



RESOLUTION OIV-OENO 426-2011

BESTIMMUNG DER DEUTERIUMVERTEILUNG IN BEI DER GÄRUNG VON TRAUBENMOST, TRAUBENMOSTKONZENTRAT, REKTIFIZIERTEM TRAUBENMOSTKONZENTRAT UND WEIN ENTSTANDEMETHANOL MITTELS KERNRESONANZSPEKTROSKOPIE (SNIF-NMR)

Die GENERALVERSAMMLUNG,

UNTER BEZUGNAHME auf Artikel 2 Absatz 2 iv des Gründungsübereinkommens der Internationalen Organisation für Rebe und Wein vom 3. April 2001,

IN ANBETRACHT der Aktionen des Strategieplans 2009-2012 der OIV,

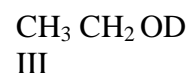
UNTER BERÜCKSICHTIGUNG der Arbeiten der Unterkommission Analysemethoden,

BESCHLIESST, die aktuelle Methode zur Bestimmung der Deuteriumverteilung in bei der Gärung von Traubenmost, Traubenmostkonzentrat, rektifiziertem Traubenmostkonzentrat und Wein entstandenem Ethanol mittels Kernresonanzspektroskopie (NMR), die im Sammelband der internationalen Methoden zur Analyse von Weinen und Traubenmosten veröffentlicht wurde, durch folgende Methode des Typs II zu ersetzen.

Bestimmung der Deuteriumverteilung in bei der Gärung von Traubenmost, Traubenmostkonzentrat, Rektifiziertem Traubenmostkonzentrat und Wein entstandenem Ethanol mittels Kernresonanzspektroskopie (SNIF-NMR¹)

1. Einleitung

Das in den Zuckern und im Wasser von Traubenmost enthaltene Deuterium findet sich nach der Gärung in den im Wein vorhandenen Molekülen I, II, III und IV neu verteilt wieder:



¹ Fractionnement Isotopique Naturel Spécifique étudié par Résonance Magnétique Nucléaire (Stellungsspezifische natürliche Isotopenfraktionierung, gemessen durch kernmagnetische Resonanzspektroskopie). Patent: Frankreich, 8122710; Europa, 824022099; USA, 854550082; Japan 57123249.

*Beglaubigte Ausführung
Porto, den 24. Juni 2011
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung*

Federico CASTELLUCCI

2. Gültigkeitsbereich

Die Methode ermöglicht die Messung der Isotopenverhältnisse (D/H) des Deuteriums in Weinethanol und in Ethanol, das bei der Gärung von Erzeugnissen des Weinbaus entstanden ist (Most, Mostkonzentrat, Rektifiziertes Traubenmostkonzentrat).

3. Definitionen

$(D/H)_I$: Isotopenverhältnis des Moleküls I

$(D/H)_{II}$: Isotopenverhältnis des Moleküls II

$(D/H)_W^Q$: Isotopenverhältnis des im Wein (oder in Gärungsprodukten) enthaltenen Wassers

$R = 2(D/H)_{II}/(D/H)_I$

R drückt die relative Deuteriumverteilung in den Molekülen I und II aus. R wird direkt an den Signalintensitäten h (Peakhöhe) gemessen und ergibt sich aus $= 3h_{II}/h_I$.

4. Prinzip

Die Bestimmung der oben definierten Parameter R, $(D/H)_I$ und $(D/H)_{II}$ erfolgt durch Deuterium-Kernresonanzspektroskopie an aus Wein oder aus den Gärungsprodukten von Most, Mostkonzentrat oder Rektifiziertem Traubenmostkonzentrat extrahiertem Ethanol unter definierten Bedingungen.

5. Reagenzien und Materialien

5.1 Reagenzien

5.1.1 Reagenzien zur Bestimmung von Wasser nach dem Karl-Fischer-Verfahren (sofern diese Methode zur Messung des Alkoholgehalts des Destillats herangezogen wird).

5.1.2 Hexafluorbenzol (C₆F₆) zur Stabilisierung der Feldfrequenz (Lock)

5.1.3 Trifluoressigsäure (TFA, CAS: 76-05-1) bzw. Trifluoressigsäure-anhydrid (TFAA, CAS: 407-25-0)

5.2 Referenzmaterial (erhältlich beim Institut für Referenzmaterialien und –messungen IRMM in Geel (B)):

5.2.1 Dicht verschlossene NMR-Röhrchen (CRM-123) zur Eichkontrolle der NMR-Geräte

5.2.2 Standard N,N-Tetramethylharnstoff (TMU); Standard-TMU mit kalibriertem Isotopenverhältnis D/H.

5.2.3 Weitere verfügbare zertifizierte Referenzmaterialien zur Kontrolle der einzelnen Stufen bei der Destillation und bei der Vorbereitung:

*Beglaubigte Ausführung
Porto, den 24. Juni 2011
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung*

Federico CASTELLUCCI

CRM		Parameter	Zertifizierter Wert	Unsicherheit
CRM-656	Ethanol aus Wein, 96 % Vol.			
		t^D (Ethanol) in % w/w	94,61	0,05
		$\delta^{13}C$ (Ethanol) in ‰ VPDB	-26,91	0,07
		(D/H) _I (Ethanol) in ppm	102,84	0,20
		(D/H) _{II} (Ethanol) in ppm	132,07	0,30
		R (Ethanol)	2,570	0,005
CRM-660	Wässrige Alkohollösung, 12 % Vol.			
		t^Q (Ethanol) in % Vol.	11,96	0,06
		$\delta^{13}C$ (Ethanol) in ‰ VPDB	-26,72	0,09
		(D/H) _I (Ethanol) in ppm	102,90	0,16
		(D/H) _{II} (Ethanol) in ppm	131,95	0,23
		R	2,567	0,005
		(D/H) _w (Wasser) in ppm	148,68	0,14

5.3 Geräte

5.3.1 NMR-Spektrometer, ausgestattet mit einem speziellen Deuteriumprobenkopf, der auf die charakteristische Frequenz ν_0 des Felds B_0 (z.B. für $B_0 = 7,05$ T, $\nu_0 = 46,05$ MHz und für $B_0 = 9,4$ T, $\nu_0 = 61,4$ MHz) abgestimmt ist sowie mit einem Entkopplungskanal (B2) und einem Kanal zur Stabilisierung der Feldfrequenz (Lock) bei der Fluorfrequenz. Das NMR-Gerät kann gegebenenfalls mit einem automatischen Probengeber und zusätzlicher Datenverarbeitungssoftware zur Bewertung der Spektren und zur Berechnung der Ergebnisse aufgerüstet werden. Die Leistungsfähigkeit des NMR-Spektrometers kann anhand von zertifizierten Referenzmaterialien (dicht verschlossene CRM 123-Röhrchen) überprüft werden.

