



RESOLUTION OIV-OENO 574-2017

MONOGRAPHIE ÜBER TANNINE – AKTUALISIERUNG DER METHODE ZUR BESTIMMUNG VON POLYPHENOLEN

DIE GENERALVERSAMMLUNG,

GESTÜTZT auf Artikel 2 Absatz 2 iv des Übereinkommens vom 3. April 2001 zur Gründung der Internationalen Organisation für Rebe und Wein,

auf Vorschlag der Sachverständigengruppe „Spezifikationen önologischer Erzeugnisse“,

BESCHLIESST, im internationalen önologischen Kodex die Ziffer 6.9 des Blattes COEI-1-TANINS „Bestimmung der Gesamtphenole“ durch folgende Ziffer zu ersetzen.

6.9 Bestimmung des Gehalts an Gesamtphenolen

Die Abschätzung des Gesamtphenolgehalts erfolgt nach der im Anhang dargelegten Methode.

Die Gesamtphenole müssen mehr als 65 % betragen.

METHODE ZUR BESTIMMUNG DES GESAMTPOLYPHENOLGEHALTS

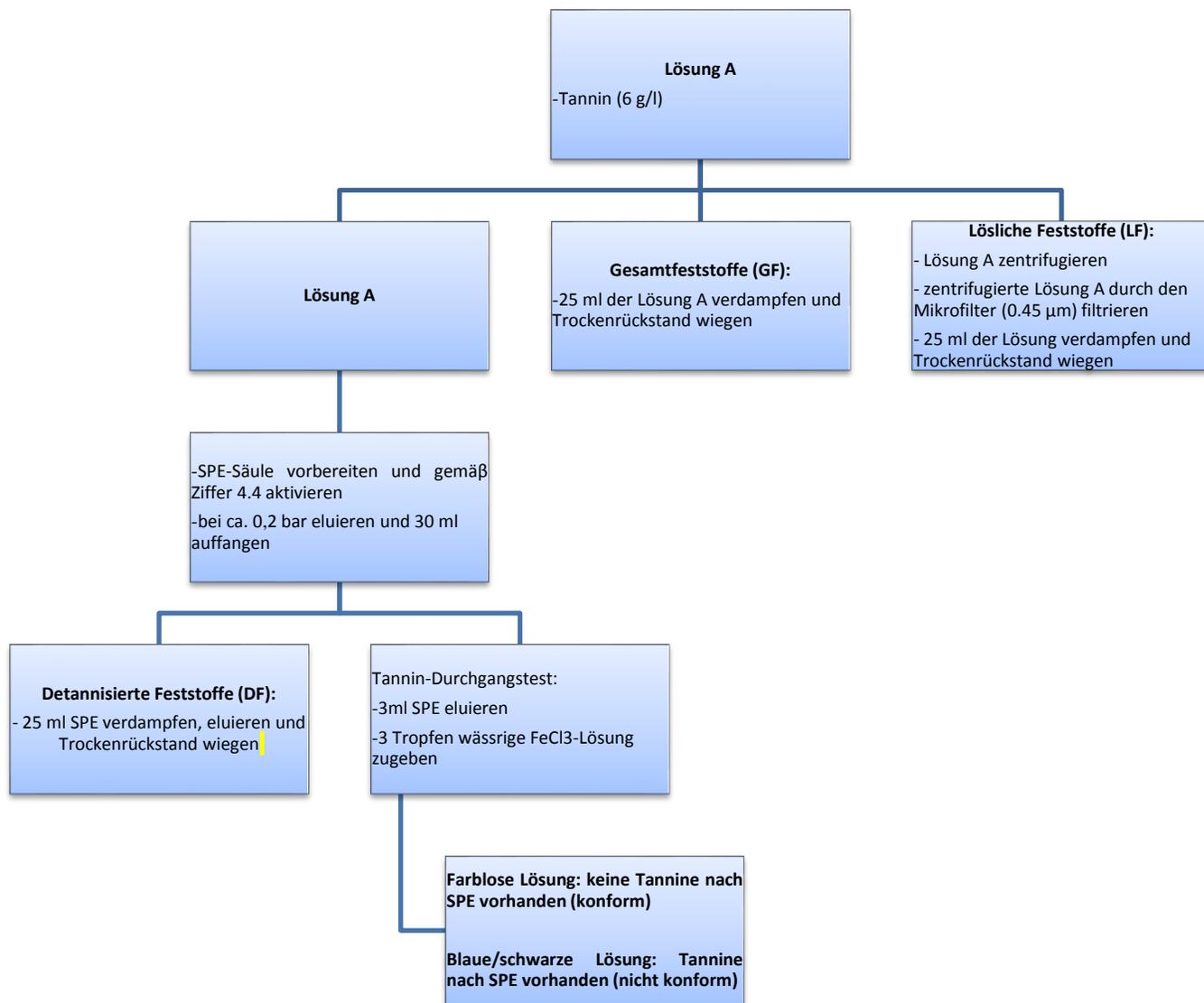
1. Prinzip

Die Methode dient zur Bestimmung der Konzentration des Polyphenolgehaltes in Präparaten von önologischem Tannin. Sie beruht auf der gravimetrischen Analyse mit vorangehender Festphasenextraktion (SPE). Dabei werden die in wässriger Lösung befindlichen Polyphenole von einem Polymer in einer SPE-Säule adsorbiert, in diesem Fall Polyvinylpolypyrrolidon, das die Fähigkeit hat, Polyphenole zurückzuhalten. Bei den nicht durch PVPP zurückgehaltenen Stoffen handelt es sich um die in der Ausgangsprobe vorhandenen nicht phenolischen Verbindungen.

Die Methode ist in folgendem Schema dargestellt:

*Beglaubigte Ausführung
Sofia, den 2. Juni 2017
