



## RESOLUTION OIV-OENO 589-2017

### METHODE ZUR BESTIMMUNG VON 1,2-PROPANDIOL UND 2,3-BUTANDIOL

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, die Sammlung internationaler Analysemethoden für Wein und Most durch folgende Methode zu ergänzen:

### **BESTIMMUNG VON 1,2-PROPANDIOL UND 2,3-BUTANDIOL**

#### **Typ IV-Methode**

#### **1. EINLEITUNG**

Nach Abschluss der Gärung werden messbare Mengen von 1,2-Propandiol und 2,3-Butandiol gebildet. In nicht vergorenen Mosten sind diese praktisch nicht vorhanden, in Weinen kommen sie innerhalb bestimmter Grenzen vor.

#### **2. PRINZIP**

Die Analyten und der interne Standard werden mit Diethylether extrahiert. Ihre Überführung in die organische Phase wird durch die Erhöhung der Ionenstärke in der Ausgangsmatrix Wein oder Most begünstigt. Daher wird zu den Proben eine große Menge an  $K_2CO_3$  gegeben (Aussalzen). Extrakte werden mittels GC-MS direkt auf einer polaren Säule analysiert. Die Bestimmung erfolgt anhand der Retentionszeit und des Massenspektrums.

#### **3. ANWENDUNGSBEREICH**

Die Methode dient der Bestimmung von 1,2-Propandiol und 2,3-Butandiol in Mosten und Weinen mit einem Zuckergehalt von mehr als 20 g/L bei Konzentrationen der Analyten von etwa 1 mg/L bis 500 mg/L.

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

*Jean-Marie AURAND*

#### 4. ABKÜRZUNGEN

C	Konzentration
GP	1,2-Propandiol
GC-MS	Gaschromatograph mit Massenspektrometer
H <sub>2</sub>	Wasserstoff
IS	Interner Standard 1,3-Butandiol
m/z	Masse/Ladungs-Verhältnis
RF	Responsefaktor
ML	Kalibrierebene der Matrix
SL	Stammlösung
KL	Kalibrierlösung
RZ	Retentionszeit
KL	Kalibrierlösungen , Gaschromatographie
GB	2,3-Butylenglykol
SW	Wein mit einem Zuckergehalt von > 20 g/l
M	Most

#### 5. REAGENZIEN

- 5.1. K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (CAS-Nr. 584-08-7)
- 5.2. Diethylether (CAS-Nr. 60-29-7)
- 5.3. Reines Ethanol (CAS-Nr. 64-17-5)
- 5.4. Fructose (CAS-Nr. 57-48-7)
- 5.5. Glucose (CAS-Nr. 50-99-7)
- 5.6. Glycerin (CAS-Nr. 56-81-5)
- 5.7. 1,2-Propandiol > 99 % (CAS-Nr. 57-55-6)
- 5.8. 2,3-Butandiol > 99 %, Isomerengemisch in (R,R) und (R,S) -Form (CAS-Nr. 513-85-9);  
Bestimmung der relativen Anteile der Formen (R,R) und (R,S) wie folgt:
  - 5.8.1. Eine Lösung (100 mg/L) gemäß den Anweisungen in den Ziffern 7.2.1 und 7.3 herstellen, indem das Isomerengemisch von 2,3-Butandiol (5.8) mit Wasser (5.10) anstatt mit der Modelllösung der Matrix verdünnt wird.
  - 5.8.2. Unter den in der Ziffer 7.6 angeführten Bedingungen in den GC einspritzen und den Anteil der Formen (R,R) und (R,S) anhand der Flächenprozentage der beiden Peaks berechnen.
  - 5.8.3. Die relativen Anteile der einzelnen Formen werden bei der Berechnung der RF<sub>i</sub> der Formen (R,R) und (R,S) verwendet (8.2.1).

