

**RISOLUZIONE OIV-OENO 619-2019**

METODO DI DETERMINAZIONE DEL POLIASPARTATO DI POTASSIO NEI VINI MEDIANTE CROMATOGRAPHIA LIQUIDA AD ALTA PRESTAZIONE ACCOPPIATA A RIVELATORE FLUORIMETRICO

Metodo di tipo IV

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 "Metodi di analisi",

CONSIDERATA la risoluzione OIV-OENO 543-2016 sul trattamento con poliaspartato di potassio nel vino,

DECIDE di completare la *Raccolta dei metodi internazionali di analisi dei vini e dei mosti* con il seguente metodo:

METODO DI DETERMINAZIONE DEL POLIASPARTATO DI POTASSIO NEI VINI MEDIANTE CROMATOGRAPHIA LIQUIDA AD ALTA PRESTAZIONE ACCOPPIATA A RIVELATORE FLUORIMETRICO

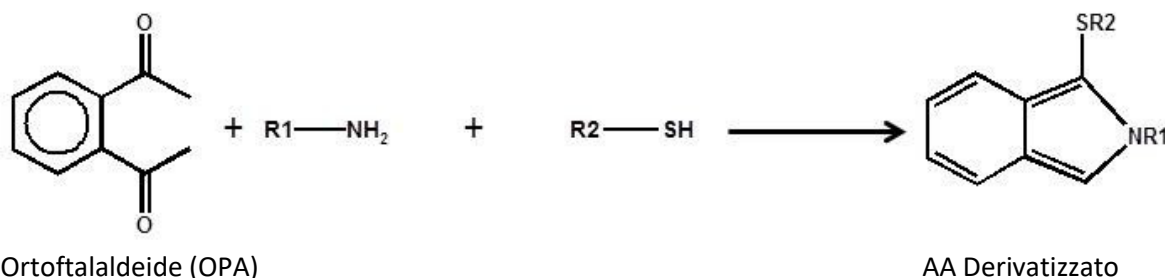
1. CAMPO DI APPLICAZIONE

Il metodo è applicabile all'analisi del Poliaspartato di Potassio (KPA) nei vini per concentrazioni superiori a 40 mg/L.

2. PRINCIPIO

La procedura operativa prevede la determinazione mediante derivatizzazione con Ortoftalaldeide (OPA) e successiva analisi cromatografica con rilevazione fluorimetrica del contenuto di acido aspartico nel vino pre- e post- idrolisi acida.

Il confronto tra la differenza in contenuto di acido aspartico tra il campione idrolizzato e quello non idrolizzato sarà indice dell'aggiunta di poliaspartato.



R1-NH₂: acido aspartico

R2-SH: mercaptoetanolo

Esemplare certificato conforme Ginevra, il 19 luglio 2019
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale

Pau ROCA



3. REAGENTI E PRODOTTI

Utilizzare acqua ultrapura (EN ISO 3696 grado 3 o acqua bidistillata)

Per idrolisi acida:

3.1 Sodio metabisolfito ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, CAS number: 7681-57-4) soluzione a 10 g/L: pesare 5 grammi di Sodio metabisolfito in pallone da 500 mL Classe A e portare a volume con acqua ultrapura

3.2 Acido cloridrico (HCl, CAS number: 7647-01-0) 6M

3.3 Idrossido di sodio (NaOH , CAS number: 1310-73-2) 5M

Soluzioni Standard

3.4 Acido aspartico (DL-Aspartic acid $\text{C}_4\text{H}_7\text{NO}_4 \geq 99\%$ CAS number: 617-45-8)

3.4.1 Soluzione madre 1: soluzione di acido aspartico a 8000 mg/L in H_2O ultrapura

3.4.2 Soluzione madre 2: soluzione di acido aspartico a 200 mg/L in H_2O ultrapura

3.5 Acido aminocaproico ($\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_2 \geq 99\%$ CAS number: 60-32-2)

3.5.1 Soluzione madre di acido aminocaproico a 1000 mg/L in H_2O ultrapura (standard interno)

Soluzioni di calibrazione preparate per diluizione dalle soluzioni madre 1 e 2 in H_2O bististillata. Di seguito sono riportati i valori guida:

- **STD1 a 2 mg/L**: prelevare 0,200 mL della soluzione madre 2 (3.4.2) e portare a volume in matraccio da 20 mL con H_2O ultrapura

- **STD2 a 10 mg/L**: prelevare 1,000 mL della soluzione madre 2 (3.4.2) e portare a volume in matraccio da 20 mL con H_2O ultrapura

- **STD3 a 50 mg/L**: prelevare 5,000 mL della soluzione madre 2 (3.4.2) e portare a volume in matraccio da 20 mL con H_2O ultrapura

