



RESOLUTION OIV-OENO 479-2017

BESTIMMUNG DER $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -ISOTOPENVERHÄLTNISSE VON GLUCOSE, FRUCTOSE, GLYCERIN UND ETHANOL IN ERZEUGNISSEN WEINBAULICHEN URSPRUNGS MITTELS HOCHLEISTUNGS-FLÜSSIGCHROMATOGRAPHIE GEKOPPELT MIT ISOTOPENVERHÄLTNIS-MASSENSPEKTROMETRIE

DIE GENERALVERSAMMLUNG,

gestützt auf Artikel 2 Absatz 2 iv des Gründungsabkommens der Internationalen Organisation für Rebe und Wein,

auf Vorschlag der Unterkommission „Analysemethoden“,

BESCHLIESST auf Vorschlag der Kommission II „Önologie“, die „*Sammlung internationaler Analysemethoden für Wein und Most*“ für Glucose, Fructose und Glycerin durch folgende Typ II-Methode und für Ethanol durch folgende Typ III-Methode zu ergänzen:

TITEL	Methodentyp
BESTIMMUNG DER $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -ISOTOPENVERHÄLTNISSE VON GLUCOSE, FRUCTOSE, GLYCERIN UND ETHANOL IN ERZEUGNISSEN WEINBAULICHEN URSPRUNGS MITTELS HOCHLEISTUNGS-FLÜSSIGCHROMATOGRAPHIE GEKOPPELT MIT ISOTOPENVERHÄLTNIS-MASSENSPEKTROMETRIE	II und III

1. Anwendungsgebiet

Vorliegende Methode gilt für Erzeugnisse weinbaulichen Ursprungs.

Es handelt sich um:

eine Typ II-Methode für Glucose, Fructose und Glycerin und

eine Typ III-Methode für Ethanol.

2. Prinzip

Die Proben werden nach Verdünnung und ggf. Filtration in das HPLC-Gerät injiziert. Das $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenverhältnis der Verbindungen wird nach ihrer Oxidation an einem Interface durch

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

Jean-Marie AURAND

Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie bestimmt. Das mit dem Akronym „co“ bezeichnete Interface ermöglicht eine chemische Oxydation der organischen Stoffe zu CO₂. Durch HPLC-co-IRMS-Kopplung kann somit das Isotopenverhältnis folgender Stoffe gleichzeitig bestimmt werden: Glucose, Fructose, Glycerin und Ethanol.

3. Chemikalien

3.1 Reines Wasser mit einer Resistivität von $\geq 18 \text{ cm M}\Omega$, HPLC-Qualität

3.2 Ammoniumpersulfat – Analysequalität – [CAS Nr. 7727-54-0]

3.3 Orthophosphorsäure – (Konzentration 85 %), Analysequalität – [CAS Nr. 7664-38-2]

3.4 Helium für die Analyse als Trägergas (CAS Nr. 07440-59-7)

3.5 Referenzgas: CO₂, Kohlendioxid für die Analyse als sekundäres Referenzgas (CA-Nr. 00124-38-9)

3.6 Internationale Standards

4. Geräte

4.1 Übliche Labormaterialien

4.2 Hochleistungs-Flüssigkeitschromatograph

4.3 Interface zur Oxidation eluierter Verbindungen

4.4 Isotopenverhältnis-Massenspektrometer

5. Probenanalyse

5.1 Vorbereitung der Proben

Je nach Zucker-, Glycerin- und Ethanolgehalt sind die Proben vorab mit Wasser auf eine Konzentration zu verdünnen (3.1), sodass sie unter den experimentellen Bedingungen festgestellt werden kann. Je

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

Jean-Marie AURAND

nach Konzentration der Verbindungen sind zwei Messungen mit verschiedenen Verdünnungen erforderlich.

5.2 Analytische Bedingungen, als Beispiel

Gesamtdauer der Analyse: 20 Minuten

Richtwerte: Die Verdünnung von Traubensäften und Weinen beträgt 1: 200 und von konzentrierten Mosten 1: 500.

