



RISOLUZIONE OIV-OENO 574-2017

MONOGRAFIA SUI TANNINI – AGGIORNAMENTO DEL METODO PER LA DETERMINAZIONE DEI POLIFENOLI

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 del Gruppo di esperti "Specificazione dei prodotti enologici",

DECIDE di sostituire il punto 6.9 "Stima dei fenoli totali" della scheda COEI-1-TANINS del *Codex enologico internazionale* con il seguente punto:

6.9 Stima della ricchezza dei fenoli totali

La stima della ricchezza dei fenoli totali viene effettuata secondo il metodo descritto in allegato.

Per i fenoli totali i risultati devono essere superiori al 65%.

METODO PER LA STIMA DEL CONTENUTO DI POLIFENOLI TOTALI

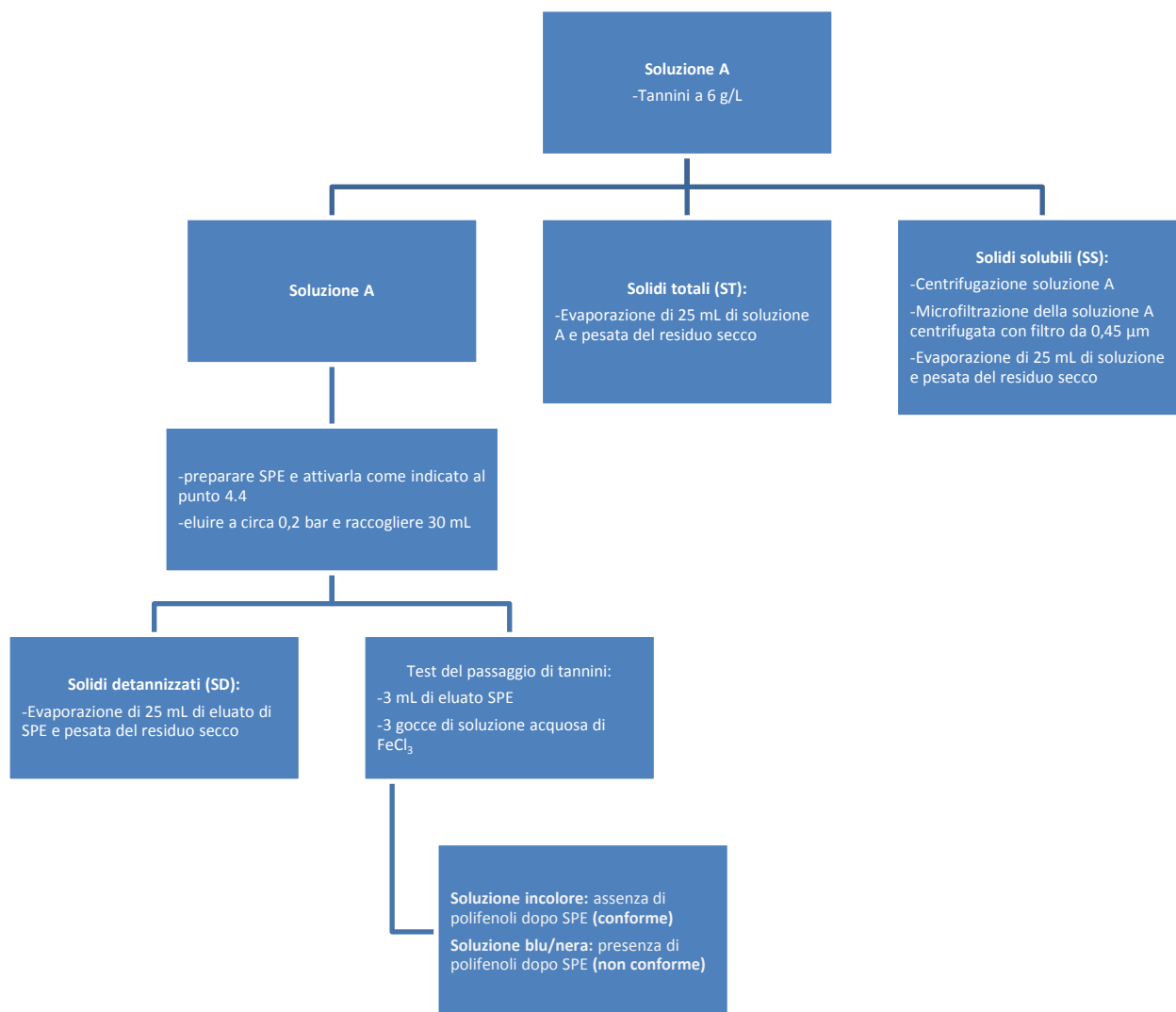
1. PRINCIPIO

Lo scopo del presente metodo è misurare la concentrazione dei polifenoli nelle preparazioni di tannini enologici; esso si basa sull'analisi gravimetrica mediante estrazione in fase solida o SPE. I tannini in soluzione acquosa vengono adsorbiti su un polimero contenuto in una colonna per SPE, in questo caso il polivinilpirrolidone, in grado di trattenere i polifenoli. Le sostanze non trattenute dal PVPP corrispondono a dei composti non fenolici inizialmente presenti nel campione d'origine.

