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, ciclammato 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 ciclammato 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

Esemplare certificato conforme Ensenada, 4 novembre 202
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale
Pau ROCA

© OIV 2022

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 ≥ 99%) (N. CAS 55589-62-3)

3.1.3. Aspartame (purezza ≥ 98%) (N. CAS 22839-47-0)

3.1.4. Ciclammato di sodio (purezza ≥ 98%) (N. CAS 139-05-9)

3.1.5. Saccarina, sale sodico diidrato (purezza ≥ 98%) (N. CAS 6155-57-3)

3.1.6. Sucralosio (purezza ≥ 98%) (N. CAS 56038-13-2)

3.1.7. Acido formico (purezza ≥ 98%) (N. CAS 64-18-6)

3.1.8. Bicarbonato d'ammonio (purezza ≥ 98%) (N. CAS 1066-33-7)

3.1.9. Metanolo per HPLC (purezza ≥ 99,9%) (N. CAS 67-56-1)

3.1.10. Acetone per HPLC (purezza ≥ 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

Esemplare certificato conforme Ensenada, 4 novembre 202
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale
Pau ROCA

© OIV 2022

4.2. pH-metro

4.3. Agitatore

4.4. Bagno a ultrasuoni

4.5. Bilancia analitica con una precisione di ± 0,01 mg

4.6. Matracci tarati di classe A

4.7. Filtri per siringa da 0,45 µm in cellulosa rigenerata (ad esempio)

4.8. Colonna C18 per HPLC (15 cm di lunghezza, 4,6 mm di diametro interno, 5 µm)

4.9. Sistema cromatografico composto da:

- un sistema di pompaggio con almeno 3 canali,
- un campionatore termostatato,
- 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.

Esemplare certificato conforme Ensenada, 4 novembre 202
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale
Pau ROCA

© OIV 2022

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 ciclammato 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[1]	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
Ciclammato di sodio	25		250			125			20
Saccarina	5		50			25			4
Sucralosio	25		250			125			20

Esemplare certificato conforme Ensenada, 4 novembre 202
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale
Pau ROCA

© OIV 2022

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%

Esemplare certificato conforme Ensenada, 4 novembre 202
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale
Pau ROCA

© OIV 2022

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:

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

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 ≥ 10 mg/L, i risultati possono essere espressi in mg/L, senza decimali.

8. Bibliografia

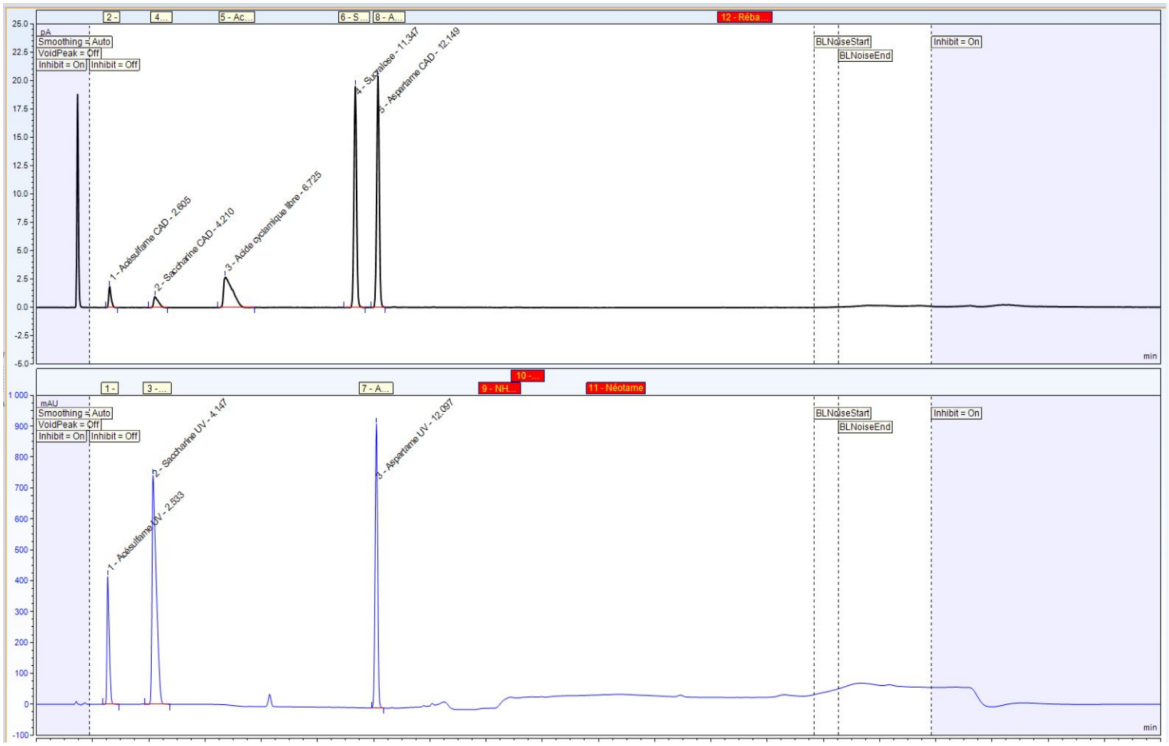
1. Organizzazione internazionale della vigna e del vino (OIV), *Raccolta dei metodi internazionali di analisi dei vini e dei mosti*, vol. 1 e 2.
2. NF EN 15911: Simultaneous determination of nine sweeteners by high performance liquid chromatography and evaporative light scattering detection in beverages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

Esemplare certificato conforme Ensenada, 4 novembre 202
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale
Pau ROCA

© OIV 2022

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:

Esemplare certificato conforme Ensenada, 4 novembre 202
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale
Pau ROCA

© OIV 2022

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
Ciclammato 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.

Esemplare certificato conforme Ensenada, 4 novembre 202
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale
Pau ROCA

© OIV 2022