

GEHALTE AN BOTRYTIZID-RÜCKSTÄNDEN IN ÖSTERREICHISCHEN WEINEN VON 2011 BIS 2017: VERGLEICH DER ANALYSEMETHODEN QUECHERS-GC-NPD UND SPME-GC-MS

CHRISTIAN PHILIPP¹, PHILLIP EDER¹, WALTER BRANDES¹, REINHARD BAUMANN¹,
ELSA PATZL-FISCHERLEITNER¹ und REINHARD EDER¹

HBLA und BA für Wein- und Obstbau Klosterneuburg
A-3400 Klosterneuburg, Wiener Straße 74
E-Mail: Christian.Philipp@weinobst.at

Pflanzenschutzmittel-Rückstände der botrytiziden Wirkstoffe Boscalid, Cyprodinil, Fludioxonil, Fenhexamid, Mepanipyrim und Pyrimethanil in österreichischem Most, Sturm und Wein unterliegen einem Monitoring der österreichischen Weinkontrolle in Form von stichprobenartigen Kontrollanalysen. Im Zuge vorliegender Arbeit wurden einerseits die Ergebnisse dieser langjährigen Kontrollanalysen interpretiert, und andererseits die Tauglichkeit der relevanten gaschromatographischen (GC) Methoden überprüft. Die Ergebnisse zeigen, dass die QuEChERS (quick easy cheap effective rugged safe)-GC-NPD (Stickstoff-Phosphor-Detektor)-Methode zwar genauer (weniger systematische Fehler) und präziser (weniger zufällige Fehler) ist als die SPME (solid phase micro extraction)-GC-MS (Massenspektrometrie)-Methode, aber beide Methoden für das Monitoring geeignet sind. Seit 2011 wurden 791 Handelsproben an der HBLA und BA für Wein- und Obstbau Klosterneuburg untersucht. Bei keiner dieser Proben wurde eine Grenzwertüberschreitung festgestellt. Je nach Wirkstoff waren bei 81,4 % bis 97,6 % der Proben keine bestimmbareren Wirkstoffkonzentrationen enthalten. Obwohl die statistische Bewertung der Ergebnisse aufgrund der speziellen Verteilung der gefundenen Konzentrationen schwierig und wenig aussagekräftig ist, kann die Hypothese bestätigt werden, dass es partiell Zusammenhänge zwischen der gefundenen Rückstandskonzentration, dem Jahrgang und der Produktart (Most, Sturm, Wein) gibt. Wie von etlichen Autoren bestätigt, hat der Vinifizierungs- und Lagerungsprozess einen Einfluss auf den Abbau der Botrytizide.

Schlagwörter: Rückstandsanalytik, Validierung, Methodenvergleich, Bland-Altman-Diagramm, Jahrgangvergleich, Wein, Most, Sturm

Contents of botryticide residues in Austrian wines 2011 to 2017: comparison of the analytical methods QuEChERS-GC-NPD and SPME-GC-MS. Residues of the botryticidal active substances boscalid, cyrprodinil, fludioxonil, fenhexamid, mepanipyrim and pyrimethanil are subject to monitoring by the Austrian wine control in grape must, fermenting must and wine. In this study the results of these control analyses are discussed and the suitability of relevant gas chromatographic (GC) methods are examined. The results show that QuEChERS (quick easy cheap effective rugged safe)-GC-NPD (nitrogen-phosphor-detector) method is more accurate (fewer systematic and random errors) than the SPME (solid phase micro extraction)-GC-MS (mass spectrometer) method, but both are suitable for monitoring and control. Since 2011 791 samples have been analyzed at the Federal Research Center for wine and fruit production in Klosterneuburg. None of these samples have exceeded the accepted maximum limits and depending on the residues in 81.4 % to 97.6 % of all samples the limit of quantification was not exceeded. Although statistic evaluation is difficult, the assumption can be confirmed that there are partial correlations between the residue concentrations and the vintage year and the product type (must, fermenting must, wine), respectively. As confirmed by several authors, the vinification and storage process have an impact on the degradation of botryticides, and therefore further studies are necessary.


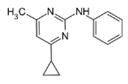
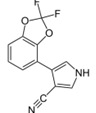
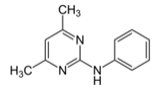
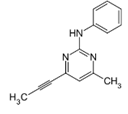
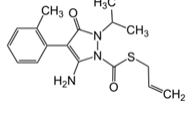
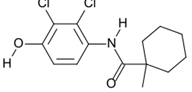
Keywords: residue analysis, validation, method comparison, Bland-Altman plot, vintage comparison, wine, must, fermenting must

Durch das hohe Qualitätsbewusstsein der Konsumenten, den steigenden wirtschaftlichen Druck und die veränderten Betriebsstrukturen (zunehmende Betriebsgrößen) ist der Einsatz von systemisch wirkenden Spezial-Botrytiziden zur Vorbeugung gegen Grauschimmel für viele Betriebe unverzichtbar geworden (REGNER, 2015; REDL, 2009; PHILIPP und EDER, 2016). Ein Monitoring der Gehalte an Rückständen in österreichischen Wein-, Most- und Sturmproben wird von der Gesetzgebung verlangt (WEINGESETZ, 2009; BGBl. I Nr. 111/2009).

Mit dem Weingesetz 2009 (BGBl. I Nr. 111/2009) wird die Europäische Verordnung (EG) Nr. 396/2005 über Höchstgehalte an Pestizidrückständen in oder auf Lebens- und Futtermitteln pflanzlichen oder tierischen Ursprungs umgesetzt. Im derzeit geltenden europäischen und nationalen Recht sind aber keine Pestizidrückstandshöchstgehalte für Traubenmost, Sturm und Wein vorgesehen. Aus diesem Grund zieht die amtliche Weinkontrolle in Österreich die gesetzlich festgelegten Obergrenzen für Tafel- und Keltertrauben zur Beurteilung heran ((EG) Nr. 396/2005). Mit der vorliegenden Arbeit soll ein Überblick über die gefundenen Rückstände dieser Wirkstoffe in Wein-, Most- und Sturmproben der Jahrgänge 2011 bis 2017 dargelegt werden. Der Tabelle 1 sind die gängigsten botrytiziden Wirkstoffe, ihre Handelsnamen und derzeit geltenden Grenzwerte zu entnehmen.

Wie von etlichen Autoren (ANGIONI et al., 2011; CABRAS et al., 1997a; ČUŠ et al., 2010a; ČUŠ et al., 2010b; LAGUNAS-ALLUÉ et al., 2012; EDDER et al., 2009; MUNITZ et al., 2013; VITALIF et al., 1998; ZAMBONIN et al., 2004; FLAK et al., 1991) beschrieben, ist ein valider Nachweis dieser botrytiziden Wirkstoffe mittels gaschromatographischer Methoden, basierend auf unterschiedlichen Probenvorbereitungen (Festphasenextraktion (SPE), Flüssig/Flüssig-Extraktion (LLE), Festphasenmikroextraktion (SPME) und Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe (QuEChERS)) und Detektoren-Massenspektroskopie (MS), Stickstoff-Phosphor-Detektor (NPD) und Flammenionisationsdetektor (FID) möglich (ANASTASSIADES et al., 1991; PAYA et al., 2007; SCHENCK und HOBBS, 2004). Im Zuge dieser Studie sollte eine Methode, der eine solid phase micro extraction -Gaschromatographie-Massenspektroskopie (SPME-GC-MS; Festphasen-Mikroextraktion) zugrunde liegt, und eine QuEChERS-GC-NPD Methode anhand der Wiederfindung der Analyten, der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sowie der Nachweis- und Bestimmungsgrenze verglichen werden. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, anhand der Kontrollproben zu interpretieren, welche dieser botrytiziden Rückstände gefunden werden und ob ein direkter Zusammenhang mit dem Produktjahrgang und der Produktart (Weißwein, Rotwein, Roséwein, Sekt, Frizzante, Perlwein, Sturm und Traubenmost) festgestellt werden kann.

Tab. 1: Gängige Spezialbotrytizide und deren Grenzwerte ((EG) Nr. 396/2005)

Wirkstoff	Handelsname	Chemische Formel	Geltende Grenzwerte
Boscalid	Cantus, Collis		5 mg/kg Keltertraube
Cyprodinil und Fludioxonil	Switch, Switch 62,5		3 mg/kg Keltertraube
			4 mg/kg Keltertraube
Pyrimethanil	Pyrimet, Pyrus, Scala		5 mg/kg Keltertraube
Mepanipirim	Frupica Opti		2 mg/kg Keltertraube
Fenpyrazamin ^{*1}	Prolectus		3 mg/kg Keltertraube
Fenhexamid	Teldor, Teldor WG		15 mg/kg Keltertraube

^{*1} hier nicht untersucht, da in Österreich erst seit 26. 7. 2013 zugelassen bzw. seit 30. 7. 2017 in der Liste der Kontrollanalyten

MATERIAL

PROBEN

Von den Weinernten 2011 bis 2017 wurden 791 Handelsproben (Most, Sturm und Weinproben) auf die botrytiziden Wirkstoffe Boscalid, Cyprodinil, Fenhexamid, Fludioxonil, Mepanipirim und Pyrimethanil analysiert. Die Verteilung der Proben nach Probennahmejahr und

Produkt ist Tabelle 2 zu entnehmen. Die Proben stammen aus allen Weinbaugebieten Österreichs und wurden von der Bundeskellereinspektion über die Jahre gesammelt. Die quantitativen Analysen der Most-, Sturm- und Weinproben der Jahre 2011 bis 2015 erfolgten mit einer SPME-GC-MS-Methode, ab 2016 wurden sämtliche Proben mittels QuEChERS-GC-NPD analysiert.

Tab. 2: Anzahl der Proben

Art der Probe	Probennahmejahr							Summe
	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	
Most		31			39	101	34	205
Sturm		43			61	51	38	193
Weißwein	41	62	63	40	20	13	19	258
Rotwein	22	36	17	22	7	4	6	114
Roséwein	1	4	4	0	2	0	1	12
Perlwein/Schaumwein/Sekt	0	1	0	1	0	1	6	9

Als Basiswein für die Methodenkalibration und den Methodenvergleich diente ein organisch-biologisch und somit frei von botrytiziden Wirkstoffen produzierter Weißwein, hergestellt von der Abteilung Kellerwirtschaft der HBLA und BA für Wein- und Obstbau Klosterneuburg, Österreich.

CHEMIKALIEN

Die analytischen Standards für die Bestimmung der Rückstände waren Fenhexamid (99,7 %), Mepanipyrim (99,9 %), Pyrimethanil (99,9 %), Fludioxonil (99,9 %), Cyprodinil (99,8 %) und Boscalid (99,9 %) (Sigma Aldrich, St. Louis, USA). Als interne Standards wurden Lindan (97 %; für die Bestimmung mittels SPME-GC-MS) und Acridin (97 %; für die Bestimmung mittels QuEChERS-GC-NPD) verwendet (Sigma Aldrich, St. Louis, USA). Von allen Standards wurden Stammlösungen in Acetonitril (10 g/1000 ml (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) hergestellt. Alle weiteren Verdünnungsschritte erfolgten in Alkohol (99 % (AustraAlco Österreichische Alkoholhandels-GmbH, Spillern, Österreich).

Des Weiteren wurden die Salze Natriumchlorid, Trinatriumcitrat-Dihydrat, Dinatriumcitrat-Sesquihydrat, Magnesiumsulfat (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), Chromabond Diamino (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) und die Lösungsmittel Ethylacetat (99,9 % (Fluka, Buchs, St. Gallen, Schweiz, jetzt Sigma Aldrich)), Aceton (>99,5 %) und Ameisensäure (98 bis 100 %) (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) für die QuEChERS-Probenvorbereitung verwendet. Natriumacetat wurde für die SPME-Probenvorbereitung verwendet (Sigma Aldrich, St. Louis, USA).

METHODEN

QUANTITATIVE ANALYSE MITTELS QUECHERS-GC-NPD

Alle Most-, Sturm- und Weinproben ab 2016 wurden mittels QuEChERS-GC-NPD analysiert. Dabei wurden 6,5 g Extraktionsmischung (4,0 g Magnesiumsulfat, 1,0 g Natriumchlorid, 1,0 g Trinatriumcitrat-Dihydrat und

0,5 Dinatriumcitrat-Sesquihydrat), 10 ml der Probe und 30 µl des Internen Standards (Acridin, 0,300 mg/l) in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen gegeben und mit 5 ml Ethylacetat versetzt. Die Mischung wurde anschließend bis zum Ende der Wärmeentwicklung gevortext (Vortex-Genie 2T, Scientific Industries, Bohemia, New York, USA) und dann bei 4700 rpm für 10 min zentrifugiert (Heraeus Megafuge 40 R, Thermo Scientific (jetzt Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA). Die 5 ml der oberen Phase wurden mit 1,05 g Clean-up-Mischung PSA (0,15 g CHROMABOND Diamino und 0,9 g Magnesiumsulfat) in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen gesammelt und für 1 min gevortext und anschließend bei 7000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde quantitativ in einen 25 ml Rundkolben überführt und mit 40 µl Ameisensäure (5 % in Ethylacetat) angesäuert und mittels Rotationsverdampfer (Laboact - Vakuumsystem Manuell VP-8VAC, KNF Neuberger GmbH, Freiburg, Deutschland) vollständig eingedampft. Der Niederschlag wurde mit 0,5 ml Lösungsmittel (Aceton:Ethylacetat = 1:1) gelöst. 100 µl der so entstandenen Lösung wurden in ein 300 µl GC Vial überführt und in den Autosampler (Typ G 4513 A, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) gestellt.

