



RISOLUZIONE ENO 11/2006

DETERMINAZIONE GLOBALE DEL GLUCOSIO, DEL FRUTTOSIO E DEL SACCAROSIO NEI MOSTI E NEI VINI TRAMITE pH-METRIA DIFFERENZIALE

L'Assemblea generale

Visto l'articolo 2 paragrafo 2 iv dell'accordo del 3 aprile 2001 che istituisce l'Organizzazione internazionale della vite e del vino

Su proposta della Sotto-Commissione dei metodi di analisi e di valutazione dei vini,

DECIDE di completare l'Allegato A della Raccolta dei metodi internazionali di analisi dei vini e dei mosti con il seguente metodo e di adottarlo come metodo di tipo IV:

Titolo	Tipo de metodo
DETERMINAZIONE GLOBALE DEL GLUCOSIO, DEL FRUTTOSIO E DEL SACCAROSIO NEI MOSTI E NEI VINI TRAMITE pH-METRIA DIFFERENZIALE	IV

1. PORTATA E CAMPO D'APPLICAZIONE

Questo metodo è applicabile all'analisi globale del glucosio, del fruttosio e del saccarosio nei mosti e nei vini tra 0 e 270 g/L.

Questa quantificazione si differenzia da quella del glucosio e del fruttosio per ph-metria differenziale e non può esserle sostituita.

2. PRINCIPIO

La determinazione tramite ph-metria differenziale del glucosio, del fruttosio e del saccarosio consiste in un'idrolisi del saccarosio tramite invertasi, seguita da una fosforilazione del glucosio e del fruttosio tramite esochinasi. Vengono in seguito quantificati gli ioni H⁺ generati in modo stechiometrico in rapporto alle quantità di glucosio e di fruttosio.

3. REAZIONI

Il saccarosio eventualmente presente è idrolizzato tramite invertasi (EC 3.2.1.26)

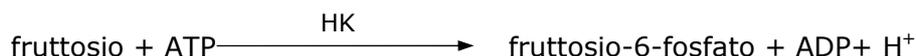


*Esemplare certificato conforme
Parigi, il 28 luglio 2006
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale*

Federico CASTELLUCCI



Il glucosio ed il fruttosio presenti inizialmente o conseguentemente all'azione dell'invertasi sono fosforilati tramite l'adenosin-trifosfato (ATP) durante una reazione enzimatica catalizzata con l'esochinasi (HK) (EC 2.7.1.1)



4. REAGENTI

4.1 Acqua demineralizzata (18 M Ω) o bidistillata

4.2 2-Amino-2-(idrossimetil)propano-1,3-diolo (TRIS) purezza $\geq 99\%$

4.3 Adenosina trifosfato disodica (ATP, 2Na) purezza $\geq 99\%$

4.4 Fosfato trisodico con dodici molecole d'acqua (Na₃PO₄·12H₂O) purezza $\geq 99\%$

4.5 Idrossido di Sodio (NaOH) purezza $\geq 98\%$

4.6 Cloruro di magnesio con sei molecole d'acqua (MgCl₂·6H₂O) purezza $\geq 99\%$

4.7 Triton X 100

4.8 Cloruro di potassio (KCl) purezza $\geq 99\%$

4.9 2-Bromo-2-nitropropano-1,3-diolo (Bronopol) (C₃H₆BrNO₄)

4.10 Invertasi (EC 3.2.1.26) 1mg \cong 500 U (da sigma res I-4504)

4.11 Esocinasi (EC 2.7.1.1) 1 mg \cong 145 U (da Hofmann La Roche, Mannheim, Germania rif. HEXO-70-1351)

4.12 Glicerolo purezza $\geq 98\%$

4.13 Saccarosio purezza $\geq 99\%$

4.14 Tampone di reazione pH 8,0 commerciale o preparato secondo il seguente metodo: in un matraccio graduato da 100 mL (5.2) versare approssimativamente 70 mL (5.3) d'acqua (4.1), agitare continuamente (5.5). Aggiungere 0,242 g \pm 0,001 g (5.4) di TRIS (4.2), 0,787 g \pm 0,001 g (5.4) di ATP (4.3), 0,494 g \pm 0,001 g (5.4) di fosfato di sodio (4.4), 0,009 mg \pm 0,001 g (5.4) d'idrossido di sodio (4.5), 0,203 g \pm 0,001 g (5.4)

*Esemplare certificato conforme
Parigi, il 28 luglio 2006
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale*

Federico CASTELLUCCI



di cloruro di magnesio(4.6), $2,000 \pm 0,001$ g (5.4) di Triton X 100 (4.7), $0,820 \text{ g} \pm 0,001$ g (5.4) di cloruro di potassio (4.8) e $0,010 \pm 0,001$ g (4.9) di Bronopol. Portare a livello con acqua (4.1). Il pH finale deve essere di $8,0 \pm 0,1$ (5.6), altrimenti aggiustare con idrossido di sodio o acido cloridrico. Il tampone così preparato è stabile per 2 mesi a 4°C.

