



RISOLUZIONE OIV-OENO 622-2019

DETERMINAZIONE DELL'ACIDO D-GLUCONICO NEI VINI E NEI MOSTI MEDIANTE METODO ENZIMATICO AUTOMATIZZATO

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 di analisi",

DECIDE di inserire nell'allegato A della *Raccolta dei metodi internazionali di analisi dei vini e dei mosti* il metodo seguente:

DETERMINAZIONE DELL'ACIDO D-GLUCONICO NEI VINI E NEI MOSTI MEDIANTE METODO ENZIMATICO AUTOMATIZZATO

(Metodo di tipo II)

1. Campo di applicazione

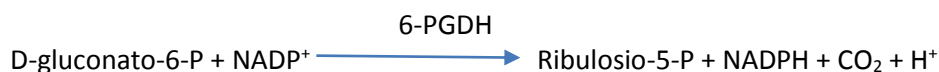
Questo metodo consente di determinare l'acido D-gluconico nei vini e nei mosti mediante un'analisi enzimatica specifica avvalendosi di un analizzatore automatico sequenziale, con concentrazioni dell'analita che vanno da 0,06 g/L a 5,28 g/L (tenendo in considerazione la possibilità di diluire il campione).

2. Principio

Il D-gluconato presente nel campione viene fosforilato in D-gluconato-6-fosfato dall'adenosina trifosfato (ATP) tramite una reazione enzimatica catalizzata dalla gluconato-chinasi (GK), con formazione di adenosina difosfato (ADP).



In presenza di NAPD (nicotinammide adenin dinucleotide fosfato), il D-gluconato-6-fosfato viene ossidato a ribulosio-5-fosfato dall'enzima 6-fosfogluconato deidrogenasi (6-PGDH). La quantità di nicotinammide adenin dinucleotide fosfato ridotto (NADPH) prodotto corrisponde a quella del D-gluconato-6-fosfato e, pertanto, a quella dell'acido D-gluconico.



Il nicotinamide adenin dinucleotide fosfato ridotto (NADPH) si determina mediante spettrofotometria a 340 nm (ovvero, alla lunghezza d'onda alla quale l'assorbimento del NADPH è massimo). La concentrazione di NADPH è proporzionale a quella dell'acido D-gluconico.

3. Reagenti e soluzioni

3.1. Reagenti:

- 3.1.1. Acqua distillata per uso analitico e di qualità EN ISO 3696
- 3.1.2. PIPES (acido 1,4-piperazinodietansulfonico) (N. CAS 5625-37-6)
- 3.1.3. β -NADP- Na_2 (β -nicotinamide adenin dinucleotide fosfato, sale disodico) (N. CAS 24292-60-2)
- 3.1.4. $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (cloruro di magnesio esaidrato) (N. CAS 7791-18-6)
- 3.1.5. ATP- Na_2 (adenosina 5'-trifosfato, sale disodico) (N. CAS 987-65-5)
- 3.1.6. Gluconato-chinasi (GK) (EC 2.7.1.12)
- 3.1.7. 6-fosfogluconato deidrogenasi (6-PGDH) (EC 1.1.1.44)
- 3.1.8. Sale sodico di acido D-gluconico (N. CAS 527-07-1), purezza minima $\geq 99\%$
- 3.1.9. NaOH (idrossido di sodio) (N. CAS 1310-73-2)
- 3.1.10. PVP K-90 (Polivinilpirrolidone K-90) (N. CAS 9003-39-8)

3.2. Soluzioni di lavoro

- 3.2.1. Reagente 1: disciogliere 30,2 g di PIPES (3.1.2.) (100 mmol/L), 1 g di β -NADP- Na_2 (3.1.3.) (1,3 mmol/L), 5,28 g di NaOH (3.1.9.) e 5 g di PVP K-90 (3.1.10.) in 1 L di acqua distillata (3.1.1.). Il pH deve essere compreso in un intervallo di 6,3-6,4. Questa soluzione rimane stabile per almeno 4 settimane a 2-8 °C.
- 3.2.2. Reagente 2: disciogliere 30,2 g di PIPES (3.1.2.) (100 mmol/L), 1 g di $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (3.1.4.), 4,84 g di ATP- Na_2 (3.1.5.) e 7,6 g di NaOH (3.1.9.) in 1 L di acqua distillata (3.1.1.). Il pH deve rimanere in un intervallo di 7,0-7,2. Aggiungere 10 KU di gluconato-chinasi (3.1.6.) e 10 KU di 6-fosfogluconato deidrogenasi (3.1.7.). Questa soluzione rimane stabile per almeno 4 settimane a 2-8 °C.

3.3. Soluzioni di calibrazione

Le soluzioni di calibrazione vengono preparate, mediante pesata, partendo dalla soluzione standard di sale sodico dell'acido D-gluconico (3.1.8.). Le concentrazioni devono rientrare nell'intervallo lineare del metodo (0,06 g/L).

Nota 1: Le istruzioni riportate sopra servono per preparare 1 L di reagente. È possibile preparare altri volumi secondo le necessità del laboratorio.



Nota 2: Per la determinazione dell'acido D-gluconico sono reperibili in commercio dei kit. L'utilizzatore deve controllare che i kit includano i reagenti menzionati sopra.

4. Attrezzatura

- 4.1. Analizzatore automatico sequenziale con controllo della temperatura (circa 37 °C), impostato per la misurazione dell'assorbanza a 340 nm. Lo strumento deve essere dotato di un software in grado di facilitare l'acquisizione dei dati ed eseguire i calcoli necessari.
- 4.2. Spettrometro o fotometro per misurare l'assorbanza a 340 nm
- 4.3. Cuvette di vetro, quarzo o metacrilato
- 4.4. Vetreria da laboratorio (matraci, pipette, ecc.) di classe A
- 4.5. Micropipette
- 4.6. Bilancia analitica con precisione di $\pm 0,0001$ g
- 4.7. pH-metro

5. Preparazione dei campioni

Se necessario, seguire il procedimento di preparazione del campione corrispondente.

