RESOLUTION OIV-OENO 665-2022

BESTIMMUNG VON SÜSSUNGSMITTELN IN WEISSWEIN UND GETRÄNKEN AUF DER BASIS VON WEISSWEIN DURCH HOCHLEISTUNGSFLÜSSIGKEITSCHROMATOGRAPHIE GEKOPPELT MIT EINEM DIODENARRAY-DETEKTOR (DAD) UND EINEM GELADENEN SPRÜHNEBELDETEKTOR (CAD)

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 Unterkommission „Analysemethoden“,

BESCHLIESST, Anhang A der *Sammlung internationaler Analysemethoden für Wein und Most* durch folgende Methode zu ergänzen:

Bestimmung von Süßungsmitteln in Weißwein und Getränken auf der Basis von Weißwein durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie gekoppelt mit einem Diodenarray-Detektor (DAD) und einem geladenen Sprühnebeldetektor (CAD)

Typ IV-Methode

1. Anwendungsgebiet

Die Methode dient der Bestimmung von fünf künstlichen Süßungsmitteln (Acesulfam-K, Aspartam, Saccharin, Natriumcyclamat, Sucralose) in Weißweinen und weinhaltigen Getränken in Konzentrationen, die für Saccharin bis zu 50 mg/L, für Acesulfam-K bis zu 125 mg/l und für Sucralose, Natriumcyclamat und Aspartam bis zu 250 mg/L betragen können.

Bei höheren Konzentrationen ist eine Verdünnung der Probe vorzunehmen.

Hinweis: Das Vorhandensein von Anthocyanen behindert die Bestimmung dieser Süßstoffe in Rosé- und Rotweinen.

2. Prinzip

Die fünf Süßstoffe werden durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie durch Trennung an einer C18-Umkehrphasensäule in Verbindung mit einem Diodenarray-Detektor und einem in Reihe angeordneten geladenen Sprühnebeldetektor (HPLC/UV-CAD) analysiert.

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

© OIV 2022

3. Reagenzien und Lösungen

3.1. Reagenzien:

3.1.1. Ultraeines Wasser gemäß EN ISO 3696 oder Wasser gleichwertiger Reinheit

3.1.2. Acesulfam K (Reinheit ≥ 99 %) (CAS-Nr. 55589-62-3)

3.1.3. Aspartam (Reinheit ≥ 98 %) (CAS-Nr. 22839-47-0)

3.1.4. Natriumcyclamat (Reinheit ≥ 98 %) (CAS-Nr. 139-05-9)

3.1.5. Saccharin, Natriumsalz-Dihydrat (Reinheit ≥ 98 %) (CAS-Nr. 6155-57-3)

3.1.6. Sucralose (Reinheit ≥ 98 %) (CAS-Nr. 56038-13-2)

3.1.7. Ameisensäure (Reinheit ≥ 98 %) (CAS-Nr. 64-18-6)

3.1.8. Ammoniumhydrogencarbonat (Reinheit ≥ 98 %) (CAS-Nr. 1066-33-7)

3.1.9. Methanol für HPCL (Reinheit ≥ 99,9 %) (CAS-Nr. 67-56-1)

3.1.10. Aceton für HPLC (Reinheit ≥ 99,8 %) (CAS-Nr. 67-64-1)

3.2. Herstellung der Pufferlösung

Eine Pufferlösung aus Ammoniumhydrogencarbonat (3.1.8) von 0,4 g/L Wasser (3.1.1) herstellen und den pH-Wert mit Ameisensäure (3.1.7) auf 4,6 einstellen.
Diese Lösung kann bei Umgebungstemperatur einen Monat lang aufbewahrt werden.

4. Geräte

4.1. Übliches Labormaterial

4.2. pH-Meter

4.3. Rührer

© OIV 2022

4.4. Ultraschallbad

4.5. Analysewaage mit einer Messgenauigkeit von ± 0,1 mg

4.6. Messkolben, Klasse A

4.7. RC Spritzenfilter, Porengröße 0,45 µm, z.B. regenerierte Cellulose

4.8. C18-Säule für HPLC (Länge 15 cm, Innendurchmesser 4,6 mm, 5 µm)

4.9. Chromatographiesystem bestehend aus:

- einem Pumpsystem mit mindestens 3 Kanälen
- einem thermostatischen Probenwechsler
- einem Säulenofen
- einem Diodenarray-Detektor oder UV/Vis-Detektor
- einem geladenen Sprühnebeldetektor (CAD)
- einem System zur Erfassung, Integration und Berechnung der Daten

5. Durchführung

5.1. Vorbereitung der Proben

- Proben vor der Abfüllung in Fläschchen durch Spritzenfilter filtrieren,
- bei zu hoher Konzentration der Probe eine Verdünnung mit der Pufferlösung vornehmen, so dass die Konzentration im vorgegebenen Bereich liegt.

