

ERGEBNISSE EINER RINGANALYSE ZUR BESTIMMUNG VON MALVIDIN-3,5-DIGLUCOSID IN ROTWEIN MITTELS REVERSED PHASE-HPLC

ELSA PATZL-FISCHERLEITNER UND REINHARD EDER

Höhere Bundeslehranstalt und Bundesamt für Wein- und Obstbau
A-3400 Klosterneuburg, Wiener Straße 74
E-Mail: Elsa.Fischerleitner@weinobst.at

Zur Ermittlung der Methodenkenzzahlen (Genauigkeit, Wiederholbarkeit) wurde eine internationale Ringanalyse mit sechs Teilnehmern zur Bestimmung von Malvidin-3,5-diglucosid in Rotwein mittels RP-HPLC durchgeführt. Der Gehalt dieses Direktträgerfarbstoffes in den fünf versendeten Proben lag, unter besonderer Beachtung des Grenzwerts von 15 mg/l, zwischen 2 mg/l und 80 mg/l. Die Auswertung erfolgte mittels MS Excel 2010. Zur allgemeinen Beurteilung der Ringanalyse wurden Gesamtmittelwert, absolute und relative Standardabweichung, Spannweite der Ergebnisse, Vergleichbarkeit, Wiederholbarkeit und HORRAT-Wert erfasst. Das Ergebnis des Ringversuchs ist akzeptabel, der HORRAT-Wert lag in allen Bereichen unter 1,5. Bei Malvidin-3,5-diglucosid-Gehalten von über 30 mg/l lag die relative Standardabweichung unter 10 %. Im Grenzwertbereich muss mit Analysefehlern von rund 11 % gerechnet werden. Lediglich bei sehr geringen Gehalten des Direktträgerfarbstoffs (z. B. 2 mg/l) lag die Streuung der Ergebnisse bei über 18 %.

Schlagwörter: Ringanalyse, Malvidindiglucosid, RP-HPLC

Results of a collaborative trial concerning the determination of malvidin-3,5-diglucoside in red wine by means of Reversed Phase-HPLC. In order to determine accuracy of the malvidin-3,5-diglucoside determination in red wine a collaborative trial (six participants) by means of RP-HPLC was organized. Contents of this hybrid pigment of five presented samples were adjusted between 2 mg/l and 80 mg/l with main focus on the current legal limit of 15 mg/l. Data evaluation was carried out with MS Excel 2010. For total interpretation mean value, standard deviation, range of values, repeatability, reproducibility and HORRAT-value were calculated. In general results of this collaborative trial are acceptable, because all analyses resulted in a HORRAT-value below 1.5. Samples with contents of 30 mg/l of Malvidin-3,5-diglucoside and more showed an analytical deviation under 10 %. Near the tolerance limit of 15 mg/l deviations of about 11 % were detected. However, low contents of malvidin-3,5-diglucoside (e. g. 2 mg/l) caused variances of more than 18 %.

Keywords: collaborative trial, malvidin-3,5-diglucoside, RP-HPLC

Seit dem ersten Jänner 2009 ist in Österreich in allen Qualitätsrotweinen und roten Prädikatsweinen die quantitative Analyse von Malvidin-3,5-diglucosid mit einer Toleranzgrenze von 15 mg/l zwingend vorgeschrieben. Sobald dieser Grenzwert überschritten wird, ist die Probe von den Bundesämtern zu beanstanden.

Malvidin-3,5-diglucosid ist ein für Direktträgertrauben und -weine spezifischer Anthocyanfarbstoff, der in den in Österreich für Qualitätswein nicht zugelassenen amerikanischen *Vitis*-Arten (z.B. *Vitis riparia*, *Vitis labrusca*, *Vitis rupestris*) vorkommt. Dem gegenübergestellt sind die traditionellen Europäerreben (*Vitis vinifera*) frei von diglucosidisch gebundenen Anthocyanen, somit ist Malvidin-3,5-diglucosid in den in Österreich zur Qualitätsweinproduktion zugelassenen Rebsorten nicht nachzuweisen (EDER et al., 1994). Zu einer gewissen Verwischung dieser klaren Differenzierung ist es durch die Züchtung und Zulassung neuer Sorten mit europäischen und amerikanischen Elternsorten gekommen. So gibt es nun in Österreich für Wein zugelassene Rebsorten, wie beispielsweise 'Regent', deren Trauben und Weine bemerkenswerte Mengen an Malvidin-3,5-diglucosid aufweisen. Da ein Verschnitt von Weinen dieser Rebsorten mit Land- und Qualitätswein verboten ist, gilt für Qualitätswein weiterhin das Toleranzlimit von 15 mg/l (FLAK et al., 2009b).