- 5.1. In caso di presenza di particelle in sospensione, filtrare o centrifugare i campioni.
- 5.2. Degassificare i campioni contenenti biossido di carbonio attraverso l'agitazione sotto vuoto, un bagno ad ultrasuoni o qualsiasi altro mezzo che permetta di raggiungere il livello di degassaggio richiesto.
- 5.3. I campioni con una concentrazione superiore al limite di linearità specificato (2 g/L) devono essere diluiti con acqua distillata (3.1.1.). Moltiplicare la concentrazione ottenuta per il fattore di diluizione.

6. Procedimento

Poiché è possibile utilizzare diversi analizzatori, si raccomanda di seguire scrupolosamente le istruzioni del fabbricante. Lo stesso vale per i kit enzimatici disponibili in commercio. I procedimenti sono indicati di seguito (i volumi forniti sono solo a titolo esemplificativo).

6.1. Procedimento manuale

- 6.1.1. Preriscaldare i reagenti e impostare il fotometro a 37 °C.
- 6.1.2. Pipettare in una cuvetta:

	Bianco del reagente (BR)	Standard/campione
Standard/campione	-	33 μ L
Acqua distillata	33 μ L	-
Reagente 1	800 μ L	800 μ L



6.1.3. Miscelare e incubare per 1 minuto a 37 °C. Leggere l'assorbanza (A1) a 340 nm.

6.1.4. Pipettare nella cuvetta:

Reagente 2	200 µL	200 µL
------------	--------	--------

6.1.5. Miscelare e incubare per 10 minuti a 37 °C. Leggere l'assorbanza (A2) del bianco del reagente, dello standard e del campione a 340 nm.

6.2. Procedimento automatizzato

6.2.1 Impostare l'analizzatore automatico (conforme ai requisiti del punto 4.1.) con i parametri presenti di seguito:

Lunghezza d'onda:	340 nm
Temperatura:	37 °C
Metodo di analisi:	2 punti (differenziale)
Volume del campione:	10 µL
Volume del reagente 1:	240 µL
Volume del reagente 2:	60 µL

6.2.2 Programmare l'analizzatore affinché esegua la seguente sequenza:

	Bianco del reagente (BR)	Standard/campione
Standard/campione	-	10 µL
Acqua distillata	10 µL	-
Reagente 1	240 µL	240 µL

Miscelare, incubare per 1-5 minuti e leggere l'assorbanza (A1). Successivamente aggiungere:

Reagente 2	60 µL	60 µL
------------	-------	-------

Miscelare, incubare per 10 minuti e leggere l'assorbanza (A2).

Lo strumento effettua delle misurazioni a intervalli regolari. Ciò consente di ottenere le cinetiche di reazione (fig. 1).

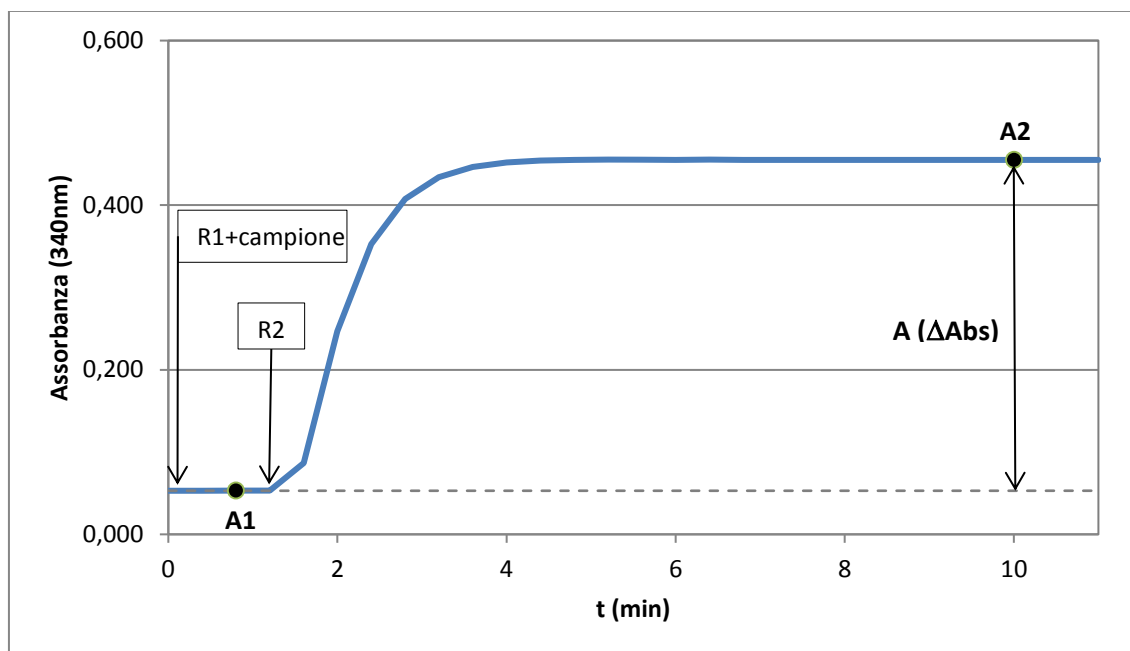


Figura 1: Esempio di cinetica di reazione

6.2.3. Si consiglia di verificare la calibrazione effettuando tre controlli distribuiti nell'intervallo di misura. Ogni laboratorio deve stabilire il proprio programma interno di controllo qualità nonché le procedure di correzione qualora i controlli non soddisfino i livelli di tolleranza accettabili.