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung*

Jean-Marie AURAND



*Beglaubigte Ausführung
Sofia, den 2. Juni 2017
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung*

Jean-Marie AURAND

2. REAGENZIEN, MATERIALIEN, GERÄTE

2.1 Reagenzien

- 2.1.1 PVPP (Polyvinylpolypyrrolidon, [CAS-Nr. 9003-39-8])
- 2.1.2 Wässrige FeCl₃-Lösung (1g/l)
- 2.1.3 Bidestilliertes Wasser
- 2.1.4 Ethanol (20% v/v)

2.2 Materialien

- 2.2.1 Aluminiumschalen (70ml)
- 2.2.2 Einweg-Pipetten mit Stopfen (50ml)
- 2.2.3 SPE-Säulen (Behälter, 70ml, 150*29,75 mm)
- 2.2.4. SPE-Säulenfritten (Durchmesser 27 mm – 20 µm PE)
- 2.2.5 1000 mL-Messkolben, Pyrex
- 2.2.6 50ml-Messzylinder, Klasse A
- 2.2.7 Membranfilter in Celluloseacetat, 0,45 µm, , Ø 47 mm
- 2.2.8 Kunststoffspritze, 50ml
- 2.2.9 Messpipette (2 Marken), 25ml, Klasse A

2.3 Geräte

- 2.3.1 Thermostat (20 °C)
- 2.3.2 Laborwaage mit einer Genauigkeit von 0,01 g
- 2.3.3 Analysewaage mit einer Genauigkeit von 0,1 mg
- 2.3.4 Trockenschrank, auf 105 °C thermostatisierbar
- 2.3.5 Trockenschrank, auf 80 °C thermostatisierbar oder Thermostat (Wasserbad)
- 2.3.6 Zentrifuge
- 2.3.7 Vacuum Manifold
- 2.3.8 Volumenmessgeräte aus Glas, Klasse A
- 2.3.9 Exsikkator

*Beglaubigte Ausführung
Sofia, den 2. Juni 2017
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung*

Jean-Marie AURAND

3. VORBEREITUNG DER PROBEN

Die Lösung (bezeichnet als Lösung A) wird zur Messung der Gesamtfeststoffe (GF), löslichen Feststoffe (LF) und detannisierten Feststoffe (DF) verwendet.

