

VERORDNUNG (EG) Nr. 440/2003 DER KOMMISSION
vom 10. März 2003
zur Änderung der Verordnung (EWG) Nr. 2676/90 zur Festlegung gemeinsamer Analysemethoden
für den Weinsektor

DIE KOMMISSION DER EUROPÄISCHEN GEMEINSCHAFTEN —

gestützt auf den Vertrag zur Gründung der Europäischen Gemeinschaft,

gestützt auf die Verordnung (EG) Nr. 1493/1999 des Rates vom 17. Mai 1999 über die gemeinsame Marktorganisation für Wein ⁽¹⁾, zuletzt geändert durch die Verordnung (EG) Nr. 2585/2001 ⁽²⁾, insbesondere auf Artikel 46 Absatz 3 Unterabsatz 1,

in Erwägung nachstehender Gründe:

- (1) Die Analysemethoden für den Weinsektor werden im Anhang der Verordnung (EWG) Nr. 2676/90 der Kommission ⁽³⁾, zuletzt geändert durch die Verordnung (EG) Nr. 1622/2000 ⁽⁴⁾, beschrieben.
- (2) Für D-Äpfelsäure wurde eine Analysenmethode entwickelt, die sich für die Messung von geringen Gehalten an D-Äpfelsäure in Wein eignet. Diese Methode wurde nach international anerkannten Kriterien validiert. Die Beschreibung dieser neuen Methode wurde vom Internationalen Weinamt in seiner Generalversammlung vom Juni 2002 angenommen.
- (3) Für die Analyse des Isotopenverhältnisses des Kohlenstoffs in Weinethanol oder Ethanol aus der Vergärung von Traubenmost, konzentriertem Traubenmost und rektifiziertem Traubenmostkonzentrat wurde eine neue Methode entwickelt, die nach international anerkannten Kriterien validiert wurde. Die Beschreibung dieser neuen Methode wurde vom Internationalen Weinamt in seiner Generalversammlung im Jahr 2001 angenommen.
- (4) Die Anwendung dieser Methoden kann eine bessere Kontrolle der Qualität und Authentizität von Weinen sicherstellen und Rechtsstreitigkeiten infolge der Anwen-

dung weniger exakter Methoden vermeiden helfen, insbesondere was die Anreicherung durch Mischungen von Zucker unterschiedlicher Herkunft und die Kontrolle der Säuerung von Wein anbelangt.

- (5) Es empfiehlt sich, die vorhandene, im Anhang der Verordnung (EWG) Nr. 2676/90 beschriebene Methode für die Bestimmung von D-Äpfelsäure durch die Beschreibung des für die Bestimmung von geringen Gehalten anzuwendenden Verfahrens zu ergänzen und die Beschreibung der neuen Methode zur Bestimmung des Isotopenverhältnisses für Kohlenstoff in Ethanol in den Anhang aufzunehmen.
- (6) Die in dieser Verordnung vorgesehenen Maßnahmen entsprechen der Stellungnahme des Verwaltungsausschusses für Wein —

HAT FOLGENDE VERORDNUNG ERLASSEN:

Artikel 1

Der Anhang der Verordnung (EWG) Nr. 2676/90 wird wie folgt geändert:

1. In Kapitel 20 „D-Äpfelsäure“ wird Punkt 8 durch den Text von Anhang I der vorliegenden Verordnung ersetzt.
2. Das Kapitel 45 in Anhang II der vorliegenden Verordnung wird angefügt.

Artikel 2

Diese Verordnung tritt am siebten Tag nach ihrer Veröffentlichung im *Amtsblatt der Europäischen Union* in Kraft.

Diese Verordnung ist in allen ihren Teilen verbindlich und gilt unmittelbar in jedem Mitgliedstaat.

Brüssel, den 10. März 2003

Für die Kommission

Franz FISCHLER

Mitglied der Kommission

⁽¹⁾ ABl. L 179 vom 14.7.1999, S. 1.

⁽²⁾ ABl. L 345 vom 29.12.2001, S. 10.

⁽³⁾ ABl. L 272 vom 3.10.1990, S. 1.

⁽⁴⁾ ABl. L 194 vom 31.7.2000, S. 1.

