

Die Serienbestimmung von Malvidin-3,5-diglucosid in Wein mittels Fluoreszenzdetektion und HPLC

WALTER FLAK, MARIA BATUSIC, RUDOLF KRIZAN, RUDOLF SCHABER und ERICH WALLNER

Bundesamt für Weinbau
A-7000 Eisenstadt, Gölbeszeile 1
E-mail: W.Flak@bawb.at

Es wird eine Methode zur Serienbestimmung von Malvidin-3,5-diglucosid in Weinen auf Basis fluoreszenzspektral-photometrischer Vorprüfung und nachlaufender, hochdruckflüssigkeitschromatografischer Quantifizierung vorgestellt. Die Probenvorbereitung besteht in einer selektiven Spaltung der glucosidischen Bindungen des Farbträgers durch Natriumnitrit; die anschließende Detektion erfolgt fluoreszenzspektralphotometrisch unter Beachtung des aktuell geltenden Grenzwerts von 15 mg/l. Für die Verifizierung von Positivbefunden wurden zwei HPLC-Verfahren (entweder mit Gradientenelution und UV-VIS-Detektion oder isokratisch mit Fluoreszenzdetektor) entwickelt. Die Nachweisgrenze der empfindlicheren Fluoreszenzdetektion liegt bei etwa 200 µg Malvidindiglucosid pro Liter Wein, die UV-VIS-Detektion erlaubt die Einhaltung einer Nachweisgrenze von zumindest 1 mg/l. Der mit der beschriebenen Anordnung erzielbare Probendurchsatz erfüllt ausreichend die Erfordernisse der Wein-Serienanalytik.
Schlagwörter: Direktträger, Qualitätsweinprüfung, Malvidin-3,5-diglucosid, Fluoreszenzdetektion

Serial determination of malvidin-3,5-diglucosid in wine by means of Fluorescence Spectrometry and HPLC. A method for a serial determination of malvidin-3,5-diglucosid in wines based on fluorescence spectrometric prescreening and subsequent HPLC quantification is presented. Sample preparation is done by a selective splitting of the glycosidic compounds of the colour medium by sodium nitrite; the following detection is carried out fluorescence spectrometrically in compliance with the current legal limit of 15 mg/l. For verification two HPLC procedures were developed (either with gradient elution and UV-VIS detection or isocratic with fluorescence detector). The detection limit of the more sensitive fluorescence detection is about 200 µg malvidindiglucosid per liter of wine, UV-VIS detection allows for compliance with a detection limit of at least 1 mg/l. The capacity of the described procedure sufficiently meets the requirements of the serial analyses of wine.

Keywords: Direct-producer vines, 'Qualitätswein' testing, malvidin-3,5-diglucosid, fluorescence detection

La détermination en série de la malvidine-3,5-diglucoside dans le vin à l'aide de la détection par fluorescence et de l'HPLC. Il est présenté une méthode de détermination en série de la malvidine-3,5-diglucoside dans les vins sur la base d'un examen préalable à la spectrophotométrie à fluorescence et d'une quantification subséquente à la chromatographie liquide sous haute pression. La préparation des échantillons consiste dans une coupure sélective des liaisons glucosidiques du chromophore à l'aide de nitrite de sodium; la détection suivante s'effectue par spectrophotométrie à fluorescence en tenant compte de la valeur limite actuelle de 15 mg/l. Deux procédés HPLC (l'un par élution par paliers et par détection UV-VIS, l'autre de manière isocratique avec un détecteur de fluorescence) ont été développés pour la vérification des résultats positifs. La limite de détection de la détection par fluorescence plus sensible se situe à près de 200 µg de malvidine-diglucoside par litre de vin, la détection par UV-VIS permet l'observation d'une limite de détection d'au moins 1 mg/l. Le débit d'échantillons pouvant être atteint avec le procédé expérimental décrit fournit une réponse suffisante aux exigences de l'analyse séquentielle des vins.