Ca. 6g Tannin auf einer Analysewaage abwiegen und das Gewicht notieren. Das Tannin in einem 1 L-Pyrexkolben in ca. 950 mL heißem (60–70 °C) bidestillierten Wasser lösen und gut schütteln. Den Kolben 30 Minuten bei Umgebungstemperatur stehen lassen. Die Lösung im Thermostaten auf 20–22 °C abkühlen lassen, mit bidestilliertem Wasser zur Marke auffüllen und gut mischen.

4. VORGEHENSWEISE

4.1 Bestimmung der Gesamtfeststoffe (GF):

- 25 ml Lösung A in eine Aluminiumschale (2.2.1) überführen,
- im Trockenschrank bei 80 °C bis zur Trocknung eindampfen,
- erneut im Trockenschrank bei 105 °C bis zum konstanten Gewicht trocknen und den Rückstand wiegen (die Schale vor dem Wiegen im Exsikkator abkühlen lassen).

Die Berechnung der Gesamtfeststoffe (GF) erfolgt nach folgender Formel:

$$GF \% = \frac{\text{Trockenrückstand (g)}}{\text{Tanningewicht (g)}} \cdot \frac{1000}{(\text{ml}) \text{ Lös A}} \cdot 100$$

4.2 Bestimmung der löslichen Feststoffe (LF):

- Lösung A bei 10 000 g während 5 Minuten zentrifugieren,
- die zentrifugierte Lösung A mikrofiltrieren (Membranfilter 0,45 µm), um eine klare Lösung zu erhalten; dann 25 mL der Lösung im Trockenschrank bei 80 °C bis zur Trocknung eindampfen,
- erneut im Trockenschrank bei 105 °C bis zum konstanten Gewicht trocknen und den Rückstand wiegen (die Schale vor dem Wiegen im Exsikkator abkühlen lassen).

Die Berechnung der löslichen Feststoffe (LF) erfolgt nach folgender Formel:

$$LF \% = \frac{\text{Trockenrückstand (g)}}{\text{Tanningewicht (g)}} \cdot \frac{1000}{(\text{ml}) \text{ Lös A}} \cdot 100$$

*Beglaubigte Ausführung
Sofia, den 2. Juni 2017
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung*

Jean-Marie AURAND

4.3 Bestimmung der unlöslichen Feststoffe (UF):

Berechnung der Differenz zwischen Gesamtfeststoffen und löslichen Feststoffen:

$$UF \% = GF \% - LF \%$$

4.4 Bestimmung der detannisierten Feststoffe (DF):

- Vorbereitung der SPE-Säule: Einfügen der ersten Fritte, $7,0 \pm 0,1$ g PVPP, zuvor mit einer Wasser-Alkohol-Lösung (20 %) 15 Minuten rehydrieren, die zweite Fritte einsetzen und die stationäre Phase gut festdrücken,
- die SPE-Säule auf dem Vacuum Manifold anbringen (Beispiel in Abb.1),
- die Säule durch drei Spülungen aktivieren (PVPP nicht trocken laufen lassen und ein Vakuum von ca. 0,2 bar anlegen, um die Verdichtung des Polymers zu vermeiden): erste Spülung mit 50 ml Ethanol (20 % v/v), zweite Spülung mit 50 ml bidestilliertem Wasser, dritte Spülung mit 20 ml der Lösung A, um Wasserrückstände auf PVPP zu entfernen,
- 30 ml der Lösung A in die Säule geben und 30 ml Eluat (detannisierte Feststoffe) in 50 ml Falcon-Röhrchen auffangen. Die Elution beenden, wenn die Flüssigkeit den Stand der oberen Fritte erreicht,
- 25 ml Eluat in eine Aluminiumschale überführen,
- im Trockenschrank bei 80 °C bis zur Trocknung eindampfen,
- erneut im Trockenschrank bei 105 °C bis zum konstanten Gewicht trocknen und den Rückstand wiegen (die Schale vor dem Wiegen im Exsikkator abkühlen lassen).