ANHANG I

„8. BESTIMMUNG VON D-ÄPFELSÄURE (D(+)-MALAT) IN WEIN MIT GERINGEM GEHALT

8.1. Anwendungsbereich

Die beschriebene Methode ist für die enzymatische Bestimmung von D-Äpfelsäure in Wein mit Gehalten von weniger als 50 mg/l anzuwenden.

8.2. Prinzip

Das Prinzip der Methode ist unter Punkt 1 beschrieben. Die durch die Zunahme der Extinktion bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessene NADH-Bildung ist proportional zur vorhandenen D-Malat-Menge, nach Zugabe einer 50 mg/l äquivalenten Menge an D-Äpfelsäure in die Messküvette.

8.3. Reagenzien

D-Äpfelsäure-Lösung in der Konzentration von 0,199 g/l, zusätzlich zu den unter Punkt 2 genannten Reagenzien.

8.4. Gerätschaften

Die Gerätschaften sind unter Punkt 3 beschrieben.

8.5. Vorbereitung der Probe

Die Vorbereitung der Probe ist unter Punkt 4 beschrieben.

8.6. Durchführung der Bestimmung

Die Durchführung der Bestimmung ist unter Punkt 5 beschrieben, wobei jedoch die Messküvette mit einer Menge D-Äpfelsäure äquivalent zu 50 mg/l beschickt wird (Zugabe von 0,025 ml einer Lösung von D-Äpfelsäure in einer Konzentration von 0,199 g/l unter Ersetzung des äquivalenten Volumens von Wasser); die erhaltenen Werte werden um 50 mg/l verringert.

8.7. Interne Validierung

Die nachstehende Tabelle gibt eine Zusammenfassung der internen Validierung der Methode zur Bestimmung von D-Äpfelsäure nach vorheriger Zugabe von 50 mg/l dieses Isomers.

Arbeitsbereich	0 mg bis 70 mg D-Äpfelsäure/l Innerhalb dieser Grenzen ist die Methode linear mit einem Korrelationskoeffizienten zwischen 0,990 und 0,994
Bestimmungsgrenze	24,4 mg/l
Nachweisgrenze	8,3 mg/l
Empfindlichkeit	0,0015 abs/mg/l
Wiederfindungsrate	87,5 % bis 115,0 % für Weißwein und 75 % bis 105 % für Rotwein
Wiederholbarkeit	= 12,4 mg/l für Weißwein (nach der OIV-Methode = 12,5 mg/l) = 12,6 mg/l für Rotwein (nach der OIV-Methode = 12,7 mg/l)
Variationskoeffizient	4,2 % bis 7,6 % (Weißwein und Rotwein)
Laborinterne Standardabweichung	CV = 7,4% (s = 4,4 mg/l; Durchschnitt = 59,3 mg/l)“

ANHANG II

„45. BESTIMMUNG DES ISOTOPENVERHÄLTNISSES $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ DURCH ISOTOPENVERHÄLTNIS-MASSENSPEKTROMETRIE (IR-MS) VON WEINETHANOL ODER ETHANOL AUS DER VERGÄRUNG VON TRAUBENMOST, KONZENTRIERTEM TRAUBENMOST UND REKTIFIZIERTEM TRAUBENMOSTKONZENTRAT

1. ANWENDUNGSBEREICH

Die Methode ermöglicht die Messung des Isotopenverhältnisses $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ von Weinethanol und Ethanol aus der Vergärung von Weinerzeugnissen (Traubenmost, konzentrierter Traubenmost, rektifiziertes Traubenmostkonzentrat).

2. NORMATIVE REFERENZEN

ISO:	5725: 1994 ‚Präzision von Messverfahren; Ermittlung der Wiederhol- und Vergleichspräzision von festgelegten Messverfahren durch Ringversuche‘
V-PDB:	Vienna-Pee-Dee Belemnite ($R_{\text{PDB}} = 0,0112372$).
Methode 8 des Anhangs der vorliegenden Verordnung:	„Nachweis der Anreicherung von Traubenmost, Traubenmostkonzentrat, rektifiziertem Traubenmostkonzentrat und Wein durch kernresonanzmagnetische Messung des Deuteriumgehaltes (SNIF-NMR)“.