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

*Jean-Marie AURAND*

- 5.9. 1,3-Butandiol, Reinheit > 99% (wasserfrei oder getrocknet) dem mit Natriumsulfat 24 Stunden Wasser entzogen wird (CAS-Nr. 107-88-0)
- 5.10. Reines Wasser für Laborzwecke nach EN ISO 3696
- 5.11. Stickstoff

## 6. GERÄTE

- 6.1. Typische Laborgeräte wie Laborgläser der Klasse A (1000 mL, 200 mL, 100 mL)
- 6.2. Analysewaage mit einer Wägegenauigkeit von  $\pm 0,0001$  g
- 6.3. Laborzentrifuge (mindestens 4000 UpM oder 2000 xg)  
Hinweis 1: mit „xg“ wird die Beschleunigung der zentrifugierten Partikel angegeben und mit UpM die Zahl der Umdrehungen des Zentrifugenrotors pro Minute. Zwischen den beiden Messeinheiten besteht folgender Zusammenhang:  $xg = 1,1178 \cdot 10^{-3} \cdot n^2 \cdot r$ . In dem Labor, das diese Methode entwickelt hat, ist  $r=0,115$  m
- 6.4. Gaschromatograph mit Massenspektrometriedetektor und Split/Splitlos-Injektor
- 6.5. Mikropipetten und Pasteurpipetten
- 6.6. Zentrifugenröhrchen (30 mL) mit Stopfen, etherresistent
- 6.7. Thermostat
- 6.8. Vortex-Laborschüttler (vertikal)

## 7. VORGEHENSWEISE

### Herstellung

#### 7.1. der Modelllösungen zur Simulation der Matrices

Um die Empfindlichkeit der quantitativen GC-MS-Bestimmung zu verbessern, sollten verschiedene Lösungen hergestellt werden, die die Matrix der betreffenden Probe möglichst gut simulieren, da die Nachweisempfindlichkeit von Glykolen je nach der Zusammensetzung der Matrix stark variiert.

Tabelle 1: Herstellung der Modelllösungen in 1000 ml-Messkolben:

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

*Jean-Marie AURAND*

	Modelllösungen	
	M	S
Fructose	100 g/L	50 g/L
Glucose	100 g/L	50 g/L
Glycerin	1 g/L	4 g/L
Reines Ethanol	1% v/v	5% v/v

## 7.2. Herstellung der Referenzlösungen

### 7.2.1.SL: GP und GB-Stammlösungen

Ca. 0,10 g 1,2-Propandiol (GP) und ca. 0,10 g ( $\pm$  0,05 g) 2,3-Butandiol (GB) auf 0,1 mg genau in einen 10 ml-Messkolben einwiegen und mit Wasser (5.10) zur Marke auffüllen, das Gewicht notieren, den Messkolben gut verschließen und mischen. Die Konzentration beträgt ca. 10 mg/ml in der GP-Lösung und 10 mg/ml in der GB-Lösung. Weicht die Menge an GP und GB um 0,1 g ab, werden die genauen Konzentrationen anhand des festgestellten Gewichts berechnet.

### 7.2.2.IS: IS-Lösung

Ca. 0,10 g 1,3-Butandiol (IS) auf 0,1 mg genau in einen 10 ml-Messkolben einwiegen und mit Wasser zur Marke auffüllen, das Gewicht notieren, den Messkolben gut verschließen und mischen. Die Konzentration dieser Lösung beträgt 10 mg/ml.

Weicht die Menge des IS um 0,1 g ab, wird die genaue Konzentration anhand des festgestellten Gewichts berechnet.

## 7.3. Herstellung der Kalibrierlösung

Die Kalibrierlösungen werden hergestellt, indem die SL-Lösung mit einer Modelllösung verdünnt wird, die in ihrer Zusammensetzung weitmöglichst der zu analysierenden Probe entspricht (für Süßwein die Modelllösung S, für Most die Modelllösung M).

