



RISOLUZIONE OIV-OENO 457-2014

METODO DI DETERMINAZIONE DELLE AMMINE BIOGENE NEI VINI MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA AD ALTA PRESTAZIONE ACCOPPIATA A RIVELATORE A SERIE DI FOTODIODI

L'ASSEMBLEA GENERALE,

Visto l'articolo 2, paragrafo 2 iv dell'Accordo che istituisce l'Organizzazione Internazionale della Vigna e del Vino,

Su proposta della Sottocommissione "Metodi d'analisi",

DECIDE di adottare e includere nella Raccolta dei metodi internazionali di analisi dei vini e dei mosti, il seguente metodo di tipo IV:

METODO DI DETERMINAZIONE DELLE AMMINE BIOGENE NEI VINI MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA AD ALTA PRESTAZIONE ACCOPPIATA A RIVELATORE A SERIE DI FOTODIODI

Metodo di tipo IV

1. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile all'analisi delle ammine biogene nei vini:

Ammine	Campo d'applicazione
Istamina	da 0,500 a 20 mg/L
Metilammina	da 0,250 a 20 mg/L
Etilammina	da 0,450 a 20 mg/L
Tiramina	da 0,235 a 20 mg/L
Putrescina	da 0,098 a 20 mg/L
Cadaverina	da 0,480 a 20 mg/L
Fenetilamina (o feniletilamina)	da 0,096 a 20 mg/L
Isoamilamina	da 0,020 a 20 mg/L

*Esemplare certificato conforme
Mendoza, il 14 novembre 2014
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale*

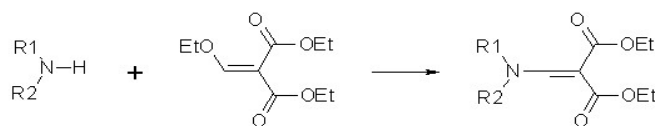
2. Definizione

Il termine biogene significa “generato dalla vita”. L’appellativo “ammine biogene” è, dunque, attribuito a tutte le ammine che derivano dal metabolismo di cellule viventi, animali, vegetali o microbiche. Le ammine biogene che si trovano nel vino sono prevalentemente di origine microbica. Tra le principali si annoverano l’istamina, la putrescina, la cadaverina e la tiramina.

3. Principio

Le ammine biogene studiate in questa sede sono costituite da ammine primarie, secondarie e terziarie, alifatiche o aromatiche. Solo le ammine aromatiche sono in grado di assorbire nell’UV. L’individuazione delle molecole nell’UV richiede, infatti, la presenza di un cromoforo al loro interno. Si tratta generalmente di una sequenza costituita da doppi legami coniugati.

Per poter utilizzare la tecnica HPLC/DAD, è necessario, pertanto, legare un cromoforo alle ammine biogene. A tale scopo, si utilizza il 2-(etossimetil)malonato di dietile (DEEMM) che, tramite il processo di alchilazione, noto come derivatizzazione, consente di ottenere ammine biogene visibili dal rivelatore a diodi [1].



Reazione di derivatizzazione

NOTA: Il risultato della derivatizzazione è calcolato mediante l’utilizzo di uno standard interno (cloridrato di 2,4,6-trimetilfeniletilamina o 2,4,6 TPA). La quantificazione di ogni ammina biogena è realizzata rispetto a una soluzione standard.

4. Reagenti e prodotti

4.1 Lista dei reagenti

Riferimento dei prodotti:

	Prodotto	N. CAS	Purezza
4.1.1	Istamina	51-45-6	≥99%
4.1.2	Metilammina	74-89-5	>99,5%
4.1.3	Etilammina	557-66-4	97%
4.1.4	Tiramina	60-19-5	≥98%
4.1.5	Putrescina (diaminobutano)	333-93-7	≥98%
4.1.6	Cadaverina (diaminopentano)	1476-39-7	≥99%

*Esemplare certificato conforme
Mendoza, il 14 novembre 2014
Il Direttore Generale dell’OIV
Secretario dell’Assemblea Generale*