*Esemplare certificato conforme
Sofia, il 2 giugno 2017
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale*

Jean-Marie AURAND

Si riporta di seguito il diagramma completo del metodo:



*Esemplare certificato conforme
Sofia, il 2 giugno 2017
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale*

Jean-Marie AURAND

2. REAGENTI, APPARECCHIATURA E STRUMENTAZIONE

2.1 Reagenti

- 2.1.1 PVPP (polivinilpolipirrolidone), [n. CAS 9003-39-8]
- 2.1.2 Soluzione acquosa di FeCl₃ (1 g/L)
- 2.1.3 Acqua bidistillata
- 2.1.4 Etanolo (20% v/v)

2.2 Apparecchiatura

- 2.2.1 Piatti in alluminio (70 mL)
- 2.2.2 Provette a fondo conico monouso con tappi (50 mL)
- 2.2.3 Colonne SPE (serbatoio da 70 mL, 150*29,75 mm)
- 2.2.4 Fritte per colonna SPE (diametro di 27 mm – 20 µm PE)
- 2.2.5 Beuta in vetro Pyrex da 1000 mL
- 2.2.6 Provette da 50 mL di classe A
- 2.2.7 Filtro a membrana in acetato di cellulosa da 0,45 µm, Ø 47 mm
- 2.2.8 Siringa in plastica da 50 mL
- 2.2.9 Pipette graduate in vetro (2 tacche) da 25 mL di classe A

2.3 Strumentazione

- 2.3.1 Bagno termostato a 20 °C
- 2.3.2 Bilance tecniche di precisione 0,01 g
- 2.3.3 Bilance analitiche di precisione 0,1 mg
- 2.3.4 Forno termostato a 105 °C
- 2.3.5 Forno termostato a 80 °C o bagno termostatico
- 2.3.6 Centrifuga
- 2.3.7 Collettore sottovuoto
- 2.3.8 Vetreria volumetrica di classe A
- 2.3.9 Essiccatore

*Esemplare certificato conforme
Sofia, il 2 giugno 2017
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale*

Jean-Marie AURAND

3. PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Per misurare i solidi totali (ST), i solidi solubili (SS) e i solidi detannizzati (SD) si utilizza la soluzione indicata di seguito (soluzione A).

Pesare circa 6 g di tannini sulla bilancia analitica e annotare il peso. In una beuta in vetro Pyrex da 1 L sciogliere i tannini in circa 950 mL di acqua bidistillata calda (60-70 °C) e agitare bene. Lasciar riposare la beuta a temperatura ambiente per 30 minuti. Raffreddare la soluzione in un bagno termostato a 20-22 °C, portare a volume con acqua bidistillata e miscelare bene.

4. PROCEDIMENTO

4.1 Misurazione dei solidi totali (ST)

- Prelevare e trasferire 25 mL di soluzione A in un piatto di alluminio (vedere 2.2.1),
- far evaporare in un forno termostato a 80 °C fino ad essiccamento,
- trasferire in un forno termostato a 105 °C e procedere all'essiccamento fino al raggiungimento di un peso costante; pesare il residuo (prima di determinare il peso, lasciar raffreddare i piatti nell'essiccatore).

Per il calcolo dei solidi totali (ST) utilizzare la seguente formula:

$$ST\% = \frac{\text{residuo}_{secco} \text{ ST}(g)}{\text{peso}_{tannini} (g)} \cdot \frac{1000}{(mL)_{solA}} \cdot 100$$

4.2 Misurazione dei solidi solubili (SS)

- Centrifugare la soluzione A a 10.000 g per 5 minuti
- microfiltrare la soluzione A centrifugata utilizzando un filtro a membrana da 0,45 µm, in modo da ottenere una soluzione limpida; quindi, far evaporare 25 mL di soluzione in un forno termostato a 80 °C fino ad essiccamento,
- trasferire in un forno termostato a 105 °C e procedere all'essiccamento fino al raggiungimento di un peso costante; pesare il residuo (prima di determinare il peso, lasciar raffreddare i piatti nell'essiccatore).