4.15 Soluzione enzimatica commerciale o preparata secondo il seguente metodo: con l'aiuto di una pipetta graduata (5.7) mettere 5 mL di glicerolo (4.11) in un matraccio graduato da 10 mL, portare a livello con acqua (4.1) e omogeneizzare. Sciogliere $300 \text{ mg} \pm 1 \text{ mg}$ (5.4) d'invertasi (4.10) $10 \text{ mg} \pm 1 \text{ mg}$ (5.4) di esochinasi (4.11) in 3mL della soluzione di glicerolo. L'attività della soluzione enzimatica deve essere di $50\ 000 \text{ U} \pm 100 \text{ U}$ al mL per l'invertasi e dei $480 \pm 50 \text{ U}$ per mL per l'esochinasi. La soluzione enzimatica è stabile per 6 mesi a 4°C.

4.16. PREPARAZIONE DELLA SOLUZIONE DI VERIFICA

Mettere $17,100 \text{ g} \pm 0,01 \text{ g}$ (5.4) di saccarosio (4.13) (preventivamente essiccato per 12 ore a 40°C fino al peso costante), $0,745 \text{ g} \pm 0,001 \text{ g}$ (5.4) di cloruro di potassio (4.8) e $0,010 \text{ g} \pm 0,001 \text{ g}$ (4.9) di Bronopol in un matraccio graduato da 100 mL (5.2). Aggiungere acqua (4.1). Omogeneizzare bene (5.5). Portare a livello con acqua (4.1) dopo aver tolto la barretta magnetica. La concentrazione finale è di 171 g/L di saccarosio. La soluzione è stabile per 6 mesi a 4°C.

5. APPARECCHIATURE

5.1 Apparecchio di pH-metria differenziale (EUROCHEM CL 10 plus, Microlab EFA o equivalente) vedi allegato A

5.2 Matraccio graduato da 100 mL classe A

5.3 Provetta graduata a piede da 100 mL

5.4 Bilancia di precisione con divisione minima di 1 mg.

5.5 Agitatore magnetico e barretta magnetica in teflon

5.6 pH-metro

5.7 Pipetta graduata da 3mL, 5 mL classe A

5.8 Matraccio graduato da 10 mL classe A

5.9 Pipette automatiche a pistone da 25 e 50 μL

6. PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

I campioni non devono essere troppo ricchi di materie in sospensione. In caso contrario centrifugarli o filtrarli. I vini frizzanti devono essere sgasati.

*Esemplare certificato conforme
Parigi, il 28 luglio 2006
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale*

Federico CASTELLUCCI



7. MODO OPERATIVO

L'operatore deve rispettare le istruzioni di utilizzo dell'apparecchio (5.1). Prima dell'uso, lo strumento deve essere stabilizzato in temperatura. I circuiti devono essere risciacquati con la soluzione tampone (4.14) dopo l'eventuale pulitura.

7.1 Determinazione del bianco (determinazione del segnale dell'enzima)

Riempire i compartimenti elettrodi (EL_1 e EL_2) del pH-metro differenziale (5.1) con il tampone (4.13), la differenza di potenziale tra i due elettrodi (D_1) deve essere compresa tra ± 150 mV;

aggiungere 32 μ L di soluzione enzimatica (4.15) nella camera di reazione (con la micropipetta 5.9 o tramite il preparatore) e riempire l'elettrodo EL_2 ;

misurare la differenza di potenziale (D_2) tra i due elettrodi;

calcolare la differenza di pH, ΔpH_0 per il bianco, secondo il seguente calcolo:

$$\Delta pH_0 = D_2 - D_1$$

dove

ΔpH_0 = la differenza di pH tra le due misure per il bianco;

D_1 = valore della differenza di pH tra i due elettrodi riempiti con il tampone;

D_2 = valore della differenza di pH tra i due elettrodi di cui uno è riempito con tampone e l'altro con tampone ed enzima.

Il valore di ΔpH_0 permette di verificare lo stato degli elettrodi in fase di dosaggio e il loro eventuale scostamento con il tempo; lo stesso deve essere compreso tra -30 e 0 mV e $\leq 1,5$ mV tra due misure consecutive. In caso contrario, verificare la qualità del tampone pH e la pulizia del circuito idraulico e degli elettrodi; pulire, se necessario, quindi ripetere il bianco.

