotopenverhältnis der Methylengruppe nachgewiesen werden (108). Andere Untersuchungen konnten hingegen entweder keine Abhängigkeit vom Hefestamm (42) oder nur eine Beeinflussung durch die Verwendung unterschiedlicher Hefearten (*Saccharomyces cerevisiae* bzw. *Saccharomyces uvarum*) (110) feststellen. Neben dem Hefestamm wird das (D/H)_{II}-Verhältnis des weiteren vom Fortschritt der Fermentation beeinflusst, wodurch Gärstockungen zu niedrigeren Werten führen können (109). Bei der Weinherstellung kommen eine vielfach höhere Anzahl unterschiedlicher Hefearten und -Stämme zum Einsatz, während bei der Obstbrandproduktion fast ausschließlich Stämme der Hefeart *Saccharomyces cerevisiae* verwendet werden. Ausnahmen bilden wenige Obstbrenner, die auf eine Zugabe von Reinzuchthefen verzichten und die Maische spontan vergären lassen (siehe Tabelle 5 bis Tabelle 8).

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Hefestämmen, die auch in der Praxis weit verbreitet sind, konnte kein signifikanter Unterschied in den resultierenden (D/H)_{II}-Verhältnissen festgestellt werden, wodurch eine Abhängigkeit der Wasserstoff- und Kohlenstoffisotopenverhältnisse des Ethanols und des ¹⁸O/¹⁶O-Verhältnisses des Wassers vom eingesetzten Hefestamm vernachlässigt werden kann.

4.3.2 Beeinflussung der Stabilisotopenverhältnisse am Ethanol durch den Destillationsschritt

Den entscheidenden technologischen Unterschied zwischen der Produktion von Wein und der Obstbrandherstellung stellt der Destillationsschritt dar. Während kinetische (irreversible) Verdampfungsprozesse stets mit einem normalen Isotopeneffekt und somit mit einer Anreicherung der leichteren Isotopologen in der Dampfphase verbunden sind, kann es im thermodynamischen Gleichgewicht auch zum gegenteiligen Effekt, dem so genannten inversen Isotopeneffekt kommen. Dieser hat eine Anreicherung der leichteren Isotopologen in der flüssigen Phase zur Folge. Dieses Phänomen konnte bei der Destillation von Ethanol und Ethanol-Wasser Mischungen mittels Drehbandkolonne bezüglich der Fraktionierung der Kohlenstoff- sowie der Wasserstoffisotopologen der Methyl- bzw. Methylengruppen des Ethanols beobachtet werden (74, 76).

Im Gegensatz zu Destillationen unter festgelegten Laborbedingungen, bei denen gezielt ein gewisser thermodynamischer Zustand erzwungen werden kann, kommt es bei der Destillation von Obstmaischen mittels Abfindungsbrennegerät zu einer ständigen Überlagerung von kinetischen Vorgängen und Aggregatzustandsänderungen, die im thermodynamischen Gleichgewicht stattfinden.

Da eine Änderung der Isotopenverhältnisse im Verlauf der Destillation den Herkunftsnachweis eines Obstbrandes beeinflussen könnte, wurde die Fraktionierung der relevanten Stabilisotopenverhältnisse mittels Pilot- und Laboranlagendestillationen überprüft.

4.3.2.1 Fraktionierung der Kohlenstoffisotopologe des Ethanols während der Destillation

Um die Fraktionierung der Kohlenstoffisotopologe des Ethanols während der Destillation zu überprüfen, wurden jeweils 130 kg Kirschmaische (Chargen 6, 8 und 10, Tabelle 4) mittels Abfindungsbrennegerät unter Standardbedingungen (siehe 3.2.2.1) destilliert und das Destillat in 500 ml Fraktionen aufgeteilt. Die Änderung der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte im Verlauf der Destillation zeigt Abbildung 12.

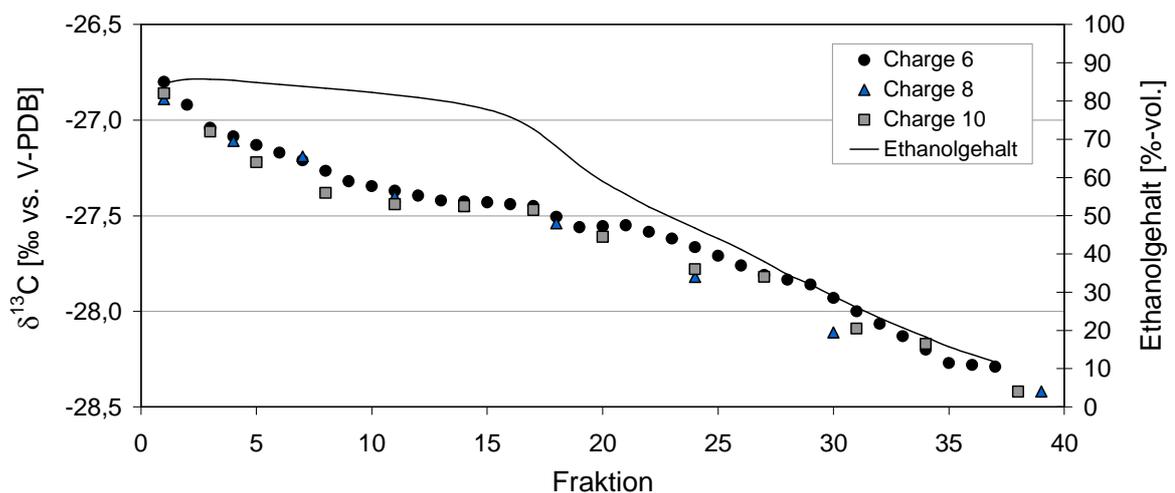


Abbildung 12: Fraktionierung der Kohlenstoffisotopologe des Ethanols während der Destillation vergorener Kirschmaischen mittels Pilotanlage

Deutlich ist die Abnahme des $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes im Verlauf der Destillation zu erkennen. Während die erste Fraktion mit einem $\delta^{13}\text{C}$ -Wert von $-26,80$ ‰ das positivste

$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis aufweist, sinkt dieser bis zum Ende der Destillation um mehr als 1,5 % auf $-28,42$ %. Vergleicht man den Ausgangswert der Maische ($-27,61$ %) mit dem der ersten Fraktion, so ist ein deutlicher inverser Isotopeneffekt zu beobachten.

Um einen Einfluss der zahlreichen Inhaltsstoffe einer Obstmaische und deren Konsistenz auf die Isotopenfraktionierung ausschließen zu können, wurden mit Hilfe einer Labordestillationsanlage Ethanol-Wasser Mischungen mit einem Ethanolgehalt von 10 %-vol. destilliert. Dieser Gehalt entspricht den Werten, die in den vergorenen Kirschmaischen der Versuchs- und Lehrbrennerei Weihenstephan gemessen wurden. Destilliert wurden jeweils 6 l der Ausgangsmischung unter Zuschaltung von 2 Böden und der Dephlegmatoreinstellung $1/3$. Das erhaltene Destillat wurde während der Destillation in Fraktionen zu jeweils 100 ml aufgeteilt. Abbildung 13 zeigt die Änderung der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte im Verlauf der Destillation der Ethanol-Wasser Mischung

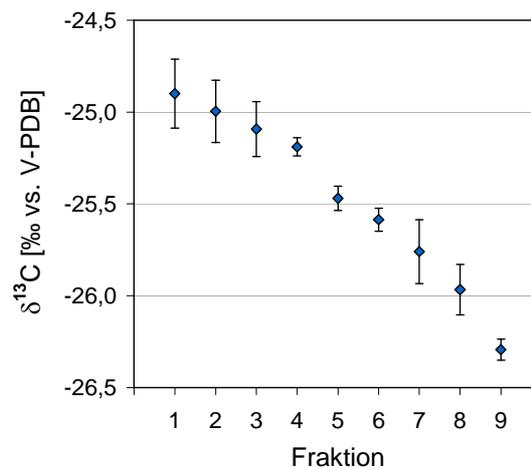


Abbildung 13: Fraktionierung der Kohlenstoffisotopologe des Ethanols während der Destillation einer Ethanol-Wasser Mischung mittels Laboranlage. Die Balken entsprechen den 95 % Konfidenzintervallen, berechnet aus den Einzelmesswerten der Fraktionen dreier Destillationen unter identischen Bedingungen

Durch den Vergleich von Abbildung 12 mit Abbildung 13 wird ersichtlich, dass die Fraktionierung der Kohlenstoffisotopologe des Ethanols unabhängig von den Inhaltsstoffen der vergorenen Maische zu beobachten ist. Die Unterschiede in den Absolutwerten der jeweiligen Messwerte ergeben sich aus den unterschiedlichen Isotopengehalten des Ethanols in den Ausgangsmaterialien Maische bzw. Ethanol-

Wasser Mischung. Die beobachteten Kohlenstoffisotopenfraktionierungen stimmen mit den Ergebnissen überein, die bei der Destillation von Ethanol–Wasser Mischungen mittels Drehbandkolonne im thermodynamischen Gleichgewicht ermittelt wurden (74, 76).

4.3.2.2 Änderung der D/H–Verhältnisse am Ethanol im Verlauf der Destillation

Neben der Fraktionierung der Kohlenstoffisotopologe des Ethanols bewirkt eine Destillation durch die physikalischen Vorgänge während des Phasenübergangs auch eine Änderung der Wasserstoffisotopenverhältnisse an der Methyl– bzw. Methylengruppe von Ethanol. Die Abhängigkeit der $(D/H)_I$ – bzw. $(D/H)_{II}$ –Verhältnisse vom Fortschritt der Destillation der Kirschmaischen mit Hilfe der Pilotanlage zeigt Abbildung 14.

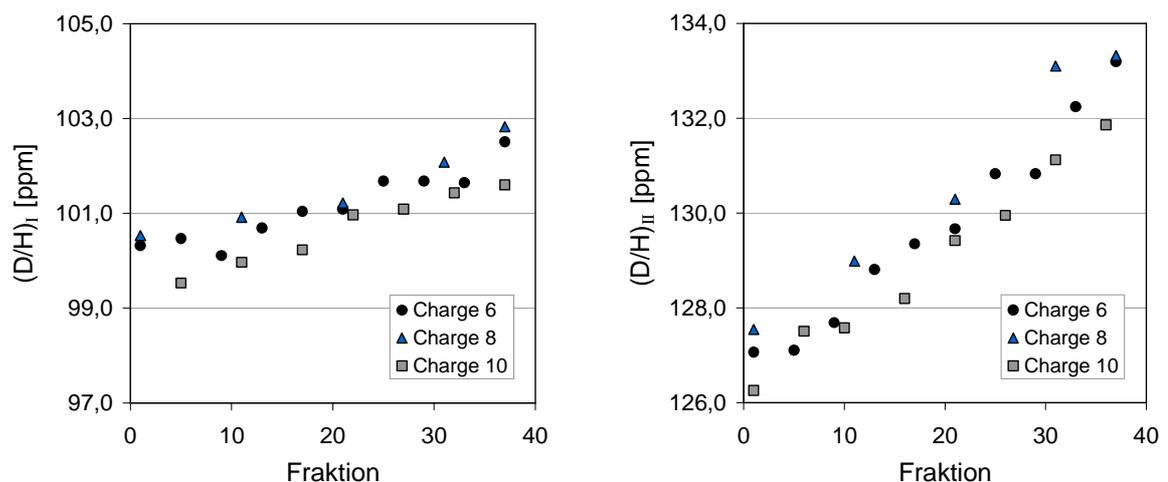


Abbildung 14: Fraktionierung der Wasserstoffisotopologe des Ethanols im Verlauf der Destillation einer Kirschmaische mittels Pilotanlage

Die Ergebnisse der SNIF–NMR[®]–Analyse der Fraktionen aus der Destillation der Kirschmaischen zeigen im Gegensatz zum Verlauf der $\delta^{13}\text{C}$ –Werte einen Anstieg der Wasserstoffisotopenverhältnisse des Ethanols im Verlauf der Destillation. So konnte für das $(D/H)_{II}$ –Verhältnis eine durchschnittliche Erhöhung von 127,0 ppm auf 132,9 ppm ermittelt werden. Der mittlere Anstieg des Wasserstoffisotopenverhältnisses an der Methylgruppe von 100,4 ppm auf 102,4 ppm ist geringer. Unter Berücksichtigung der entsprechenden D/H–Verhältnisse der vergorenen Maische

((D/H)_I: 100,98 ppm; (D/H)_{II}: 129,9 ppm) ist für die Fraktionierung der Wasserstoffisotopologie des Ethanols im Verlauf der Destillation ein deutlicher normaler Isotopeneffekt zu beobachten.

Zur Bestätigung der D/H-Verläufe wurden analog zur Ermittlung der Kohlenstoffisotopenfraktionierung die D/H-Verhältnisse im Destillat der Ethanol-Wasser Mischungen, die mittels Laboranlage erzeugt wurden, bestimmt.

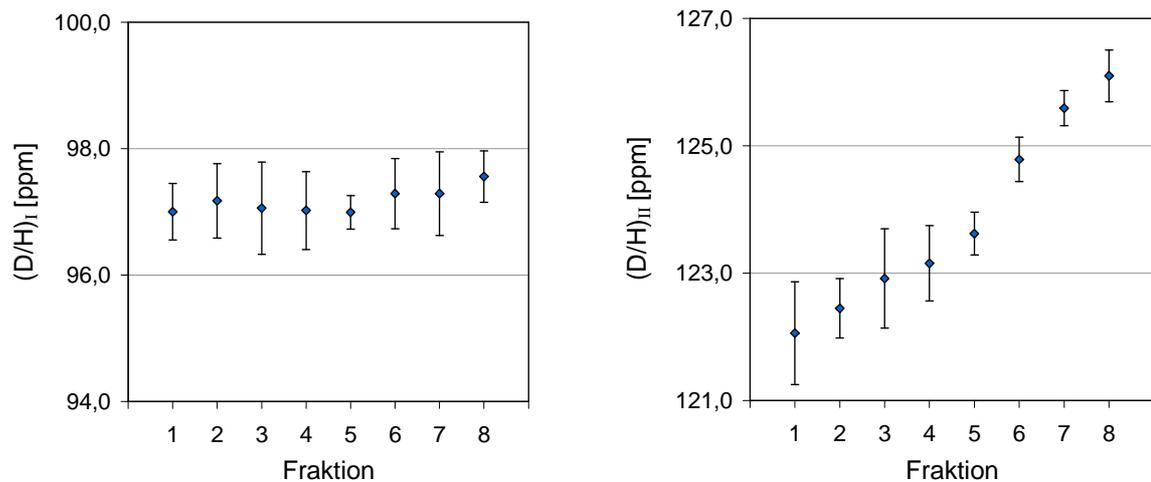


Abbildung 15: Fraktionierung der Wasserstoffisotopologie des Ethanols im Verlauf der Destillation einer Ethanol-Wasser Mischung mittels Laboranlage. Die Balken entsprechen den 95 % Konfidenzintervallen, berechnet aus den Einzelmesswerten der Fraktionen dreier Destillationen unter identischen Bedingungen

Während der normale Isotopeneffekt für die Fraktionierung der Wasserstoffisotope an der Methylengruppe durch die Destillation der Ethanol-Wasser Mischung bestätigt werden konnte, ist der Anstieg der (D/H)_I-Verhältnisse nicht signifikant. Jedoch wurden nur die ersten acht der insgesamt 13 Fraktionen analysiert, da die Ethanolmenge in den restlichen Fraktionen für eine ²H-NMR-Messung nicht ausreichend war.

Die Änderungen der D/H-Verhältnisse weichen von den für die Destillation in Drehbandkolonnen beschriebenen Ergebnissen ab; die während der Destillation mittels Pilot- und Laboranlagen ermittelten Daten sind typisch für einen irreversiblen, kinetischen physikalischen Prozess (74).

4.3.2.3 Einfluss der Destillationstechnik auf die Isotopenverhältnisse am Ethanol

Unter thermodynamischen Gleichgewichtsbedingungen wurde für die Destillation von Ethanol–Wasser Mischungen mittels Drehbandkolonne eine Abhängigkeit des Fraktionierungsfaktors α von der Anzahl der theoretischen Böden festgestellt (74).

Da für die Obstbrandproduktion die Zuschaltung von bis zu drei Verstärkerböden und die Verwendung eines Dephlegmators erlaubt sind, wurde der Einfluss dieser beiden Verstärkereinrichtungen auf die beschriebene Fraktionierung der Kohlenstoff- und Wasserstoffisotopologe des Ethanols im Verlauf der Destillation überprüft. Hierfür wurden Ethanol–Wasser Mischungen ohne Einsatz von Verstärkereinrichtungen, unter alleiniger Verwendung des Dephlegmators und unter Zuschaltung von drei Glockenböden ohne Dephlegmatorverwendung mittels Laboranlage destilliert. Die Änderungen der Kohlenstoff- und Wasserstoffisotopenverhältnisse am Ethanol sind in Abbildung 16 dargestellt.