5.3.2 NMR-Probenröhrchen, 10 mm

5.3.3 Destillationsapparat

Anmerkung: Es kann jede beliebige Methode zur Extraktion von Ethanol eingesetzt werden, sofern der im Wein enthaltene Alkohol ohne Isotopenfraktionierung gewonnen

*Beglaubigte Ausführung
Porto, den 24. Juni 2011
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung*

Federico CASTELLUCCI

werden kann. Die in Abbildung 1 gezeigte Drehbandkolonne nach Cadiot ist ein Beispiel für ein manuelles Destillationssystem, durch das 96 bis 98,5% des Ethanol im Wein ohne Isotopenfraktionierung extrahiert werden kann und ein Destillat mit einem Alkoholgehalt von 92 bis 93% in % w/w (95% vol.) gewonnen wird.

Ein derartiges System besteht aus folgenden Komponenten

- * Elektrischer Heizpilz, regelbar ,
- * 1l-Rundkolben mit Schliffstopfen,
- * Drehbandkolonne (Teflonspirale),
- * Erlenmeyerkolben mit Schliff und Schliffstopfen zum Auffangen des Destillats.

Automatische Destillationssysteme sind ebenfalls erhältlich.

Die Leistungsfähigkeit des Destillationssystems sollte sowohl im Hinblick auf die Ausbeute der Extraktion als auch auf die Genauigkeit der Isotopenbestimmung regelmäßig überprüft werden. Diese Kontrolle kann anhand einer Destillation von CRM-600 mit anschließender Messung durchgeführt werden.

5.3.4 Ferner werden folgende Verbrauchsmaterialien und folgendes gängiges Labormaterial benötigt:

- Mikropipette mit geeigneten Spitzen,
- Waage mit einer Genauigkeit von mindestens 0,1 mg
- Waage mit einer Genauigkeit von mindestens 0,1 g
- Einwegspritze für den Transfer von Flüssigkeiten,
- Kolben mit präziser Maßeinteilung (50 ml, 100 ml, 250 ml ...)
- Kolben mit luftdichtem Verschlusssystem und inertem Septum (zur Aufbewahrung der Aliquote von Weinen, Destillaten und Rückständen bis zur Messung)
- Geräte und Verbrauchsmaterialien gemäß der Spezifikation anderer in diesem Zusammenhang verwendeter Methoden.

Die in voranstehender Liste angeführten Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien sind beispielhaft und können durch andere Ausstattungen mit äquivalenten Leistungsmerkmalen ersetzt werden.

6. Probennahme (Vorbereitung der Proben)

6.1. Sofern nicht bekannt, Bestimmung des Alkoholgehalts (tv) des Weins oder des Gärungsprodukts mit einer Genauigkeit von mindestens 0,05 % Vol. (z.B. unter Verwendung der OIV-Methode MA-F-AS312-01-TALVOL).

6.2. Extraktion des Ethanol

Unter Verwendung eines geeigneten Messkolbens wird ein angemessenes Volumen von V ml einer homogenen Probe des Weins oder des Gärungsprodukts in den Rundkolben des Destillationsgeräts gegeben. Zum Auffangen des Destillats wird ein Erlenmeyerkolben mit Schliff vorgesehen. Das zu destillierende Produkt wird erwärmt, um eine konstante Rückflussrate am Kondensator zu erhalten. Es wird mit dem Auffangen des Destillats begonnen, sobald eine für das Ethanol-Wasser-Azeotrop typische stabile Dampftemperatur

*Beglaubigte Ausführung
Porto, den 24. Juni 2011
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung*

Federico CASTELLUCCI

(78°C) erreicht ist; bei Anstieg der Temperatur wird der Vorgang abgebrochen. Das Auffangen des Destillats sollte solange erfolgen, bis das Ethanol-Wasser-Azeotrop vollständig abdestilliert ist.

Bei Einsatz einer manuell betätigten Drehbandkolonne (Abbildung 1) kann folgendes Verfahren angewendet werden:

- Die siedende, dem Ethanol-Wasser-Azeotrop entsprechende Flüssigkeit wird aufgefangen. Bei Anstieg der Temperatur wird die Entnahme 5 Minuten lang unterbrochen. Sobald die Temperatur wieder auf 78°C abgesunken ist, wird die Entnahme wieder aufgenommen, bis die Dampftemperatur erneut ansteigt. Dieser Vorgang wird wiederholt, bis nach Unterbrechung der Entnahme nicht wieder ein Absinken der Temperatur auf 78°C erfolgt. Als Alternative können im Handel erhältliche Destillationssysteme verwendet werden.

Das Gewicht m^D des aufgefangenen Destillats wird mit einer Genauigkeit von mindestens 0,1 g gewogen.

Um eine Isotopenfraktionierung zu vermeiden, sollte das Destillat bis zum weiteren Gebrauch, also der Bestimmung des Alkoholgehalts (6.3.) und der Vorbereitung des NMR-Röhrchens (7.1) in einem dichten Fläschchen aufbewahrt werden, so dass eine Verdunstung vermieden wird.

Ein Aliquot von einigen ml der Rückstände wird zurückbehalten. Gegebenenfalls kann das Isotopenverhältnis $(D/H)_w^Q$ des Aliquots bestimmt werden.

6.3. Bestimmung des Alkoholgehalts des Destillats

Der Alkoholgehalt (%w/w) des Destillats muss mit einer Genauigkeit von mindestens 0,1 % bestimmt werden.

An einer Probe von ca. 0,5 ml Alkohol mit exakt bekannter Masse ρ g kann der Wassergehalt des Destillats (ρ' g) mit dem Karl-Fischer-Verfahren bestimmt werden. Der Alkoholgehalt des Destillats pro Masse wird wie folgt berechnet:

$$t_m^D \% w/w = 100 (1 - \rho') / \rho$$

Alternativ dazu kann der Alkoholgehalt durch Dichtemessung ermittelt werden, beispielsweise unter Verwendung eines elektronischen Densimeters.

6.4 Ausbeute der Destillation

Die Ausbeute der Destillation wird anhand folgender Formel abgeschätzt:

$$\text{Ausbeute der Destillation \%} = 100 t_m^D m^D / (V \cdot tv)$$

Aufgrund der Unsicherheit der einzelnen Ausdrücke und insbesondere der Unsicherheit von tv wird die Ausbeute der Destillation mit $\pm 0,5\%$ geschätzt (bei einem Wein mit 10% v/v).

Bei Verwendung einer Drehbandkolonne nach Cadiot ist bei einer Ausbeute von über 96% keine signifikante Isotopenfraktionierung zu erwarten. In jedem Fall sollte bei der Destillation ein angemessenes Volumen V ml an Wein oder Gärungsprodukten verwendet werden, um eine ausreichende Ausbeute der Extraktion sicherzustellen. Typischerweise verwendete Aliquote der Weinprobe mit 750, 500, 400 und 300 ml sollten bei Anwendung des oben beschriebenen Destillationsverfahrens mit einer Drehbandkolonne unter Verwendung von Weinen oder Gärungsprodukten mit $tv = 4, 6, 8$ und 10% Vol. für eine Ausbeute von 96% ausreichend sein.

