

## RISOLUZIONE OIV-OENO 665-2022

### **DETERMINAZIONE DEGLI EDULCORANTI NEL VINO BLANCO E BEVANDE A BASE DI VINO BIANCO MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA AD ALTA PRESTAZIONE ACCOPPIATA A UN RIVERLATORE A SERIE DI DIODI E A UN RIVERLATORE AD AEROSOL CARICATO ELETTROSTATICAMENTE**

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 dalla Sottocommissione "Metodi di analisi",

DECIDE di completare l'allegato A della *Raccolta dei metodi internazionali di analisi dei vini e dei mosti* con il metodo seguente:

### **Determinazione degli edulcoranti nel vino bianco e nelle bevande a base di vino bianco mediante cromatografia liquida ad alta prestazione accoppiata a un rivelatore a serie di diodi e a un rivelatore ad aerosol caricato elettrostaticamente**

Metodo di Tipo IV

#### **1. Campo di applicazione**

Il presente metodo permette la quantificazione di cinque edulcoranti artificiali (acesulfame di potassio, aspartame, saccarina, ciclamato di sodio e sucralosio) nei vini bianchi (e nelle bevande a base di vino bianco), in concentrazioni che possono arrivare fino a 50 mg/L per la saccarina, 125 mg/L per l'acesulfame di potassio e 250 mg/L per il sucralosio, il ciclamato di sodio e l'aspartame.

Per concentrazioni più elevate, è necessario diluire il campione.

Nota: La presenza di antociani interferisce con la quantificazione di questi edulcoranti nei vini rosati e nei vini rossi.

#### **2. Principio**

I cinque edulcoranti sono analizzati mediante cromatografia liquida ad alta

prestazione per separazione su una colonna C18 a fase inversa accoppiata a un rivelatore a serie di diodi e a un rivelatore CAD (*Charged Aerosol Detector*) disposti in serie (HPLC/UV-CAD).

### **3. Reagenti e soluzioni**

#### **3.1. Reagenti:**

- 3.1.1. Acqua conformemente alla norma EN ISO 3696 o equivalente
- 3.1.2. Acesulfame di potassio (purezza  $\geq 99\%$ ) (N. CAS 55589-62-3)
- 3.1.3. Aspartame (purezza  $\geq 98\%$ ) (N. CAS 22839-47-0)
- 3.1.4. Ciclammati di sodio (purezza  $\geq 98\%$ ) (N. CAS 139-05-9)
- 3.1.5. Saccarina, sale sodico diidrato (purezza  $\geq 98\%$ ) (N. CAS 6155-57-3)
- 3.1.6. Sucralosio (purezza  $\geq 98\%$ ) (N. CAS 56038-13-2)
- 3.1.7. Acido formico (purezza  $\geq 98\%$ ) (N. CAS 64-18-6)
- 3.1.8. Bicarbonato d'ammonio (purezza  $\geq 98\%$ ) (N. CAS 1066-33-7)
- 3.1.9. Metanolo per HPLC (purezza  $\geq 99,9\%$ ) (N. CAS 67-56-1)
- 3.1.10. Acetone per HPLC (purezza  $\geq 99,8\%$ ) (N. CAS 67-64-1)

#### **3.2. Preparazione della soluzione tampone**

Preparare una soluzione tampone di bicarbonato d'ammonio (3.1.8) in acqua (3.1.1) a una concentrazione di 0,4 g/L e aggiustare il pH a 4,6 con acido formico (3.1.7).

Questa soluzione può essere conservata per 1 mese a temperatura ambiente.

### **4. Strumentazione**

#### **4.1. Normale attrezzatura di laboratorio**

**4.2. pH-metro**

**4.3. Agitatore**

**4.4. Bagno a ultrasuoni**

**4.5. Bilancia analitica con una precisione di  $\pm 0,01$  mg**

**4.6. Matracci tarati di classe A**

**4.7. Filtri per siringa da  $0,45 \mu\text{m}$  in cellulosa rigenerata (ad esempio)**

**4.8. Colonna C18 per HPLC (15 cm di lunghezza, 4,6 mm di diametro interno,  $5 \mu\text{m}$ )**

**4.9. Sistema cromatografico composto da:**

- un sistema di pompaggio con almeno 3 canali,
- un campionatore termostato,
- un forno a colonna,
- un rivelatore a serie di diodi o UV-VIS,
- un rivelatore CAD,
- un sistema di acquisizione, integrazione ed elaborazione dati.

## **5. Procedimento**

### **5.1. Preparazione dei campioni**

Filtrare i campioni con dei filtri per siringa prima di porli nei vial, se il campione è troppo concentrato, diluire con la soluzione tampone in modo da ottenere una concentrazione compresa nell'intervallo di riferimento.

