



RISOLUZIONE ENO 23/2004

DOSAGGIO DEGLI ACIDI ORGANICI E ANIONI MINERALI NEI VINI MEDIANTE CROMATOGRAFIA IONICA

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 dei metodi di analisi e valutazione dei vini,

DECIDE di completare l'Allegato A della Raccolta dei metodi internazionali d'analisi del vino, con il seguente metodo di tipo IV:

DETERMINAZIONE DEGLI ACIDI ORGANICI E DEGLI ANIONI MINERALI NEI VINI MEDIANTE CROMATOGRAFIA IONICA

Introduzione

Lo sviluppo della cromatografia ionica ad alta risoluzione nei laboratori ha permesso di studiare con questa tecnica il dosaggio degli acidi organici e degli anioni minerali nelle bevande alcoliche o non alcoliche.

Trattandosi nella fattispecie dell'analisi dei vini, i risultati dei saggi di comparazione incrociata e le misurazioni dei tassi di recupero hanno permesso di validare una metodologia analitica.

L'interesse principale di questo metodo consiste nel fatto che le colonne a scambio ionico consentono una separazione della maggior parte degli acidi organici e degli anioni, mentre il rilevamento per conduttometria evita all'analista le interferenze dovute alla presenza di composti fenolici. Tale tipo d'interferenze è notevole nei metodi cromatografici che comportano un rilevamento nell'ultravioletto a 210 nm.

1 – Oggetto e campo di applicazione

Il metodo di dosaggio degli anioni minerali e degli acidi organici mediante cromatografia ionica è applicabile alle bevande alcoliche (vini, acquaviti e liquori). Esso consente di dosare gli acidi organici negli intervalli di concentrazione riportati nella tabella 1; tali concentrazioni sono ottenute mediante diluizione dei campioni.

*Esemplare certificato conforme
Parigi, il 30 luglio 2004
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale*

Federico CASTELLUCCI



RISOLUZIONE ENO 23/2004

Tabella 1 : Ambito di concentrazione degli anioni per l'analisi a cromatografia ionica

Solfato	da 0,1 a 10	mg/l
Ortofosfato	da 0,2 a 10	mg/l
Acido malico	da 1 a 20	mg/l
Acido tartarico	da 1 a 20	mg/l
Acido citrico	da 1 a 20	mg/l
Acido isocitrico	da 0,5 a 5	mg/l

Le condizioni di lavoro appena citate sono date a titolo indicativo. Esse integrano modalità di calibratura praticate correntemente e sono quindi modulabili in funzione del tipo di apparecchiatura utilizzata (natura della colonna, sensibilità del rilevatore,...) e del modo di operare (volume di campione iniettato, diluizione,...).

2- Principio

Separazione degli anioni minerali e degli acidi organici su una resina a scambio ionico.

Rilevamento per conduttometria.

Identificazione in base al tempo di ritenzione e quantificazione mediante una curva di taratura.

3 - Reagenti

Tutti i reagenti utilizzati nel corso dell'analisi devono essere di qualità analitica. L'acqua per la preparazione delle soluzioni deve essere distillata o deionizzata con una conducibilità inferiore a 0,06 μ S, esente da anioni in quantità superiore ai limiti di rilevamento che l'apparecchiatura permette di raggiungere.

3.1 Eluente

La composizione dell'eluente dipende dalla natura della colonna di separazione e dalla natura del campione da analizzare. Essa va comunque preparata sempre a partire da soluzioni acquose d'idrossido di sodio.

Le prestazioni dell'analisi cromatografica sono alterate per la carbonatazione della soluzione d'idrossido di sodio; di conseguenza le bottiglie di fase mobile vengono ripulite mediante elio prima di immettere idrossido di sodio e si devono prendere tutte le precauzioni per evitare di contaminarle con l'aria ambiente.

Infine, saranno utilizzate soluzioni d'idrossido di sodio concentrate, commerciali.

Nota

La tabella del capitolo 7 ricorda i principali interferenti che possono essere presenti nei campioni.

È dunque necessario sapere preliminarmente se essi coeluiscono con gli ioni da dosare e se sono presenti a una concentrazione tale da rendere inaffidabile l'analisi.