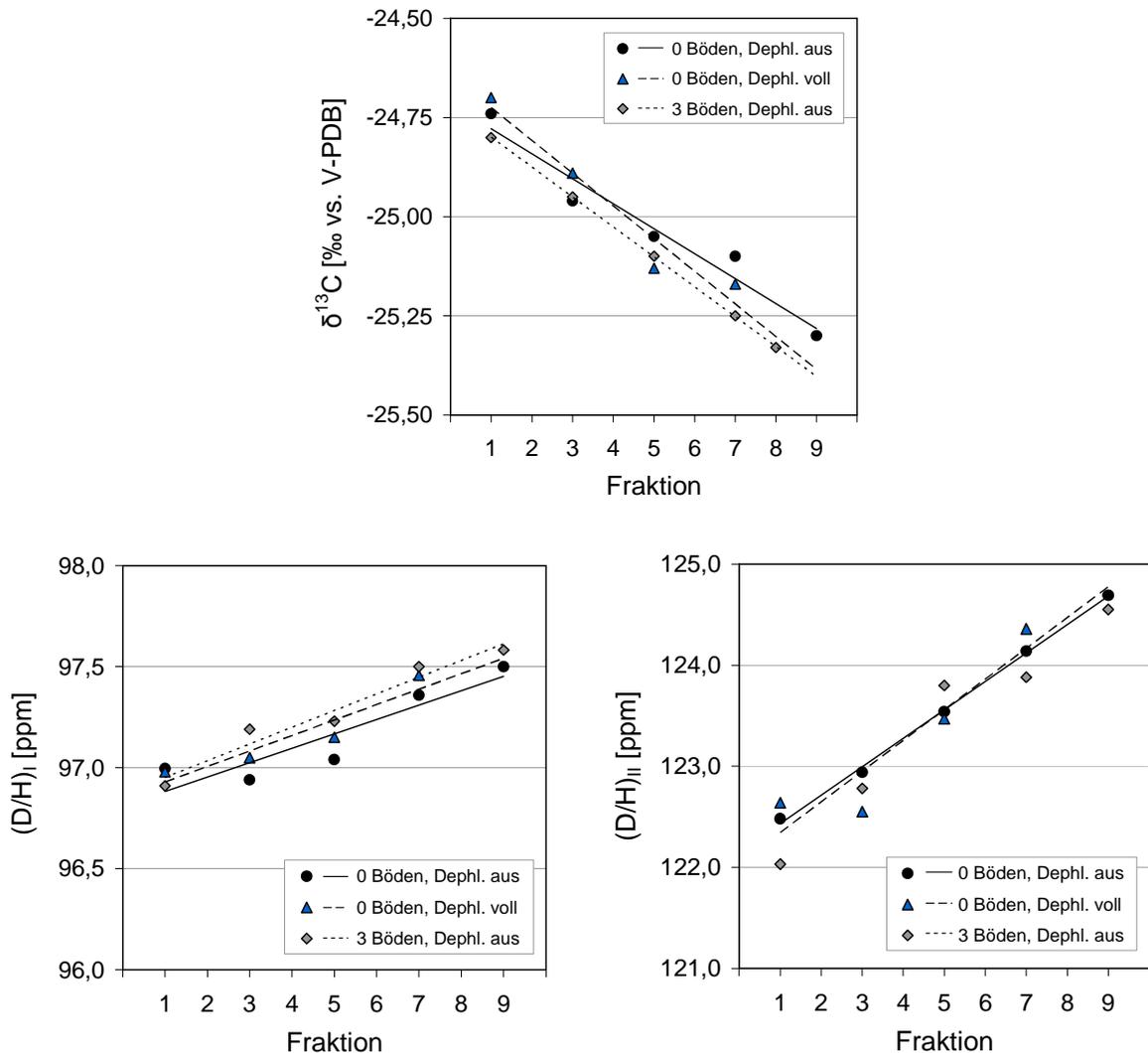


Abbildung 16: Einfluss von Dephlegmator und Glockenböden auf die Fraktionierung der Kohlenstoff- und Wasserstoffisotopologe des Ethanols im Verlauf der Destillation mittels Laboranlage

Der Abbildung ist zu entnehmen, dass unter allen drei Bedingungen Isotopenfraktionierungen zu beobachten sind, die analog den zuvor während der Destillationen mittels Pilot- und Laboranlage gezeigten Fraktionierungen verlaufen. Zudem besteht kein signifikanter Unterschied in den jeweiligen Isotopenverhältnissen der entsprechenden Fraktionen, die unter Variation von Bodenanzahl und Dephlegmatoreinstellung gewonnen wurden. Die linearen Regressionsgeraden der jeweiligen Messreihen zeigen eine etwas geringere Steigung der jeweiligen Verläufe bei der Destillation ohne Verstärkereinrichtungen. Dies lässt sich durch die teilweisen Phasenübergänge

beim Passieren des Ethanol–Wasser Dampfes der Glockenböden und des Dephlegmators erklären. Auch hier treten Fraktionierungseffekte auf, wodurch die resultierende Gesamtfractionierung während der Destillation verstärkt wird. Jedoch ist dieser Einfluss sehr gering. Dies lässt vermuten, dass der hauptsächlich für die Fraktionierung verantwortliche Phasenübergang beim Verdampfen der Ethanol–Wasser Mischung direkt in der Blase stattfindet. Zwar kommt es theoretisch auch zu einer Kondensation und einer erneuten Verdampfung auf den Glockenböden. Dies geschieht jedoch hauptsächlich zu Beginn der Destillation, da die Wirkung der Böden im Verlauf der Destillation sehr schnell nachlässt und es somit im weiteren Destillationsverlauf zu keiner nennenswerten Isotopenfraktionierung kommt. Auch sinkt die Kondensationsleistung des Dephlegmators sehr schnell, da das Wasser in dessen Innenraum rasch vom aufsteigenden Dampf erhitzt wird. Somit wirkt sich auch die Destillationstechnik nicht signifikant bei der Interpretation von Kohlenstoff– und Wasserstoffisotopenverhältnissen am Ethanol bezüglich einer regionalen Herkunftsbestimmung aus. Zur Bestätigung wurden an der Versuchs– und Lehrbrennerei Weihenstephan die Rohbrände der Chargen 2–4 ein zweites Mal destilliert. Die Destillation fand wie bei der Herstellung von Feinbränden aus Rohbränden üblich ohne Verstärkereinrichtungen statt (siehe 3.2.2.1). Tabelle 17 zeigt die Gegenüberstellung der Kohlenstoff– und Wasserstoffverhältnisse am Ethanol des resultierenden Mittellaufs und der Mittelläufe aus den einfachen Destillationen mit Verstärkereinrichtungen der Chargen 1, 7 und 9.

Tabelle 17: Abhängigkeit der Kohlenstoff– und Wasserstoffisotopenverhältnisse des Ethanols von der Destillationstechnik

Charge	Destillationstechnik	$\delta^{13}\text{C}$ [% vs. V–PDB]	(D/H) _I [ppm]	(D/H) _{II} [ppm]
1	Feinbrand aus Maische	–27,34	100,50	128,59
7	Feinbrand aus Maische	–27,46	100,70	128,29
9	Feinbrand aus Maische	–27,55	100,59	128,28
2 – 4	Feinbrand aus Rohbrand	–27,28	100,01	127,87
Maximale Differenz zw. FB und RB^{a)}		0,27	0,69	0,72
Wiederholgrenze		0,17	0,55	0,64

^{a)} FB: Feinbrand aus Maische; RB: Feinbrand aus Rohbrand

Die maximalen Differenzen zwischen den Isotopenverhältnissen der Destillate, die durch einmalige Destillation aus der Maische (FB) gewonnen wurden und dem Feinbrand aus den drei Rauhbränden (RB) liegen über den jeweiligen Wiederholgrenzen. Diese Unterschiede lassen sich mit der Herstellung des Rauhbrandes erklären: Während hier zwar kein Vorlauf abgetrennt wird, bleibt wegen des Abbruchs der Destillation bei ca. 5 %–vol. in der Vorlage ein geringer Anteil des Ethanol der vergorenen Maische in der Schlempe zurück. Durch die beschriebenen Fraktionierungen weisen die resultierenden Rauhbrände geringfügig positivere $\delta^{13}\text{C}$ und entsprechend niedrigere D/H-Verhältnisse als die ursprüngliche Maische auf. Diese Unterschiede zeigen sich schließlich auch in den Isotopenverhältnissen des Feinbrands, der durch die Destillation dieser Rauhbrände entsteht. Da diese Beeinflussung der Isotopenverhältnisse der resultierenden Mittelläufe jedoch äußerst gering ist, stellt die Destillationstechnik keine Beschränkung der Anwendbarkeit der Methode zum Herkunftsnachweis dar.

4.3.2.4 Abhängigkeit der Isotopenverhältnisse am Ethanol von den Grenzen der Mittellauffraktion

Wie gezeigt werden konnte, unterliegen alle für den Herkunftsnachweis relevanten Isotopenverhältnisse am Ethanol während der Destillation einer mehr oder weniger starken Fraktionierung. Aufgrund dieser Fraktionierung variieren auch die jeweiligen Isotopenverhältnisse in Vor-, Mittel- und Nachlauf.

Während die Vorlaufmenge im Allgemeinen mit 1 % der zu destillierenden Maischemenge angenommen werden kann, schwankt der Ethanolgehalt in der Vorlage, bei der von Mittel- auf Nachlauf umgeschaltet wird, in der Praxis üblicherweise zwischen folgenden Grenzen:

- a) Umstellung auf NL bei einem Ethanolgehalt von 65 %–vol. in der Vorlage,
- b) Umstellung auf NL bei einem Ethanolgehalt von 50 %–vol. in der Vorlage

Deshalb wurden aus den Isotopenverhältnissen der einzelnen Destillatfraktionen der Chargen 6, 8 und 10 die resultierenden Kohlenstoff- bzw. Wasserstoffisotopenverhältnisse des Mittellaufs (Π_{ML}) in Abhängigkeit vom Ethanolgehalt beim Wechsel zwischen Mittel- und Nachlauf gemäß Formel 8 berechnet.

Formel 8: Berechnung der Isotopenverhältnisse der Mittellauffraktion

$$\Pi_{ML} = \frac{\sum_{i=a}^b (\Pi \cdot A)_i}{\sum_{i=a}^b A_i}$$

Π = D/H bzw. $\delta^{13}\text{C}$
 A = Alkoholgehalt der Fraktion in %-vol.
 i = Fraktion
 a = erste Fraktion des ML
 b = letzte Fraktion des ML

Während die erste Fraktion (a) des Mittellaufs, bedingt durch die festgesetzte Vorlaufmenge, als konstant betrachtet werden kann, wird die letzte Fraktion (b) variiert. Dies entspricht dem Wechsel von Mittel- auf Nachlauf bei unterschiedlichen Ethanolgehalten in der Vorlage. Hierdurch erhält man die jeweiligen Isotopenverhältnisse, die ein Mittellauf in Abhängigkeit des Ethanolgehaltes beim Wechsel ML–NL aufweisen würde. Da nur ausgewählte Fraktionen der drei fraktionierten Destillationen der Kirschmaische hinsichtlich ihrer Kohlenstoff- bzw. Wasserstoffisotopenverhältnisse am Ethanol analysiert wurden, wurden die fehlenden Messwerte, die für die Bestimmung von Π_{ML} notwendig sind, durch Berechnung von Regressionsgeraden ermittelt. Die jeweiligen Bestimmtheitsmaße (r^2) lagen zwischen 0,95 und 0,99. Tabelle 18 zeigt die mittels Regressionsgeraden und Formel 8 berechneten Kohlenstoff- und Wasserstoffisotopenverhältnisse des Ethanols in Abhängigkeit des Wechsels von Mittel- auf Nachlauf gemäß der beiden Fälle (a) und (b).

Tabelle 18: Abhängigkeit der Kohlenstoff- und Wasserstoffisotopenverhältnisse am Ethanol vom Wechsel zwischen Mittel- und Nachlauf

Charge	Alkoholgehalt beim Wechsel ML-NL ^{a)} [%-vol.]	$\delta^{13}\text{C}$ Mittellauf [% vs. V-PDB]	(D/H) _I Mittellauf [ppm]	(D/H) _{II} Mittellauf [ppm]
6	65	-27,28	100,61	128,18
	50	-27,34	100,73	128,52
Differenz		0,06	0,12	0,34
8	65	-27,35	100,00	127,74
	50	-27,41	100,16	128,12
Differenz		0,06	0,16	0,38
10	65	-27,24	100,93	129,03
	50	-27,32	101,03	129,30
Differenz		0,08	0,10	0,27
Wiederholgrenze		0,17	0,55	0,64

^{a)} ML: Mittellauf; NL: Nachlauf

Die maximale Differenz der $\delta^{13}\text{C}$ - Werte zwischen den jeweiligen Mittelläufen einer Charge liegt mit einem Betrag von 0,08 % unter der Wiederholgrenze von zwei aufeinander folgenden Messungen. Die Wiederholgrenze ist in der Commission Regulation (EC) No 440/2003 für die Messung von Kohlenstoffisotopenverhältnissen am Ethanol mit 0,24 % angegeben (85). Unter den hier angewandten Messbedingungen nahm dieser Wert einen Betrag von 0,17 % an.

Vergleicht man analog die entsprechenden Differenzen der (D/H)_I- bzw. (D/H)_{II}-Verhältnisse, die aus dem Wechsel zwischen Mittel- und Nachlauf bei unterschiedlichen Alkoholgehalten resultieren, so zeigt sich auch hier, dass die Maximalbeträge von 0,16 ppm bzw. 0,38 ppm unter den jeweiligen Wiederholgrenzen von 0,55 ppm bzw. 0,64 ppm liegen.

Daraus wird ersichtlich, dass trotz der messbaren Isotopenfraktionierungen im Verlauf der Destillation die Anwendbarkeit der Methode für den Nachweis der geographischen Herkunft von Obstbränden durch einen Wechsel zwischen Mittel- und Nachlauf innerhalb praxisüblicher Grenzen nicht beeinflusst wird.

4.3.3 Vergleich der Kohlenstoff- und Wasserstoffisotopenverhältnisse von Original- und Pilotanlagendestillaten

Um den Einfluss der Summe aller während der Obstbrandherstellung auftretenden Fraktionierungen bewerten zu können, wurden authentische vergorene Kirschmaischen unter konstanten Bedingungen (siehe 3.2.2.2) mittels Labordestillationsanlage destilliert. Die Destillate wurden anschließend bezüglich der Kohlenstoff- und Wasserstoffisotopenverhältnisse des Ethanols analysiert und die Ergebnisse mit den entsprechenden Daten der Originaldestillate verglichen. Diese Destillate wurden aus denselben Maischen von unterschiedlichen Kleinbrennern unter Bedingungen hergestellt, die einen Großteil der in der Praxis üblichen Variationen abdecken. So kamen neben unterschiedlichen Hefestämmen auch Brenngeräte verschiedener Hersteller zum Einsatz, mit denen die vergorenen Maischen mittels einfacher oder zweifacher Destillation mit oder ohne Verstärkereinrichtungen destilliert wurden, wobei der Wechsel zwischen Mittel- und Nachlauf je nach Probe innerhalb bestimmter Grenzen schwankte.

Abbildung 17 zeigt die Korrelationen der Kohlenstoff- bzw. Wasserstoffisotopenverhältnisse des Ethanols der Originalproben und der aus den entsprechenden vergorenen Maischen mittels Laboranlagen gewonnenen Destillate.

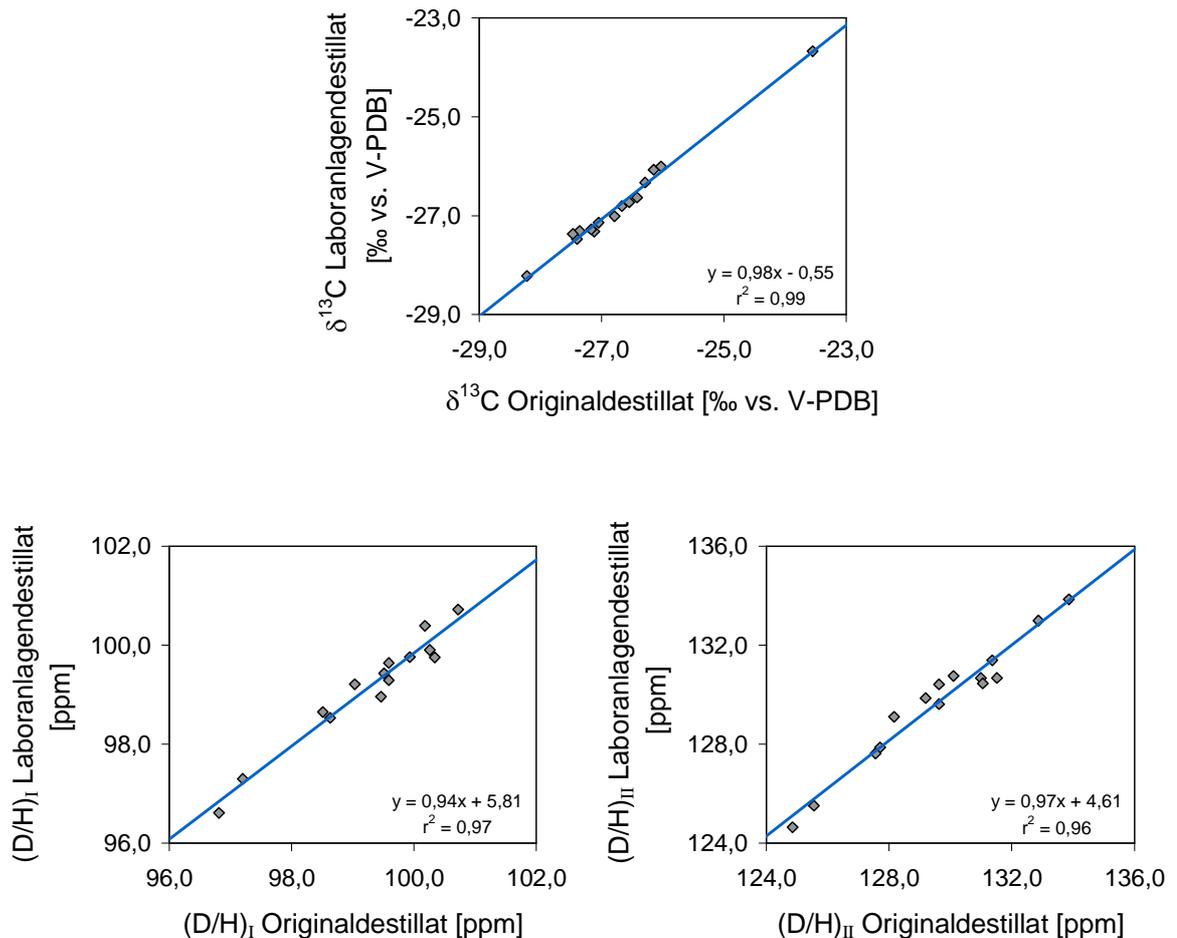


Abbildung 17: Vergleich der Kohlenstoff- und Wasserstoffisotopenverhältnisse des Ethanols von Original- und Laboranlagendestillaten

Die ermittelten Stabilisotopenverhältnisse der Laboranlagendestillate korrelieren mit Bestimmtheitsmaßen (r^2) zwischen 0,96 und 0,99 in hohem Maße mit den entsprechenden Werten der Originaldestillate. Zudem weisen die berechneten Ausgleichsgeraden, bezogen auf die Absolutwerte der Isotopenverhältnisse, relativ geringe Achsenabschnitte sowie Steigungen von näherungsweise eins auf.

Dies zeigt, dass auch die Summe der einzelnen Produktionsabschnitte im Verlauf der Obstbrandherstellung keine signifikante Beeinflussung der gemessenen Stabilisotopenverhältnisse bewirkt, obgleich geringe Isotopenfraktionierungen während der einzelnen Verfahrensschritte zu beobachten sind.