*Beglaubigte Ausführung
Porto, den 24. Juni 2011
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung*

Federico CASTELLUCCI

6.5 Gärung von Mosten, Mostkonzentrat und rektifiziertem Mostkonzentrat

Die Hefe kann vor Gebrauch in einer kleinen Menge Most reaktiviert werden.

Das Glasgefäß wird mit einer Vorrichtung ausgestattet, die es luftdicht verschließt und Ethanolverluste verhindert.

6.5.1 Most

Rund 1 Liter Most, dessen Konzentration an vergärbaren Zuckern zuvor bestimmt wurde, in das Gärungsgefäß geben. Anschließend rund 1 g möglicherweise zuvor reaktiverer Trockenhefe zugeben und luftdichten Gäraufsatz einsetzen. Die Gärung erfolgt, bis der Zucker verbraucht ist. Das vergärrte Produkt kann dann gemäß dem bereits für Wein unter 6.1 bis 6.4 beschriebenen Verfahren destilliert werden.

Anmerkung: Durch Zugabe von Schwefeldioxid konservierter Most muss durch Einleitung von Stickstoff in einem Wasserbad bei 70 bis 80°C unter Rückfluss entschwefelt werden, um eine Isotopenfraktionierung durch verdampfendes Wasser zu vermeiden. Andernfalls kann das Schwefeldioxid unter geringem Zusatz von Wasserstoffperoxid-Lösung (H₂O₂) entfernt werden.

6.5.2 Mostkonzentrat

V ml Mostkonzentrat mit bekanntem Zuckeranteil (ca. 170 g) in das Gärgefäß geben. Mit (1000 – V) ml Wasser auf einen Liter auffüllen. Trockenhefe (1 g) und 3 g DIFCO Bacto Hefestickstoffbase ohne Aminosäuren zugeben. Homogenisieren und wie unter 6.5.1 beschrieben fortfahren.

6.5.3. Rektifiziertes Traubenmostkonzentrat)

Vorgehensweise wie in 6.5.2 beschrieben. Mit (1000 - V) ml Wasser auffüllen, in dem zuvor 3 g Weinsäure gelöst wurden.

Hinweis: Konzentrierter Most und Rektifiziertes Traubenmostkonzentrat werden in Wasser mit einer (D/H)-Isotopenkonzentration aufgelöst, die sich von der des ursprünglichen Mosts unterscheidet. Die für Ethanol gemessenen (D/H)_I und (D/H)_{II} -Parameter sind so zu normalisieren, als wäre der Most in Wasser vergärrt, die die gleiche Deuterium-Konzentration aufweist wie V-SMOW (155.76 ppm).

Die Normalisierung der Daten erfolgt durch folgende Gleichungen (Martin et al., 1996, J. AOAC, 79, 62-72):

$$\left(\frac{D}{H}\right)_I^{NormV-SMOW} = \left(\frac{D}{H}\right)_I - 0.19 \times \left[\left(\frac{D}{H}\right)_w^S - 155.76 \right]$$

$$\left(\frac{D}{H}\right)_{II}^{NormV-SMOW} = \left(\frac{D}{H}\right)_{II} - 0.78 \times \left[\left(\frac{D}{H}\right)_w^S - 155.76 \right]$$

*Beglaubigte Ausführung
Porto, den 24. Juni 2011
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung*

Federico CASTELLUCCI

wobei $\left(\frac{D}{H}\right)_w^s$ dem Isotopenverhältnis von Deuterium im verdünnten Most entspricht. Dieser Wert kann anhand der Global Meteoric Water Line (Craig, 1961) berechnet werden:

$$\left(\frac{D}{H}\right)_w^s = 155.76 \times \left[\frac{(8 \times \delta^{18}O + 10)}{1000} + 1 \right]$$

wobei $\delta^{18}O$ bei verdünntem Most anhand der Methode zur Bestimmung des $^{18}O/^{16}O$ -Isotopenverhältnisses in Wein und Most [OIV-MA-AS2-12] gemessen wird.

Je 50 ml der Proben (Most oder mit Schwefeldioxid behandelter Most oder Mostkonzentrat oder Rektifiziertes Traubenmostkonzentrat) zur eventuellen Extraktion des Wassers zur Bestimmung seines Isotopenverhältnisses $(D/H)_w^Q$ zurückbehalten.

7. Verfahren

7.1 Vorbereitung der Alkoholprobe für die NMR-Messung

- NMR-Probenkopf mit 10 mm Durchmesser: In ein zuvor gewogenes Fläschchen werden 3,2 ml des nach dem unter 6.2 beschriebenen Verfahren gewonnenen Destillats gefüllt und auf 0,1 mg genau abgewogen (m_A); anschließend wird eine Probe von 1,3 ml des internen Standards TMU (5.2.2) entnommen und auf 0,1 mg genau abgewogen (m_{ST}).

Je nach Art des verwendeten Spektrometers und Probenkopf wird eine ausreichende Menge an Hexafluorbenzol (5.1.2) zur Stabilisierung der Feldfrequenz (Lock) zugegeben:

Spektrometer	10 mm Probenkopf
7,05 T	150 μ l
9,4 T	35 μ l

Diese Zahlen sind Richtgrößen. Das tatsächlich verwendete Volumen sollte an die Empfindlichkeit des NMR-Spektrometers angepasst werden. Während der Vorbereitung des Röhrchens und bis zur NMR-Messung sollte sorgfältig darauf geachtet werden, jegliche Verdampfung von Ethanol und TMU zu vermeiden, da dies eine Isotopenfraktionierung und folglich zu Fehlern bei den Einwaagen (m_A und m_{ST}) der Komponenten sowie der Ergebnisse der NMR bewirken würde.

Die Richtigkeit des Messverfahrens einschließlich dieser Vorbereitungsphase kann anhand von CMR 656 überprüft werden.

Anmerkung: Das Hexafluorbenzol kann mit 10% (v/v) Trifluoressigsäure (5.1.3) zugegeben werden, um einen schnellen Wasserstoffaustausch bei Hydroxylbindungen zu katalysieren, woraus sich sowohl für die Hydroxylsignale als auch für die Restwassersignale ein einziger NMR-Peak ergibt.