Die Analyse erfolgte mit einem GC (Typ 7820 A, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) mit Injektor, Controller und Autosampler (Typ G 4513 A) und NPD Detektor (Typ, 7820 mit einer Perle (12-16211), Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Die Trennung erfolgte mit einer Säule HP-5 (30 m × 0,32 mm I.D. × 0,25 µm df; Agilent Technologies, Santa Clara, USA) bei einem Säulenfluss von 1,6 ml/min. Als Transportgas wurde Helium verwendet. Das Injektionsvolumen betrug 2 µl im Splitless-Modus, die Injektor-Temperatur betrug 280 °C. Die Detektortemperatur betrug 330 °C bei 3 ml/min H₂-Fluss und einem Luft-Fluss von 60 ml/min. Der Makeup-Fluss war auf 10,4 ml/min eingestellt. Die maximale Perlenspannung betrug 4,095 V. Der Ofentemperaturgradient begann mit 8 min bei 50 °C, wurde danach auf 180 °C mit 25 °C/min Steigerungsraten und dann um weitere 8 °C/min bis zu einer Temperatur von 250 °C erhitzt. Bei dieser Temperatur blieb die Temperatur 2 min konstant, bevor sie wieder um 8 °C/min bis zu einer Temperatur von 280 °C erhitzt wurde, wo sie dann für

weitere 10 min konstant gehalten wurde. Die Gesamtlaufzeit betrug 37,7 min. Das relative Peakflächenverhältnis der einzelnen Analyten mit dem Internen Standard korreliert positiv mit den in der Probe enthaltenen Konzentrationen der Pestizide. Die Kalibration erfolgte mit fünf verschiedenen Konzentrationsstufen von 0,015 mg/l bis 1,500 mg/l in biologisch produziertem Wein. Die Probenvorbereitung für die Kalibration erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie oben erwähnt.

QUANTITATIVE ANALYSE MITTELS SPME-GC-MS

15 ml der zu analysierenden Proben wurden mit 0,5 g Natriumacetat und 50 µl eines Internen Standards (Lindan, 0,167 mg/l Endkonzentration) in einem Head-Space-Vial (20 ml) mit einem Magnetrührknochen in den Autosampler (CombiPal Probengeber; CTC Analytics, Zwingen, Schweiz) gestellt. Als Probeaufgabesystem diente eine Inverse (in die Flüssigkeit)-Solid-Phase-Micro-Extraction (SPME) mit einer Polyacrylate (PA)-Faser (polar). Die Präinkubationszeit bei 40 °C betrug zehn Sekunden, die Adsorptionszeit bei 40 °C 30 min, und die Desorptionszeit im Injektor bei 250 °C 5 min.

Für die Analyse wurde ein 6890 N Serie II Gaschromatograph (Agilent, Santa Clara, USA) verwendet. Die Injektortemperatur betrug 250 °C. Als Säule wurde eine ZB-5ms (60 m × 0,25 mm I.D. × 0,25 µm df) der Firma Phenomenex (Torrance, USA) eingebaut. Als Trägergas wurde Helium (5.6) bei konstantem Fluss von 1,6 ml/min verwendet. Der Totalfluss am Injektor war bei 24,24 psi 24,6 ml/min. Das Gerät wurde im Splitless-Modus betrieben. Der Ofentemperaturgradient begann mit 8 min bei 50 °C, wurde danach auf 180 °C mit 25 °C/min Steigerungsraten und dann um weitere 8 °C/min bis zu einer Temperatur von 250 °C erhitzt. Bei dieser Temperatur blieb die Temperatur zwei min konstant, bevor sie wieder um 8 °C/min bis zu einer Temperatur von 280 °C erhitzt wurde, wo sie dann für weitere 10 min konstant gehalten wurde. Die Gesamtlaufzeit betrug 37,7 min. Als Massenspektrometer wurde ein massenselektiver Detektor 5975 (Agilent, Santa Clara, USA) verwendet. Dieses Gerät war im "direct interface" mit dem Gaschromatographen verbunden. Die Temperatur der Transfer-

line betrug 250 °C. Die "electron multiplier" Spannung betrug 1400 V.

Die Proben wurden im "single ion monitoring" (SIM)-Modus gemessen. Die Auswertung erfolgte über das relative Verhältnis der Peakfläche der Probe zur Peakfläche des internen Standards. Die verwendeten Qualifier- und Quantifizermassen sind Tabelle 3 zu entnehmen. Die Kalibration wurde als Einpunkt-Kalibration bei einer Konzentration von 0,167 mg/l für alle Analyten nach jeder dritten Probe wiederholt. Die Probenvorbereitung für die Kalibration erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie oben erwähnt.

Tab. 3: Qualifier- und Quantifizermassen der SPME-GC-MS-Methode

Analyt	Quantifier (m/z)	Qualifier (m/z)
Pyrimethanil	198	199
Cyprodinil	224	225
Procymidon	283	285
Mepanipyrim	222	223
Fludioxonil	248	182 / 249
Fenhexamid	97	177 / 179
Boscalid	140	342 / 344
Lindan (Interner Standard)	219	217

VALIDIERUNG UND METHODENVERGLEICH

Die Retentionszeit und Linearität der Kalibration (Bestimmtheitsmaß der Kalibrationsgeraden) wurden aus der jeweiligen Kalibration entnommen.

Als Basiswein für die Validierung und den Methodenvergleich diente ein kontrolliert-biologisch und somit frei von botrytiziden Wirkstoffen produzierter Wein. Diesem Wein wurden 35 Konzentrationen (Boscalid: 0,000 mg/l bis 0,506 mg/l; Cyprodinil: 0,000 mg/l bis 0,627 mg/l; Fenhexamid: 0,000 mg/l bis 0,447 mg/l; Fludioxonil: 0,000 mg/l bis 0,468 mg/l; Mepanipyrim: 0,000 mg/l bis 0,169 mg/l; Pyrimethanil: 0,000 mg/l bis 0,578 mg/l) der Analyten zugesetzt. Ein daraus resultierender Wein mit 0,050 mg von jedem Analyten pro Liter wurde zur Ermittlung der Reproduzierbarkeit (Reproducibility) und Wiederholbarkeit (Repeatability) verwendet. Dabei wurde die Intraday- Repeatability (ein Analytiker, zehn Analysen desselben Weines an einem Tag) insge-

samt dreimal ermittelt und daraus die Interday-Repeatability (ein Analytiker, 10 Analysen desselben Weines an drei Tagen) kalkuliert. Die Reproduzierbarkeit der Analysen ergab sich aus einer Wiederholung durch einen zweiten Analytiker (zwei Analytiker, 10 Analysen desselben Weines an zwei Tagen).

Die durchschnittliche Wiederfindung wurde aus den 35 zugesetzten Konzentrationen der Analyten berechnet. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert der Wiederfindung, als Standardabweichung der Wiederfindung, als höchster und als niedrigster Wert der Wiederfindung für alle Analyten und für beide Methoden angegeben.

Die Bestimmungsgrenze (LOQ) der Analyten wurde für die SPME-GC-MS-Methode durch das Signal/Rausch-Verhältnis berechnet. Die Nachweisgrenze (LOD) wird für diese Methode nicht angegeben. LOQ entspricht dem Zehnfachen der Standardabweichung des Hintergrundrauschens. Aus der Grundkalibrierung der QuEChERS-GC-NPD wurde die Nachweis- und Bestimmungsgrenze aller Analyten unter Einhaltung der deutschen Norm DIN 32645 berechnet (KOLB et al., 1993; AUSTRIAN STANDARDS INSTITUTE/ ÖSTERREICHISCHES NORMUNGSMINISTERIUM (ON), 2011). Diese Kalkulation ist für die SPME-GC-MS-Methode aufgrund der Einpunkt-Kalibration nicht möglich.

Der Methodenvergleich erfolgte in Form von Bland-Altman-Diagrammen. Bei der Methode nach Bland und Altman wird die Differenz eines Wertepaares gegen den Mittelwert eines Wertepaares aufgetragen. Mit dieser Methode kann die Verbindung zwischen Messfehler und dem wahren Wert beurteilt werden, wobei der wahre Wert durch den Mittelwert der Messungen approximiert wird (GIAVARINA, 2015).

STATISTIK

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels SPSS-Statistics 22.0 (IBM) und Excel Office 2016 hinsichtlich der Unterschiede zwischen den Jahrgängen 2011 bis 2017, der Produktarten (Traubenmost, Sturm, Wein) und der Wirkstoffe. Die Ergebnisse werden als rel.

Anteil nicht bestimmbar (%), rel. Anteil < 0,050 mg/l (%), rel. Anteil < 0,100 mg/l (%), rel. Anteil < 0,250 mg/l (%), Maximalkonzentration (mg/l) und rel. Anteil an Proben, die den Grenzwert überschreiten (%), angegeben. Zunächst wurde der Datensatz mit einer explorativen Datenanalyse auf Normalverteilung getestet. Für diese Datenanalyse werden Ergebnisse unter der Bestimmungsgrenze, wie bei REIMANN et al. (2008) empfohlen, als Bestimmungsgrenze minus 0,001 mg/l in die Berechnung der Daten aufgenommen. Es wurden keine Ausreißer eliminiert. Nicht nachweisbare Konzentrationen werden für die Statistik als nicht bestimmbar definiert. Lag eine Normalverteilung und Varianzhomogenität vor, wurden die Mittelwerte der unabhängigen Stichproben mittels Tukey B-Test auf dem Signifikanzniveau von 0,05 ausgewertet, bestand Normalverteilung, aber keine Varianzhomogenität, wurde der Dunnett-T3-Test ebenfalls auf dem Signifikanzniveau von 0,05 verwendet. War der jeweilige Datensatz nicht normal verteilt, wurde ein Kruskal-Wallis-Test auf dem Signifikanzniveau von 0,05 durchgeführt und in Form von paarweisen Vergleichen ausgewertet (KRUSKAL und WALLIS, 1952; HARTING und ELPELT, 1999; REIMANN et al., 2008).

ERGEBNISSE

ERGEBNISSE DER METHODENENTWICKLUNG UND VALIDIERUNG

Es konnte sowohl bei dieser Methode als auch beim SPME-GC-MS-Lauf eine sehr gute Trennung der Analyten beobachtet werden. Der Abbildung 1 ist das Chromatogramm eines repräsentativen QuEChERS-GC-NPD-Laufes der Kalibration (Konzentration der Analyten: 0,500 mg/l) zu entnehmen. Die Retentionszeiten sowie Kalibrationsdaten und Angaben über die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für die Analyten bei der QuEChERS-GC-NPD und der SPME-GC-MS Methode sind Tabelle 4 zu entnehmen.

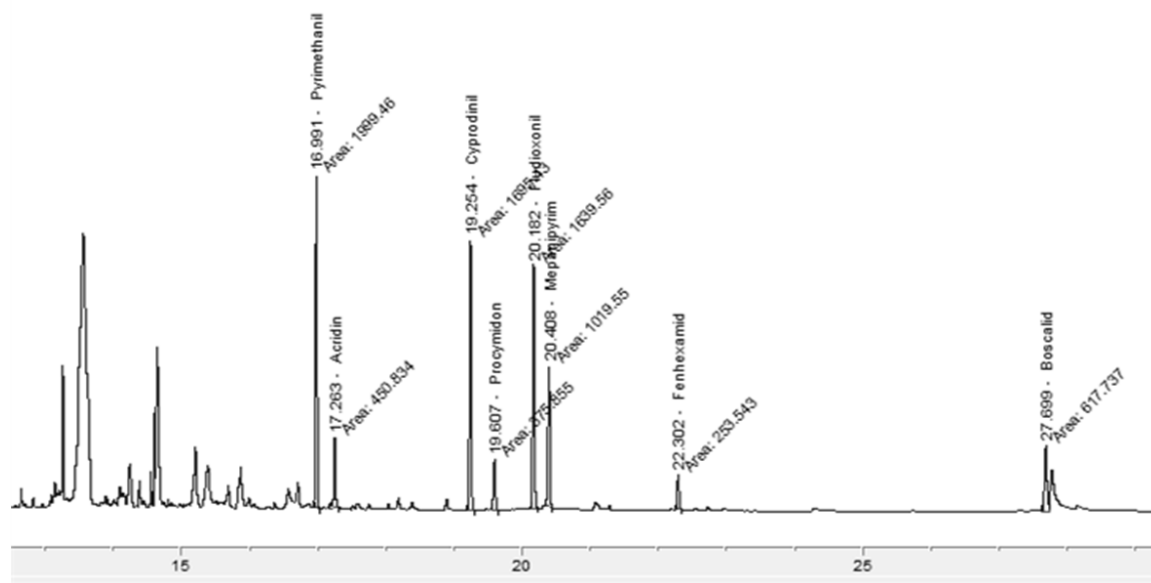


Abb. 1: Auszug eines Chromatogramms der QuEChERS-GC-NPD-Methode (Kalibration: Konzentration der Analyten: 0,500 mg/l)

Tab. 4: Retentionszeit, Linearität der Kalibration, Nachweis- (LOD) und Bestimmungsgrenze (LOQ) der QuEChERS-GC-NPD-Methode und der SPME-GC-MS-Methode

	QuEChERS-GC-NPD				SPME-GC-MS			
	RT (min)	R ²	LOD ^{*1} (mg/l)	LOQ ^{*1} (mg/l)	RT (min)	R ²	LOD	LOQ ^{*2} (mg/l)
Boscalid	27,672	0,99682	0,005	0,025	30,140	1,00000	-	0,010
Cyprodinil	19,271	0,99998	0,001	0,010	18,806	1,00000	-	0,010
Fenhexamid	22,265	0,99682	0,002	0,015	22,402	1,00000	-	0,010
Fludioxonil	20,149	0,99985	0,001	0,010	20,071	1,00000	-	0,010
Mepanipyrim	20,581	0,99987	0,003	0,015	19,803	1,00000	-	0,010
Pyrimethanil	16,900	0,99997	0,003	0,010	16,066	1,00000	-	0,010

^{*1} ermittelt durch DIN 32645; ^{*2} ermittelt durch das Signal/Rausch-Verhältnis

Bei der QuEChERS-GC-NPD wurde eine externe Kalibration in biologisch produziertem Wein mittels fünf Kalibrationspunkten und der Nutzung eines Internen Standards durchgeführt. Die Kalibrationsgleichungen sind, den im Wein üblichen Konzentrationsbereich der Analyten betreffend, linear (Korrelationskoeffizient aller Analyten $\geq 0,99682$). Die Nachweisgrenzen (LOD), ermittelt über DIN 32645, schwankten zwischen 0,005 mg/l bei Boscalid und 0,001 mg/l bei Fludioxonil. Die Kalibration der SPME-GC-MS-Methode wurde als Einpunkt Kalibration entwickelt und ist daraus resultierend

ideal linear ($R^2 = 1,00000$). Die Bestimmungsgrenzen für die QuEChERS-GC-NPD-Methode wurden analog zur DIN 32645 aus der Kalibration exakt berechnet und für die SPME-GC-MS-Methode über das Signal/Rausch-Verhältnis geschätzt (KOLB et al., 1993; AUSTRIAN STANDARDS INSTITUTE/ÖSTERREICHISCHES NORMUNGSMINISTERIUM (ON), 2011). Die SPME-GC-MS-Methode dürfte für einige Analyten (Boscalid, Fenhexamid und Mepanipyrim) sensitiver sein als die QuEChERS-GC-NPD-Methode (Tab. 4).

