



RISOLUZIONE OIV-OENO 589-2017

METODO PER LA DETERMINAZIONE DEL 1,2-PROPANDIOLO E DEL 2,3-BUTANDIOLO

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 d'analisi",

DECIDE di completare la Raccolta dei metodi internazionali di analisi dei vini e dei mosti con il seguente metodo:

DETERMINAZIONE DEL 1,2-PROPANDIOLO E DEL 2,3-BUTANDIOLO

Tipo di Metodo: IV

1. INTRODUZIONE

A seguito dei processi fermentativi si formano quantità misurabili di 1,2-propandiolio e di 2,3-butandiolio. Essi sono praticamente assenti nei mosti non fermentati e presenti entro certi limiti nei vini.

2. PRINCIPIO

Gli analiti e lo Standard Interno sono estratti utilizzando etere etilico. Il loro trasferimento nella fase organica è favorita dall'aumento della forza ionica nella matrice vino o mosto di partenza. Per questa ragione i campioni sono aggiunti di una grande quantità di K_2CO_3 ("salting out"). Gli estratti sono analizzati direttamente mediante GC-MS su una colonna polare. La rilevazione è effettuata grazie al tempo di ritenzione ed allo spettrometro di massa.

3. CAMPO DI APPLICAZIONE

Il metodo è adatto alla determinazione dell'1,2-propandiolio e del 2,3-butandiolio nei mosti e nei vini con contenuto zuccherino superiore a 20 g/l, e per concentrazioni degli analiti comprese tra circa 1 mg/L e 500 mg/L.

*Esemplare certificato conforme
Sofia, il 2 giugno 2017
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale*

Jean-Marie AURAND

4. ABBREVIAZIONI

C	Concentrazione
GP	1,2-Propandiolo
GC-MS	Gascromatografo con rivelatore Spettrometro di Massa
H ₂	Idrogeno
SI	Standard Interno 1,3-butandiolo
m/z	Rapporto massa/carica
RF	Fattore di Risposta
ML	Livello di calibrazione della matrice
SM	Soluzione madre
ST	Soluzione di taratura
Tr	Tempo di ritenzione
ST	Soluzioni di taratura gascromatografiche
GB	2,3-Butilenglicole
VD	Vino con zuccheri ≥ 20 g/l
M	Mosto

5. REAGENTI

- 5.1. K₂CO₃ (CAS 584-08-7)
- 5.2. Etere etilico (CAS 60-29-7)
- 5.3. Etanolo assoluto (CAS 64-17-5)
- 5.4. Fruttosio (CAS 57-48-7)
- 5.5. Glucosio (CAS 50-99-7)
- 5.6. Glicerina (CAS 56-81-5)
- 5.7. 1,2-Propandiolo, >99% (CAS 57-55-6)
- 5.8. 2,3-butandiolo, >99%, miscela di isomeri in forma (R;R) e (R;S) (CAS 513-85-9). Valutare l'abbondanza relativa della forma (R;R) e della forma (R;S) nel seguente modo:
 - 5.8.1. Preparare una soluzione di 100 mg / l, seguendo le istruzioni di cui ai punti 7.2.1 e 7.3 e diluendo la miscela di isomeri del 2,3-butandiolo (5.8) in acqua (5.10) invece che nella soluzione del modello della matrice;
 - 5.8.2. iniettare nel GC secondo le condizioni descritte nel paragrafo 7.6 e calcolare la percentuale di forma (R;R) e la forma (R;S) dalla una percentuale delle aree dei due picchi;
 - 5.8.3. Tenere conto dell'abbondanza relativa di ciascuna forma per calcolare la concentrazione delle soluzioni standard C_{ST,i} utilizzati nel par. 8.2.1 per il calcolo di RF_i relativi alle forme (R;R) e (R;S).
- 5.9. 1,3-butandiolo, purezza > 99%, anidro, (oppure disidratato con sodio solfato per 24 ore) (CAS 107-88-0)
- 5.10. Acqua purificata per uso di laboratorio e di qualità EN ISO 3696
- 5.11. Azoto.

