



RISOLUZIONE OIV-OENO 552-2016

DOSAGGIO DEGLI ZUCCHERI NEI MOSTI E NEI VINI MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA AD ALTA PRESTAZIONE - AGGIORNAMENTO DEL METODO OIV-MA-AS311-03

L'ASSEMBLEA GENERALE,

Visto l'articolo 2, paragrafo 2 iv dell'Accordo del 3 aprile 2001 che istituisce l'Organizzazione internazionale della vigna e del vino,

Su proposta dalla Sottocommissione "Metodi di analisi",

DECIDE, su proposta della Commissione II "Enologia", di modificare come segue il metodo OIV-MA-AS311-03 della *Raccolta dei metodi internazionali di analisi dei vini e dei mosti*:

Metodo di Tipo II¹

DOSAGGIO DEGLI ZUCCHERI NEI MOSTI E NEI VINI MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA AD ALTA PRESTAZIONE

1. - SCOPO E CAMPO D'APPLICAZIONE

Questo metodo può essere utilizzato per la quantificazione diretta degli zuccheri nei mosti e nei vini per concentrazioni fino a 20 g/L e per concentrazioni superiori dopo diluizione.

Allo stesso modo è possibile quantificare il glicerolo (tra 0,5 e 15 g/L) e il saccarosio (tra 1 e 40 g/L).

2. - PRINCIPIO

Gli zuccheri e il glicerolo vengono separati mediante HPLC utilizzando una colonna con alchilammina e determinati mediante rifrattometria.

3. - REAGENTI

3.1 - Acqua demineralizzata di Tipo I (ISO 3696) o equivalente (di grado HPLC);

3.2 - Acetonitrile [75-05-8] (trasmissione minima a 200 nm - purezza \geq 99%);

3.3 - Fruttosio [57-48-7] (purezza \geq 99%);

3.4 - Glucosio [492-62-6] (purezza \geq 99%);

3.5 - Saccarosio [57-50-1] (purezza \geq 99%);

3.6 - Glicerolo [56-81-5] (purezza \geq 99%).

PREPARAZIONE DELLE SOLUZIONI DI REAZIONE

3.9 - Acqua demineralizzata (3.1) filtrata attraverso una membrana di cellulosa con dimensione dei pori di 0,45 μ m;

¹ Metodo di Tipo II per il glucosio e il fruttosio. Metodo di Tipo IV per il saccarosio e il glicerolo.

*Esemplare certificato conforme
Bento Gonçalves, il 28 ottobre 2016
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale*

Jean-Marie AURAND

3.10 - Eluente: acetonitrile (3.2)/acqua (3.9) in rapporto 80/20.

Nota 2: è possibile adattare il rapporto acqua/acetonitrile in funzione degli obiettivi.

4. - STRUMENTAZIONE

4.1 - Membrana di filtrazione in cellulosa con diametro dei pori di 0,45 µm;

4.2 - Cartuccia filtrante di silice derivatizzata con gruppi ottadecil (ad es., Sep-Pak C₁₈);

4.3 - Apparecchiatura comune per HPLC;

4.4 - Colonna con fase di alchilammina, diametro delle particelle di 5 µm, 250 x 4,6 mm;

Nota 3: è possibile utilizzare colonne con lunghezza, diametro interno e dimensione delle particelle differenti, ma il metodo di Tipo II si riferisce alle caratteristiche sopra descritte.

4.5 - Rivelatore dell'indice di rifrazione (RID);

4.6 - Normale apparecchiatura da laboratorio.

5. - CAMPIONAMENTO

Se necessario, i campioni vengono previamente degassati (ad es., con azoto o elio, oppure con un bagno a ultrasuoni).

6. - PROCEDIMENTO

6.1 - Preparazione del campione

6.1.1 - Diluizione

I vini con contenuto inferiore a 20 g/L di (glucosio + fruttosio) vengono analizzati senza essere diluiti. I mosti e i vini con contenuto superiore a 20 g/L devono essere diluiti per rientrare nell'intervallo di taratura.