In der offiziellen vom OIV zugelassenen Analysenmethode (OIV, 2013a) wird Malvidin-3,5-diglucosid aufgrund seiner ziegelroten Fluoreszenz im UV-Licht (bei 369 nm) visuell nachgewiesen. Üblicherweise wird zuvor eine Auftrennung der Rotweinfarbstoffe mit Papier- oder Dünnschichtchromatographie durchgeführt (EDER et al., 1990). Da mit diesen Methoden aber keine quantitativen Aussagen bezüglich Direktträgerfarbstoff gemacht werden können, werden in vielen Labors verschiedene Reversed Phase-HPLC-Methoden eingesetzt, die sich in der Probenvorbereitung, der Verwendung der Säule, des Laufmittels, des Gradienten und der Detektion unterscheiden können. FLAK et al. (2009a) beschreiben sowohl eine HPLC-Methode mit UV/VIS-Detektion als auch eine HPLC-Methode mit Fluoreszenzdetektion. Da bis zum heutigen Zeitpunkt noch keine offiziellen Aussagen über die Genauigkeit der HPLC-Methoden existieren, ist die Durchführung einer internationalen Ringanalyse zu diesem Zweck unumgänglich.

MATERIAL UND METHODEN

Der Laborvergleichstest wurde analog zu den OIV-Grundsätzen aufgebaut (OIV, 2013b) und enthielt daher fünf verdeckte Proben mit je einer Wiederholung (blind duplicate). Die Proben wurden an zwei österreichische und acht europäische Weinlabors versandt. Um ein repräsentatives Ergebnis zu erhalten, ist vom OIV zwar eine Teilnahme von mindestens acht Labors gewünscht, teilgenommen haben aber leider nur insgesamt sechs Labors aus Österreich und Deutschland. Die Analyse des gewünschten Parameters erfolgte mit RP-HPLC, wobei die Wahl der Trennsäule, des Laufmittels und des Gradienten nicht vorgeschrieben war. Es wurde pro Labor eine Doppelbestimmung durchgeführt, um eine gute statistische Auswertung der Daten gewährleisten zu können.

Der Gehalt an Malvidin-3,5-diglucosid der einzelnen Proben lag, unter besonderer Beachtung des Grenzwertbereichs von 15 mg/l, zwischen 2 mg/l und 80 mg/l.

Die Auswertung des Ringversuchs erfolgte mit einer selbst entwickelten Auswertungsdatei (MS Excel 2010). Ermittelt wurden einerseits Maßzahlen für die individuelle Betrachtung der Ergebnisse (z. B. Übereinstimmung des Labormittelwerts mit dem Gesamtmittelwert, Bezug des Wertes auf die festgestellten Schwankungsbreiten) bzw. zur Beurteilung der Leistungsfähigkeit des einzelnen Labors (z-score), andererseits Kennzahlen zur allgemeinen Beurteilung der Ringanalyse (Gesamtmittelwert, Standardabweichung, Spannweite der Ergebnisse, Vergleichbarkeit, Wiederholbarkeit, HORRAT-Wert).

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die zur Bewertung des Gesamtergebnisses der Laborvergleichsuntersuchung relevanten Ergebnisse sind in Tabelle 1 dargestellt.

Mit dem HORRAT-Wert (HORWITZ und ALBERT, 2006) wird festgestellt, ob die Streuung der Ergebnisse zufriedenstellend ist. Das Ergebnis eines Ringversuchs gilt nach HORWITZ et al. (1998) als akzeptabel, wenn der HORRAT-Wert 1,5 nicht überschreitet. Es kommt zwar bei keiner der fünf Proben zu einer Überschreitung des HORRAT-Wertes von 1,5, dennoch kann das Ergebnis dieser Ringanalyse nicht gänzlich als zufrieden-

denstellend eingestuft werden, da sehr geringe Gehalte größeren Schwankungen unterworfen sind. In dieser Ringanalyse wurde bei einem Gehalt von 2 mg/l Malvidin-3,5-diglucosid ein Variationskoeffizient von 0,185 ermittelt, die Schwankungsbreite liegt in diesem Bereich also bei 18,5%.

Bezugnehmend auf Abbildung 1 ist anzumerken, dass die relative Standardabweichung bei der Bestimmung des Gehalts an Malvidin-3,5-diglucosid mittels HPLC erst bei Ergebnissen ab 30 mg/l unter 10 % liegt. Im Bereich des gesetzlichen Grenzwertes von 15 mg/l muss mit einem etwas höheren Analysenfehler gerechnet

werden (Abb. 1), dieser liegt mit einer relativen Standardabweichung von 11,2 % aber auch noch im akzeptablen Bereich. Dass im niedrigen Gehaltsbereich des Direktträgerfarbstoffs (Mittelwert der Probe 2: 2 mg/l) mit einer größeren Streuung der Werte gerechnet werden muss, liegt unter anderem auch daran, dass diese Analysenwerte zum Teil schon nahe an den Nachweisgrenzen mancher HPLC-Methoden liegen. Diese wurden von einigen teilnehmenden Labors mit 1 bzw. 2 mg/l angegeben und lagen auch bei FLAK et al. (2009a) in diesem Bereich.