Tab. 5: Reproduzierbarkeit und Wiederholbarkeit der QuEChERS-GC-NPD-Methode und der SPME-GC-MS-Methode

	QuEChERS-GC-NPD			SPME-GC-MS		
	Intraday Srt ^{*1}	Interday Srt ^{*1}	Srd ^{*2}	Intraday Srt ^{*1}	Interday Srt ^{*1}	Srd ^{*2}
Boscalid	4,80 %	6,96 %	8,11 %	3,97 %	7,00 %	7,00 %
Cyprodinil	4,55 %	4,99 %	4,99 %	3,01 %	8,96 %	10,65 %
Fenhexamid	4,41 %	6,91 %	7,93 %	4,37 %	11,15 %	15,23 %
Fludioxonil	5,59 %	6,09 %	6,29 %	3,66 %	8,89 %	9,32 %
Mepanipyrim	1,04 %	2,29 %	3,29 %	3,29 %	10,54 %	10,02 %
Pyrimethanil	4,47 %	5,55 %	6,42 %	2,93 %	8,12 %	8,55 %

^{*1} Repeatability (Wiederholbarkeit); ^{*2} Reproducibility (Reproduzierbarkeit)

Den Tabellen 5 und 6 sind die Ergebnisse der Validierung zu entnehmen. Wie aus Tabelle 5 ersichtlich, sind die Ergebnisse der QuEChERS-GC-NPD-Analysen wiederhol- und reproduzierbarer als die Ergebnisse der

SPME-GC-MS-Methode. Auch die durchschnittliche Wiederfindung (Recovery) (Tab. 6) ist bei allen Analyten mittels QuEChERS-GC-NPD besser (näher bei 100 %) als bei SPME-GC-MS.

Tab. 6: Wiederfindungsraten verteilt über den Konzentrationsbereich von 0,005 bis 0,6 mg/l (40 Messungen)

	QuEChERS-GC-NPD				SPME-GC-MS			
	M ^{*1}	SD ^{*2}	highest	lowest	M ^{*1}	SD ^{*2}	highest	lowest
Boscalid	87,5 %	15,2 %	113,7 %	74,4 %	64,7 %	7,4 %	82,3 %	48,3 %
Cyprodinil	98,1 %	10,8 %	133,3 %	83,9 %	89,1 %	11,6 %	107,0 %	60,0 %
Fenhexamid	97,6 %	17,1 %	116,9 %	87,6 %	70,7 %	7,3 %	87,8 %	57,7 %
Fludioxonil	99,7 %	13,3 %	112,5 %	65,7 %	71,2 %	8,6 %	78,7 %	44,1 %
Mepanipyrim	88,0 %	17,0 %	125,2 %	60,8 %	74,6 %	8,3 %	90,2 %	55,1 %
Pyrimethanil	98,9 %	10,0 %	127,3 %	84,3 %	89,8 %	8,9 %	103,2 %	66,7 %

^{*1} Mittelwert; ^{*2} Standardabweichung

ERGEBNISSE DES METHODENVERGLEICHS MITTELS BLAND-ALTMAN-DIAGRAMM

Zur besseren graphischen Aufbereitung der Ergebnisse wurden die Wiederfindungsraten auch in Form von Bland-Altman-Diagrammen dargestellt (Abb. 2 bis 7). Dies gilt einerseits für den Vergleich der Ergebnisse mit den Soll-Werten, andererseits, wie bei Bland-Altman üblich, für den direkten Vergleich der Methoden. Für diese Bewertung wurden der Mittelwert der Differenzen (d) und die Standardabweichung der Differenzen

(s) zwischen den zwei Messungen berechnet und als ein Streudiagramm mit den Achsen X und Y präsentiert. Die Datenpunkte in der y-Achse entsprechen der Differenz der beiden Messungen (A-B), und auf der x-Achse wird der Mittelwert der Messungen ((A+B/2) dargestellt. Wertepaare, deren Abweichungen dem Doppelten der Standardabweichung der Differenzen entsprachen, wurden als Ausreißer aus der Berechnung entfernt (BLAND und ALTMAN, 1987; GIAVARINA, 2015).

Den ersten Punkt zur Bewertung für die Übereinstimmung zweier Methoden im Bland-Altman-Diagramm

stellt der Mittelwert der Differenzen dar, er wird als horizontale Linie aufgetragen. In einem idealen Modell wären die einzelnen Messungen von gleichem Wert und somit alle Differenzen 0. Durch zufällige und systematische Messfehler weichen die Messwerte innerhalb der Methoden ab, und es entsteht eine Vielzahl an unterschiedlichen Differenzen. Während bei rein zufälligen Messfehlern der Mittelwert aller Differenzen bei 0 liegen sollte, zeigt sich ein systematischer Messfehler in Abweichung davon (GIAVARINA, 2015). Bei den Verbindungen Boscalid (-0,021 mg/l), Fenhexamid (-0,019 mg/l), Fludioxonil (-0,027 mg/l), Pyrimethanil (-0,005 mg/l) und Mepanipyrim (-0,001 mg/l) ist dieser systematische Messfehler leicht negativ, das heißt, bei gleichen Soll-Konzentrationen an Botrytiziden waren die Analyseergebnisse bei SPME GC MS-Analysen im Durchschnitt der Proben etwas geringer als bei QuEChERS-GC-NPD Analysen. Das bestätigen die Ergebnisse der Wiederfindungsmessungen der Tabelle 6. Nur bei Cyprodinil gibt es keine systematische Abweichung bei den Ergebnissen zwischen den beiden Methoden.

Den zweiten Punkt zur Beurteilung des Bland-Altman-Diagramms stellen die sogenannten "Limits of Agreement" dar (GIAVARINA, 2015). Nach BLAND und ALTMAN (1987) sollten 95 % der Datenpunkte innerhalb der zweifachen Standardabweichung der Differenzen ($\pm 2s$) liegen. Das obere und untere "Limit of Agreement" werden somit durch $d+1,96*s$ und $d-1,96*s$ definiert. Als grundlegende Bedingung für diese Annahme gilt die Normalverteilung der Differenzen. Die "Limits of Agreement" werden ebenfalls als horizontale Linie aufgetragen und geben Auskunft über die Schwankungsbreite der Abweichungen. Mithilfe des Bland-Altman-Diagramms können zwar systematische Fehler und die Schwankungsbreite, in der 95 % der Differenzen

zwischen zwei Messwerten liegen, bestimmt werden, eine Aussage über die Eignungsfähigkeit beziehungsweise Verwendungsfähigkeit der Methoden kann jedoch nicht getroffen werden. Um die Verwendungsfähigkeit der Methoden zu beurteilen, wurde deshalb das Prinzip des "A priori-Kriteriums" eingeführt. Dazu wird vor den Messungen (a priori) ein maximal akzeptables Limit für die Schwankungsbreite der Differenzen (erwartetes "Limit of Agreement"), basierend auf analytisch relevanten Kriterien, eingeführt und nach Erstellung des Bland-Altman-Diagramms mit den "Limits of Agreements" verglichen, ob dieses "A priori-Kriterium" eingehalten werden kann oder nicht (GIAVARINA, 2015; PRASNIKAR et al., 2016). Im Zuge dieser Arbeit werden zwei Kategorien an "A priori-Kriterien" vorgestellt. Das strenge analytische "A priori-Kriterium" basierend auf dem Doppelten der Bestimmungsgrenze (GIAVARINA, 2015), und das "A priori-Kriterium" basierend auf den gesetzlichen Grenzwerten für Rückstände in Keltertrauben ((EG) Nr. 396/2005). Das zweite Kriterium entspricht einem Hundertstel des gesetzlichen Grenzwertes (Tab. 7).

Demnach gilt eine absolute Vergleichbarkeit nach diesen sehr strengen analytischen Kriterien für Boscalid (höchste Bestimmungsgrenze, Abb. 2) und auch für Mepanipyrim (eingeschränkter Überwachungsbereich bis $< 0,200$ mg/l, Abb. 6). Bei den anderen Botrytiziden konnte das analytische A priori-Kriterium nicht erfüllt werden. In absoluten Zahlen betrachtet, sind die Abweichungen im Vergleich zu den von der Weinkontrolle herangezogenen Grenzwerten für Keltertrauben (Tab. 1) um ein Vielfaches kleiner. Basierend auf den "Grenzwert-A priori-Kriterien" sind die Ergebnisse der beiden Methoden mit Ausnahme von Cyprodinil deshalb vergleichbar.

Tab. 7: A priori-Kriterien für die Bland-Altman-Diagramme

	A priori-Kriterium analytisch (mg/l)	A priori-Kriterium basierend auf dem Grenzwert (mg/l)	Grenzwerte (mg/kg Keltertrauben)
Boscalid	0,050	0,050	5
Cyprodinil	0,020	0,030	3
Fenhexamid	0,030	0,150	15
Fludioxonil	0,020	0,040	4
Mepanipyrim	0,030	0,020	2
Pyrimethanil	0,020	0,050	5

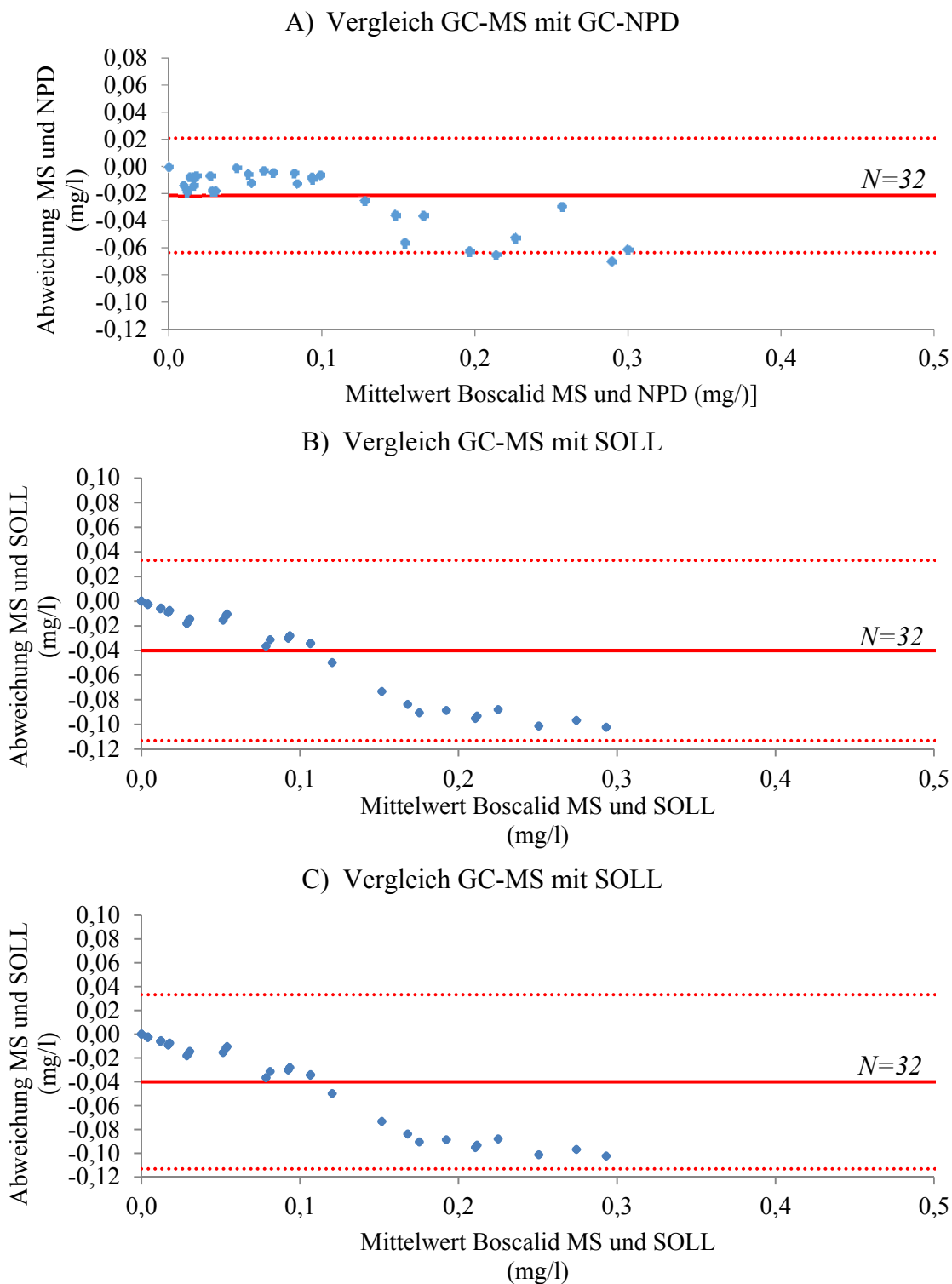


Abb. 2: Bland-Altman-Diagramm der Boscalid-Konzentrationen: A) Vergleich GC-MS mit GC-NPD, B) Vergleich GC-MS mit der Sollkonzentration, C) Vergleich GC-MS mit der Sollkonzentration (Die dicke rote Linie entspricht dem Mittelwert der Abweichungen, die gestrichelte Linie entspricht den "Limits of Agreement". Wertepaare, deren Abweichungen dem Doppelten der Standardabweichung der Differenzen entsprachen, wurden als Ausreißer aus der Berechnung entfernt; N = Anzahl der Proben.)