7. Calcoli

Calcolare la concentrazione di acido D-gluconico utilizzando la formula seguente:

- Se la calibrazione viene realizzata con un punto (standard) e il bianco:

$$\frac{A2 - 0,81 \times A1)_{\text{Campione}} - (A2 - 0,81 \times A1)_{\text{BR}}}{(A2 - 0,81 \times A1)_{\text{Standard}} - (A2 - 0,81 \times A1)_{\text{BR}}} \times F \times \text{g/L}_{\text{Standard}} = \text{g/L}_{\text{Campione}}$$

- Se la calibrazione viene realizzata con una retta:

$$A = (A2 - 0,81 \times A1)_{\text{Campione}} - (A2 - 0,81 \times A1)_{\text{BR}}$$

Per ottenere la concentrazione di acido D-gluconico, le assorbanze calcolate (A) si interpolano alla retta di calibrazione (fig. 2). Moltiplicare quindi la concentrazione ottenuta per il fattore di diluizione (F).

A1: assorbanza del Bianco/Standard/Campione + Reagente 1

A2: assorbanza del Bianco/Standard/Campione + Reagente 1 + Reagente 2

BR: bianco del reagente



0,81: fattore di correzione della diluizione del reagente 1 (può variare in base ai volumi utilizzati secondo la formula $[\text{Vol. campione} + \text{Reagente 1}]/[\text{Vol. campione} + \text{Reagente 1} + \text{Reagente 2}]$).

F: fattore di diluizione del campione (da applicare ove necessario)

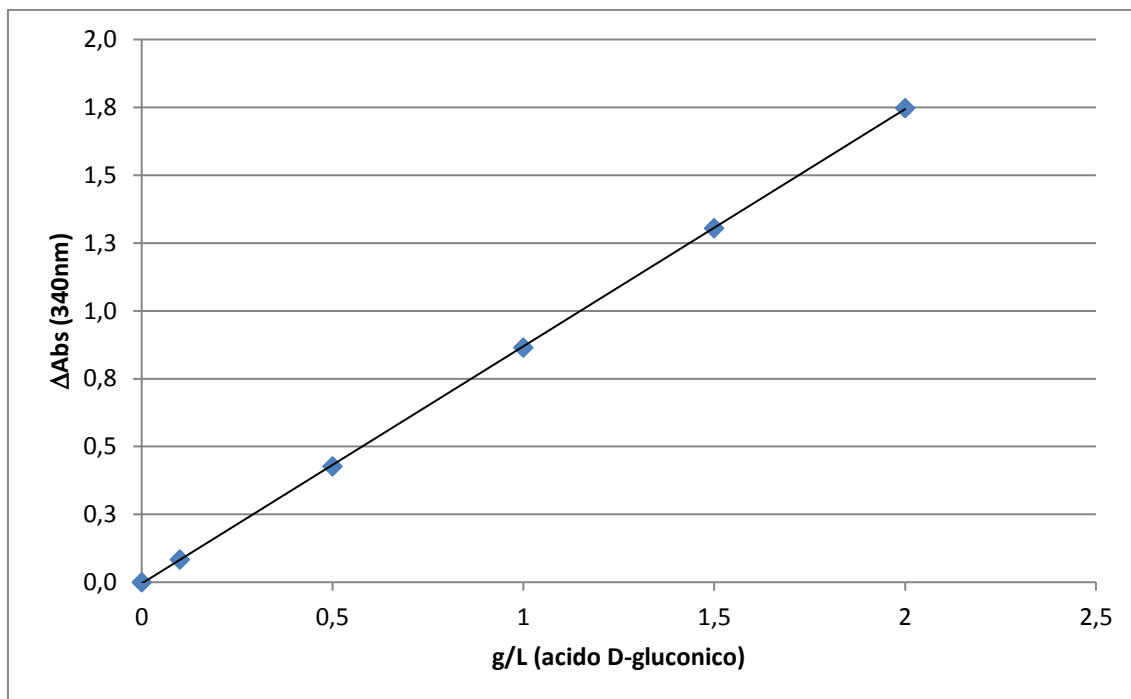


Figura 2: Esempio di retta di calibrazione

8. Espressione dei risultati

I risultati si esprimono in g/L, con due cifre decimali o in base all'incertezza.

9. Caratteristiche del metodo enzimatico automatizzato

9.1. Ripetibilità

$$r = 0,0396x + 0,0098$$

Dove x rappresenta la concentrazione di acido gluconico in g/L.

9.2 Riproducibilità

$$R = 0.1226x + 0.0237$$

Dove x rappresenta la concentrazione di acido gluconico in g/L.

Esemplare certificato conforme Ginevra, il 19 luglio 2019
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale

Pau ROCA



9.3 Limite di quantificazione

LoQ di validazione = 0,06 g/L

Esemplare certificato conforme Ginevra, il 19 luglio 2019
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale

Pau ROCA

ALLEGATO
Risultati dello studio inter-laboratorio

1. Studio collaborativo

1.1. Laboratori partecipanti: hanno partecipato 19 laboratori di 6 diversi paesi.

Laboratorio	Paese
Agroscope	Svizzera
Biosystems S.A	Spagna
Bundesamt für Weinbau	Austria
Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR)	Germania
Centrolab 2006, S.L	Spagna
Comité Champagne Comité Interprofessionnel du vin de Champagne (CIVC)	Francia
Estación de Viticultura y Enología de Navarra (EVENA)	Spagna
Estación de Viticultura y Enología Alcázar de San Juan	Spagna
Estación Enológica de Castilla y León (ITACyL)	Spagna
Estación Enológica de Haro	Spagna
Federal College and Research Institute for Viticulture and Pomology (HBLA)	Austria
Freixenet S.A	Spagna
Institut Català de la Vinya i el Vi (INCAVI)	Spagna
Instituto dos Vinhos do Douro e do Porto (IVDP)	Portogallo
Laboratoires Dœnos Rhône	Francia
Laboratoires Dubernet	Francia
Laboratorio Arbitral Agroalimentario	Spagna
Landesuntersuchungsamt, Institut für Lebensmittelchemie und Arzneimittelprüfung	Germania
Miguel Torres, SA	Spagna

Per l'analisi sono stati utilizzati 2 x 10 campioni in doppio cieco, con 1 ripetizione.

