RESOLUTION OIV-OENO 662H-2022

METHODE ZUR BESTIMMUNG DES ISOTOPENVERHÄLTNISSES $^{18}O/^{16}O$ VON WASSER IN TRAUBENSAFT

Typ IV-Methode

DIE GENERALVERSAMMLUNG,

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

AUF VORSCHLAG der Unterkommission „Analysemethoden“,

IN DER ERWÄGUNG, dass die Bestimmung für Traubensaft anhand der Methode OIV-MA-AS12-12 der *Sammlung internationaler Analysemethoden für Wein und Most* erfolgen kann,

BESCHLIESST, die folgende Methode einzufügen:

Methode zur Bestimmung des Isotopenverhältnisses $^{18}O/^{16}O$ von Wasser in Traubensaft

1. ANWENDUNGSBEREICH

Die Methode ermöglicht die Bestimmung des Isotopenverhältnisses $^{18}O/^{16}O$ von Wasser in Traubensaft nach Äquilibrierung mit CO_2 unter Verwendung der Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie.

2. DEFINITIONEN

Erkennen des Zusatzes von Wasser zu Traubensaft anhand des Sauerstoffisotopenverhältnisses $^{18}O/^{16}O$

3. PRINZIP

Die Methode beruht auf der Äquilibrierung des Wassers in Traubensaft mit CO_2 gemäß folgender Isotopenaustauschreaktion:

Beglaubigte Ausführung 4 November 2022
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung
Pau ROCA

© OIV 2022

$C^{16}O_2 + H_2{}^{18}O \rightleftharpoons C^{16}O^{18}O + H_2{}^{16}O$

Nach der Äquilibrierung wird das Kohlendioxid in gasförmiger Phase zur Analyse mittels Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (IRMS) verwendet, wobei das Isotopenverhältnis $^{18}O/^{16}O$ an dem aus der Äquilibrierung resultierenden CO_2 bestimmt wird.

4. REAGEN ZIEN UND MATERIALIEN

Die Reagenzien und Verbrauchsmaterialien hängen von der verwendeten Methode ab. Die gewöhnlich verwendeten Systeme beruhen auf der Äquilibrierung von Wasser in Traubensaft mit CO_2.

Folgende Referenzmaterialien, Arbeitsstandards und Verbrauchsmaterialien können verwendet werden:

4.1. Referenzmaterialien

NAME	herausgegeben von	$\delta^{18}O$ bezogen auf V-SMOW
VSMOW2	NIST/IAEA	0 ‰
GISP	NIST	-24,78 ‰
SLAP	NIST/IAEA	-55,5 ‰

4.2. Arbeitsstandards

4.2.1. Zur Äquilibrierung verwendetes Kohlendioxid (für kontinuierliche Fließsysteme können auch Zylinder mit einer Mischung aus Helium und Kohlendioxid verwendet werden.)

4.2.2. Arbeitsstandards mit kalibrierten $\delta^{18}O$ VSMOW-Werten, die auf internationale Referenzmaterialien zurückgeführt werden können.

Beglaubigte Ausführung 4 November 2022
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung
Pau ROCA

© OIV 2022

4.3. Verbrauchsmaterialien

- Helium für die Analyse (CAS 07440-59-7)
- Kohlendioxid für die Analyse verwendet als Referenzgas (CAS 00124-38-9)

5. GERÄTE

Geräte und Schnittstellen sind methodenabhängig und können wie folgt verwendet werden.

5.1. Isotopenverhältnis-Massenspektrometer (IRMS)

Isotopenverhältnis-Massenspektrometer (IRMS) für die Bestimmung des relativen Gehalts von ^{18}O in natürlich vorkommendem CO_2 mit einer internen Genauigkeit von mindestens 0,05 ‰ ausgedrückt als relativer Wert.
Das bei der Messung der Isotopenverhältnisse verwendete Massenspektrometer ist in der Regel mit einem Dreifachkollektor zur simultanen Messung der Intensitäten von mz = 44, 45 und 46 ausgestattet.

5.2. Geräte und Materialien

Die verwendeten Ausrüstungen und Materialien müssen den genannten Anforderungen hinsichtlich der verwendeten Methode/Geräte (gemäß den Herstellerangaben) entsprechen. Es können jedoch alle Geräte und Materialien mit ähnlichen Leistungsmerkmalen verwendet werden.