*Esemplare certificato conforme
Sofia, il 2 giugno 2017
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale*

Jean-Marie AURAND

6. APPARECCHIATURE

- 6.1. Attrezzatura tipica di laboratorio di cui matracci da 1000 mL, 200 mL, 100 mL di classe A;
- 6.2. Bilancia analitica con risoluzione $\pm 0,0001$ g;
- 6.3. Centrifuga da laboratorio (almeno 4000 rpm o 2000 xg);

Nota 1. "xg" esprime l'accelerazione subita dalle particelle che subiscono la centrifugazione mentre "rpm" rappresenta il numero di giri al minuto del rotore della centrifuga utilizzata. Fra le due unità di misura sussiste la relazione: $xg = 1,1178 \cdot 10^{-3} \cdot n^2 \cdot r$. Nel laboratorio che ha sviluppato questo metodo $r=0.115$ m;

- 6.4. Gascromatografo con rilevatore a spettrometria di massa con iniettore split-splitless;
- 6.5. Micropipette di precisione e pipette di Pasteur;
- 6.6. Tubi da centrifuga da 30 ml resistenti all'etere e muniti di tappo;
- 6.7. Bagno termostatico;
- 6.8. Agitatore verticale tipo vortex.

7. PROCEDIMENTO

7.1. Preparazione delle soluzioni modello che simulano le matrici

Per avere una risposta migliore al GC-MS nel corso della quantitativa è opportuno preparare varie soluzioni che simulino il più possibile la matrice del campione considerato, in quanto la risposta all'analisi dei glicoli varia in base alla matrice in cui sono solubilizzati.

Tab.1. : Preparazione delle soluzioni modello in matracci tarati da 1000 ml:

	Soluzioni modello	
	M	D
Fruttosio	100 g/L	50 g/L
Glucosio	100 g/L	50 g/L
Glicerina	1 g/L	4 g/L
Etanolo assoluto	1% v/v	5% v/v

7.2. Preparazione delle soluzioni di riferimento

7.2.1.SM: Soluzione Madre GP e GB

Pesare con la precisione di 0,1 mg circa 0,10 g di 1,2-Propandiolo (GP) e circa 0,10 g di 2,3-Butandiolo (GB) in un matraccio da 10 ml e portare a volume con acqua (5.10), annotare il peso. Chiudere accuratamente il matraccio e mescolare.

La concentrazione di questa soluzione è di circa 10 mg/ml in GP e 10 mg/ml in GB.

Se le quantità di GP e GB differiscono da 0,1 g, calcolare le concentrazioni esatte in base al peso registrato.

*Esemplare certificato conforme
Sofia, il 2 giugno 2017
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale*

Jean-Marie AURAND

7.2.2. *SI Soluzione SI*

Pesare accuratamente con la precisione di 0,1 mg circa 0,10 g di 1,3-Butandiolo (SI) in un matraccio da 10 ml e portare a volume con acqua, annotare il peso. Chiudere accuratamente il matraccio e mescolare.

La concentrazione di questa soluzione è di 10 mg/ml. Se la quantità di SI differisce da 0,1 g, calcolare la concentrazione esatta in base al peso registrato.

7.3. Preparazione della soluzione di taratura in matrice

Le soluzioni di taratura si preparano come segue, diluendo la soluzione SM in una soluzione modello la cui composizione si avvicina il più possibile al campione che deve essere analizzato (per il vino dolce, la soluzione modello D; per il mosto, la soluzione modello M):

Tab.2. : Preparazione delle soluzioni di taratura (ST) in matracci tarati da 100 ml.

	ST-M	ST-D
Soluzione SM	1 ml	1 ml
A volume finale di 100 ml con:	Soluzione modello M	Soluzione modello D

Ogni soluzione di taratura ST contiene la matrice scelta e la concentrazione di GP e GB pari a 100 mg/L. Lo Standard Interno verrà aggiunto prima dell'estrazione come descritto al par. 7.5.

7.4. Preparazione dei campioni

Se la concentrazione dell'analita nel campione è superiore alla massima concentrazione prevista dal campo di applicazione, diluire il campione con la soluzione modello (7.1).

Omogeneizzare il campione prima di prelevare l'aliquota da 10 ml sottoporre ad estrazione.

Nel caso di mosti o vini torbidi, prelevare il vino limpido dopo filtrazione.