3. DEFINITIONEN

$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$:	Verhältnis der Isotopen von Kohlenstoff 13 (^{13}C) und Kohlenstoff 12 (^{12}C) für eine gegebene Probe
$\delta^{13}\text{C}$:	Der δ -Wert ist die in pro mille (‰) angegebene Abweichung des Isotopenverhältnisses einer Probe relativ zu einem internationalen Standard.
SNIF-NMR:	Stellungsspezifische natürliche Isotopenfraktionierung, gemessen durch kernmagnetische Resonanzspektroskopie
V-PDB:	Vienna Pee Dee Belemnite. PDB ist die Hauptreferenz für die Messung natürlicher Variationen des Kohlenstoff-13-Isotopengehalts. Es handelt sich dabei um ein Kalziumkarbonat aus einem Cretaceischen Belemnite der Pee-Dee Formation in South Carolina (USA). Sein Isotopenverhältnis $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ oder R_{PDB} beträgt $R_{\text{PDB}} = 0,0112372$. Die PDB-Reserven sind seit langem erschöpft, es bleibt jedoch die Hauptreferenz für die Darstellung natürlicher Variationen des Kohlenstoff 13-Isotopengehalts und dient zur Kalibrierung von Referenzmaterialien, die von der Internationalen Atomenergiebehörde (IAEA) in Wien (Österreich) erhältlich sind. Die Isotopenbestimmung für natürlich vorkommenden Kohlenstoff 13 werden daher gewöhnlich im Verhältnis zu V-PDB ausgedrückt.
m/z:	Masse-zur-Ladung-Verhältnis.

4. PRINZIP

Bei der Photosynthese erfolgt die Assimilation des Kohlendioxidgases durch die Pflanzen auf der Grundlage von zwei hauptsächlichen Metabolismusarten, des C_3 -Metabolismus (Calvin-Zyklus) und des C_4 -Metabolismus (Hatch und Slack). Diese zwei Arten der Photosynthese weisen eine unterschiedliche Isotopenfraktionierung auf. Erzeugnisse, die von C_4 -Pflanzen stammen, wie z. B. Zucker und durch Gärung gewonnener Alkohol, weisen einen höheren ^{13}C -Gehalt auf, als ähnliche Erzeugnisse von Pflanzen der C_3 -Gruppe. Die Mehrzahl der Pflanzen wie beispielsweise Reben und Rüben gehören der C_3 -Gruppe an. Rohrzucker und Mais gehören zur C_4 -Gruppe. Die Messung des ^{13}C -Gehaltes ermöglicht so den Nachweis und die Quantifizierung von C_4 -Zuckern (Rohrzucker oder Maisisoglucose), die Traubenerzeugnissen (Traubenmost, Wein etc.) zugesetzt wurden. Die Kombination des ^{13}C -Gehaltes und des Ergebnisses der SNIF-NMR-Messung ermöglicht außerdem die Quantifizierung des Zusatzes von Mischungen von Zuckern oder Alkoholen von C_3 - und C_4 -Pflanzen.

Der ^{13}C -Gehalt wird bestimmt mithilfe des bei der kompletten Verbrennung der Probe entstehenden Kohlendioxids. Die Häufigkeit der wichtigsten Massenisotopomere 44 ($^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2$), 45 ($^{13}\text{C}^{16}\text{O}_2$ und $^{12}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O}$) und 46 ($^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$), die sich aus den verschiedenen möglichen Kombinationen der Isotope ^{18}O , ^{17}O , ^{16}O , ^{13}C und ^{12}C ergeben, werden mithilfe von Ionenströmen auf drei verschiedenen Kollektoren eines Isotopenverhältnis-Massenspektrometers gemessen. Die Anteile der Isotopomere $^{13}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O}$ und $^{12}\text{C}^{17}\text{O}_2$ sind aufgrund ihres geringen Vorkommens vernachlässigbar. Der Ionenstrom für m/z = 45 wird um den Anteil an $^{12}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O}$ korrigiert, der unter Berücksichtigung der relativen Häufigkeit von ^{18}O und ^{17}O anhand der Intensität des Stroms bei m/z = 46 berechnet wird (Craig-Korrektur). Der Vergleich mit einer an der internationalen Referenz V-PDB kalibrierten Referenz ermöglicht die Berechnung des $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes auf einer relativen Skala.