6.1.2 - Filtrazione

Prima dell'analisi, il campione deve essere filtrato su un filtro (4.1) con diametro dei pori di 0,45 µm;

6.1.3 - Eliminazione dei composti fenolici (se necessario)

Per il mosto o il vino: passare attraverso una cartuccia C₁₈ (4.2)

6.2 - Analisi

6.2.1 Condizioni analitiche

Nota 4: Per il metodo di Tipo II le seguenti istruzioni hanno carattere obbligatorio.

Nota 5: Le condizioni possono essere adattate dal laboratorio, ma si perderebbe il riferimento al metodo di Tipo II.

Sistema HPLC (4.3) dotato di colonna (4.4) e RID (4.5).

Fase mobile: eluente isocratico - acetonitrile/acqua (3.10);

Flusso: 1 mL/min;

Volume iniettato: tra 10 e 50 µL; il volume iniettato dipende dal materiale utilizzato.

Esempi di cromatogrammi vengono forniti nell'Allegato B, alle figure 1 e 2.

E' raccomandabile che la risoluzione fruttosio-glucosio sia ≥ 2

6.2.2 Taratura esterna

La soluzione di taratura che si applica a tutti i composti descritti in questo procedimento può contenere:

glicerolo (3.6) 10 g/L \pm 0,01 g/L;

fruttosio (3.3) 10 g/L \pm 0,01 g/L;

glucosio (3.4) 10 g/L \pm 0,01 g/L;

saccarosio (3.5) 10 g/L \pm 0,01 g/L.

Nota 6: qualora si voglia quantificare un solo composto, si può preparare una soluzione contenente solo il composto richiesto.

6.3 Calcolo dei fattori di risposta per la taratura esterna utilizzata nelle analisi di routine

Esemplare certificato conforme

Bento Gonçalves, il 28 ottobre 2016

Il Direttore Generale dell'OIV

Secretario dell'Assemblea Generale

Jean-Marie AURAND

$$RF_i = \text{area}_i / C_i$$

dove

area_i = area del picco del prodotto nella soluzione di taratura
e C_i = quantità di prodotto presente nella soluzione di taratura

È altresì possibile utilizzare una curva di taratura.

7. - ESPRESSIONE DEI RISULTATI

7.1 Calcolo delle concentrazioni

$$C_e = \text{area}_e / RF_i$$

dove

area_e = area del picco del prodotto presente nel campione.

I risultati sono espressi in g/L.

Nota 7: i risultati sono espressi con al massimo un decimale.

8. - GARANZIA E CONTROLLO QUALITÀ

Riconducibilità agli standard internazionali per massa, volume e temperatura.

Controlli sintetici e/o di riferimento provenienti, per esempio, da prove inter laboratorio, sono utilizzati come controllo di qualità interno. Carte di controllo possono essere utilizzate.

9. - PRESTAZIONE DEL METODO

Nessun composto noto co-eluisce con il fruttosio, il glucosio o il saccarosio.

Robustezza: l'analisi è sensibile a piccole variazioni di temperatura. È necessario proteggere le colonne da variazioni di temperatura.

10. - PRECISIONE

(Vedere l'Allegato B.3)

10.1 - Glucosio (concentrazione ≥ 3 g/L)

Limite di ripetibilità \cong limite di riproducibilità = 13%

10.2 - Fruttosio (concentrazione ≥ 2 g/L)

Limite di ripetibilità = 7%

Limite di riproducibilità = 10%

10.3 - Glucosio + fruttosio (concentrazione ≥ 5 g/L)

Limite di ripetibilità \cong limite di riproducibilità = 10%

*Esemplare certificato conforme
Bento Gonçalves, il 28 ottobre 2016
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale*

Jean-Marie AURAND

Allegato A
(A titolo informativo)
Esempi di cromatogrammi HPLC

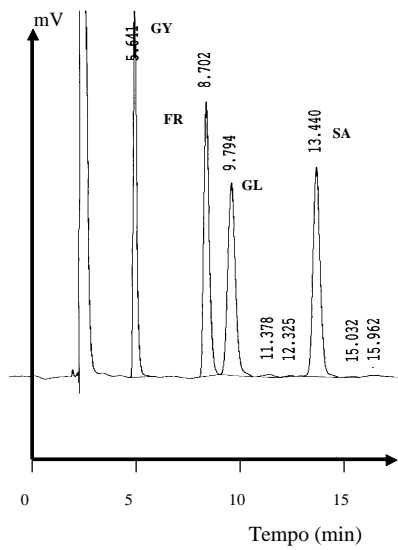


Figura 1 – Cromatogramma di una soluzione di taratura (concentrazione di zuccheri e glicerolo pari a 10 g/L)

Glicerolo (GY), fruttosio (FR), glucosio (GL), saccarosio (SA).