HPLC:

Säule: Kohlenhydratsäule (Beispiel: Carbohydrate column 700 CH, HyperRez XP Carbohydrate H⁺)

Einspritzvolumen: 25 µL

Mobile Phase: Wasser (3.1)

Flussrate: 0,4 ml/min

Säulentemperatur: 80 °C

Fließmittel Interface:

Lösung aus Ammoniumpersulfat (3.2) (15 Massenprozent) und Orthophosphorsäure (2,5 Volumenprozent)

Flussrate der peristaltischen Pumpe: 0.6 mL/min

Temperatur: 93 °C

Flussrate Helium als Träger: 15 mL/min

Flussrate Helium zur Trocknung: 50 mL/min

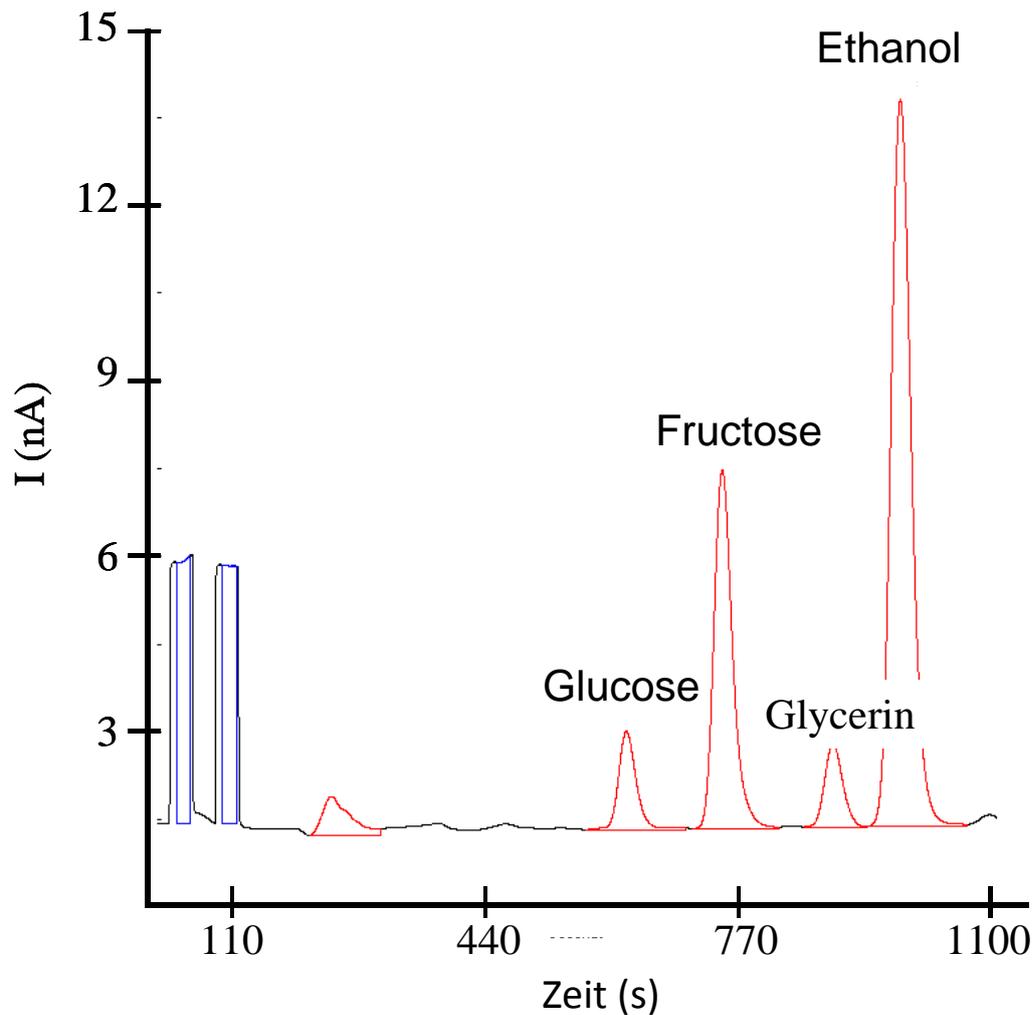
*Beglaubigte Ausführung
Sofia, den 2. Juni 2017
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung*