5. REAGENZIEN

Die Reagenzien und Verbrauchsmaterialien hängen von den vom Laboratorium verwendeten Gerätschaften (6) ab. Die gewöhnlich verwendeten Systeme beruhen auf dem Prinzip des Elementaranalysators. Dieser kann für die Einführung von Proben in versiegelten Metallkapseln oder für die Injektion flüssiger Proben durch einen Septumverschluss mittels einer Spritze ausgerüstet sein.

Je nach Art der verwendeten Instrumente können folgende Referenzmaterialien, Reagenzien und Verbrauchsmaterialien verwendet werden:

- Referenzmaterialien
- verfügbar von der IAEA:

Name	Material	$\delta^{13}\text{C}$ gegenüber V-PDB (9)
— IAEA-CH-6	Saccharose	- 10,4 ‰
— IAEA-CH-7	Polyethylen	- 31,8 ‰
— NBS22	Öl	- 29,7 ‰
— USGS24	Graphit	- 16,1 ‰

- verfügbar vom Institut für Referenzmaterialien und -messungen (IRMM) in Geel, Belgien:

Name	Material	$\delta^{13}\text{C}$ gegenüber V-PDB (9)
— CRM/BCR 656	Weinalkohol	- 26,93 ‰
— CRM/BCR 657	Glukose	- 10,75 ‰
— CRM/BCR 660	wässrige alkoholische Lösung (TAV 12 ‰)	- 26,72 ‰

- Arbeitsstandard mit einem bekannten $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis, kalibriert an den internationalen Referenzmaterialien.
- Die nachstehende Liste der Verbrauchsmaterialien wurde für die Durchflusssysteme erstellt:
 - Helium für die Analyse (CAS 07440-59-7),
 - Sauerstoff für die Analyse (CAS 07782-44-7),
 - Kohlendioxid für die Analyse, verwendet als sekundäres Referenzgas für die Bestimmung des $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisses (CAS 00124-38-9),
 - Oxydationsreagens für den Ofen des Verbrennungssystems, z. B. Kupfer(II)-Oxid für die Elementaranalyse (CAS 1317-38-0),
 - Trockenmittel zur Eliminierung des bei der Verbrennung entstehenden Wassers, z. B. Anhydron für die Elementaranalyse (Magnesiumperchlorat) (CAS 10034-81-8). (Nicht erforderlich für die Geräte, die mit einem Wasserentfernungssystem mit Kühlfalle oder selektiv durchlässigem Kapillarrohr ausgestattet sind).

6. GERÄTSCHAFTEN UND MATERIAL

6.1. Isotopenverhältnis-Massenspektrometer (IR-MS)

Die Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie ermöglicht die Bestimmung des relativen Gehalts von ^{13}C in natürlich vorkommendem CO_2 mit einer internen Genauigkeit von 0,05 ‰ oder mehr, ausgedrückt als relativer Wert (9). Die interne Genauigkeit wird definiert als Differenz zwischen zwei Messungen an derselben CO_2 -Probe. Das Massenspektrometer dient zur Messung des Isotopenverhältnisses und ist im Normalfall mit einem Dreifachkollektor ausgestattet, um gleichzeitig die Stärke für das Verhältnis $m/z = 44, 45$ und 46 zu messen. Das Massenspektrometer für die Isotopenmessung muss daher entweder mit einem doppelten Einlasssystem ausgestattet sein, um abwechselnd die unbekannte Probe und eine Referenzprobe messen zu können, oder aber über ein integriertes System verfügen, das eine quantitative Verbrennung ausführt und das Kohlendioxid vor der Messung im Massenspektrometer von den anderen Verbrennungserzeugnissen trennt.

6.2. Verbrennungsapparat

Verbrennungsapparat zur quantitativen Umwandlung von Ethanol in Kohlendioxid mit Eliminierung aller anderen Verbrennungsprodukte einschließlich des Wassers ohne Isotopenfraktionierung. Die Apparatur kann entweder aus einem in das Massenspektrometer integrierten Durchflusssystem (6.2.1) oder einem externen Verbrennungssystem (6.2.2) bestehen. Die Apparatur muss eine Präzision ermöglichen, die mindestens der unter (11) angegebenen entspricht.

6.2.1. Durchflusssysteme

Diese bestehen entweder aus einem Elementaranalysator oder einem Gaschromatografen mit angeschlossenem Verbrennungssystem.