1.2. Campioni

Campione	Vial	Tipo di campione
A	1/12	Moscatel
B	2/11	Mosto concentrato
C	3/13	Mosto solfitato
D	4/15	Vino bianco
E	5/14	Vino bianco
F	6/16	Vino rosato
G	7/10	Vino rosso
H	8/19	Vino rosso
I	9/18	Vino rosso
J	17/20	Matrice sintetica

Esemplare certificato conforme Ginevra, il 19 luglio 2019
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale

Pau ROCA



1.3. Risultati del metodo automatizzato

		A		B		C		D		E		F		G		H		I		J	
		1	12	2	11	3	13	4	15	5	14	6	16	7	10	8	19	9	18	17	20
1	Rip #1	2,10	2,00	1,00	1,00	0,23	0,23	0,29	0,28	0,10	0,11	2,72	2,72	5,20	5,25	0,15	0,15	0,49	0,48	0,06	0,06
	Rip #2	2,01	2,02	0,99	1,00	0,22	0,23	0,30	0,29	0,11	0,10	2,70	2,68	5,13	5,18	0,14	0,14	0,48	0,49	0,05	0,06
	$\bar{X}_{(1)}$	2,06	2,01	1,00	1,00	0,23	0,23	0,30	0,29	0,11	0,11	2,71	2,70	5,17	5,22	0,15	0,15	0,49	0,49	0,06	0,06
2	Rip #1	1,95	2,02	1,02	0,99	0,23	0,23	0,29	0,30	0,10	0,09	2,79	2,72	5,27	5,24	0,13	0,13	0,47	0,46	0,05	0,05
	Rip #2	2,00	2,10	1,03	1,01	0,23	0,23	0,29	0,30	0,11	0,10	2,75	2,80	5,30	5,20	0,13	0,13	0,47	0,45	0,05	0,05
	$\bar{X}_{(2)}$	1,97	2,06	1,03	1,00	0,23	0,23	0,29	0,30	0,11	0,10	2,77	2,76	5,28	5,22	0,13	0,13	0,47	0,45	0,05	0,05
3	Rip #1	2,19	2,19	1,06	1,07	0,27	0,28	0,34	0,33	0,13	0,13	2,95	3,06	5,54	5,63	0,08	0,08	0,51	0,50	0,06	0,06
	Rip #2	2,21	2,30	1,09	1,07	0,27	0,28	0,34	0,34	0,13	0,13	2,95	2,99	5,51	5,68	0,07	0,08	0,49	0,50	0,06	0,06
	$\bar{X}_{(3)}$	2,20	2,24	1,07	1,07	0,27	0,28	0,34	0,34	0,13	0,13	2,95	3,02	5,53	5,66	0,07	0,08	0,50	0,50	0,06	0,06
4	Rip #1	2,10	2,10	1,02	1,05	0,23	0,24	0,28	0,29	0,10	0,10	2,70	2,80	3,78	3,94	0,13	0,12	0,45	0,46	0,10	0,10
	Rip #2	2,08	2,12	1,03	1,04	0,24	0,25	0,29	0,29	0,10	0,11	2,72	2,82	3,80	3,98	0,13	0,13	0,45	0,45	0,10	0,10
	$\bar{X}_{(4)}$	2,09	2,11	1,03	1,05	0,24	0,25	0,29	0,29	0,10	0,11	2,71	2,81	3,79	3,96	0,13	0,13	0,45	0,46	0,10	0,10
5	Rip #1	1,88	1,94	0,98	0,96	0,22	0,33	0,27	0,26	0,10	0,09	2,68	2,58	4,95	4,90	0,11	0,08	0,43	0,42	0,04	0,05
	Rip #2	2,06	2,12	0,99	1,00	0,24	0,23	0,29	0,29	0,11	0,09	3,08	2,84	5,40	5,30	0,12	0,15	0,47	0,48	0,07	0,06
	$\bar{X}_{(5)}$	1,97	2,03	0,99	0,98	0,23	0,28	0,28	0,28	0,11	0,09	2,88	2,71	5,18	5,10	0,12	0,12	0,45	0,45	0,06	0,06
6	Rip #1	2,06	2,02	1,00	1,01	0,22	0,23	0,28	0,29	0,10	0,10	2,80	2,78	5,22	5,22	0,12	0,12	0,46	0,46	0,05	0,05
	Rip #2	1,98	2,01	0,99	1,00	0,22	0,22	0,27	0,28	0,09	0,10	2,75	2,75	5,22	5,22	0,12	0,11	0,45	0,46	0,05	0,05
	$\bar{X}_{(6)}$	2,02	2,02	0,99	1,00	0,22	0,23	0,28	0,29	0,09	0,10	2,78	2,77	5,22	5,22	0,12	0,12	0,45	0,46	0,05	0,05
7	Rip #1	2,02	2,02	0,98	0,99	0,23	0,23	0,29	0,29	0,11	0,11	2,74	2,75	5,28	5,16	0,13	0,13	0,46	0,47	0,05	0,06
	Rip #2	2,01	2,01	0,98	0,99	0,23	0,23	0,30	0,29	0,11	0,12	2,75	2,74	5,28	5,22	0,14	0,14	0,46	0,47	0,05	0,05
	$\bar{X}_{(7)}$	2,02	2,02	0,98	0,99	0,23	0,23	0,30	0,29	0,11	0,12	2,75	2,75	5,28	5,19	0,14	0,14	0,46	0,47	0,05	0,06
8	Rip #1	2,09	2,11	1,02	1,01	0,24	0,24	0,29	0,29	0,10	0,09	2,83	2,84	5,20	5,25	0,10	0,10	0,47	0,46	0,05	0,05