5.2.1. Fläschchen mit Septum, die für das verwendete System geeignet sind,

5.2.2. Volumenpipetten mit geeigneten Spitzen,

5.2.3. Temperaturüberwachtes System zur Ausführung der Äquilibrierung bei konstanter Temperatur, typischerweise innerhalb von ± 1 °C

5.2.4. Vakuumpumpe (falls für das verwendete System erforderlich),

5.2.5. Autosampler (falls für das verwendete System erforderlich),

Beglaubigte Ausführung 4 November 2022
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung
Pau ROCA

© OIV 2022

5.2.6. Spritzen zur Probenentnahme (falls für das verwendete System erforderlich),

5.2.7. GC-Säule zur Trennung des CO_2 von anderen Elementargasen (falls für das verwendete System erforderlich).

5.2.8. Vorrichtung zur Wasserentfernung (z. B. selektive permeable Membran)

6. PROBENVORBEREITUNG

Saftproben werden ebenso wie Referenzmaterialien ohne jegliche Vorbehandlung für die Analyse verwendet. Eine mögliche Fermentation muss durch Zusatz von Benzoesäure (oder ein anderes die Fermentation verhinderndes Mittel) verhindert werden oder es muss durch eine Membran (Porendurchmesser 0,22 µm) filtriert werden.

7. VERFAHREN

Die nachfolgende Beschreibung bezieht sich auf Verfahren, die im Regelfall zur Bestimmung des Isotopenverhältnisses $^{18}O/^{16}O$ mittels Äquilibrierung von Wasser mit einem CO_2-Arbeitsstandard und anschließender Messung durch IRMS verwendet werden. Diese Verfahren können an die Änderungen der vom Hersteller gelieferten Geräte und Instrumente angepasst werden, da verschiedene Arten von Äquilibrierungsvorrichtungen mit unterschiedlichen Betriebsbedingungen verfügbar sind. Die Einführung von Kohlendioxid in das IRMS kann entweder durch ein doppeltes Einlasssystem oder durch ein kontinuierliches Fließsystem erfolgen. Die technischen Systeme und die entsprechenden Betriebsbedingungen sind beispielhaft angeführt.

Anmerkung: Alle Angaben zu Volumen, Temperaturen, Drücken und Zeiten sind nur Richtwerte. Die entsprechenden Werte müssen den vom Hersteller zur Verfügung gestellten Spezifikationen entnommen und/oder experimentell bestimmt werden.

7.1. Manuelle Äquilibrierung

Ein definiertes Volumen der Probe/des Standards wird mittels einer Pipette in einen Kolben abgefüllt. Der Kolben wird dann fest am Verteiler befestigt.

Jeder Verteiler wird auf unter - 80°C abgekühlt, um die Proben tiefzukühlen (für Verteiler mit Kapillarrohren ist die Einfrierung nicht erforderlich). Anschließend wird das ganze System ausgepumpt.

Beglaubigte Ausführung 4 November 2022
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung
Pau ROCA

© OIV 2022

Nachdem ein stabiles Vakuum erreicht wurde, kann das als Arbeitsstandard dienende gasförmige CO_2 in die verschiedenen Kolben expandieren. Für den Äquilibrierungsvorgang wird jeder Verteiler 12 Stunden lang (über Nacht) in ein temperaturüberwachtes Wasserbad bei typischerweise 25°C (± 1°C) gestellt. Dabei ist es entscheidend, dass die Temperatur des Wasserbads konstant und homogen bleibt.

Nach Abschluss des Äquilibrierungsprozesses wird das resultierende CO_2 aus den Kolben auf die Probenseite unter dem doppelten Einlasssystems überführt. Die Messungen werden durch mehrfachen Vergleich der auf der Probenseite und auf der Standardseite (Standard CO_2-Referenzgas) des doppelten Einlasssystems enthaltenen CO_2-Anteile durchgeführt.

Dies wird solange wiederholt, bis die letzte Probe der Reihe gemessen wurde.