Jean-Marie AURAND

IRMS:

Stromstärke an der Elektronenfalle: 300 μA

5.3 Beispiel eines Chromatogramms



Chromatogramm eines süßen Weins – Analyse mittels HPCL-IRMS-Kopplung

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

Jean-Marie AURAND

6. Bestimmung der Isotopenverhältnisse

Das Referenzgas CO₂ wird anhand internationaler handelsüblicher Standards kalibriert. Die Isotopenverhältnisse werden in δ ‰ im Verhältnis zu Pee Dee Belemnite (PDB) ausgedrückt und sind wie folgt definiert:

$$\delta^{13}\text{C}_p (\text{‰}) = [(R_p / R_{\text{St}}) - 1] * 10^3$$

wobei:

P: Probe, St: Standard, R: ¹³C/¹²C-Isotopenverhältnis bedeuten.

7. Eigenschaften der Methode

Die Eigenschaften der Methode zur Messung der ¹³C-Isotopenverhältnisse von Glucose, Fructose, Glycerin und Ethanol wurden mittels HPLC-co-IRMS anhand der Ergebnisse eines Ringversuchs für vier Weinproben (trockener Wein, süßer Wein, Traubensaft und rektifiziertes Traubenmostkonzentrat) bestimmt. Die Ergebnisse für die einzelnen analysierten Verbindungen und Matrixtypen sind im Anhang dargelegt.

8. Literatur

1. Cabanero, Al.; Recio, JL.; Rupérez, M. (2008) Isotope ratio mass spectrometry coupled to liquid and gas chromatography for wine ethanol characterization. Rapid Commun. Mass Spectrom. 22: 3111-3118.
2. Cabanero, Al.; Recio, JL.; Rupérez, M. (2010) Simultaneous stable carbon isotopic analysis of wine glycerol and ethanol by liquid chromatography coupled to isotope ratio mass spectrometry. J. Agric. Food Chem. 58: 722-728.
3. Guyon, F.; Gaillard, L.; Salagoity, MH.; Médina, B. Intrinsic Ratios of Glucose, Fructose, Glycerol and Ethanol ¹³C/¹²C Isotopic Ratio Determined by HPLC-co-IRMS: Toward Determining Constants for Wine Authentication. Anal. Bioanal. Chem. (2011) 401: 1551-1558.

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

Jean-Marie AURAND

Anhang

Statistische Auswertung der Ergebnisse zur Bestimmung der Präzision (Wiederholbarkeit und Vergleichbarkeit) der Methode mittels HPLC -*co*-IRMS Kopplung

Liste der Laboratorien in alphabetischer Reihenfolge ihres Herkunftslands

Land	Labor
Belgien	IRMM
China	CNRIFI
Deutschland	INTERTEK
Deutschland	UNI DUE
Deutschland	ELEMENTAR
Deutschland	QSI
Deutschland	LVI
Frankreich	SCL-33
Italien	FLORAMO
Japan	AKITA Univ.
Spanien	MAGRAMA
Tschech. Rep.	SZPI

Antworten:

12 Laboratorien / 14 Antworten

Bearbeitung der Ergebnisse des Ringversuchs nach ISO 5725-2

Proben:

- 1 trockener Wein (Wein A)
- 1 süßer Wein (Wein B)
- 1 rektifiziertes Traubenmostkonzentrat (RTK)
- 1 Traubensaft

Analysebedingungen:

Jede Probe wurde für die Wiederholbarkeit doppelt und für die Vergleichbarkeit im Doppelblind-Versuch analysiert.

