



RISOLUZIONE OIV-OENO 426-2011

DETERMINAZIONE DELLA DISTRIBUZIONE DI DEUTERIO NELL'ETANOLO DERIVATO DALLA FERMENTAZIONE DEI MOSTI DI UVA, DEI MOSTI DI UVA CONCENTRATI, DEI MOSTI DI UVA CONCENTRATI RETTIFICATI E DEI VINI MEDIANTE L'UTILIZZO DELLA RISONANZA MAGNETICA NUCLEARE (SNIFNMR/ RMNFINS)

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

IN VISTA DELLE azioni previste dal Piano Strategico dell'OIV 2009-2012

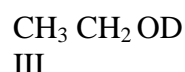
CONSIDERANDO il lavoro svolto dalla Sottocommissione dei Metodi di analisi

DECIDE di sostituire l'attuale metodo per la determinazione della distribuzione del deuterio nell'etanolo derivato dalla fermentazione dei mosti di uve, dei mosti di uve concentrati, dei mosti di uve concentrati rettificati e dei vini mediante l'utilizzo della risonanza magnetica nucleare pubblicato nel Compendio dei metodi internazionali di analisi del vino e del mosto con il seguente metodo Tipo II.

Determinazione della distribuzione di deuterio nell'etanolo derivato dalla fermentazione dei mosti di uva, dei mosti di uva concentrati, dei mosti di uva concentrati rettificati e dei vini mediante l'utilizzo della risonanza magnetica nucleare (SNIF-NMR/ RMN-FINS¹)

1. Introduzione

Il deuterio contenuto negli zuccheri e nell'acqua nel mosto d'uva è ridistribuito dopo la fermentazione nelle molecole I, II, III e IV del vino:



¹ Fractionnement Isotopique Naturel Spécifique étudié par Résonance Magnétique Nucléaire (Frazionamento Isotopico Naturale Specifico di Sito studiato tramite RMN). Brevetto: Francia, 8122710; Europa, 824022099; USA, 854550082; Giappone 57123249.

*Esemplare certificato conforme
Porto, il 24 giugno 2011
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale*

Federico CASTELLUCCI

2. Ambito

Il metodo consente la misurazione dei rapporti isotopici di deuterio (D/H) nell'etanolo del vino e nell'etanolo ottenuto per fermentazione di prodotti della vite (mosti, mosti concentrati, mosti concentrati rettificati).

3. Definizioni

$(D/H)_I$: rapporto isotopico associato alla molecola I

$(D/H)_{II}$: rapporto isotopico associato alla molecola II

$(D/H)_W^Q$: rapporto isotopico dell'acqua nel vino (oppure in prodotti fermentati)

$R = 2(D/H)_{II}/(D/H)_I$

R esprime la relativa distribuzione del deuterio nelle molecole I e II; R è misurato direttamente dalle intensità h (intensità di picco) dei segnali e quindi $R = 3h_{II}/h_I$.

4. Principio

I summenzionati parametri R, $(D/H)_I$ e $(D/H)_{II}$ sono determinati mediante risonanza magnetica nucleare del deuterio nell'etanolo estratto dal vino o dai prodotti di fermentazione del mosto, dal mosto concentrato o dallo zucchero di uva (mosto rettificato concentrato) ottenuto in determinate condizioni.

5. Reagenti e materiali

5.1 Reagenti:

5.1.1 Reagenti per la determinazione dell'acqua con il metodo Karl Fischer (quando questo metodo viene utilizzato per la misurazione del grado alcolico del distillato).

5.1.2 Esafluorobenzene (C_6F_6) utilizzato come sostanza di stabilizzazione campo-frequenza (lock), o, in alternativa Acido trifluoroacetico (TFA, CAS: 76-05-1) o, anidride trifluoroacetica (TFAA, CAS: 407-25-0)

5.2 Materiali di riferimento (disponibili presso l'*Institute for Reference Materials and Measurements IRMM* di Geel (B)):

5.2.1 Provette per campioni NMR sigillate CRM-123, utilizzate per controllare la taratura della strumentazione NMR.

5.2.2 N,N-tetrametil urea (TMU) standard; TMU standard con un rapporto isotopico D/H calibrato.

*Esemplare certificato conforme
Porto, il 24 giugno 2011
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale*

Federico CASTELLUCCI

5.2.3 Altri CRM disponibili utilizzati per verificare le fasi di distillazione e di preparazione:

CRM		Parametro	Valore certificato	Incertezza
CRM-656	Etanolo da vino, 96% vol.			
		t^D (etanolo) in % v/a	94,61	0,05
		$\delta^{13}C$ (etanolo) in ‰ VPDB	-26,91	0,07
		(D/H) _I (etanolo) in ppm	102,84	0,20
		(D/H) _{II} (etanolo) in ppm	132,07	0,30
		R (etanolo)	2,570	0,005
CRM-660	Soluzione idroalcolica, 12% vol.			
		t^Q (etanolo) in % vol.	11,96	0,06
		$\delta^{13}C$ (etanolo) in ‰ VPDB	-26,72	0,09
		(D/H) _I (etanolo) in ppm	102,90	0,16
		(D/H) _{II} (etanolo) in ppm	131,95	0,23
		R	2,567	0,005
		(D/H) _w (acqua) in ppm	148,68	0,14

5.3 Apparecchiatura

5.3.1 Spettrometro NMR corredato di sonda specifica “deuterio” regolato alla frequenza caratteristica ν_0 del campo B_0 (ad esempio, per $B_0 = 7,05$ T, $\nu_0 = 46,05$ MHz e per $B_0 = 9,4$ T, $\nu_0 = 61,4$ MHz) con canale di disaccoppiamento del protone (B2) e canale di stabilizzazione del campo frequenza (lock) alla frequenza fluoro. Lo strumento NMR può essere dotato di un campionatore automatico e di un software di elaborazione dati aggiuntivo per la valutazione degli spettri e il calcolo dei risultati. Le prestazioni dello spettrometro NMR possono essere controllate utilizzando il materiale certificato di riferimento (Certified Reference Material) (provette sigillate CRM-123).

5.3.2 Provette NMR 10 mm

5.3.3 Apparecchiatura di distillazione

Nota: può essere utilizzato qualsiasi metodo per l'estrazione dell'etanolo a condizione che l'alcol del vino sia recuperato senza frazionamento isotopico.