	Rip #2	2,10	2,09	1,00	1,01	0,24	0,23	0,29	0,29	0,10	0,10	2,80	2,78	5,18	5,18	0,10	0,08	0,47	0,47	0,05	0,05
	$\bar{X}_{(8)}$	2,10	2,10	1,01	1,01	0,24	0,24	0,29	0,29	0,10	0,10	2,82	2,81	5,19	5,22	0,10	0,09	0,47	0,47	0,05	0,05
9	Rip #1	1,94	2,02	1,00	1,00	0,24	0,24	0,29	0,29	0,11	0,11	2,74	2,74	5,15	5,25	0,15	0,15	0,47	0,48	0,06	0,06
	Rip #2	1,94	2,00	1,00	1,00	0,24	0,24	0,29	0,29	0,11	0,11	2,76	2,74	5,10	5,10	0,14	0,15	0,47	0,47	0,06	0,06
	$\bar{X}_{(9)}$	1,94	2,01	1,00	1,00	0,24	0,24	0,29	0,29	0,11	0,11	2,75	2,74	5,13	5,18	0,15	0,15	0,47	0,48	0,06	0,06
10	Rip #1	1,95	2,05	1,00	1,00	0,23	0,23	0,29	0,29	0,11	0,10	2,70	2,65	5,20	5,30	0,14	0,14	0,48	0,45	0,05	0,05
	Rip #2	2,00	2,00	0,99	1,00	0,23	0,25	0,28	0,29	0,10	0,11	2,70	2,75	5,40	5,30	0,13	0,13	0,48	0,46	0,05	0,05
	$\bar{X}_{(10)}$	1,98	2,03	1,00	1,00	0,23	0,24	0,29	0,29	0,11	0,11	2,70	2,70	5,30	5,30	0,14	0,14	0,48	0,46	0,05	0,05
11	Rip #1	0,10	<0,05	<0,05	<0,05	0,23	0,25	0,29	0,33	0,08	0,10	0,13	0,26	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	0,06	0,05
	Rip #2	0,10	<0,05	<0,05	<0,05	0,25	0,24	0,28	0,27	0,08	0,10	0,13	0,26	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	0,05	0,05
	$\bar{X}_{(11)}$	0,10	-	-	-	0,24	0,25	0,29	0,30	0,08	0,10	0,13	0,26	-	-	-	-	-	-	0,06	0,05
12	Rip #1	2,49	2,47	1,17	1,16	0,29	0,27	0,38	0,38	0,14	0,13	3,51	3,42	6,37	6,12	0,18	0,18	0,61	0,60	0,06	0,05
	Rip #2	2,56	2,53	1,16	1,20	0,30	0,28	0,38	0,37	0,14	0,13	3,43	3,32	6,28	6,24	0,18	0,18	0,61	0,60	0,06	0,05
	$\bar{X}_{(12)}$	2,53	2,50	1,17	1,18	0,30	0,28	0,38	0,38	0,14	0,13	3,47	3,37	6,33	6,18	0,18	0,18	0,61	0,60	0,06	0,05
13	13a	2,05	2,06	0,98	0,98	0,22	0,22	0,28	0,27	0,10	0,10	2,76	2,74	5,27	5,18	0,13	0,15	0,46	0,45	0,05	0,05
	13b	2,05	2,06	0,98	0,98	0,22	0,22	0,28	0,27	0,10	0,10	2,76	2,74	5,27	5,18	0,13	0,15	0,46	0,45	0,05	0,05
	$\bar{X}_{(13)}$	2,05	2,06	0,98	0,98	0,22	0,22	0,28	0,27	0,10	0,10	2,76	2,74	5,27	5,18	0,13	0,15	0,46	0,45	0,05	0,05
14	Rip #1	1,86	1,86	0,96	0,96	0,23	0,24	0,29	0,32	0,11	0,10	2,57	2,64	4,99	5,19	0,17	0,11	0,50	0,39	0,05	0,09
	Rip #2	1,88	1,86	0,95	0,97	0,23	0,23	0,29	0,32	0,15	0,1	2,56	2,65	5,00	5,10	0,15	0,11	0,45	0,34	0,06	0,05
	$\bar{X}_{(14)}$	1,87	1,86	0,96	0,97	0,23	0,24	0,29	0,32	0,13	0,10	2,57	2,65	5,00	5,15	0,16	0,11	0,48	0,37	0,06	0,07
15	Rip #1	1,91	1,98	1,11	1,12	0,30	0,31	0,32	0,33	0,10	0,11	3,23	3,13	5,88	6,01	0,13	0,16	0,50	0,52	0,02	0,04
	Rip #2	1,93	1,99	1,12	1,13	0,31	0,32	0,32	0,34	0,09	0,12	3,24	3,14	5,90	6,08	0,12	0,17	0,51	0,53	0,02	0,04
	$\bar{X}_{(15)}$	1,92	1,99	1,12	1,13	0,31	0,32	0,32	0,34	0,10	0,12	3,24	3,14	5,89	6,05	0,13	0,17	0,51	0,53	0,02	0,04
16	Rip #1	1,98	1,99	1,00	1,00	0,23	0,23	0,28	0,28	0,10	0,10	2,78	2,82	5,27	5,34	0,13	0,13	0,47	0,47	0,05	0,05
	Rip #2	2,04	2,08	0,99	1,00	0,23	0,23	0,28	0,28	0,10	0,10	2,79	2,81	5,30	5,28	0,14	0,14	0,47	0,47	0,05	0,05
	$\bar{X}_{(16)}$	2,01	2,04	1,00	1,00	0,23	0,23	0,28	0,28	0,10	0,10	2,79	2,82	5,29	5,31	0,14	0,14	0,47	0,47	0,05	0,05



