



## RISOLUZIONE OIV-OENO 595-2018

### DETERMINAZIONE DELL'ETANALE TOTALE NEI VINI MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA AD ALTA PRESTAZIONE

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 aggiungere all'allegato A, sezione 3 della *Raccolta dei metodi internazionali di analisi dei vini e dei mosti* il metodo seguente:

#### METODO DI TIPO IV

### DETERMINAZIONE DELL'ETANALE TOTALE NEI VINI MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA AD ALTA PRESTAZIONE

#### SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE

Il metodo descritto è adatto alla determinazione dell'etanale totale (libero e legato all'anidride solforosa) nei vini per concentrazioni comprese tra 0.2 e 80 mg/l.

#### 1. PRINCIPIO

L'identificazione dell'analita avviene mediante derivatizzazione della molecola con 2,4 dinitrofenilidrazina (DNPH) e successiva eluizione tramite tecnica HPLC, la rilevazione è effettuata considerando il tempo di ritenzione alla lunghezza d'onda di 365nm.

#### 2. REAGENTI E PRODOTTI

- 2.1. 2,4 dinitrofenilidrazina (DNPH) CAS Number 119-26-6, purity  $\geq 99.0\%$  (HPLC)
- 2.2. Anidride solforosa ( $\text{SO}_2$ ) come potassio metabisolfito ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ) CAS Number: 16731-55-8, purity  $\geq 98\%$
- 2.3. Acido solforico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) CAS Number 7664-93-9, purity 95.0-98.0%
- 2.4. Acido formico ( $\text{CH}_2\text{O}_2$ ) CAS Number 64-18-6, purity  $\sim 98\%$
- 2.5. Acetonitrile ( $\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$ ) CAS Number 75-05-8, purity  $\geq 99.9\%$
- 2.6. Etanale ( $\text{CH}_3\text{CHO}$ ) CAS Number 75-07-0, purity  $\geq 99.5\%$
- 2.7. Acqua ultrapura per HPLC CAS Number 7732-18-5 di Tipo I secondo ASTM D1193 ISO 3696.
- 2.8. Acido perclorico ( $\text{HClO}_4$ ) CAS Number 7601-90-3, purity 70%

*Esemplare certificato conforme  
Punta del Este, il 23 novembre 2018  
Il Direttore Generale dell'OIV  
Segretario dell'Assemblea Generale*

Jean-Marie AURAND

#### *Preparazione delle soluzioni di reagenti*

- 2.9. Soluzione preparata fresca di anidride solforosa con concentrazione 1120 mg/l di SO<sub>2</sub> ottenuta preparando una soluzione di 2 g/l di K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (2.2) in acqua ultrapura per HPLC.
- 2.10. Soluzione di acido solforico al 25 % v/v preparata diluendo l'acido solforico concentrato (2.3) con acqua ultrapura per HPLC.
- 2.11. Soluzione di acetonitrile acidificato con acido perclorico al 2.8 % ottenuta diluendo l'acido perclorico (2.8) con acetonitrile (2.5).
- 2.12. Soluzione preparata fresca di 2,4 dinitrofenilidrazina (2.1) in acetonitrile acidificato (2.11) con concentrazione di 2 g/l di DNPH.
- 2.13. Preparazione delle soluzioni di calibrazione.

La soluzione madre è preparata diluendo la quantità opportuna di etanale (densità = 0.785 g/mL) in acqua ultrapura per HPLC per avere una concentrazione di tra 300 e 400 mg/L. Poiché l'etanale puro è molto volatile è opportuno preparare la soluzione madre prelevando volumi fissi di etanale mediante matracci tarati (3.1). La soluzione madre è preparata prelevando 10 mL di acetaldeide pura con un matraccio tarato, trasferendo l'acetaldeide pura in un altro matraccio tarato da 20 mL e portando a volume con acqua ultrapura per HPLC. Le soluzioni diluite saranno preparate portando a volume in matracci tarati di capacità maggiore con acqua ultrapura per HPLC. Le soluzioni di calibrazione avranno le concentrazioni di 10mg/l, 30mg/l, 50mg/l, 70mg/l e 100 mg/l e sono ottenute mediante diluizione opportuna della soluzione madre in matracci tarati da 50 ml. I volumi saranno prelevati dalla soluzione madre mediante micropipette di precisione (3.2) e portati a volume con acqua ultrapura per HPLC in matracci tarati (3.1).