*Esemplare certificato conforme
Porto, il 24 giugno 2011
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale*

Federico CASTELLUCCI

La colonna Cadiot illustrata in figura 1 è un esempio di sistema di distillazione manuale che permette di estrarre dal 96 al 98,5% di etanolo di un vino senza frazionamento isotopico e di ottenere un distillato con una gradazione alcolica da 92 a 93% (m/m) (95% vol.).

Tale sistema è composto da:

- Riscaldatore semisferico elettrico con regolatore di tensione,
- Pallone a fondo rotondo da un litro con collo smerigliato
- Colonna Cadiot con asta rotante (parte mobile in Teflon),
- Beute con collo smerigliato per la raccolta del distillato

Sono disponibili anche sistemi di distillazione automatica.

Le prestazioni del sistema di distillazione possono essere verificate periodicamente sia per la resa dell'estrazione che per l'accuratezza della determinazione isotopica. Questo controllo può essere effettuato mediante distillazione ed analisi di CRM-660.

5.3.4 Sono necessari i seguenti consumabili e le seguenti attrezzature di laboratorio:

- micropipetta con punta adeguata,
- bilancia con sensibilità di 0,1 mg o superiore,
- bilancia con sensibilità di 0,1 g o superiore
- siringa monouso per il trasferimento di liquidi,
- boccette in vetro
- matraccio con taratura di precisione (50 ml, 100 ml, 250 ml, ...)
- matracci dotati di sistemi di chiusura ermetica e setti inerti (per la conservazione di aliquote di vino, distillato e residuo fino alla misurazione)
- attrezzature e consumabili, come specificato per gli altri metodi di cui al presente documento.

Le attrezzature di laboratorio e i consumabili indicati negli elenchi di cui sopra sono esempi e possono essere sostituiti con altri materiali aventi prestazioni equivalenti.

6. Campionamento (Preparazione del campione)

6.1. Se non disponibile, determinare il titolo alcolometrico del vino o del prodotto fermentato (tv) con un'approssimazione il più possibile vicina allo 0,05% vol. (ad esempio, utilizzando il metodo OIV MA-F-AS312-01-TALVOL).

6.2. Estrazione dell'etanolo

Introdurre un campione omogeneo di volume opportuno (V ml) di vino o di prodotto fermentato nel pallone dell'apparecchiatura di distillazione. Inserire una beuta con cono smerigliato per la raccolta del distillato. Scaldare il prodotto da distillare fino ad ottenere un rapporto di riflusso costante al livello del condensatore. Iniziare la raccolta del distillato quando la temperatura dei vapori si stabilizza a quella tipica dell'azeotropo etanolo-acqua (78 °C) e interrompere la raccolta quando la temperatura aumenta. La raccolta del distillato deve continuare fino a quando l'azeotropo etanolo-acqua è completamente recuperato.

Quando si utilizza manualmente una colonna Cadiot (figura 1) si può applicare la seguente

*Esemplare certificato conforme
Porto, il 24 giugno 2011
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale*

Federico CASTELLUCCI

procedura:

- Raccogliere il liquido in ebollizione che corrisponde all'azeotropo etanolo-acqua. Quando la temperatura supera i 78.5°C sospendere la raccolta per cinque minuti. Appena la temperatura torna a 78 °C, ricominciare a raccogliere il distillato fino a quando la temperatura dei vapori aumenta di nuovo. Ripetere l'operazione fino a quando la temperatura, dopo l'interruzione della raccolta, non scende più.

In alternativa, possono essere usati altri sistemi di distillazione disponibili in commercio.

Il distillato raccolto viene pesato (m^D) con approssimazione a 0,1 g o migliore

Al fine di evitare frazionamenti isotopici, il distillato deve essere conservato in una fiala ben chiusa, tale da evitare l'evaporazione, fino all'utilizzo successivo per la determinazione del titolo alcolometrico (6.3) e la preparazione della provetta NMR (7.1).

Nel caso in cui sia necessario determinare il rapporto isotopico $(D/H)^Q_w$ del residuo, ne viene conservata un'aliquota di pochi ml.

6.3. Determinazione del titolo alcolometrico del distillato

Il titolo alcolometrico (% v/a) del distillato deve essere determinato con una precisione superiore a 0,1%.

Il contenuto di acqua del distillato (ρ' g) può essere determinato con il metodo Karl Fischer utilizzando un campione di circa 0,5 ml di alcool con massa (ρ g) precisamente nota. Il titolo alcolometrico tramite massa del distillato è quindi dato da:

$$t_m^D \% m/m = 100 (1 - \rho') / \rho$$

In alternativa, il titolo alcolometrico può essere determinato tramite densimetria utilizzando, ad esempio, un densimetro elettronico.

6.4 Resa della distillazione

La resa della distillazione viene stimata usando la seguente formula:

$$\text{Produzione dist. \%} = 100 t_m^D m^D / (V \cdot t_v)$$

Data l'incertezza relativa ad ogni termine, e in particolare relativa a t_v , la resa della distillazione è stimata intorno a $\pm 0,5\%$ (nel caso di un vino caratterizzato da 10% v/v).

Quando si utilizza la colonna Cadiot, non è atteso alcun effetto significativo di frazionamento isotopico per una resa di estrazione superiore al 96%. L'operatore può utilizzare un volume idoneo V_{ml} di vino o di prodotto fermentato per la distillazione, al fine di garantire che la resa di estrazione sia sufficiente. Di norma, aliquote di 750, 500, 400 e 300 ml di campione di vino sono sufficienti per ottenere una resa del 96% durante la procedura di distillazione con colonna Cadiot di vini o prodotti fermentati rispettivamente con $t_v = 4, 6, 8$ e 10% vol.

6.5. Fermentazione di mosti, mosti concentrati e mosti concentrati rettificati

Prima dell'utilizzo, il lievito può essere riattivato in un piccolo volume di mosto.

Il recipiente di fermentazione è dotato di un dispositivo che permetta di operare senza contatto con l'aria e di evitare la perdita di etanolo.