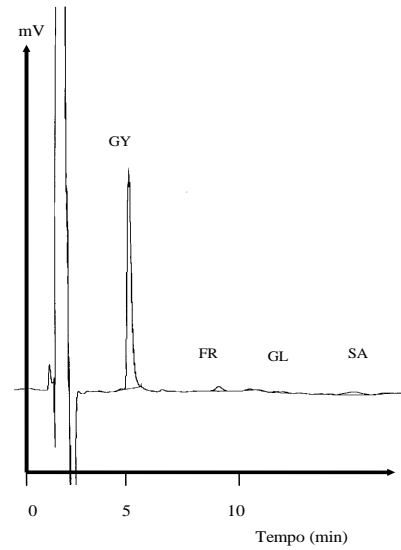


Figura 2 – Cromatogramma di un vino rosato

*Esemplare certificato conforme
Bento Gonçalves, il 28 ottobre 2016
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale*

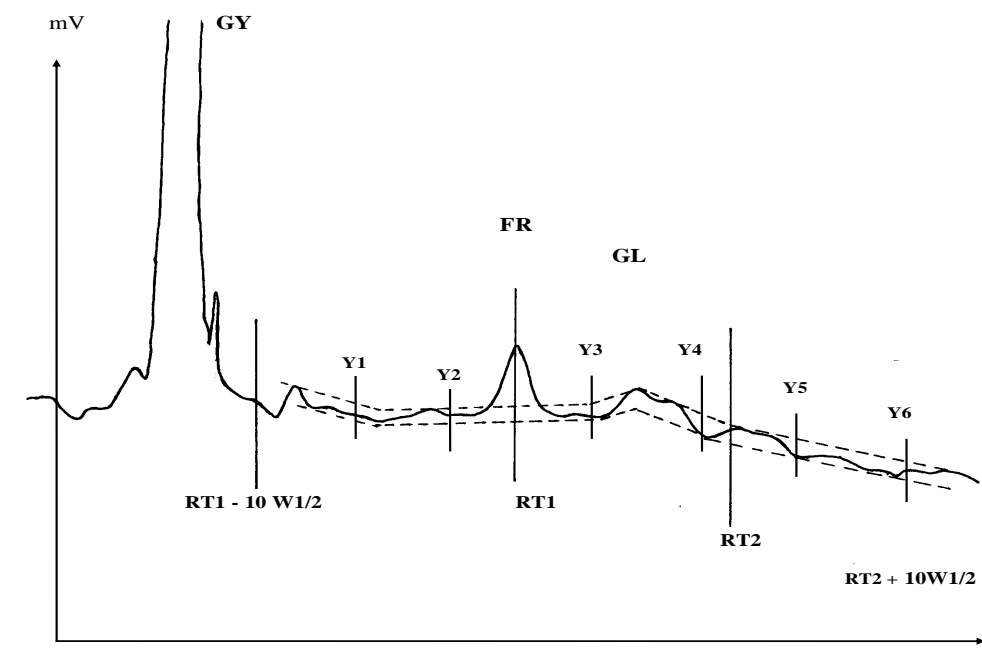


Figura 3 – Misura dei picchi del rumore di fondo dopo l’ingrandimento del cromatogramma
 Fruttosio (FR), glucosio (GL), saccarosio (SA), glicerolo (GY).

RT1: tempo di ritenzione del fruttosio; RT2: tempo di ritenzione del glucosio.

W1/2: ampiezza del picco a metà altezza; Yi: altezza del rumore di fondo al punto i.