Tab. 1: Statistische Beurteilungsparameter der Ringanalyse

Probe	Gesamtmittelwert Malvidin-3,5-diglucosid mg/l	Standard- abweichung mg/l	Rel. Standard- abweichung %	Spann- weite mg/l	Vergleich- barkeit (R) mg/l	Wiederhol- barkeit mg/l	HORRAT- Wert
1	31,70	3,14	9,89	10,4	9,69	2,11	1,14
2	2,00	0,37	18,52	1,6	1,13	0,50	1,39
3	11,22	1,64	14,58	4,8	5,06	1,02	1,43
4	79,65	6,04	7,58	11,4	18,67	3,90	1,00
5	13,79	1,54	11,19	4,9	4,73	1,89	1,12

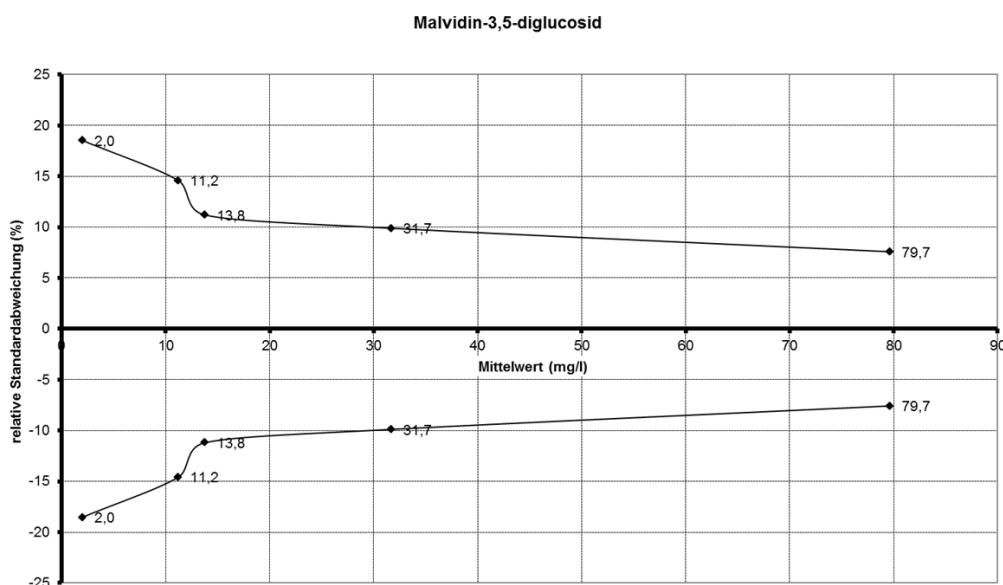


Abb. 1: Relative Standardabweichung bei der Bestimmung des Gehalts an Malvidin-3,5-diglucosid mittels HPLC in Abhängigkeit vom Mittelwert

LITERATUR

- EDER, R., WENDELIN, S. UND BARNA, J. 1994: Klassifizierung von Rotweinsorten mittels Anthocyananalyse. 1. Mitt.: Anwendung multivariater statistischer Methoden zur Differenzierung von Traubenproben. Mitt. Klosterneuburg 44: 201-212
- EDER, R., KALCHGRUBER, R., WENDELIN, S. UND BARNA, J. 1990: Nachweis von Fremd- und Direktträgerfarbstoff in Wein mittels Reversed-Phase Dünnschichtchromatographie. Mitt. Klosterneuburg 40: 152-157
- FLAK, W., BATUSIC, M., KRIZAN, R., SCHABER, R. UND WALLNER, E. 2009A: Die Serienbestimmung von Malvidin-3,5-diglucosid im Wein mittels Fluoreszenzdetektion und HPLC. Mitt. Klosterneuburg 59: 115-120
- FLAK, W., REGNER, F. UND EDER, R. 2009B: Kontrolle von Qualitätsweinen auf Direktträgerfarbstoffe. Der Winzer (1): 8-10
- HORWITZ, W. AND ALBERT, R. 2006: The Horwitz ratio (HorRat): A useful index of method performance with respect to precision. J. AOAC Int. 89(4): 1095-1099
- HORWITZ, W., BRITTON, B. AND CHIRTEL, S.J. 1998: OIV 2013A: Compendium of international methods of analysis of wine and musts, Vol. 2. Malvidin diglucoside (A18) Method MA-AS315-03:R2009. Paris: OIV, 2013
- OIV 2013B: Compendium of international methods of analysis of wine and musts, Vol. 2. Protocol for design, conduction and interpretation of collaborative studies (oeno 6/2000). OIV-MA-AS1-09:R2000. Paris: OIV, 2013

Eingelangt am 26. Jänner 2015