Tabelle 2: Herstellung der Kalibrierlösungen (KL) in 100 ml-Messkolben:

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

*Jean-Marie AURAND*

	KL-M	KL-S
SL-Lösung	1 ml	1 ml
Auffüllung zur Marke (100 ml) mit:	Modelllösung M	Modelllösung S

Die Kalibrierlösungen (KL) enthalten die gewählte Matrix und die Konzentration von GP und GB beträgt 100 mg/L. Die Zugabe des internen Standards erfolgt vor der Extraktion gemäß der Ziffer 7.5.

#### 7.4. Vorbereitung der Proben

Ist die Konzentration des Analyten höher als die maximale Konzentration, die sich aus dem Anwendungsbereich ergibt, ist die Probe mit der Modelllösung (7.1) zu verdünnen. Vor Entnahme des aliquoten Teils von 10 ml der zu extrahierenden Probe wird die Probe geschüttelt.

Bei Mosten oder trüben Weinen wird der klare Wein nach Filtration verwendet.

Bei Schaum- und Perlweinen ist eine Entgasung gemäß der OIV-Methode „Gesamtsäuregehalt“ (OIV-MA-AS313-01 Typ I, Ziffer 5.1) vorzunehmen.

Alle Vorbereitungsarbeiten und Doppelversuch durchführen.

#### 7.5. Extraktion

##### 7.5.1. Zugabe des IS zur Probe

Für die Analyse von PG in einem 100 mL-Messkolben eine Lösung herstellen, die 5 ml IS-Lösung (7.2.2) enthält, und mit der zu analysierenden Probe bis zur Marke auffüllen, gut schütteln.

Die Lösung enthält 500 mg IS/L.

##### 7.5.2. Moste, Weine mit einem Zuckergehalt von > 20 g/l

###### 7.5.2.1. Zugabe von $K_2CO_3$

10 mL der zuvor hergestellten Lösung, die die zu analysierende Probe und die IS-Lösung enthält, in ein Zentrifugenröhrchen (6.6) geben; 10 g  $K_2CO_3$  (5.1) zugeben und abkühlen lassen. Für eine schnellere Abkühlung kann ein Thermostat (6.7) bei 20° C verwendet werden.

###### 7.5.2.2. Extraktion mit Ether

Nach Abkühlung 10 mL Diethylether (5.2) zugeben, das Gemisch mit einem Laborschüttler

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

*Jean-Marie AURAND*

des Typs Vortex schütteln und dann 10 Minuten bei ca. 3500 UpM (oder 1500 xg) zentrifugieren (6.3).

#### 7.5.3. *Reinigung für die GC/MS-Analyse*

Den Überstand mit Hilfe einer Pasteurpipette in einen Kolben überführen und im Stickstoffstrom trocknen. Den Rückstand mit ca. 1 mL Diethylether aufnehmen und in ein GC-Probenfläschchen geben. Diese wird dicht verschlossen und steht dann zur GC/MS-Analyse bereit.

#### 7.5.4. *Extraktion der Kalibrierlösungen (KL)*

Eine Extraktion ist auch bei der gewählten Kalibrierlösung vorzunehmen (7.3). Kalibrierlösungen sind genauso wie Proben zu behandeln und nach Zugabe des internen Standards (7.5.1) ist wie bei solchen zu verfahren.

### 7.6. GC-MS-Analyse

Die nachfolgend aufgeführten Parameter der GC/MS-Analyse dienen als Anhaltspunkt. Es können alternative Systeme verwendet werden, sofern diese angemessene chromatographische Leistungen erbringen und die Trennung der Peaks mit einer Auflösung von höher als 2 ermöglichen.