Esemplare certificato conforme
Bento Gonçalves, il 28 ottobre 2016
Il Direttore Generale dell’OIV
Secretario dell’Assemblea Generale

Allegato B

(A titolo informativo)

Dati sulla precisione

B.1 Campioni del test inter-laboratorio

Questo studio è stato condotto dal laboratorio interregionale di repressione delle frodi a Bordeaux. Il test si è basato sull'analisi di 12 campioni (6 campioni diversi duplicati in cieco) identificati con le lettere dalla A alla J (4 vini bianchi e 4 vini rossi; 2 vini bianchi Porto e 2 vini rossi Porto) contenenti glucosio e fruttosio. Il contenuto di ciascun zucchero era compreso tra 2 e 65 g/L. Ai vini provenienti dalla regione di Bordeaux è stato aggiunto glucosio e fruttosio e sono stati stabilizzati con 100 mg/L di SO₂ (TRICARD e MEDINA 2003).

B.2 Condizioni cromatografiche

Considerando i fattori di risposta di questi due zuccheri e le scale dei cromatogrammi, il rumore di fondo corrisponde alla concentrazione di fruttosio di 0,04 g/L e alla concentrazione di glucosio di 0,06 g/L (vedere Figura A3).

Si ottengono quindi il limite di rivelabilità (3 volte il rumore di fondo) e il limite di quantificazione (10 volte il rumore di fondo):

$$\text{LOD}_{\text{fruttosio}} = 0,12 \text{ g/L}$$

$$\text{LOD}_{\text{glucosio}} = 0,18 \text{ g/L}$$

$$\text{LOQ}_{\text{fruttosio}} = 0,4 \text{ g/L}$$

$$\text{LOQ}_{\text{glucosio}} = 0,6 \text{ g/L}$$

Questi risultati sono compatibili con quelli ottenuti da TUSSEAU e BOUNIOL (1986) e sono ripetibili su altri cromatogrammi.

B.3 Precisione

Allo studio interlaboratorio hanno partecipato nove laboratori:

Istituto Sperimentale per l'Enologia, Asti, Italia;
Laboratoire de la DGCCRF, Montpellier, Francia;
Laboratoire LARA, Tolosa, Francia;
Instituto dos Vinhos do Porto, Porto, Portogallo;
Instituto da Vinha e do Vinho, Unhos, Portogallo;
Estación de Viticultura y Enología, Vilafranca del Penedès, Spagna;
Comité Interprofessionnel du vin de Champagne, Epernay, Francia;
Station fédérale de Changins, Svizzera;
Laboratoire de la DGCCRF di Talence, Francia.

*Esemplare certificato conforme
Bento Gonçalves, il 28 ottobre 2016
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale*

Jean-Marie AURAND

Successivamente, applicando il metodo di analisi descritto, è stata eseguita l'analisi di 3 punti del gruppo di soluzioni di taratura e di 12 campioni.

I risultati sono stati analizzati in base al protocollo dell'OIV (Protocole de validation des méthodes d'analyse - Risoluzione OENO 6/1999).

In base a questo protocollo, non è necessario ripetere le analisi; tuttavia, quattro laboratori hanno fornito i risultati delle analisi ripetuti 3 volte. Per le analisi dei risultati in conformità con il Protocollo dell'OIV è stata scelta una sola serie (la prima).

Sono stati eseguiti i calcoli di ripetibilità (secondo Youden), quelli di riproducibilità e i test di Cochran e Grubbs.

I dati delle ripetizioni hanno consentito di elaborare in altro modo gli scarti tipo di ripetibilità (secondo la norma ISO 5725).

*Esemplare certificato conforme
Bento Gonçalves, il 28 ottobre 2016
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale*