#### *Preparazione del solvente A per l'analisi HPLC*

- 2.14. Soluzione di acido formico al 0.5 % v/v preparata diluendo l'acido formico concentrato (2.4) con acqua ultrapura per HPLC (2.7).

### **3. APPARECCHIATURE**

- 3.1. Vetreria tipica di laboratorio di cui matracci da 10ml-20ml 50ml di classe A vials da 2ml e contenitori da litro per i solventi e pipette Pasteur
- 3.2. Micropipette di precisione
- 3.3. Agitatore di tipo vortex
- 3.4. Filtri a membrana di 0,45 micron per la preparazione di campioni, certificati per uso in HPLC
- 3.5. Beuta da vuoto da 1l (nel caso l'HPLC non sia fornito di degasatore automatico dei solventi).
- 3.6. Pompa da vuoto (nel caso l'HPLC non sia fornito di degasatore automatico dei solventi).
- 3.7. Bilancia analitica con risoluzione  $\pm 0,0001$  g;
- 3.8. Stufa a convenzione naturale con precisione di  $\pm 1^\circ\text{C}$  a  $+65^\circ\text{C}$ .
- 3.9. HPLC con rilevatore UV, due pompe per lavorare in gradiende e forno per il riscaldamento della colonna
- 3.10. colonna C18 (250 x 4.6 mm, 4 $\mu\text{m}$  diametro delle particelle)

*Nota: Qualsiasi altro sistema può essere utilizzato a condizione che separi bene l'acetaldeide*

*Esemplare certificato conforme  
Punta del Este, il 23 novembre 2018  
Il Direttore Generale dell'OIV  
Secretario dell'Assemblea Generale*

*Jean-Marie AURAND*

*dagli altri composti carbonilici derivatizzati. La risoluzione cromatografica tra il picco dell'acetaldeide e il picco più vicino nel cromatogramma deve essere maggiore di 1.*

#### 4. CAMPIONAMENTO

Il vino deve essere prelevato e conservato in contenitore di vetro chiuso con tappo in teflon e in ambiente inerte (azoto o argon).

#### 5. PROCEDIMENTO

##### Derivatizzazione

La derivatizzazione viene condotta in vials di vetro con tappo in teflon da 2 ml, all'interno della quale si aggiungono in successione 100 µl di vino o soluzione standard filtrato a 0,45 µm, 20 µl di una soluzione preparata fresca di anidride solforosa (2.2) con concentrazione (1120mg/l di SO<sub>2</sub>), 20 µl di acido solforico al 25% (2.3) e 140µl di una soluzione preparata fresca di 2,4 dinitrofenilidrazina in acetonitrile con concentrazione 2 g/l di DNPH (2.12).

Al termine delle aggiunte la soluzione è prontamente agitata tramite vortex e messa in stufa a 65° per 15 minuti e successivamente raffreddata a temperatura ambiente.

Terminata la reazione la soluzione è lasciata raffreddare a temperatura ambiente per 15 minuti per poi essere iniettata nell'HPLC. I campioni devono essere iniettati entro 10 ore dalla fine della reazione di derivatizzazione.

##### Analisi HPLC

Si forniscono qui di seguito i parametri specifici dell'analisi HPLC a titolo di esempio.

##### Condizioni tipiche di funzionamento

- Volume di iniezione 15 µl
- Flusso di eluente 0,75ml/min
- Colonna C18 (5.10)
- Solvente per la pulizia dell'iniettore: acetonitrile
- Temperatura della colonna 35°C
- Solvente di fase mobile A: 0,5% di acido formico in acqua ultrapura per HPLC
- Solvente di fase mobile B: acetonitrile
- Rilevazione a 365 nm