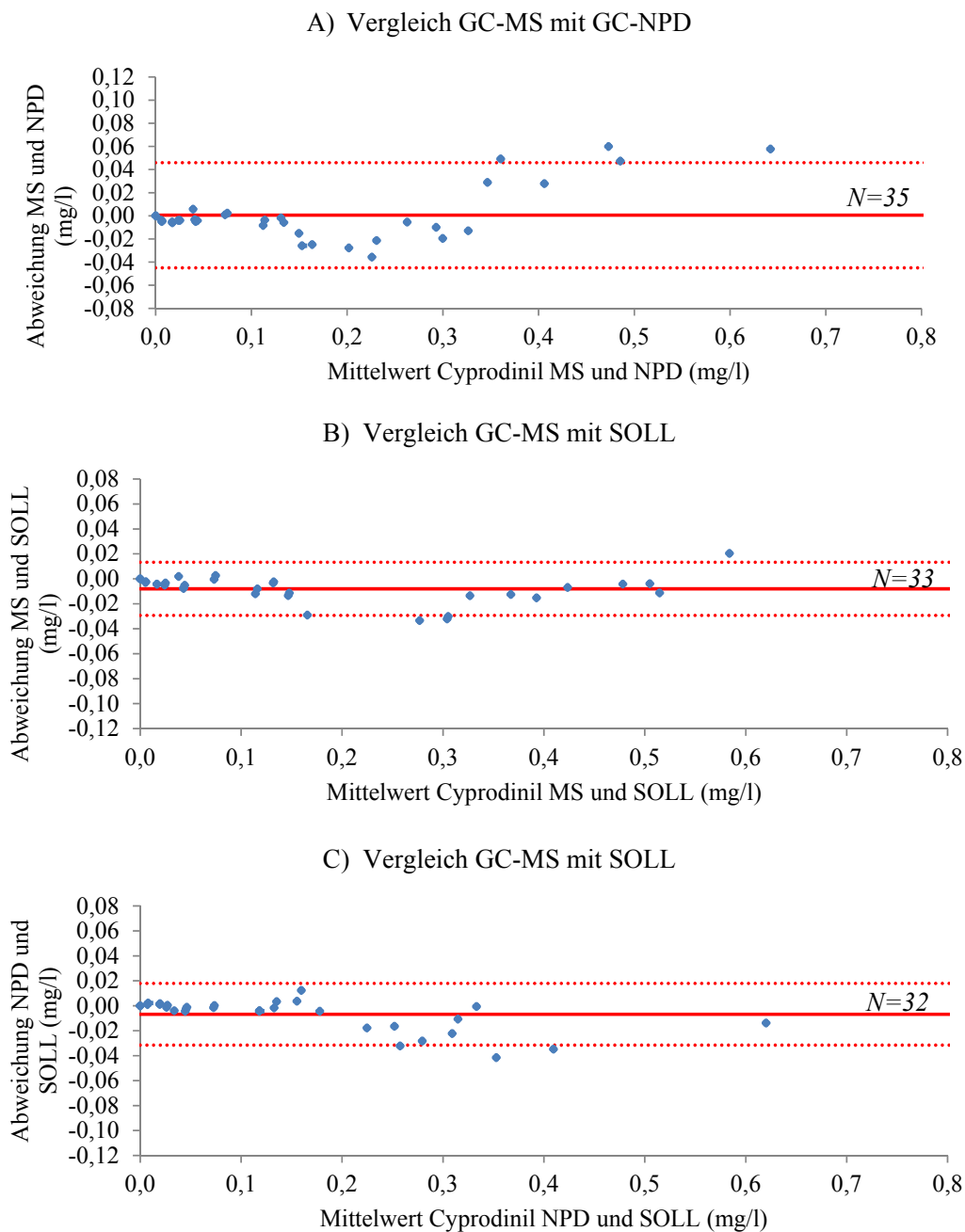


Abb. 3: Bland Altman Diagramm der Cyprodinil-Konzentrationen: A) Vergleich GC-MS mit GC-NPD, B) Vergleich GC-MS mit der Sollkonzentration, C) Vergleich GC-MS mit der Sollkonzentration: (Die dicke rote Linie entspricht dem Mittelwert der Abweichungen, die gestrichelte Linie entspricht den "Limits of Agreement". Wertepaare, deren Abweichungen dem Doppelten der Standardabweichung der Differenzen entsprachen, wurden als Ausreißer aus der Berechnung entfernt; N = Anzahl der Proben.)

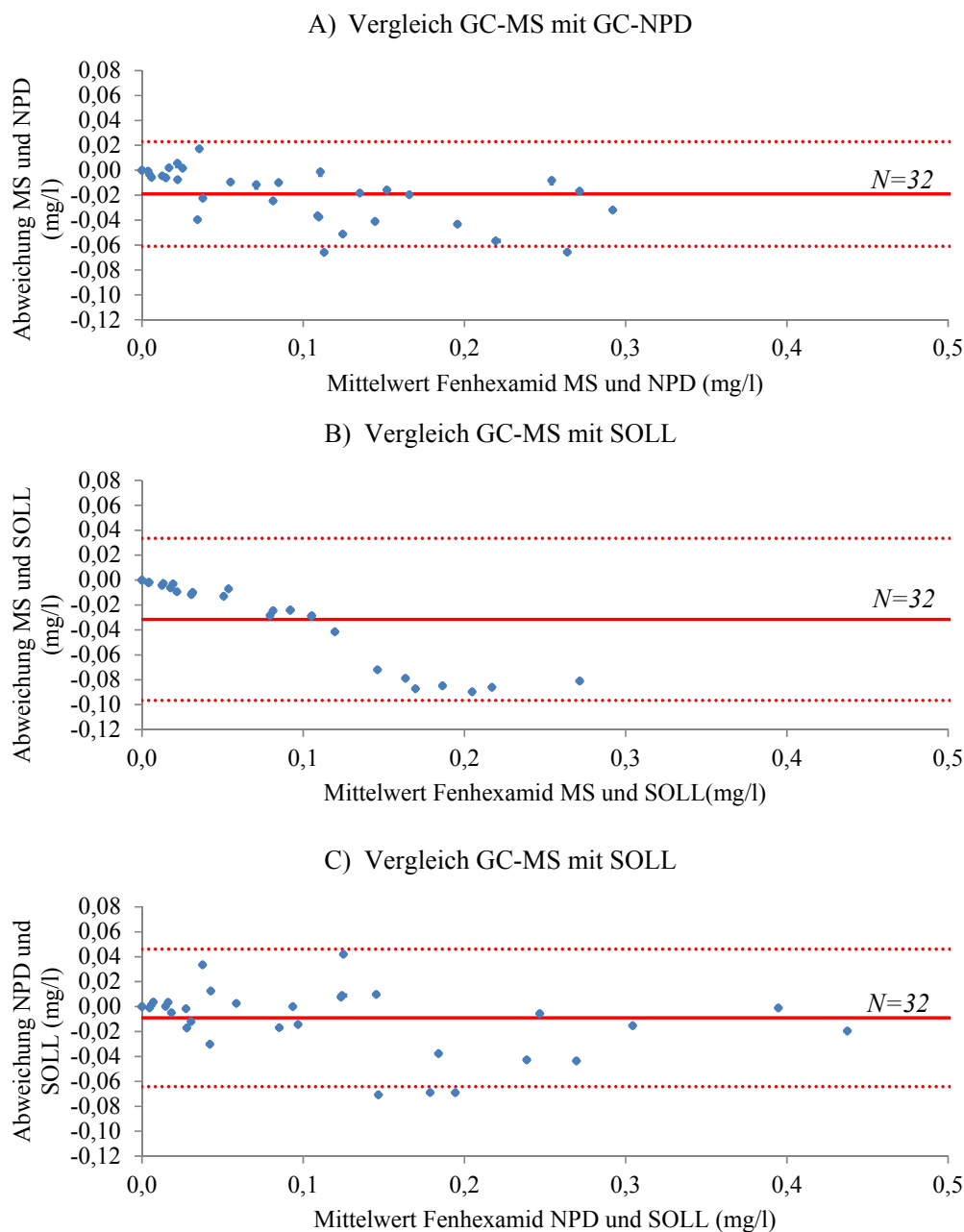


Abb. 4: Bland Altman Diagramm der Fenhexamid-Konzentrationen: A) Vergleich GC-MS mit GC-NPD, B) Vergleich GC-MS mit der Sollkonzentration, C) Vergleich GC-MS mit der Sollkonzentration: (Die dicke rote Linie entspricht dem Mittelwert der Abweichungen, die gestrichelte Linie entspricht den "Limits of Agreement". Wertepaare, deren Abweichungen dem Doppelten der Standardabweichung der Differenzen entsprechen, wurden als Ausreißer aus der Berechnung entfernt; N = Anzahl der Proben.)

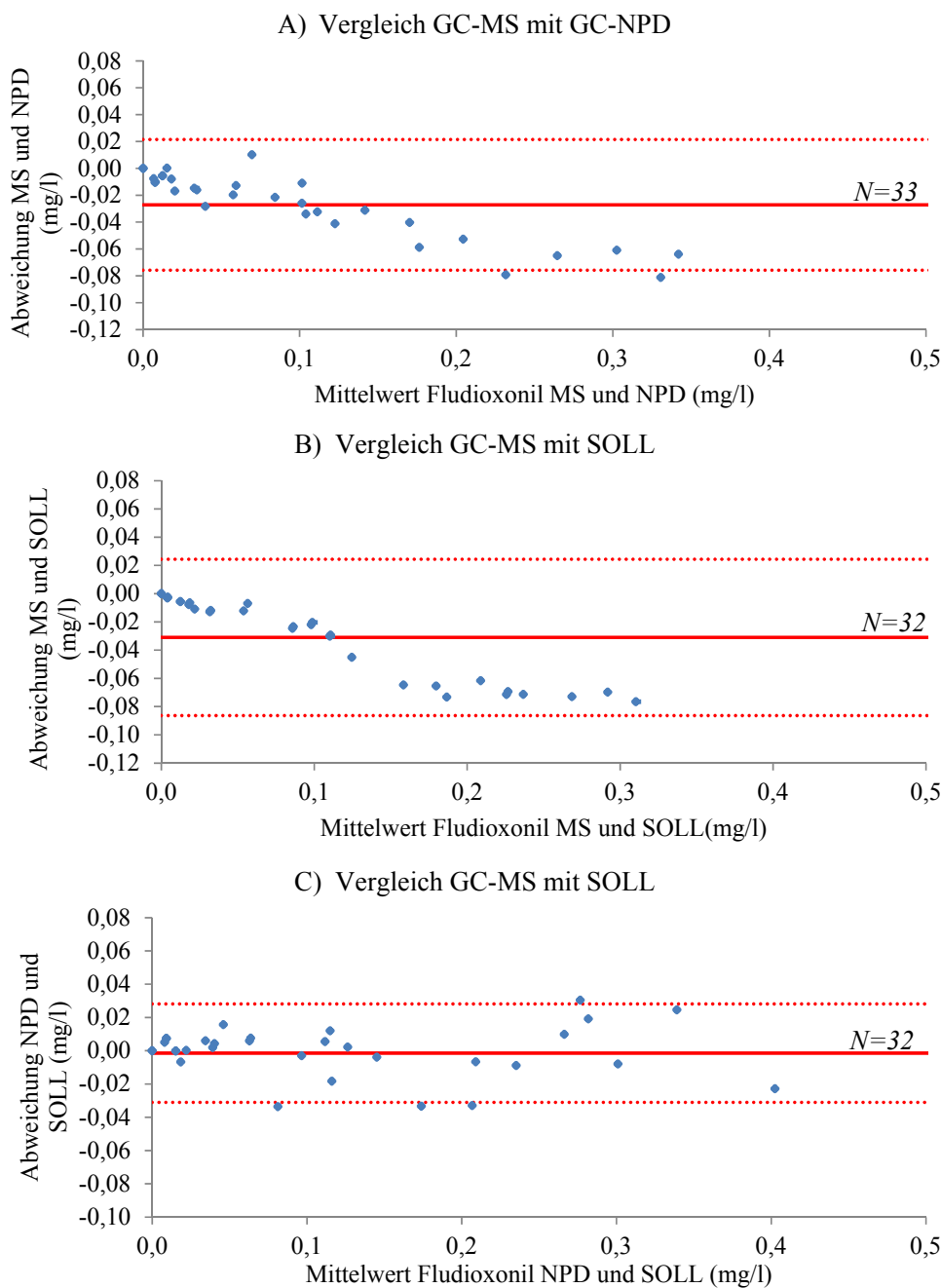


Abb. 5: Bland Altman Diagramm der Fludioxonil-Konzentrationen: A) Vergleich GC-MS mit GC-NPD, B) Vergleich GC-MS mit der Sollkonzentration, C) Vergleich GC-MS mit der Sollkonzentration: (Die dicke rote Linie entspricht dem Mittelwert der Abweichungen, die gestrichelte Linie entspricht den "Limits of Agreement". Wertepaare, deren Abweichungen dem Doppelten der Standardabweichung der Differenzen entsprachen, wurden als Ausreißer aus der Berechnung entfernt; N = Anzahl der Proben.)