Mots clés: Hybrides, examen qualitatif des vins, malvidine-3,5-diglucoside, détection par fluorescence

Die Rebsorten, die in Österreich für die Erzeugung von Qualitätswein oder Qualitätswein besonderer Reife und Lesart (Prädikatswein) verwendet werden dürfen, sind ausschließlich Reben der Art *Vitis vinifera* L. (Eu-

ropäerrebe). Alle diese Vinifera-Sorten sind in botanisch-ampelographischer Hinsicht durch offene Triebspitzen sowie eine unterbrochene Rankenfolge und Markröhre gekennzeichnet. Im Gegensatz zu den meisten amerikanischen Vitis-Arten (*Vitis riparia*, *Vitis rupestris*, *Vitis berlandieri*) weisen Europäerreben keinen Foxgeschmack auf und sind in farbmäßiger Hinsicht frei von diglucosidisch gebundenen Anthocyanen. Dieser so genannte Direktträgerfarbstoff (Malvidin-3,5-diglucosid) verleiht vielen Amerikanerreben und den daraus erzeugten Säften und Weinen eine markante orangefarbene Färbung. Der Farbstoff ist auch in vielen Neuzüchtungen auf Direktträgerbasis (Kreuzungen und Hybriden) zumindest noch in Spuren enthalten und nachzuweisen. Die erst in Folge der Reblauskrise in Österreich angepflanzten amerikanischen Vitis-Arten sind seit der Zwischenkriegszeit (1929: Kennzeichnungspflicht für Direktträgerwein; 1936: Auspflanzverbot für Direktträgerweine; 1937: Verschnittverbot von Edelwein mit Direktträgerwein) nicht mehr für die Weinproduktion zugelassen (BGBL., 1929, 1936, 1937a und b).

Ursprünglich waren dadurch nur die Reben von der Auspflanzung ausgeschlossen, die ohne Pfropfung auf Unterlagsreben kultiviert werden können; heute sind auch alle Hybride beziehungsweise Rebsorten mit „Amerikanereinfluss“ von diesem Verbot, zumindest was ein Inverkehrbringen als Qualitätswein angeht, betroffen. Dabei weisen diese Sorten aus weinbaulicher Sicht durchaus positive Eigenschaften auf, da sie in der Regel überdurchschnittlich gegen Infektionen (z.B. *Oidium* oder *Peronospora*) und viele Rebschädlinge widerstandsfähig sind. Damit kann der Einsatz von chemisch-synthetischen Insektiziden und organischen Fungiziden weitgehend vermieden werden. Diese natürlichen Resistenzeigenschaften sind Sortenmerkmale, die aus Kostengründen generell für den Weinbau, aber insbesondere für die Biowein-Erzeugung (Biologisch-organischer Weinbau) von Interesse sind. In diesem weinbaulichen Bereich findet man häufig Rebsorten, wie 'Regent', 'Phoenix' oder 'Saphira', die sich sehr gut in die Bio-Programme integrieren lassen. Neben den bereits in langjähriger Tradition kultivierten Direktträger-Sorten, wie etwa den im Südburgenland regional bedeutsamen so genannten „Uhdlerreben“ werden also auch aktuell Rebneuzüchtungen, die Eigenschaften der Amerikanerreben aufweisen, ausgepflanzt und kultiviert. Die Einbringung derartiger Weine in Großmengen, vorwiegend Land-, aber auch Qualitätsweine aus roten Sorten, ist aus weinrechtlicher Sicht

unzulässig und kann zu Beanstandungen führen. Vor allem aus dieser Sicht verlangen die weinwirtschaftlichen Gremien nach einer effizienten und exakten Untersuchungsmöglichkeit für private Einreicher wie auch nach einer flächendeckenden Kontrolle von Qualitäts- und Exportweinen hinsichtlich Verschnitt mit Direktträgerwein.