Jean-Marie AURAND

	Prodotto	N. CAS	Purezza
4.1.7	Feniletilamina	64-04-0	≥99%
4.1.8	Isoamilamina	107-85-7	99%
4.1.9	Acido Borico	10043-35-3	≥98,5%
4.1.10	Idrossido di sodio	1310-73-2	≥98%
4.1.11	Azide di sodio	26628-22-8	≥99,5%
4.1.12	Cloridrato di 2,4,6-trimetilfeniletilamina	3167-10-0	97%
4.1.13	DEEMM (2-(etossimetilen)malonato di dietile)	87-13-8	97%
4.1.14	Acido acetico glaciale	64-19-7	≥99,7%
4.1.15	Metanolo HPLC	67-56-1	≥99,9%
4.1.16	Acetonitrile HPLC	75-05-8	≥99,93%
4.1.17	Acido cloridrico	7647-01-0	≥37%
4.1.18	Acqua ultrapura (18 MΩ)		

5. Soluzione standard interno

Preparazione di una soluzione a 2 g/L

Pesare 20 mg di cloridrato di 2, 4, 6 – trimetilfeniletilamina (4.1.12).
Dissolvere in 10 mL di HCl 0,1 M (5.1).

Conservazione

La soluzione viene conservata a temperatura ambiente.

5.1. Soluzione HCL 0,1 M

Preparazione di una soluzione di HCl 0,1 M:

Prelevare circa 900 mL di acqua ultrapura (4.1.18) con una provetta (6.13).
Versare circa 500 mL di acqua ultrapura (4.1.18) in matraccio tarato da 1 litro (6.9).
Prelevare 100 mL di HCl 1 M (preparato a partire dal prodotto commerciale al punto 4.1.17) con una provetta (6.11).
Versare i 100 mL di HCl 1 M nel matraccio tarato (6.9).
Portare a volume fino a 1 litro con la restante acqua Milli-Q.

Conservazione

La soluzione viene conservata a temperatura ambiente.

*Esemplare certificato conforme
Mendoza, il 14 novembre 2014
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale*

Jean-Marie AURAND

5.2. Tampone borato 1 M

Per 100 mL di soluzione

Pesare 6,183 g di acido borico (4.1.9).

Disciogliere in un becher (6.2) da 100 mL aggiungendo 80 mL di acqua ultrapura (misurati con una provetta graduata) (6.11).

Aggiustare il pH a 9 con una soluzione di NaOH 4 M (preparata a partire dal prodotto commerciale al punto 4.1.10).

Portare al volume di 100 mL in un matraccio tarato (6.7).

Nota: per ottenere una soluzione ottimale, è opportuno che i cristalli di acido borico si dissolvano al più basso pH possibile. A tale scopo, l'aggiunta di NaOH deve essere effettuata a piccole dosi (10 gocce di pipetta Pasteur) (6.30) nel corso di 3 ore circa.

Conservazione

La soluzione viene conservata a temperatura ambiente.

5.3. Fase mobile HPLC

Fase mobile A: tampone acetato 25 mM + 0,02% di azide di sodio a pH 5,8:

Prelevare 1,8 L di acqua ultrapura in un becher da 2 litri (6.3).

Aggiungere 2,86 mL di acido acetico glaciale (4.1.14) (ambientare bene la punta nel becher).

Aggiungere poi 0,4 g di azide di sodio (4.1.11).

Agitare utilizzando un agitatore magnetico (6.24).

Aggiustare il pH a 5,80 aggiungendo NaOH 4 M tramite una pipetta Pasteur (6.30) (circa 6,5 mL).

Portare al volume di 2000 mL in un matraccio da 2000 mL (6.10).

Fase mobile B: Acetonitrile/Metanolo (80/20):

Per 2 litri di fase mobile:

Prelevare 400 mL di metanolo (4.1.15) con una provetta graduata (6.12) e travasarli in un flacone di 2 L (6.20) e aggiungere allo stesso flacone 1600 mL di acetonitrile (4.1.16) misurati con una provetta graduata (6.14)..

Conservazione

Le soluzioni vengono conservate a temperatura ambiente.