7.2 Aufzeichnung der 2H -NMR-Spektren von Alkohol

Die Homogenität des Magnetfelds B_0 in der Probe wird durch sog. "shimming", d.h. durch die Maximierung des ^{19}F -NMR-Lock-Signals optimiert, das an Hexafluorbenzol beobachtet

*Beglaubigte Ausführung
Porto, den 24. Juni 2011
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung*

Federico CASTELLUCCI

werden kann. Unter der Voraussetzung, dass die Starteinstellungen für eine gegebene Probe näherungsweise ein homogenes Magnetfeld ergeben, wie dies im Allgemeinen bei einer Versuchsreihe mit gemäß 7.1 vorbereiteten Ethanolproben der Fall ist, können moderne NMR-Spektrometer effizient automatisch shimmen. Die Wirksamkeit des shimming kann anhand der Auflösung eines Spektrums überprüft werden, das ohne exponentielle Multiplikation (d.h. $LB = 0$) aufgenommen wurde (Abbildung 2b), wobei die Auflösung durch die Halbwertsbreite des Methyl- und Methylensignals des Ethanols und des Methylsignals von TMU ausgedrückt wird. Unter optimalen Bedingungen sollte die Halbwertsbreite kleiner als 0,5 Hz sein. Die Empfindlichkeit, gemessen am Methylsignal von Ethanol bei 95 % Vol. (93,5 % m/m) und berechnet mit einer exponentiellen Multiplikation von $LB = 2$ (Abbildung 2a), sollte mindestens 150 betragen.

7.2.2 Prüfung der Messeinstellungen

Die Homogenität und Empfindlichkeit werden wie üblich gemäß den Anweisungen des Herstellers eingestellt.

Dicht verschlossene Röhrchen CRM123 verwenden (H: Hoch, M: Mittel, L: Niedrig).

Anhand des nachfolgend in 9.3 beschriebenen Verfahrens werden die Isotopenwerte dieser Alkohole bestimmt und mit H_{mess} , M_{mess} und L_{mess} bezeichnet.

Anschließend werden diese Werte mit den entsprechenden Referenzwerten verglichen, die durch den oberen Index H_{st} , M_{st} und L_{st} gekennzeichnet sind.

Als Anhaltspunkt sollte die Standardabweichung aus durchschnittlich 10 Wiederholungen für jedes Spektrum für den R-Wert in einer Größenordnung von 0,01, für $(D/H)_I$ in einer Größenordnung von 0,5 ppm und für $(D/H)_{II}$ in einer Größenordnung von 1 ppm liegen.

Die Mittelwerte der so bestimmten Isotopenparameter (R, $(D/H)_I$, $(D/H)_{II}$) müssen innerhalb der entsprechenden Standardabweichung der Wiederholbarkeit liegen, die für die Referenzmaterialien CRM 123 angegeben wurden. Sollte dies nicht der Fall sein, so muss die Überprüfung wiederholt werden.

Nach Optimierung der Einstellungen kann auch anderes CRM-Material zur Qualitätsprüfung bei Messungen für Routineanalysen verwendet werden.

7.3 Bedingungen bei der Aufnahme von NMR-Spektren

Die gemäß 7.1 vorbereitete Alkoholprobe wird in ein 10 mm-Röhrchen gegeben und in den Probenkopf eingesetzt.

Es werden folgende Bedingungen zur Aufnahme der NMR-Spektren vorgeschlagen:

- Die Temperatur des Probenkopfs sollte im optimalen Fall mit einer maximalen Schwankung von $\pm 0,5$ K je nach durch die Entkopplung entstehender Wärmeenergie konstant im Bereich von 302 K bis 306 K gehalten werden;
- Die Aufnahmezeit sollte bei einer Spektralbreite von 1.200 Hz mindestens 6,8 s betragen (Speicherbedarf 16 KB) (d.h. rund 20 ppm bei 61,4 MHz oder 27 ppm bei 46,1 MHz);
- Impuls 90° ;

*Beglaubigte Ausführung
Porto, den 24. Juni 2011
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung*

Federico CASTELLUCCI

- Quadratur-Detektion: Offset 01 für Ethanol zwischen den Referenzsignalen OD und CHD und für Wasser zwischen den Referenzsignalen HOD und TMU einstellen;
- Wert des Offset 02 (Entkoppler) anhand eines mit der Entkopplungsspule am gleichen Röhrchen gemessenen Protonenspektrums bestimmen. Eine gute Entkopplung ist erreicht, wenn sich 02 in der Mitte des Frequenzabstands zwischen den CH₃- und CH₂-Gruppen befindet. Es sollte das Breitbandentkopplungsverfahren oder ein zusammengesetztes Impuls-Entkopplungsverfahren (z.B. WALTZ16) angewendet werden, um eine homogene Entkopplung des gesamten Spektrums zu gewährleisten.

Für jedes Spektrum ist eine genügende Anzahl Akkumulationen NS durchzuführen, um das unter 7.2 als Empfindlichkeit beschriebene Signal-Rauschverhältnis zu erhalten. Die Reihe mit NS Akkumulationen wird NE Mal wiederholt. Die Werte von NS hängen von der Art des verwendeten Spektrometers und dem Probenkopf ab. Es empfiehlt sich beispielsweise:

Spektrometer	10 mm Probenkopf
7,05 T	NS = 304
9,4 T	NS = 200

Die Anzahl der Wiederholungen NE sollte statistisch sinnvoll sein und ausreichen, um die unter Punkt 9 angegebene Leistung und Genauigkeit der Methode zu erzielen.

Falls zwei NMR-Probenröhrchen gemäß dem unter 7.1. beschriebenen Verfahren vorbereitet wurden, können für jedes Gefäß fünf Wiederholungen von NMR-Spektren (NE=5) aufgenommen werden. Das Endergebnis für jeden Isotopenparameter entspricht dem Mittelwert der für die beiden NRM-Probenröhrchen erzielten Messungen. In diesem Fall sind die Annahmekriterien für die Validierung der erhaltenen Ergebnisse:

$$|\text{Mes1(D/H)}_{\text{I}} - \text{Mes2(D/H)}_{\text{I}}| < 0.5 \text{ ppm} \quad , \quad |\text{Mes1(D/H)}_{\text{II}} - \text{Mes2(D/H)}_{\text{II}}| < 0.8 \text{ ppm}$$

8. Darstellung der Ergebnisse

Für jedes der NE Spektren (siehe NMR-Spektrum von Ethanol, Abbildung 2a) ist folgendes zu bestimmen:

$$R = 3 \frac{h_{\text{II}}}{h_{\text{I}}} = 3 \cdot \frac{\text{Signalhöhe II (CH}_3\text{ CHD OH)}}{\text{Signalhöhe I (CH}_2\text{D CH}_2\text{OH)}}$$

$$\left(D/H \right)_I = 1,5866 \cdot T_I \cdot \frac{m_{st}}{m_A} \cdot \frac{\left(D/H \right)_{st}}{t_m^D}$$

$$\left(D/H \right)_{II} = 2,3799 \cdot T_{II} \cdot \frac{m_{st}}{m_A} \cdot \frac{\left(D/H \right)_{st}}{t_m^D}$$

mit

*Beglaubigte Ausführung
Porto, den 24. Juni 2011
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung*

Federico CASTELLUCCI

- $T_I = \frac{\text{Signalhöhe I (CH}_2\text{D CH}_2\text{OH)}}{\text{Signalhöhe des internen Standards (TMU)}}$
- $T_{II} = \frac{\text{Signalhöhe II (CH}_3\text{CHD OH)}}{\text{Signalhöhe des internen Standards (TMU)}}$

- m_{ST} und m_A , siehe 7.1

- t_m^D , siehe 6.3

- $(D/H)_{st}$ = Isotopenverhältnis des internen Standards (TMU) laut Angabe des IRMM-Zertifikats.