7.2 Test

Riempire i compartimenti elettrodi (EL_1 e EL_2) con il tampone (4.14); aggiungere 10 μ L (con la micropipetta 5.9 o tramite il preparatore) di soluzione campione di saccarosio (5) nella camera di reazione;

riempire gli elettrodi EL_1 e EL_2 con la miscela tampone + soluzione campione;

misurare la differenza (D_3) di potenziale tra i due elettrodi;

aggiungere 32 μ L di soluzione enzimatica (4.15) e riempire l'elettrodo EL_2 con la miscela tampone + soluzione campione + enzima;

dopo il tempo necessario per la reazione enzimatica, misurare la differenza di potenziale (D_4) tra i due elettrodi;

calcolare la differenza di pH, ΔpH_c per il campione testato secondo il seguente calcolo:

$$\Delta pH_c = (D_4 - D_3) - \Delta pH_0$$

dove

ΔpH_c = la differenza di pH tra le due misure D_3 e D_4 per il campione testato meno la differenza ottenuta per il bianco;

*Esemplare certificato conforme
Parigi, il 28 luglio 2006
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale*

Federico CASTELLUCCI



D_3 = valore della differenza di pH tra i due elettrodi riempiti con la miscela tampone/soluzione di riferimento;

D_4 = valore della differenza di pH tra i due elettrodi di cui uno è riempito di tampone/soluzione di riferimento e l'altro di tampone/soluzione di riferimento/enzima.

Calcolare la pendenza della retta del test:

$$s = C_u / \Delta pH_c$$

dove

C_u è la concentrazione di glucosio nella soluzione campione espressa in g/L.

Verificare la validità della campionatura analizzando 10 μ L di soluzione campione (ML) di saccarosio (5) seguendo la procedura (7.3). Il risultato deve essere compreso tra $\pm 2\%$ del valore di riferimento. In caso contrario ricominciare la procedura di calibrazione.

7.3 – Quantificazione

Riempire i compartimenti elettrodi (EL_1 e EL_2) con il tampone (4.14) aggiungere 10 μ L (con la micropipetta 5.9 o tramite il preparatore) di campione nella camera di reazione;

riempire gli elettrodi EL_1 e EL_2 con la miscela tampone + campione:

misurare la differenza (D_5) di potenziale tra i due elettrodi;

aggiungere 32 μ L di soluzione enzimatica (4.15) e riempire l'elettrodo EL_2 con la miscela tampone + campione + enzima:

misurare la differenza di potenziale (D_6) tra i due elettrodi;

calcolare la quantità di soluto nel campione secondo il seguente calcolo:

$$w = s \times [(D_6 - D_5) - \Delta pH_0]$$

dove

w = la quantità di soluto nel campione (in g/L);

S è la pendenza determinata dalla retta di calibrazione;

ΔpH_0 = la differenza di pH tra le due misure per il bianco;

D_5 = valore della differenza di pH tra i due elettrodi riempiti con il campione/soluzione di riferimento;

D_6 = valore della differenza di pH tra i due elettrodi di cui uno è riempito con tampone/campione e l'altro con tampone/campione/enzima.

8. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

I risultati sono espressi in g/L di glucosio invertito con una cifra significativa dopo la virgola.

9. CARATTERISTICHE DELL'ANALISI

A causa dell'idrolisi del saccarosio nei mosti ed i vini non è stato possibile organizzare un'analisi tra laboratori diversi secondo il protocollo dell'OIV.

*Esemplare certificato conforme
Parigi, il 28 luglio 2006
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale*

Federico CASTELLUCCI



Lo studio intra-laboratorio di questo metodo mostra per il saccarosio una linearità tra 0 e 250 g/L, un limite d'individuazione di 0,2 g/L, un limite di quantificazione di 0,6 g/L, una ripetibilità di $0,0837x - 0,0249$ g/L ed una riproducibilità di $0,0935x - 0,073$ g/L (dove x è il tasso di saccarosio).

