



RISOLUZIONE OIV-OENO 479-2017

DETERMINAZIONE DEL RAPPORTO ISOTOPICO $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ NEL GLUCOSIO, FRUTTOSIO, GLICEROLO ED ETANOLO PRESENTI NEI PRODOTTI DI ORIGINE VITIVINICOLA MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA AD ALTA PRESTAZIONE ACCOPPIATA A SPETTROMETRIA DI MASSA ISOTOPICA

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 della Sottocommissione "Metodi d'analisi",

DECIDE, su proposta della Commissione II "Enologia", di introdurre il seguente metodo di tipo II per il glucosio, il fruttosio e il glicerolo e di tipo III per l'etanolo nella *Raccolta dei metodi internazionali di analisi dei vini e dei mosti*:

Titolo	Tipo di metodo
DETERMINAZIONE DEL RAPPORTO ISOTOPICO $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ NEL GLUCOSIO, FRUTTOSIO, GLICEROLO ED ETANOLO PRESENTI NEI PRODOTTI DI ORIGINE VITIVINICOLA MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA AD ALTA PRESTAZIONE ACCOPPIATA A SPETTROMETRIA DI MASSA ISOTOPICA	II e III

1. Campo d'applicazione

Questo metodo vale per i prodotti di origine vitivinicola.

Il presente metodo è:

- di tipo II per il glucosio, il fruttosio e il glicerolo,
- di tipo III per l'etanolo.

2. Principio

I campioni vengono iniettati, dopo diluizione e filtrazione se necessario, nell'apparecchio per HPLC. Il rapporto isotopico $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ nei composti è determinato, dopo la loro ossidazione in un'interfaccia liquida, mediante spettrometria di massa isotopica. Tale interfaccia liquida, simboleggiata

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

Jean-Marie AURAND

dall'acronimo "co", consente l'ossidazione chimica della materia organica in CO₂. L'accoppiamento HPLC-co-IRMS consente quindi di determinare contemporaneamente il rapporto isotopico nei seguenti composti: glucosio, fruttosio, glicerolo ed etanolo.

3. Reagenti

3.1 Acqua pura con resistività $\geq 18 \text{ M}\Omega \times \text{cm}$ di grado HPLC;

3.2 Persolfato d'ammonio – di purezza analitica – [N. CAS: 7727-54-0];

3.3 Acido ortofosforico (concentrazione: 85%) – di purezza analitica – [N. CAS: 7664-38-2];

3.4 Elio per analisi, utilizzato come gas vettore [N. CAS: 07440-59-7];

3.5 Gas di riferimento: CO₂, biossido di carbonio per analisi, utilizzato come gas secondario di riferimento [N. CAS: 00124-38-9];

3.6 Standard internazionali.

4. Materiali

4.1 Attrezzatura di laboratorio;

4.2 Apparecchio per cromatografia liquida ad alta prestazione;

4.3 Interfaccia liquida per l'ossidazione dei composti eluiti;

4.4 Spettrometro di massa isotopica.

5. Analisi dei campioni

5.1 Preparazione dei campioni

In base al tenore di zucchero, glicerolo ed etanolo, i campioni devono essere innanzitutto diluiti con acqua (3.1) al fine di ottenere una concentrazione osservabile in condizioni sperimentali. A seconda delle concentrazioni dei composti, si rendono necessarie due misurazioni con diluizioni diverse.

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

Jean-Marie AURAND

5.2 Esempi di condizioni analitiche

Durata totale dell'analisi: 20 minuti

A titolo indicativo, la diluizione per i succhi d'uva e per i vini è dell'ordine di 1:200, mentre quella per i mosti concentrati è dell'ordine di 1:500.

HPLC:

Colonna: colonna per l'analisi dei carboidrati (ad es., Carbohydrate column 700 CH, HyperRez XP Carbohydrate H⁺)

Volume iniettato: 25 µL

Fase mobile: acqua (3.1)

Flusso: 0,4 mL/min.

Temp. colonna: 80 °C

Interfaccia liquida:

Soluzione di persolfato d'ammonio (3.2) (15% in peso) e di acido ortofosforico (2,5% in volume)

Flusso della pompa peristaltica: 0,6 mL/min.

Temperatura di riscaldamento: 93 °C

Flusso del vettore elio: 15 mL/min.

Flusso dell'elio di essiccazione: 50 mL/min.