Für die Systeme mit Einführung der Proben in Metallkapseln wird folgendes Labormaterial verwendet:

- Volumen-Mikrospritze oder -Mikropipette mit geeignetem Trichter,
- Waage mit einer Genauigkeit von 1 µg oder mehr,
- Zange für die Einkapselung,
- Zinnkapseln für flüssige Proben,
- Zinnkapseln für feste Proben.

Anmerkung: Um das Risiko des Verdampfens der Ethanolproben zu begrenzen, ist es möglich, in die Kapseln ein absorbierendes Material (z. B. Chromosorb W 45-60 mesh) einzubringen, wobei vorher durch Messung geprüft werden muss, dass dieses keine signifikante Menge an Kohlenstoff enthält, die die Messung verfälschen könnte.

Bei Verwendung eines Elementaranalysators mit Flüssigkeitsinjektion oder eines Probevorbereitungssystems für die Gaschromatografie mit anschließender Verbrennung wird folgendes Labormaterial verwendet:

- Spritze für Flüssigkeiten,
- verschließbare Glasfläschchen mit inerten Septumverschlüssen.

Die o. g. Labormaterialien dienen als Beispiele und können je nach von dem jeweiligen Laboratorium verwendeter Verbrennungsapparatur und Massenspektrometer durch andere Materialien mit gleichwertiger Funktion ersetzt werden.

6.2.2. Externe Vorbereitung der Probe

In diesem Fall werden die Kohlendioxidproben, die sich aus der Verbrennung der zu analysierenden Proben ergeben, sowie die Referenzprobe in Glaskolben aufgefangen und anschließend für die Isotopenanalyse an das Doppeleinlasssystem des Spektrometers angeschlossen. Dabei können verschiedene in der einschlägigen Literatur beschriebene Verbrennungsapparaturen verwendet werden:

- geschlossenes Verbrennungssystem mit Sauerstoffgaszirkulation;
- Elementaranalysator mit Helium- und Sauerstoffdurchfluss;
- versiegelter Glaskolben mit Kupfer(II)-Oxid als Oxidationsmittel.

7. VORBEREITUNG DER PROBEN

Vor der Isotopenbestimmung muss das Ethanol aus dem Wein extrahiert werden. Dies geschieht durch Destillation des Weins wie beschrieben unter Absatz 3.1 der Methode Nr. 8 (SNIF-NMR).

Im Fall von Traubenmost, Traubenmostkonzentrat oder rektifiziertem Traubenmostkonzentrat müssen die Zucker zunächst wie unter Absatz 3.2 der Methode 8 beschrieben zu Ethanol fermentiert werden.

8. DURCHFÜHRUNG

Alle Vorbereitungsschritte sind ohne signifikanten Ethanolverlust durch Verdampfen durchzuführen, welcher die Isotopenzusammensetzung der Probe verändern kann.

Die nachstehende Beschreibung bezieht sich auf die üblicherweise angewandten Verfahren für die Verbrennung von Ethanolproben bei der Nutzung handelsüblicher automatischer Verbrennungssysteme. Jedes andere Verfahren, das die quantitative Umwandlung der Ethanolprobe in Kohlendioxid ohne Verdampfungsverluste gewährleistet, kann für die Vorbereitung des Kohlendioxids für die Isotopenanalyse verwendet werden.

Durchführung des Versuchs bei Verwendung eines Elementaranalysators:

a) Einkapselung der Proben:

- es sind saubere Kapseln, Zange und Arbeitsplatte zu verwenden;
- eine Kapsel geeigneter Größe ist mithilfe der Zange zu entnehmen;
- mithilfe der Mikropipette wird die notwendige Menge Flüssigkeit in die Kapsel eingeführt;
- *Anmerkung:* 3,84 mg reines Ethanol oder 4,17 mg Destillat mit einem Alkoholgehalt von 92 % m/m sind notwendig, um 2 mg Kohlenstoff zu erhalten. Die geeignete Destillatmenge ist auf dieselbe Weise je nach der erforderlichen Kohlenstoffmenge bzw. der Empfindlichkeit des Massenspektrometers zu berechnen;
- die Kapsel wird mithilfe der Zange verschlossen;