Per il calcolo dei solidi solubili (SS) utilizzare la seguente formula:

*Esemplare certificato conforme
Sofia, il 2 giugno 2017
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale*

Jean-Marie AURAND

$$SS\% = \frac{\text{residuo}_{secco} SS (g)}{\text{peso}_{tannini} (g)} \cdot \frac{1000}{(mL)solA} \cdot 100$$

4.3 Misurazione dei solidi insolubili (SI)

Calcolare la differenza tra i solidi totali e i solidi solubili utilizzando la seguente formula:

$$SI\% = ST\% - SS\%$$

4.4 Misurazione dei solidi detannizzati (SD)

- Preparare le colonne SPE: introdurre la prima frittta, $7,0 \pm 0,1$ g di PVPP, precedentemente reidratata con una soluzione idroalcolica al 20% per 15 minuti, e la seconda frittta, poi compattare bene la fase stazionaria,
- posizionare la colonna SPE sul collettore sottovuoto (esempio in figura 1),
- condizionare la colonna con tre lavaggi (non lasciar essiccare il PVPP e applicare un vuoto di circa 0,2 bar per evitare il compattamento del polimero): primo lavaggio con 50 mL di etanolo (20% v/v); secondo lavaggio con 50 mL di acqua bidistillata; terzo lavaggio con 20 mL di soluzione A per eliminare i residui di acqua dal PVPP,
- aggiungere 30 mL di soluzione A dalla parte superiore della colonna e raccogliere 30 mL di eluato (SD, solidi detannizzati) in una provetta a fondo conico da 50 mL Falcon; interrompere l'eluizione quando il liquido raggiunge il livello della frittta superiore,
- prelevare 25 mL di eluato e trasferirli su un piatto di alluminio,
- far evaporare in un forno termostato a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ fino ad essiccamento,
- trasferire in un forno termostato a $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ e procedere all'essiccamento fino al raggiungimento di un peso costante, pesare il residuo (prima di determinare il peso, lasciar raffreddare i piatti nell'essiccatore).

Per il calcolo dei solidi detannizzati (SD) utilizzare la seguente formula:

$$SD\% = \frac{\text{residuo}_{secco} SD(g) - BK(g)}{\text{peso}_{tannini} (g)} \cdot \frac{1000}{(mL)solA} \cdot 100$$

dove BK è il valore relativo al bianco misurato dopo la SPE (v. punto 4.5).

*Esemplare certificato conforme
Sofia, il 2 giugno 2017
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale*

Jean-Marie AURAND



Figura 1 – Esempio di estrazione SPE

Per garantire l'assenza di polifenoli nell'eluato dopo il passaggio attraverso la colonna, aggiungere a 3 mL di soluzione di solidi detannizzati (SD) 3 gocce di soluzione acquosa di FeCl_3 . Se si osserva una variazione di colore verso una sfumatura nero-bluastro, i polifenoli sono passati attraverso il polimero; pertanto, è necessario ripetere l'analisi riducendo il peso iniziale del prodotto. Qualora la soluzione rimanga incolore dopo il trattamento con le 3 gocce, si può procedere con l'analisi gravimetrica.

4.5 Misurazione del bianco (BK)

Prima di eseguire l'eluizione SPE, è necessario procedere a un test del bianco, in modo da poter valutare le eventuali interferenze provocate dal processo analitico. Procedere nel modo indicato di seguito:

- preparare le colonne SPE: introdurre la prima frittata, $7,0 \pm 0,1$ g di PVPP, precedentemente reidratata con una soluzione idroalcolica al 20% per 15 minuti, e la seconda frittata, poi impaccare bene,
- posizionare la colonna SPE sul collettore sottovuoto (esempio in figura 1),
- condizionare la colonna con due lavaggi (non lasciar essiccare il PVPP e applicare un vuoto di circa 0,2 bar per evitare il compattamento del polimero): primo lavaggio con 50 mL di etanolo (20% v/v); secondo lavaggio con 70 mL di acqua bidistillata,
- aggiungere 30 mL di acqua bidistillata dalla parte superiore della colonna e raccogliere 30 mL di eluato (bianco per i solidi detannizzati) in una provetta a fondo conico da 50 mL Falcon; interrompere l'eluizione quando il liquido raggiunge il livello della frittata superiore,

*Esemplare certificato conforme
Sofia, il 2 giugno 2017
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale*

Jean-Marie AURAND

- prelevare 25 mL di eluato e trasferirli su un piatto di alluminio; far quindi evaporare in un forno termostato a 80 °C fino ad essiccamento,
- trasferire in un forno termostato a 105 °C e procedere all'essiccamento fino al raggiungimento di un peso costante, pesare il residuo (prima di determinare il peso, lasciar raffreddare i piatti nell'essiccatore).

5 ESPRESSIONE DEI RISULTATI

Misurazione della percentuale di polifenoli totali (%polifenoli):

La formula per calcolare la percentuale di tannini è:

$$\%polifenoli = \frac{SS\% - SD\%}{ST\%} \cdot 100$$

- Valutazione dell'idoneità del PVPP: CONSULTARE OENO 11/2002 - COEI-1-PVPP: 2007, PAR. 6.

*Esemplare certificato conforme
Sofia, il 2 giugno 2017
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale*

Jean-Marie AURAND