Die Verwendung von Signalhöhen anstelle der Signalflächen setzt voraus, dass die Halbwertsbreiten gleich sind. Sie stellen dann eine annehmbare Annäherung dar. (Abbildung 2b).

Für jeden Isotopenparameter werden für die Anzahl der Aufnahmewiederholungen der Spektren für eine gegebene Probe der Mittelwert und das Konfidenzintervall berechnet.

Eine optionale Software ermöglicht derartige Berechnungen direkt.

9. Genauigkeit

Wie in nachfolgend angegebener Literatur beschrieben, wurde die Wiederholbarkeit und Reproduzierbarkeit der SNIF-NMR-Methode durch Ringversuche an Fruchtsäften geprüft. Bei diesen Untersuchungen wurde jedoch nur der Parameter $(D/H)_I$ berücksichtigt. Für Wein können zur Bestimmung der Standardabweichung der Wiederholbarkeit und der Grenze der Wiederholbarkeit Daten aus mehreren laborinternen Untersuchungen herangezogen werden (siehe Anlage I). Die in Anlage II aufgeführten Ergebnisse von Eignungsprüfungen liefern Daten, die zur Berechnung der Standardabweichung der Reproduzierbarkeit und der Grenze der Reproduzierbarkeit für Weine verwendet werden können.

Die Ergebnisse können wie folgt zusammengefasst werden:

	$(D/H)_I$	$(D/H)_{II}$	R
S_r	0.26	0.30	0.005
r	0.72	0.84	0.015
S_R	0.35	0.62	0.006
R	0.99	1.75	0.017

wobei

*Beglaubigte Ausführung
Porto, den 24. Juni 2011
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung*

Federico CASTELLUCCI

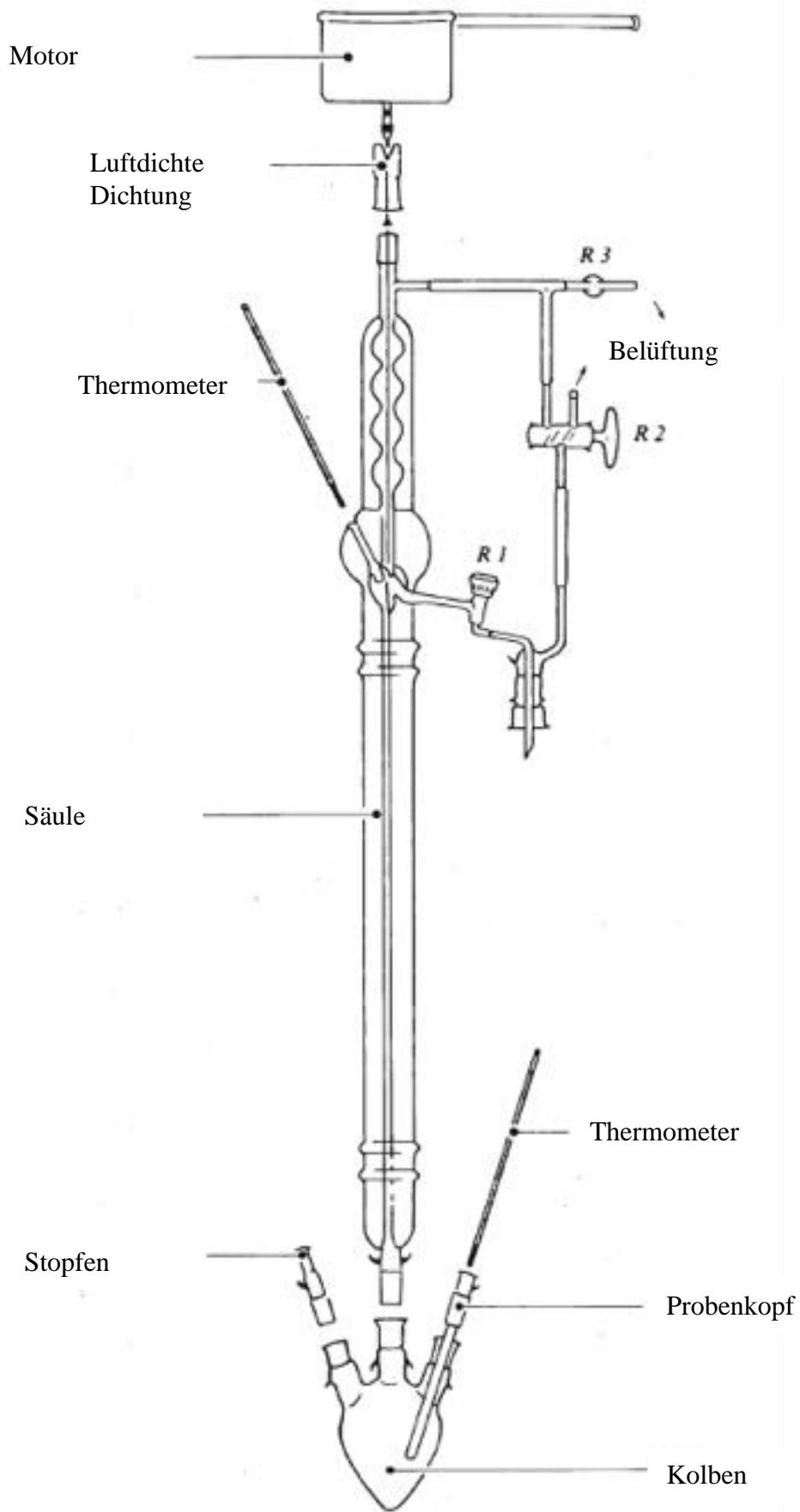
- S (r) : Standardabweichung der Wiederholbarkeit
- r: Grenze der Wiederholbarkeit
- S (R) : Standardabweichung der Reproduzierbarkeit
- R : Grenze der Reproduzierbarkeit

LITERATUR

- MARTIN G.J., MARTIN M.L., MABON F., *Anal. Chem.*, 1982, 54, 23802382.
- MARTIN G.J., MARTIN M.L., *J. Chim. Phys.*, 1983, 80, 294297.
- MARTIN G.J., GUILLOU C., NAULET N., BRUN S., TEP Y., CABANIS J.C., CABANIS M.T., SUDRAUD P., *Sci. Alim.*, 1986, 6, 385405.
- MARTIN G.J., ZHANG B.L., NAULET N. und MARTIN M.L., *J. Amer. Chem. Soc.*, 1986, 108, 51165122.
- MARTIN G.J., GUILLOU C., MARTIN M.L., CABANIS M.T., TEP Y. und AVERNY J., *J. Agric. Food Chem.*, 1988, 36, 316.
- MARTIN G. G., WOOD R., MARTIN, G. J., *J. AOAC Int.*, 1996, 79 (4), 917-928.
- MARTIN G.G., HANOTE V., LEES M., MARTIN Y-L., *J. Assoc Off Anal Chem*, 1996, 79, 62-72
- CRAIG H., *Science*, 1961, 133, 1702 – 1703.