Tavola dei dati ottenuti. I valori in corsivo corrispondono ai valori rifiutati secondo il test di Grubbs bilaterale semplice (valori aberranti) e secondo il test di Grubbs doppio (bilaterale, P = 2,5%) nonché al test di Cochran (unilaterale, P = 2,5%).

Campione	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
N° laboratori presi in considerazione	16	15	17	16	16	16	15	15	15	16
N° ripetizioni	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Minimo	1,87	0,96	0,22	0,28	0,09	2,61	5,03	0,07	0,45	0,05
Massimo	2,24	1,12	0,31	0,34	0,12	2,81	5,97	0,18	0,52	0,07
Valore medio (g/L)	2,04	1,01	0,25	0,29	0,10	2,79	5,28	0,13	0,47	0,06
S _r	0,03	0,01	0,01	0,01	0,01	0,05	0,08	0,01	0,01	0,01
Limite r = 2√2 * S _r	0,09	0,02	0,02	0,02	0,03	0,13	0,22	0,02	0,02	0,02
RSD _r	1,48%	0,76%	2,13%	1,93%	8,53%	1,70%	1,50%	3,99%	1,70%	9,86%
S riproducibilità (S _R)	0,09	0,04	0,03	0,02	0,01	0,13	0,24	0,03	0,02	0,01
Limite R = 2√2 * S _R	0,28	0,11	0,07	0,05	0,06	0,38	0,67	0,07	0,05	0,02
RSD _R	4,63%	3,96%	10,57%	5,89%	8,91%	4,81%	4,50%	19,21%	4,09%	12,49%
Horwitz RSD _r (%)	3,39%	3,77%	4,66 %	4,54%	5,31%	3,23%	2,94%	5,12%	4,22%	5,84%
HorRat _r	0,44	0,20	0,46	0,43	1,61	0,53	0,51	0,78	0,40	1,69
Horwitz RSD _R (%)	5,08%	5,65%	6,99%	6,81%	7,96%	4,85%	4,40%	7,68%	6,34%	8,75%
HorRat _R	0,91	0,70	1,51	0,86	1,12	0,99	1,02	2,50	0,65	1,43

S: scarto tipo; RSD: scarto tipo relativo; r: limite di ripetibilità; R: limite di riproducibilità.

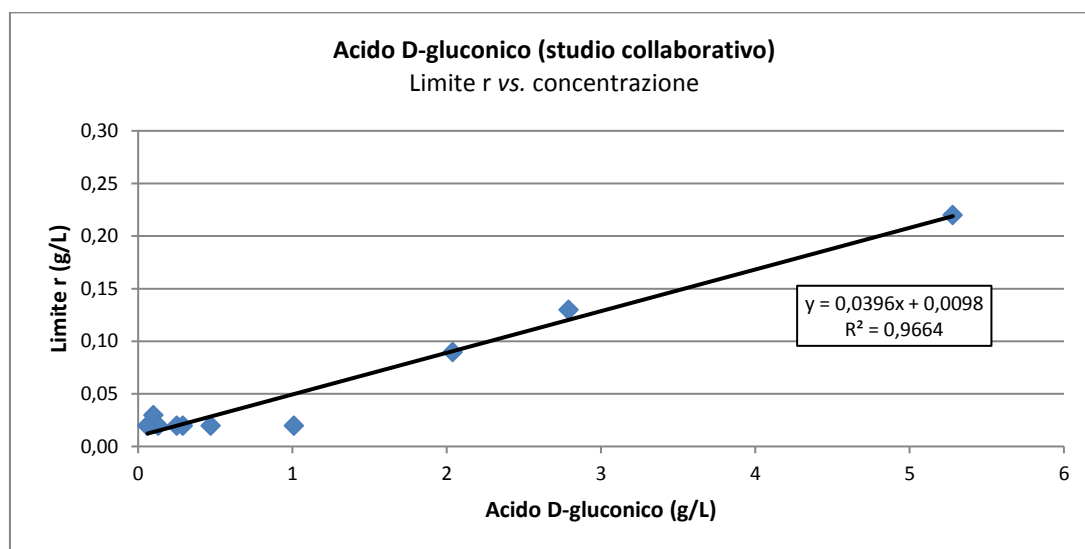


Figura 3: Limite di ripetibilità in base alla concentrazione

Esemplare certificato conforme Ginevra, il 19 luglio 2019
 Il Direttore Generale dell'OIV
 Secretario dell'Assemblea Generale