Als geeigneter weinchemischer Parameter für eine Unterscheidung zwischen den beiden Rebtypen bietet sich der spezifische Farbstoff Malvidin-3,5-diglucosid (Abb. 1) an, der nativ ausschließlich in Amerikanerreben vorkommt, aber auch in vielen davon abgeleiteten Hybriden (z. B. 'Cabernet Cortis', 'Cabernet Carol', 'Monarch', 'Muskat bleu', 'Regent' und 'Rondo') nachzuweisen ist (STARK-URNAU et al., 2004). Malvidin-3,5-diglucosid ist ein natürlicher Farbstoff, der zu den Anthocyanidinen gehört und außer in roten Trauben auch in einigen Früchten und Blüten vorkommt. In den in Österreich für die Qualitätsweinproduktion zugelassenen Rebsorten ist der Farbstoff allerdings nicht nachzuweisen; die Farbträger dieser Reben und Weine bestehen ausschließlich aus monoglucosidisch gebundenen Anthocyanen (EDER et al., 1994).

Farbgebende Verbindungen haben aus analytischer Sicht den Vorteil, dass sie wegen ihrer spektralen Eigenschaften in der Regel mit hoher Empfindlichkeit und Selektivität nachgewiesen werden können (AMERINE und OUGH, 1980; LINSKENS und JACKSON, 1988). Eine aufwändige Probenvorbereitung ist in der Regel nicht erforderlich. Damit sind fast immer auch Serienbestimmungen mit entsprechend hohem Probendurchsatz möglich. Ein derartiges Nachweisverfahren ist daher grundsätzlich geeignet, die sehr großen Probenzahlen, die im österreichischen Qualitätsweinprüfsystem und beim Weinexport jährlich anfallen, in einer kundenorientierten Zeitspanne zu bewältigen.

Seit Jahresbeginn 2009 werden von den österreichischen Prüfstellen (LFZ für Wein- und Obstbau Klosterneuburg, BAWB Eisenstadt) alle amtlichen Rotweinproben

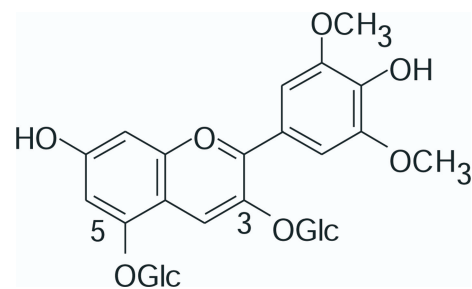


Abb. 1: Strukturformel von Malvidin-3,5-diglucosid

auf Freiheit von Malvidindiglycosid geprüft. Dabei gelangt OIV-konform und auf Basis des darauf aufbauenden österreichischen Erlasses (LE.4.3.2/0090-I/2/2008) eine Bestimmungsgrenze von 15 mg/l zur Anwendung.

Material und Methoden

Die vorgestellte Methodik zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von Malvidin-3,5-diglycosid in Weinen besteht aus einer fluoreszenzspektralphotometrischen Vorprüfung (screening) nach selektiver Aufspaltung der glucosidischen Bindung mit Natriumnitrit (NaNO_2) (OIV, 2009). Allfällige positive Farbstoffnachweise werden nachlaufend mit einem adaptierten hochdruckflüssigkeitschromatografischen Trennverfahren, entweder mit UV/VIS- oder fluoreszenzspektralphotometrischer Detektion, verifiziert und quantifiziert.

Als Standard (Reinsubstanz) dient Malvidin-3,5-diglycosidchlorid (AS: 16727-30-3; AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland).

Fluoreszenzspektralphotometrische Vorprüfung

Malvidin-3,5-diglycosid weist natürliche Fluoreszenzeigenschaften auf und ist daher mittels Fluoreszenzspektroskopie mit hoher Selektivität und auch den Spurenbereich erfassender Empfindlichkeit nachzuweisen. Für die serienanalytische Vorprüfung werden 200 μl einer Weinprobe in Mikro-Titerplatten (Nunc F96 Microwell plate, Art.Nr. 237108) pipettiert und mit 800 μl H_2O (dest.), 50 μl HCl (0,5 N) und 500 μl NaNO_2 (2 %) versetzt.