7.2. Verwendung eines automatischen Äquilibrierungsgeräts

Ein definiertes Volumen der Probe/des Standards wird mittels einer Pipette in einen Kolben abgefüllt. Die Probenfläschchen werden im Äquilibrierungssystem angebracht und auf unter - 80°C abgekühlt, um die Proben tiefzukühlen (für Verteiler mit Kapillarrohren ist die Einfrierung nicht erforderlich). Anschließend wird das ganze System ausgepumpt.

Nachdem ein stabiles Vakuum erreicht wurde, kann das als Arbeitsstandard dienende gasförmige CO_2 in die verschiedenen Kolben expandieren. Ein Gleichgewicht wird typischerweise nach einem Zeitraum von 5 Stunden bei einer Temperatur von 22 ± 1°C und leichtem Schütteln (falls verfügbar) erreicht. Da die Äquilibrierungsdauer von verschiedenen Parametern (z.B. der Geometrie der Fläschchen, der Temperatur, der angewandten Schüttelbewegung...) abhängt, sollte die minimale Äquilibrierungszeit experimentell bestimmt werden.

Nach Abschluss des Äquilibrierungsprozesses wird das resultierende CO_2 aus den Kolben auf die Probenseite des doppelten Einlasssystems überführt. Die Messungen werden durch mehrfachen Vergleich der auf der Probenseite und auf der Standardseite (Standard CO_2-Referenzgas) des doppelten Einlasssystems enthaltenen CO_2-Anteile durchgeführt.

Dies wird solange wiederholt, bis die letzte Probe der Reihe gemessen wurde.

7.3. Manuelle Vorbereitung, automatische Äquilibrierung und Analysen mit doppeltem Einlasssystem

Ein definiertes Volumen der Probe/des Standards (z.B. 200 µL) wird mittels einer

Beglaubigte Ausführung 4 November 2022
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung
Pau ROCA

© OIV 2022

Pipette in einen Kolben abgefüllt. Die offenen Kolben werden dann in eine geschlossene, für die Äquilibrierung mit CO_2 abgefüllte Kammer gegeben (4.2.1). Nach mehrfacher Entlüftung zur Beseitigung aller Luftspuren werden die Kolben geschlossen und auf die Thermostatscheibe des Probenwechslers gestellt. Die Äquilibrierung erfolgt nach mindestens 8 Stunden bei 40°C.

Nach Abschluss des Äquilibrierungsprozesses wird das resultierende CO_2 getrocknet und aus den Kolben auf die Probenseite des doppelten Einlasssystems überführt. Die Messungen werden durch mehrfachen Vergleich der auf der Probenseite und auf der Standardseite (Standard CO_2-Referenzgas) des doppelten Einlasssystems enthaltenen CO_2-Anteile durchgeführt.

Dies wird solange wiederholt, bis die letzte Probe der Reihe gemessen wurde.

7.4. Verwendung eines automatischen Äquilibrierungsgeräts gekoppelt mit einem Durchflusssystem

Ein definiertes Volumen der Probe/des Standards wird mittels einer Pipette in einen Kolben abgefüllt. Die Probenfläschchen werden auf den temperaturüberwachten Boden gesetzt.

Mithilfe einer Gasspritze werden die Fläschchen mit einer Mischung aus He und CO_2 gespült. Das CO_2 bleibt zur Äquilibrierung im Kopfbereich der Fläschchen.

Die Temperatur und die Äquilibrierungszeit sollten vom Hersteller angegeben oder experimentell festgelegt werden.

Ein Gleichgewicht wird normalerweise nach einem Zeitraum von mindestens 18 Stunden bei einer Temperatur von 25 ± 1°C erreicht.

Nach Abschluss des Äquilibrierungsprozesses wird das resultierende CO_2 über das Durchlaufsystem in die Ionenquelle des Massenspektrometers überführt. Das CO_2-Referenzgas wird ebenfalls über das Durchlaufsystem in das IRMS eingeführt. Die Messung wird gemäß einem speziellen, je nach Art des Geräts unterschiedlichen, Protokoll ausgeführt.