Zum einen wird hierdurch die grundsätzliche Anwendbarkeit der untersuchten Stabilisotopenverhältnisse beim Nachweis der Herkunft von Obstbränden bestätigt. Zusätzlich ergeben sich daraus aber auch Vorteile für die praktische Anwendung der

Methode. Während im Rahmen dieser Arbeit authentische Kirsch- und Zwetschgendestillate der beteiligten Brenner für die Datengewinnung herangezogen werden mussten, ist es für die Erstellung einer zukünftigen Datenbank ausreichend, Rohfrüchte aus den jeweiligen geographischen Regionen zu beziehen. Die Möglichkeit, diese analog zur Isotopenanalyse im Weinsektor unter konstanten Bedingungen im Labormaßstab ohne signifikante Beeinflussung der relevanten Isotopenverhältnisse vergären und anschließend destillieren zu können, macht die Datenerhebung unabhängig von der Unterstützung zuverlässiger Obstbrandhersteller. Somit können Proben beliebiger geographischer Herkunft in eine spätere Datenbank aufgenommen werden, unabhängig von der tatsächlich vorherrschenden Brennereidichte. Darüber hinaus erlaubt dies die zuverlässige Untersuchung von Handelsproben unbekannter geographischer Herkunft, deren Herstellungsbedingungen nicht vollständig dokumentiert sind, wie dies bei ausländischen Destillaten denkbar wäre.

4.3.4 Abhängigkeit des $\delta^{18}\text{O}$ -Wertes des Wassers eines Obstbrandes durch Destillation und Verschneiden auf Trinkstärke

Das Sauerstoffisotopenverhältnis eines trinkfertigen Obstbrandes setzt sich aus dem $\delta^{18}\text{O}$ -Wert des Mittellaufs und dem des Verschnittwassers zusammen. Daher wurde neben dem Einfluss des Destillationsschrittes auf das $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ -Verhältnis des Wassers auch die Beeinflussung dieses Wertes durch das anschließende Verschneiden des Mittellaufs auf Trinkstärke untersucht.

4.3.4.1 Beeinflussung des $\delta^{18}\text{O}$ -Wertes des Wassers durch den Destillationsprozess

Um den Einfluss des Destillationsschrittes auf die Sauerstoffisotopenverhältnisse des Wassers zu überprüfen, wurden fünf Fraktionen aus der fraktionierten Destillation von Charge 6 bezüglich ihrer $\delta^{18}\text{O}$ -Werte analysiert.

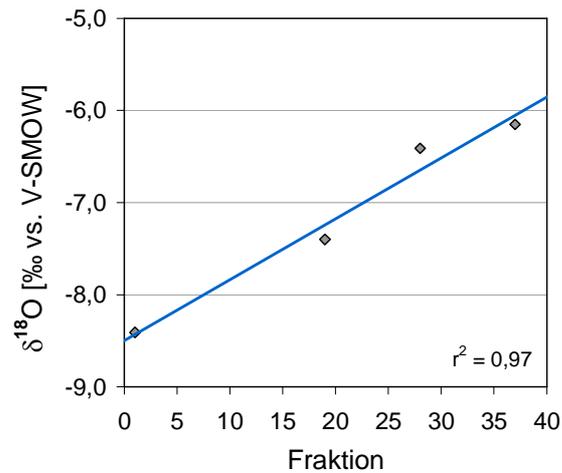


Abbildung 18: Änderung des $\delta^{18}\text{O}$ -Werts von Wasser im Verlauf der Destillation von Charge 6

Die in Abbildung 18 dargestellten Ergebnisse bestätigen den normalen Isotopen-effekt, verbunden mit der Anreicherung des leichteren Isotopologs im Destillat, wie er in der Literatur für die Fraktionierung der ^{18}O -Isotope des Wassers sowohl für die Destillation im thermodynamischen Gleichgewicht als auch unter irreversiblen Bedingungen beschrieben ist (43, 73). Aufgrund dieser Isotopenfraktionierung wurde analog zu den Betrachtungen der Isotopenverhältnisse des Ethanols der Einfluss des Wechsels zwischen Mittel- und Nachlauf auf den entsprechenden $\delta^{18}\text{O}$ -Wert des Mittellaufs untersucht. Hierfür wurden Fraktionen der Destillate der Chargen 6 und 8 entsprechend eines Wechsels bei praxisüblichen Grenzwerten von 65 %-vol. bzw. 50 %-vol. vereint. Anschließend wurden die $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ -Verhältnisse des Wasseranteils der resultierenden Mittelläufe analysiert und auf Basis der Wiederholgrenze der angewandten Messmethode miteinander verglichen. Die gemessenen Sauerstoffisotopenverhältnisse zeigt Tabelle 19.

Tabelle 19: Abhängigkeit des $\delta^{18}\text{O}$ -Werts des Wassers vom Wechsel zwischen Mittel- und Nachlauf

Wechsel zw. ML und NL bei	$\delta^{18}\text{O}$ -Wert Wasser	
	Charge 6	Charge 8
65 %-vol.	-7,00	-5,86
50 %-vol.	-6,88	-6,23
Differenz	0,12	0,37
Wiederholgrenze	0,42	

Wie die Ergebnisse zeigen, bewirkt der Wechsel zwischen Mittel- und Nachlauf bei unterschiedlichen Ethanolgehalten nur eine geringe Differenz der Sauerstoffisotopenverhältnisse des Wassers eines Destillats. Die gemessenen Unterschiede liegen unterhalb der Wiederholgrenze und beeinflussen somit die Anwendbarkeit der Methode für den geographischen Herkunftsnachweises eines Obstbrandes nicht. Außerdem setzt sich der Wasseranteil eines trinkfertigen Produkts aus dem des Mittellaufs sowie dem Verschnittwasser zusammen. Durch das Verschneiden werden auch die messbaren Differenzen der $\delta^{18}\text{O}$ -Werte im Fertigprodukt geringer und können somit vernachlässigt werden.

4.3.4.2 Beeinflussung der Aussagekraft des $\delta^{18}\text{O}$ -Wertes des Wassers eines Obstbrandes durch das Verschneiden des Mittellaufs auf Trinkstärke

Im Gegensatz zu den Kohlenstoff- und Wasserstoffisotopenverhältnissen des Ethanols, die während des Verschneidens des Mittellaufs auf Trinkstärke konstant bleiben, setzt sich der $\delta^{18}\text{O}$ -Wert des Wassers eines Obstbrandes aus dem Sauerstoffisotopenverhältnis des Wassers im Mittellauf sowie dem des Verschnittwassers zusammen.

Das Verhältnis von Mittellauf zu Verschnittwasser hängt dabei zum einen vom Ethanolgehalt des Mittellaufs, zum anderen von der gewünschten Trinkstärke des Fertigdestillats ab, die üblicherweise zwischen 40,0 und 45,0 %-vol. liegt.

Um die Summe der Einflüsse beider Faktoren bewerten zu können, wurden die $\delta^{18}\text{O}$ -Werte des Fertigdestillats mit denen der zugehörigen Mittelläufe verglichen. Die $\delta^{18}\text{O}$ -Werte der Mittelläufe wurden hierfür aus den gemessenen Sauerstoffisotopen-

verhältnissen der Fertigdestillate sowie der entsprechenden Verschnittwässer berechnet. Abbildung 19 zeigt die Korrelation der $\delta^{18}\text{O}$ -Werte von Mittellauf und Fertigprodukt für 25 authentische Proben.

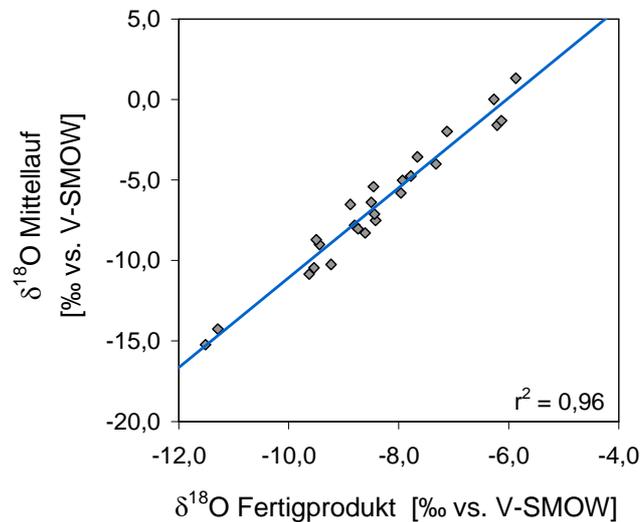


Abbildung 19: Korrelation der $\delta^{18}\text{O}$ -Werte von Mittellauf und Fertigprodukt

Das hohe Bestimmtheitsmaß (r^2) von 0,96 verdeutlicht, dass trotz der genannten Einflüsse beim Verschneiden des Mittellaufs auf Trinkstärke die $\delta^{18}\text{O}$ -Werte von Mittellauf und Fertigprodukt sehr gut miteinander korrelieren. Die Begründung hierfür liegt in den jeweiligen Schwankungsbreiten der Sauerstoffisotopenverhältnisse von Verschnittwasser und Mittellauf. So liegen die entsprechenden Werte der untersuchten Verschnittwässer, die sowohl aus Norditalien als auch aus Franken und dem Schwarzwald stammen, zwischen $-10,3\%$ und $-8,15\%$, während die $\delta^{18}\text{O}$ -Werte der Mittelläufe Beträge von $-15,3\%$ bis $1,32\%$ annehmen. Zwar werden die Sauerstoffisotopenverhältnisse des Fertigprodukts durch die Menge des zugesetzten Verschnittwassers beeinflusst, die hauptsächliche Information stammt jedoch aus den Isotopenverhältnissen der Mittelläufe. Diese sind im Gegensatz zu den Werten der Verschnittwässer zusätzlich von Fraktionierungen während des Wachstums der Frucht abhängig, die durch klimatische Bedingungen am Anbauort bestimmt werden und zeigen somit weitaus größere Schwankungen. Die geringe Beeinflussung der $\delta^{18}\text{O}$ -Werte des Fertigdestillats von denen der Verschnittwässer zeigt sich auch in

der schlechten linearen Korrelation mit einem Bestimmtheitsmaß von lediglich 0,36 (Abbildung 20).

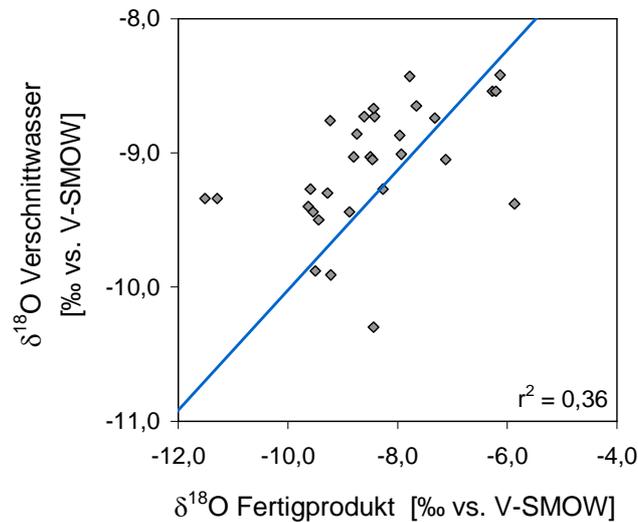


Abbildung 20: Korrelation der $\delta^{18}\text{O}$ -Werte von Verschnittwasser und Fertigprodukt

Somit ist es ausreichend, die Sauerstoffisotopenverhältnisse der trinkfertigen Obstbrände zu bestimmen. Da im Falle der Charakterisierung von Destillaten unbekannter geographischer Herkunft keine Angaben über die $\delta^{18}\text{O}$ -Werte des verwendeten Verschnittwassers vorliegen, liefert diese Tatsache einen entscheidenden Vorteil für die praktische Anwendung der Methode. Zudem erschwert dies die Möglichkeit, Sauerstoffisotopenverhältnisse des Wassers eines Obstbrandes durch gezieltes Verschneiden des Mittellaufs mit Wasser einer anderen Region als die des Obstbaugebietes zu verfälschen.

4.4 Stabilisotopenverhältnisse unvergorener Kirschmaischen

4.4.1 Vergleich einzelner Stabilisotopenverhältnisse

Zur Herkunftsbestimmung der Rohfrüchte wurden die von den Brennern zur Verfügung gestellten unvergorenen Kirschmaischen bezüglich $\delta^{18}\text{O}$ des Fruchtwassers, $\delta^{13}\text{C}$ des Fruchtzuckers sowie $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^2\text{H}$, $\delta^{34}\text{S}$ und $\delta^{15}\text{N}$ der Pulpe analysiert. Zusätzlich wurden in ausgewählten Mustern die Isotopenverhältnisse $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ der Pulpe bestimmt.

Kohlenstoffisotopenverhältnisse von Zucker bzw. Fruchtpulpe

Abbildung 21 zeigt die Gegenüberstellung der Kohlenstoffisotopenverhältnisse von Zucker bzw. Fruchtpulpe der analysierten Kirschproben der Jahrgänge 2003 und 2004.

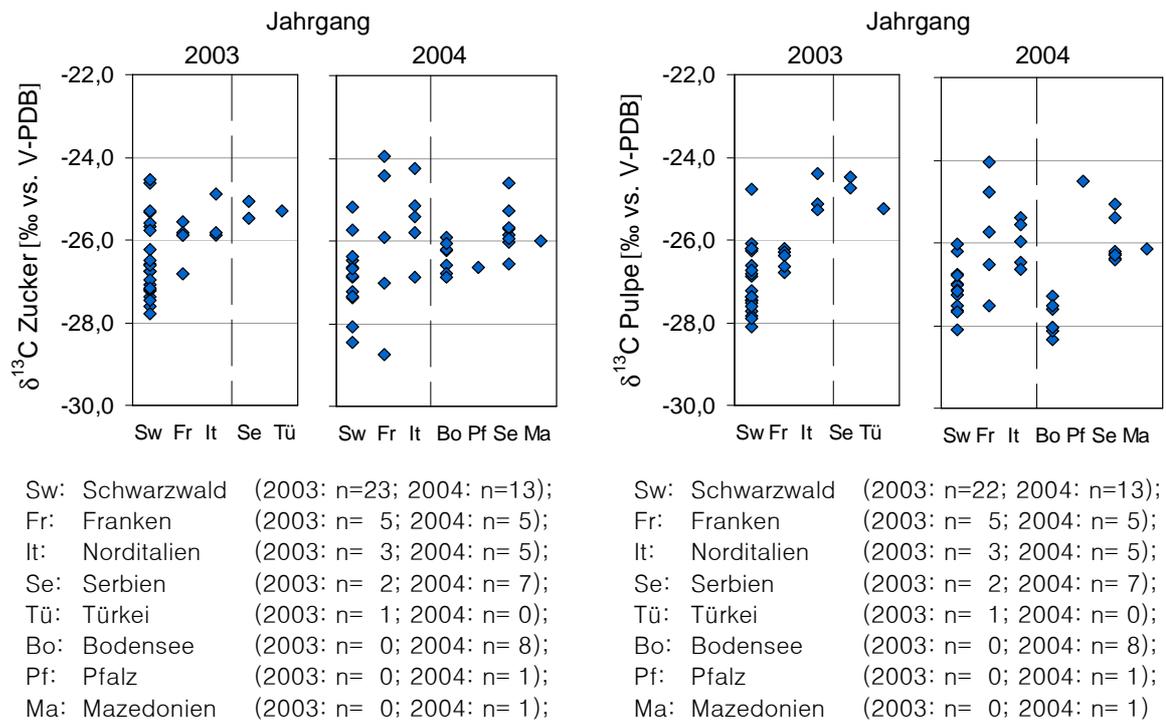


Abbildung 21: $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von Zucker und Pulpe unvergorener Kirschproben

Sowohl 2003 als auch 2004 liegen die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte des Zuckers der Proben aus dem Schwarzwald, aus Franken sowie aus Norditalien in derselben Größenordnung. Auf Basis dieses Isotopenverhältnisses ist somit keine Unterscheidung bezüglich der regionalen Herkunft möglich. Auch die gemessenen $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse der Muster aus den übrigen Regionen unterscheiden sich nicht signifikant von diesen Werten.

Beim Vergleich der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der Pulpe beider Jahrgänge zeigen sich ebenfalls starke Überschneidungen der Proben aus den ersten drei Regionen. Lediglich die Kirschen aus Norditalien weisen 2003 etwas positivere Kohlenstoffisotopenverhältnisse auf. Dies ist auf die hohe Temperaturdifferenz von bis zu $6\text{ }^\circ\text{C}$ (95) zwischen Norditalien und den beiden deutschen Standorten während des Sommers 2003 zurückzuführen. Durch Untersuchungen der Isotopenverhältnisse von Weintrauben konnte eine geringe Tendenz zu positiveren $\delta^{13}\text{C}$ -Werten, hervorgerufen durch

warmes und trockenes Klima nachgewiesen werden (41). Grund hierfür ist der resultierende Trockenstress der Pflanze, wodurch die stomatäre Leitfähigkeit der Pflanze verringert wird. Dies wiederum führt zu einer Verringerung der CO₂-Nachlieferung und somit zu einer Verringerung der Isotopendiskriminierung während der Photosynthese (40). Bemerkbar macht sich dieses Phänomen auch in den ¹³C/¹²C-Verhältnissen der Pulpe der übrigen Regionen des Jahrgangs 2003. So weisen die südosteuropäischen Muster aus Serbien und der Türkei ähnlich hohe δ¹³C-Werte auf wie die Proben aus Norditalien. Grundsätzlich liefert das Kohlenstoffisotopenverhältnis jedoch nur wenig Informationen bezüglich der regionalen Herkunft, da es im Vergleich zu anderen Stabilisotopenverhältnissen, wie z.B. dem δ¹⁸O-Wert von Wasser, nur eine geringe Abhängigkeit von klimatischen Faktoren aufweist (41). Dies zeigt sich im Vergleich der Isotopenverhältnisse der Proben aus 2004. Die in diesem Jahr in Norditalien lediglich um etwa 3 °C höheren durchschnittlichen Maximaltemperaturen (95) im Vergleich zu den Regionen Schwarzwald und Franken resultieren in Messwerten, die sich nicht eindeutig von denen der deutschen Proben unterscheiden lassen. Auch die δ¹³C-Werte der übrigen Regionen fallen in dieselbe Spannweite und lassen keine Zuordnung der Kirschen zu den einzelnen Standorten zu.

Sauerstoff- und Wasserstoffisotopenverhältnisse der Fruchtpulpe

Aussagekräftigere Informationen über klimatische Bedingungen am Anbauort und somit eine bessere Unterscheidung der Proben bezüglich ihrer regionalen Herkunft sind von den Sauerstoffisotopenverhältnissen des Wassers und den δ²H-Werten der Pulpe zu erwarten (siehe 2.3.1.3).