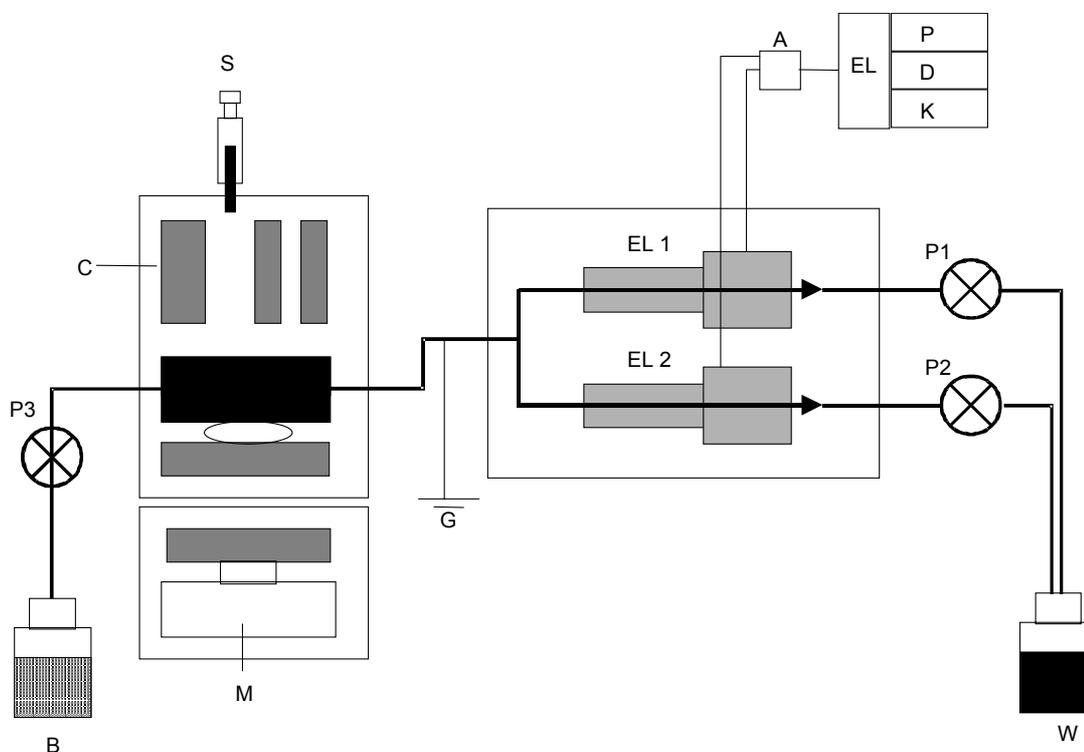
10. CONTROLLO QUALITÀ

Possono essere compiuti controlli di qualità con materiali di riferimento certificati, dei vini le cui caratteristiche hanno riscosso un consenso o di vini con aggiunte inseriti regolarmente nelle serie analitiche seguendo le relative schede di controllo.

*Esemplare certificato conforme
Parigi, il 28 luglio 2006
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale*

Federico CASTELLUCCI

Allegato A



Schema dell'apparecchio di pH-metria differenziale

A: amplificatore differenziale; B: soluzione tampone; C: camera di miscela; D: indicatore; EL1 ed EL 2 elettrodi capillari; EL: parte elettronica; G: messa a terra; K: tastiera; M: agitatore magnetico; P: stampante; da P1 a P3: pompe peristaltiche; S: siringa d'iniezione del campione e dell'enzima ; W: scarico.

*Esemplare certificato conforme
Parigi, il 28 luglio 2006
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale*

Federico CASTELLUCCI



Allegato B

BIBLIOGRAFIA

LUZZANA M., PERELLA M. et ROSSI-BERNARDI L (1971) : Electrometric method for measurement of small pH changes in biological systems. Anal. Biochem, 43, 556-563.

LUZZANA M., AGNELLINI D., CREMONESI P. e CARAMENTI G. (2001) : Enzymatic reactions for the determination of sugars in food samples using the differential pH technique. Analyst, 126, 2149 -2152.

LUZZANA M., LARCHER R., MARCHITTI C. V. e BERTOLDI D. (2003) : Quantificazione mediante pH-metria differenziale dell'urea negli spumanti metodo classico.in "Spumante tradizionale e classico nel terzo millennio" 27-28 giugno 2003, Istituto Agrario di San Michele.

MOIO L., GAMBUTI A., Di MARZIO L. e PIOMBINO P. (2001) : Differential pHmeter determination of residual sugars in wine. Am. J. Enol. Vitic, 52(3), 271 - 274.

MOSCA A., DOSSI G., LUZZANA M., ROSSI-BERNARDI L., FRIAUF W. S., BERGER R.L., HOPKINS H. P. e CAREY V (1981) : Improved apparatus for the differential measurement of pH : application to the measurement of glucose. Anal. Biochem., 112, 287 - 294.

TUSSEAU D., FENEUIL A., ROUCHASSE J.-M. e VAN LAERS S. (2004): Mesures de différents paramètres d'intérêt œnologique par pHmétrie différentielle. F.V. O.I.V. n° 1199, 5 pages.

*Esemplare certificato conforme
Parigi, il 28 luglio 2006
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale*

Federico CASTELLUCCI