#### 7.6.1. *Typische GC-Bedingungen*

Säule: DB-WAX 60 m x 0,25 mm x 0,25 µm

Trägergas: He

Flussrate: 1,0 ml/min

Injektortemperatur: 250°C

Einspritzvolumen: 1 µL

Ionisierende Strahlung: 70 eV

Temperaturprogramm:

	Erhöhung (°C/min)	Temperatur (°C)	Tempo (min)
<b>Start</b>		50	8,00
<b>Rampe 1</b>	4,0	220	
<b>Rampe 2</b>		220	40

#### 7.6.2. *Besondere MS-Bedingungen*

Quelle: 230 °C

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

*Jean-Marie AURAND*

MS-Detektion: 150 °C scan 35.00 – 350.00 amu  
Startzeit: 10 min  
Die Erfassungszeit für jede Masse beträgt 250 µs  
Modalitäten der Erfassung: Full Scan

## 8. BEWERTUNG

### 8.1. Identifizierung

Die Identifizierung erfolgt durch den Vergleich der Retentionszeit der Standards und der Massenspektren mit der GC/MS-Bibliothek.

### 8.2. Berechnungen

Für die quantitative Bestimmung wird für den IS, für GP und für GB ein Masse/Ladungs-Verhältnis von 45 berücksichtigt.

#### 8.2.1. Bestimmung der Responsefaktoren

Die quantitative Bestimmung erfolgt anhand des Responsefaktors (RF), der durch die Analyse der Referenzlösung ermittelt wird:

$$RF_i = \frac{A_{SI}/C_{SI}}{A_{ST,i}/C_{ST,i}}$$

hierbei sind:

$A_{IS}$  die Peakfläche des internen Standards und  $C_{SI}$  seine Konzentration,

$A_{KL,i}$  die Peakfläche von GP und der isomeren Formen von GB in der Kalibrierlösung und  $C_{ST,i}$  seine Konzentration.

#### 8.2.2. Berechnung der Konzentrationen in den Proben

Nach Berechnung des RF, kann die Konzentration von GP und der isomeren Formen von GB in den Proben nach der folgenden Formel berechnet werden:

$$C_i = RF_i \cdot C_{KL} \cdot \frac{A_i}{A_{IS}}$$

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

*Jean-Marie AURAND*

hierbei sind:

$A_i$  die Peakfläche von GP oder des Isomers von GB in der Probe und  $C_i$  seine Konzentration.

### 8.3. Angabe der Ergebnisse

Die Ergebnisse werden in mg/L ohne Dezimalstellen angegeben.

2,3-Butylenglykol wird als Summe von 2,3-Butylenglykol (R,R) und 2,3-Butylenglykol (R,S) ausgedrückt.

## 9. LITERATUR

*Gas Chromatographic/Mass Spectrometric Determination of 3-Methoxy-1,2-Propanediol and Cyclic Diglycerols, By-Products of Technical Glycerol, in Wine: Interlaboratory Study.*

Carsten Fauhl, Reiner Wittkowski, Janice Lofthouse, Simon Hird, Paul Brereton, Giuseppe Versini, Michele Lees, Claude Guillou; JOURNAL OF AOAC INTERNATIONAL VOL. 87, NO. 5, 2004.

*Proposta di un metodo di preparazione del campione per la determinazione dei glicoli dei vini.* Di Stefano R., García Moruno E., Borsa D., VINI D'ITALIA, 4, 61-64 (1992).

*La determinazione del glicerolo, del 2,3-butandiolo e dei glicoli nei vini.* García Moruno E., Di Stefano R., VINI D'ITALIA, 5, 41-46 (1989).

*Glicoli naturalmente presenti nei vini.* Di Stefano R., Borsa D., García Moruno E., VINI D'ITALIA, 5, 39-44 (1988).