##### Gradiente di eluizione

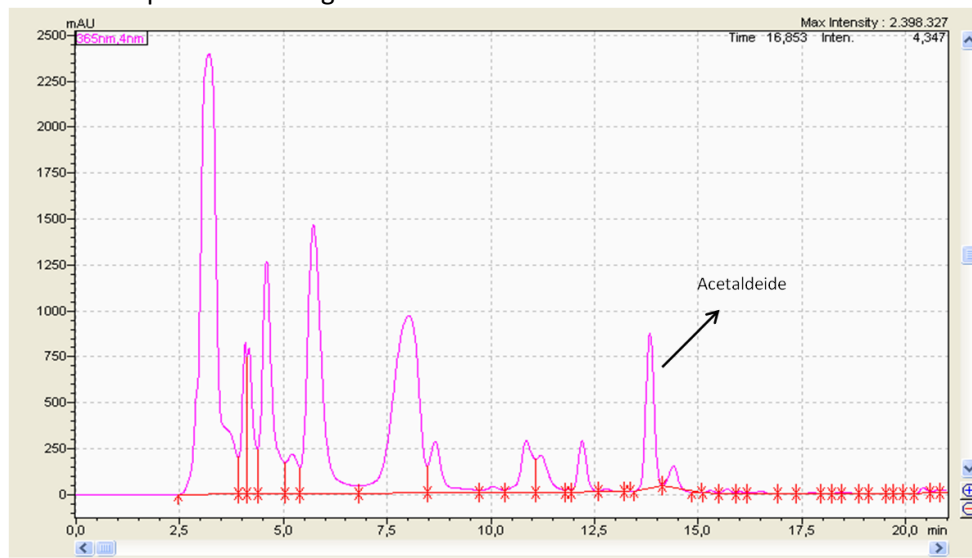
Il protocollo di eluizione prevede:

35% eluente B (0,1 sec)	65 % eluente A (0,1 s)
60% eluente B (8minuti)	40 % eluente A (8 min)
90% eluente B (13minuti)	10 % eluente A (13 min)
95% eluente B (15minuti)	5 % eluente A (15 min)
95% eluente B (17minuti)	5 % eluente A (17 min)
35% eluente B (21minuti)	65 % eluente A (21 min)
35% eluente B (25minuti)	65 % eluente A (25 min)

*Esemplare certificato conforme  
Punta del Este, il 23 novembre 2018  
Il Direttore Generale dell'OIV  
Secretario dell'Assemblea Generale*

*Jean-Marie AURAND*

### Esempio di cromatogramma



## 6. CALCOLO

La concentrazione di etanale viene calcolata in base all'equazione della retta di calibrazione ottenuta iniettando le soluzioni di calibrazione (2.13).

## 7. PRECISIONE E PARAMETRI DI VALIDAZIONE

Il coefficiente di variazione per analisi ripetute nello stesso laboratorio è inferiore al 6% (nell'intervallo di concentrazione 10-100 mg/l). Lo scarto tipo di ripetibilità è di 2.7% per una concentrazione di 14 mg/l, 2.98% per una concentrazione di 18 mg/l, 4.8% per una concentrazione di 22 mg/l, 1.3% per una concentrazione di 60 mg/l. Il range di linearità è 0.2-80.0 mg/L. Il limite di rilevabilità è 0.1 mg/l. Il recupero in vino è compreso tra 92 e 102% (m/m).

## 8. RISULTATI

I risultati sono espressi come mg di etanale totale/l e con 1 cifra decimale.

## 9. BIBLIOGRAFIA DI RIFERIMENTO

Behforouz, M., Bolan, J. L., & Flynt, M. S. (1985). 2, 4-Dinitrophenylhydrazones: a modified method for the preparation of these derivatives and an explanation of previous conflicting results. *The Journal of Organic Chemistry*, 50(8), 1186-1189.

Elias, R. J., Laurie, V. F., Ebeler, S. E., Wong, J. W., & Waterhouse, A. L. (2008). Analysis of selected carbonyl oxidation products in wine by liquid chromatography with diode array detection. *Analytica chimica acta*, 626(1), 104-110.

Han, G., Wang, H., Webb, M. R., & Waterhouse, A. L. (2015). A rapid, one step preparation for measuring selected free plus SO<sub>2</sub>-bound wine carbonyls by HPLC-DAD/MS. *Talanta*, 134, 596-602.

*Esemplare certificato conforme  
Punta del Este, il 23 novembre 2018  
Il Direttore Generale dell'OIV  
Segretario dell'Assemblea Generale*

Jean-Marie AURAND