- **STD4 a 100 mg/L**: prelevare 0,250 mL della soluzione madre 1 (3.4.1) e portare a volume in matraccio da 20 mL con H_2O ultrapura

- **STD5 a 250 mg/L**: prelevare 0,625 mL della soluzione madre 1 (3.4.1) e portare a volume in matraccio da 20 mL con H_2O ultrapura

- **STD6 a 500 mg/L**: prelevare 1,250 mL della soluzione madre 1 (3.4.1) e portare a volume in matraccio da 20 mL con H_2O ultrapura

Soluzione derivatizzante:

3.6 Sodio tetraborato x 10 H_2O (solido, $> 99\%$, CAS number: 1303-96-4)

3.6.1 Soluzione tampone 0,1M di sodio tetraborato x 10 H_2O a pH 10,5: sciogliere 19,1 g in acqua ultrapura e portare a volume in matraccio da 500 mL, verificare il valore di pH.

3.7 Ortoftaldeide (OPA) ($\text{C}_8\text{H}_6\text{O}_2 \geq 99\%$ CAS number: 643-79-8)

3.8 Mercaptoetanolo ($\text{C}_2\text{H}_6\text{OS} \geq 99\%$ CAS number: 60-24-2)

3.9 Soluzione derivatizzante: in un matraccio da 10 mL introdurre 100 mg di OPA, 200 μL di mercaptoetanolo, 1 mL di metanolo e portare a volume con una soluzione tampone a pH 10,5 di sodio tetraborato decaidrato 0,1M. La soluzione deve essere ripreparata all'uso.

Fasi mobili per HPLC:

3.10 Alcol metilico HPLC grade (liquido)

3.11 Tetraidrofurano HPLC grade (liquido)

3.12 Sodio acetato anidro (CAS number: 127-09-3)

3.12.1 Tampone sodio acetato 0,05M: sciogliere 2,05 g in acqua ultrapura e portare a volume in matraccio da 500 mL

Esemplare certificato conforme Ginevra, il 19 luglio 2019

Il Direttore Generale dell'OIV

Secretario dell'Assemblea Generale

Pau ROCA



3.13 Acetonitrile (CH_3CN) HPLC grade (liquido)

3.14 Acqua ultrapura (ad esempio di qualità EN ISO 3696 grado 3 o acqua bidistillata)

3.15 Fase mobile:

- [eluente A]: acqua ultrapura
- [eluente B]: tampone sodio acetato 0,05M/tetraidrofurano (96:4)
- [eluente C]: metanolo
- [eluente D]: acetonitrile

4. MATERIALE E STRUMENTAZIONE

Quando non meglio specificato, la vetreria necessaria per la preparazione delle soluzioni dovrà essere di classe A.

4.1 Piastra riscaldante

4.2 Vial da 4 mL in vetro scuro con tappo a vite

4.3 Micropipetta 0,100-1,000 mL

4.4 Microfiltro in cellulosa acetato a trottolina con porosità 0,20 μm

4.5 Bilancia analitica

4.6 Matracci tarati

4.7 Sistema HPLC che include pompa quaternaria, campionatore automatico, comparto colonna termostato, FLD

4.8 Colonna: Fase polare C18 end-capped (ad esempio Synchronis aQ 4,6x250mm; 5 μm)

5. PROCEDIMENTO

Il procedimento è diviso in tre fasi operative: l'idrolisi acida a caldo del campione di vino, la procedura di preparazione dei campioni (sia degli standard di calibrazione che dei vini pre e post idrolisi) da sottoporre all'analisi mediante HPLC-FLD per la determinazione della concentrazione di acido aspartico e analisi HPLC-FLD.

Fase 1: Idrolisi acida

- Trasferire in vial da 4 mL (4.2) di vetro scuro con tappo a vite rispettivamente:
 - 0,2 mL della soluzione di sodio metabisolfito a 10 g/L (3.1)
 - 2 mL del campione di vino
 - 2 mL di HCl 6M (3.2)
- Riscaldare mediante piastra riscaldante a 108 ± 2 °C per 72 ore
- Trasferire in matraccio da 10 mL, aggiungere 2,5 mL di NaOH 5M (3.3) e portare a volume con acqua ultrapura

La verifica dell'intero processo di idrolisi acida è riportata al paragrafo 6.