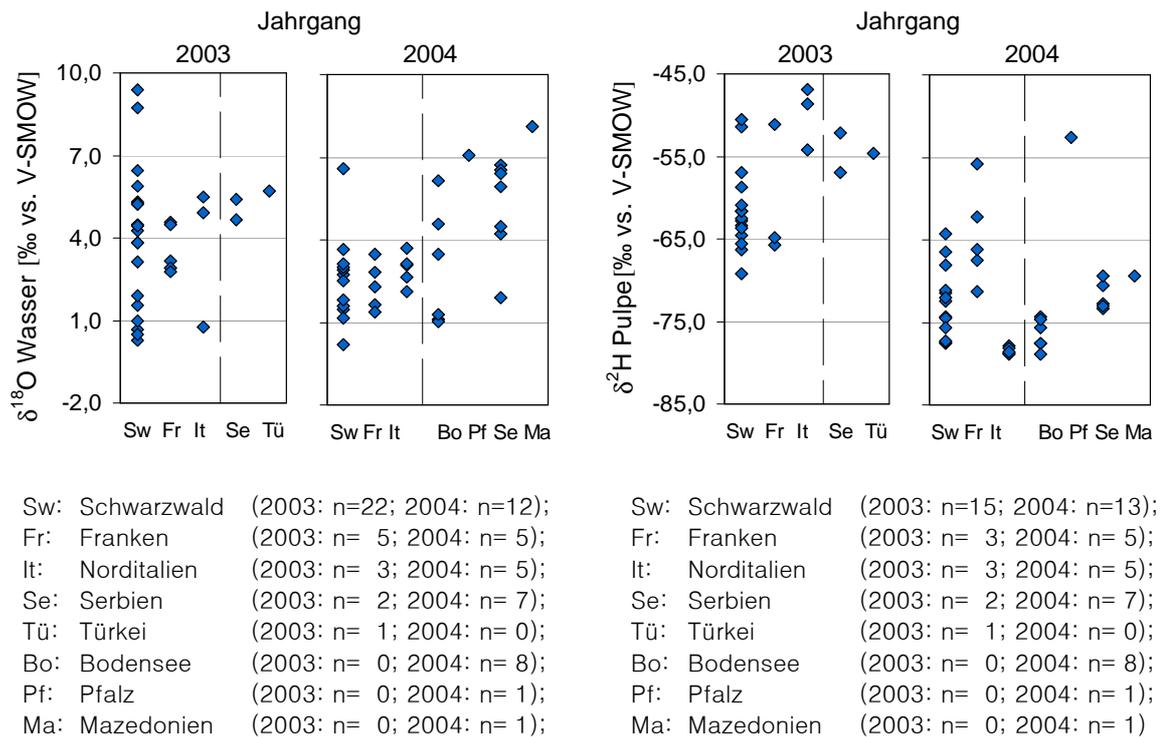


Abbildung 22: $\delta^{18}\text{O}$ - sowie $\delta^2\text{H}$ Werte der Pulpe unvergorener Kirschen

Wie aus Abbildung 22 ersichtlich, weisen die Proben aus Norditalien beider Jahrgänge trotz des wärmeren Klimas vergleichbare $\delta^{18}\text{O}$ -Werte wie die Muster aus Franken und dem Schwarzwald auf. Dies widerspricht den Erfahrungen, wonach wärmeres und trockneres Klima eine Anreicherung der ^{18}O -Isotope in der Pflanze bewirkt (50). Die Tatsache, dass sich die Proben der drei Regionen trotz des Klimaunterschieds dennoch nicht voneinander unterscheiden lassen, ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass die Sauerstoffisotopenverhältnisse des Wassers in der Frucht nicht nur von den klimatischen Bedingungen während des Wachstums, sondern auch von den entsprechenden $\delta^{18}\text{O}$ -Werten des von der Pflanze aufgenommenen Wassers beeinflusst werden. Diese werden wiederum bestimmt vom Breitengrad des Anbaugebietes (Breiteneffekt), der Entfernung zum Meer (Kontinentaleffekt) und der Höhe der Region, in der das Regenwasser niedergeht und mit dem Grundwasser das Wasserreservoir für die Pflanze bildet (45). Besonders der letztgenannte Höheneffekt, bedingt durch die das Trentino umgebenden Alpen, macht sich in den δ -Werten der Proben aus dieser Region bemerkbar. Durch die im Vergleich niedrigeren Isotopenverhältnisse des der Pflanze zur Verfügung stehenden

Wassers (111) wird die Erhöhung der $\delta^{18}\text{O}$ -Werte, die aus dem wärmeren und trockneren Klima resultieren, egalisiert. Auch die Proben der übrigen Regionen liefern keine signifikant von den Messwerten der Muster aus dem Schwarzwald, Franken sowie Norditalien abweichenden Sauerstoffisotopenverhältnisse. Lediglich die beiden Einzelproben aus der Pfalz und Mazedonien zeigen leicht positivere $\delta^{18}\text{O}$ -Werte. Diese können jedoch nicht als repräsentativ für die beiden Standorte angesehen werden, da hierfür eine höhere Probenanzahl nötig wäre.

Auch die Wasserstoffisotopenverhältnisse der Pulpe lassen weder 2003 noch 2004 eine zuverlässige Unterscheidung der Schwarzwälder, Fränkischen und Norditalienischen Proben zu. Analog zu den $\delta^{18}\text{O}$ -Werten wären auch hier, bedingt durch das wärmere Klima, positivere Isotopenverhältnisse für die Proben aus Norditalien zu erwarten (50). Zu erklären wäre die Egalisierung dieser klimabedingten Erhöhung der $\delta^2\text{H}$ -Werte ebenfalls durch die Abreicherung der ^2H -Isotope des der Pflanze zur Verfügung stehenden Wassers durch den Höheneffekt der Alpen. Während trotz des niedrigen Wasserstoffisotopenverhältnisses des Grundwassers die Norditalienischen Proben durch den extrem heißen Sommer 2003 sehr hohe $^2\text{H}/^1\text{H}$ -Verhältnisse aufweisen, zeigen diese im Jahr 2004 im Vergleich zu den Mustern aus dem Schwarzwald und aus Franken die niedrigsten $\delta^2\text{H}$ -Werte, bedingt durch den geringeren regionalen Temperaturunterschied dieses Jahrgangs. Auch die Messwerte der Proben aus den übrigen Regionen fallen mit Ausnahme der Einzelprobe aus der Pfalz in die Größenordnung der Schwarzwälder Muster und sind somit nicht von diesen zu differenzieren.

Stickstoff- und Schwefelisotopenverhältnisse der Fruchtpulpe

Während die Verhältnisse der Sauerstoff- und Wasserstoffisotopen vor allem von klimatischen Bedingungen abhängen, werden die Schwefel- und Stickstoffisotopenverhältnisse von der Geologie und dem Einsatz von Düngemitteln bestimmt.

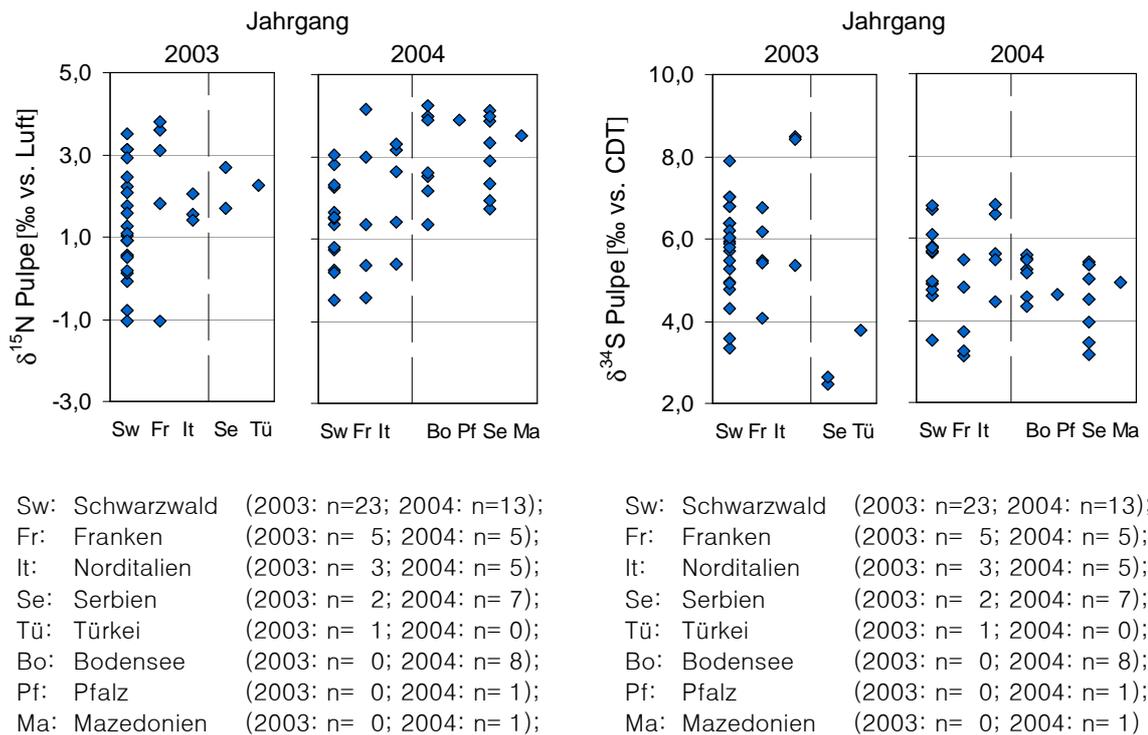


Abbildung 23: $\delta^{15}\text{N}$ - sowie $\delta^{34}\text{S}$ Werte der Pulpe unvergorener Kirschen

Vergleicht man die Stickstoffisotopenverhältnisse der Proben der einzelnen Provenienzen, so lässt sich weder 2003 noch 2004 ein signifikanter Unterschied feststellen (Abbildung 23). Auch jahrgangsbedingte Änderungen der Werte der Proben einer Region sind nicht zu verzeichnen.

Ebenfalls geringe regionale Unterschiede zeigen die Schwefelisotopenverhältnisse der Kirschproben. Lediglich die Werte der Serbischen Proben des Jahrgangs 2003 weisen negativere Beträge auf als die Muster der übrigen Standorte. Dieser Trend ließ sich jedoch 2004 nicht bestätigen. Dies widerspricht der Tatsache, dass die Schwefelisotopenverhältnisse von den $\delta^{34}\text{S}$ -Werten des Gesteins sowie anthropogenen Einflüssen abhängen, welche als unabhängig von klimatischen Bedingungen gelten (3).

Jedoch müssen die bisherigen Betrachtungen durch den Hinweis ergänzt werden, dass nicht alle Messwerte der einzelnen Regionen bedingungslos zwischen beiden Jahrgängen verglichen werden können, da für einige Proben des Jahrgangs 2003 keine Vergleichsmuster derselben Standorte aus 2004 zur Verfügung standen.

Strontiumisotopenverhältnisse der Fruchtpulpe

Nützliche Informationen für den regionalen Herkunftsnachweis liefert darüber hinaus das Strontiumisotopenverhältnis $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$, da es ausschließlich von den geologischen Begebenheiten am Wachstumsort bestimmt wird und somit keine Jahrgangsabhängigkeit zeigt (30). Erste Ergebnisse der Analyse von Proben aus dem Schwarzwald und Norditalien zeigt Abbildung 24.

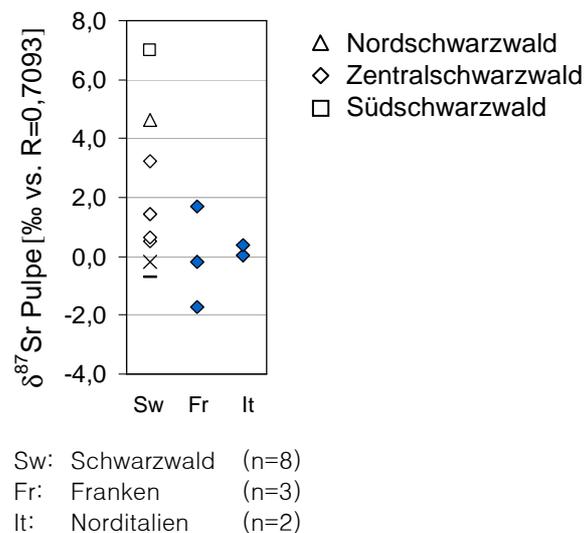


Abbildung 24: Strontiumisotopenverhältnisse der Pulpe ausgewählter Kirschproben des Jahrgangs 2003

Betrachtet man den gesamten Bereich der entsprechenden Messwerte einer Region, so fallen die Proben aus Franken und Norditalien in die Größenordnung der Daten des Schwarzwaldes. Dies lässt die $\delta^{87}\text{Sr}$ -Werte als unbrauchbaren Indikator für eine geographische Unterscheidung von Kirschproben erscheinen.

Da die Strontiumisotopenverhältnisse jedoch durch die geologischen Bedingungen am jeweiligen Standort bestimmt werden, können auch hier innerhalb einer Region stärkere lokale Schwankungen auftreten. Die Probe aus dem Nordschwarzwald weist z.B. ein positiveres $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ -Verhältnis auf als die beiden Muster aus dem Süden der Region. Dies deutet an, dass die Strontiumisotopenverhältnisse besser für eine engmaschige lokale Unterteilung einer Region geeignet sind als Isotope, die klimabedingten Schwankungen unterworfen sind, da diese für großflächige Gebiete

vergleichbar verlaufen. Jedoch sind die Daten aufgrund der geringen Probenanzahl noch nicht für eine Zuordnung unbekannter Proben geeignet und müssten daher weiter ergänzt werden.

4.4.2 Lineare Kombination einzelner Stabilisotopenverhältnisse der Fruchtpulpe mittels Diskriminanzanalyse

Bedingt durch die Überschneidung der Spannweiten der einzelnen δ -Werte zwischen den Proben der jeweiligen Provenienzen ist eine Herkunftszuordnung auf Basis einzelner Stabilisotopenverhältnisse nicht möglich. Deshalb wurden mehrere Isotopenverhältnisse mittels linearer Diskriminanzanalyse (SPSS 12.0 für Windows; Version 12.0.1) zu neuen Variablen, so genannten Diskriminanzwerten, kombiniert. Abbildung 25 und Abbildung 26 zeigen das Ergebnis der Diskriminanzanalyse der Kirschproben aus dem Schwarzwald, Franken und Norditalien der Jahrgänge 2003 und 2004 auf Basis der Stabilisotopenverhältnisse $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Zucker sowie $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ und $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ der Pulpe. Des Weiteren sind die Gruppenmittelpunkte auf Basis des berechneten Diskriminanzmodells abgebildet.

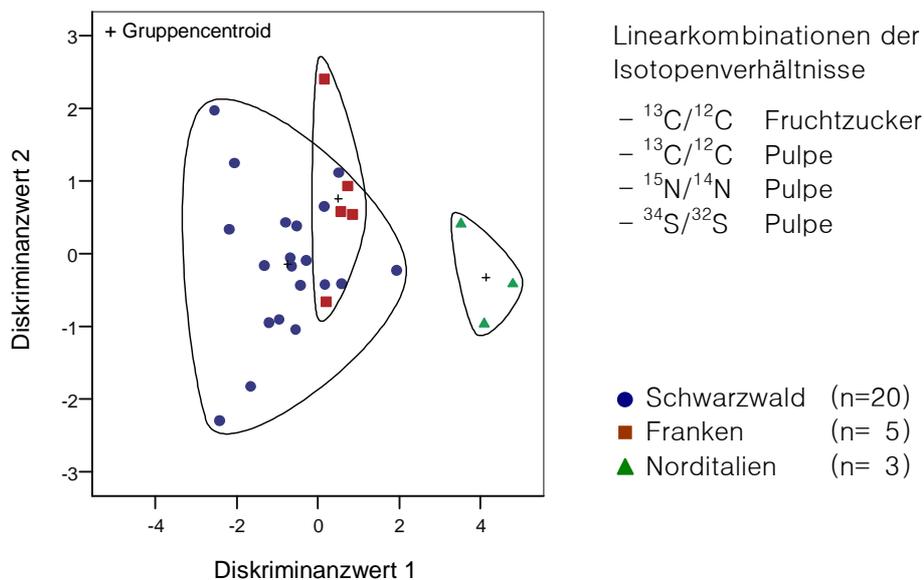


Abbildung 25: Regionale Differenzierung der unvergorenen Maischeproben des Jahrgangs 2003 mittels Diskriminanzanalyse

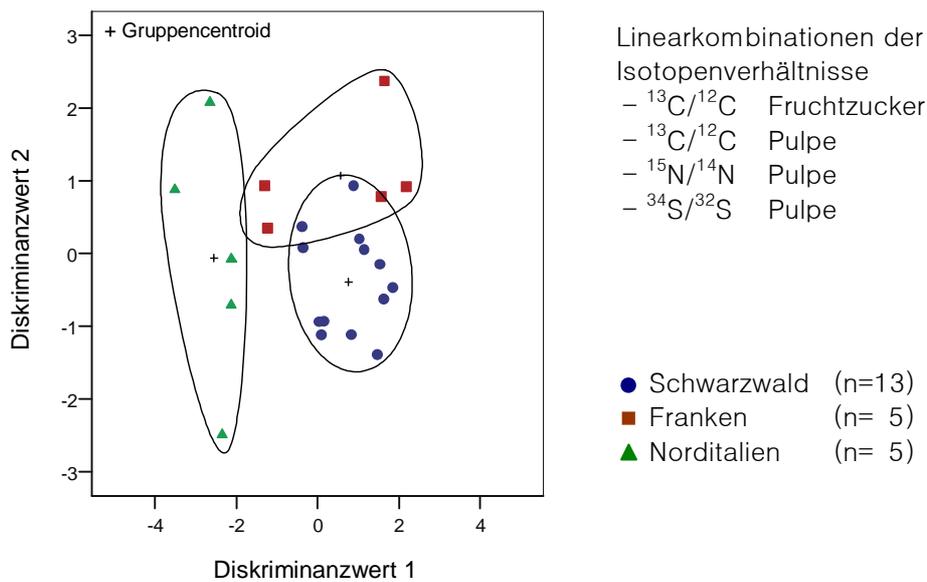


Abbildung 26: Regionale Differenzierung der unvergorenen Maischepulven des Jahrgangs 2004 mittels Diskriminanzanalyse

Trotz der geringen Unterschiede der Isotopenverhältnisse zwischen den Proben der drei Regionen Schwarzwald, Franken und Norditalien gelang mit Hilfe der Diskriminanzanalyse eine relativ zuverlässige Unterscheidung der Kirschen des Jahrgangs 2003 aus dem Trentino von denen aus Franken bzw. dem Schwarzwald. Eine befriedigende Trennung der Muster aus den beiden zuletzt genannten, geographisch nahe beieinander liegenden Gebieten konnte jedoch nicht erreicht werden. Während die mittels Resubstitution ermittelte Klassifizierungsrate für die norditalienischen Proben bei 100 % lag, wurden lediglich jeweils 80 % der fränkischen Muster sowie der Muster aus dem Schwarzwald der richtigen Region zugeordnet. Die Auswertung des Modells mittels Kreuzvalidierung lieferte dieselben Ergebnisse.