*Esemplare certificato conforme
Porto, il 24 giugno 2011
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale*

Federico CASTELLUCCI

6.5.1 Mosti

Porre circa un litro di mosto, la cui concentrazione di zuccheri fermentiscibili è stata in precedenza determinata, nel recipiente di fermentazione. Aggiungere circa 1 g di lievito secco riattivato in precedenza. Inserire il dispositivo che consente di operare fuori dal contatto con l'aria. Effettuare la fermentazione fino ad esaurimento degli zuccheri. Il prodotto fermentato viene distillato seguendo la procedura già descritta per il vino nei paragrafi da 6.1 a 6.4.

Nota: i mosti mutizzati mediante l'aggiunta di anidride solforosa, devono essere preventivamente desolfitati. La desolfitazione avviene per gorgogliamento di una corrente di azoto all'interno del mosto riscaldato in bagnomaria a 70-80 °C in condizioni di riflusso, in modo da evitare il frazionamento isotopico dovuto all'evaporazione dell'acqua. In alternativa, l'anidride solforosa può essere eliminata con l'aggiunta di una piccola quantità di una soluzione di perossido di idrogeno (H₂O₂).

6.5.2. Mosti concentrati

Collocare una quantità V ml di mosto concentrato contenente una quantità di zucchero nota (circa 170 g) nel recipiente di fermentazione. Riempire fino ad 1 litro con (1000 - V) ml di acqua. Aggiungere lieviti secchi (1 g) e 3 g di base Bacto Yeast Nitrogen senza aminoacidi. Omogeneizzare e procedere come descritto al paragrafo 6.5.1.

6.5.3. Zucchero d'uva (Mosti concentrati rettificati)

Procedere come descritto al paragrafo 6.5.2. Riempire fino ad 1 litro con (1000 - V) ml di acqua contenente anche 3 g di acido tartarico disciolto.

Nota: I mosti concentrati e i mosti concentrati rettificati vengono diluiti con acqua del rubinetto avente una concentrazione isotopica (D/H) diversa da quella del mosto originale. I parametri (D/H)_I e (D/H)_{II} misurati nei siti metilico e metilenico dell'etanolo, con idrogeni provenienti dall'acqua del mezzo di fermentazione per una quota pari al 19% e al 78% rispettivamente, devono essere quindi normalizzati. Per la normalizzazione ci si riferisce all'acqua di riferimento V-SMOW con D/H pari a 155,76 ppm., applicando le seguenti equazioni (Martin et al., 1996, J. AOAC, **79**, 62-72):

$$\left(\frac{D}{H}\right)_I^{Norm.V-SMOW} = \left(\frac{D}{H}\right)_I - 0.19 \times \left[\left(\frac{D}{H}\right)_w^S - 155.76 \right]$$

$$\left(\frac{D}{H}\right)_{II}^{Norm.V-SMOW} = \left(\frac{D}{H}\right)_{II} - 0.78 \times \left[\left(\frac{D}{H}\right)_w^S - 155.76 \right]$$

dove $\left(\frac{D}{H}\right)_w^S$ è il rapporto isotopico di deuterio del mosto diluito. Si può calcolare questo valore usando l'equazione della Global Meteoric Water Line (Craig, 1961):

*Esemplare certificato conforme
Porto, il 24 giugno 2011
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale*

Federico CASTELLUCCI

$$\left(\frac{D}{H}\right)_w^S = 155.76 \times \left[\frac{(8 \times \delta^{18}O + 10)}{1000} + 1 \right]$$

dove $\delta^{18}O$ si misura sul mosto diluito con il metodo per la determinazione del rapporto isotopico $^{18}O/^{16}O$ dell'acqua in vini e mosti [OIV-MA-AS2-12].

Conservare 50 ml di campione di mosto o di mosto trattato con anidride solforosa, mosto concentrato o concentrato rettificato, in vista di una possibile estrazione dell'acqua e della determinazione del rapporto isotopico $(D/H)_w^Q$.

7. Procedura

7.1. Preparazione del campione di alcool per la misurazione NMR

- Provetta NMR 10 mm di diametro: raccogliere, in una boccetta di vetro preventivamente tarata, 3,2 ml di distillato, come descritto al punto 6.2, e pesare con un'approssimazione vicina allo 0,1 mg (m_A); aggiungere poi 1,3 ml come campione dello standard interno TMU (5.2.2) e pesare nuovamente la boccetta con un'approssimazione vicina allo 0,1 mg (m_{ST}).

A seconda del tipo di spettrometro e di provetta utilizzati, aggiungere una quantità sufficiente di esafluorobenzene (5.1.2) come sostanza di stabilizzazione del campo frequenza (lock):

Spettrometro	10 mm provetta
7,05 T	150 μ l
9,4 T	35 μ l

Queste cifre sono indicative e il reale volume da utilizzare dovrà essere regolato in base alla sensibilità dello strumento NMR. Durante le operazioni per la preparazione della provetta e fino alla misurazione NMR, l'addetto deve porre attenzione nell'evitare l'evaporazione di etanolo e TMU, con conseguente frazionamento isotopico, errore nelle pesate (m_A e m_{ST}) dei componenti e risultati NMR errati.

La correttezza della procedura di misurazione, compresa questa fase di preparazione, può essere verificata utilizzando lo standard CRM 656.

Nota: è possibile aggiungere all'esafluorobenzene un 10% (v/v) di acido trifluoroacetico (5.1.3) al fine di catalizzare lo scambio rapido di idrogeno su legame idrossilico che risulti in un singolo picco NMR per i segnali idrossilici e di acqua residua.

7.2 Registrazione dello spettro alcolico 2H NMR

L'uniformità del campo magnetico B_0 nel campione tramite l'applicazione della procedura di "ispessimento" che massimizza il segnale di lock ^{19}F NMR nell'osservazione dell'esafluorobenzene. I moderni spettrometri NMR sono in grado di eseguire in modo automatico e efficiente questa procedura di "ispessimento", a condizione che le impostazioni iniziali siano abbastanza prossime all'uniformità ottimale del campo magnetico per un dato campione, come nel caso di un lotto di campioni di etanolo preparati secondo la descrizione al punto 7.1. L'efficacia della procedura può essere verificata grazie alla risoluzione misurata sullo spettro così ottenuto, senza moltiplicazione esponenziale (vale a dire $LB = 0$) (figura 2b) ed espressa tramite la mezza ampiezza dei segnali metile e metilene dell'etanolo e il segnale metile di TMU, che devono essere inferiori a 0,5 Hz in condizioni ottimali. La sensibilità, misurata con un fattore di moltiplicazione LB esponenziale pari a 2 (figura 2a) deve essere

*Esemplare certificato conforme
Porto, il 24 giugno 2011
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale*

Federico CASTELLUCCI

maggiore o eguale a 150 per il segnale metile dell'etanolo avente un titolo alcolico al 95% vol. (93,5 % max.).