5.2. Herstellung der Standardlösungen

5.2.1. Herstellung der Stammlösung N3 (nur als Beispiel)

In einen 100 mL-Messkolben einwiegen:

© OIV 2022

- 12,5 mg Acesulfam K (3.1.2)
- 25 mg Aspartam (3.1.3)
- 25 mg Natriumcyclamat (3.1.4)
- 5 mg Saccharin (3.1.5)
- 25 mg Sucralose (3.1.6)

In ca. 20 mL Wasser/Methanol (1:1) lösen und mit der Pufferlösung zur Marke auffüllen. Falls notwendig, Ultraschallbehandlung vornehmen.

Die N3-Lösung kann zwischen 2 °C und 8 °C 6 Monate aufbewahrt werden.

5.2.2. Herstellung der Arbeitslösungen N2 und N1

Anhand der N3-Lösung werden Lösungen mit zwei weiteren Konzentrationen hergestellt:

N2: Verdünnung der N3-Lösung im Verhältnis 1:2. Es werden z.B. 10 mL N3 in einen 20 mL-Messkolben gegeben und mit Pufferlösung zur Marke aufgefüllt.

N1: Verdünnung der N3-Lösung im Verhältnis 2:25. Es werden z.B. 2 mL N3 in einen 25 mL-Messkolben gegeben und mit Pufferlösung zur Marke aufgefüllt.

Die Standardlösungen durch Spritzenfilter filtrieren und die Fläschchen in den Probenwechsler stellen.

Übersicht über die Standardlösungen (als Beispiel):

Süßungs-mittel	*Stammlösung (N3)*			*Arbeitslösung (N2)*			*Arbeitslösung (N1)*		
	Ein-waage (mg)	Volumen Mess-kolben	Konzentration in mg/L	Entnahme-menge N3	Volumen Mess-kolben	Konzentration in mg/L	Entnahme-menge N3	Volumen Mess-kolben	Konzentration in mg/L
Acesulfam K	12,5	100 mL	125	10mL	20mL	62,5	2mL	25mL	10
Aspartam	25		250			125			20
Cyclamat Na	25		250			125			20
Saccharin	5		50			25			4
Sucralose	25		250			125			20

5.3. Chromatographiebedingungen

Die Bedingungen, die zu den im Anhang angeführten Leistungen geführt haben, sind beispielhaft aufgeführt:

- Temperatur Säulenofen: 30°C

© OIV 2022

- Probenwechsler: 20°C
- Zusammensetzung der mobilen Phase (Reagenzien in HPLC-Qualität):
    - Phase A: 72 % Methanol/25 % Puffer/3 % Aceton
    - Phase B: 12 % Methanol/88 % Puffer
- Wellenlänge UV-Detektion: 210 nm
- Durchfluss: 1 mL/min
- CAD-Parameter:
    - Filter: 3,6
    - Datenerfassung: 10 Hz
    - Temperatur: hoch (50 °C)
    - Potenzfunktion: von 0 bis 13 min: 1,50; von 13 bis 40 min: 1,48

Anzuwendender Elutionsgradient:

Zeit (min)	Prozent von A	Prozent von B
0	0 %	100 %
4	0%	100 %
11	53 %	47 %
18,5	82 %	18 %
25	82 %	18 %
27	100 %	0 %
31	100 %	0 %
32	0 %	100 %
40	0 %	100 %

© OIV 2022

Die Temperatur der Säule, des CAD und des DAD werden mit der mobilen Phase B stabilisiert.

6. Berechnung

- Die Ergebnisse werden durch externe Kalibrierung anhand der Peakfläche der einzelnen Süßstoffe berechnet, in mg/l angegeben und wie folgt berechnet:

$$Konzentration\ Probe\ (mg/L) = (\frac{A_e - Int}{P}) \times Verdünnung$$

Hierbei sind A_e die Peakfläche der Probe, Int die Ordinate am Ursprung der Kalibrierkurve und P die Steigung der Kalibrierkurve.

7. Angabe der Ergebnisse

Für Gehalte < 10 mg/L können die Ergebnisse in mg/L mit einer signifikanten Nachkommastelle angegeben werden.

Für Gehalte ≥ 10 mg/L können die Ergebnisse in mg/L ohne Dezimalstelle angegeben werden.