Auch die Proben des Jahrgangs 2004 resultierten in einem relativ breiten Überlappungsbereich der Diskriminanzwerte der Muster aus Franken und dem Schwarzwald. Während die norditalienischen Proben noch relativ zuverlässig von denen des Schwarzwaldes differenziert werden konnten, liegen zwei der fränkischen Proben relativ nahe am Gruppencentroid der Muster aus Norditalien. Diese Überlappungen spiegeln sich auch in den Klassifizierungsraten der einzelnen Proben wider. So konnten durch Resubstitution zwar 100 % der norditalienischen Muster richtig zugeordnet werden. Dieser Wert betrug für die Schwarzwälder Kirschen jedoch

lediglich 85 %, von den fränkischen Mustern konnten sogar nur noch drei von fünf Proben der korrekten Anbauregion zugeordnet werden. Die Klassifizierungsraten, welche durch Kreuzvalidierung erhalten wurden, betragen 77 % für die Proben des Schwarzwaldes, 60 % für norditalienischen und lediglich 20 % für die fränkischen Muster. Diese Werte zeigen, dass auf Basis der genannten Isotopenverhältnisse keine ausreichende Trennung erfolgen konnte.

Eine weitaus zuverlässigere Trennung der Proben bezüglich der drei Regionen Schwarzwald, Franken und Norditalien erlauben die δ^{13} -Werte des Fruchtzuckers sowie die Kohlenstoff-, Stickstoff- und Schwefelisotopenverhältnisse in Verbindung mit den δ^2 H-Werten der Fruchtpulpe des Jahrgangs 2004 (Abbildung 27).

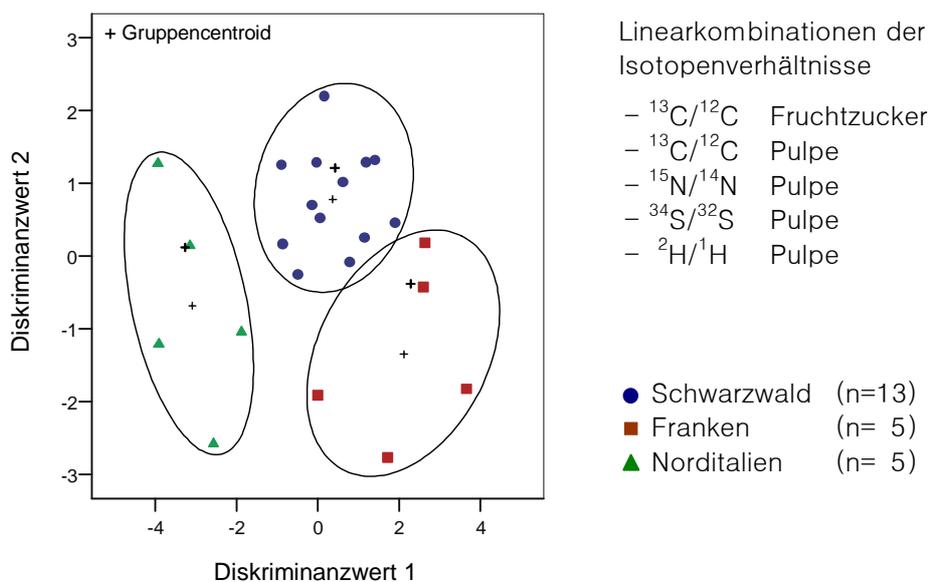


Abbildung 27: Regionale Differenzierung der unvergorenen Maischeprobe des Jahrgangs 2004 mittels Diskriminanzanalyse unter Berücksichtigung der Wasserstoffisotopenverhältnisse der Fruchtpulpe

Mit Hilfe der Diskriminanzfunktionen, die auf Basis dieser Messwerte berechnet wurden, konnten mittels Resubstitution und Kreuzvalidierung 100 % der authentischen Proben rückwirkend den Standorten Schwarzwald, Franken und Norditalien zugeordnet werden.

Besonders bei der Interpretation einzelner Proben muss jedoch die Tatsache berücksichtigt werden, dass zur Bestimmung der Isotopenverhältnisse jeweils nur eine

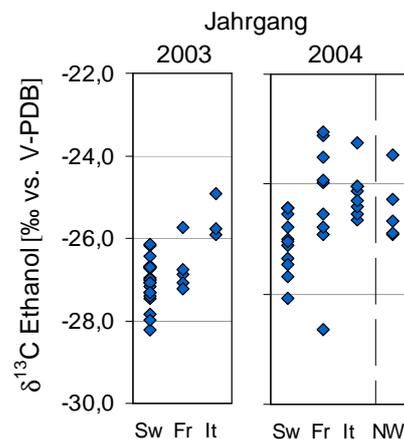
sehr geringe Probenmenge nötig ist. Somit sind die Ergebnisse nicht immer repräsentativ für die gesamte Ernte eines Standorts. Eventuell resultierende Fehlklassifikationen können in der Praxis jedoch durch die Messung mehrerer Einzelproben eines Standorts vermieden werden. So zeigte sich, dass die Ergebnisse der Destillate homogener sind, da hier durch die Vergärung größerer Maischemengen Schwankungen der Isotopenverhältnisse einzelner Kirschen ausgeglichen werden.

4.5 Stabilisotopenverhältnisse der Destillate

4.5.1 Vergleich einzelner Stabilisotopenverhältnisse

Als Basis für eine Unterscheidung authentischer Destillate bezüglich ihrer geographischen Herkunft wurden die Kohlenstoff- und Wasserstoffisotopenverhältnisse des Ethanols sowie der $\delta^{18}\text{O}$ -Wert des Wasseranteils bestimmt. In Abbildung 28 bis Abbildung 30 sind die Ergebnisse der Isotopenanalyse der Kirschwässer der beiden Jahrgänge 2003 und 2004 gegenübergestellt.

Kohlenstoffisotopenverhältnisse des Ethanols



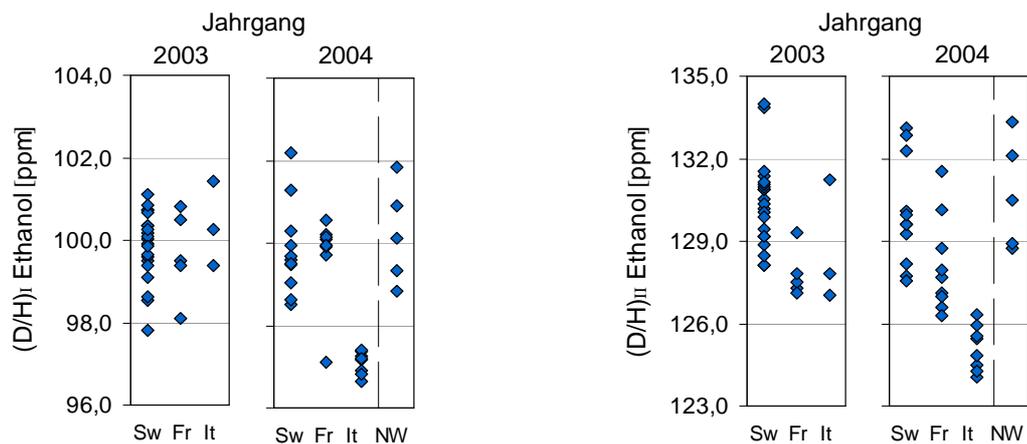
Sw: Schwarzwald (2003: n=21; 2004: n=11);
 Fr: Franken (2003: n= 5; 2004: n= 9);
 It: Norditalien (2003: n= 3; 2004: n= 8);
 NW: Nord Württemb. (2003: n= 0; 2004: n= 5);

Abbildung 28: $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von Ethanol der Destillate der Jahrgänge 2003 und 2004

Die Kohlenstoffisotopenverhältnisse des Ethanols der untersuchten Destillate (Abbildung 28) zeigen vergleichbar zu den $\delta^{13}\text{C}$ -Werten von Fruchtzucker und Pulpe nur eine geringe Abhängigkeit von klimatischen Bedingungen und somit des Standorts. Lediglich die Destillate aus Norditalien des Jahrgangs 2003 weisen im Vergleich zu den Proben aus Franken und dem Schwarzwald leicht erhöhte Werte auf, hervorgerufen durch die Ausnahmestellung des Klimas 2003, was sich besonders in Norditalien durch hohe Temperatur- und Niederschlagsunterschiede im Vergleich zu den langjährigen Mittelwerten bemerkbar machte. Die Werte der Proben des Jahrgangs 2004 liegen ebenfalls alle in derselben Größenordnung.

Wasserstoffisotopenverhältnisse des Ethanols

Zuverlässigere Informationen bezüglich der regionalen Herkunft eines Obstbrandes liefern die Wasserstoffverhältnisse des Ethanols. Besonders das $(\text{D}/\text{H})_{\text{II}}$ -Verhältnis liefert Hinweise auf die klimatischen Bedingungen am Wachstumsort und ist somit für eine Differenzierung von Produkten aus unterschiedlichen Regionen geeignet (67). Abbildung 29 zeigt die D/H-Verhältnisse der Methyl- bzw. Methylengruppe des Ethanols.



Sw: Schwarzwald (2003: n=21; 2004: n=11);
 Fr: Franken (2003: n= 5; 2004: n= 9);
 It: Norditalien (2003: n= 3; 2004: n= 8);
 NW: Nord Württemb. (2003: n= 0; 2004: n= 5);

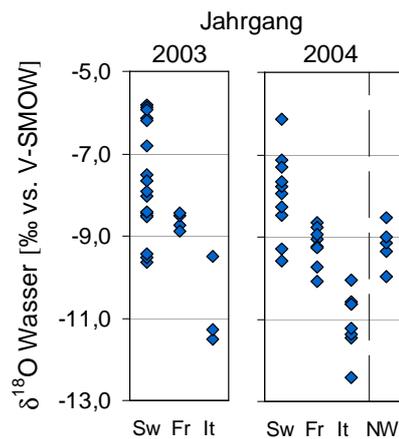
Sw: Schwarzwald (2003: n=21; 2004: n=11);
 Fr: Franken (2003: n= 5; 2004: n= 9);
 It: Norditalien (2003: n= 3; 2004: n= 8);
 NW: Nord Württemb. (2003: n= 0; 2004: n= 5);

Abbildung 29: D/H-Verhältnisse von Ethanol der Destillate der Jahrgänge 2003 und 2004

Die italienischen Kirschwässer des Jahrgangs 2004 lassen sich von den Mustern der übrigen Regionen auf Basis der Wasserstoffisotopenverhältnisse sowohl der Methyl- als auch der Methylengruppe des Ethanolis unterscheiden. Auch hier zeigt sich analog zu den Wasserstoffisotopenverhältnissen der Pulpe das Zusammenspiel von klimatischen Bedingungen und dem Isotopenverhältnis des von der Pflanze aufgenommenen Wassers. Zwar bewirken heiße und trockene Bedingungen einen Anstieg der D/H-Verhältnisse. Jedoch weist das Grundwasser, das den norditalienischen Pflanzen zur Verfügung steht, durch den beschriebenen Höheneffekt der Alpen stark abgereicherte Deuteriumgehalte auf. Dies resultiert schließlich in den niedrigen D/H-Verhältnisse der Proben aus Norditalien des Jahrgangs 2004 im Vergleich zu den Destillaten der übrigen Regionen. Diese Unterschiede wurden hingegen durch die extreme Hitze und die geringen Niederschlagsmengen des Jahres 2003 egalisiert, da besonders Norditalien von den außergewöhnlichen Klimaunterschieden im Vergleich zum langjährigen Mittel betroffen war. Somit ist eine Differenzierung der Norditalienischen Muster von den Destillaten der deutschen Regionen nicht möglich. Die gemessenen Werte der Proben aus Nord Baden-Württemberg beider Jahrgänge liegen jeweils in der Größenordnung der entsprechenden Isotopenverhältnisse der Schwarzwälder Destillate.

Sauerstoffisotopenverhältnisse des Wassers

Neben den genannten Isotopenverhältnissen des Ethanolis wurden die Sauerstoffisotopenverhältnisse des Wasseranteils der Destillate analysiert. Ergebnisse aus der Stabilisotopenanalytik für den Herkunftsnachweis von Wein haben gezeigt, dass besonders der $\delta^{18}\text{O}$ -Wert des Wassers charakteristisch für die klimatischen Gegebenheiten und somit abhängig vom Standort einer Pflanze ist (58,62–64).



Sw: Schwarzwald (2003: n=21; 2004: n=11);
 Fr: Franken (2003: n= 5; 2004: n= 8);
 It: Norditalien (2003: n= 3; 2004: n= 8);
 NW: Nord Württemb. (2003: n= 0; 2004: n= 5);

Abbildung 30: $\delta^{18}\text{O}$ -Werte von Wasser der Destillate der Jahrgänge 2003 und 2004

Wie aus Abbildung 30 ersichtlich, weisen die norditalienischen Proben beider Jahrgänge die niedrigsten $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ -Verhältnisse aller untersuchten Destillate auf. Diese Werte erlauben somit bereits eine recht gute Differenzierung dieser Proben von den Destillaten der deutschen Standorte. Zurückzuführen sind diese Werte wiederum auf die ^{18}O -Anreicherung des Regenwassers durch den Höheneffekt des Standorts (111). Dies wirkt sich zum einen auf die Sauerstoffisotopenverhältnisse des der Pflanze zur Verfügung stehenden Grundwassers aus. Zum anderen besitzt dadurch auch das Verschnittwasser, das in der Regel vom selben Standort stammt, geringere $\delta^{18}\text{O}$ -Werte als vergleichbares Wasser der übrigen Regionen. Jahrgangsbedingte Schwankungen fallen durch das Herabsetzen des Mittellaufs auf Trinkstärke gering aus, da das hierfür verwendete Verschnittwasser meist aus Quellen stammt, in denen sich der Niederschlag über mehreren Jahre sammelt und vermischt und somit eine geringe Klimaabhängigkeit zeigt.

Strontiumisotopenverhältnisse der Fertigdestillate

Zusätzlich wurden von vier Mustern aus den Regionen Schwarzwald und Franken sowohl unvergorene Kirschen als auch Verschnittwasser und auf Trinkstärke verdünnte Destillate bezüglich ihrer $\delta^{87}\text{Sr}$ -Werte analysiert. Hierdurch sollte untersucht werden, inwieweit sich das Strontiumisotopenverhältnis aus dem der unvergorenen

Frucht sowie des Verschnittwassers zusammensetzt. Abbildung 31 zeigt die in den Proben 3, 52, 54 und 55 gemessenen Werte.

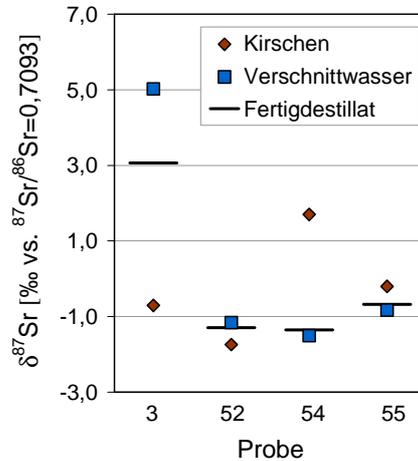


Abbildung 31: Strontiumisotopenverhältnisse von unvergorenen Kirschen, Verschnittwasser und Fertigdestillat ausgewählter Muster

Die Ergebnisse zeigen, dass der $\delta^{87}\text{Sr}$ -Wert des Fertigdestillats nicht nur von dem des Verschnittwassers abhängt sondern in geringerem Maße auch vom entsprechenden Isotopenverhältnis der Kirsche beeinflusst wird. Um die Aussagekraft dieses Verhältnisses bezüglich einer regionalen Herkunftsinformation eines Obstbrandes bewerten zu können, sind jedoch weitere systematische Untersuchungen nötig. So können zum jetzigen Zeitpunkt noch keine Aussagen über das Destillationsverhalten von Strontium getroffen werden. Signifikante Fraktionierungen sind zwar aufgrund des geringen relativen Masseunterschieds beider Isotope nicht zu erwarten, müssten aber für eine zuverlässige Bewertung durch die Analyse fraktionierter Destillate ebenfalls untersucht werden. Auch müsste eine Beeinflussung des $\delta^{87}\text{Sr}$ -Wertes durch ein Enthärten des Verschnittwassers, wie es teilweise in der Praxis üblich ist, geprüft werden. Grundsätzlich hat sich jedoch gezeigt, dass die Messung des Strontiumisotopenverhältnisse $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ in Kirschwasser mittels Thermo Ionization Mass Spectrometry (TIMS) möglich ist.

Falls nachgewiesen werden kann, dass die Informationen bezüglich der regionalen Herkunft von Kirsche und Verschnittwasser durch technologische Verfahrensschritte nicht signifikant verändert werden, wäre der $\delta^{87}\text{Sr}$ -Wert somit eine weitere Kenngrö-

Be zur Differenzierung authentischer Produkte von Destillaten mit falschen Herkunftsangaben.

4.5.2 Lineare Kombination einzelner Stabilisotopenverhältnisse der Destillate mittels Diskriminanzanalyse

Analog zur geographischen Trennung der Rohfrüchte wurden die Diskriminanzfunktionen auf Basis der Isotopenverhältnisse $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $(\text{D}/\text{H})_{\text{I}}$ und $(\text{D}/\text{H})_{\text{II}}$ des Ethanol sowie der $\delta^{18}\text{O}$ -Werte des Wassers der authentischen Destillate der Jahrgänge 2003 und 2004 berechnet. Abbildung 32 und Abbildung 33 zeigen jeweils die entsprechende Auftragung der Diskriminanzwerte der Kirschbrände aus den drei Anbaubereichen Schwarzwald, Franken und Norditalien. In Abbildung 33 ist zusätzlich die Lage der analysierten Proben aus dem nördlichen Teil Baden-Württembergs auf Basis der berechneten Diskriminanzfunktionen ersichtlich.