*Esemplare certificato conforme
Mendoza, il 14 novembre 2014
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale*

Jean-Marie AURAND

5.4. Soluzioni standard di ammine biogene

Preparazione delle soluzioni A

Soluzione madre A a 500 mg/L

Pesare circa 50 mg (pesi noti con precisione) di istamina (4.1.1), metilammina (4.1.2), etilammina (4.1.3), tiramina (4.1.4) e putrescina (4.1.5) e discioglierle nello stesso matraccio da 100 mL (6.7) con HCl 0,1 M (5.1).

Soluzione standard A a 50 mg/L

Prelevare 25 mL della soluzione A a 500 mg/L e versarli in un matraccio da 250 mL (6.8).
Portare a volume fino a 250 mL con HCl 0,1 M (5.1).

Soluzione standard A a 40 mg/L

Prelevare 50 mL di HCl 0,1 M (5.1) e versarli in un matraccio da 250 mL (6.8).
Portare a volume fino a 250 mL con la soluzione standard A a 50 mg/L.

Preparazione delle soluzioni B

Soluzione madre B a 500 mg/L

Pesare circa 50 mg (pesi noti con precisione) di cadaverina (4.1.6), feniletilamina (4.1.7) e isoamilamina (4.1.8) e discioglierli nello stesso matraccio da 100 mL (6.7) con HCl 0,1 M (5.1).

Soluzione standard B a 50 mg/L

Prelevare 25 mL della soluzione B a 500 mg/L e versarli in un matraccio da 250 mL (6.8).
Portare a volume fino a 250 mL con HCl 0,1 M (5.1).

Soluzione standard B a 10 mg/L

Prelevare 50 mL della soluzione B a 50 mg/L e versarli in un matraccio da 250 mL (6.8).
Portare a volume fino a 250 mL con HCl 0,1 M (5.1).

Fusione delle soluzioni A e B – Soluzione standard

In un matraccio da 100 mL (6.7), aggiungere 50 mL di soluzione A a 40 mg/L mediante un matraccio da 50 mL (6.6).

Portare a volume fino a 100 mL con la soluzione B a 10 mg/L: si otterrà la **soluzione a 20 (A)/5 (B) mg/L**.

*Esemplare certificato conforme
Mendoza, il 14 novembre 2014
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale*

Jean-Marie AURAND

La tabella seguente illustra come preparare le concentrazioni per i punti della curva di calibrazione:

Concentrazione della soluzione iniziale (mg/L)	Volume prelevato di soluzione iniziale (mL)	Portare al volume di 100 mL con una soluzione di HCl 0,1 M (mL)	Concentrazione della soluzione finale (mg/L)
20 (A)/5 (B)	50	50	10 (A)/2,5 (B)
10 (A)/2,5 (B)	50	50	5 (A)/1,25 (B)
5 (A)/1,25 (B)	20	80	1 (A)/0,25 (B)

In questo modo, si otterranno quattro concentrazioni per le ammine biogene contenute nella soluzione A (20, 10, 5 e 1 mg/L) e quattro concentrazioni per le ammine biogene contenute nella soluzione B (5, 2,5, 1,25 e 0,25 mg/L).

Conservazione

Le soluzioni vengono conservate a -20 °C.

6. Materiale e strumentazione

- 6.1 Becher da 25 mL
- 6.2 Becher da 250 mL
- 6.3 Becher da 2000 mL
- 6.4 Matraccio tarato da 10 mL
- 6.5 Matraccio tarato da 25 mL
- 6.6 Matraccio tarato da 50 mL
- 6.7 Matraccio tarato da 100 mL
- 6.8 Matraccio tarato da 250 mL
- 6.9 Matraccio tarato da 1000 mL
- 6.10 Matraccio tarato da 2000 mL
- 6.11 Provette da 100 mL
- 6.12 Provette da 500 mL
- 6.13 Provette da 1000 mL
- 6.14 Provette da 2000 mL
- 6.15 Pipetta automatica da 200 µL
- 6.16 Pipetta automatica da 1 mL
- 6.17 Pipetta automatica da 5 mL
- 6.18 Pipetta automatica da 10 mL
- 6.19 Punte per pipette automatiche da 1 mL, 5 mL e 10 mL
- 6.20 Flacone da 2 litri
- 6.21 Provette per idrolisi in vetro Pyrex da 10 mL con tappo a vite
- 6.22 Flaconi da 2 mL con tappo a vite adatti all'autocampionatore
- 6.23 Bilancia per pesate da 0 a 205 g