Fase 2: preparativa per analisi HPLC

Il metodo prevede una reazione di derivatizzazione dell'acido aspartico con ortoftalaldeide (OPA). Per la preparazione dei campioni per l'analisi HPLC si procede come indicato di seguito:

- Soluzioni standard di calibrazione e campioni di vino pre-idrolisi:
 - Prelevare e microfiltrare (filtro 0,20 μm) 1 mL della soluzione da analizzare in matraccio da 20 mL
 - Aggiungere 0,2 mL di standard interno (3.5.1)
 - Portare a volume con acqua ultrapura

Esemplare certificato conforme Ginevra, il 19 luglio 2019
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale

Pau ROCA



- Campioni post-idrolisi:

- Prelevare e microfiltrare (filtro 0,20 µm) 5 mL della soluzione da analizzare in matraccio da 20 mL
- Aggiungere 0,2 mL di standard interno (3.5.1)
- Portare a volume con acqua ultrapura

Fase 3: analisi HPLC

I parametri strumentali per l'analisi HPLC-FLD, a titolo di esempio, sono riportati di seguito:

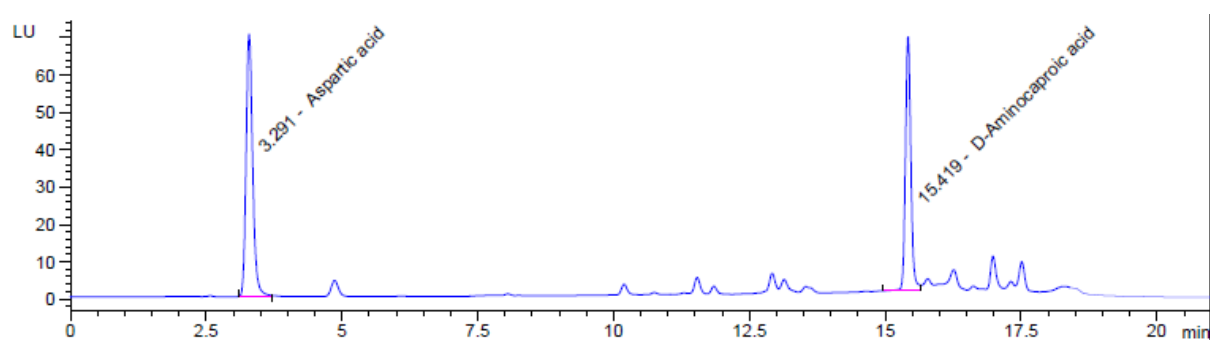
- Temperatura fornello 40°C
- Iniezione: 10 µL
- Lunghezza d'onda (λ): FLD Ex 340 nm, Em 450 nm;
- La separazione è realizzata in gradiente (vedi eluenti al punto 3.15):

Tempo	%B	%C	%D	Flusso
0,00	100,0	0,0	0,0	1,1
3,00	100,0	0,0	0,0	1,1
15,00	50,0	25,0	25,0	1,1
17,00	84,0	8,0	8,0	1,1
18,00	100,0	0,0	0,0	1,1
Stop time 21 min + 2 min post time				

Di seguito si riporta, a titolo di esempio, la modalità di derivatizzazione automatizzata con autocampionatore:

- Posizioni dei reagenti nell'autocampionatore:
 - posizione 1: metanolo
 - posizione 3: OPA
 - posizione 4: vial vuota
 - posizione 11: acqua ultrapura
- Step di derivatizzazione:
 - prelevare 2,0 µL di aria
 - prelevare 20,0 µL dal vial 1
 - immettere 20,0 µL nel vial 4
 - prelevare 5,0 µL dal campione
 - immettere 5,0 µL nell'alloggiamento
 - prelevare 0,0 µL dal vial 1 (per pulizia esterna dell'ago)
 - prelevare 5,0 µL dal vial 3
 - immettere 5,0 µL nell'alloggiamento
 - miscelare 10,0 µL nell'alloggiamento, 10 volte
 - attendere 0,50 min
 - iniettare

Nel caso in cui si ottengano risultati superiori al limite della curva di taratura diluire opportunamente il campione e rieseguire l'analisi.



Cromatogramma relativo a Vino Rosso

6. CONTROLLO QUALITÀ

In ogni serie analitica eseguire un controllo qualità per l'analisi di un campione di vino con l'aggiunta di 100 mg/L di acido aspartico.

Il campione preparato secondo le indicazioni al punto 5 è analizzato all'inizio della serie e i risultati ottenuti, espressi come tasso di rendimento, sono riportati su una carta di controllo.

7. CARATTERISTICHE DEL METODO: PARAMETRI DI VALIDAZIONE INTRALABORATORIO

- Linearità:

vengono utilizzati calibranti a titolo noto non idrolizzati e derivatizzati, per simulare l'intero processo analitico. Ogni sequenza, per essere accettata, deve avere curve di calibrazione con un $R^2 > 0,990$ (figura 1).