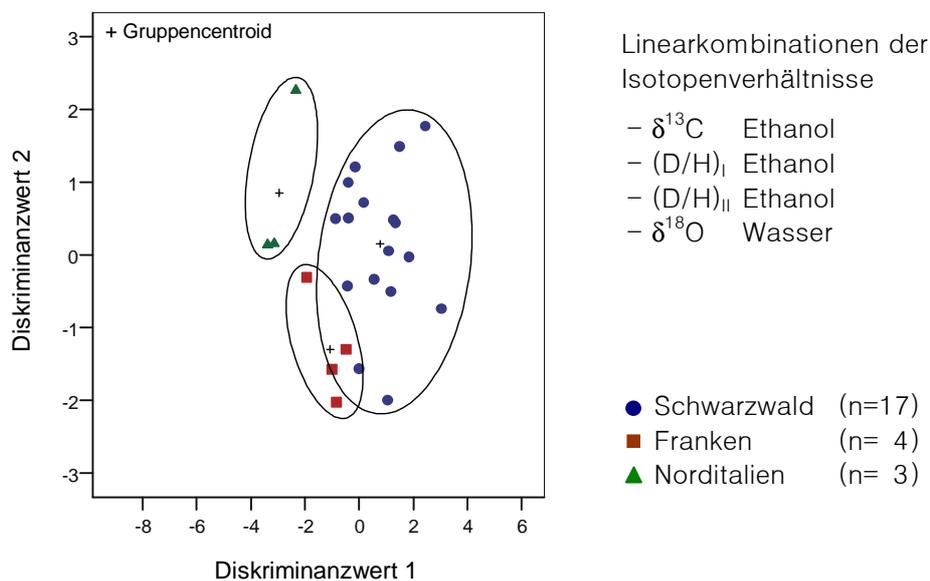


Abbildung 32: Regionale Differenzierung der Destillate des Jahrgangs 2003 mittels Diskriminanzanalyse

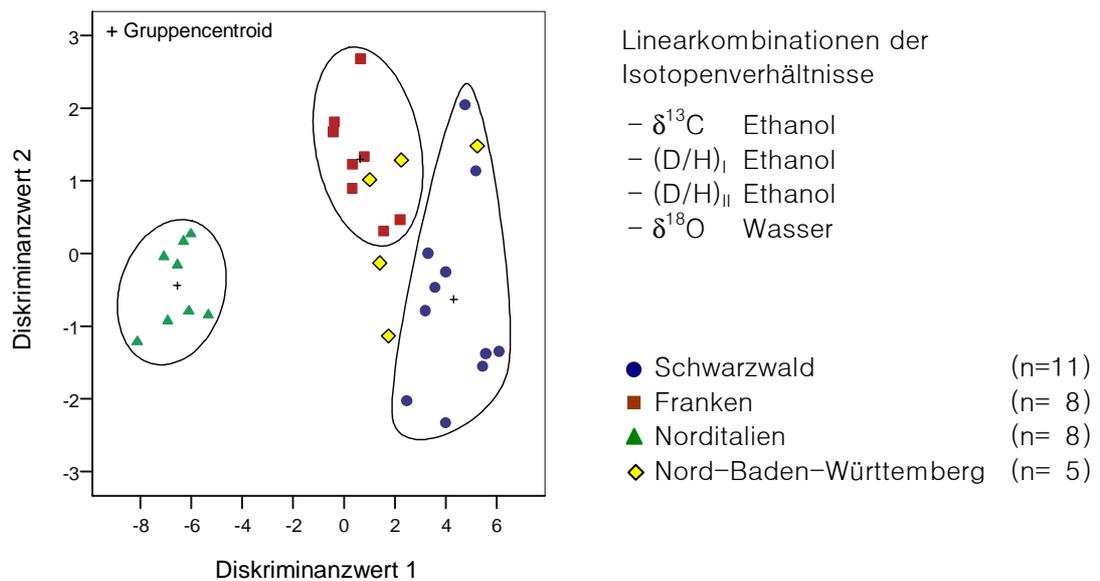


Abbildung 33: Regionale Differenzierung der Destillate des Jahrgangs 2004 mittels Diskriminanzanalyse

Trotz der ähnlichen Verteilung der Isotopenverhältnisse der Destillate aus den jeweiligen Regionen des Jahrgangs 2003 ist mittels Diskriminanzanalyse eine vollständige Abtrennung der Proben aus Norditalien von denen aus Franken und dem Schwarzwald möglich. Die Überschneidung der Cluster der Fränkischen und Schwarzwälder Proben spiegelt sich auch in den Klassifizierungsraten dieser Destillate wider. Während bei der Resubstitution noch 100 % der fränkischen Proben richtig klassifiziert werden konnten, sank dieser Wert bei der Kreuzvalidierung auf 50 %. Die Muster aus dem Schwarzwald liefern hier jeweils eine korrekte Klassifizierungsrate von 88 bzw. 77 %. Jedoch wurde keines der deutschen Destillate Norditalien zugeordnet.

Im Gegensatz dazu konnten die Proben des Jahrgangs 2004 durch Rücksubstitution vollständig den entsprechenden Regionen Schwarzwald, Franken und Norditalien zugeordnet werden. Bei der anschließenden Kreuzvalidierung wurde lediglich ein Schwarzwälder Kirschwasser dem Standort Franken zugeordnet.

Es zeigte sich, dass selbst die geringen klimatischen Unterschiede zwischen den Regionen Schwarzwald und Franken, wie sie 2004 repräsentativ für die entsprechenden langjährigen Mittelwerte der Kenndaten Temperatur und Niederschlag zu beobachten waren, ausreichend für die Trennung der Destillate sind.

Wie aus der geographischen Lage des Standortes Nord Baden–Württemberg zu erwarten, liegen auch die Diskriminanzwerte dieser Muster im Bereich zwischen denen aus Franken sowie dem Schwarzwald. Drei Destillate werden rechnerisch Franken, die übrigen beiden Muster dem Schwarzwald zugeordnet. Dies zeigt, dass das Potential der Stabilisotopenanalyse bezüglich der Trennkraft von Destillaten unterschiedlicher geographischer Herkunft klimabedingt deutlich von der Entfernung der Standorte voneinander abhängt und sich die Klassifizierungsergebnisse bei zu engmaschiger Unterteilung eines Gebietes in verschiedene Regionen verschlechtern. In einem abschließenden Schritt wurden alle gemessenen Stabilisotopenverhältnisse der Destillate aus Franken, Norditalien und dem Schwarzwald der beiden Jahrgänge 2003 und 2004 in einem Diskriminanzmodell zusammengefasst. Dies sollte die Anwendbarkeit der Methode überprüfen, da in der Praxis im Gegensatz zur Weinproduktion oftmals Destillate mehrerer Kampagnen vermischt und anschließend ohne Angabe der verschnittenen Jahrgänge in den Handel gelangen. Da jedoch die Isotopenverhältnisse der Proben aus Norditalien des Jahrgangs 2003 stark von den zu erwartenden Werten abwichen, wurden für die Berechnung des Diskriminanzmodells, wie es Abbildung 34 zeigt, sechs Gruppen definiert. Diese spiegeln jeweils die Proben einer Region der beiden analysierten Jahrgänge getrennt voneinander wider. Zusätzlich wurden vier Kirschwässer mit der Bezeichnung „Schwarzwälder Kirschwasser“ bekannter Brennereien aus dem Handel bezogen, und mittels des berechneten Diskriminanzmodells bewertet.

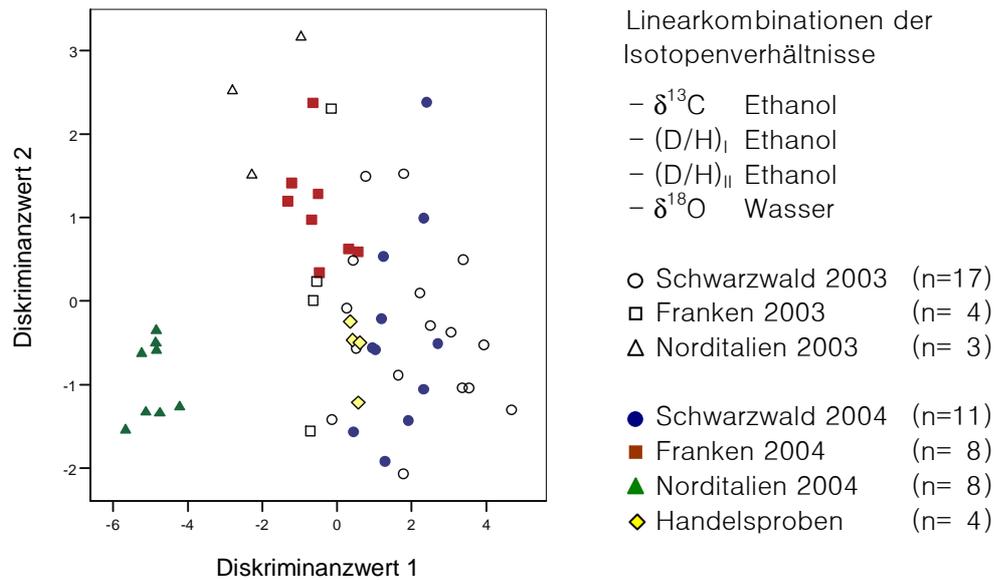


Abbildung 34: Regionale Einordnung von Handelsproben auf Basis eines berechneten Diskriminanzmodells

Aus den Klassifizierungsergebnissen der Diskriminanzanalyse lassen sich zwei für die Anwendbarkeit der Methode entscheidende Ergebnisse ableiten. Zum einen zeigt sich, dass die Proben aus Norditalien in zwei weit voneinander entfernten Clustern resultieren, da die Isotopenverhältnisse der Proben des Jahrgangs 2003 wie bereits diskutiert stark von denen des Folgejahres abwichen. Dies bestätigt die signifikante Beeinflussung der Trennergebnisse durch die klimatischen Extrembedingungen des Jahres 2003, die speziell die Region südlich der Alpen betrafen. Auch ist eine geringe Überlappung der Muster aus den Regionen Schwarzwald und Franken zu erkennen, wie dies bereits aus dem Diskriminanzmodell der entsprechenden Destillate des Jahrgangs 2003 zu erwarten war.

Zum anderen macht Abbildung 34 jedoch deutlich, dass sich weder die Cluster der Destillate aus Franken noch die der Proben aus dem Schwarzwald nach Jahrgängen trennen lassen. Obwohl durch die Einteilung in sechs Gruppen eine Trennung in sechs Cluster angestrebt war, überlappen sich die Proben beider Jahrgänge, ohne dass gewisse Schwerpunkte zu erkennen sind. Dies zeigt, dass die geringere jahrgangsbedingte Temperaturschwankung, wie sie nördlich der Alpen im Vergleich zu Norditalien in den analysierten Jahren 2003 und 2004 zu beobachten war, keinen signifikanten Einfluss auf die Trennung hatte. Somit können Isotopenwerte, die über

mehrere Jahre aufgezeichnet werden, durchaus kombiniert werden, um daraus eine Basis zur regionalen Einordnung unbekannter Proben zu gewinnen. Dies bestätigt auch die korrekte Einordnung der vier analysierten Handelsproben auf Basis des berechneten Diskriminanzmodells, die alle der Region Schwarzwald zugeordnet werden konnten.

4.6 Vergleich der Stabilisotopenverhältnisse von Kirsch- und Zwetschgenwässern

Abschließend wurden die Kohlenstoff- und Wasserstoffisotopenverhältnisse des Ethanols sowie die $\delta^{18}\text{O}$ -Werte des Wassers von Zwetschgen- und Kirschwässern verglichen, um eine Übertragbarkeit der beschriebenen Ergebnisse auf Zwetschgendestillate zu überprüfen. Da Norditalien keine typische Region für die Herstellung von Zwetschgenwässern darstellt, standen Muster dieses Standorts nicht für die Analysen zur Verfügung. Im Folgenden werden daher exemplarisch die gemessenen Isotopenverhältnisse authentischer Proben aus dem Schwarzwald und aus Franken des Jahrgangs 2004 mit den entsprechenden Daten der untersuchten Kirschwässer verglichen. Abbildung 35 zeigt die Spannbreiten der gemessenen $\delta^{13}\text{C}$ -Werte des Ethanols.

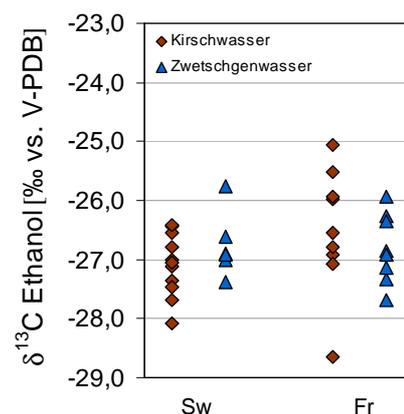


Abbildung 35: Vergleich der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von Kirsch- und Zwetschgenwässern der Regionen Franken und Schwarzwald

Den ermittelten Stabilisotopenwerten ist zu entnehmen, dass kein signifikanter Trend der $\delta^{13}\text{C}$ -Werten bezüglich der Rohstoffsorte zu verzeichnen ist. Diese Ergebnisse decken sich mit der Tatsache, dass die Kohlenstoffisotopenverhältnisse hauptsächlich vom Stoffwechselweg der Pflanze abhängen, welcher für beide C_3 -Pflanzen identisch verläuft. Während die Zwetschgendestillate aus dem Schwarzwald leicht erhöhte Werte im Vergleich zu den Kirschwässern aufweisen, ist beim Vergleich der entsprechenden Destillate aus Franken der gegenteilige Effekt zu beobachten. Die Unterschiede können jedoch nicht als signifikant bezeichnet werden.

Größere Differenzen sind beim Vergleich der Wasserstoffisotopenverhältnisse des Ethanol von Kirsch- und Zwetschgenwässern zu beobachten. Die gemessenen NMR-Daten sind in Abbildung 36 gegenübergestellt.

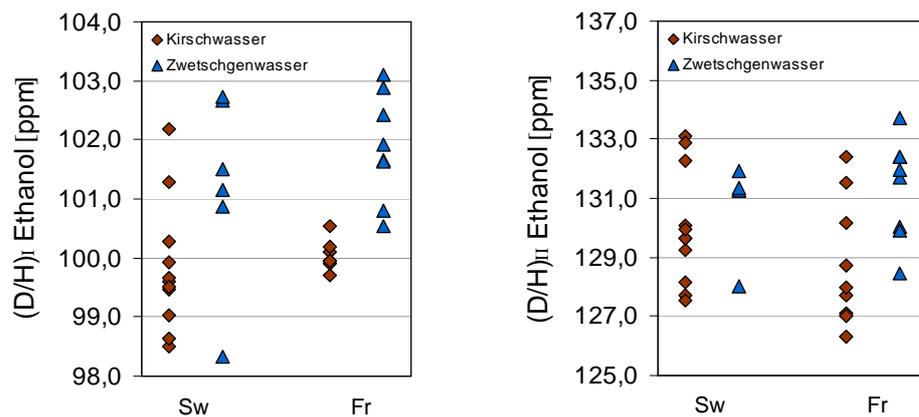


Abbildung 36: Vergleich der D/H-Verhältnisse von Kirsch- und Zwetschgenwässern der Regionen Franken und Schwarzwald

Besonders auffällig sind die deutlich höheren $(\text{D}/\text{H})_{\text{I}}$ -Verhältnisse der Zwetschgenwässer. Dies deckt sich mit den Ergebnissen einer früheren Studie, bei der verschiedenen Obstbrände bezüglich ihrer Wasserstoffisotopenverhältnisse an der Methylgruppe verglichen wurden (9). Hierbei konnte gezeigt werden, dass Zwetschgenbrände um durchschnittlich 2 ppm höhere $(\text{D}/\text{H})_{\text{I}}$ -Verhältnisse aufweisen als Kirschwässer desselben Jahrgangs. Zurückzuführen sind diese Ergebnisse auf die unterschiedlichen Transpirationsleistungen und die Reifezeitpunkte der jeweiligen Früchte (9). So werden Kirschen in der Regel im Juni, Zwetschgen hingegen zwischen September und Oktober geerntet. Durch die gewöhnlich vorherrschende Wärme und

Trockenheit in den Monaten Juli bis September kann es zu einer höheren Deuteriumanreicherung in den Stoffwechselprodukten der Pflanze kommen. Dies spiegelt sich folglich in den höheren $^2\text{H}/^1\text{H}$ -Verhältnissen des aus dem Fruchtzucker gebildeten Ethanol wider. Dieses Phänomen müsste sich auch in den $(\text{D}/\text{H})_{\text{II}}$ -Verhältnisse bemerkbar machen, konnte aber bei den hier untersuchten Destillaten nicht nachgewiesen werden. Jedoch zeigt sich, dass die untersuchten Stabilisotopenverhältnisse der Zwetschgenwässer ähnlich kleine Spannbreiten aufweisen wie die der Kirschdestillate. Dies spiegelt sich auch in den $\delta^{18}\text{O}$ -Werten des Wassers wider (Abbildung 37).

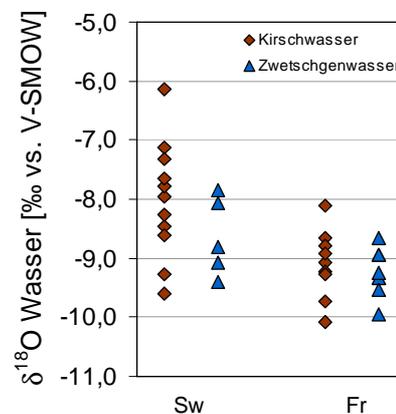


Abbildung 37: Vergleich der $\delta^{18}\text{O}$ -Werte von Kirsch- und Zwetschgenwässern der Regionen Franken und Schwarzwald

Durch die erwähnte spätere Reifephase der Zwetschgen und den damit verbundenen Unterschieden in den klimatischen Bedingungen sind höhere Sauerstoffisotopenverhältnisse des Fruchtwassers zu erwarten als für Kirschen. Beim Vergleich der $\delta^{18}\text{O}$ -Werte des Wassers der jeweiligen Kirsch- und Zwetschgenwässer lässt sich jedoch kein Unterschied feststellen. Dies erklärt sich durch das Herabsetzen der Mittelläufe auf Trinkstärke. Da das hierfür verwendete Verschnittwasser nahezu keine klimatische Abhängigkeit aufweist, werden die Unterschiede in den Sauerstoffisotopenverhältnissen der Mittelläufe gedämpft.

Auf Basis dieser Betrachtungen kann deshalb davon ausgegangen werden, dass sich Zwetschgenwässer unterschiedlicher geographischer Herkunft mittels Analyse der Stabilisotopenverhältnisse von Ethanol und Wasser vergleichbar den in dieser

Arbeit untersuchten Kirschdestillaten differenzieren lassen. Unterschiede in der Beeinflussung dieser Isotopenverhältnisse durch die technologischen Verfahrensschritte während der Herstellung im Vergleich zur Kirschbrandproduktion sind nicht zu erwarten, da die beschriebenen Isotopenfraktionierungen auf physikalischen Phänomenen beruhen, die nicht durch die Art des Rohstoffes beeinflusst werden.