- jede Kapsel muss vollkommen dicht verschlossen sein. Ist dies nicht der Fall, ist sie auszusondern und es muss eine neue Kapsel vorbereitet werden;
- für jede Probe sind zwei Kapseln vorzubereiten;
- die Kapseln werden an geeigneter Stelle im automatischen Probenwechsler des Elementaranalysators angeordnet. Jede Kapsel ist sorgfältig mit einer Ordnungsnummer zu versehen;
- die Kapseln mit dem Arbeitsstandard werden systematisch an den Anfang und an das Ende der Probenreihe gesetzt;
- es sind regelmäßig Kontrollproben in die Probenreihe einzubringen.

b) Kontrolle und Einstellung des Elementaranalysators und des Massenspektrometers

- Einstellung der Ofentemperaturen des Elementaranalysators und des Helium- und Sauerstoffflusses für eine optimale Verbrennung der Probe;
- Prüfung auf eventuelle Lecks im Elementaranalyse- und Massenspektrometriesystem (z. B. durch Kontrolle des Ionenstroms für $m/z = 28$, was N_2 entspricht);
- Einstellung des Massenspektrometers für die Messung von Ionenströmen bei $m/z = 44, 45$ und 46 ;
- Überprüfung des Systems mithilfe von bekannten Kontrollproben vor Beginn der Messungen an den Proben.

c) Durchführung einer Reihe von Messungen

Die im automatischen Probenwechsler des Elementaranalysators (oder des Chromatografen) angeordneten Proben werden nacheinander bearbeitet. Das Kohlendioxid jeder Probenverbrennung wird zum Massenspektrometer überführt, das die Ionenströme misst. Der mit den Geräten verbundene Computer registriert die Stärke der Ionenströme und berechnet die δ -Werte für jede Probe (9).

9. BERECHNUNG

Ziel der Methode ist es, das Isotopenverhältnis $^{13}C/^{12}C$ von Ethanol aus Wein oder Traubenerzeugnissen nach der Fermentierung zu messen. Das Isotopenverhältnis $^{13}C/^{12}C$ kann durch seine Abweichung von einem Referenzwert ausgedrückt werden. Die isotopische Abweichung für Kohlenstoff 13 ($\delta^{13}C$) wird also auf einer Skala von Delta pro Tausend ($\delta/1\,000$) berechnet, indem die Ergebnisse der Messprobe mit denen dem zuvor an der internationalen Referenz (V-PDB) kalibrierten Arbeitsstandard verglichen werden. Die $\delta^{13}C$ -Werte der Probe (pr) im Verhältnis zu dem Arbeitsstandard (ref) werden wie folgt ausgedrückt:

$$\delta^{13}C_{pr/ref} \text{ ‰} = 1\,000 \times (R_{pr} - R_{ref})/R_{ref},$$

wobei R_{pr} und R_{ref} jeweils für das Isotopenverhältnis $^{13}C/^{12}C$ des Kohlendioxids der Probe und des Arbeitsstandards stehen.

Die $\delta^{13}C$ -Werte der Probe (pr) werden also im Verhältnis zu der V-PDB-Referenz wie folgt ausgedrückt:

$$\delta^{13}C_{pr/V-PDB} \text{ ‰} = \delta^{13}C_{pr/ref} + \delta^{13}C_{ref/V-PDB} + (\delta^{13}C_{pr/ref} \times \delta^{13}C_{ref/V-PDB})/1\,000,$$

wobei $\delta^{13}C_{ref/V-PDB}$ die vorher berechnete Abweichung des Arbeitsstandards gegen die V-PDB-Referenz darstellt.

Während der Messungen können leichte Abweichungen aufgrund der unterschiedlichen Messbedingungen auftreten. In diesem Fall müssen die $\delta^{13}C$ -Werte der Proben gemäß der Differenz zwischen dem für die Kontrollprobe gemessenen $\delta^{13}C$ -Wert und deren wirklichen Wert korrigiert werden, der zuvor an der internationalen V-PDB-Referenz kalibriert wurde. Zwischen zwei Messungen der Kontrollprobe kann die Messabweichung und damit die an den Messergebnissen der Proben durchzuführende Korrektur als linear angenommen werden. Die Kontrollprobe ist wenigstens zu Beginn und am Ende jeder Messreihe zu bestimmen. Danach kann mittels einer linearen Interpolation die Berichtigung für jede Probe berechnet werden.