## 5.2. Preparazione delle soluzioni standard

### 5.2.1. Preparazione della soluzione madre L3 (fornita a titolo d'esempio)

In un matraccio graduato da 100 mL aggiungere esattamente circa:

- 12,5 mg di acesulfame di potassio (3.1.2)
- 25 mg di aspartame (3.1.3)
- 25 mg di ciclamato di sodio (3.1.4)
- 5 mg di saccarina (3.1.5)
- 25 mg di sucralosio (3.1.6)

Sciogliere in circa 20 mL di acqua/metanolo (1:1) e quindi portare a volume con la soluzione tampone. Passare agli ultrasuoni se necessario.

Questa soluzione L3 si conserva tra 2 °C e 8 °C per 6 mesi.

### 5.2.2. Preparazione delle soluzioni di lavoro L2 e L1

Partendo dalla soluzione L3, preparare gli altri due livelli come segue:

L2: soluzione L3 diluita a 1/2. Ad esempio, in un matraccio da 20 mL, porre 10 mL di L3 e portare a volume con la soluzione tampone.

L1: soluzione L3 diluita a 2/25. Ad esempio, in un matraccio da 25 mL, porre 2 mL di L3 e portare a volume con la soluzione tampone.

Filtrare le soluzioni standard con dei filtri per siringa e porre i vial nel campionatore.

*Tabella riassuntiva delle soluzioni standard (fornita a titolo d'esempio):*

Edulcoranti	Soluzione madre (L3)			Soluzione di lavoro (L2)			Soluzione di lavoro (L1)		
	Pesata (mg)	Volume del matraccio	Concentrazione In mg/L	Volume prelevato da L3	Volume del matraccio	Concentrazione In mg/L <sup>1</sup>	Volume prelevato da L3	Volume del matraccio	Concentrazione In mg/L
Acesulfame di potassio	12,5	100 mL	125	10 mL	20 mL	62,5	2 mL	25 mL	10
Aspartame	25		250			125			20
Ciclamato di sodio	25		250			125			20
Saccarina	5		50			25			4
Sucralosio	25		250			125			20

### 5.3. Condizioni cromatografiche

A titolo d'esempio vengono indicate di seguito le condizioni che hanno permesso di ottenere i risultati che figurano in allegato:

- Temperatura del forno a colonna: 30 °C
- Temperatura del campionatore: 20 °C
- Composizione della fase mobile (reattivi di qualità HPLC):
- Fase A: 72% metanolo/ 25% tampone/ 3% acetone
- Fase B: 12% metanolo/ 88% tampone
- Lunghezza d'onda del rivelatore UV: 210 nm
- Flusso: 1 mL/min
- Volume d'iniezione: 10 µL
- Parametri del CAD:
- Filtro: 3,6
- Frequenza di campionamento: 10 Hz
- Temperatura: alta (50 °C)
- Fattore di correzione (power function): da 0 a 13 min: 1,50; da 13 a 40 min: 1,48

Gradiente di eluizione da applicare:

Tempo (min)	Percentuale di A	Percentuale di B
0	0%	100%
4	0%	100%
11	53%	47%
18,5	82%	18%
25	82%	18%

27	100%	0%
31	100%	0%
32	0%	100%
40	0%	100%

Stabilizzare la colonna con la fase mobile B e i rivelatori CAD e DAD per la durata di tempo necessaria.

## 6. Calcoli

I risultati sono calcolati per standardizzazione esterna in funzione dell'area del picco di ciascun edulcorante e si esprimono in mg/L secondo la formula:

$$\text{Concentrazione campione (mg/L)} = \left( \frac{A_c - Int}{P} \right) \times \text{Diluizione}$$

Dove  $A_c$  è l'area del picco del campione,  $Int$  è l'ordinata all'origine della curva di calibrazione e  $P$  la pendenza della curva di calibrazione.

## 7. Espressione dei risultati

Per i valori < 10 mg/L, i risultati possono essere espressi in mg/L con una cifra significativa dopo la virgola.