Nach einer Reaktionszeit von fünf Minuten erfolgt die Beigabe von 5 ml ethanolischer Ammoniaklösung (5 %). Nach weiteren zehn Minuten wird die entsprechende Lösung für fünf Minuten mit 3000 U/min abzentrifugiert und 200 μl des resultierenden Überstands zur automatisierten Fluoreszenz-Messung bei 394 nm Anregungswellenlänge und 494 nm Emissionswellenlänge eingesetzt (Abb. 2). Es wird ein Fluoreszenzspektralphotometer mit Microplate Reader (Cary Eclipse, Varian Inc., Walnut Creek, CA 94598, USA) verwendet.

Die Nachweisgrenze für Malvidin-3,5-diglycosid beträgt unter den obigen Versuchsbedingungen ca. 5 mg pro Liter Weinprobe. Damit kann der im Sinne der geltenden Verordnung noch tolerierbare Höchstgehalt von 15 mg/l gesichert nachgewiesen werden. Die dazu verwendeten Mikro-Titerplatten fassen jeweils insgesamt

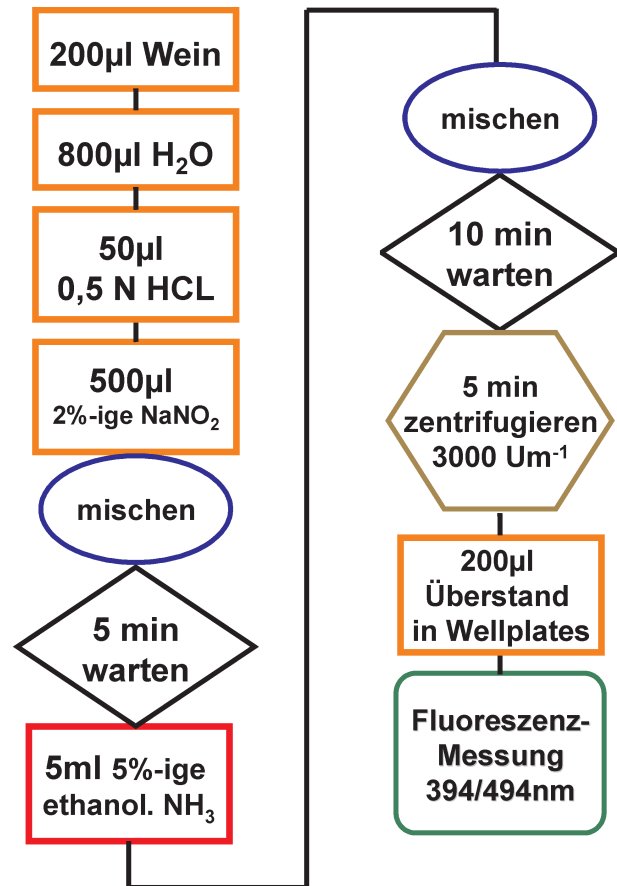


Abb. 2: Ablaufschritte zur automatisierten fluoreszenzspektralphotometrischen Vorprüfung auf Malvidin-3,5-diglycosid

96 Weinproben, der gesamte Zeitaufwand für die Messung beträgt etwa 110 Sekunden.

Im Falle eines positiven Nachweises von Malvidin-3,5-diglycosid beim Screening erfolgt die Quantifizierung des Farbstoffes mittels einer der nachstehend beschriebenen HPLC-Methoden.

HPLC mit UV/VIS-Detektion

Pumpe: Varian Prostar 230 (Varian Inc.) (LZS concept, Pöttelsdorf, Österreich)

Autosampler: Varian Prostar 410 (Varian Inc.) (LZS concept, Pöttelsdorf, Österreich)

Detektor: Varian Prostar 345 (Varian Inc.) (LZS concept, Pöttelsdorf, Österreich)

Säule: 2 x Merck 125-4 LiChrospher 100 RP-18 (5 μm) (VWR International)