7.2.1. Verifica della taratura degli strumenti

Procedere alla standardizzazione ordinaria relativa all'uniformità e alla sensibilità sulla base delle specifiche del produttore.

Utilizzare le provette sigillate CRM123 (H: alto, M: medio, L: basso).

Seguire la procedura descritta al punto 9.3, determinare i valori isotopici dell'alcool, indicandoli come Hmeas, Mmeas, Lmeas.

Procedere a un confronto con i valori standard corrispondenti, indicati dagli esponenti Hst, Mst, Lst.

Tipicamente, l'indicazione per lo scarto tipo per la ripetibilità ottenuta su una media di 10 ripetizioni di ogni spettro deve essere nell'ordine di 0,01 per il rapporto R e di 0,5 ppm per $(D/H)_I$ e di 1 ppm per $(D/H)_{II}$.

I valori medi ottenuti per i vari parametri isotopici (R, $(D/H)_I$, $(D/H)_{II}$) devono essere entro la corrispondente deviazione standard di ripetibilità data per i parametri relativi a CRM123. In caso contrario, ripetere la verifica.

Quando le tarature sono state ottimizzate, per monitorare la qualità delle misurazioni nelle analisi di routine è possibile usare anche altri materiali CRM.

7.3. Condizioni per l'ottenimento dello spettro NMR

Collocare un campione di alcool preparato come descritto al punto 7.1 in una provetta da 10 mm e introdurla all'interno della sonda.

Le condizioni suggerite per l'ottenimento dello spettro NMR sono le seguenti:

- la temperatura della sonda deve essere costante, regolata ad una temperatura tra 302 K a 306 K (secondo la potenza di riscaldamento generata dal disaccoppiamento) con variazioni massime di $\pm 0,5$ °K
- tempo di acquisizione di almeno 6,8 s per 1200 Hz di ampiezza spettrale (memoria 16 K) (vale a dire, circa 20 ppm a 61,4 MHz o 27 ppm a 46,1 MHz);
- impulso 90°;
- rivelazione in quadratura: fissare l'offset 01 tra i segnali di riferimento OD e CHD per l'etanolo e tra i segnali di riferimento HOD e TMU per l'acqua.
- determinare il valore dell'offset di disaccoppiamento 02 utilizzando lo spettro protonico misurato dalla bobina di disaccoppiamento sulla stessa provetta. Si ottiene un buon disaccoppiamento quando 02 si trova al centro dell'intervallo di frequenza esistente tra i gruppi CH₃- e -CH₂-. Utilizzare la modalità a disaccoppiamento a banda larga o le sequenze composite di impulso (es.: WALTZ16) al fine di garantire un disaccoppiamento uniforme sull'intero spettro.

Effettuare, per ciascuno spettro, un numero di accumulazioni NS sufficiente ad ottenere il rapporto segnale/rumore indicato al punto 7.2 e ripetere NE volte tale serie di accumulazioni NS. I valori di NS dipendono dal tipo di spettrometro e di sonda utilizzati. Alcuni esempi delle scelte possibili sono:

*Esemplare certificato conforme
Porto, il 24 giugno 2011
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale*

Federico CASTELLUCCI

Spettrometro 10 mm sonda
 7,05 T NS = 304
 9,4 T NS = 200

Il numero di ripetizioni NE dovrà essere statisticamente significativo e sufficiente ad ottenere una deviazione standard di ripetibilità almeno equivalente a quanto riportato al §9.

Qualora siano state preparate due provette con il campione NMR seguendo quanto descritto in 7.1, è possibile registrare per ogni provetta cinque ripetizioni dello spettro NMR (NE=5). Il risultato finale per ogni parametro isotopico corrisponde al valore medio delle misurazioni ottenute sulle due provette NMR. In questo caso i criteri di accettazione per la validazione dei risultati ottenuti con le due provette sono:

$$|Mes1(D/H)_1 - Mes2(D/H)_1| < 0.5 \text{ ppm} , |Mes1(D/H)_2 - Mes2(D/H)_2| < 0.8 \text{ ppm}$$

8. Calcolo dei risultati

Determinare per ognuno degli spettri NE (vedere spettro NMR per l'etanolo, Figura 2a):

$$R = 3 \frac{h_{II}}{h_I} = 3 \cdot \frac{\text{altezza del segnale II (CH}_3\text{CHD OH)}}{\text{altezza del segnale I (CH}_2\text{D CH}_2\text{OH)}}$$

$$(D/H)_I = 1.5866 \cdot T_I \cdot \frac{m_{ST}}{m_A} \cdot \frac{(D/H)_{ST}}{t_m^D}$$

$$(D/H)_{II} = 2.3799 \cdot T_{II} \cdot \frac{m_{ST}}{m_A} \cdot \frac{(D/H)_{ST}}{t_m^D}$$

con

- $T_I = \frac{\text{alt. del segnale I (CH}_2\text{D CH}_2\text{OH)}}{\text{alt. del segnale standard interno (TMU)}}$
- $T_{II} = \frac{\text{alt. del segnale II (CH}_3\text{CHD OH)}}{\text{alt. del segnale standard interno (TMU)}}$

- m_{ST} e m_A , vedere 7.1

- t_m^D , vedere 6.3

- $(D/H)_{ST}$ = rapporto isotopico dello standard interno (TMU) indicato sul certificato fornito da IRMM.

L'utilizzo dell'altezza dei segnali di picco al posto delle superfici, misurabile con minore precisione, presuppone larghezze uguali delle righe di assorbimento a metà altezza, con un'approssimazione ragionevole (Figura 2 b).

Per ciascuno dei parametri isotopici, calcolare la media e l'intervallo di confidenza per il numero di spettri ripetuti acquisiti per un dato campione.

Un software opzionale consente di eseguire tali calcoli online.