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, auf der Basis der Analytik stabiler Isotope eine Methode zur Bestimmung der regionalen Herkunft von Obstbränden am Beispiel von Kirsch- und Zwetschgenwasser aus dem Schwarzwald, Franken sowie Norditalien (Alto Adige) zu erarbeiten. Als Grundlage für eine derartige Bestimmung wurden der $\delta^{13}\text{C}$ -Wert des Ethanols sowie der $\delta^{18}\text{O}$ -Wert des Wassers mit Hilfe von Isotope Ratio Mass Spectrometry (IRMS) ermittelt. Darüber hinaus wurden die beiden Wasserstoffisotopenverhältnisse $(\text{D}/\text{H})_{\text{I}}$ und $(\text{D}/\text{H})_{\text{II}}$ am Ethanol, welche sich mittels Site-specific Natural Isotope Fractionation-Nuclear Magnetic Resonance (SNIF-NMR[®]) bestimmen lassen, zur Bewertung herangezogen.

Durch die Herstellung eigener Destillate unter gezielter Variation einzelner Verfahrensschritte wurden zunächst Einflüsse des Herstellungsprozesses auf Isotopensignaturen relevanter Verbindungen in den Obstbränden untersucht. Variiert wurden hierbei neben dem verwendeten Hefestamm die Destillationsbedingungen und die angewandten Destillationstechniken (unterschiedlicher Einsatz von Glockenböden und Dephlegmator). Authentische vergorene Kirschmaischen wurden mittels Laboranlage unter konstanten Bedingungen destilliert und bezüglich der relevanten Stabilisotopenverhältnisse analysiert. Diese Ergebnisse wurden anschließend mit den entsprechenden Isotopenverhältnissen der Originaldestillate verglichen, die Brennern unter Bedingungen hergestellt worden waren, die praxisübliche Variationen im Verlauf des Herstellungsprozesses abdecken.

Es zeigte sich, dass der Destillationsschritt von Fraktionierungen der Kohlenstoff- und Wasserstoffisotopologie begleitet wird. Die beobachteten Verschiebungen von Isotopenverhältnissen lagen jedoch unterhalb der Wiederholgrenzen der jeweiligen Analysemethoden und beeinträchtigen daher die Anwendbarkeit der Isotopenanalytik zur Herkunftsbestimmung nicht.

Sowohl für unvergorene Kirschen als auch für daraus hergestellte Destillate war eine Zuordnung der Herkunft auf der Basis einzelner Isotopenverhältnisse nicht möglich. Durch Kombination der Einzeldaten mittels Diskriminanzanalyse gelang es jedoch, in beiden untersuchten Jahrgängen (2003, 2004) die Muster aus Norditalien eindeutig von denen aus dem Schwarzwald und aus Franken abzutrennen. Aufgrund der

klimabedingten Angleichung von Isotopenverhältnissen im Jahre 2003 kam es zu geringfügigen Überschneidungen der Diskriminanzwerte für Rohfrüchte und Destillate aus Franken und dem Schwarzwald. Eine vollständige Trennung ließ sich 2004 erzielen, einem Jahrgang, dessen klimatische Kenndaten (Temperatur, Niederschlag) dem langjährigen Mittel entsprachen. Auch nach Kombination der gemessenen Isotopenverhältnisse beider Jahrgänge war eine Differenzierung der norditalienischen Destillate von denen aus Deutschland möglich.

Der Vergleich der Isotopenverhältnisse von Kirschbränden und Zwetschgendestillaten aus Franken und dem Schwarzwald zeigte gute Übereinstimmungen. Es kann daher davon ausgegangen werden kann, dass die für Kirschwasser aufgezeigte Vorgehensweise auch für eine regionale Zuordnung von Zwetschgenwässern herangezogen werden kann.

Für die routinemäßige Anwendung der Methode sind jedoch auch in Zukunft regelmäßige Probenahmen und anschließende Analysen der Stabilisotopenverhältnisse nötig, um aus diesen Ergebnissen eine verlässliche Datenbank erstellen zu können, wie dies bereits in der Wein- und Fruchtsaftanalytik praktiziert wird. Hierdurch können Jahrgangsbedingte Schwankungen zuverlässiger bewertet und in zukünftigen Modellen berücksichtigt werden.

Literatur

- (1) Eckert, F. *Alkohol Jahrbuch 2005*; Zimmermann Druck + Verlag GmbH: Balve, 2005.
- (2) Spirituosen mit geographischen Angaben. *Alkoholhaltige Getränke-Verordnung (AGeV), Anlage 4 (zu § 9)*.
- (3) Rossmann, A. Determination of stable isotope ratios in food analysis. *Food Rev. Int.* **2001**, *17*, 347–381.
- (4) Martin, G. J.; Martin, M. L. The site-specific natural isotope fractionation-NMR method applied to the study of wines. In *Wine Analysis. Modern Methods of Plant Analysis*; Linskens, M. F., Jackson, J. F., Conte, L. S., Eds.; Springer-Verlag: Berlin, 1988; pp 259–275.
- (5) Rossmann, A.; Schmidt, H. L. Assignment of ethanol origin and proof of sugar addition to wine by positional deuterium and carbon-13 isotope-ratio measurement. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1989**, *188*, 434–438.
- (6) Nier, A. O.; Gulbransen, E. A. Variations in the relative abundance of the carbon isotopes. *J. Am. Chem. Soc.* **1939**, *61*, 697–698.
- (7) Koziat, J., Rossmann, A., Martin, G. J.; Johnson, P. Determination of the oxygen-18 and deuterium content of fruit and vegetable juice water. An European inter-laboratory comparison study. *Analytica Chimica Acta* **1995**, *302*, 29–37.
- (8) Martin, G. J., Martin, M. L., Mabon, F.; Michon, M. J. A new method for the identification of the origin of ethanols in grain and fruit spirits: High-field quantitative deuterium nuclear magnetic resonance at the natural abundance level. *J. Agric. Food Chem.* **1983**, *31*, 311–315.
- (9) Hermann, A.; Endres, O. Erste Erfahrungen beim Einsatz der NMR-Spektroskopie zur Untersuchung von Edelbränden. *Lebensmittelchemie* **1993**, *47*, 73–85.
- (10) Bauer-Christoph, C., Wachter, H., Christoph, N., Rossmann, A.; Adam, L. Assignment of raw material and authentication of spirits by gas chromatography, hydrogen-, and carbon-isotope ratio measurements. Part 1. Analytical methods and results of a study of commercial products. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1997**, *204*, 445–452.
- (11) Pissinatto, L., Martinelli, L. A., Victoria, R. L.; De Camargo, P. B. Stable carbon isotopic analysis and the botanical origin of ethanol in Brazilian brandies. *Food Res. Int.* **2000**, *32*, 665–668.
- (12) Aguilar-Cisneros, B. O., Lopez, M. G., Richling, E., Heckel, F.; Schreier, P. Tequila authenticity assessment by headspace SPME-HRGC-IRMS analysis of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ and $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ratios of ethanol. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 7520–7523.

- (13) Bauer–Christoph, C., Christoph, N., Aguilar–Cisneros, B. O., Lopez, M. G., Richling, E., Rossmann, A.; Schreier, P. Authentication of tequila by gas chromatography and stable isotope ratio analyses. *Eur. Food Res. Technol.* **2003**, *217*, 438–443.
- (14) Parker, I. G., Kelly, S. D., Sharman, M., Dennis, M. J.; Howie, D. Investigation into the use of carbon isotope ratios ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) of Scotch whiskey congeners to establish brand authenticity using gas chromatography–combustion–isotope ratio mass spectrometry. *Food Chem.* **1998**, *63*, 423–428.
- (15) Misselhorn, K., Brueckner, H., Muessing–Zufika, M.; Grafehrend, W. Identification of the starting material for highly rectified alcohol. *Ernaehrung* **1983**, *7*, 545–678.
- (16) Tanner, H.; Brunner, H. B. *Obstbrennerei heute*; Verlag Heller: Schwäbisch Hall, 1995.
- (17) Pieper, H. J., Bruchmann, E. E.; Kolb, E. *Technologie der Obstbrennerei*, 2 ed.; Verlag Eugen Ulmer: Stuttgart, 1993.
- (18) Wüstenfeld, H.; Haeseler, G. *Trinkbranntweine und Liköre*; Paul Parey Verlag: Berlin, Hamburg, 1964.
- (19) Fauth, R., Frank, W., Simson, I.; Stroehmer, G. Die Herstellung von Spirituosen. In *Spirituosen–Technologie*; Kolb, E., Ed.; Behr’s Verlag: Hamburg, 2002; pp 25–33.
- (20) Verordnung (EWG) Nr. 1576/89 des Rates vom 29. Mai 1989 zur Festlegung der allgemeinen Regeln für die Begriffsbestimmung, Bezeichnung und Aufmachung von Spirituosen.
- (21) Verordnung (EWG) Nr. 2626/95 der Kommission vom 10. November 1995 zur Änderung der Verordnung (EWG) Nr. 1014/90 mit Durchführungsvorschriften für die Begriffsbestimmung, Bezeichnung und Aufmachung von Spirituosen.
- (22) Adam, L., Bartels, W., Christoph, N.; Stempl, W. *Brennereianalytik Band 2, Qualitätskontrolle und Analytik im Fachlabor*; B. Behr’s Verlag GmbH & Co.: Hamburg, 1995.
- (23) Adam, L., Haug, M.; Kolb, E. Beitrag zur Kenntnis flüchtiger Inhaltsstoffe von Weindestillaten aus den Jahren 1990 bis 1993 – I. Gesamtübersicht, Alkohole und Carbonylverbindungen. *Die Branntweinwirtschaft* **1996**, *3*, 66–74.
- (24) Adam, L., Haug, M.; Kolb, E. Beitrag zur Kenntnis flüchtiger Inhaltsstoffe von Weindestillaten aus den Jahren 1990 bis 1993 – II. Ester und Sensorik. *Die Branntweinwirtschaft* **1996**, *3*, 82–90.
- (25) Adam, L., Bartels, W., Christoph, N.; Stempl, W. *Brennereianalytik Band 1, Qualitätskontrolle in der Brennerei und beim Spirituosenhersteller*; B. Behr’s Verlag GmbH & Co.: Hamburg, 1995.
- (26) Schmidt, H. L., Rossmann, A., Stoeckigt, D.; Christoph, N. Herkunft und Authentizität von Lebensmitteln. *Chem. Unserer Zeit* **2005**, *39*, 90–99.
- (27) Jakubke, H. D.; Karcher, R. *Lexikon der Chemie*; Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg, 1998.

- (28) Almeida, C. M.; Vasconcelos, M. T. S. D. ICP–MS determination of strontium isotope ratio in wine in order to be used as a fingerprint of its regional origin. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2001**, *16*, 607–611.
- (29) Horn, P., Hoelzl, S., Todt, W.; Matthies, D. Isotope abundance ratios of Sr in wine provenance determinations, in a tree–root activity study, and of Pb in a pollution study on tree–rings. *Isotopes in Environmental and Health Studies* **1998**, *34*, 31–42.
- (30) Horn, P., Schaaf, P., Holbach, B., Hoelzl, S.; Eschnauer, H. Strontium–87 and –86 transfer from rock and soil into vine and wine. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1993**, *196*, 407–409.
- (31) Horn, P., Hoelzl, S.; Schaaf, P. Lead and strontium–isotope signatures as tracers for anthropogenic and geological influences. *Isotopenpraxis* **1993**, *28*, 263–272.
- (32) Eschnauer, H., Hölzl, S.; Horn, P. Isotopensignaturen schwerer Elemente als Parameter zur Charakterisierung von Weinen. *Vitic. Enol. Sci.* **1994**, *49*, 125–129.
- (33) Craig, H. The geochemistry of the stable carbon isotopes. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **1953**, *3*, 53–92.
- (34) Nier, A. O. A redetermination of the relative abundances of the isotopes of carbon, nitrogen, oxygen, argon, and potassium. *Physical Review* **1950**, *77*, 789–793.
- (35) Bigeleisen, J. Statistical mechanics of isotope effects on the thermodynamic properties of condensed systems. *J. Chem. Phys.* **1961**, *34*, 1485–1493.
- (36) Calvin, M. B., J.A. The way of CO₂ in plant photosynthesis. *Comp. Biochem. Physiol.* **1962**, *4*, 187–204.
- (37) Downton, W. J. S. The occurrence of C₄ photosynthesis among plants. *Photosynthetica* **1975**, *9*, 96–105.
- (38) Winkler, F. J.; Schmidt, H. L. Application possibilities of carbon–13 isotope mass spectrometry in food analysis. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1980**, *171*, 85–94.
- (39) Dunbar, J., Schmidt, H. L.; Woller, R. Possible method for the detection of added sugar in wine using hydrogen isotope determinations. *Vitis* **1983**, *22*, 375–386.
- (40) Farquhar, G. D., Ehleringer, J. R.; Hubick, K. T. Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **1989**, *40*, 503–537.
- (41) Rossmann, A., Schmidt, H. L., Reniero, F., Versini, G., Moussa, I.; Merle, M. H. Stable carbon isotope content in ethanol of EC data bank wines from Italy, France, and Germany. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1996**, *203*, 293–301.

- (42) Martin, G. J., Zhang, B. L., Naulet, N.; Martin, M. L. Deuterium transfer in the bioconversion of glucose to ethanol studied by specific labeling at the natural abundance level. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 5116–5122.
- (43) Majoube, M. Fractionation of oxygen-18 and deuterium between water and vapor. *Journal de Chimie Physique et de Physico-Chimie Biologique* **1971**, *68*, 1423–1436.
- (44) Schotterer, U., Stocker, T., Bürki, H., Hunziker, J., Kozel, R., Grasso, D.; Tripet, J. Das Schweizer Isotopen-Messnetz. *GWA* **2000**, *10*, 733–741.
- (45) Mook, W. G. Environmental isotopes in the hydrological cycle; principles and applications. *UNESCO/IAEA Series* **2000**, *1*, 103–113.
- (46) Dansgaard, W. Stable Isotopes in precipitation. *Tellus* **1964**, *16*, 436–468.
- (47) Yurtsever, Y.; Gat, F. R. Atmospheric waters. *IAEA Technical Reports Series* **1981**, *210*, 103–142.
- (48) Foerstel, H. Natural fractionation of stable oxygen isotopes as an indicator of the purity and origin of wine. *Naturwissenschaften* **1985**, *72*, 449–455.
- (49) Dunbar, J. A study of the factors affecting the oxygen-18/oxygen-16 ratio of the water of wine. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1982**, *174*, 355–359.
- (50) Foerstel, H.; Prast, H. Dependence of the oxygen-18/oxygen-16 ratio in leaf water on the physical conditions of the environment. I. Experiment in the climate-controlled chamber. *Ber. Kernforschungsanlage Juelich* **1979**, 34 pp.
- (51) Rossmann, A., Reniero, F., Moussa, I., Schmidt, H. L., Versini, G.; Merle, M. H. Stable oxygen isotope content of water of EU data-bank wines from Italy, France, and Germany. *Zeitschrift fuer Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung A: Food Research and Technology* **1999**, *208*, 400–407.
- (52) Kornexl, B. E., Rossmann, A.; Schmidt, H.-L. Improving fruit juice origin assignment by combined carbon and nitrogen isotope ratio determination in pulps. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1996**, *202*, 55–59.
- (53) Krouse, H. R., Steward, J. W. B.; Grinenko, V. A. *Stable Isotopes: Natural and Anthropogenic Sulfur in the Environment*; John Wiley & Sons Ltd.: Chichester, 1991.
- (54) Capo, R. C., Stewart, B. W.; Chadwick, O. A. Strontium isotopes as tracers of ecosystem processes: theory and methods. *Geoderma* **1998**, *82*, 197–225.
- (55) Barbaste, M., Robinson, K., Guilfoyle, S., Medina, B.; Lobinski, R. Precise determination of the strontium isotope ratios in wine by inductively coupled plasma sector field multicollector mass spectrometry (ICP-SF-MC-MS). *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2002**, *17*, 135–137.
- (56) Fortunato, G., Mucic, K., Wunderli, S., Pillonel, L., Bosset, J. O.; Gremaud, G. Application of strontium isotope abundance ratios measured by MC-ICP-MS for food authentication. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2004**, *19*, 227–234.