Die Berechnung der detannisierten Feststoffe (DF) erfolgt nach folgender Formel:

$$DF \% = \frac{\text{Trockenrückstand (g)} - BK (g)}{\text{Tanningewicht (g)}} \cdot \frac{1000}{(\text{ml}) \text{ Lös A}} \cdot 100$$

wobei BK der nach erfolgter SPE gemessene Blindwert ist (siehe 4.5)

*Beglaubigte Ausführung
Sofia, den 2. Juni 2017
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung*

Jean-Marie AURAND



Abbildung 1 – Beispiel einer SPE-Extraktion

Um sicherzustellen, dass im Eluat nach Durchlaufen der Säule keine Polyphenole vorhanden sind, werden zu 3 ml der Lösung der detannisierten Feststoffe (DF) 3 Tropfen wässrige FeCl_3 -Lösung gegeben. Nimmt die Lösung einen bläulichen Farbton an, haben die Polyphenole das Polymer durchlaufen, und die Analyse sollte wiederholt werden, indem das Ausgangsgewicht des Produkts verringert wird. Bleibt die Lösung nach dieser Behandlung farblos, kann die gravimetrische Analyse durchgeführt werden.

4.5 Bestimmung des Blindwerts (BK)

Vor Durchführung der SPE-Elution ist ein Blindversuch erforderlich, um durch das Analyseverfahren bedingte Interferenzen zu ermitteln. Dabei ist folgendermaßen vorzugehen:

- die erste Fritte, $7,0 \pm 0,1\text{g}$ PVPP einfügen, zuvor mit einer Wasser-Alkohol-Lösung (20 %) 15 Minuten rehydrieren und mit der zweiten Fritte die stationäre Phase feststopfen,
- die SPE-Säule auf dem Vacuum Manifold anbringen (Beispiel in Abb.1),
- die Säule durch zwei Spülungen aktivieren (PVPP nicht trocknen und ein Vakuum von ca. 0,2 bar anlegen, um die Verdichtung des Polymers zu vermeiden): erste Spülung mit 50 ml Ethanol (20 % v/v), zweite Spülung mit 70 ml bidestilliertem Wasser,
- 30 ml bidestilliertes Wasser in die Säule geben und 30 ml Eluat (Blindprobe für detannisierte Feststoffe) in 50 ml Falcon-Röhrchen auffangen. Die Elution beenden, wenn die Flüssigkeit den Stand der oberen Fritte erreicht,

*Beglaubigte Ausführung
Sofia, den 2. Juni 2017
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung*

Jean-Marie AURAND

- 25 ml Eluat in eine Aluminiumschale überführen und im Trockenschrank bei 80 °C bis zur Trocknung eindampfen,
- erneut im Trockenschrank bei 105 °C bis zum konstanten Gewicht trocknen und den Rückstand wiegen (die Schale vor dem Wiegen im Exsikkator abkühlen lassen).

5 ANGABE DER ERGEBNISSE

Berechnung des Anteils der Gesamtpolyphenole (% Polyphenole):

Der Prozentanteil der Polyphenole wird nach folgender Formel berechnet:

$$\% \text{ Polyphenole} = \frac{LF\% - DF\%}{GF\%} \cdot 100$$

- Bestimmung der Eignung von PVPP: Siehe OENO 11/2002 - COEI-1-PVPP: 2007, PARA. 6.

*Beglaubigte Ausführung
Sofia, den 2. Juni 2017
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung*

Jean-Marie AURAND