*Beglaubigte Ausführung
Porto, den 24. Juni 2011
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung*

Federico CASTELLUCCI



Beglaubigte Ausführung
 Porto, den 24. Juni 2011
 Der Generaldirektor der OIV
 Sekretär der Generalversammlung

Federico CASTELLUCCI

Abbildung 1 – Vorrichtung zur Ethanolextraktion

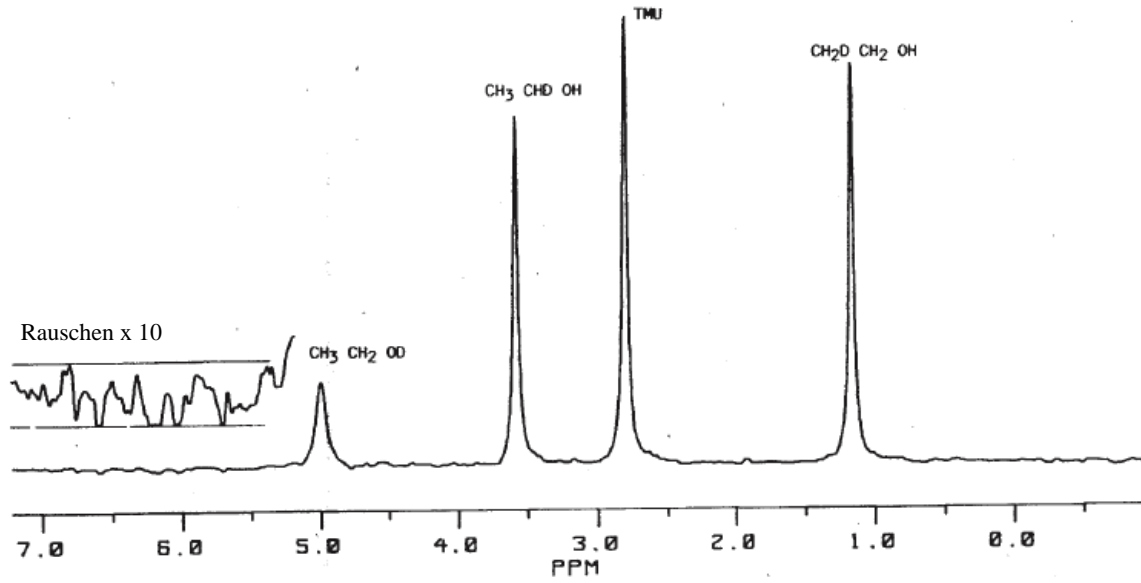


Abbildung 2a
 ^2H -NMR-Spektrum von Ethanol aus Wein mit einem internen Standard (TMU: N,N-Tetramethylharnstoff)

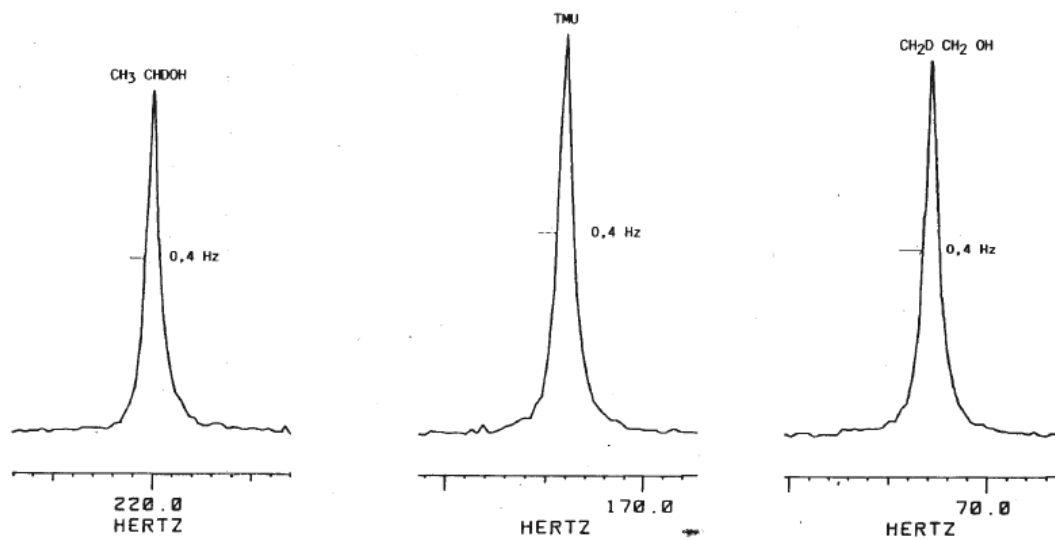


Abbildung 2b
 ^2H -Spektrum von Ethanol, aufgenommen unter den gleichen Bedingungen wie in Abbildung 2a, jedoch ohne exponentielle Multiplikation (LB = 0)

*Beglaubigte Ausführung
Porto, den 24. Juni 2011
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung*

Federico CASTELLUCCI

Anlage I: Berechnung der Wiederholbarkeit anhand von laborinternen Wiederholbarkeitsstudien

Die in 4 Labors durchgeführten Wiederholbarkeitsstudien liefern Daten, die eine Berechnung der Wiederholbarkeit der SNIF-NMR Methode ermöglichen.

Die laborinternen Wiederholbarkeitsstudien wurden von den Labors 1, 2 und 3 anhand von Destillationen und Messungen im Doppelversuch von 10, 9 oder 15 verschiedenen Weinproben durchgeführt.

Labor 4 führte 16 Destillationen und Messungen desselben Weins innerhalb eines kurzen Zeitraums unter Wiederholbarkeitsbedingungen durch.