10. QUALITÄTSSICHERUNG UND KONTROLLE

Es ist zu kontrollieren, dass der ^{13}C -Wert für die Kontrollprobe um nicht mehr als 0,5 ‰ von dem zulässigen Wert abweicht. Ist die Abweichung größer, ist die Einstellung des Spektrometers zu kontrollieren und gegebenenfalls anzupassen.

Für jede Probe ist sicherzustellen, dass die Differenz zwischen den beiden nacheinander gemessenen Kapseln weniger als 0,3 ‰ beträgt. Das Endergebnis für eine bestimmte Probe ist somit der Mittelwert der Ergebnisse der beiden Kapseln. Liegt die Abweichung über 0,3 ‰, ist die Messung zu wiederholen.

Eine korrekte Durchführung der Messung kann anhand der Stärke des Ionenstroms für $m/z = 44$ kontrolliert werden, der proportional zu der Menge des in den Elementaranalysator injizierten Kohlenstoffs ist. Unter Standardbedingungen müsste die Stärke dieses Ionenstroms für die analysierten Proben praktisch konstant sein. Eine signifikante Abweichung deutet auf eine Verdampfung des Ethanols (z. B. durch eine unzureichend verschlossene Kapsel) oder eine Instabilität des Elementaranalysators oder des Massenspektrometers hin.

11. LEISTUNGSMERKMALE DER METHODE (Genauigkeit)

Ein erster Labor-Ringversuch (11.1) wurde an Destillaten aus Alkohol aus Wein, Rohrzucker und Rüben sowie verschiedenen Mischungen dieser drei Ausgangserzeugnisse durchgeführt. Da bei diesen Analysen der Destillationsschritt nicht mit einbezogen wurde, wurden zusätzliche Informationen aus anderen Ringversuchen an Wein (11.2) und insbesondere Eignungstestreihen (11.3) für Isotopenmessungen berücksichtigt. Die Ergebnisse zeigen, dass die verschiedenen Destillationssysteme und insbesondere die für die SNIF-NMR verwendeten Systeme bei Verwendung unter angemessenen Bedingungen keine signifikante Abweichung bei den Bestimmungen von $\delta^{13}\text{C}$ von Weinalkohol aufweisen. Die im Ringversuch (11.1) an Destillaten ermittelten Präzisionsparameter sind praktisch identisch mit denen für Wein.

11.1. Ringversuche an den Destillaten

Jahr der Ringversuche: 1996
 Anzahl der Laboratorien: 20
 Anzahl der Proben: 6 Proben im Doppel-Blindvergleich
 Analyt: $\delta^{13}\text{C}$ von Ethanol

Code der Proben	Alkohol aus Wein	Alkohol aus Rüben	Alkohol aus Rohrzucker
A & G	80 %	10 %	10 %
B & C	90 %	10 %	0 %
D & F	0 %	100 %	0 %
E & I	90 %	0 %	10 %
H & K	100 %	0 %	0 %
J & L	0 %	0 %	100 %

Proben	A/G	B/C	D/F	E/I	H/K	J/L
Anzahl der Laboratorien nach Beseitigung der herausfallenden Ergebnisse	19	18	17	19	19	19
Anzahl der akzeptierten Ergebnisse	38	36	34	38	38	38
Mittelwert ($\delta^{13}\text{C}$) ‰	- 25,32	- 26,75	- 27,79	- 25,26	- 26,63	- 12,54
Sr^2	0,0064	0,0077	0,0031	0,0127	0,0069	0,0041
Wiederholstandardabweichung (Sr) ‰	0,08	0,09	0,06	0,11	0,08	0,06
Wiederholgrenze r ($2,8 \times \text{Sr}$) ‰	0,22	0,25	0,16	0,32	0,23	0,18
S_R^2	0,0389	0,0309	0,0382	0,0459	0,0316	0,0584
Vergleichstandardabweichung (S_R)	0,20	0,18	0,20	0,21	0,18	0,24
Vergleichsgrenze R ($2,8 \times \text{S}_R$) ‰	0,55	0,49	0,55	0,60	0,50	0,68