*Esemplare certificato conforme
 Porto, il 24 giugno 2011
 Il Direttore Generale dell'OIV
 Segretario dell'Assemblea Generale*

Federico CASTELLUCCI

9. Accuratezza

La ripetibilità e la riproducibilità del metodo RMN-FINS sono state studiate attraverso studi collaborativi su succhi di frutta, come riportato nella bibliografia qui di seguito. Tuttavia questi studi hanno considerato solo il parametro $(D/H)_I$. Per il vino, studi intralaboratorio effettuati da diversi laboratori possono essere considerati per stabilire la deviazione standard della ripetibilità e il limite di ripetibilità come illustrato nell'allegato I. I risultati delle prove di idoneità valutazione dei laboratori riportato nell'allegato II forniscono dati che possono essere utilizzate per calcolare la deviazione standard della riproducibilità e il limite di riproducibilità per i vini.

Queste cifre possono essere riassunti come segue:

	$(D/H)_I$	$(D/H)_{II}$	R
S_r	0.26	0.30	0.005
r	0.72	0.84	0.015
S_R	0.35	0.62	0.006
R	0.99	1.75	0.017

Con

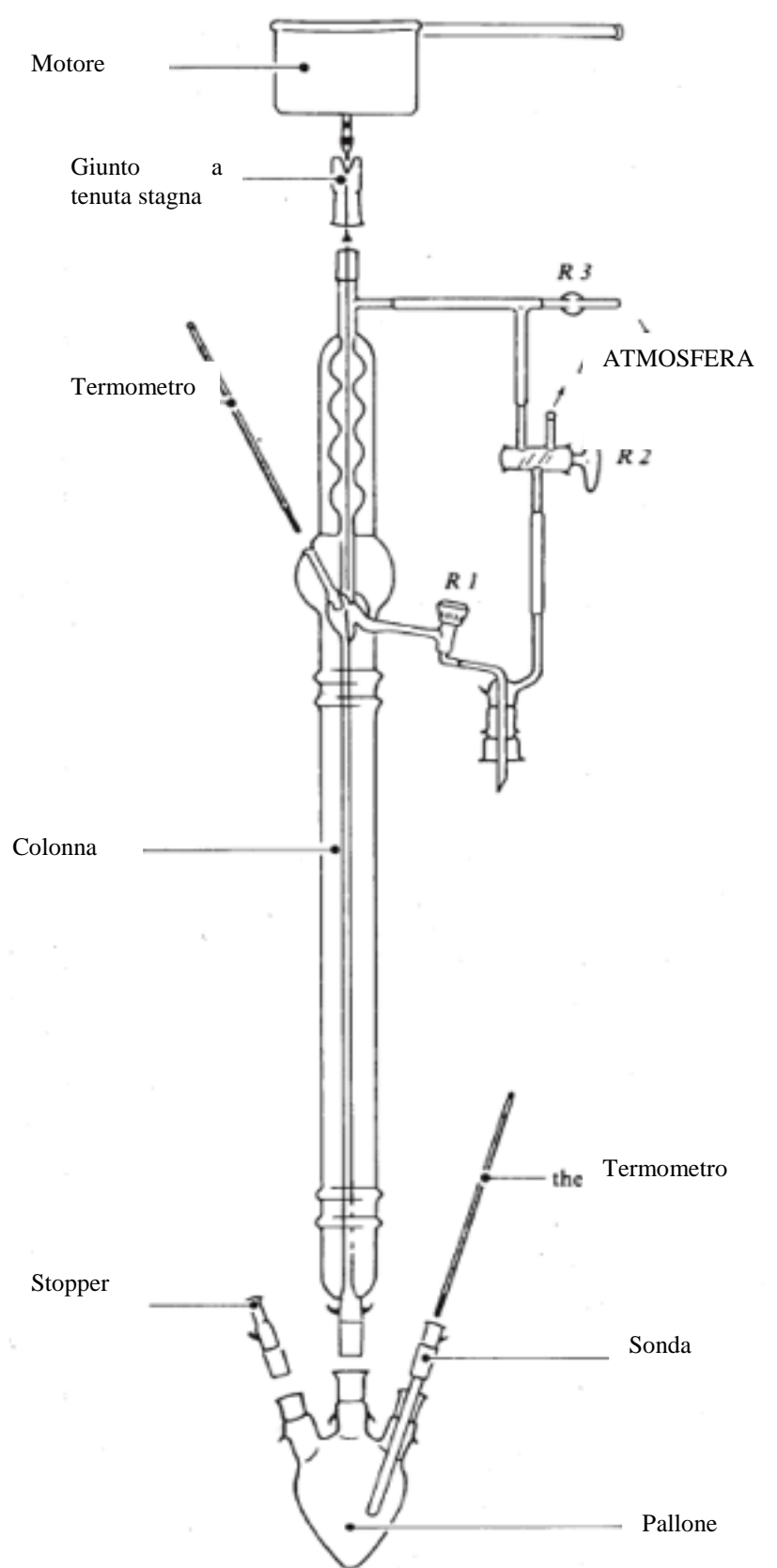
- S_r : scarto tipo di ripetibilità
- r: limite di ripetibilità
- S_R : scarto tipo di riproducibilità
- R: limite di riproducibilità

BIBLIOGRAFIA

- MARTIN G.J., MARTIN M.L., MABON F., *Anal. Chem.*, 1982, 54, 2380-2382.
MARTIN G.J., MARTIN M.L., *J. Chim. Phys.*, 1983, 80, 294-297.
MARTIN G.J., GUILLOU C., NAULET N., BRUN S., TEP Y., CABANIS J.C.,
CABANIS M.T., SUDRAUD P., *Sci. Alim.*, 1986, 6, 385-405.
MARTIN G.J., ZHANG B.L., NAULE
T N. e MARTIN M.L., *J. Amer. Chem. Soc.*, 1986, 108, 5116-5122.
MARTIN G.J., GUILLOU C., MARTIN M.L., CABANIS M.T., TEP Y. E AERNY J., *J. Agric. Food Chem.*, 1988, 36, 316.
MARTIN G. G., WOOD R., MARTIN, G. J., *J. AOAC Int.*, 1996, 79 (4), 917-928.
MARTIN G.G., HANOTE V., LEES M., MARTIN Y-L., *J. Assoc Off Anal Chem*, 1996, 79, 62-72
CRAIG H., *Science*, 1961, 133, 1702 - 1703

*Esemplare certificato conforme
Porto, il 24 giugno 2011
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale*