Gradiententrennung: A: 5 mM KH_2PO_4 , pH-Wert: 1,85, B: 100 % Methanol

Tab. 1: Gradientenprogramm der HPLC-Trennung

Time	Flow	% A	% B
	1,10	84,0	16,0
18,25	1,10	58,0	42,0
19,25	1,10	32,0	68,0
25,20	1,10	32,0	68,0
26,50	1,10	84,0	16,0

Detektion: VIS 520 nm

Nachweisgrenze: ca. 1 mg/l

Einspritzmenge 20 µl, Flussrate (1 ml/min), Probe 1:3 verdünnt

Die Nachweisgrenze der routinemäßig eingesetzten, hochdruckflüssigkeitschromatografischen Bestimmungsmethode mit UV/VIS-Detektion bei 520 nm (gebräuchliche Methode) beträgt zumindest 1 mg Malvidindiglusosid pro Liter Weinprobe. Eine besondere Probenvorbereitung ist nicht erforderlich, die komplexe Weinmatrix verlangt allerdings eine binäre Gradientenelution zur optimalen Peaktrennung. Der Zeitaufwand für die Auftrennung und quantitative Bestimmung einer Weinprobe beträgt etwa 40 Minuten. Abbildung 3 zeigt das mit VIS-Detektion erstellte HPLC-Chromatogramm von einem Rotwein mit einem Gehalt von 20 mg Malvidindiglusosid je Liter.

HPLC mit Fluoreszenzdetektion

Zum gesicherten Nachweis von Spurengehalten von Malvidindiglusosid wurde eine ergänzende HPLC-Methodik auf Basis der Fluoreszenzdetektion entwickelt. Die selektive fluoreszenzspektralphotometrische Detektion ermöglicht eine isokratische Trennanordnung sowie eine Quantifizierung von bis zu 200 µg Malvidindiglusosid pro Liter.

Die vorgestellte HPLC-Methode baut auf papier- und dünn-schichtchromatografischen Verfahren auf, die bisher über die natürliche Fluoreszenz der Verbindung einen vergleichsweise empfindlichen, aber rein qualitativen Nachweis von Malvidin-3,5-diglusosid gestatten (Schneyder, 1979).

Pumpe: Varian Prostar 230 (LZS concept, Pöttelsdorf, Österreich)

Autosampler: Varian Prostar 410 (LZS concept, Pöttelsdorf, Österreich)

Detektor: Varian Prostar 363 (LZS concept, Pöttelsdorf, Österreich)

Säule: Merck 125-4 LiChrospher 100 RP-18 (5 µm) (VWR International)

Flussrate: 1 ml/min

Laufmittel: 10 % H₃PO₄ + 17 % Methanol + 73 % H₂O (isokratisch)

Detektion: Fluoreszenz (Ex 325 nm/Em 490 nm)