*Esemplare certificato conforme
Mendoza, il 14 novembre 2014
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale*

Jean-Marie AURAND

- 6.24 Agitatore magnetico
- 6.25 Cromatografo liquido ad alta prestazione (HPLC)
- 6.26 Software per l'acquisizione dei dati
- 6.27 Rivelatore DAD (a diodi o raggi UV)
- 6.28 Colonna di tipo ottadecile (ad esempio, HP[®] C₁₈-HL, 250 mm x 4,6 mm, 5 µm)
- 6.29 Bagno a secco a 70° C
- 6.30 Pipette Pasteur
- 6.31 Bagno a ultrasuoni

7. Campionamento (preparazione del campione)

Questo metodo non richiede alcun campionamento particolare poiché 1 mL di vino da analizzare viene prelevato e direttamente depositato in una provetta per idrolisi in vetro Pyrex da 10 mL con tappo a vite (6.21) (vedere modalità operativa).

Tuttavia, si raccomanda di effettuare la reazione di derivatizzazione con DEEMM nel momento in cui si riceve il campione dato che la concentrazione di l'istamina nel vino può diminuire nel corso del tempo.

8. Modalità operativa

8.1. Prova

La manipolazione deve essere effettuata obbligatoriamente sotto cappa a causa della tossicità di alcuni reagenti.

Se il tampone borato contiene dei cristalli, riscaldarli a 50 °C agitando lentamente la sostanza fino a che si riscalda.

Per evitare eventuali rischi di assorbimento sulle punte delle pipette automatiche, si consiglia di utilizzare la micropipetta come segue:

- ambientare la punta una sola volta con la soluzione da prelevare;
- aggiungere la soluzione nel recipiente senza che la parte inferiore della punta tocchi la soluzione stessa, salvo indicazioni contrarie.

Agitare bene le soluzioni prima dell'utilizzo (in particolare, il vino congelato).

Nella provetta per idrolisi in vetro Pyrex da 10 mL (6.21), introdurre, utilizzando le appropriate micropipette:

- 1,75 mL di tampone borato (5.2);
- 750 µL di metanolo (4.1.15);
- 1 mL di campione da derivatizzare (pipetta automatica da 1 mL) (6.16);
- 40 µL di campione interno (2, 4, 6 - TPA a 2 g/L) (5.);
- 30 µL di DEEMM (4.1.13).

Chiudere la provetta (stringere bene per evitare l'eventuale evaporazione della soluzione) e agitare manualmente.

*Esemplare certificato conforme
Mendoza, il 14 novembre 2014
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale*

Jean-Marie AURAND

Accendere il bagno a secco a (6.29) 70 °C.

Mettere la provetta nel bagno a ultrasuoni (6.31) per 30 minuti (due turni da 15 minuti agitando ogni 5 minuti). Utilizzare esclusivamente un galleggiante di plastica adatto al bagno poiché la derivatizzazione non avviene nel modo corretto in presenza di un galleggiante metallico.

Riscaldare la miscela di reazione a 70 °C per un'ora nel bagno a secco (6.29) al fine di eliminare il DEEMM in eccesso.

Spegnere il bagno a secco.

Dopo il ritorno a temperatura ambiente, riempire i flaconi da 2 mL con una pipetta Pasteur (6.30) (sostituire la pipetta Pasteur per ogni flacone). Agitare i flaconi manualmente prima di prelevare la soluzione.

8.2. Condizioni operative

Le condizioni operative riportate di seguito sono fornite a titolo d'esempio.

Fase mobile

- A: tampone acetato 25 mM + 0,02% di azide di sodio a pH 5,8.
- B: acetonitrile/metanolo (80/20).

Gradiente di eluizione a seguito di un flusso di 0,9 mL/min.:

Tempo (min)	% A	% B
0	90	10
5	90	10
10	83	17
35	60	40
43	28	72
48	18	82
52	0	100
57	0	100

Temperatura della colonna: 15 °C.

Lunghezza d'onda di rilevazione: 280 nm.