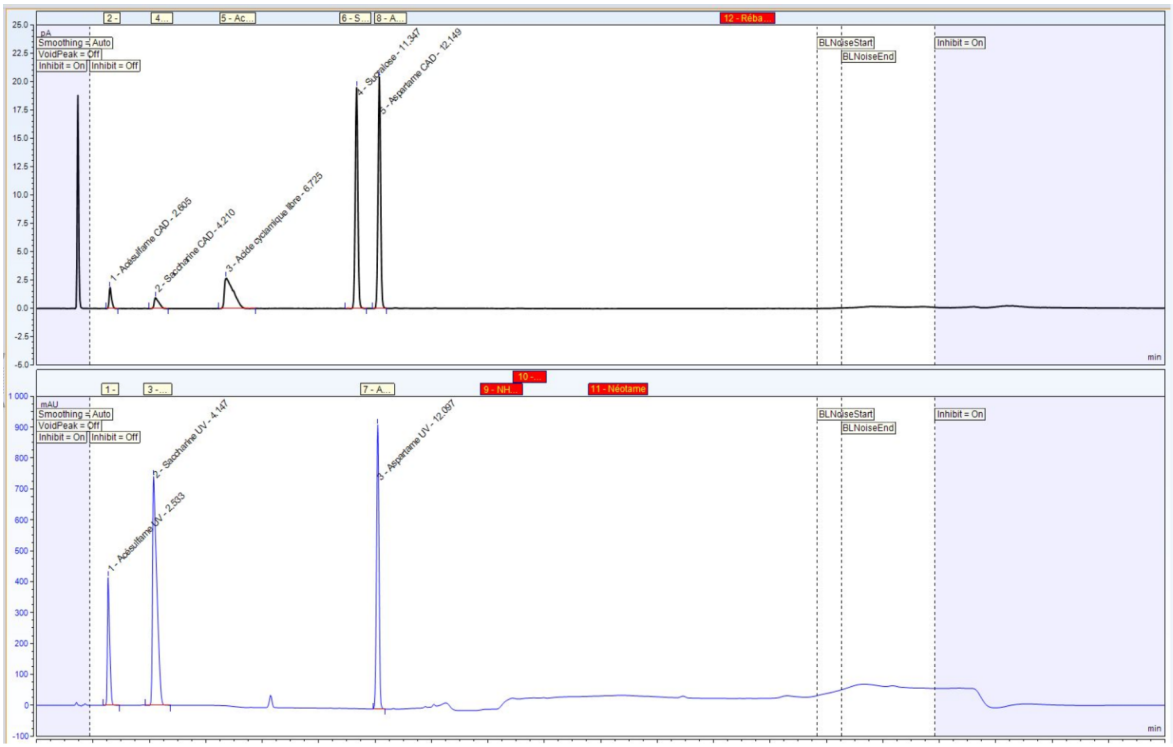
8. Literatur

1. Internationale Organisation für Rebe und Wein (OIV), *Sammlung internationaler Analysemethoden für Wein und Most,* Band 1 und 2
2. NF EN 15911: Gleichzeitige Bestimmung von neun Süßungsmitteln mittels Hochleistungs-Flüssigchromatographie und Geladener Sprühnebel-Detektion in Getränken und Obstkonserven
3. ISO 3696: Wasser für analytische Zwecke – Anforderungen und Prüfungen
4. ISO 11352: Abschätzung der Wasserbeschaffenheit beruhend auf Validierungs- und Kontrolldaten

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

© OIV 2022

Anhang 1: Beispiel für ein Chromatogramm einer Standardlösung des Konzentrationsniveaus 3



Anhang 2: Beispiel für eine interne Validierung

Für die Methode wurde eine Leistungsbewertung und eine Validierungsstudie für die Matrix Weißwein und weißweinhaltige Getränke durchgeführt.

Die sich daraus ergebenden Eigenschaften der Methode sind in nachstehender Tabelle zusammengefasst:

Süßungsmittel	Wiederhol-barkeit in % (r %)	Laborinterne Vergleichbarkeit in % (R %)	Nachweisgrenze mg/L	Bestimmungs-grenze mg/L	Linearitäts-bereich mg/L
Acesulfam K	2,5	8,5	2	5	5-125
Saccharin	1,7	6,8	1	2	2-50

© OIV 2022

Aspartam	1,9	8,7	4	10	10-250
Cyclamat Na	5,5	12,8	4	10	10-250
Sucralose	6,6	12,9	4	10	10-250

Die Bestimmungsgrenze entspricht dem Niveau 1, dem ersten Punkt des Kalibrierbereichs.

Die Nachweisgrenze entspricht 1/3 der Bestimmungsgrenze.

Die Linearität wurde durch Analyse von 5 Konzentrationsstufen für jeden Süßstoff mit 5 Wiederholungen pro Stufe an verschiedenen Tagen verifiziert.

Die Wiederholbarkeit und Reproduzierbarkeit wurden durch Analyse jedes Süßungsmittels in jedem Matrixtyp an 5 verschiedenen Tagen mit jeweils 2 Wiederholungen bei 3 Konzentrationsniveaus ermittelt, die im Linearitätsbereich des Verfahrens ausgewählt wurden.

© OIV 2022