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

*Jean-Marie AURAND*

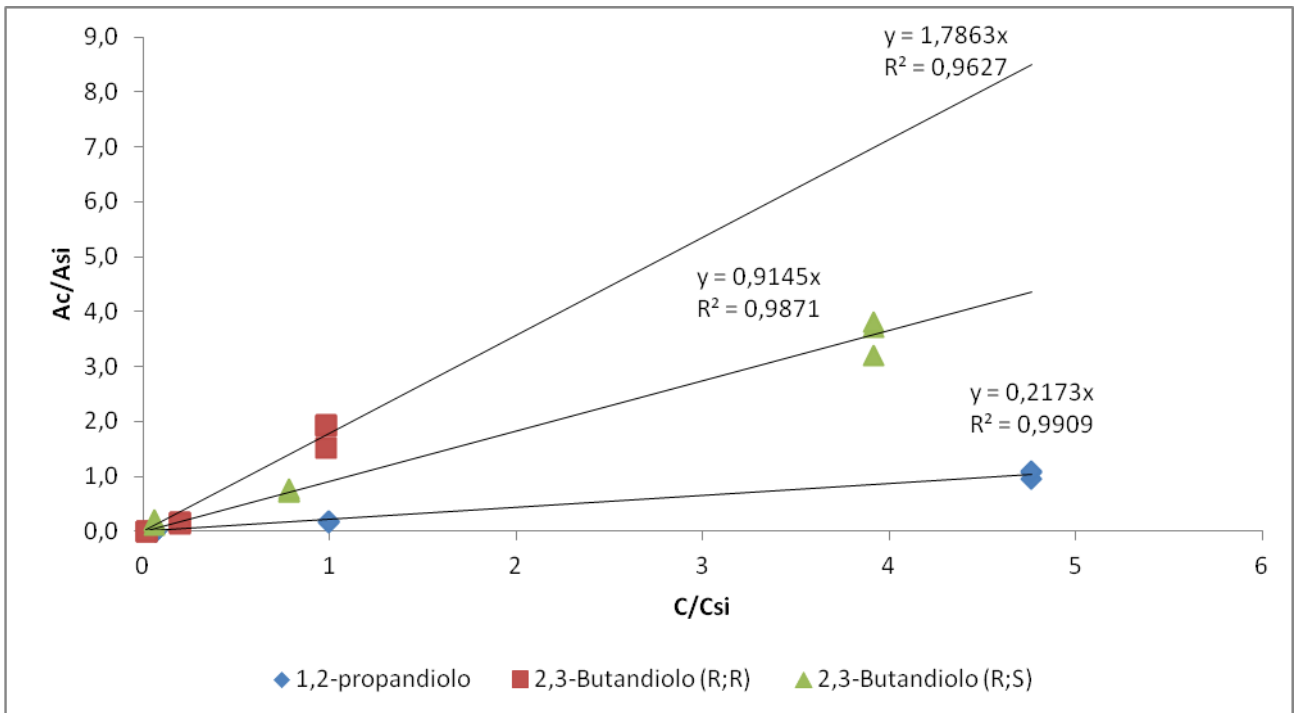


# ANHANG 1

## LEISTUNGSDATEN DER METHODE

### 1. Linearität

Prüfung der Linearität mit einer Zuckerlösung mit 200 g/l Zucker (100 g/l Glucose und 100 g/l Fructose). Die Analyten wurden in Konzentrationen von 10, 100 und 500 mg/l zugesetzt und der IS in einer Konzentration von ca. 100 mg/l. Es wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt.



Nachfolgend der mittlere Responsefaktor:

1,2-Propandiol  $RF = (C/C_{Si})/(A/A_{Si}) = 1/0,2173 = 4,60$

2,3-Butandiol (R,R)  $RF = (C/C_{Si})/(A/A_{Si}) = 1/1,7863 = 0,56$

2,3-Butandiol (R,S)  $RF = (C/C_{Si})/(A/A_{Si}) = 1/0,9145 = 1,09$

### 2. Wiederholgrenze

Die Wiederholgrenze wurde anhand von 2 Mostproben bestimmt.

Eine Mostprobe wurde als solche analysiert (Most Nr. 1), und bei der anderen Mostprobe wurden zum ersten Most 100 mg/l Standardlösung SL (Most Nr. 2) gegeben.