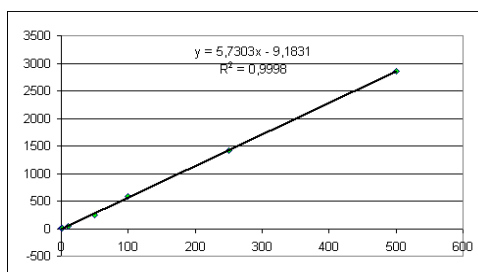


Figura 1

- Recupero ed Effetto matrice:

Soluzioni acquose:

la verifica del recupero dei processi di idrolisi acida e derivatizzazione viene effettuata mediante confronto tra soluzioni acquose standard di acido aspartico pre e post idrolisi. Sono state preparate tre soluzioni a concentrazione nota (25, 100, 200 mg/L) e i dati ottenuti sono riportati in tabella:

	Test 1	Test 2	Test 3
pre-idrolisi (mg/L)	25,4	109	213
post-idrolisi (mg/L)	25,2	108	213
recupero (%)	99,2	99,1	100



Vino:

è stato applicato il metodo delle aggiunte standard (aggiunte scalari di poliaspartato di potassio a 50 mg/L e a 200 mg/L per la verifica dell'interferenza dovuta alla matrice nella determinazione del KPA) a vino bianco e vino rosso. Per ogni livello sono state eseguite 5 prove di ripetibilità.

	Vino rosso TQ (mg/L)	Vino rosso + 50 mg/L	Vino rosso + 200 mg/L	Vino bianco TQ (mg/L)	Vino bianco + 50 mg/L	Vino bianco + 200 mg/L
Repliche (in Ac. Asp.)	84,0	123,9	258,2	121,9	164,6	294,2
	85,4	127,3	259,4	123,2	163,3	291,5
	83,8	125,1	250,2	121,9	170,3	291,3
	87,7	124,4	253,5	119,5	161,9	284,8
	83,2	126,1	256,9	123,3	160,0	287,4
Media (in Ac. Asp.)	84,8	125,4	255,6	122,0	164,0	289,8
S _r (in Ac. Asp.)	1,8	1,4	3,8	1,5	3,9	3,7
Media (in KPA aggiunto)	-	46,6	196,3	-	48,3	193,0
S _r (in KPA aggiunto)	-	2,8	5,0	-	4,9	3,8
Horrat r	-	0,99	0,52	-	1,71	0,48
KPA teorico	-	50	200	-	50	200
Rec KPA %	-	93	98	-	94	96

S_r (in Ac. Asp.): deviazione standard dei test di ripetibilità espresso in acido aspartico

S_r (in KPA): deviazione standard dei test di ripetibilità espresso in KPA

Rec KPA %: recupero espresso in KPA

Il recupero deve rientrare nell'intervallo 80 - 110 %. La ripetibilità soddisfa il criterio di Horrat.

- Limite di rilevabilità e Limite di quantificazione:

Considerando che il vino ha un contenuto naturale di Acido aspartico si è scelto di determinare LOD e LOQ con l'approccio del rapporto segnale/rumore determinato su campioni di vino.

CALCOLO DEL LIMITE DI RIVELABILITA' E QUANTIFICAZIONE		
CASO 3: È NOTO IL SEGNALE RAPPORTO/RUMORE (S/N) PER BASSA CONCENTRAZIONE		
C	24,74	Valore della concentrazione del campione di vino
S/N	122,5	Rapporto segnale/rumore
LOD	0,7	Limite di rivelabilità
LOQ	2,1	Limite di quantificazione (3 LOD)

8. CALCOLO ED ESPRESSIONE DEL RISULTATO

Il calcolo dei milligrammi per litro (mg/L) di acido aspartico presente nei campioni viene eseguito dal processore del programma di acquisizione.

La quantifica per il poliaspartato di potassio (KPA) aggiunto si ottiene per differenza tra campione sottoposto ad idrolisi e il campione tal quale non idrolizzato:

$$KPA(mg/l) = (AcidoAspartico_{vino_idrolizzato} - AcidoAspartico_{vino_tq}) \cdot f_{KPA}$$

Esemplare certificato conforme Ginevra, il 19 luglio 2019

Il Direttore Generale dell'OIV

Segretario dell'Assemblea Generale

Pau ROCA



dove f_{KPA} è il fattore di conversione da acido aspartico a poliaspartato di potassio calcolato dal rapporto tra i pesi molecolari del monomero di poliaspartato di potassio e dell'acido aspartico, secondo l'equazione:

$$f_{KPA} = \frac{PM_{monomeroKPA}}{PM_{acidoaspartico}} = 1,15$$

I risultati vanno espressi in mg/L con un solo numero significativo dopo la virgola.

9. **BIBLIOGRAFIA**

- OIV-MA-AS1-10 (OENO 7/2000)

Esemplare certificato conforme Ginevra, il 19 luglio 2019
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale

Pau ROCA