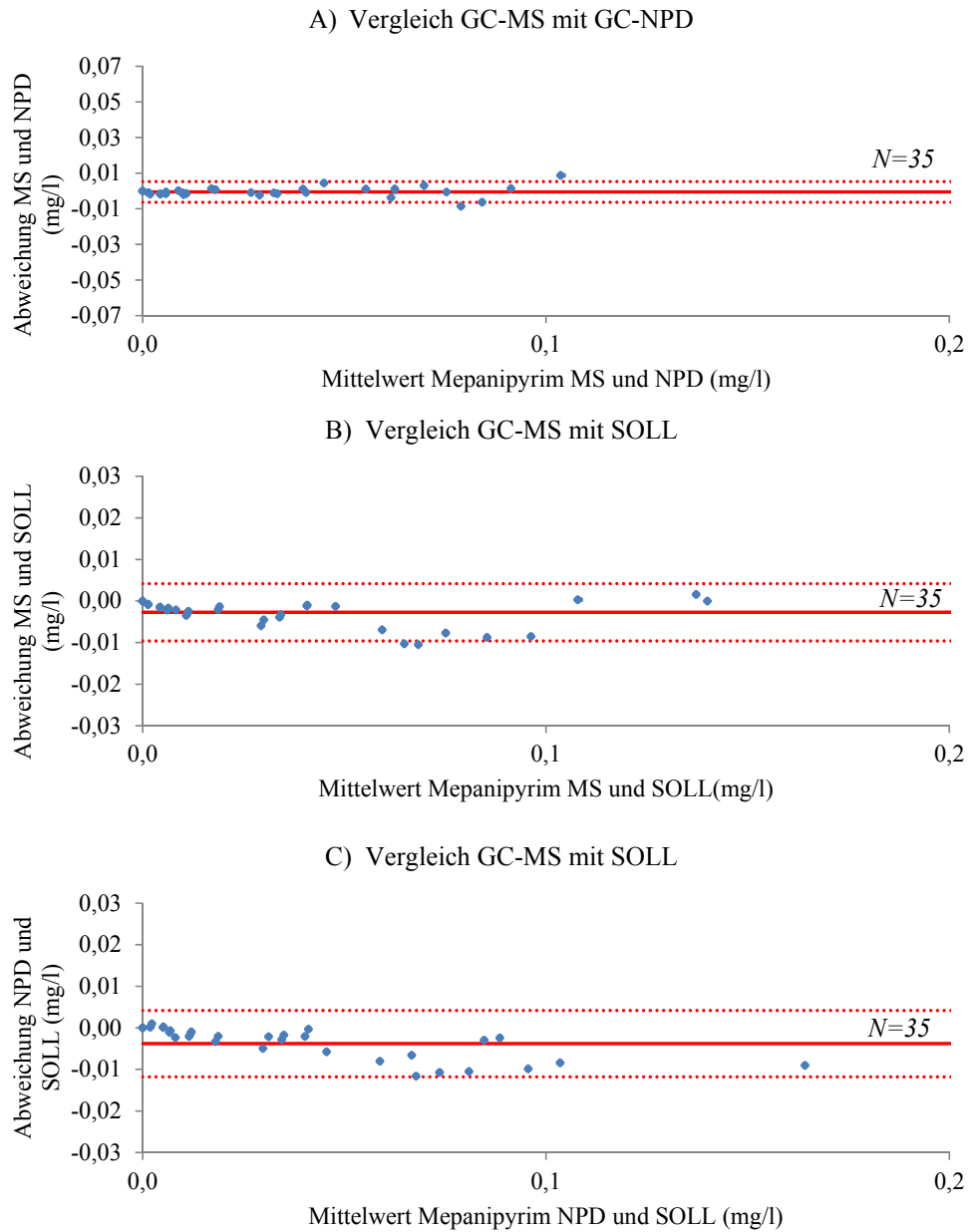


Abb. 6: Bland Altman Diagramm der Mepanipyrim-Konzentrationen: A) Vergleich GC-MS mit GC-NPD, B) Vergleich GC-MS mit der Sollkonzentration, C) Vergleich GC-MS mit der Sollkonzentration: (Die dicke rote Linie entspricht dem Mittelwert der Abweichungen, die gestrichelte Linie entspricht den "Limits of Agreement". Wertepaare, deren Abweichungen dem Doppelten der Standardabweichung der Differenzen entsprechen, wurden als Ausreißer aus der Berechnung entfernt; N = Anzahl der Proben.)

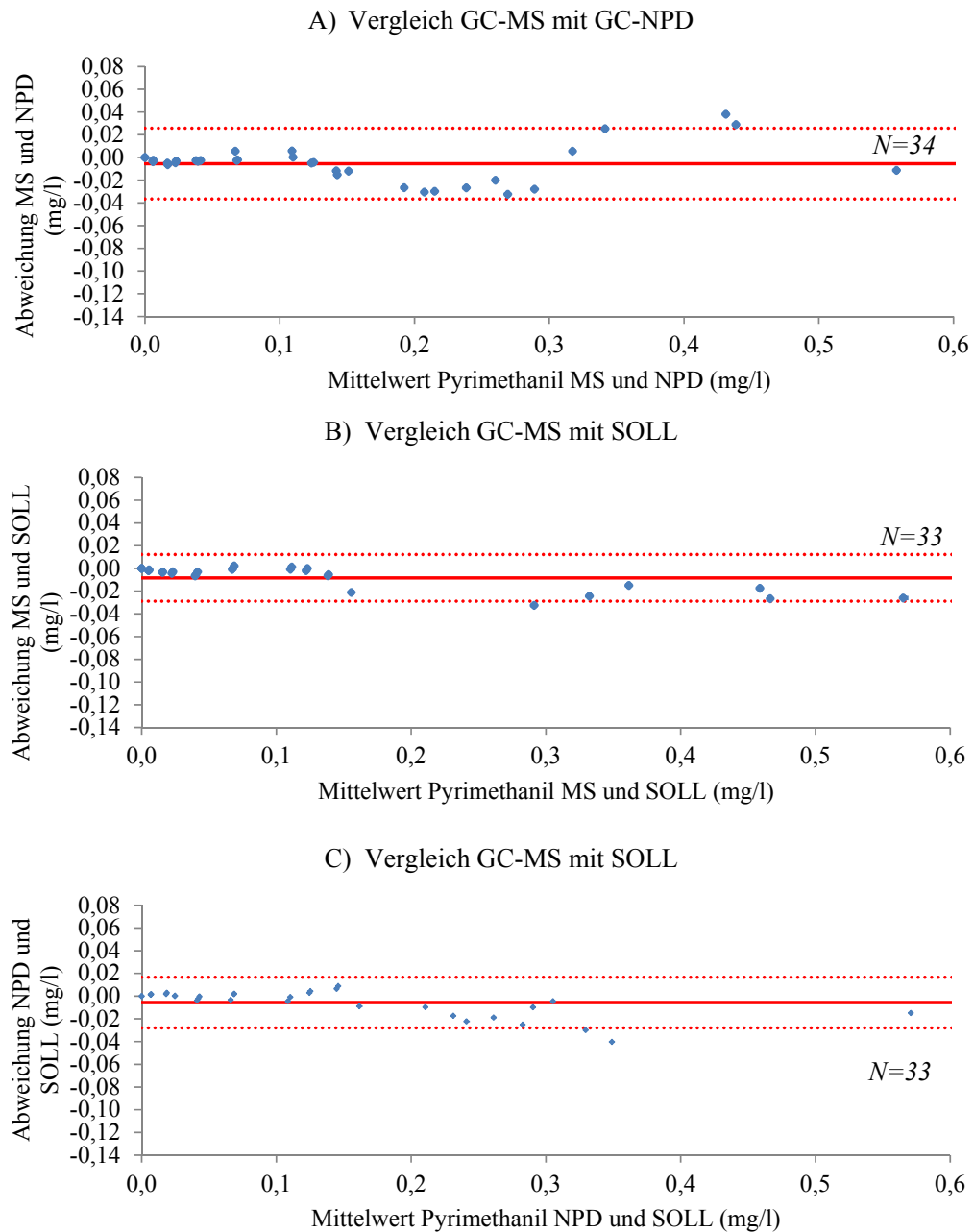


Abb. 7: Bland Altman Diagramm der Pyrimethanil-Konzentrationen: A) Vergleich GC-MS mit GC-NPD, B) Vergleich GC-MS mit der Sollkonzentration, C) Vergleich GC-MS mit der Sollkonzentration: (Die dicke rote Linie entspricht dem Mittelwert der Abweichungen, die gestrichelte Linie entspricht den "Limits of Agreement". Wertepaare, deren Abweichungen dem Doppelten der Standardabweichung der Differenzen entsprachen, wurden als Ausreißer aus der Berechnung entfernt; N = Anzahl der Proben.)

Es ist zielführend, die Ergebnisse der beiden Methoden zu den Soll-Konzentrationen (Gold-Standard) in Form eines Bland-Altman-Diagramms einzutragen (GIAVARINA, 2015; PATZL-FISCHERLEITNER et al., 2016). Aus diesen Darstellungen (B und C der Abb. 2 bis 7) geht hervor, dass die Ergebnisse der QuEChERS-GC-NPD einen geringeren systematischen und zufälligen Fehler haben als die Ergebnisse der SPME-GC-MS-Methode. Werden bei der QuEChERS-GC-NPD bei Boscalid, Mepanipyrim und Pyrimethanil sogar die strengen analytischen A priori-Kriterien erreicht und bei Cyprodinil, Fenhexamid und Fludioxonil nur gering überschritten, übersteigen die Limits of Agreement bei allen Analyten der SPME-GC-MS diese strengen analytischen Kriterien. Die Abweichungen im Vergleich zu den gesetzlichen Grenzwerten sind aber auch hier um ein Vielfaches kleiner. Zusammenfassend kann gesagt werden, die QuEChERS-GC-NPD-Methode ist den Ergebnissen dieser Arbeit nach genauer, also richtiger (weniger systematische Fehler) und präziser (weniger zufällige Fehler) als die SPME-GC-MS-Methode. In Bezug auf den gesetzlichen Auftrag gibt es nach unserer Einschätzung der Situation aber für keine der beiden Methoden Bedenken, da die Abweichungen um ein Vielfaches geringer (< 1:100) sind als die gesetzlichen Grenzwerte (basierend auf den Grenzwerten für Tafeltrauben).

GEHALTE AN BOTRYTIZID-RÜCKSTÄNDEN IN ÖSTERREICHISCHEN WEIN-, MOST- UND STURM-PROBEN VON 2011 BIS 2017

Den folgenden Boxplot-Darstellungen (Abb. 8 bis 13) sind die gefundenen Rückstandskonzentrationen der Wirkstoffe Boscalid, Cyprodinil, Fludioxonil, Fenhexamid, Mepanipyrim und Pyrimethanil in 791 begutachteten Proben im Zeitraum 2011 bis 2017 zu entnehmen. Für die Datenanalyse wurden Ergebnisse unter der Bestimmungsgrenze, wie von REIMANN et al. (2008) empfohlen, als "Bestimmungsgrenze minus 0,001 mg/l" in die Berechnung der Daten aufgenommen. Die rote Linie markiert die Bestimmungsgrenze (LOQ). In Tabelle 8 sind die Ergebnisse der gefundenen Rückstände als rel. Anteil nicht bestimmbar (%), rel. Anteil < 0,050 mg/l (%), rel. Anteil < 0,100 mg/l (%), rel. Anteil < 0,250 mg/l (%), Maximalkonzentration (mg/l) und rel. Anteil an Proben, die den Grenzwert überschreiten (%), angegeben.

Tab. 8: Relative Anteile gefundener Rückstände im Untersuchungszeitraum 2011 bis 2017

	nicht bestimmbar mg/l	Anteil < 0,050 mg/l	Anteil < 0,100 mg/l	Anteil < 0,250 mg/l	max. Konzentration	Anteil über Grenzwert
Boscalid	82,0 %*1	92,3 %	97,2 %	98,9 %	0,800 mg/l	0 %
Cyprodinil	96,6 %*2	99,7 %	100 %	100 %	0,050 mg/l	0 %
Fenhexamid	88,1 %*3	94,5 %	97,0 %	99,6 %	0,440 mg/l	0 %
Fludioxonil	94,8 %*2	99,6 %	100 %	100 %	0,070 mg/l	0 %
Mepanipyrim	97,6 %*3	99,6 %	99,9 %	100 %	0,130 mg/l	0 %
Pyrimethanil	81,4 %*2	94,3 %	97,7 %	99,5 %	0,560 mg/l	0 %

*1 nicht bestimmbar = 0,025 mg/l; *2 nicht bestimmbar = 0,010 mg/l; *3 nicht bestimmbar = 0,015 mg/l

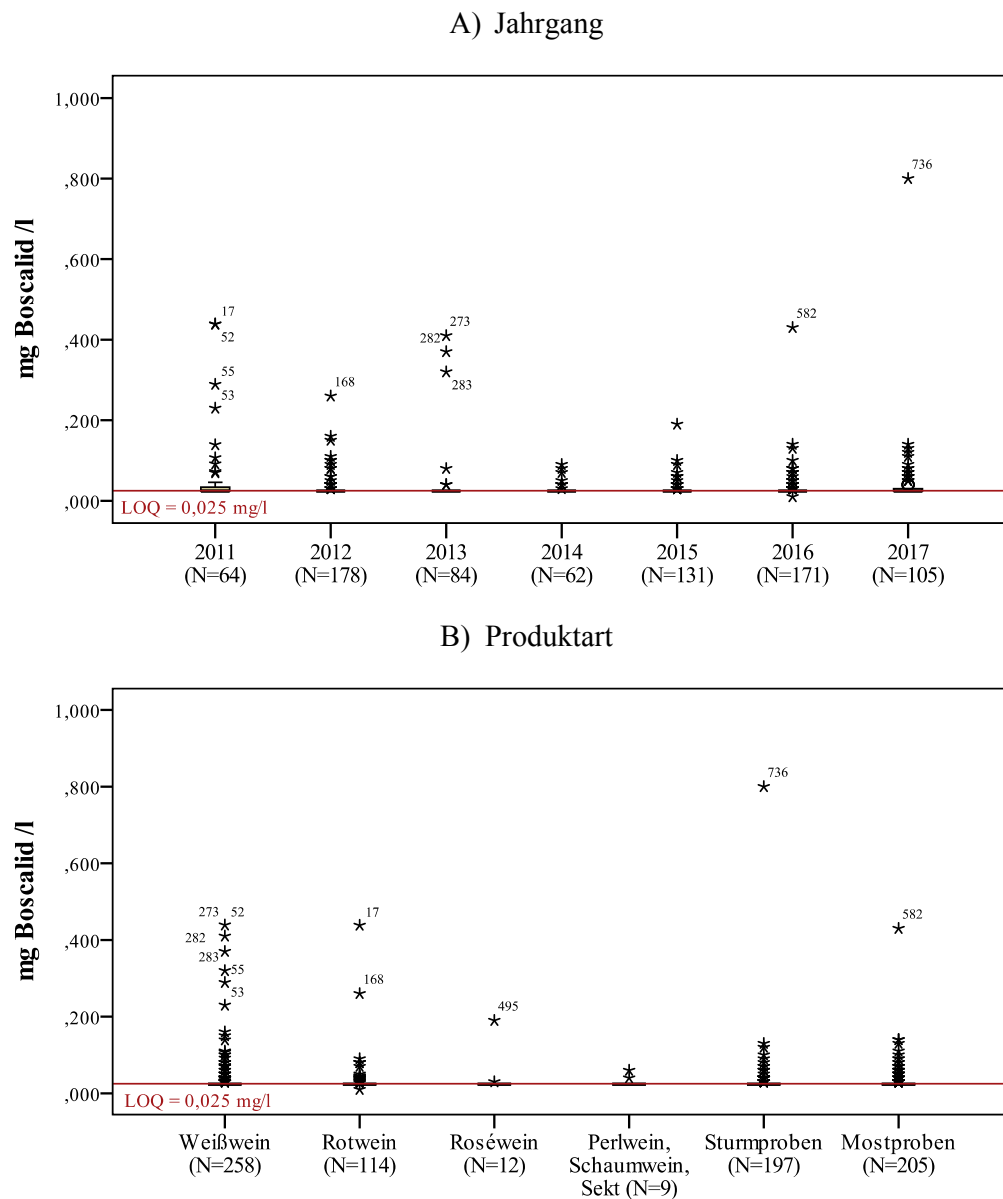


Abb. 8: Verteilung der gefundenen Boscalid-Konzentrationen in 791 Handelsproben: A) Verteilung über die Jahre 2011 bis 2017; B) Verteilung über die Produktart