Pau ROCA

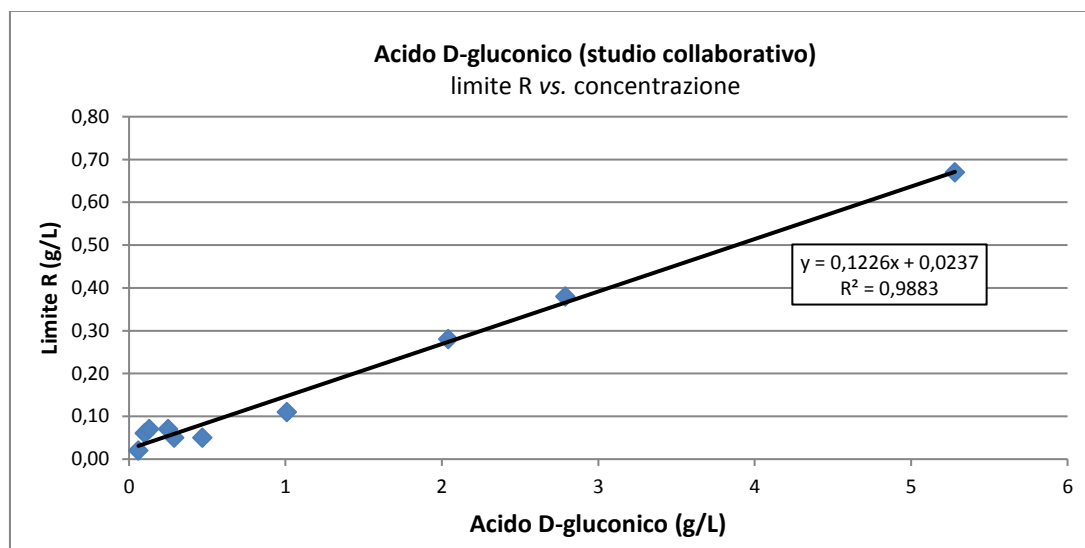


Figura 4: Limite di riproducibilità in base alla concentrazione

1.4. Risultati del metodo manuale

		A		B		C		D		E		F		G		H		I		J	
		1	12	2	11	3	13	4	15	5	14	6	16	7	10	8	19	9	18	17	20
2	Rip #1	2,05	2,09	1,06	0,99	0,25	0,25	0,34	0,33	<i>0,10</i>	<i>0,12</i>	2,85	2,84	5,32	5,34	0,14	0,13	0,45	0,46	0,05	0,05
	Rip #2	2,08	2,10	1,03	1,02	0,23	0,26	0,35	0,32	<i>0,09</i>	<i>0,10</i>	2,83	2,86	5,34	5,36	0,15	0,13	0,44	0,45	0,05	0,05
	$\bar{X}_{(2)}$	2,07	2,10	1,05	1,01	0,24	0,26	0,35	0,33	0,10	0,11	2,84	2,85	5,33	5,35	0,15	0,13	0,45	0,46	0,05	0,05
10	Rip #1	2,24	2,11	1,01	1,04	0,26	0,26	0,34	0,33	0,11	0,11	3,05	3,19	5,64	5,68	0,14	0,16	0,34	0,41	0,05	0,05
	Rip #2	2,37	2,24	1,01	1,06	0,25	0,26	0,35	0,34	0,12	0,11	3,10	3,02	5,65	5,78	0,14	0,15	0,33	0,42	0,05	0,05
	$\bar{X}_{(10)}$	2,31	2,18	1,01	1,05	0,26	0,26	0,35	0,34	0,12	0,11	3,08	3,11	5,65	5,73	0,14	0,16	0,34	0,42	0,05	0,05
18	Rip #1	2,61	2,54	1,04	0,99	0,27	0,28	0,34	0,34	0,13	0,12	3,44	3,38	5,97	6,22	0,21	0,23	0,44	0,47	0,05	0,05
	Rip #2	2,57	2,54	0,97	1,01	0,28	0,28	0,35	0,35	0,12	0,12	3,32	3,42	6,04	6,31	0,21	0,21	0,51	0,53	0,05	0,05
	$\bar{X}_{(18)}$	2,59	2,54	1,00	1,00	0,28	0,28	0,34	0,34	0,12	0,12	3,38	3,40	6,00	6,26	0,21	0,22	0,48	0,50	0,05	0,05

Tavola dei dati ottenuti. I valori in corsivo corrispondono ai valori rifiutati secondo il test di Grubbs bilaterale semplice (valori aberranti) e secondo il test di Grubbs doppio (bilaterale, P = 2,5%) nonché al test di Cochran (unilaterale, P = 2,5%).

Esemplare certificato conforme Ginevra, il 19 luglio 2019
 Il Direttore Generale dell'OIV
 Segretario dell'Assemblea Generale

Pau ROCA



Campione	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
N° laboratori presi in considerazione	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
N° ripetizioni	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Minimo	2,05	0,97	0,23	0,32	0,09	2,83	5,32	0,13	0,33	0,05
Massimo	2,61	1,06	0,28	0,35	0,13	3,44	6,31	0,23	0,53	0,05
Valore medio (g/L)	2,29	1,02	0,26	0,34	0,11	3,11	5,72	0,17	0,44	0,05
S _r	0,06	0,02	0,01	0,01	0,01	0,02	0,11	0,01	0,03	-
Limite r = 2√2* S _r	0,16	0,07	0,02	0,03	0,02	0,04	0,31	0,03	0,10	-
RSD _r	0,03%	0,02%	0,03%	0,03%	0,06%	0,01%	0,02%	0,06%	0,08%	-
S riproducibilità (S _R)	0,25	0,02	0,02	0,01	0,01	0,27	0,41	0,04	0,06	-
Limite R = 2√2* S _R	0,70	0,07	0,05	0,03	0,03	0,77	1,14	0,12	0,17	-
RSD _R	0,11%	0,02%	0,06%	0,03%	0,10%	0,09%	0,07%	0,26%	0,14%	-
Horwitz RSD _r (%)	3,33%	3,76%	4,62%	4,44%	5,24%	3,18%	2,90%	4,94%	4,27%	-
HorRat _r	0,77	0,60	0,55	0,61	1,09	0,16	0,67	1,21	1,82	-
Horwitz RSD _R (%)	4,99%	5,64%	6,92%	6,66%	7,86%	4,77%	4,35%	7,41%	6,41%	-
HorRat _R	2,18	0,42	0,93	0,47	1,30	1,85	1,63	3,46	2,22	-

S: scarto tipo; RSD: scarto tipo relativo; r: limite di ripetibilità; R: limite di riproducibilità.