Flusso: 0,9 mL/min.

Volume iniettato: 50 µl.

Durata dell'analisi: 57 minuti.

Identificazione delle ammine biogene

Le ammine biogene sono identificate in funzione del loro tempo di ritenzione. Ognuna di esse è stata, pertanto, analizzata individualmente al fine di determinarne il tempo di ritenzione (Tr).

*Esemplare certificato conforme
Mendoza, il 14 novembre 2014
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale*

Jean-Marie AURAND

Ammine		Tr medio (min.)
Istamina	HI	25,46
Metilamina	ME	33,11
Etilamina	ET	39,00
Tiramina	TY	41,50
Putrescina	PU	46,00
Cadaverina	CA	48,00
Feniletilamina	PH	48,75
Isoamilamina	IS	50,25
Campione interno	2,4,6 TPA	54,75

9. Calcoli (risultati)

Gli errori sistematici causati dall'incertezza sul rendimento della derivatizzazione e sul volume di iniezione possono essere corretti utilizzando uno standard interno.

Una volta corretto il valore del picco, la concentrazione dell'ammina biogena è calcolata a partire dal valore della pendenza della curva di calibrazione standard dell'ammina corrispondente. Per ogni serie di analisi, deve essere realizzata una curva di calibrazione a partire da standard di concentrazione conosciuta.

I risultati sono espressi in mg/L con un solo numero significativo dopo la virgola.

10. Controllo di Qualità

I controlli di qualità possono essere realizzati con materiali di riferimento certificati, con vini le cui caratteristiche derivano da un consenso o vini in cui sono state effettuate delle aggiunte standard eseguite regolarmente nella serie di analisi e seguendo le schede di controllo correlate.

11. Caratteristiche del metodo: parametri di validazione intralaboratorio

I parametri di validazione sono stati determinati in conformità con il punto [4].

11.1. Linearità

L'approccio scelto per lo studio della linearità è quello di confrontare gli scarti tipo residui da un modello di regressione lineare e da un modello di regressione polinomiale di secondo ordine.

Questo studio è stato condotto su due diversi vini arricchiti con ammine biogene alle concentrazioni di 0, 1, 5, 10 e 20 mg/L (soluzione A) e 0, 0,25, 1,25, 2,5 e 5 mg/L (soluzione B).

*Esemplare certificato conforme
Mendoza, il 14 novembre 2014
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale*

Jean-Marie AURAND

Sintesi dei risultati relativi alle ammine biogene:

Ammine biogene	S _{RES} Lineare	S' _{res} 2° Ordine	DS ²	PG	F (5 %)	Conclusione
Metilammina	0,766	0,606	3,218	8,757	4,75	Lineare
Etilammina	0,371	0,371	0,140	1,014		Lineare
Tiramina	1,065	1,065	1,135	1,000		Lineare
Putrescina	0,524	0,523	0,286	1,043		Lineare
Cadaverina	0,276	0,267	0,134	1,881		Lineare
Feniletilammina	0,251	0,248	0,082	1,328		Lineare
Isoamilammina	0,216	0,215	0,055	1,199		Lineare
Istamina	0,591	0,589	0,316	1,084		Lineare

11.2. Specificità

Il principio della misura della specificità consiste nello studiare la retta di regressione $r = a + bv$ e verificare che la pendenza b sia equivalente a 1 ($T_{oss} < T_{critico}$) e che l'ordinata all'origine a sia equivalente a 0 ($T'_{oss} < T_{critico}$). Le ipotesi sono verificate tramite un test T di Student associato a un rischio di errore dell'1%.

Il valore di $T_{critico}$, bilaterale [$p=2$; 1%] associato a un rischio di errore dell'1% per un numero di gradi di libertà pari a 3 è di 4,541.