Die nachfolgende Tabelle bezieht sich auf 10 Parallelversuche. Die Wiederholgrenze (r) ist durch folgende Formel gegeben:  $r = 2.8 * S_r$ . ( $S_r$  = Standardabweichung der Wiederholgrenze, RSDr = relative Standardabweichung der Wiederholgrenze)

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

Jean-Marie AURAND

Verbindung	Most Nr. 1				Most Nr. 2)			
	Mittelwert (mg/l)	Sr (mg/l)	RSDr %	r (mg/l)	Mittelwert (mg/l)	Sr (mg/l)	RSDr %	r (mg/l)
1,2-Propandiol	1,5	0,5	36	1,5	107	9	9%	30
2,3-Butandiol (R,R)	3,2	1,6	52	4,6	30	3	9%	9,0
2,3-Butandiol (R,S)	5,4	1,7	33	4,9	104	11	10%	34

Bestimmung der Wiederholgrenze anhand der Horwitz-Gleichung und des Horrat-Werts (r):

#### Most Nr. 1

	Mittelwert (mg/l)	C·10 <sup>6</sup> (m/m)	PRSD(R)	R Horwitz	Horrat (r)	r min H	r max H
1,2-Propandiol	1,5	1,5	15	0,6	2,40	0,2	0,8
2,3-Butandiol (R,R)	3,2	3,2	13	1,2	3,87	0,3	1,6
2,3-Butandiol (R,S)	5,4	5,4	12	1,9	2,64	0,5	2,5

Die Wiederholgrenze „r“ liegt aufgrund der großen Schwankungen der Messungen bei niedrigen Konzentrationen, die nahe an der Bestimmungsgrenze liegen (siehe Ziffer 5 Anhang 1), nicht in dem durch die Horwitz-Gleichung vorgegebenen Akzeptanzbereich ( $r_{\min H} < r < r_{\max H}$ ).

#### Most Nr. 2

	Mittelwert (mg/l)	C·10 <sup>5</sup> (m/m)	PRSD(R)	R Horwitz	Horrat (r)	r min H	r max H
1,2-Propandiol	107	11	7,9	24	1,09	5,9	31,8
2,3-Butandiol (R,R)	30	3	9,5	8	0,98	2,0	10,7
2,3-Butandiol (R,S)	104	10	7,9	23	1,29	5,7	30,8

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

*Jean-Marie AURAND*

Die Wiederholgrenze „r“ liegt in dem durch die Horwitz-Gleichung vorgegebenen Akzeptanzbereich ( $r_{\min H} < r < r_{\max H}$ ).

### 3. Wiederfindung

Die Wiederfindung wurde bei Most Nr. 2 vor und nach der Zugabe der Referenzlösung SL ermittelt (siehe Ziffer 7.3).

Verbindung	Konz. im Most (mg/l)	Zugesetzte Konz. (mg/l)	Erwartete Konz. (mg/l)	Gemessene Konz. (mg/l)	Wiederfindung (%)
1,2-Propandiol	0,7	99,5	100,2	107,5	107
2,3-Butandiol (R,R)	12,6	21,7	34,3	29,9	87
2,3-Butandiol (R,S)	11,4	86,8	98,2	103,7	106
2,3-Butandiol (R,R) + (R,S)	24,0	108,5	132,5	133,6	101

Die Wiederfindung, die als Summe der beiden Formen ermittelt wurde, ist für 1,2-Propandiol und 2,3-Butandiol zufriedenstellend.

### 4. Auswirkung der Zuckermatrix auf die Responsefaktoren

Es wurden die RF in Zuckerlösungen (äquimolare Mengen an Glucose und Fructose) einer Konzentration von 200 g/l und 2 g/l Gesamtzucker verglichen.

	1,2-Propandiol		2,3-Butandiol (R,R)		2,3-Butandiol (R,S)	
Zucker	200 g/l	2 g/l	200 g/l	2 g/l	200 g/l	2 g/l
RF	4,60	5,90	0,55	0,56	1,08	1,09
ΔRF  %	22,0 %		1,8 %		0,9 %	

Der Matrixeffekt ist bei 1,2-Propandiol sehr ausgeprägt, bei 2,3-Butandiol ist er hingegen unerheblich.