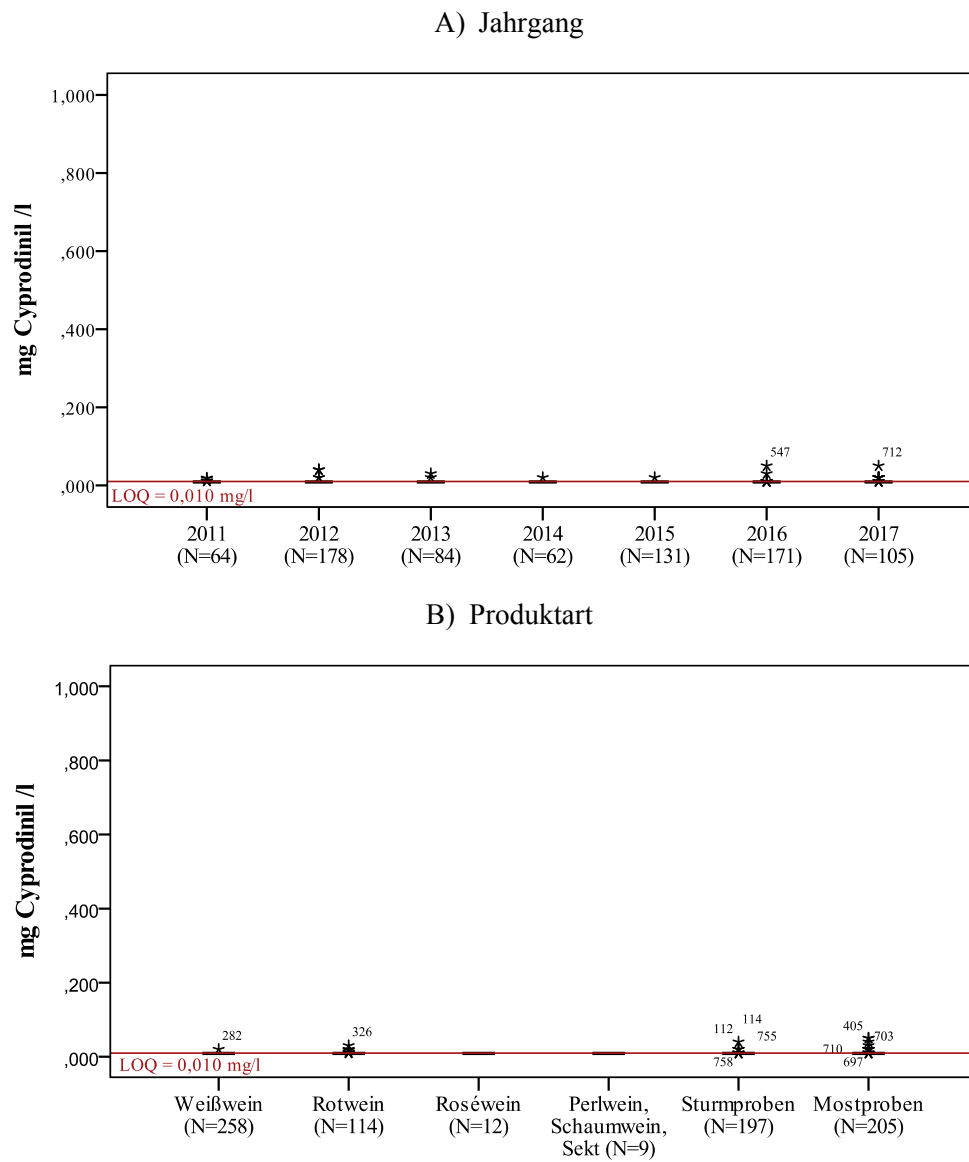


Abb. 9: Verteilung der gefundenen Cyprodinil-Konzentrationen in 791 Handelsproben: A) Verteilung über die Jahre 2011 bis 2017; B) Verteilung über die Produktart

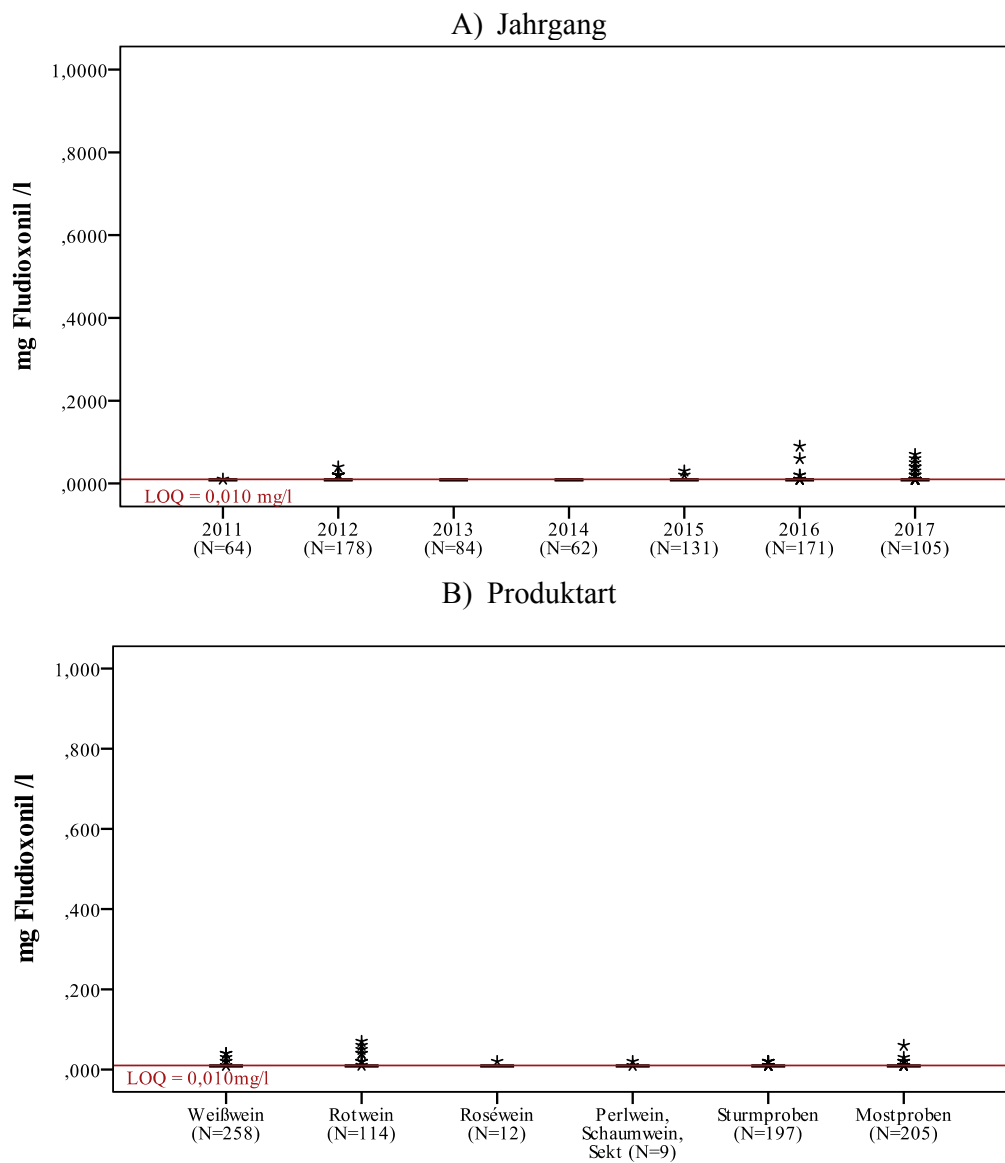


Abb. 10: Verteilung der gefundenen Fludioxonil-Konzentrationen in 791 Handelsproben: A) Verteilung über die Jahre 2011 bis 2017; B) Verteilung über die Produktart

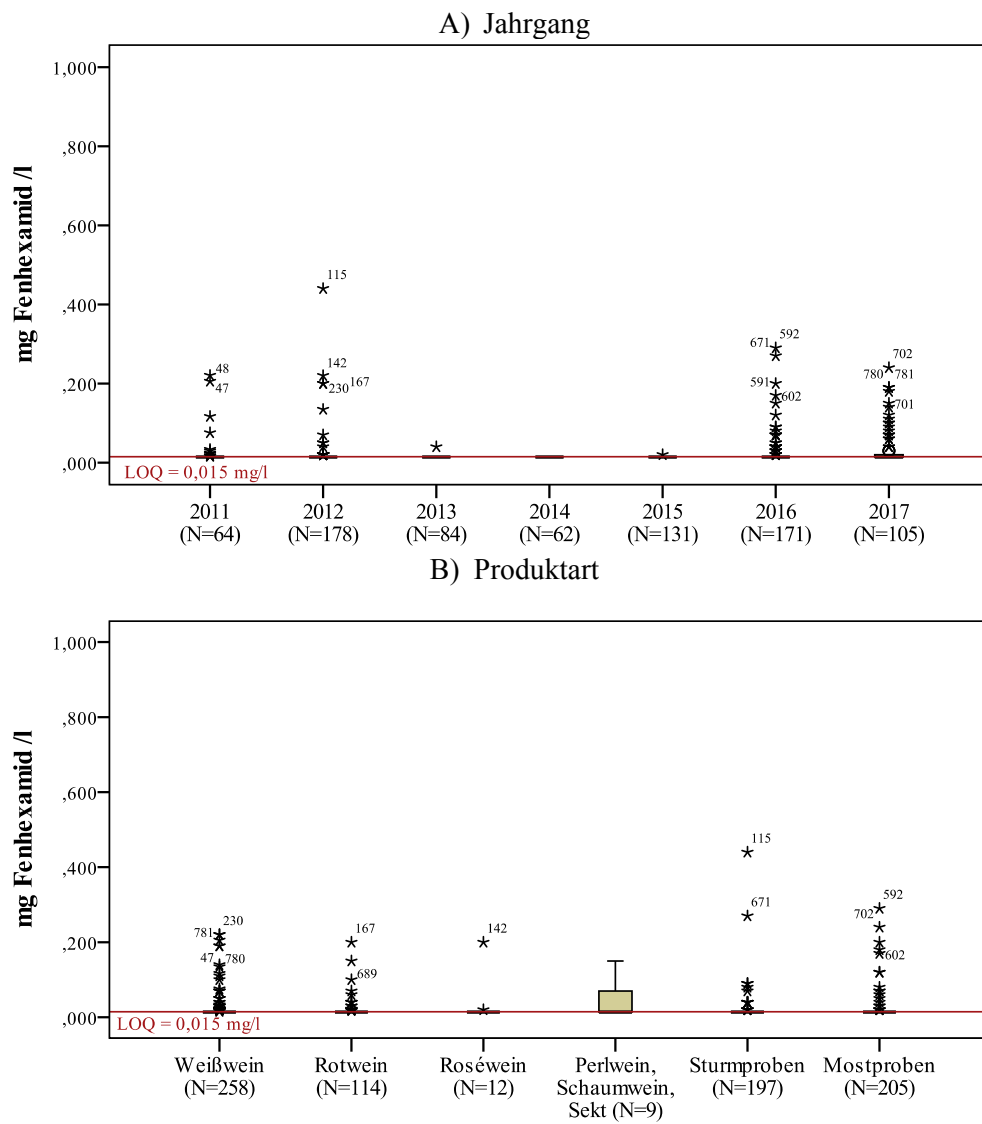


Abb. 11: Verteilung der gefundenen Fenhexamid-Konzentrationen in 791 Handelsproben: A) Verteilung über die Jahre 2011 bis 2017; B) Verteilung über die Produktart