11.2. Ringversuche anhand von zwei Weinen und einem Alkohol

Jahr des Ringversuchs:	1996
Anzahl der Laboratorien:	14 für die Destillation der Weine, davon 7 zugleich für die Messung von $\delta^{13}\text{C}$ des Weinethanols 8 für die Messung von $\delta^{13}\text{C}$ der Alkoholprobe
Anzahl der Proben:	3 (Weißwein 9,3 % vol., Weißwein 9,6 % vol. und Alkohol 93 % m/m)
Analyt:	$\delta^{13}\text{C}$ von Ethanol

Proben	Rotwein	Weißwein	Alkohol
Anzahl der Laboratorien	7	7	8
Anzahl der akzeptierten Ergebnisse	7	7	8
Mittelwert ($\delta^{13}\text{C}$) ‰	- 26,20	- 26,20	- 25,08
Varianz der Vergleichbarkeit S_R^2	0,0525	0,0740	0,0962
Vergleichstandardabweichung (S_R) ‰	0,23	0,27	0,31
Vergleichsgrenze R ($2,8 \times S_R$)	0,64	0,76	0,87

Die teilnehmenden Laboratorien haben unterschiedliche Destillationssysteme verwendet. Die in einem einzelnen Laboratorium durchgeführten Isotopenbestimmungen $\delta^{13}\text{C}$ zeigen bei allen Destillaten des Ringversuchs weder Ausreißer noch signifikante Abweichungen von den Mittelwerten. Die Varianz der Ergebnisse ($S^2 = 0,0059$) ist vergleichbar mit der Varianz der Wiederholbarkeit S_r^2 des Ringversuchs an den Destillaten (11.1).

11.3. Ergebnisse der Eignungsprüfungen für die Isotopenbestimmung

Seit Dezember 1994 wurden regelmäßig internationale Eignungsprüfungen für die Isotopenbestimmung von Weinen und Alkoholen (Destillate mit 96 % vol.) durchgeführt. Die Ergebnisse ermöglichen den teilnehmenden Laboratorien, die Qualität ihrer Analysen zu überprüfen. Die statistische Auswertung der Ergebnisse ermöglicht die Erfassung der Abweichung der Bestimmungen unter Wiederholbedingungen und damit die Schätzung der Varianz und der Vergleichsgrenze. Die nachstehende Tabelle fasst die Ergebnisse für die $\delta^{13}\text{C}$ -Bestimmung von Ethanol in Weinen und Destillaten zusammen:

Datum	Wein				Destillate			
	N	S_R	S_R^2	R	N	S_R	S_R^2	R
Dezember 1994	6	0,210	0,044	0,59	6	0,151	0,023	0,42
Juni 1995	8	0,133	0,018	0,37	8	0,147	0,021	0,41
Dezember 1995	7	0,075	0,006	0,21	8	0,115	0,013	0,32
März 1996	9	0,249	0,062	0,70	11	0,278	0,077	0,78
Juni 1996	8	0,127	0,016	0,36	8	0,189	0,036	0,53
September 1996	10	0,147	0,022	0,41	11	0,224	0,050	0,63
Dezember 1996	10	0,330	0,109	0,92	9	0,057	0,003	0,16
März 1997	10	0,069	0,005	0,19	8	0,059	0,003	0,16
Juni 1997	11	0,280	0,079	0,78	11	0,175	0,031	0,49
September 1997	12	0,237	0,056	0,66	11	0,203	0,041	0,57
Dezember 1997	11	0,127	0,016	0,36	12	0,156	0,024	0,44
März 1998	12	0,285	0,081	0,80	13	0,245	0,060	0,69
Juni 1998	12	0,182	0,033	0,51	12	0,263	0,069	0,74
September 1998	11	0,264	0,070	0,74	12	0,327	0,107	0,91
Gewichteter Durchschnitt		0,215	0,046	0,60		0,209	0,044	0,59

N: Anzahl der teilnehmenden Laboratorien

11.4. Wiederhol- und Vergleichsgrenzen

Die in den vorstehenden Tabellen aufgeführten Daten der verschiedenen Labor-Ringversuche ermöglichen so für die vorliegende Methode die Bestimmung der Wiederhol- und Vergleichsgrenzen unter Einbeziehung des Destillationsschrittes:

Wiederholgrenze r : 0,24

Vergleichsgrenze R : 0,6.“