### 5. Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die Nachweisgrenze (LD) und die Bestimmungsgrenze (LQ) hängen von den jeweiligen

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

*Jean-Marie AURAND*

Messbedingungen der chemischen Analyse ab und sind von den Anwendern der Methode festzulegen.

Die Nachweisgrenze (LD) und die Bestimmungsgrenze (LQ) wurden unter Verwendung der zuvor genannten Geräte und Bedingungen (Ziffer 8) und entsprechend den Anweisungen der Resolution OENO 7-2000 (OIV-MA-AS1-10) „Schätzung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen einer Analyseverfahren“ (siehe graphischer Ansatz Ziffer 4.2) ermittelt.

	1,2-Propandiol	2,3-Butandiol (R,R)	2,3-Butandiol (R,S)
LR (mg/l)	0,2	0,2	0,2
LQ (mg/l)	0,6	0,7	0,8

## ANHANG 2

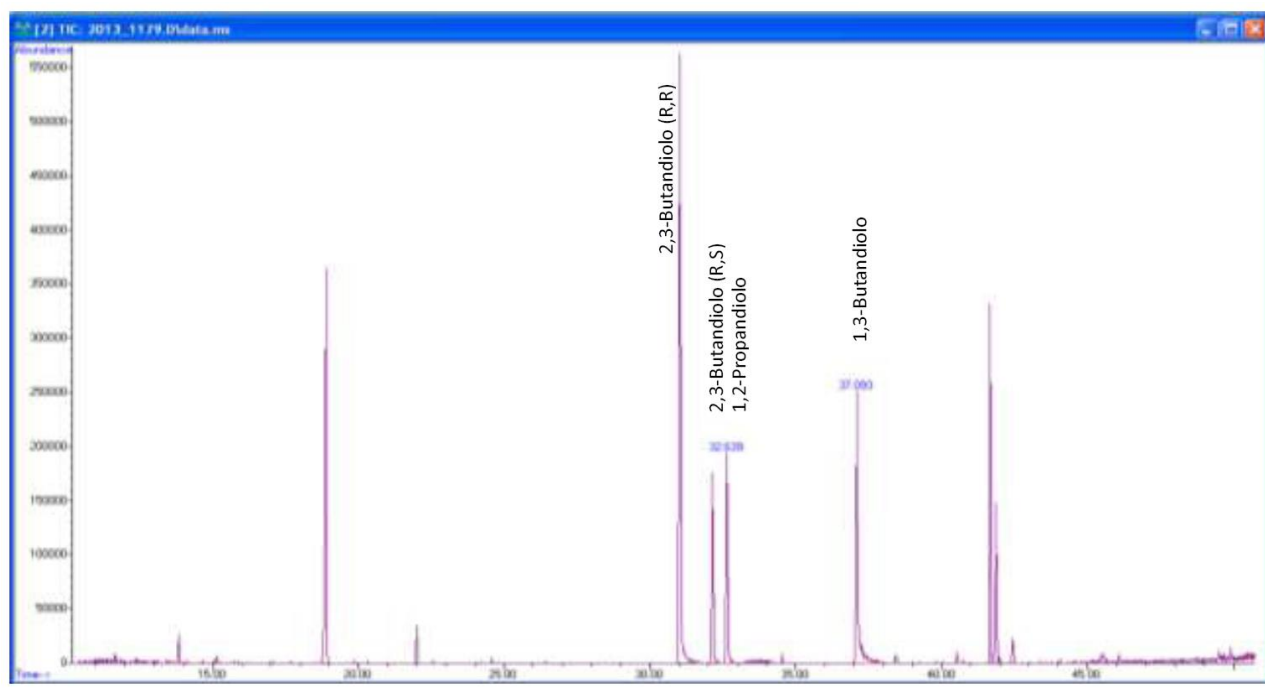


Abb. 1 Chromatogramm eines Weins

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

*Jean-Marie AURAND*