Nel caso di vini spumanti o frizzanti, effettuare il degrassaggio come descritto nel metodo OIV Acidità Totale (OIV-MA-AS313-01 paragrafo 5.1).

Effettuare l'intero processo preparativo e le prove in doppio.

7.5. Estrazione

7.5.1. *Aggiunta dello SI al campione*

Preparare in un matraccio da 100 mL una soluzione contenente 5 ml della soluzione di SI (7.2.2) e poi portare a volume con il campione da analizzare. Quindi agitare bene.

Questa soluzione contiene 500 mg/L di SI.

7.5.2. *Mosti, Vino con zuccheri > 20 g/l*

7.5.2.1. *Aggiunta del K₂CO₃*

Nella provetta da centrifuga (6.6) mettere 10 mL della soluzione appena preparata

*Esemplare certificato conforme
Sofia, il 2 giugno 2017
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale*

Jean-Marie AURAND

composta dal campione da analizzare e dalla soluzione di SI, quindi aggiungere 10 g di K_2CO_3 (5.1) ed aspettare che si raffreddi. Per velocizzare il raffreddamento è possibile utilizzare un bagno termostato a 20°C (6.7).

7.5.2.2. Estrazione con etere

Una volta raffreddato aggiungere 10 mL di etere etilico (5.2) ed agitare il tutto con l'agitatore verticale di tipo vortex, poi centrifugare (6.3) a circa 3500 rpm (o 1500 xg) per 10 minuti.

7.5.3. Purificazione per l'analisi GC/MS

Il liquido surnatante è raccolto con una pipetta Pasteur, trasferito in una palloncino adatto e portato a secco in corrente di azoto. Il residuo va recuperato con 1 mL circa di etere etilico e messo in una vial da GC chiudendola ermeticamente pronta per l'analisi in GC/MS.

7.5.4. Estrazione delle soluzioni di taratura ST

Questo procedimento deve essere eseguito anche per la soluzione di taratura ST scelta (7.3). Le soluzioni ST devono essere considerate come un campione a tutti gli effetti, quindi trattate analogamente al campione a partire dall'aggiunta dello SI (7.5.1).

7.6. Analisi mediante GC-MS

Si forniscono qui di seguito i parametri specifici dell'analisi GC-MS a titolo di esempio. Si possono utilizzare sistemi alternativi, se forniscono prestazioni cromatografiche adeguate e consentono di separare i picchi gascromatografici con risoluzione maggiore di 2.

7.6.1. Condizioni GC tipiche

colonna: DB-WAX 60m x 0.25mm x 0.25um

Gas vettore: He

Flusso gas vettore: 1.0 ml/min

temperatura dell'iniettore: 250°C

volume d'iniezione: 1 µL

corrente ionizzante: 70 eV

programmata di temperatura:

	Incremento (°C/min)	Temperatura (°C)	Tempo (min)
Inizio		50	8.00
Rampa 1	4.0	220	
Rampa 2		220	40

*Esemplare certificato conforme
Sofia, il 2 giugno 2017
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale*

Jean-Marie AURAND

7.6.2. Condizioni MS Specifiche

Sorgente: 230 °C

Rilevazione MS: 150 °C scan 35.00 – 350.00 a.m.u.

Start time 10 min

Tempo di acquisizione per ciascuna massa è di 250 µs

Modalità di acquisizione: Full Scan

8. VALUTAZIONE

8.1. Identificazione

L'identificazione avviene attraverso il confronto con il tempo di ritenzione degli appositi standard e lo spettro di massa presente nella libreria associata al GC-MS.

8.2. Calcoli

Per la quantificazione si usa la m/z 45 sia per lo SI che per il GP che per le due forme di GB.

8.2.1. Determinazione di fattori di risposta

La quantificazione è effettuata a partire dal fattore di risposta RF ottenuto analizzando la soluzione di riferimento:

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

dove:

A_{SI} è l'area del picco dello Standard interno e C_{SI} la sua concentrazione;

$A_{ST,i}$ è l'area del picco del GP e di ciascuna forma isomerica del GB nella Soluzione di Taratura e $C_{ST,i}$ la sua concentrazione.