Federico CASTELLUCCI



*Esemplare certificato conforme
Porto, il 24 giugno 2011
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale*

Federico CASTELLUCCI

Figura 1 – Apparecchiatura per l'estrazione dell'etanolo

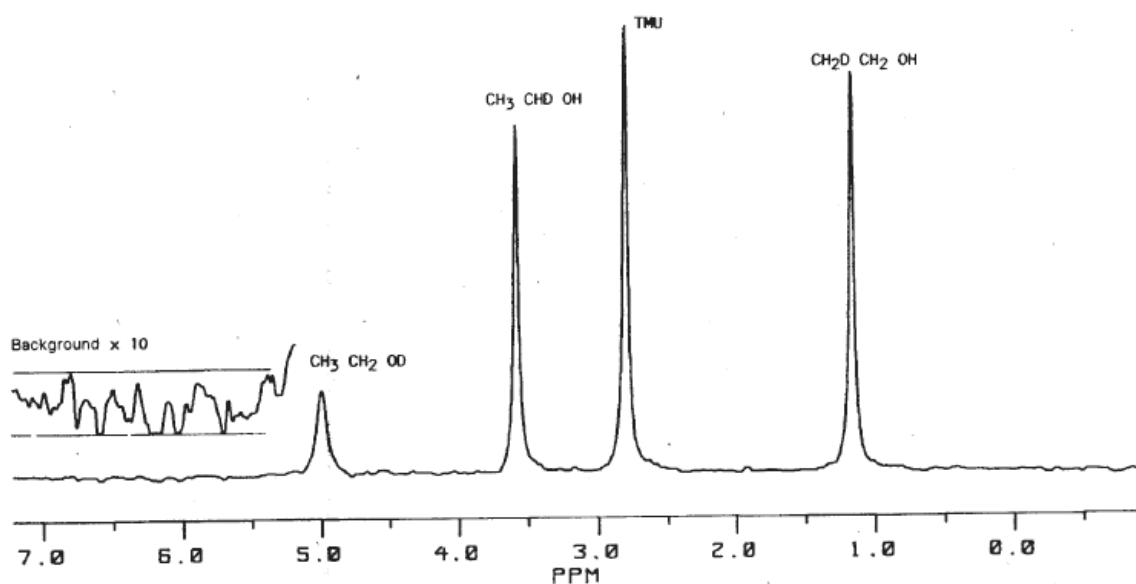


Figura 2a
Spettro RMN ^2H di un etanolo di vino con uno standard interno (TMU: N,N tetrametilurea)

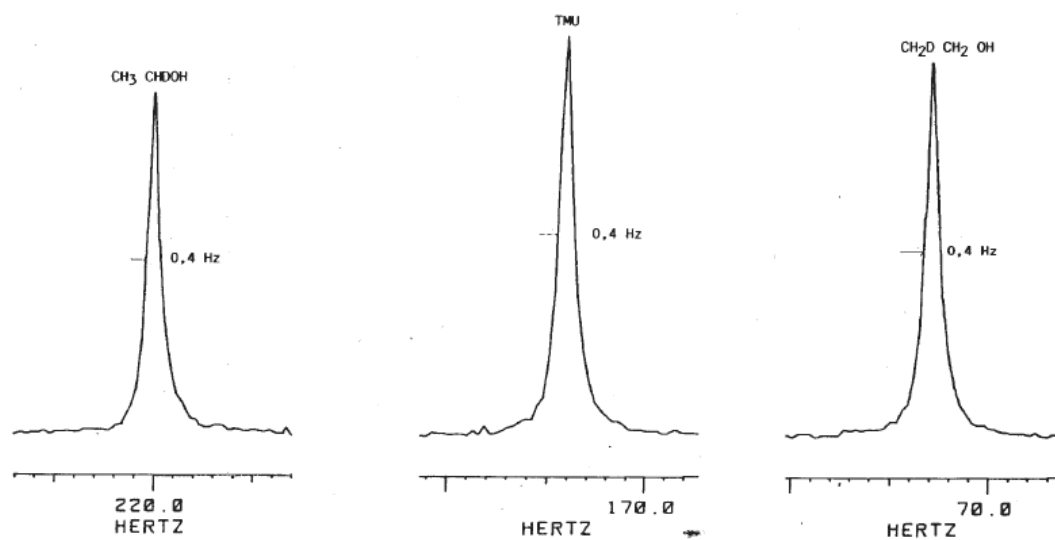


Figura 2b
Spettro ^2H dell'etanolo realizzato nelle stesse condizioni della figura 2a senza moltiplicazione esponenziale (LB=0)

*Esemplare certificato conforme
Porto, il 24 giugno 2011
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale*

Federico CASTELLUCCI

Allegato I: Stima della ripetibilità degli studi di ripetibilità condotti internamente

Gli studi di ripetibilità interna eseguiti in 4 laboratori forniscono i dati necessari per consentire una stima della ripetibilità del metodo SNIF-NMR.

Gli studi di ripetibilità interna sono stati eseguiti mediante doppie distillazioni e misurazioni di 10,9 o 15 campioni di vino diversi da parte dei laboratori 1, 2 e 3.

In alternativa, il laboratorio 4 ha eseguito 16 distillazioni e misurazioni sullo stesso vino in condizione di ripetibilità su un intervallo di tempo breve.

Tabella I-1:

lab 1: 10 vini analizzati in duplicato

Campione			(D/H) _I		(D/H) _{II}		R		
	(D/H) _I	(D/H) _{II}	R	abs(Δ(D/H) _I)	Quadrati	abs(Δ(D/H) _{II})	Quadrati	abs(Δ(R))	Quadrati
1	103,97	130,11	2,503	0,55	0,302	0,68	0,462	0,000	0,00000
	104,52	130,79	2,503						
2	103,53	130,89	2,529	0,41	0,168	0,32	0,102	0,016	0,00026
	103,94	130,57	2,513						
3	102,72	130,00	2,531	0,32	0,102	0,20	0,040	0,004	0,00002
	103,04	130,20	2,527						
4	105,38	132,39	2,513	0,14	0,020	0,20	0,040	0,000	0,00000
	105,52	132,59	2,513						
5	101,59	127,94	2,519	0,48	0,230	0,20	0,040	0,016	0,00026
	101,11	128,14	2,535						
6	103,23	132,14	2,560	0,30	0,090	0,36	0,130	0,001	0,00000
	102,93	131,78	2,561						
7	103,68	130,95	2,526	0,15	0,023	0,75	0,563	0,011	0,00012
	103,53	130,20	2,515						
8	101,76	128,86	2,533	0,24	0,058	0,42	0,176	0,003	0,00001
	101,52	128,44	2,530						
9	103,05	129,59	2,515	0,04	0,002	0,44	0,194	0,007	0,00005
	103,01	129,15	2,508						
10	101,47	132,63	2,614	0,50	0,250	0,18	0,032	0,010	0,00010
	100,97	132,45	2,624						
Somma dei quadrati:					1,245		1,779		0,00081
Sr					0,25		0,30		0,006
r					0,71		0,84		0,018