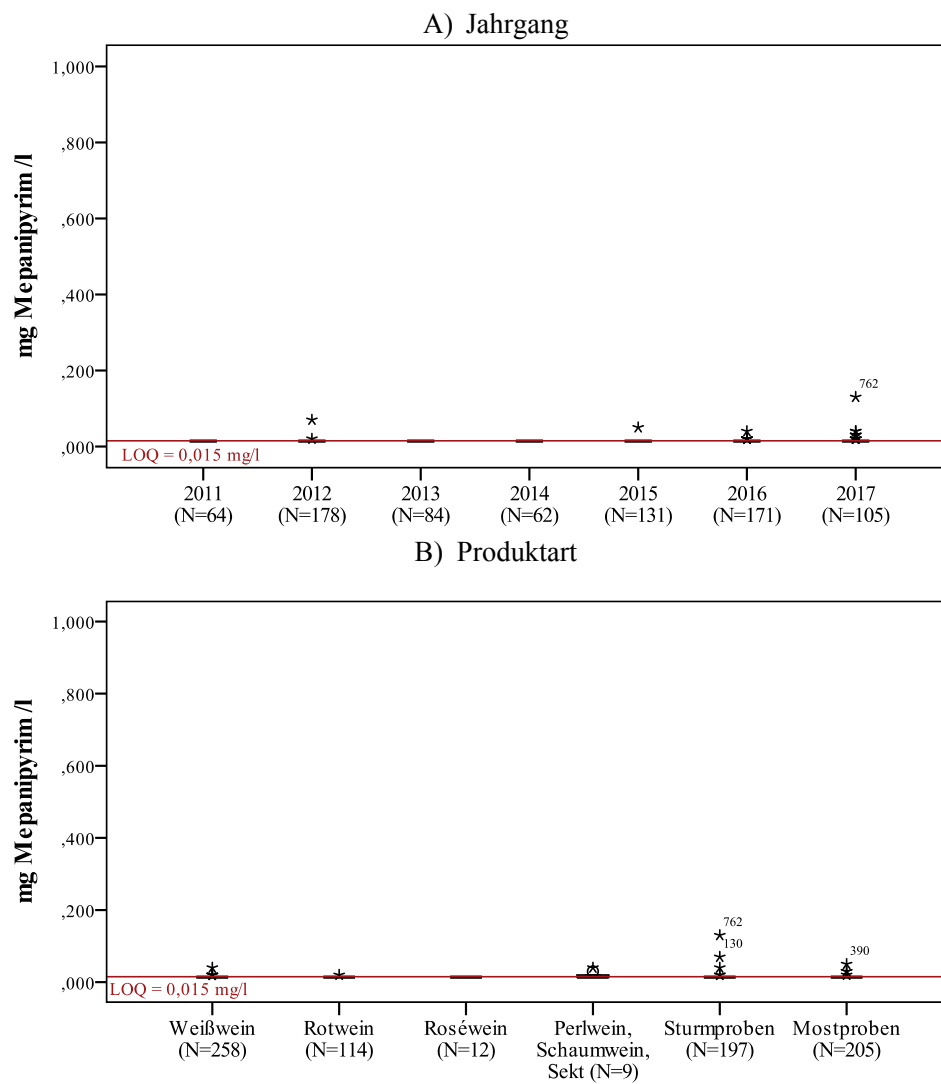


Abb. 12: Verteilung der gefundenen Mepanipyrim-Konzentrationen in 791 Handelsproben: A) Verteilung über die Jahre 2011 bis 2017; B) Verteilung über die Produktart

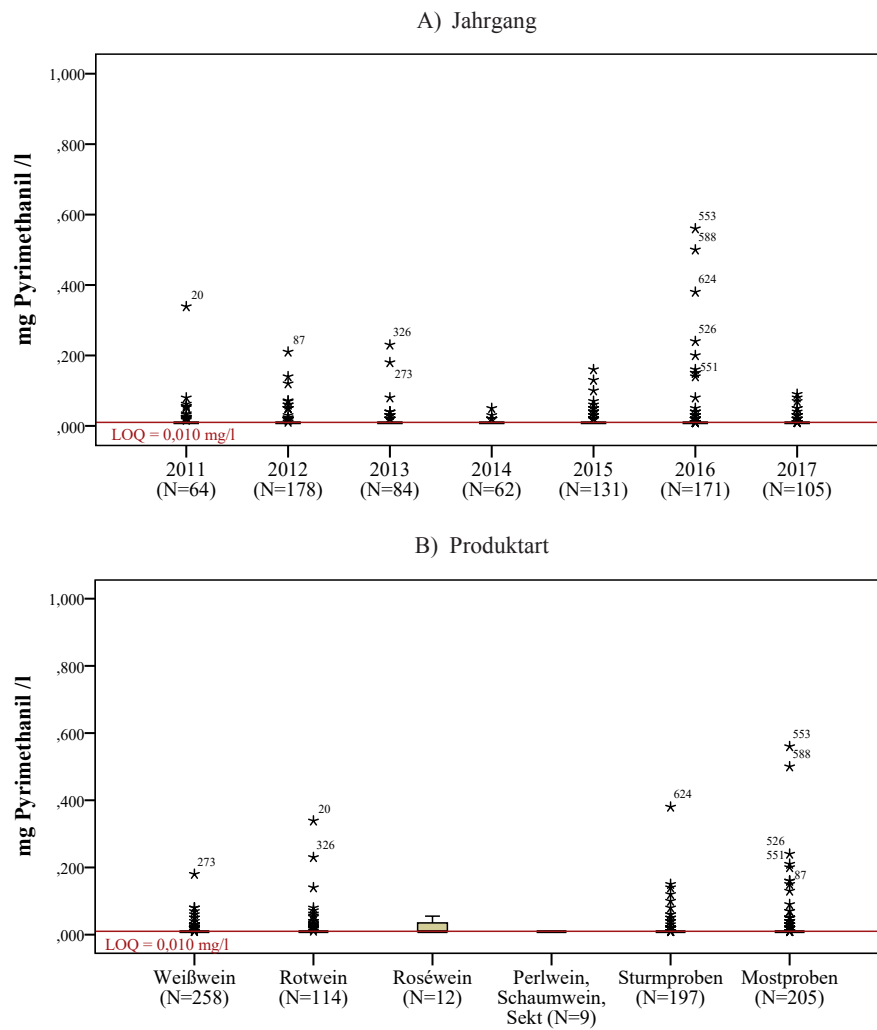


Abb. 13: Verteilung der gefundenen Pyrimethanil-Konzentrationen in 791 Handelsproben: A) Verteilung über die Jahre 2011 bis 2017; B) Verteilung über die Produktart

Abbildung 8 und Tabelle 8 sind die gefundenen Boscalid-Konzentrationen der 791 begutachteten Handelsproben zu entnehmen. Bei 82,0 % der Proben konnte kein Boscalid bestimmt werden. Die gefundene max. Konzentration von 0,8 mg Boscalid/l wurde in einer Sturmprobe aus 2017 gemessen, und bei keiner Probe wurde der Grenzwert (5 mg Boscalid/kg Keltertrauben) überschritten ((EG) Nr. 396/2005). Statistisch abgesicherte Aussagen über Unterschiede in den Boscalid-Konzentrationen der Jahrgänge und der verschiedenen Produktarten sind schwer interpretierbar, da sehr schief (82,0 % < 0,025 mg/l). Bei derart schiefen Datensätzen sind nach REIMANN et al. (2008) die statistischen Ergebnisse wenig aussagekräftig. Mittels nicht-parametrischer Tests können jedoch generelle Aussagen getätigt werden (KRUSKAL und WALLIS, 1952; HARTING und ELPELT, 1999; REIMANN et al., 2008). Ein signifikanter Zusammenhang zwischen Jahrgang und gefundener Boscalid-Konzentration konnte festgestellt werden (Kruskal Wallis H: 30,516, DF = 6, $p \leq 0.000$; paarweiser Vergleich: 2013-2017: H = -87,314, $p = 0,002$; 2013-2011: H = 100,34, $p = 0,002$; 2012-2017: H = -67,842, $p = 0,007$; 2012-2011: H = 80,867, $p = 0,007$; 2015-2011: H = 71,891, $p = 0,047$). Mit den Proben 736, 273, 582, 282 unter anderen wurden sehr hohe Rückstandskonzentrationen gefunden. Wie von etlichen Autoren (EDER et al., 2017; SCHILDBERGER und KRIEGER, 2011; NEUBERGER et al., 2008; FLAK et al., 1991; CABRAS et al., 1997b; CABRAS und ANGIONI, 1997; CABRAS et al., 2000; DOULIA et al., 2017) bestätigt, sind Botrytizid-Wirkstoffe sehr stabil und demnach über lange Zeit in Wein bestimmbar. Es wird beobachtet, dass durch Vinifizierung und Lagerung von Weinen die Gehalte an Botrytiziden reduziert werden können (EDER et al., 2017; CABRAS et al., 2000; FLAK et al., 1991). In Bezug auf die Ergebnisse bei Boscalid kann diesbezüglich keine Aussage über Zusammenhänge zwischen Produktart und Boscalid-Konzentration hergestellt werden (Kruskal Wallis H: 3,745, DF = 5, $p = 0.587$) (KRUSKAL und WALLIS, 1952).

Die Verteilung der gefundenen Cyprodinil-Konzentrationen ist Abbildung 9 und Tabelle 8 und die der Fludioxonil-Konzentrationen Abbildung 10 und Tabelle 8 zu entnehmen. Die beiden Wirkstoffe sind im Handelsprodukt Switch enthalten. Im Gegensatz zu anderen Botrytizidwirkstoffen konnten bei keiner Probe mehr als 0,070 mg/l gefunden werden. Statistische Aussagen über Unterschiede zwischen den Jahrgängen und Produktarten machen aufgrund der schiefen Verteilung der Daten wenig Sinn - auch deshalb, weil bei mehr als 96,6 % der Proben Cyprodinil nicht bestimmbar war. Dennoch ergaben sich signifikante Einflüsse durch den Jahrgang bei Cyprodinil (Kruskal Wallis H: 14,293, DF = 6, $p = 0.027$; signifikante paarweise Vergleiche: 2015-2017: H = -30,975, $p = 0,022$) sowie Fludioxonil (Kruskal Wallis H: 53,303, DF = 6, $p \leq 0.000$; signifikante paarweise Vergleich: 2011-2017: H = -69,348, $p \leq 0.000$; 2012-2017: H = -50,702, $p \leq 0.000$; 2013-2017: H = -75,457, $p \leq 0.000$; 2014-2017: H = -75,457, $p \leq 0.000$; 2015-2017: H = -69,289, $p \leq 0.000$; 2016-2017: H = -56,945, $p \leq 0.000$) und ebenfalls durch die Produktart bei Cyprodinil (Kruskal Wallis H: 14,253, DF = 5, $p = 0.014$; signifikante paarweise Vergleiche: Weißwein-Rotwein: H = -21,847, $p = 0,018$) und bei Fludioxonil (Kruskal Wallis H: 13,125, DF = 5, $p = 0.022$; keine signifikanten paarweisen Vergleiche).

Die Ergebnisse der gefundenen Fenhexamid-Konzentrationen zeigen ein interessantes, aber schwer interpretierbares Ergebnis (Abb. 11, Tab. 8). Fenhexamid ist ein Wirkstoff im Handelsprodukt Teldor®. Der Wirkstoff ist seit 2001 in der EU zugelassen und hat eine vorläufige Zulassung bis zum Jahr 2030. In den Jahren 2013 bis 2015 konnte dieser Wirkstoff in kaum einer Probe, in den Jahren 2011 bis 2012 und 2016 bis 2017 hingegen mit teilweise hohen Konzentrationen (bis 0,440 mg/l) bestimmt werden. Ein signifikanter Jahrgangsunterschied wurde festgestellt (Kruskal Wallis H: 62,533, DF = 6, $p \leq 0.000$; signifikante paarweise Vergleiche: 2012-2017: H = -53,589, $p = 0,016$; 2013-2017: H = -103,152, $p \leq 0.000$; 2014-2017: H = -107,867, $p \leq 0.000$; 2015-

2017: $H = -105,069$, $p \leq 0.000$; 2014-2016: $H = -68,444$, $p = 0.008$; 2015-2012: $H = 51,480$, $p = 0.011$; 2015-2011: $H = 64,523$, $p \leq 0.023$; 2015-2016: $H = -65,647$, $p \leq 0.000$; 2013-2016: $H = -105,069$, $p \leq 0.000$). Es gilt jedoch auch für Fenhexamid, dass in keiner Probe der für die österreichische Weinkontrolle verwendete Grenzwert für Keltertrauben überschritten wurde ((EG) Nr. 396/2005). Ebenfalls konnte ein signifikanter Einfluss der Produktart festgestellt werden (Kruskal Wallis $H: 18,480$, $DF = 5$, $p = 0.002$; keine signifikanten paarweisen Vergleiche).

Die Mepanipyrim-Konzentrationen (Abb. 12, Tab. 8) zeigen, dass in den Jahren 2011, 2013 und 2014 bei keiner Probe dieses Botrytizid bestimmbar war. Ein signifikanter Jahrgangsunterschied konnte festgestellt werden (Kruskal Wallis $H: 31,662$, $DF = 6$, $p \leq 0.000$; signifikante paarweise Vergleiche: 2011-2017: $H = -37,924$, $p = 0.002$; 2012-2017: $H = -33,438$, $p \leq 0.000$; 2013-2017: $H = -37,924$, $p \leq 0.000$; 2014-2017: $H = -37,924$, $p = 0.002$; 2015-2017: $H = -34,836$, $p \leq 0.000$; 2016-2017: $H = -24,079$, $p = 0.029$). Der Kruskal-Wallis-Test zeigt bei diesem Botrytizid einen signifikanten Einfluss ($H: 69,803$, $p \leq 0.000$) durch die Produktart, wobei die Gehalte bei Perlwein, Schaumwein und Sekt signifikant ($p \leq 0.000$) höher waren als bei anderen Produkten. Aufgrund der geringen Stichprobe bei der Variante Perlwein, Schaumwein und Sekt ist dieses Ergebnis aber wenig aussagekräftig.

Abbildung 13 und Tabelle 8 sind die gefundenen Pyrimethanil-Konzentrationen in den 791 analysierten Handelsproben der Jahre 2011 bis 2017 zu entnehmen. Der Kruskal-Wallis-Test zeigt bei diesem Botrytizid keinen signifikanten Jahrgangsunterschied ($H = 10,315$, $DF = 6$, $p = 0.112$) aber einen signifikanten Einfluss durch die Produktart (Kruskal-Wallis $H: 21,775$, $DF = 5$, $p = 0.001$; signifikante paarweise Vergleiche: Weißwein-Rotwein: $H = -53,073$, $p = 0.0037$; Weißwein-Mostproben: $H = -55,017$, $p = 0.0012$).