Tabelle I-1:

Lab 1: 10 im Doppelversuch analysierte Weine

Probe	(D/H) _I		R	(D/H) _{II}		R			
	abs($\Delta(D/H)_I$)	Quadrate		abs($\Delta(D/H)_{II}$)	Quadr.	abs($\Delta(R)$)	Quadrate		
1	103.97	130.11	2.503	0.55	0.302	0.68	0.462	0.000	0.00000
	104.52	130.79	2.503						
2	103.53	130.89	2.529	0.41	0.168	0.32	0.102	0.016	0.00026
	103.94	130.57	2.513						
3	102.72	130.00	2.531	0.32	0.102	0.20	0.040	0.004	0.00002
	103.04	130.20	2.527						
4	105.38	132.39	2.513	0.14	0.020	0.20	0.040	0.000	0.00000
	105.52	132.59	2.513						
5	101.59	127.94	2.519	0.48	0.230	0.20	0.040	0.016	0.00026
	101.11	128.14	2.535						
6	103.23	132.14	2.560	0.30	0.090	0.36	0.130	0.001	0.00000
	102.93	131.78	2.561						
7	103.68	130.95	2.526	0.15	0.023	0.75	0.563	0.011	0.00012
	103.53	130.20	2.515						
8	101.76	128.86	2.533	0.24	0.058	0.42	0.176	0.003	0.00001
	101.52	128.44	2.530						
9	103.05	129.59	2.515	0.04	0.002	0.44	0.194	0.007	0.00005
	103.01	129.15	2.508						
10	101.47	132.63	2.614	0.50	0.250	0.18	0.032	0.010	0.00010
	100.97	132.45	2.624						
Summe der Quadr.:				1.245			1.779		0.00081
				Sr	0.25		0.30		0.006
				r	0.71		0.84		0.018

*Beglaubigte Ausführung
Porto, den 24. Juni 2011
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung*

Federico CASTELLUCCI

Tabelle I-2:

Lab 2: 9 im Doppelversuch analysierte Weine

Probe	(D/H)_I	(D/H)_{II}	R	(D/H)_I		(D/H)_{II}		R	
				abs($\Delta(D/H)_I$)	Quadrate	abs($\Delta(D/H)_{II}$)	Quadr.	abs($\Delta(R)$)	Quadr.
1	105.02	133.78	2.548	0.26	0.068	0.10	0.010	0.008	0.00007
	104.76	133.88	2.556						
2	102.38	130.00	2.540	0.73	0.533	0.40	0.160	0.010	0.00011
	101.65	129.60	2.550						
3	100.26	126.08	2.515	0.84	0.706	0.64	0.410	0.008	0.00007
	99.42	125.44	2.523						
4	101.17	128.83	2.547	0.51	0.260	0.45	0.203	0.004	0.00002
	100.66	128.38	2.551						
5	101.47	128.78	2.538	0.00	0.000	0.26	0.068	0.005	0.00003
	101.47	128.52	2.533						
6	106.14	134.37	2.532	0.12	0.014	0.04	0.002	0.002	0.00000
	106.26	134.41	2.530						
7	103.62	130.55	2.520	0.05	0.003	0.11	0.012	0.003	0.00001
	103.57	130.66	2.523						
8	103.66	129.88	2.506	0.28	0.078	0.55	0.302	0.004	0.00001
	103.38	129.33	2.502						
9	103.50	129.66	2.506	0.43	0.185	0.22	0.048	0.015	0.00021
	103.93	129.44	2.491						
Summe der Quad.:					1.846		1.214		0.00053
				Sr	0.32		0.26		0.005
				r	0.91		0.74		0.015

*Beglaubigte Ausführung
Porto, den 24. Juni 2011
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung*

Federico CASTELLUCCI

Tabelle I-3:

Lab 3: 15 im Doppelversuch analysierte Weine

Probe	(D/H) _I	(D/H) _{II}	R	(D/H) _I	(D/H) _{II}	R			
				abs($\Delta(D/H)_I$)	Quadr.	abs($\Delta(D/H)_{II}$)	Quadrate	abs($\Delta(R)$)	Quadr.
1	101.63	125.87	2.477	0.06	0.004	0.46	0.212	0.007	0.00005
	101.57	125.41	2.470						
2	99.24	124.41	2.507	0.05	0.002	0.04	0.002	0.001	0.00000
	99.19	124.37	2.508						
3	101.23	125.07	2.471	0.06	0.004	0.16	0.026	0.005	0.00002
	101.17	125.23	2.476						
4	100.71	125.29	2.488	0.07	0.005	1.16	1.346	0.024	0.00058
	100.78	124.13	2.464						
5	99.89	124.02	2.483	0.18	0.032	0.56	0.314	0.007	0.00005
	99.71	123.46	2.476						
6	100.60	124.14	2.468	0.19	0.036	0.66	0.436	0.018	0.00032
	100.41	124.80	2.486						
7	101.47	125.60	2.476	0.23	0.053	0.14	0.020	0.003	0.00001
	101.70	125.74	2.473						
8	102.02	124.00	2.431	0.13	0.017	0.07	0.005	0.005	0.00002
	102.15	123.93	2.426						
9	99.69	124.60	2.500	0.40	0.160	0.53	0.281	0.000	0.00000
	100.09	125.13	2.500						
10	99.17	123.71	2.495	0.30	0.090	0.19	0.036	0.004	0.00002
	99.47	123.90	2.491						
11	100.60	123.89	2.463	0.40	0.160	0.54	0.292	0.001	0.00000
	101.00	124.43	2.464						
12	99.38	124.88	2.513	0.33	0.109	0.55	0.302	0.002	0.00000
	99.05	124.33	2.511						
13	99.51	125.24	2.517	0.44	0.194	0.01	0.000	0.011	0.00012
	99.95	125.25	2.506						
15	101.34	124.68	2.460	0.43	0.185	0.41	0.168	0.002	0.00000
	101.77	125.09	2.458						
Summe der Quad.					1.050		3.437		0.00120
				Sr	0.19		0.34		0.006
				r	0.53		0.96		0.018

*Beglaubigte Ausführung
Porto, den 24. Juni 2011
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung*

Federico CASTELLUCCI

Tabelle I-4:

Lab 4: ein 16-mal analysierter Wein

Wiederholung	(D/H) _I	(D/H) _{II}	R		(D/H) _I	(D/H) _{II}	R
1	101.38	126.87	2.503	Varianz:	0.0703	0.0840	0.000013
2	101.30	126.22	2.492				
3	100.98	125.86	2.493	Sr	0.27	0.29	0.004
4	100.94	126.00	2.497				
5	100.71	125.79	2.498	r	0.75	0.82	0.010
6	100.95	126.05	2.497				
7	101.17	126.30	2.497				
8	101.22	126.22	2.494				
9	100.99	125.91	2.494				
10	101.29	126.24	2.493				
11	100.78	126.07	2.502				
12	100.65	125.65	2.497				
13	101.01	126.17	2.498				
14	100.89	126.05	2.499				
15	101.66	126.52	2.489				
16	100.98	126.11	2.498				