Nachweisgrenze: ca. 0,2 mg/l

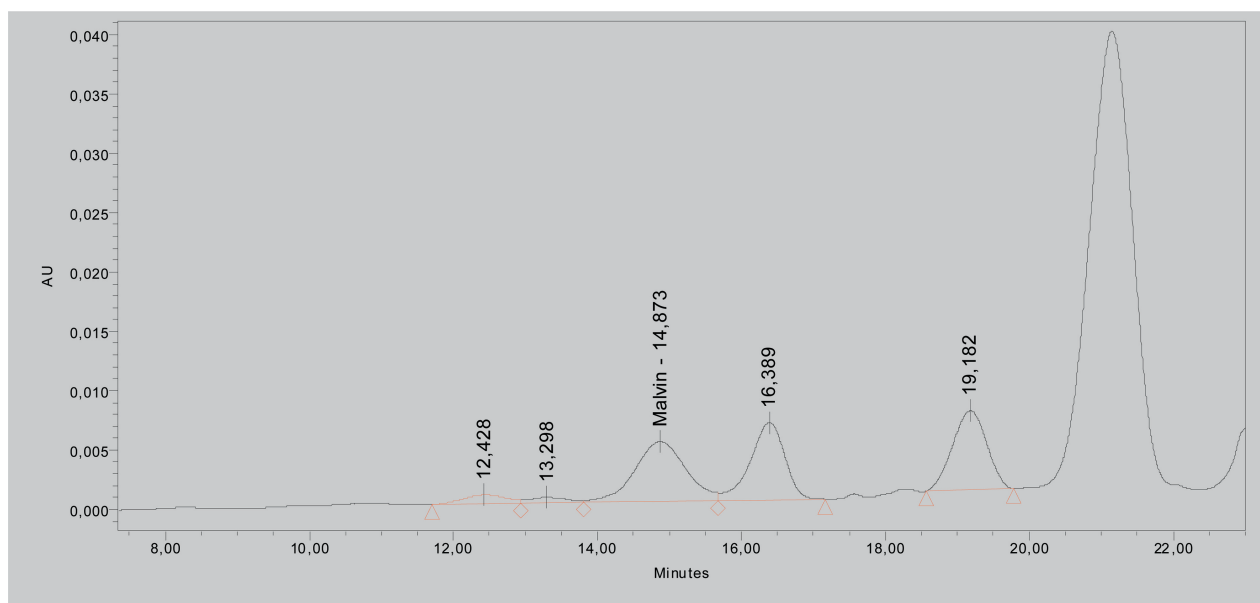


Abb. 3: HPLC-Gradiententrennung eines Rotweins mit einem Gehalt von 20 mg Malvidin-3,5-diglusosid pro Liter

Probenvorbereitung. 250 µl Weinprobe werden mit entionisiertem Wasser 1:4 verdünnt (Endvolumen: 1 ml) und mit 400 µl 2% iger NaNO₂-Lösung versetzt, anschließend werden 20 µl in das HPLC-System injiziert. Der Zeitaufwand für eine Bestimmung beträgt etwa 11 Minuten, das Verfahren ist durch Einbindung eines HPLC-Probengebers ohne zusätzlichen Aufwand automatisierbar.

Aus Abbildung 4 ist die Trennleistung und Empfindlichkeit des beschriebenen HPLC-Verfahrens mit fluoreszenzspektralphotometrischer Detektion am Beispiel eines Rotweins mit einem Gehalt von 2 mg/l Malvidin-3,5-diglucosid zu ersehen.

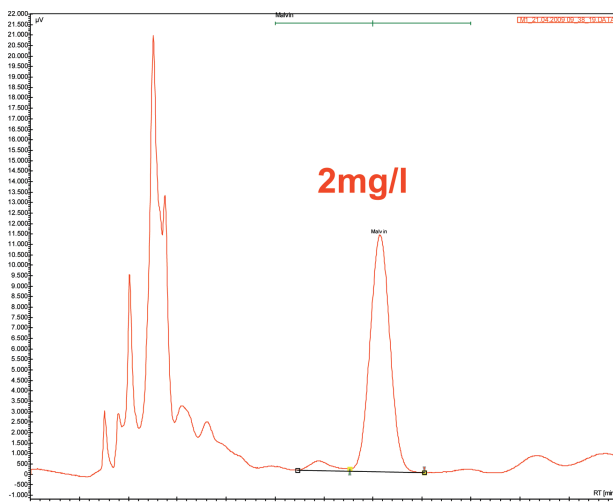


Abb. 4: Isokratische HPLC-Trennung mit Fluoreszenzdetektion eines Rotweins mit einem Gehalt von 2 mg Malvidin-3,5-diglucosid pro Liter

Ergebnisse und Diskussion

Bisher wurden rund 7000 Weine mit dem oben beschriebenen Verfahren untersucht, wobei 120 positive Nachweise von Malvidin-3,5-diglucosid zu verzeichnen waren. Die in diversen Weinen festgestellten Konzentrationen reichen dabei von im Bereich der Toleranzgrenze (15 mg/l) bis zu Werten um 500 mg/l und im Einzelfall auch darüber. Beispielhaft sind dazu nachstehend die Untersuchungsergebnisse zu einigen Sorten- und Neuzüchtungen (anonymisiert) sowie zu Weinen der Rebsorte 'Regent' ausgewiesen (Tab. 2). Die Größenordnung der nachgewiesenen Gehalte kann im Verschnittfall auch bei kleineren Eintragsmengen bereits zu einer Grenzwertüberschreitung und Beanstandung

führen. Wenn als Qualitätswein bezeichnete Weine von diesem Nachweis betroffen sind, dann resultiert daraus eine Abwertung der Gesamtmenge zu Tafelwein mit allen finanziellen und imageschädigenden Konsequenzen.