*Esemplare certificato conforme
Porto, il 24 giugno 2011
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale*

Federico CASTELLUCCI

Tabella I-2:

lab 2: 9 vini analizzati in duplicato

Campione	(D/H) _I	(D/H) _{II}	R	(D/H) _I	Quadrati	(D/H) _{II}	Quadrati	R	
				abs(Δ(D/H) _I)		abs(Δ(D/H) _{II})		abs(Δ(R))	Quadrati
1	105,02	133,78	2,548	0,26	0,068	0,10	0,010	0,008	0,00007
	104,76	133,88	2,556						
2	102,38	130,00	2,540	0,73	0,533	0,40	0,160	0,010	0,00011
	101,65	129,60	2,550						
3	100,26	126,08	2,515	0,84	0,706	0,64	0,410	0,008	0,00007
	99,42	125,44	2,523						
4	101,17	128,83	2,547	0,51	0,260	0,45	0,203	0,004	0,00002
	100,66	128,38	2,551						
5	101,47	128,78	2,538	0,00	0,000	0,26	0,068	0,005	0,00003
	101,47	128,52	2,533						
6	106,14	134,37	2,532	0,12	0,014	0,04	0,002	0,002	0,00000
	106,26	134,41	2,530						
7	103,62	130,55	2,520	0,05	0,003	0,11	0,012	0,003	0,00001
	103,57	130,66	2,523						
8	103,66	129,88	2,506	0,28	0,078	0,55	0,302	0,004	0,00001
	103,38	129,33	2,502						
9	103,50	129,66	2,506	0,43	0,185	0,22	0,048	0,015	0,00021
	103,93	129,44	2,491						
Somma dei quadrati:					1,846		1,214		0,00053
Sr					0,32		0,26		0,005
r					0,91		0,74		0,015

*Esemplare certificato conforme
Porto, il 24 giugno 2011
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale*

Federico CASTELLUCCI

Tabella I-3:

lab 3: 15 vini analizzati in duplicato

Campione	(D/H) _I	(D/H) _{II}	R	(D/H)I	Quadrati	(D/H)II	Quadrati	R	Quadrati
				abs($\Delta(D/H)_I$)		abs($\Delta(D/H)_{II}$)		abs($\Delta(R)$)	
1	101,63	125,87	2,477	0,06	0,004	0,46	0,212	0,007	0,00005
	101,57	125,41	2,470						
2	99,24	124,41	2,507	0,05	0,002	0,04	0,002	0,001	0,00000
	99,19	124,37	2,508						
3	101,23	125,07	2,471	0,06	0,004	0,16	0,026	0,005	0,00002
	101,17	125,23	2,476						
4	100,71	125,29	2,488	0,07	0,005	1,16	1,346	0,024	0,00058
	100,78	124,13	2,464						
5	99,89	124,02	2,483	0,18	0,032	0,56	0,314	0,007	0,00005
	99,71	123,46	2,476						
6	100,60	124,14	2,468	0,19	0,036	0,66	0,436	0,018	0,00032
	100,41	124,80	2,486						
7	101,47	125,60	2,476	0,23	0,053	0,14	0,020	0,003	0,00001
	101,70	125,74	2,473						
8	102,02	124,00	2,431	0,13	0,017	0,07	0,005	0,005	0,00002
	102,15	123,93	2,426						
9	99,69	124,60	2,500	0,40	0,160	0,53	0,281	0,000	0,00000
	100,09	125,13	2,500						
10	99,17	123,71	2,495	0,30	0,090	0,19	0,036	0,004	0,00002
	99,47	123,90	2,491						
11	100,60	123,89	2,463	0,40	0,160	0,54	0,292	0,001	0,00000
	101,00	124,43	2,464						
12	99,38	124,88	2,513	0,33	0,109	0,55	0,302	0,002	0,00000
	99,05	124,33	2,511						
13	99,51	125,24	2,517	0,44	0,194	0,01	0,000	0,011	0,00012
	99,95	125,25	2,506						
15	101,34	124,68	2,460	0,43	0,185	0,41	0,168	0,002	0,00000
	101,77	125,09	2,458						
Somma dei quadrati:					1,050		3,437		0,00120
				Sr	0,19		0,34		0,006
				r	0,53		0,96		0,018

*Esemplare certificato conforme
Porto, il 24 giugno 2011
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale*

Federico CASTELLUCCI

Tabella I-4:

lab 4: un vino analizzato 16 volte

Ripetizione	(D/H) _I	(D/H) _{II}	R		(D/H) _I	(D/H) _{II}	R
1	101,38	126,87	2,503	Varianza:	0,0703	0,0840	0,000013
2	101,30	126,22	2,492				
3	100,98	125,86	2,493	Sr	0,27	0,29	0,004
4	100,94	126,00	2,497				
5	100,71	125,79	2,498	r	0,75	0,82	0,010
6	100,95	126,05	2,497				
7	101,17	126,30	2,497				
8	101,22	126,22	2,494				
9	100,99	125,91	2,494				
10	101,29	126,24	2,493				
11	100,78	126,07	2,502				
12	100,65	125,65	2,497				
13	101,01	126,17	2,498				
14	100,89	126,05	2,499				
15	101,66	126,52	2,489				
16	100,98	126,11	2,498				

I dati aggregati per la deviazione standard della ripetibilità e per il limite di ripetibilità possono quindi essere stimati come:

	(D/H) _I	(D/H) _{II}	R
Sr	0,26	0,30	0,005
Limite di ripetibilità r	0,72	0,84	0,015