- (57) Martin, G. J., Guillou, C., Martin, M. L., Cabanis, M. T., Tep, Y.; Aerny, J. Natural factors of isotope fractionation and the characterization of wines. *J. Agric. Food Chem.* **1988**, *36*, 316–322.
- (58) Kosir, I. J., Kocjancic, M., Ogrinc, N.; Kidric, J. Use of SNIF–NMR and IRMS in combination with chemometric methods for the determination of chaptalization and geographical origin of wines (the example of Slovenian wines). *Analytica Chimica Acta* **2001**, *429*, 195–206.
- (59) Ogrinc, N., Kosir, I. J., Kocjancic, M.; Kidric, J. Determination of Authenticity, Regional Origin, and Vintage of Slovenian Wines Using a Combination of IRMS and SNIF–NMR Analyses. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 1432–1440.
- (60) Christoph, N., Rossmann, A.; Voerkelius, S. Possibilities and limitations of wine authentication using stable isotope and meteorological data, Data banks and statistical tests. Part 1: Wines from Franconia and Lake Constance 1992 to 2001. *Mitteilungen Klosterneuburg* **2003**, *53*, 23–40.
- (61) Gimenez–Miralles, J. E., Salazar, D. M.; Solana, I. Regional Origin Assignment of Red Wines from Valencia (Spain) by ^2H NMR and ^{13}C IRMS Stable Isotope Analysis of Fermentative Ethanol. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 2645–2652.
- (62) Monetti, A., Versini, G.; Reniero, F. Classification of Italian wines on a regional scale by means of a multi–isotopic analysis. *Developments in Food Science* **1995**, *37B*, 1723–1730.
- (63) Versini, G., Monetti, A.; Reniero, F. Monitoring authenticity and regional origin of wines by natural stable isotope ratios analysis. *ACS Symposium Series* **1997**, *661*, 113–131.
- (64) Christoph, N., Baratossy, G., Kubanovic, V., Kozina, B., Rossmann, A., Schlicht, C.; Voerkelius, S. Possibilities and limitations of wine authentication using stable isotope ratio analysis and traceability. Part 2: Wines from Hungary, Croatia, and other European countries. *Mitteilungen Klosterneuburg* **2004**, *54*, 144–158.
- (65) Breas, O., Reniero, F.; Serrini, G. Isotope ratio mass spectrometry: analysis of wines from different European countries. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1994**, *8*, 967–970.
- (66) Gremaud, G., Pfammatter, E., Piantini, U.; Quaille, S. Classification of Swiss wines on a regional scale by means of multi–isotopic analysis combined with chemometric methods. *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene* **2002**, *93*, 44–56.
- (67) Day, M. P., Zhang, B.; Martin, G. J. Determination of the geographical origin of wine using joint analysis of elemental and isotopic composition. II–differentiation of the principal production zones in France for the 1990 vintage. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1995**, *67*, 113–123.
- (68) Martin, G. J., Mazure, M., Jouitteau, C., Martin, Y. L., Aguille, L.; Allain, P. Characterization of the geographic origin of Bordeaux wines by a combined

- use of isotopic and trace element measurements. *American Journal of Enology and Viticulture* **1999**, *50*, 409–417.
- (69) Almeida, C. M. R.; Vasconcelos, M. T. S. D. Does the winemaking process influence the wine $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$? A case study. *Food Chem.* **2003**, *85*, 7–12.
- (70) Jancso, G.; Van Hook, W. A. Condensed phase isotope effects. *Chem. Rev.* **1974**, *74*, 689–719.
- (71) Bigeleisen, J.; Kerr, E. C. Vapor–liquid equilibriums of dilute solutions of HT in e–H₂ and DT in e–D₂ from the triple points to the critical temperatures of the solutions. *J. Chem. Phys.* **1963**, *39*, 763–768.
- (72) Jancso, G., Rebelo, L. P. N.; Van Hook, W. A. Non–ideality in isotopic mixtures. *Chem. Soc. Rev.* **1994**, *23*, 257–264.
- (73) Mook, W. G. Environmental isotopes in the hydrological cycle; principles and applications. *UNESCO/IAEA Series* **2000**, *1*, 31–45.
- (74) Moussa, I., Naulet, N., Martin, M. L.; Martin, G. J. A site–specific and multielement approach to the determination of liquid–vapor isotope fractionation parameters: the case of alcohols. *J. Phys. Chem.* **1990**, *94*, 8303–8309.
- (75) Bigeleisen, J. Chemistry of isotopes. *Science* **1965**, *147*, 463–471.
- (76) Zhang, B.–L., Jouitteau, C., Pionnier, S.; Gentil, E. Determination of Multiple Equilibrium Isotopic Fractionation Factors at Natural Abundance in Liquid–Vapor Transitions of Organic Molecules. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 2983–2988.
- (77) McKinney, C. R., McCrea, J. M., Epstein, S., Allen, H. A.; Urey, H. C. Improvements in mass spectrometers for the measurement of small differences in isotope abundance ratios. *Review of Scientific Instruments* **1950**, *21*, 724–730.
- (78) Epstein, S.; Mayeda, T. Variation of oxygen 18 content of waters from natural sources. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **1953**, *4*, 213–224.
- (79) Hoering, T. Variations of nitrogen–15 abundance in naturally occurring substances. *Science (Washington, DC, United States)* **1955**, *122*, 1233–1234.
- (80) McCrea, J. M. The isotopic chemistry of carbonates and a paleo–temperature scale. *J. Chem. Phys.* **1950**, *18*, 849–857.
- (81) Bigeleisen, J., Perlman, M. L.; Prosser, H. C. Conversion of hydrogenic materials to hydrogen for isotopic analysis. *Anal. Chem.* **1952**, *24*, 1356–1357.
- (82) Barrie, A., Bricout, J.; Koziat, J. Gas chromatography–stable isotope ratio analysis at natural abundance levels. *Biomedical Mass Spectrometry* **1984**, *11*, 583–588.
- (83) Matthews, D. E.; Hayes, J. M. Isotope–ratio–monitoring gas chromatography–mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **1978**, *50*, 1465–1473.

- (84) Sano, M., Yotsui, Y., Abe, H.; Sasaki, S. A new technique for the detection of metabolites labeled by the isotope carbon-13 using mass fragmentography. *Biomedical Mass Spectrometry* **1976**, *3*, 1–3.
- (85) Commission Regulation (EC) No. 440/2003 of 10 March 2003; amending Regulation (EEC) No. 2676/90 determining community methods for the analysis of wines, Annex II. *Off. J. Eur. Union* **2003**, *L 66*, 15–23.
- (86) Commission Regulation (EC) No. 822/97 of 6 May 1997 amending Regulation (EEC) No 2676/90 determining Community methods for the analysis of wines. *Off. J. Eur. Union* **1997**, *L 117*, 10–12.
- (87) Schwedt, G. *Analytische Chemie. Grundlagen, Methoden und Praxis*; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, New York, 2004.
- (88) Commission Regulation (EEC) No. 2676/90 of 17 September 1990 determining Community methods for the analysis of wines. *Off. J. Eur. Union* **1990**, *L 272*, 1–192.
- (89) Versini, G.; Camin, F. Laboratorio di Analisi e Ricerche, Istituto Agrario di San Michele all'Adige, San Michele all'Adige, Trento, Italy. **2005**, *Personal Communications*.
- (90) International Organization for Standardisation. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method. *ISO 5725 1–6* **1994**.
- (91) Jansson, J.; Laatz, W. Diskriminanzanalyse. In *Statistische Datenanalyse mit SPSS für Windows*; Jansson, J., Laatz, W., Eds.; Springer: Berlin, 2005; pp 439–444.
- (92) Martens, J. Diskriminanzanalyse. In *Statistische Datenanalyse mit SPSS für Windows*; Martens, J., Ed.; Oldenbourg: München, 2003; pp 267–288.
- (93) Backhaus, K. Diskriminanzanalyse. In *Multivariate Analysemethoden*; Backhaus, K., Ed.; Springer: Berlin, 2003; pp 91–163.
- (94) Brosius, F. Diskriminanzanalyse. In *SPSS 12*; Brosius, F., Ed.; Mitp-Verlag: Bonn, 2004; pp 591–637.
- (95) <http://www.wetteronline.de> (Status 04.Okt.2005).
- (96) <http://www.klimadiagramme.de> (Status 04.Okt.2005).
- (97) Bundesanstalt für Geowissenschaften und Rohstoffe (BGR). Geologische Karte der Bundesrepublik Deutschland, 1:1.000.000. Hannover, 1993.
- (98) *GeoBavaria : 600 Millionen Jahre Bayern*; Bayerisches Geologisches Landesamt: München, 2004.
- (99) *Geological Map of Italy, 1:1250000*; Dipartimento Difesa del Suolo, Servizio Geologico d'Italia, 2004.
- (100) Adam, L. *Kontraktionstabellen*, 1 ed.; Verlag Heller Chemie- und Verwaltungsgesellschaft mbH: Schwäbisch Hall, 1995.

-
- (101) Otto, F. M. Analytische Kennzahlen in Steinobstmaischen und Steinobstbränden. Diplomarbeit, TU– München, 1997.
- (102) Jung, O. Ein Beitrag zur Qualitätsverbesserung: Destillate lagern – Viele Einflüsse bestimmen den Erfolg. *Kleinbrennerei* **2003**, *2*.
- (103) Meinel, J. Veränderungen der flüchtigen Inhaltsstoffe während der Herstellung von Obstbränden. Dissertation, TU–München, 1995.
- (104) Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin. Maßnahmen zur Reduzierung von Ethylcarbamat in Steinobstbränden. <http://www.bfr.bund.de> **1999**.
- (105) Christoph, N.; Bauer–Christoph, C. Maßnahmen zur Reduzierung des Ethylcarbamatgehaltes bei der Herstellung von Steinobstbränden I. *Kleinbrennerei* **1998**, *11*, 9–13.
- (106) Christoph, N.; Bauer–Christoph, C. Maßnahmen zur Reduzierung des Ethylcarbamatgehaltes bei der Herstellung von Steinobstbränden II. *Kleinbrennerei* **1999**, *1*, 5–9.
- (107) Dunbar, J. Oxygen isotope studies on some New Zealand grape juices. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1982**, *175*, 253–257.
- (108) Fauhl, C.; Wittkowski, R. Oenological Influences on the D/H Ratios of Wine Ethanol. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 3979–3984.
- (109) Vallet, C., Said, R., Rabiller, C.; Martin, M. L. Natural abundance isotopic fractionation in the fermentation reaction: influence of the nature of the yeast. *Bioorganic Chemistry* **1996**, *24*, 319–330.
- (110) Martin, G. J., Benbernou, M.; Lantier, F. Application of site–specific natural isotope fractionation (SNIF–NMR) of hydrogen to the characterization of European beers. *Journal of the Institute of Brewing* **1985**, *91*, 242–249.
- (111) Longinelli, A.; Selmo, E. Isotopic composition of precipitation in Italy: a first overall map. *Journal of Hydrology* **2003**, *270*, 75–88.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Klassischer Aufbau eines Brenngerätes	4
Abbildung 2:	Aufbau eines modernen Brenngerätes	5
Abbildung 3:	Glockenböden und Dephlegmator	5
Abbildung 4:	$\delta^{13}\text{C}$ -Werte der Hauptkohlenstoffreservoirs der Erde	12
Abbildung 5:	Potentialkurve zweier Moleküle	20
Abbildung 6:	Änderung der Bindungsenergie beim Phasenübergang flüssig-gasförmig	21
Abbildung 7:	Häufigkeitsverteilungen von Messwerten	27
Abbildung 8:	Häufigkeitsverteilung der Diskriminanzwerte	28
Abbildung 9:	Graphische Darstellung zweier Diskriminanzfunktionen	29
Abbildung 10:	Herkunft der Kirsch- und Zwetschgenproben	32
Abbildung 11:	Klimadiagramme von Freiburg Würzburg und Bozen	34
Abbildung 12:	Fraktionierung der Kohlenstoffisotopologie des Ethanols während der Destillation vergorener Kirschmaischen mittels Pilotanlage	72
Abbildung 13:	Fraktionierung der Kohlenstoffisotopologie des Ethanols während der Destillation einer Ethanol-Wasser Mischung mittels Laboranlage	73
Abbildung 14:	Fraktionierung der Wasserstoffisotopologie des Ethanols im Verlauf der Destillation einer Kirschmaische mittels Pilotanlage	74
Abbildung 15:	Fraktionierung der Wasserstoffisotopologie des Ethanols im Verlauf der Destillation einer Ethanol-Wasser Mischung mittels Laboranlage	75
Abbildung 16:	Einfluss von Dephlegmator und Glockenböden auf die Fraktionierung der Kohlenstoff- und Wasserstoffisotopo- logie des Ethanols im Verlauf der Destillation mittels Laboranlage	77

Abbildung 17:	Vergleich der Kohlenstoff- und Wasserstoffisotopenverhältnisse des Ethanol von Original- und Laboranlagendestillaten	83
Abbildung 18:	Änderung des $\delta^{18}\text{O}$ -Werts von Wasser im Verlauf der Destillation von Charge 6	85
Abbildung 19:	Korrelation der $\delta^{18}\text{O}$ -Werte von Mittellauf und Fertigprodukt	87
Abbildung 20:	Korrelation der $\delta^{18}\text{O}$ -Werte von Verschnittwasser und Fertigprodukt	88
Abbildung 21:	$\delta^{13}\text{C}$ -Werte von Zucker und Pulpe unvergorener Kirschproben	89
Abbildung 22:	$\delta^{18}\text{O}$ - sowie $\delta^2\text{H}$ Werte der Pulpe unvergorener Kirschen	91
Abbildung 23:	$\delta^{15}\text{N}$ - sowie $\delta^{34}\text{S}$ Werte der Pulpe unvergorener Kirschen	93
Abbildung 24:	Strontiumisotopenverhältnisse der Pulpe ausgewählter Kirschproben des Jahrgangs 2003	94
Abbildung 25:	Regionale Differenzierung der unvergorenen Maischeproben des Jahrgangs 2003 mittels Diskriminanzanalyse	95
Abbildung 26:	Regionale Differenzierung der unvergorenen Maischeproben des Jahrgangs 2004 mittels Diskriminanzanalyse	96
Abbildung 27:	Regionale Differenzierung der unvergorenen Maischeproben des Jahrgangs 2004 mittels Diskriminanzanalyse unter Berücksichtigung der Wasserstoffisotopenverhältnisse der Fruchtpulpe	97
Abbildung 28:	$\delta^{13}\text{C}$ -Werte von Ethanol der Destillate der Jahrgänge 2003 und 2004	98
Abbildung 29:	D/H-Verhältnisse von Ethanol der Destillate der Jahrgänge 2003 und 2004	99
Abbildung 30:	$\delta^{18}\text{O}$ -Werte von Wasser der Destillate der Jahrgänge 2003 und 2004	101
Abbildung 31:	Strontiumisotopenverhältnisse von unvergorenen Kirschen, Verschnittwasser und Fertigdestillat ausgewählter Muster	102

Abbildung 32:	Regionale Differenzierung der Destillate des Jahrgangs 2003 mittels Diskriminanzanalyse	103
Abbildung 33:	Regionale Differenzierung der Destillate des Jahrgangs 2004 mittels Diskriminanzanalyse	104
Abbildung 34:	Regionale Einordnung von Handelsproben auf Basis eines berechneten Diskriminanzmodells	106
Abbildung 35:	Vergleich der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von Kirsch- und Zwetschgenwässern der Regionen Franken und Schwarzwald	107
Abbildung 36:	Vergleich der D/H-Verhältnisse von Kirsch- und Zwetschgenwässern der Regionen Franken und Schwarzwald	108
Abbildung 37:	Vergleich der $\delta^{18}\text{O}$ -Werte von Kirsch- und Zwetschgenwässern der Regionen Franken und Schwarzwald	109

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Orientierungswerte für untere Konzentrationsgrenzen von Verderbnisindikatoren für den Rückschluss auf den Verderb einer Obstmaische	8
Tabelle 2:	Bioelemente und die mittleren relativen Häufigkeiten ihrer stabilen Isotope	10
Tabelle 3:	Internationale Isotopenstandards	11
Tabelle 4:	Einmaisch- und Lagerbedingungen der Kirschmaischen	39
Tabelle 5:	Herkunfts- und Einmaischdaten der Kirschproben (Jahrgang 2003)	56
Tabelle 6:	Herkunfts- und Einmaischdaten der Kirschproben (Jahrgang 2004; Teil 1)	57
Tabelle 7:	Herkunfts- und Einmaischdaten der Kirschproben (Jahrgang 2004; Teil 2)	58
Tabelle 8:	Herkunfts- und Einmaischdaten der Zwetschgenproben (2004)	58
Tabelle 9:	Destillationsbedingungen der Kirschdestillate (Jahrgang 2003)	59
Tabelle 10:	Destillationsbedingungen der Kirschdestillate (Jahrgang 2004; Teil 1)	60
Tabelle 11:	Destillationsbedingungen der Kirschdestillate (Jahrgang 2004; Teil 2)	61
Tabelle 12:	Destillationsbedingungen der Zwetschgendestillate (Jahrgang 2004)	61
Tabelle 13:	Auf den eingesetzten GC- Säulen erfasste Verbindungen	64
Tabelle 14:	Konzentrationen flüchtiger Verbindungen sowie von Ethylcarbamat in den Destillaten (Teil 1)	66
Tabelle 15:	Konzentrationen flüchtiger Verbindungen sowie von Ethylcarbamat in den Destillaten (Teil 2)	67
Tabelle 16:	Einfluss des Hefestamms auf Stabilisotopenverhältnisse	70

Tabelle 17:	Abhängigkeit der Kohlenstoff- und Wasserstoffisotopen- verhältnisse des Ethanols von der Destillationstechnik	78
Tabelle 18:	Abhängigkeit der Kohlenstoff- und Wasserstoffisotopen- verhältnisse am Ethanol vom Wechsel zwischen Mittel- und Nachlauf	81
Tabelle 19:	Abhängigkeit des $\delta^{18}\text{O}$ -Werts des Wassers vom Wechsel zwischen Mittel- und Nachlauf	86

Formelverzeichnis

Formel 1:	Berechnung von δ -Werten (33)	11
Formel 2:	Meteoric Water Line (MWL) (42)	14
Formel 3:	Berechnung des Isotopic Fractionation Factors α (69)	18
Formel 4:	Berechnung des Ethanolgehalts (86)	25
Formel 5:	Berechnung der Wiederholgrenze r (88)	26
Formel 6:	Allgemeine Darstellung einer Diskriminanzfunktion auf Basis zweier Messgrößen	28
Formel 7:	Berechnung des $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes	48
Formel 8:	Berechnung der Isotopenverhältnisse der Mittellauffraktion	80

Lebenslauf

Zur Person

Name: Ron Baudler
Geburtstag und -ort: 31.12.1976 in Coburg
Staatsangehörigkeit: deutsch

Ausbildung

09-1983 – 07.1987: Grund- und Volksschule Rödental-Einberg
09.1987 – 06.1996: Gymnasium Ernestinum Coburg
10.1997 – 02.2003: Studium der Technologie und Biotechnologie der
Lebensmittel an der Technischen Universität
München/Weihenstephan
Abschluss als Dipl.-Ing.
03.2003 – 01.2006: Wissenschaftlicher Mitarbeiter
am Lehrstuhl für Allgemeine Lebensmitteltechnologie
(Prof. Dr. K.-H. Engel) in Freising/Weihenstephan
Anfertigen der vorliegenden Arbeit:
„Nachweis der Herkunft von Kirsch- und Zwetschgen-
wässern mittels Analytik stabiler Isotopen“

Publikationen und Vorträge

Baudler, R.; Adam, L.; Roßmann, A.; Engel, K. H. Einfluss brennereitechnologischer Verfahren auf den Herkunftsnachweis von Kirschwässern mittels Analytik stabiler Isotope. *Lebensmittelchemie* **2004**, *58*, 92–93.

Baudler, R.; Adam, L.; Roßmann, A.; Versini, G.; Engel, K. H. Täuschungen auf der Spur. *Kleinbrennerei* **2004**, *10*, 4–6.

Baudler, R.; Adam, L.; Roßmann, A.; Versini, G.; Engel, K. H. Influence of the distillation step on the ratios of stable isotopes of ethanol in cherry brandies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Im Druck.

Engel, K.-H.; Baudler, R.; Adam, L.; Roßmann, A.; Versini, G.; Christoph, N.; Bauer-Christoph, C. Assignment of the regional origin of cherry brandies by stable isotope analysis. *ACS Symposium Series*. Im Druck.

08.02.2004 Regionaltagung der Gesellschaft Deutscher Chemiker e.V. (GDCh), Würzburg:

„Einfluss brennereitechnologischer Verfahren auf den Herkunftsnachweis von Kirschwässern mittels Analytik stabiler Isotope“

02.04.2004 Behr's Spirituosenforum, Darmstadt:

„Isotopenbestimmung in Steinobstbränden“

07.12.2005 Jahresversammlung des Verbandes Badischer Klein- und Obstbrenner e.V., Freiamt

“Nachweis der Herkunft von Kirsch- und Zwetschgenwässern mittels Analytik stabiler Isotope“