Sintesi dei risultati delle ammine biogene

Ammine biogene	Vino A		Vino B		Vino C		Vino D	
	T _{oss}	T' _{oss}	T _{oss}	T' _{oss}	T _{oss}	T' _{oss}	T _{oss}	T' _{oss}
Metilammina	4,482	2,321	2,933	0,013	1,563	0,007	5,199	2,864
Etilammina	0,411	0,002	0,081	0,010	0,546	10,556	0,169	2,537
Tiramina	1,834	0,005	0,636	0,005	2,151	4,485	3,420	37,419
Putrescina	7,605	0,041	0,604	0,000	3,257	0,064	2,135	0,011
Cadaverina	5,499	0,033	1,719	1,314	10,929	0,049	8,466	0,026
Feniletilammina	3,348	0,016	1,265	0,001	10,238	0,034	5,925	0,009
Isoamilammina	12,980	0,016	2,297	0,004	12,996	0,020	11,121	0,000
Istamina	4,978	0,250	1,222	0,006	3,128	0,014	1,229	0,004

11.3. Ripetibilità

Per questo studio di ripetibilità sono stati selezionati sette vini rossi differenti e sono state eseguite tre ripetizioni differenti su ciascuno di essi. Le concentrazioni andavano da 0,5 mg/L a 15 mg/L, a seconda dell'ammina biogena e del vino.

*Esemplare certificato conforme
Mendoza, il 14 novembre 2014
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale*

Jean-Marie AURAND

Ammine biogene	S_r (mg/L)	r (mg/L)	Intervallo di validazione (mg/L)
Metilammina	0,335	0,937	3-16
Etilammina	0,173	0,486	2 - 7
Tiramina	0,276	0,773	2 - 20
Putrescina	0,500	1,400	7 - 26
Cadaverina	0,025	0,069	0,2 – 0,8
Feniletilammina	0,028	0,079	0,3 – 1,1
Isoamilammina	0,017	0,048	0,1 – 0,8
Istamina	0,108	0,303	5 - 16

11.4. Riproducibilità

Per questo studio di riproducibilità, sono stati selezionati tre vini rossi differenti e sono state eseguite due ripetizioni differenti su ciascuno di essi.

Ammine biogene	S_r (mg/L)	R (mg/L)	Intervallo di validazione (mg/L)
Metilammina	0,533	1,492	3-16
Etilammina	0,884	2,475	2 - 7
Tiramina	0,341	0,955	2 - 20
Putrescina	0,419	1,172	7 - 26
Cadaverina	0,172	0,482	0,2 – 0,8
Feniletilammina	0,053	0,150	0,3 – 1,1
Isoamilammina	0,056	0,157	0,1 – 0,8
Istamina	1,333	3,732	5 - 16

11.5. Limiti di rivelabilità (LOD) e quantificazione (LOQ)

Secondo uno studio interlaboratorio e utilizzando il metodo delle diluizioni successive partendo da una soluzione a 0,5 mg/L che è stata diluita in serie fino a 0.01 mg/L:

*Esemplare certificato conforme
Mendoza, il 14 novembre 2014
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale*

Jean-Marie AURAND

Ammine		LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
Istamina	HI	0,167	0,500
Metilamina	ME	0,083	0,250
Etilamina	ET	0,150	0,450
Tiramina	TY	0,078	0,235
Putrescina	PU	0,033	0,098
Cadaverina	CA	0,160	0,480
Fenilettilamina	PH	0,032	0,096
Isoamilamina	IS	0,007	0,020

12. Bibliografia

[1] Gomez-Alonzo S., Hermosin-Gutierrez I., Garcia-Romero E., 2007. Simultaneous HPLC analysis of biogenic amines, amino acids, and ammonium Ion as Aminoenone derivatives in wine and beer samples. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55, 608-613.

[2] Tricard C., Cazabeil J.-M., Salagoiti M.H. (1991) : dosage des amines biogènes dans les vins par HPLC, Analisis, 19, M53-M55.

[3] RECUEIL DES METHODES INTERNATIONALES D'ANALYSES – OIV, Amines biogènes par HPLC, Méthode OIV-MA-AS315-18, Analyse des amines biogènes des moûts et des vins par HPLC (Résolution OIV-Oeno 346-2009).

[4] « Guide pratique pour la validation, le contrôle qualité et l'estimation de l'incertitude d'une méthode d'analyse œnologique alternative ». Résolution Oeno 10/2005. OIV. Octobre 2005. www.oiv.int

*Esemplare certificato conforme
Mendoza, il 14 novembre 2014
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale*

Jean-Marie AURAND