*Esemplare certificato conforme
Parigi, il 30 luglio 2004
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale*

Federico CASTELLUCCI



RISOLUZIONE ENO 23/2004

Le bevande fermentate contengono acido succinico che può interferire con l'acido malico. Per questo motivo è necessario aggiungere metanolo nell'eluente per migliorare la risoluzione della colonna a livello di queste due sostanze (20 % di metanolo).

3.2 Soluzioni "madri" di riferimento

Preparare delle soluzioni "madri" di riferimento a concentrazioni precise vicine a quelle indicate nella tabella successiva. Sciogliere nell'acqua, in matracci tarati da 1000 ml, dei quantitativi di sali o acidi corrispondenti (Tabella 2).

Tabella 2: Concentrazione degli anioni dosati nelle soluzioni "madri" di riferimento

Anioni e acidi	Composti pesati	Concentrazione finale (mg/l)	Quantità pesata (mg)
Solfato	Na_2SO_4	500	739,5
Ortofosfato	KH_2PO_4	700	1003,1
Ac. malico	Ac. malico	1000	1000,0
Ac. tartarico	Ac. tartarico	1000	1000,0
Ac. citrico	Ac. Citrico. H_2O	1000	1093,8
Ac. isocitrico	Isocitrato $3\text{Na} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	400	612,4

Nota

Il laboratorio deve prendere le precauzioni necessarie per la caratteristica igroscopica di alcuni sali.

3.3 Soluzioni di riferimento

Le soluzioni di riferimento sono ottenute mediante diluizione nell'acqua delle soluzioni "madri" di riferimento di ogni ione o acido.

Tali soluzioni devono contenere tutti gli ioni o gli acidi dosati in una gamma di concentrazioni che coprano necessariamente quella corrispondente ai campioni da analizzare. Esse devono essere preparate il giorno stesso del loro utilizzo.

Vanno analizzate almeno due soluzioni di riferimento e un bianco in modo da stabilire, per sostanza, delle curve di taratura mediante tre punti (0, metà della concentrazione massima, concentrazione massima).

Nota

La tabella 1 fornisce indicazioni sulle concentrazioni massime in anioni e acidi nelle soluzioni di riferimento, anche se le prestazioni delle colonne cromatografiche sono migliori con soluzioni molto diluite.

*Esemplare certificato conforme
Parigi, il 30 luglio 2004
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale*

Federico CASTELLUCCI



RISOLUZIONE ENO 23/2004

Bisogna pertanto cercare il più possibile l'adeguamento tra le prestazioni della colonna e il livello di diluizione dei campioni.

In linea di massima, si deve diluire il campione tra 50 e 200 volte al massimo, salvo casi particolari.

Per migliorare la durata di vita delle soluzioni secondarie, si raccomanda di prepararle in soluzione in una miscela acqua/metanolo (80/20).

4 - Apparecchiatura

Materiale corrente di laboratorio e,

4.1 Insieme di strumenti per la cromatografia ionica comprendente:

4.1.1 Serbatoi d'eluenti

4.1.2 Pompa a flusso costante, esente da pulsazioni

4.1.3 Dispositivo di iniezione, manuale o automatico, costituito da un iniettore con regolatore del volume (per esempio 25 o 50 µl).

4.1.4 Colonne di separazione

Insieme costituito da una colonna a scambio anionico, a prestazione controllata, ed eventualmente di una precolonna dello stesso tipo della colonna principale. A titolo di esempio, è possibile utilizzare le colonne AS11 e la precolonna AG11 di DIONEX®.

4.1.5 Sistema di rilevamento

Cella conduttimetrica a circolazione, a basso volume, collegata a un conduttimetro con diversi livelli di sensibilità.

Per abbassare la conducibilità dell'eluente, è installato un dispositivo di eliminazione chimica, scambiatore cationico a monte della cella conduttimetrica.