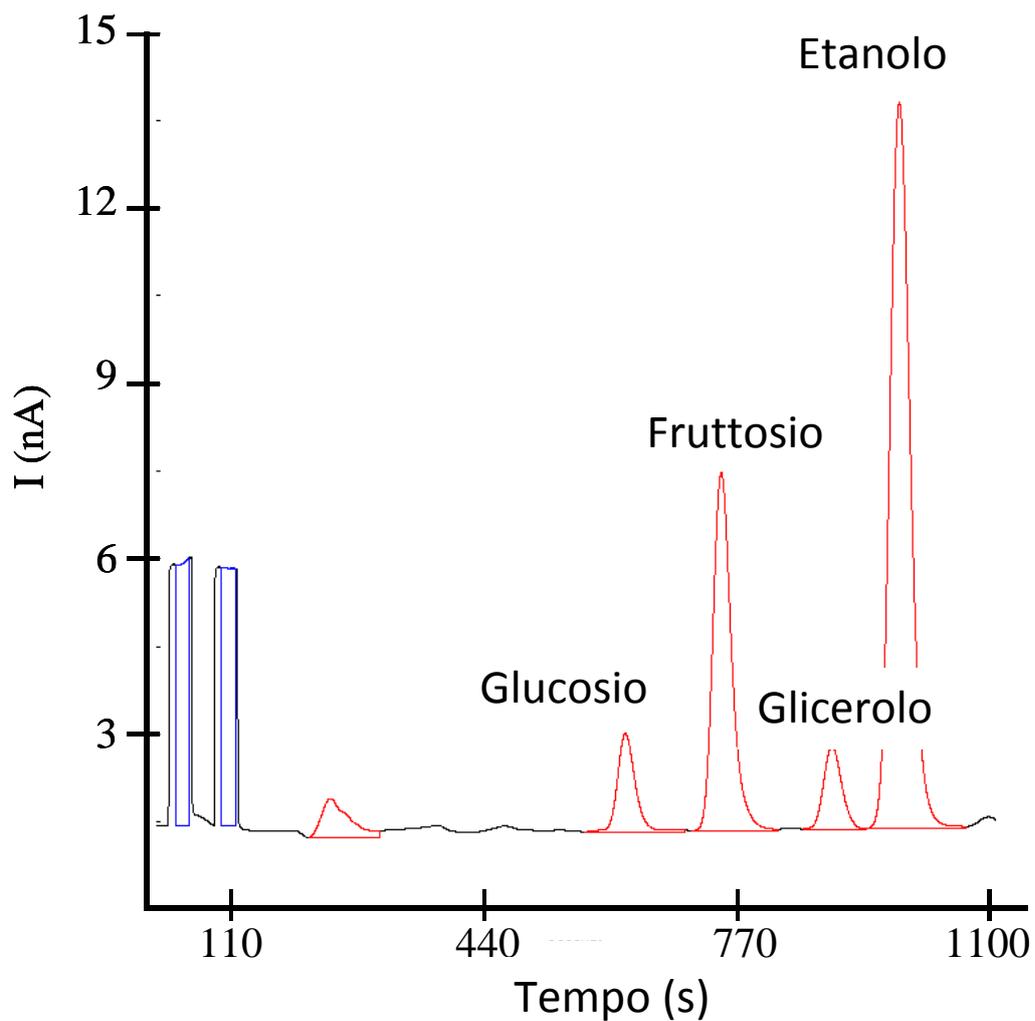
IRMS (spettrometria di massa isotopica):

Corrente della trappola: 300 µA

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

Jean-Marie AURAND

5.3 Esempio di cromatogramma



Cromatogramma di un vino dolce analizzato mediante HPLC-co-IRMS

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

Jean-Marie AURAND

6. Determinazione del rapporto isotopico

Il gas di riferimento (CO₂) è stato calibrato sulla base degli standard internazionali del commercio. I rapporti isotopici sono espressi in δ ‰ in relazione al Pee Dee Belemnite (PDB) e sono definiti come segue:

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{Camp}} (\text{‰}) = [(R_{\text{Camp}} / R_{\text{St}}) - 1] \times 10^3$$

dove: Camp: campione; St: standard; R: rapporto isotopico ¹³C/¹²C.

7. Caratteristiche del metodo

Le caratteristiche del metodo di misurazione del rapporto isotopico di δ¹³C nel glucosio, fruttosio, glicerolo ed etanolo mediante HPLC-co-IRMS sono state determinate a partire dai risultati ottenuti da una catena di analisi inter-laboratorio su 4 campioni (vino secco, vino dolce, succo d'uva e mosto concentrato rettificato). I risultati ottenuti per ogni composto analizzato e per ciascun tipo di matrice sono riportati nell'allegato.

8. Bibliografia

1. Cabanero, Al.; Recio, JL.; Rupérez, M. (2008) *Isotope ratio mass spectrometry coupled to liquid and gas chromatography for wine ethanol characterization*. Rapid Commun. Mass Spectrom. 22: 3111-3118.
2. Cabanero, Al.; Recio, JL.; Rupérez, M. (2010) *Simultaneous stable carbon isotopic analysis of wine glycerol and ethanol by liquid chromatography coupled to isotope ratio mass spectrometry*. J. Agric. Food Chem. 58: 722-728.
3. Guyon, F.; Gaillard, L.; Salagoity, MH.; Médina, B. (2011) *Intrinsic Ratios of Glucose, Fructose, Glycerol and Ethanol ¹³C/¹²C Isotopic Ratio Determined by HPLC-co-IRMS: Toward Determining Constants for Wine Authentication*. Anal. Bioanal. Chem. 401: 1551-1558.