Die Gesamt-Standardabweichungen der Wiederholbarkeit und der Wiederholbarkeitsgrenze können daraus wie folgt berechnet werden:

	(D/H) _I	(D/H) _{II}	R
Sr	0.26	0.30	0.005
Grenze der Wiederholbarkeit r	0.72	0.84	0.015

Bereitstellung der laborinternen Wiederholbarkeitsstudien durch (in alphabetischer Reihenfolge):

-Bundesinstitut für Risikobewertung,
Thielallee 88-92 PF 330013 D-14195 BERLIN – GERMANY

-Fondazione E. Mach-Istituto Agrario di San Michele all'Adige ,
Via E. Mach, 1 - 38010 San Michele all'Adige (TN), ITALY

-Joint Research Centre - Institute for Health and Consumer Protection,
I-21020 ISPRA (VA) – ITALY

*Beglaubigte Ausführung
Porto, den 24. Juni 2011
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung*

Federico CASTELLUCCI

Anlage II: Bewertung der Reproduzierbarkeit anhand von Eignungsprüfungsdaten

Seit Dezember 1994 wird regelmäßig ein internationales Training für Eignungsprüfungen hinsichtlich der Bestimmung von Isotopenparametern für Wein und andere Lebensmittelmatrizen durchgeführt. Den teilnehmenden Labors wird dadurch eine Bewertung der Leistungsfähigkeit und Qualität ihrer Analysen ermöglicht. Die statistische Auswertung der Ergebnisse, die anhand einer großen Anzahl von Proben über einen langen Zeitraum erzielt werden, ermöglicht eine Beurteilung der Variabilität der Messungen unter Reproduzierbarkeitsbedingungen. Es kann somit eine gute Beurteilung der Varianzparameter und der Reproduzierbarkeitsgrenze der Methode vorgenommen werden. Die in 40 Durchgängen der Eignungsprüfungen von 1994 bis 2010 für mehrere Weintypen (Rot-, Weiß-Roséwein, trockener, süßer und Schaumwein) erzielten Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle II-1 aufgeführt.

Für $(D/H)_I$ und $(D/H)_{II}$ kann die Gesamt-Standardabweichung S_R somit anhand folgender Gleichung berechnet werden:

$$\sqrt{\frac{\sum_i^K (N_i - 1) S_{R,i}^2}{\sum_i^K (N_i - 1)}}$$

Dabei sind N_i und $S_{R,i}$ die Anzahl der Werte und die Standardabweichung der Reproduzierbarkeit des Durchgangs i und K die Anzahl der Durchgänge.

Unter Berücksichtigung der Definition des intramolekularen Verhältnisses R und unter Anwendung der Regeln für die Fortpflanzung des Standardfehlers, wobei davon ausgegangen wird, dass $(D/H)_I$ und $(D/H)_{II}$ unkorreliert sind (die Kovarianz ist gleich null), kann ebenfalls die Standardabweichung der Reproduzierbarkeit für diesen Parameter berechnet werden.

Es ergeben sich somit folgende Berechnungen:

	$(D/H)_I$	$(D/H)_{II}$	R
S_R :	0.35	0.62	0.006
Grenze der Reproduzierbarkeit R	0.99	1.75	0.017

*Beglaubigte Ausführung
Porto, den 24. Juni 2011
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung*

Federico CASTELLUCCI

Table II-1 : FIT Eignungsprüfung – Zusammenfassung statistischer Daten für Weinproben:

Probe	Jahr	Durchgang	(D/H) _I			(D/H) _{II}		
			N	Mittelwert	S _R	N	Mittelwert	S _R
Rotwein	1994	R1	10	102.50	0.362	10	130.72	0.33
Roséwein	1995	R1	10	102.27	0.333	10	128.61	0.35
Rotwein	1995	R2	11	101.45	0.389	11	127.00	0.55
Rotwein	1996	R1	11	101.57	0.289	11	132.23	0.34
Roséwein	1996	R2	12	102.81	0.322	12	128.20	0.60
Weißwein	1996	R3	15	103.42	0.362	15	127.97	0.51
Rotwein	1996	R4	15	102.02	0.377	13	131.28	0.30
Roséwein	1997	R1	16	103.36	0.247	16	126.33	0.44
Weißwein	1997	R2	16	103.42	0.444	15	127.96	0.53
Süßer Weißwein	1997	R2	14	99.16	0.419	15	130.02	0.88
Wein	1997	R3	13	101.87	0.258	15	132.03	0.61
Süßwein	1997	R3	12	102.66	0.214	12	128.48	0.48
Roséwein	1997	R4	16	102.29	0.324	16	129.29	0.63
Süßwein	1997	R4	15	102.04	0.269	13	131.27	0.30
Weißwein	1998	R1	16	105.15	0.302	16	127.59	0.59
Süßwein	1998	R3	16	102.17	0.326	16	129.60	0.56
Rotwein	1998	R4	17	102.44	0.306	17	131.60	0.47
Weißwein	1999	R1	14	102.93	0.404	13	129.64	0.46
Süßwein	2000	R2	15	103.19	0.315	14	129.43	0.60
Wein	2001	R1	12	105.28	0.264	16	131.32	0.68
Süßwein	2001	R2	14	101.96	0.249	15	128.99	1.05
Wein	2002	R1	17	101.01	0.365	16	129.02	0.74
Wein	2002	R2	17	101.30	0.531	17	129.28	0.93
Wein	2003	R1	18	100.08	0.335	18	128.98	0.77
Süßwein	2003	R2	17	100.51	0.399	18	128.31	0.80
Wein	2004	R1	18	102.88	0.485	19	128.06	0.81
Süßwein	2004	R3	16	101.47	0.423	16	130.10	0.71
Wein	2005	R1	19	101.33	0.447	19	129.88	0.76
Süßwein	2005	R2	15	102.53	0.395	15	131.36	0.38
Trockener Wein	2006	R1	18	101.55	0.348	18	131.30	0.51
Süßwein	2006	R2	18	100.31	0.299	18	127.79	0.55
Wein	2007	R1	18	103.36	0.403	18	130.90	0.90
Süßwein	2007	R2	19	102.78	0.437	19	130.72	0.55
Wein	2008	R1	24	103.20	0.261	23	131.29	0.59
Süßwein	2008	R2	20	101.79	0.265	19	129.73	0.34
Trockener Wein	2009	R1	24	102.96	0.280	23	130.25	0.49
Süßwein	2009	R2	21	101.31	0.310	21	127.07	0.50
Trockener Wein	2010	R1	21	101.80	0.350	20	129.65	0.40
Schaumwein	2010	R1	11	101.51	0.310	11	129.09	0.68
Trockener Wein	2010	R2	20	104.05	0.290	19	133.31	0.58

*Beglaubigte Ausführung
Porto, den 24. Juni 2011
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung*

Federico CASTELLUCCI