WIRKSTOFFE IM VERGLEICH

Abbildung 14 zeigt eine Gegenüberstellung der relevanten Botrytizid-Konzentrationen und die signifikanten Unterschiede zwischen den Varianten (Kruskal-Wallis-Test $H = 3656,609$, $DF = 5$, $p \leq 0.000$; Boscalid > Fenhexamid = Mepanipyrim > Pyrimethanil > Cyprodinil = Fludioxonil). Diese können mehrere Ursachen haben. Einerseits könnten die Pflanzenschutzmittel Cantus, Pyrimet, Pyrus, Scala, Teldor u. a. bei den Winzerinnen und Winzern häufiger oder eher später zum Einsatz kommen als zum Beispiel Switch und Frupica Opti, andererseits wäre es auch denkbar, dass sich Wirkstoffe wie Cyprodinil und Fludioxonil rascher abbauen als andere Pflanzenschutzmittel (CABRAS et al., 1997b; CABRAS und ANGIONI, 1997; CABRAS et al., 2000). Dagegen spricht aber, dass diese Wirkstoffe auch in Most kaum nachweisbar waren. Die ausgebrachten Mengen (höchstzulässige Aufwandmenge/ha und Wirkstoffkonzentration) zeigen einige interessante Unterschiede, können aber auch nicht die signifikanten Unterschiede erklären. So werden bei Switch mit einer max. Aufwandmenge von 0,96 kg/ha pro Spritzung (max. zwei Anwendungen erlaubt) 360 g Cyprodinil und 240 g Fludioxonil pro ha und Anwendung, also in Summe maximal 720 g Cyprodinil und 480 g Fludioxonil pro ha, ausgebracht – auf der anderen Seite ist bei Scala (400 g Pyrimethanil/l) und Cantus (500 g Boscalid/kg) nur eine Anwendung pro Jahr erlaubt. Die gesamt ausgebrachte Wirkstoffmenge ist aber vergleichbar, so dürfen bei Cantus max. 1,2 kg, also 600 g Boscalid/ha, und bei Scala maximal 2,5 l, also 800 g Pyrimethanil/ha ausgebracht werden (PFLANZENSCHUTZMITTELREGISTER, 2018).

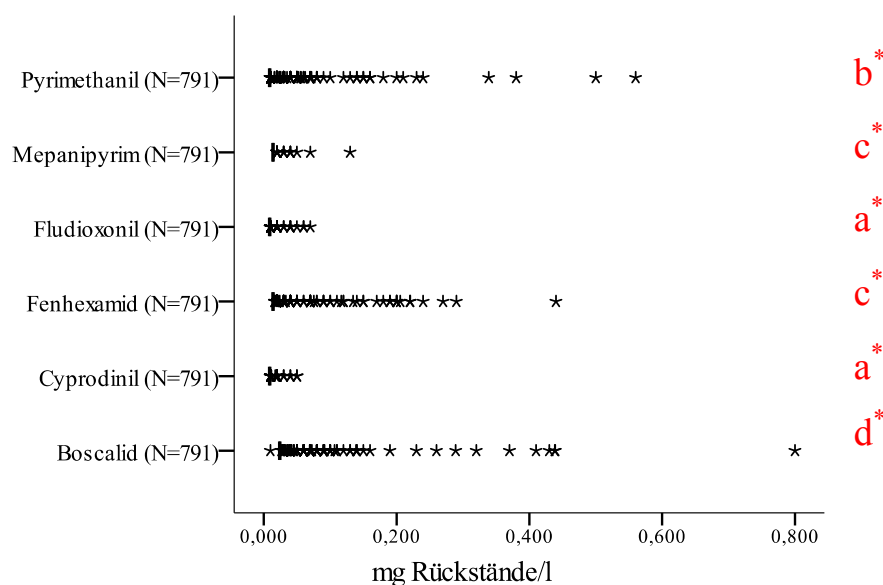


Abb. 14: Verteilung der Rückstands-Konzentrationen der verschiedenen analysierten botrytiziden Wirkstoffe: Gleiche Buchstaben bedeuten "Kein signifikanter Unterschied zwischen den Varianten" (Kruskal-Wallis-Test mit paarweisem Vergleich)

DISKUSSION

Im Zuge dieser Studie wurden 791 österreichische Most-, Sturm- und Weinproben von 2011 bis 2017 auf die botrytiziden Wirkstoffe Boscalid, Cyprodinil, Fludioxonil, Fenhexamid, Mepanipyrim und Pyrimethanil untersucht. Dabei kamen zwei gaschromatographische Methoden zum Einsatz, die unter anderem mittels Bland-Altman-Diagrammen auf ihre Tauglichkeit überprüft wurden. Beide Methoden sind für ein Monitoring der Rückstandskonzentrationen und für eine Kontrolle der Grenzwerte geeignet.

Bei keiner der analysierten Proben wurden die für die Weinkontrolle gültigen Grenzwerte für Keltertrauben überschritten. Je nach Wirkstoff enthielten 81,4 % bis 97,6 % aller analysierten Proben keine bestimmbar Rückstände dieser Botrytizide. Dennoch konnten vereinzelt Proben gefunden werden, die Rückstände in Konzentrationen > 0,250 mg/l enthielten. Ein direkter Zusammenhang zwischen Produktart und Rückstandskonzentration und Einflüsse des Jahrgangs auf die Konzentrationen sind statistisch schwer zu belegen. Die

Daten sind nicht normalverteilt, sogar sehr schief (81,4 bis 97,6 % aller Proben ohne bestimmbar Rückstandskonzentrationen), die Varianzen sind nicht homogen, außerdem die Stichprobenanzahl zwischen den Gruppen (unterschiedliche Jahrgänge, unterschiedliche Produktarten) sehr unterschiedlich. Dennoch kann indirekt die Aussage von einigen Autoren (EDER et al., 2017; CABRAS et al., 2000; FLAK et al., 1991) bestätigt werden, dass sich Konzentrationen an Botrytiziden während der Vinifikation und Lagerung der Weine langsam abbauen. Das zeigt sich partiell bei einzelnen Wirkstoffen an den Verteilungen der gefundenen Konzentrationen bei Most und Wein (zum Beispiel bei Pyrimethanil - Most vs. Weißwein). Es scheint so, dass verschiedene Wirkstoffe dabei unterschiedlich reagieren. Genauere Studien und Abbauprobversuche sind allenfalls notwendig, um diese Vermutungen zu bestätigen. Außerdem müssen önologische Verfahren getestet werden, mit Hilfe derer man nichtvermeidbare Rückstände reduzieren kann.

LITERATUR

- ANGIONI, A., DEDOLA, F., GARAU, V. L., SCHIRRA, M. UND CABONI, P. 2011: Fate of iprovalicarb, indoxacarb, and boscalid residues in grapes and wine by GC-ITMS analysis. *Journal of agricultural and food chemistry* 59(12): 6806-6812.
- ANASTASSIADES, M., LEHOTAY, S. J., ŠTAJNBAHER, D. UND SCHENCK, F. J. 2003: Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC international* 86(2): 412-431.
- AUSTRIAN STANDARDS INSTITUTE/ ÖSTERREICHISCHES NORMUNGSMINISTERIUM (ON), ÖNORM - DIN 32645. 2011: Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze: Ermittlung unter Wiederholbedingungen, Begriffe, Verfahren, Auswertung, <https://shop.austrian-standards.at/Preview.action?preview=&dok-key=387655&selectedLocale=de> (28. 06. 2017)
- BELYER, G. 2008: Traubenfäule und Botrytis in den Griff bekommen. *Der Badische Winzer* 6: 18-21.
- BLAND, J.M. UND ALTMAN D.G. 1987: Statistical methods for assessing agreement between measurement. *Biochimica Clinica* 11: 399-404.
- BUNDESGESETZBLATT. 2009: Weingesetz 2009, BGBl. I Nr. 111/2009
- CABRAS, P., ANGIONI, A., GARAU, V.L. UND MESELLI, E.V. 1997a: Gas chromatographic determination of cyprodinil, fludioxonil, pyrimethanil, and tebuconazole in grapes, must, and wine. *Journal of AOAC International* 80 (4): 867-870.
- CABRAS, P., ANGIONI, A., GARAU, V.-L., MELIS, M., PIRISI, F.-M., MINELLI, E.-V., GABITZA, F. UND CUBEDDU, M. 1997b: Fate of some new fungicides (cyprodinil, fludioxonil, pyrimethanil and tebuconazole) from vine to wine. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 45 (3): 2708-2710.
- CABRAS, P. UND ANGIONI, A. 2000: Pesticide residues in grapes, wine, and their processing products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (4): 967-973.
- CABRAS, P., MELONI, M., PIRISI, F.M., FARRIS, G.A. UND FATICHENTI, F. 1988: Yeast and pesticide interaction during aerobic fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 29 (2-3): 298-301.
- ČUŠ, F., ČESNIK, H. B., BOLTA, Š. V. UND GREGORČIČ, A. 2010: Pesticide residues and microbiological quality of bottled wines. *Food Control* 21(2): 150-154.
- ČUŠ, F., ČESNIK, H. B., BOLTA, Š. V. UND GREGORČIČ, A. 2010: Pesticide residues in grapes and during vinification process. *Food Control* 21(11): 1512-1518.
- DOULIA, D.S., ANAGNOS, E.K., LIAPIS, K.S. UND KLIMENTZOS, D.A. 2017: Effect of clarification process on the removal of pesticide residues in white wine. *Food Control* 72: 134-144.
- EDDER, P., ORTELLI, D., VIRET, O., COGNARD, E., MONTMOLLIN, A. D. UND ZALI, O. 2009: Control strategies against grey mould (*Botrytis cinerea* Pers.: Fr) and corresponding fungicide residues in grapes and wines. *Food Additives and Contaminants* 26(5): 719-725.
- EDER, P., PHILIPP, C., PATZL-FISCHERLEITNER, E., MANDL K. UND EDER R. 2017: Abbaudynamik von Botrytiziden-Wirkstoffen während der Weinproduktion und Lagerung. Poster bei der Kontaminantentagung, Linz.
- EUROPÄISCHE VERORDNUNG 2005: (EG) Nr. 396/2005 über Höchstgehalte an Pestizidrückständen.
- FLAK, W., TEUSCHLER, S. UND TSCHIEK, G. 1991: Der Einfluss von Schönungsmitteln auf den Rückstandgehalt von Botrytis-Fungiziden in Wein. *Mitteilungen Klosterneuburg* 41(6): 228-232.
- GIAVARINA, D. 2015: Understanding bland altman analysis. *Biochimica medica: Biochimica medica* 25(2): 141-151.

- HARTUNG, J. UND ELPELT, B. 1999: Multivariate Statistik. Lehr- und Handbuch der angewandten Statistik. 6. Unwesentlich veränderte Auflage – Oldenbourg: München
- KOLB, M.; BAHR, A., HIPPICH, S. UND SCHULZ, W. 1993: Calculation of detection limit, identification limit and determination limit according to DIN-32645 with the aid of a computer-program. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica* 21(6): 308-311.
- KROMIDAS S, 2011: Handbuch Validierung in der Analytik. John Wiley & Sons.
- KRUSKAL, W. H. UND WALLIS, W. A. 1952: Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American statistical Association* 47(260): 583-621.
- LAGUNAS-ALLUÉ, L., SANZ-ASENSIO, J. UND MARTÍNEZ-SORIA, M. T. 2012: Optimization and validation of a simple and fast method for the determination of fungicides in must and wine samples by SPE and GC/MS. *Journal of AOAC International* 95(5): 1511-1519.
- NEUBERGER, A., SCHILDBERGER, B., KRIEGER-WEBER, S., KNEIFEL, W. UND MANDL, K. 2008: Einfluss ausgewählter Fungizide auf Milchsäurebakterien. *Mitteilungen Klosterneuburg* 58(1): 23-27.
- PATZL-FISCHERLEITNER, E., PRASNIKER, N. UND FUCHS, A. 2015: Methodenvergleich zur Bestimmung des reinen CO₂-Überdrucks in Perl- und Schaumwein. 38th World Congress of Vine and Wine 5: 06004
- PFLANZENSCHUTTMITTELREGISTER. 2018: Pflanzenschutzmittelregister 2018
- PHILIPP, C. UND EDER, P. 2017: Rückstände in Wein. *Der Winzer* 3: 6-10.
- PRASNIKER, E., FUCHS, A. UND PATZL-FISCHERLEITNER, E. 2016: Methodenvergleich zur Bestimmung des reinen CO₂-Überdrucks in Perl- und Schaumwein. *Mitteilungen Klosterneuburg Rebe und Wein, Obstbau und Fruchteverwertung* 66(4): 344-357.
- REDL, H. 2009: Erfolgreiche Alternativen gegen Traubenfäule. *Der Winzer* 5: 6-11.
- REGNER, F. 2015: Botrytis - unvermeidbar? *Der Winzer* 5: 6-11.
- REIMANN, C., FILZMOSE, P., GARRETT, R. G. UND DUTTER, R. 2008: *Statistical data analysis explained: applied environmental statistics with R* – Chichester: Wiley.
- SCHILDBERGER, B. UND KRIEGER, S. 2011: BSA und Pflanzenschutzmittel. *Schweizer Zeitschrift für Obst- und Weinbau* 14: 4-6.
- VITALIF, M., GUIDOTTI, M., GIOVINAZZO, R. UND CEDRONET, O. 1998: Determination of pesticide residues in wine by SPME and GC/MS for consumer risk assessment. *Food Additives & Contaminants* 15(3): 280-287.
- ZAMBONIN, C. G., QUINTO, M., DE VIETRO, N. UND PALMISANO, F. 2004: Solid-phase microextraction-gas chromatography mass spectrometry: A fast and simple screening method for the assessment of organophosphorus pesticides residues in wine and fruit juices. *Food Chemistry* 86(2): 269-274.

Eingelangt am 19. März 2018