4.1.6 Registratore, integratore o altro dispositivo di trattamento dei segnali.

4.2 Bilancia sensibile a 1 mg

4.3 Matracci tarati da 10 a 1000 ml

4.4 Pipette calibrate da 1 a 50 ml

4.5 Membrane filtranti dal diametro medio dei pori di 0,45 µm.

*Esemplare certificato conforme
Parigi, il 30 luglio 2004
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale*

Federico CASTELLUCCI



RISOLUZIONE ENO 23/2004

5 - Campionamento

I campioni sono diluiti tenendo conto degli anioni minerali e degli acidi organici che si intende dosare.

Se la loro concentrazione nel campione è molto variabile, saranno necessari due livelli di diluizione allo scopo di rispettare i settori di concentrazione coperti dalle soluzioni di riferimento.

6 – Modo di operare

Azionare l'apparecchiatura secondo le istruzioni fornite dal fabbricante.

Regolare le condizioni di pompaggio (flusso d'eluente) e di rilevamento in modo da ottenere una separazione selettiva dei picchi nella gamma di concentrazione degli ioni da analizzare.

Lasciare che il sistema si stabilizzi fino ad ottenere una linea di base stabile.

6.1 Taratura

Preparare le soluzioni di riferimento come indicato al punto 3.3.

Iniettare le soluzioni di riferimento in modo tale che il volume iniettato sia almeno 5 volte quello del loop per consentire il lavaggio del sistema.

Costruire le curve di taratura per ciascun ione. Esse devono essere di norma delle rette.

6.2 Prova in bianco

Iniettare l'acqua utilizzata nella preparazione delle soluzioni di riferimento e dei campioni.

Controllare l'assenza di picchi interferenti e quantificare gli anioni minerali presenti (cloruro, solfato...).

6.3 Analisi

Diluire eventualmente il campione a due livelli diversi come indicato al punto 5, in modo che gli anioni e gli acidi da dosare siano presenti negli intervalli delle concentrazioni delle soluzioni di riferimento.

Filtrare il campione diluito su una membrana filtrante (4.5) prima dell'iniezione.

Procedere quindi come per la taratura (6.1).

7 - Ripetibilità, riproducibilità

Questo metodo è stato testato da diversi laboratori, anche se non si tratta di una validazione formale secondo il protocollo OIV (eno 6/99).

Sono stati calcolati secondo la norma ISO 5725 i limiti di ripetibilità e di riproducibilità del dosaggio di ciascuno ione nei vini.

Ogni analisi è stata ripetuta 3 volte.

Numero di laboratori partecipanti: 11; I risultati sono i seguenti:

*Esemplare certificato conforme
Parigi, il 30 luglio 2004
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale*

Federico CASTELLUCCI



RISOLUZIONE ENO 23/2004

Vino bianco

	N° laboratori considerati	Media (mg/l)	Ripetibilità (mg/l)	Riproducibilità (mg/l)
Acido malico	11/11	2745	110	559
Acide citrico	9/11	124	13	37
Acide tartarico	10/11	2001	96	527
Solfato	10/11	253	15	43
Ortofosfato	9/11	57	5	18

Vino rosso

	N° laboratori considerati	Media (mg/l)	Ripetibilità (mg/l)	Riproducibilità (mg/l)
Acido malico	8/11	128	16	99
Acido citrico	8/10	117	8	44
Acide tartarico	9/11	2154	48	393
Solfato	10/11	324	17	85
Ortofosfato	10/11	269	38	46

8 - Calcolo dei tassi di recupero

Il campione addizionato è un vino bianco

Determinazione	N° laboratori considerati	Concentrazione iniziale (mg/l)	Aggiunta reale (mg/l)	Aggiunta misurata (mg/l)	Tasso di recupero (%)
Acido citrico	11/11	122	25,8	24,2	93,8
Acido malico	11/11	2746	600	577	96,2
Acido tartarico	11/11	2018	401	366	91,3

9 - Rischi di interferenze

Qualsiasi sostanza il cui tempo di ritenzione coincida con quello di uno degli ioni analizzati, può costituire un'interferenza.

*Esemplare certificato conforme
Parigi, il 30 luglio 2004
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale*

Federico CASTELLUCCI



RISOLUZIONE ENO 23/2004

Le interferenze più frequenti sono le seguenti:

Anioni o acidi	Interferenti
Nitrato	bromuro
Solfato	ossalato, maleato
Ortofosfato	ftalato
Acido malico	Acido succinico, Acido citramalico
Acido tartarico	Acido malonico
Acido citrico	-
Acido isocitrico	-

Nota

L'aggiunta di metanolo nella fase mobile può risolvere certi problemi di analisi.