I dati degli studi di ripetibilità interna sono stati forniti da (in ordine alfabetico):

-Bundesinstitut für Risikobewertung,
Thielallee 88-92 PF 330013 D-14195 BERLINO – GERMANIA

-Fondazione E. Mach-Istituto Agrario di San Michele all'Adige ,
Via E. Mach, 1 - 38010 San Michele all'Adige (TN), ITALIA

- Centro Comune di Ricerca - Istituto per la salute e la protezione dei consumatori,
I-21020 ISPRA (VA) – ITALIA

-Laboratorio Arbitral Agroalimentario, Carretera de la Coruña, km 10,7
E-28023 MADRID –SPAGNA

*Esemplare certificato conforme
Porto, il 24 giugno 2011
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale*

Federico CASTELLUCCI

Allegato II: Stima della riproducibilità a partire dai dati delle prove di valutazione

Dal dicembre 1994 sono stati regolarmente organizzati esercizi di valutazione internazionale sulla determinazione di parametri isotopici sui vini e sulle varie matrici alimentari. Tali esercizi di valutazione consentono ai laboratori partecipanti di valutare la propria performance e la qualità delle proprie analisi. L'uso statistico dei risultati così ottenuti su un largo numero di campioni per un lungo periodo di tempo permette di apprezzare la variabilità delle misurazioni in condizioni di riproducibilità. Ciò consente una buona stima dei parametri di varianza e del limite di riproducibilità del metodo. Nella tabella II-1 sottostante sono riassunti i risultati di 40 cicli di prove di valutazione dal 1994 fino al 2010 per vari tipi di vino (rosso, bianco, rosato, secco, dolce e spumante).

Per $(D/H)_I$ e $(D/H)_{II}$, il valore S_R combinato può quindi essere calcolato con la seguente equazione:

$$\sqrt{\frac{\sum_i^K (N_i - 1) S_{R,i}^2}{\sum_i^K (N_i - 1)}}$$

con N_i e $S_{R,i}$ come numero di valori e deviazione standard della riproducibilità del i^{esimo} ciclo, e K come numero di cicli.

Considerando la definizione del rapporto intramolecolare R , e applicando le regole standard di propagazione dell'errore, è possibile ipotizzare che $(D/H)_I$ e $(D/H)_{II}$ non siano correlati (i termini covarianza sono quindi pari a zero), si può altresì stimare la deviazione standard della Riproducibilità di questo parametro.

Pertanto, è possibile calcolare i seguenti dati:

	$(D/H)_I$	$(D/H)_{II}$	R
S_R :	0,35	0,62	0,006
Limite di Riproducibilità R	0,99	1,75	0,017

*Esemplare certificato conforme
Porto, il 24 giugno 2011
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale*

Federico CASTELLUCCI

Tabella II-1: Prove di valutazione con metodo FIT – Riepilogo dei valori statistici osservati nei campioni di vino:

Campione	Anno	Ciclo	(D/H) _I			(D/H) _{II}		
			N	Media	S _R	N	Media	S _R
Vino rosso	1994	R1	10	102,50	0,362	10	130,72	0,33
Vino rosato	1995	R1	10	102,27	0,333	10	128,61	0,35
Vino rosso	1995	R2	11	101,45	0,389	11	127,00	0,55
Vino rosso	1996	R1	11	101,57	0,289	11	132,23	0,34
Vino rosato	1996	R2	12	102,81	0,322	12	128,20	0,60
Vino bianco	1996	R3	15	103,42	0,362	15	127,97	0,51
Vino rosso	1996	R4	15	102,02	0,377	13	131,28	0,30
Vino rosato	1997	R1	16	103,36	0,247	16	126,33	0,44
Vino bianco	1997	R2	16	103,42	0,444	15	127,96	0,53
Vino bianco dolce	1997	R2	14	99,16	0,419	15	130,02	0,88
Vino	1997	R3	13	101,87	0,258	15	132,03	0,61
Vino dolce	1997	R3	12	102,66	0,214	12	128,48	0,48
Vino rosato	1997	R4	16	102,29	0,324	16	129,29	0,63
Vino dolce	1997	R4	15	102,04	0,269	13	131,27	0,30
Vino bianco	1998	R1	16	105,15	0,302	16	127,59	0,59
Vino dolce	1998	R3	16	102,17	0,326	16	129,60	0,56
Vino rosso	1998	R4	17	102,44	0,306	17	131,60	0,47
Vino bianco	1999	R1	14	102,93	0,404	13	129,64	0,46
Vino dolce	2000	R2	15	103,19	0,315	14	129,43	0,60
Vino	2001	R1	12	105,28	0,264	16	131,32	0,68
Vino dolce	2001	R2	14	101,96	0,249	15	128,99	1,05
Vino	2002	R1	17	101,01	0,365	16	129,02	0,74
Vino	2002	R2	17	101,30	0,531	17	129,28	0,93
Vino	2003	R1	18	100,08	0,335	18	128,98	0,77
Vino dolce	2003	R2	17	100,51	0,399	18	128,31	0,80
Vino	2004	R1	18	102,88	0,485	19	128,06	0,81
Vino dolce	2004	R3	16	101,47	0,423	16	130,10	0,71
Vino	2005	R1	19	101,33	0,447	19	129,88	0,76
Vino dolce	2005	R2	15	102,53	0,395	15	131,36	0,38
Vino secco	2006	R1	18	101,55	0,348	18	131,30	0,51
Vino dolce	2006	R2	18	100,31	0,299	18	127,79	0,55
Vino	2007	R1	18	103,36	0,403	18	130,90	0,90
Vino dolce	2007	R2	19	102,78	0,437	19	130,72	0,55
Vino	2008	R1	24	103,20	0,261	23	131,29	0,59
Vino dolce	2008	R2	20	101,79	0,265	19	129,73	0,34
Vino secco	2009	R1	24	102,96	0,280	23	130,25	0,49
Vino dolce	2009	R2	21	101,31	0,310	21	127,07	0,50
Vino secco	2010	R1	21	101,80	0,350	20	129,65	0,40
Vino spumante	2010	R1	11	101,51	0,310	11	129,09	0,68
Vino secco	2010	R2	20	104,05	0,290	19	133,31	0,58

*Esemplare certificato conforme
Porto, il 24 giugno 2011
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale*

Federico CASTELLUCCI