8.2.2. Calcolo delle concentrazioni nei campioni

Una volta calcolato il valore di RF, si può poi procedere al calcolo della concentrazione di GP e di ciascuna forma isomerica del GB nei campioni con la formula:

$$C_i = RF_i \cdot C_{ST} \cdot \frac{A_i}{A_{SI}} \quad C_i = RF_i \cdot C_{ST} \cdot \frac{A_i}{A_{SI}}$$

dove:

A_i è l'area del picco del GP o dell'isomero del GB nel campione e C_i la sua concentrazione.

8.3. Espressione dei risultati

I risultati si esprimono in mg/L senza decimali.

Esprimere il 2,3-Butilenglicole come somma del 2,3-Butilenglicole (R,R) e del 2,3-Butilenglicole (R,S).

*Esemplare certificato conforme
Sofia, il 2 giugno 2017
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale*

Jean-Marie AURAND

9. BIBLIOGRAFIA

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

Carsten Faulh , 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).

*Esemplare certificato conforme
Sofia, il 2 giugno 2017
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale*

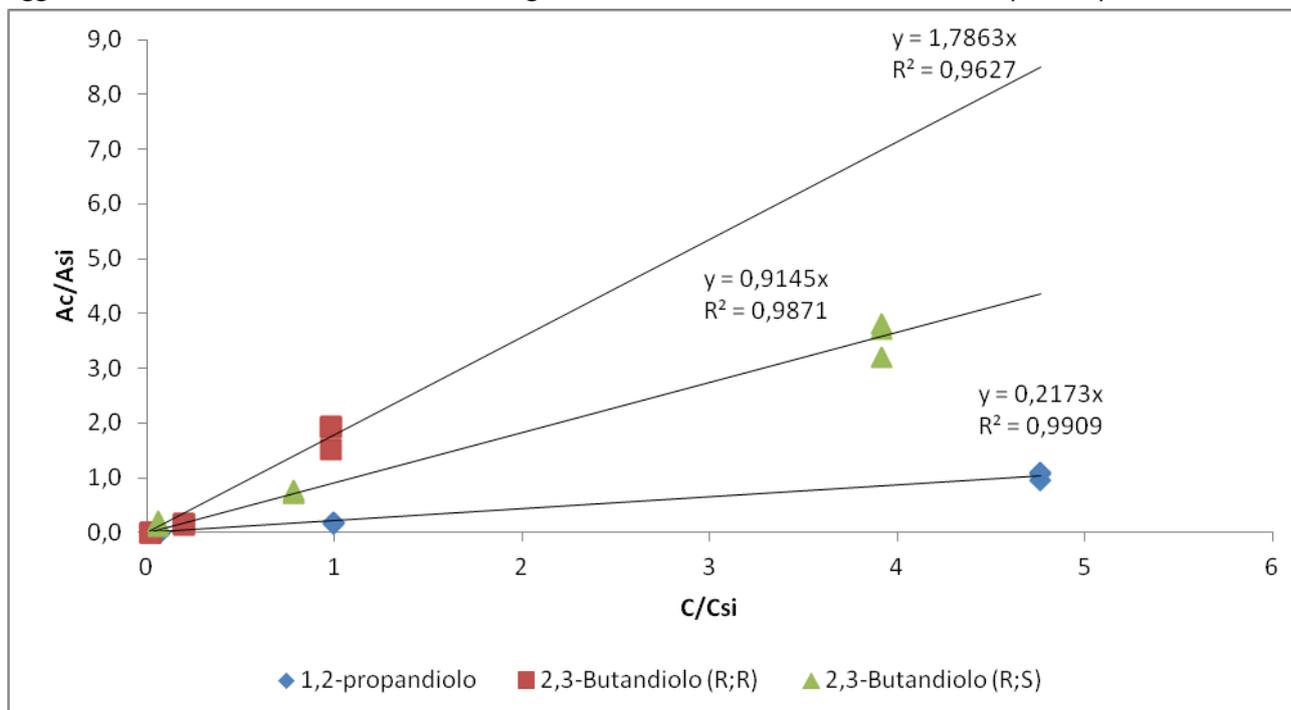
Jean-Marie AURAND

ALLEGATO 1

PRESTAZIONI DEL METODO

1. Linearità

Verifica della risposta lineare su una soluzione zuccherina a 200 g/l (di 100 g/l di glucosio e 100 g/l di fruttosio). Ogni analita è stato aggiunto alle concentrazioni 10, 100 e 500 mg/l mentre lo SI è stato aggiunto alla concentrazione di circa 100 mg/l. Le misure sono state effettuate in triplice replica.