8. BERECHNUNG

Die Stromintensitäten bei m/z = 44, 45, 46 werden für jede Probe und jedes analysierte Referenzmaterialaufgezeichnet. Die Isotopenverhältnisse $^{18}O/^{16}O$ werden mittels Computer und der Software des IRMS-Geräts berechnet. In der Praxis werden die Isotopenverhältnisse $^{18}O/^{16}O$ an einem zuvor an V-SMOW kalibrierten

Beglaubigte Ausführung 4 November 2022
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung
Pau ROCA

© OIV 2022

Arbeitsstandard gemessen. Während der Online-Messungen können aufgrund von Änderungen der Messbedingungen leichte Abweichungen auftreten. In diesem Fall müssen die □^{18}O-Werte der Proben gemäß der Differenz zwischen dem für den Arbeitsstandard gemessenen □ ^{18}O-Wert und dessen Konsenswert, der zuvor an V-SMOW kalibriert wurde, korrigiert werden. Zwischen zwei Messungen des Arbeitsstandards kann die Messabweichung und damit die an den Messergebnissen der Proben durchzuführende Korrektur als linear angenommen werden. Der Arbeitsstandard ist zu Beginn und am Ende jeder Messreihe zu bestimmen. Danach kann mittels einer linearen Interpolation zwischen zwei Werten (die Differenz zwischen dem Konsenswert des Arbeitsstandards und den Messungen der erzielten Werte) die Berichtigung für jede Probe berechnet werden.

$$\delta^{18}O_{V-SMOW} = \left[\frac{(\frac{^{18}O}{^{16}O})_{sample} - (\frac{^{18}O}{^{16}O})_{V-SMOW}}{(\frac{^{18}O}{^{16}O})_{V-SMOW}}\right] \times 1000[\%]$$

Der normalisierte □^{18}O-Wert über der V-SMOW/SLAP-Skala wird anhand folgender Gleichung berechnet:

$$\delta^{18}O_{V-SMOW/SLAP} = \left[\frac{\delta^{18}O_{échantillon} - \delta^{18}O_{V-SMOW}}{\delta^{18}O_{V-SMOW} - \delta^{18}O_{SLAP}}\right] \times 55{,}5[\%]$$

9. Eigenschaften der Methode

Es wurde eine Validierungsstudie durchgeführt, um die Eignung der Methode für die betreffenden Matrices unter Berücksichtigung der Linearität, der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen und der Genauigkeit der Methode zu beurteilen. Der letztgenannte Parameter wurde anhand der Präzision und der Richtigkeit der Methode ermittelt.

9.1. Genauigkeit der Methode

Berücksichtigt wurden die Wiederholbarkeit und die laborinterne Reproduzierbarkeit. Die Werte dieser Parameter sind in Tabelle 1 aufgeführt. Die Wiederholbarkeit wurde ausgedrückt als ‰ der Messungen, die unter gleichen Bedingungen und am gleichen

Beglaubigte Ausführung 4 November 2022
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung
Pau ROCA

© OIV 2022

Tag für den gesamten Traubensaft wiederholt wurden. Die Reproduzierbarkeit wurde ausgedrückt als Mittelwert von ‰ der Messungen derselben Traubensaftprobe, die von zwei Betreibern durchgeführt wurden.

9.2. Richtigkeit der Methode

Die Wiederfindungsrate wurde anhand einer Traubensaftprobe bestimmt, die mit Leitungswasser in 6 Konzentrationen (20 % - 99,5 %) dotiert wurde. Für jede Konzentration wurden 5 Bestimmungen durchgeführt. Die Richtigkeit wurde auch als Abweichung unter Verwendung eines Referenzmaterials und durch Berechnung des relativen Fehlers ausgedrückt.

Tabelle 1: Eigenschaften der Methode

	Korrelations-koeffizient (R2)	Wiederhol-barkeit (n=16) ‰	Vergleich-barkeit (n=7) ‰	Wieder-findung (%)± SD	Richtig-keit (RM) (‰)
	0,998	0,20	0,29	101± 2,16	0,17

10. LITERATUR

1. OIV - Methode zur Bestimmung des Isotopenverhältnisses $^{18}O/^{16}O$ von Wasser in Wein und Most, Methode OIV-MA-AS12-312.

Beglaubigte Ausführung 4 November 2022
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung
Pau ROCA

© OIV 2022