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

Jean-Marie AURAND

Allegato

**Trattamento statistico della catena d'analisi condotta con HPLC-co-IRMS
per la determinazione della precisione del metodo (ripetibilità e riproducibilità)**

Elenco dei laboratori in ordine alfabetico dei paesi di origine:

Paese	Laboratorio
Belgio	IRMM
Cina	CNRIFFI
Repubblica ceca	SZPI
Francia	SCL-33
Germania	INTERTEK
Germania	UNI DUE
Germania	ELEMENTAR
Germania	QSI
Germania	LVI
Giappone	AKITA Univ.
Italia	FLORAMO
Spagna	MAGRAMA

Risposte:

12 laboratori/14 risposte

L'elaborazione dei risultati della catena inter-laboratorio è stata effettuata secondo la norma ISO 5725-2.

Campioni:

- 1 vino secco (Vino A)
- 1 vino dolce (Vino B)
- 1 mosto concentrato rettificato (MCR)
- 1 succo d'uva

Condizioni analitiche:

Ogni campione è stato analizzato in duplicato (ripetibilità) e in doppio cieco (riproducibilità).
I risultati sono espressi in ‰ rispetto al PDB.

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

Jean-Marie AURAND

Precisione di misura per il glucosio

Ripetibilità e riproducibilità

	Vino B	MCR	Succo d'uva
Numero di laboratori	12	12	12
Numero di risposte	14	13	14
Numero di risposte considerate (eliminazione dei valori aberranti)	13	13	12
Valore minimo	-26,33	-25,04	-25,78
Valore massimo	-23,72	-23,74	-24,62
Valore medio	-25,10	-24,24	-25,19
Varianza di ripetibilità	0,02	0,01	0,01
Scarto tipo di ripetibilità (S_r)	0,14	0,10	0,09
Limite di ripetibilità (r ‰)	0,40	0,29	0,24
Varianza di riproducibilità	0,39	0,14	0,11
Scarto tipo di riproducibilità (S_R)	0,62	0,38	0,33
Limite di riproducibilità (R ‰)	1,77	1,06	0,94

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

Jean-Marie AURAND

Precisione di misura per il fruttosio

Ripetibilità e riproducibilità

	Vino B	MCR	Succo d'uva
Numero di laboratori	12	11	12
Numero di risposte	14	13	14
Numero di risposte considerate (eliminazione dei valori aberranti)	13	13	13
Valore minimo	-25,56	-24,19	-25,33
Valore massimo	-24,12	-23,19	-23,98
Valore medio	-24,87	-23,65	-24,56
Varianza di ripetibilità	0,02	0,03	0,02
Scarto tipo di ripetibilità (S_r)	0,14	0,16	0,14
Limite di ripetibilità (r ‰)	0,40	0,46	0,39
Varianza di riproducibilità	0,15	0,10	0,18
Scarto tipo di riproducibilità (S_R)	0,39	0,32	0,42
Limite di riproducibilità (R ‰)	1,10	0,90	1,19

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

Jean-Marie AURAND

Precisione di misura per il glicerolo

Ripetibilità e riproducibilità

	Vino A	Vino B
Numero di laboratori	12	12
Numero di risposte	12	12
Numero di risposte considerate (eliminazione dei valori aberranti)	11	11
Valore minimo	-32,91	-30,74
Valore massimo	-30,17	-28,27
Valore medio	-31,75	-29,54
Varianza di ripetibilità	0,13	0,04
Scarto tipo di ripetibilità (S_r)	0,36	0,19
Limite di ripetibilità (r ‰)	1,03	0,55
Varianza di riproducibilità	0,57	0,37
Scarto tipo di riproducibilità (S_R)	0,76	0,61
Limite di riproducibilità (R ‰)	2,14	1,72

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

Jean-Marie AURAND

Precisione di misura per l'etanolo

Ripetibilità e riproducibilità

	Vino A	Vino B
Numero di laboratori	12	12
Numero di risposte	11	12
Numero di risposte considerate (eliminazione dei valori aberranti)	10	12
Valore minimo	-27,85	-27,60
Valore massimo	-26,50	-26,06
Valore medio	-27,21	-26,82
Varianza di ripetibilità	0,03	0,03
Scarto tipo di ripetibilità (S_r)	0,16	0,17
Limite di ripetibilità ($r \text{ ‰}$)	0,47	0,47
Varianza di riproducibilità	0,16	0,23
Scarto tipo di riproducibilità (S_R)	0,40	0,47
Limite di riproducibilità ($R \text{ ‰}$)	1,14	1,34

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

Jean-Marie AURAND