Il fattore di risposta medio è:

1,2-propandiolo	$RF = (C/Csi)/(A/Asi) = 1/0,2173 = 4,60$
2,3-butandiolo (R,R)	$RF = (C/Csi)/(A/Asi) = 1/1,7863 = 0,56$
2,3-butandiolo (R,S)	$RF = (C/Csi)/(A/Asi) = 1/0,9145 = 1,09$

2. Ripetibilità

La ripetibilità è stata valutata su due campioni di mosto.

Uno è stato analizzato tale e quale (Mosto n. 1) e l'altro è stato ottenuto dal primo aggiungendo 100 mg/l di soluzione standard SM (Mosto n. 2).

La tabella che segue si riferisce a 10 repliche e la ripetibilità (r) è espressa con la formula $r=2.8 \cdot Sr$. (Sr = deviazione standard di ripetibilità, $RSDr$ = deviazione standard relativa di ripetibilità)

*Esemplare certificato conforme
Sofia, il 2 giugno 2017
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale*

Jean-Marie AURAND

Composto	Mosto n. 1				Mosto n. 2			
	Media (mg/l)	Sr (mg/l)	RSDr %	r (mg/l)	Media (mg/l)	Sr (mg/l)	RSDr %	r (mg/l)
1,2-propandiolo	1,5	0,5	36	1,5	107	9	9%	30
2,3-Butanediol (R,R)	3,2	1,6	52	4,6	30	3	9%	9,0
2,3-Butanediol (R,S)	5,4	1,7	33	4,9	104	11	10%	34

Valutazione dell'attendibilità del limite di ripetibilità in base all'equazione di Horwitz ed al parametro Horrat(r):

Mosto n. 1

	Media (mg/l)	C·10 ⁶ (m/m)	PRSD(R)	R Horwitz	Horrat (r)	r min H	r max H
1,2-propandiolo	1,5	1,5	15	0,6	2,40	0,2	0,8
2,3-Butanediol (R,R)	3,2	3,2	13	1,2	3,87	0,3	1,6
2,3-Butanediol (R,S)	5,4	5,4	12	1,9	2,64	0,5	2,5

Il limite di ripetibilità "r" non rientra nell'intervallo di accettabilità previsto dall'equazione di Horwitz ($r \min H < r < r \max H$) a causa della maggiore variabilità delle misure a basse concentrazioni, vicine al limite di quantificazione riportato al par. 5 dell'allegato 1.

Mosto n. 2

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

Il limite di ripetibilità "r" rientra nell'intervallo di accettabilità previsto per mezzo dell'equazione di Horwitz ($r \min H < r < r \max H$).

3. Recupero

Il recupero è stato valutato sul mosto n. 2 prima e dopo all'aggiunta della soluzione di riferimento SM come descritto al par. 7.3 del metodo.

Composto	Conc. nel Mosto (mg/l)	Conc. Aggiunta (mg/l)	Conc. attesa (mg/l)	Conc. misurata (mg/l)	Recupero (%)
1,2-propandiolo	0,7	99,5	100,2	107,5	107
2,3-butandiolo (R,R)	12,6	21,7	34,3	29,9	87
2,3-butandiolo (R,S)	11,4	86,8	98,2	103,7	106
2,3-butandiolo (R,R) + (R,S)	24,0	108,5	132,5	133,6	101

*Esemplare certificato conforme
Sofia, il 2 giugno 2017
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale*

Jean-Marie AURAND

Il recupero è soddisfacente per l'1,2-propandiolo e per il 2,3-butandiolo valutato globalmente come somma delle due forme.

4. Effetto della matrice zuccherina sui fattori di risposta

Sono stati confrontati gli RF ottenuti in soluzioni zuccherine equimolari in glucosio e fruttosio alla concentrazione di 200 g/l e 2 g/l di zuccheri totali.