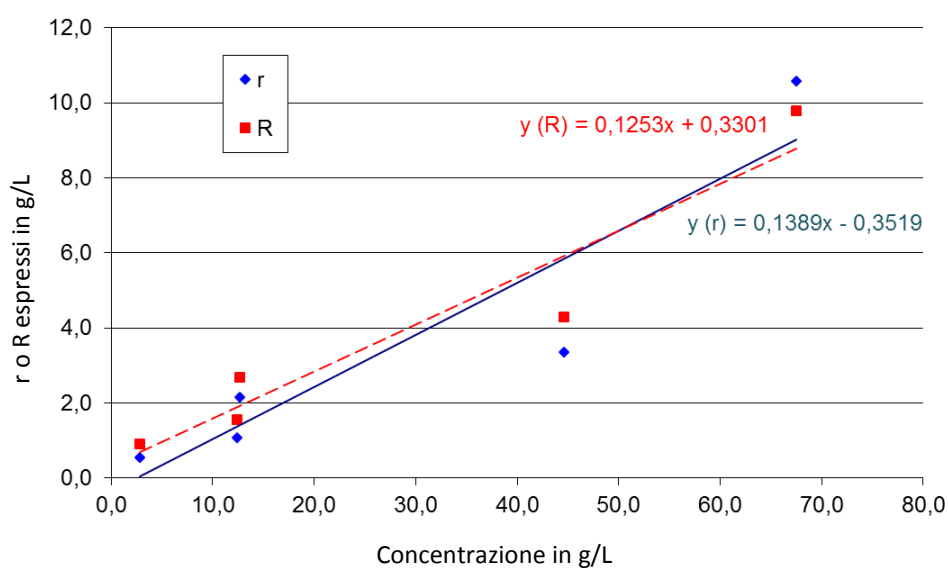
Jean-Marie AURAND

B.3.1 – GLUCOSIO

Quantificazione del glucosio mediante HPLC (in g/L)						
Numero di laboratori	9	9	9	9	9	9
Numero di campioni	2	2	2	2	2	2
Valore medio	2,9	2,9	12,6	12,4	44,6	67,5
Scarto tipo di ripetibilità	0,44	0,17	0,67	0,34	1,05	3,31
Limite di ripetibilità	1,42	0,55	2,15	1,07	3,35	10,58
Scarto tipo di riproducibilità	0,78	0,30	0,90	0,52	1,43	3,28
Limite di riproducibilità	2,32	0,90	2,68	1,55	4,28	9,78
Valore Horrat	5,7*	2,1	1,84	1,08	1,01	1,62

*Valore non considerato per l'espressione della precisione

Quantificazione del glucosio mediante HPLC
r e R in funzione del contenuto di glucosio



Correlazione tra r e R e la concentrazione del glucosio (ISO 5725)

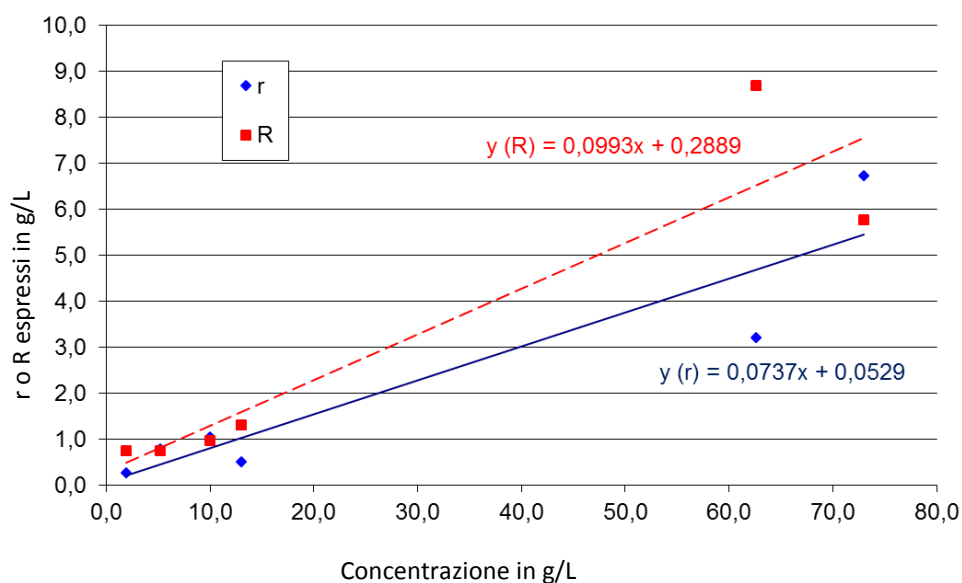
*Esemplare certificato conforme
Bento Gonçalves, il 28 ottobre 2016
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale*