Angabe der Ergebnisse ‰ vs PDB

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

Jean-Marie AURAND

Präzision der Bestimmung von Glucose

Wiederholbarkeit und Vergleichbarkeit

	Wein B	RTK	Traubensaft
Zahl der Laboratorien	12	12	12
Zahl der Ergebnisse	14	13	14
Zahl der berücksichtigten Ergebnisse (Eliminierung von Ausreißern)	13	13	12
Mindestwert	-26,33	-25,04	-25,78
Höchstwert	-23,72	-23,74	-24,62
Mittelwert	-25,10	-24,24	-25,19
Varianz der Wiederholung	0,02	0,01	0,01
Standardabweichung der Wiederholbarkeit (S_r)	0,14	0,10	0,09
Wiederholgrenze (r ‰)	0,40	0,29	0,24
Varianz der Vergleichbarkeit	0,39	0,14	0,11
Standardabweichung der Vergleichbarkeit (S_R)	0,62	0,38	0,33
Vergleichsgrenze (R ‰)	1,77	1,06	0,94

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

Jean-Marie AURAND

Präzision der Bestimmung von Fructose

Wiederholbarkeit und Vergleichbarkeit

	Wein B	RTK	Traubensaft
Zahl der Laboratorien	12	11	12
Zahl der Ergebnisse	14	13	14
Zahl der berücksichtigten Ergebnisse (Eliminierung von Ausreißern)	13	13	13
Mindestwert	-25,56	-24,19	-25,33
Höchstwert	-24,12	-23,19	-23,98
Mittelwert	-24,87	-23,65	-24,56
Varianz der Wiederholung	0,02	0,03	0,02
Standardabweichung der Wiederholbarkeit (S_r)	0,14	0,16	0,14
Wiederholgrenze (r ‰)	0,40	0,46	0,39
Varianz der Vergleichbarkeit	0,15	0,10	0,18
Standardabweichung der Vergleichbarkeit (S_R)	0,39	0,32	0,42
Vergleichsgrenze (R ‰)	1,10	0,90	1,19

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

Jean-Marie AURAND

Präzision der Bestimmung von Glycerin

Wiederholbarkeit und Vergleichbarkeit

	Wein A	Wein B
Zahl der Laboratorien	12	12
Zahl der Ergebnisse	12	12
Zahl der berücksichtigten Ergebnisse (Eliminierung von Ausreißern)	11	11
Mindestwert	-32,91	-30,74
Höchstwert	-30,17	-28,27
Mittelwert	-31,75	-29,54
Varianz der Wiederholung	0,13	0,04
Standardabweichung der Wiederholbarkeit (S_r)	0,36	0,19
Wiederholgrenze (r ‰)	1,03	0,55
Varianz der Vergleichbarkeit	0,57	0,37
Standardabweichung der Vergleichbarkeit (S_R)	0,76	0,61
Vergleichsgrenze (R ‰)	2,14	1,72

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

Jean-Marie AURAND

Präzision der Bestimmung von Ethanol

Wiederholbarkeit und Vergleichbarkeit

	Wein A	Wein B
Zahl der Laboratorien	12	12
Zahl der Ergebnisse	11	12
Zahl der berücksichtigten Ergebnisse (Eliminierung von Ausreißern)	10	12
Mindestwert	-27,85	-27,60
Höchstwert	-26,50	-26,06
Mittelwert	-27,21	-26,82
Varianz der Wiederholung	0,03	0,03
Standardabweichung der Wiederholbarkeit (S_r)	0,16	0,17
Wiederholgrenze (r ‰)	0,47	0,47
Varianz der Vergleichbarkeit	0,16	0,23
Standardabweichung der Vergleichbarkeit (S_R)	0,40	0,47
Vergleichsgrenze (R ‰)	1,14	1,34

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

Jean-Marie AURAND