	1,2-propandiolo		2,3-butandiolo (R,R)		2,3-butandiolo (R,S)	
Zuccheri	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 %	

L'effetto matrice sull' 1,2-propandiolo è molto marcato mentre è trascurabile per i 2,3-Butandioli.

5. Limite di rilevabilità e limite di quantificazione

Il limite di rilevazione (LR) e il limite di quantificazione (LQ) dipendono dalle singole condizioni di misura dell'analisi chimica e devono essere determinati da coloro che usano il metodo.

Il limite di rilevabilità (LR) e il limite di quantificazione sono stati valutati usando la strumentazione e le condizioni menzionate precedentemente (§. 8) seguendo le istruzioni della risoluzione ENO 7-2000 (OIV-MA-AS1-10) "Valutazione dei Limiti di Quantificazione e di Rilevabilità di un Metodo di Analisi" riportate al paragrafo 4.2 circa il metodo grafico.

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

*Esemplare certificato conforme
Sofia, il 2 giugno 2017
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale*

Jean-Marie AURAND

ALLEGATO 2

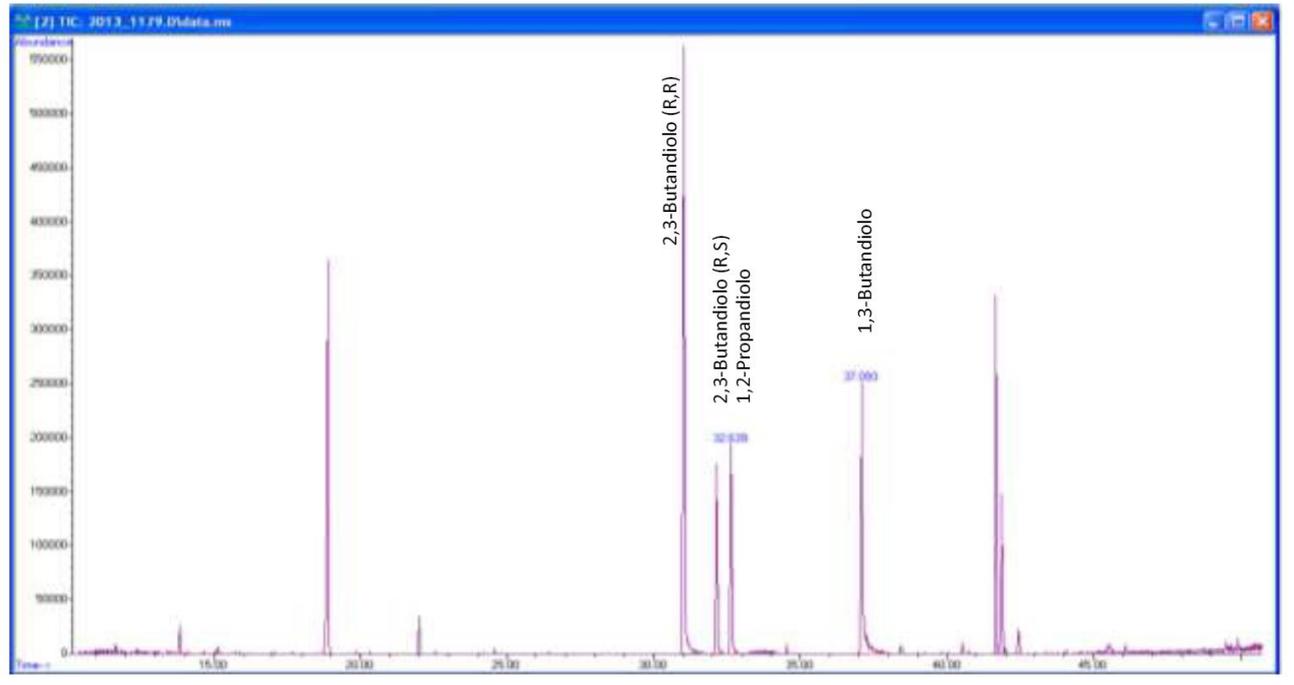


FIG. 1 Cromatogramma di un vino.

*Esemplare certificato conforme
Sofia, il 2 giugno 2017
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale*

Jean-Marie AURAND