I parametri statistici sono stati calcolati prendendo in considerazione i risultati dei 3 laboratori.

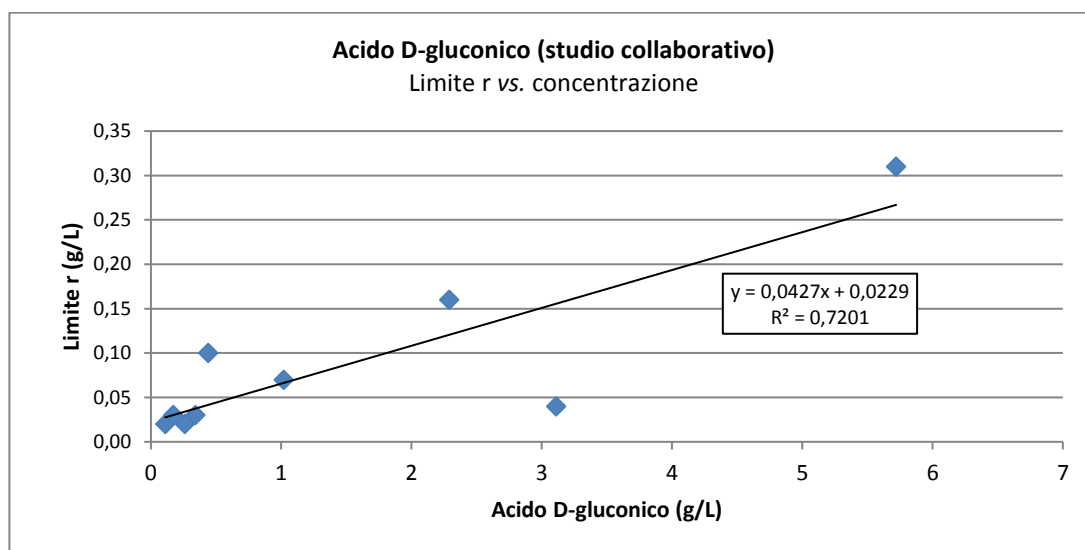


Figura 5: Limite di ripetibilità secondo la concentrazione

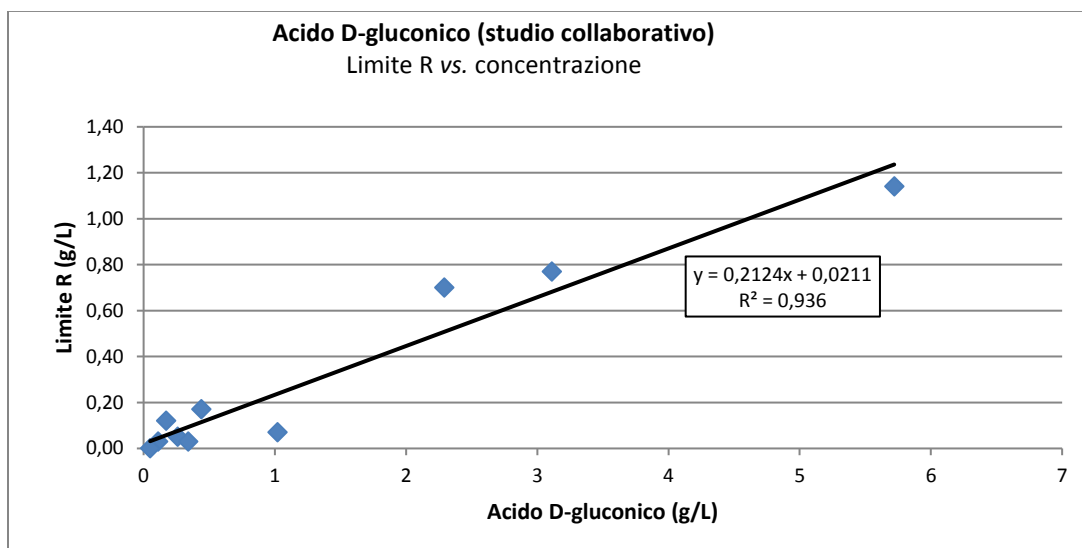


Figura 6: Limite di riproducibilità secondo la concentrazione

2. Bibliografia

Organizzazione internazionale della vigna e del vino (OIV), *Raccolta dei metodi internazionali di analisi dei vini e dei mosti*, Vol. 1 e 2, 2019.

Organizzazione internazionale della vigna e del vino (OIV), "Collaborative Study", *Raccolta dei metodi internazionali di analisi dei vini e dei mosti*, OIV-MA-AS1-07: R2000.

Organizzazione internazionale della vigna e del vino (OIV), "Protocol for the design, conducts and interpretation of collaborative studies", *Raccolta dei metodi internazionali di analisi dei vini e dei mosti*, OIV-MA-AS1-09: R2000.

ISO 13528:2015 (E), Protocol for the design, conducts and interpretation of collaborative studies, 2ª edizione.

Zoecklein, B. W., Fugelsang, K. C., Gump, B. H., Nury, F. S., *Wine analysis and production*, Van Nostrand Reinhold, 1ª edizione, 31 dicembre 1990.