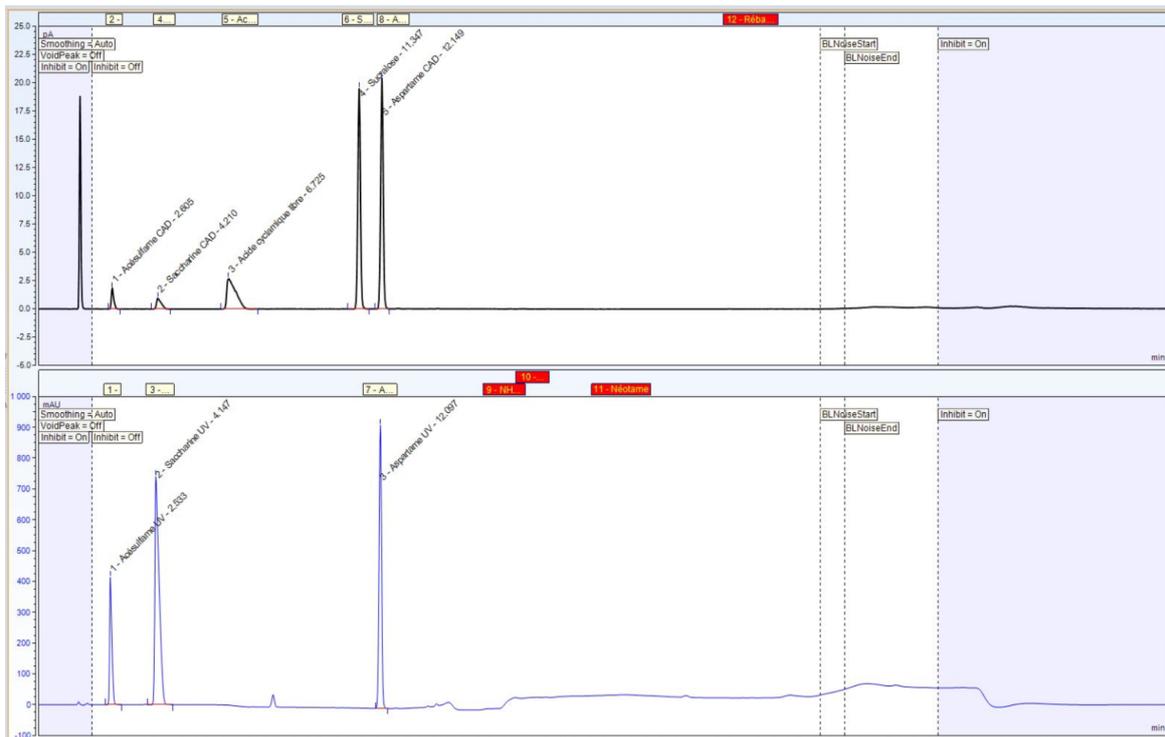
Per i valori  $\geq$  10 mg/L, i risultati possono essere espressi in mg/L, senza decimali.

## 8. Bibliografia

1. Organizzazione internazionale della vigna e del vino (OIV), *Raccolta dei metodi internazionali di analisi dei vini e dei mosti*, vol. 1 e 2.
2. NF EN 15911: Simultaneous determination of nine sweeteners by high performance liquid chromatography and evaporative light scattering detection in beverages and canned fruits.
3. ISO 3696: Acqua per uso analitico in laboratorio - Requisiti e metodi di prova.

#### 4. ISO 11352: Water quality -- Estimation of measurement uncertainty based on validation and quality control data.

### Allegato 1: Esempio di cromatogramma di una soluzione standard di livello 3



### Allegato 2: Esempio di validazione interna

Il metodo è stato sottoposto a una valutazione delle prestazioni ed è stato condotto uno studio di validazione interna sulla matrice “vino bianco” e “bevanda a base di vino bianco”

La tabella di seguito riassume le caratteristiche del metodo ottenute con questo lavoro:

Edulcoranti	Ripetibilità in % (r%)	Riproducibilità intralaboratorio in % (R%)	Limite di rivelabilità accettato in mg/L	Limite di quantificazione accettato in mg/L	Intervallo di linearità in mg/L
Acesulfame di potassio	2,5	8,5	2	5	5-125
Saccarina	1,7	6,8	1	2	2-50
Aspartame	1,9	8,7	4	10	10-250
Ciclamato di sodio	5,5	12,8	4	10	10-250
Sucralosio	6,6	12,9	4	10	10-250

Il limite di quantificazione accettato corrisponde al livello 1, il primo punto della curva di calibrazione.

Il limite di rivelabilità accettato corrisponde a 1/3 del limite di quantificazione.

La linearità è stata verificata analizzando 5 livelli di concentrazione per ciascun dolcificante da 5 ripetizioni per livello in giorni diversi.

Ripetibilità e riproducibilità sono state ottenute analizzando ciascun dolcificante in ogni tipo di matrice in 5 giorni diversi con 2 ripetizioni ogni volta, essendo su 3 livelli di concentrazione scelti nell'intervallo di linearità del metodo.