Per esempio:

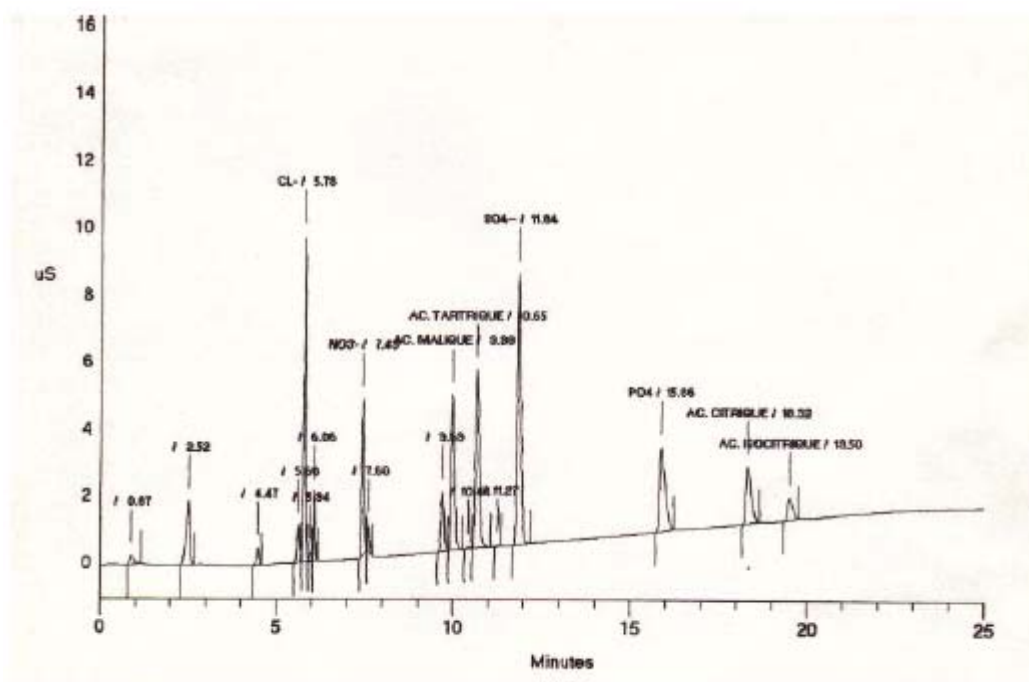
- La presenza di metanolo nella fase mobile non è sempre richiesta ; tuttavia è indispensabile per ottenere una risoluzione adeguata tra acido succinico e acido malico durante l'analisi dei vini.
- Gli ioni ossalati e solfati coeluiscono con la maggior parte delle condizioni cromatografiche; è necessario il 13% di metanolo nella fase mobile per separarli.
- La risoluzione dei picchi che corrispondono agli acidi acetico e lattico è soddisfacente se si ottiene un gradiente di eluizione in idrossido di sodio, senza metanolo.

*Esemplare certificato conforme
Parigi, il 30 luglio 2004
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale*

Federico CASTELLUCCI

10 - Esempi di cromatogrammi

Allegato (a)



Cromatogramma di una soluzione di riferimento di acidi organici e anioni minerali:

Cloruro (1,96 mg/l), Nitrato (2,21 mg/l), Acido malico (5,35 mg/l), Acide tartarico (5,08 mg/l), Solfato (2,8 mg/l), Ortofosfato (3,9 mg/l), Acido citrico (3,24 mg/l), Acido isocitrico (1,6 mg/l).

Apparecchiatura utilizzata di marca DIONEX: Pompa, Rilevatore PED, soppressore AMMSII con AUTOREGEN, colonna AS11 e precolonna AG11.