Jean-Marie AURAND

B.3.2 – FRUTTOSIO

Quantificazione del fruttosio mediante HPLC (in g/L)						
Numero di laboratori	9	9	9	9	9	9
Numero di campioni	2	2	2	2	2	2
Valore medio	1,9	5,2	10,0	13,0	62,6	73,0
Scarto tipo di ripetibilità	0,09	0,24	0,32	0,16	3,20	2,10
Limite di ripetibilità	0,27	0,79	1,03	0,51	3,20	6,72
Scarto tipo di riproducibilità	0,25	0,25	0,32	0,43	2,91	1,93
Limite di riproducibilità	0,75	0,75	0,96	1,30	8,68	5,77
Valore Horrat	2,54	1,09	0,81	0,87	1,53	0,89

Quantificazione del fruttosio mediante HPLC
r e R in funzione del contenuto di fruttosio



Correlazione tra r e R e la concentrazione del fruttosio (ISO 5725)

*Esemplare certificato conforme
Bento Gonçalves, il 28 ottobre 2016
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale*

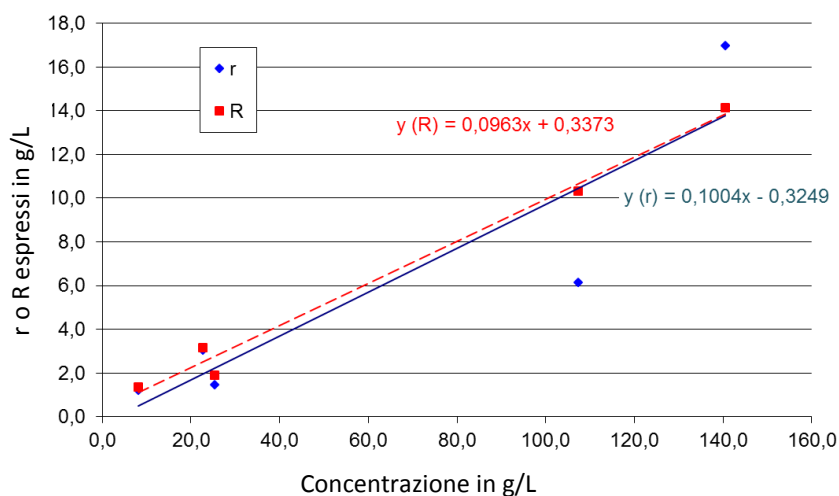
Jean-Marie AURAND

B.3.3 – GLUCOSIO + FRUTTOSIO

Quantificazione del glucosio + fruttosio mediante HPLC (in g/L)						
Numero di laboratori	9	9	9	9	9	9
Numero di campioni	2	2	2	2	2	2
Valore medio	4,7	8,1	22,6	25,4	107,3	140,5
Scarto tipo di ripetibilità	0,48	0,38	1,06	0,46	1,92	5,30
Limite di ripetibilità	1,52	1,21	3,07	1,48	6,13	17,0
Scarto tipo di riproducibilità	0,89	0,46	1,06	0,64	3,47	4,74
Limite di riproducibilità	2,64	1,38	3,17	1,90	10,34	14,15
Valore Horrat	4,17*	1,39	1,33	0,72	1,15	1,26

*Valore non considerato per l'espressione della precisione

Quantificazione del glucosio + fruttosio mediante HPLC
r e R in funzione del contenuto di glucosio + fruttosio



Correlazione tra r e R e la concentrazione del glucosio + fruttosio
(ISO 5725)

*Esemplare certificato conforme
Bento Gonçalves, il 28 ottobre 2016
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale*

Jean-Marie AURAND

Bibliografia

TRICARD, C. e MEDINA, B., "Essai inter laboratoire OIV – Dosage des sucres dans les vins par HPLC", *Feuille Vert 1143*, 2003, 8 pagine.

TUSSEAU, D. e BOUNIOL, C., *Sc. Alim.*, N° 6, 1986, pagg. 559-577.

TUSSEAU, D. "Limite de détection - limite de quantification", *Feuille vert OIV 1000*, 1996.

"Protocole pour la planification, la conduite et l'interprétation des études de performance des méthodes d'analyse", *Risoluzione OIV-OENO 6-2000*.

"Accuratezza (esattezza e precisione) dei metodi di misura e dei risultati", *Norma ISO 5725* (1994).

*Esemplare certificato conforme
Bento Gonçalves, il 28 ottobre 2016
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale*

Jean-Marie AURAND