Tab.2: Gehalte an Malvidin-3,5-diglucosid in Weinen aus Rebneuzüchtungen (A bis F) auf Direktträgerbasis sowie der interspezifischen Rebsorte 'Regent' (1 bis 3)

Proben	Malvidin-3,5-diglucosid (mg/l)	
Neuzüchtung	A	362
	B	459
	C	522
	D	207
	E	272
	F	307
Regent	1	265
	2	585
	3	430

Das im Rahmen einer Vorprüfung als Screening-Methode eingesetzte fluoreszenzspektralphotometrische Verfahren hat sich bisher in der Laborroutine auch bei großem Probenanfall bestens bewährt. Die entsprechend hohe Durchsatzkapazität von 96 Proben pro Stunde ergibt sich insbesondere aus der vergleichsweise kurzen Messzeit von 0,1 Sekunden für die Einzelprobe. Nachteilig sind allenfalls die vergleichsweise hohen Anschaffungskosten für das Fluoreszenzspektralphotometer.

Auch die ergänzende quantitative Bestimmung von Malvidin-3,5-diglucosid mittels HPLC zeigte im bisherigen Dauerbetrieb eine zufriedenstellende Stabilität und Trennleistung.

Literatur

- AMERINE, M.A. and OUGH, C.S. (1980): Methods for analysis of musts and wine. - New York: Wiley, 1980
- BGBL. (1929): 254. Bundesgesetz vom 18. Juli 1929, womit das Weingesetz ergänzt und abgeändert wird. (II. Weingesetznovelle, § 23 d). Bundesgesetzblatt für die Republik Österreich, 60. Stück: S. 994
- BGBL. (1936): 73. Bundesgesetz, womit die Neuanlage von Weingärten und das Auspflanzen von Direktträgerreben verboten wird. Bundesgesetzblatt für die Republik Österreich, 11. Stück: S. 71 (ausgegeben am 5. März 1936)
- BGBL. (1937a): 327. Bundesgesetz, betreffend einige Maßnahmen zur Regelung der Erzeugung von Wein und des Verkehrs damit. Bundesgesetzblatt für die Republik Österreich, 78. Stück: S. 1341 (ausgegeben am 23. September 1937)
- BGBL. (1937b): 329. Verordnung betreffend die Festsetzung von Preisen für Wein und das Verbot von Verschnitten

mit Erzeugnissen aus Direktträgerreben. Bundesgesetzblatt für die Republik Österreich, 79. Stück: S. 1343-1344 (ausgegeben am 24. September 1937)

- 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
- LINSKENS, H.F. and JACKSON, J.F. (1988): Modern methods of plant analysis. - Berlin: Springer, 1988
- OIV (2009): Compendium of international methods of analysis of wines and musts, Vol. 2. Malvidin diglucoside (A18). Method MA-E-AS315-03-DIGMAL. - Paris: OIV, 2009
- SCHNEYDER, J. (1979). Malvidindiglucosid. In: Methodenbuch für Weinanalysen in Österreich, Teil A 22. - Wien: Arbeitsgemeinschaft Landwirtschaftlicher Versuchsanstalten (ALVA), 1979
- STARK-URNAU, M., HILL, B.H.E., KAST, W.K. und LAY, H. 2004: Fluoreszenzmikroskopische Methode zum Nachweis von Malvidin-3,5-diglucosid in Trauben und Weinen verschiedener Rotweinsorten. Mitt. Klosterneuburg 54: 249-254

Manuskript eingelangt am 14. Juli 2009