Flusso 2ml/mn -

Fase mobile 1: Acqua-NaOH 0,5mM/l, metanolo (80/20)

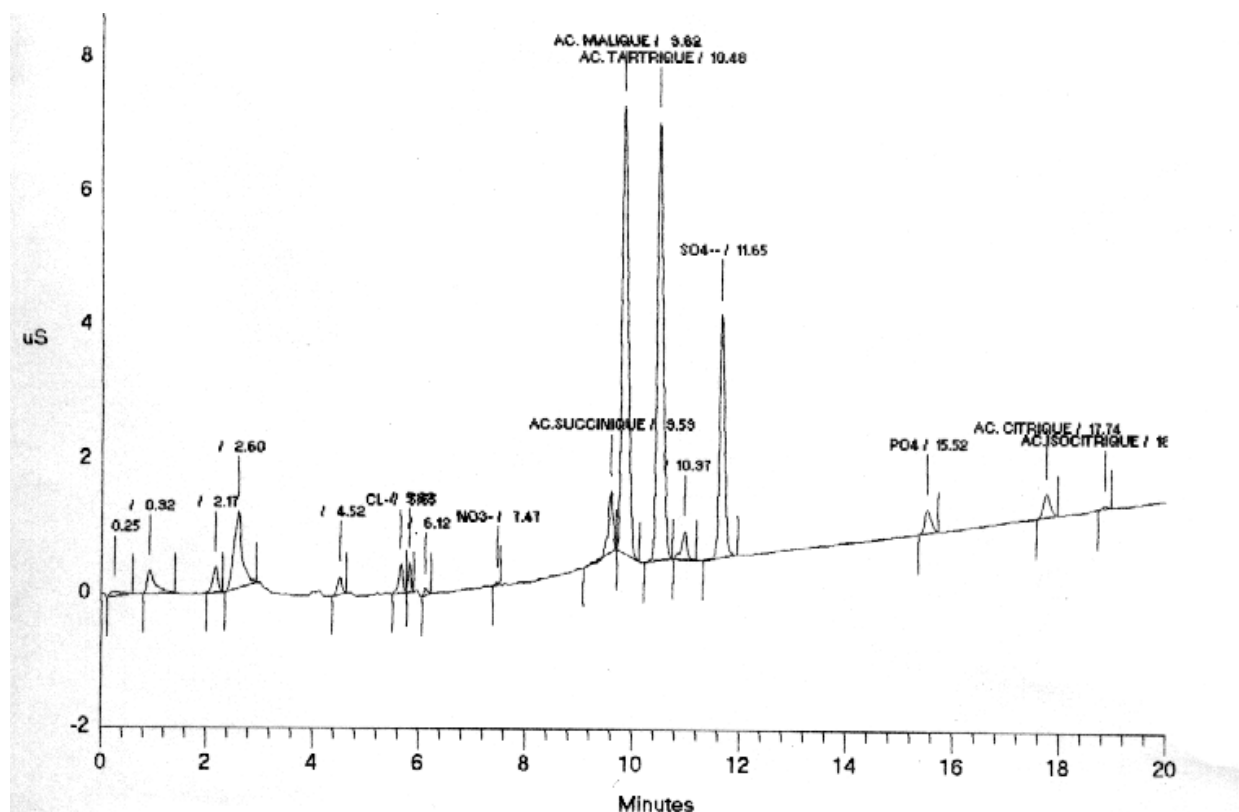
Fase mobile 2: Acqua-NaOH 100mM/l, metanolo (80/20)

Gradiente di eluizione: 100% Fase mobile 1 a 65% fase mobile 1 in 25 mn.

*Esemplare certificato conforme
Parigi, il 30 luglio 2004
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale*

Federico CASTELLUCCI

Allegato (b)



Cromatogramma di un vino rosato diluito 200 volte:

Apparecchiatura utilizzata di marca DIONEX: Pompa, Rilevatore PED, soppressore AMMSII con AUTOREGEN, colonna AS11 e precolonna AG11.

Flusso 2ml/mn -

Fase mobile 1: Acqua-NaOH 0,5mM/l, metanolo (80/20)

Fase mobile 2: Acqua-NaOH 100mM/l, metanolo (80/20)

Gradiente di eluizione: 100% Fase mobile 1 a 65% fase mobile 1 in 25 mn.

*Esemplare certificato conforme
Parigi, il 30 luglio 2004
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale*

Federico CASTELLUCCI