

RISOLUZIONE OIV-OENO 687-2023

VALIDAZIONE DEL METODO DI DOSAGGIO DELL'ACIDO SORBICO NEI VINI MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA (OENO 6/2006)

AVVISO: La presente risoluzione modifica la seguente risoluzione:
- OENO 6/2006

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 OENO 06/2006 "Dosaggio degli acidi sorbico, benzoico e salicilico nei vini mediante cromatografia liquida ad alte prestazioni", adottata nel 2006,

CONSIDERATO che la presente validazione riguarda solo l'acido sorbico,

DECIDE di aggiungere l'allegato A "Validazione del metodo di dosaggio dell'acido sorbico nei vini mediante cromatografia liquida" e modificare il metodo relativo all'acido sorbico da tipo IV a tipo II,

DECIDE di modificare la risoluzione OENO 06/2006 "Dosaggio degli acidi sorbico, benzoico e salicilico nei vini, mediante cromatografia liquida ad alte prestazioni", e di conseguenza anche il metodo OIV-MA-AS313-20, come segue (le parti aggiunte sono in grassetto, le parti eliminate sono barrate):

2. Campo di applicazione

Tutti i vini o mosti di uva, in particolare quelli in grado di contenere soltanto tracce di acido sorbico, benzoico o salicilico (~~evidenziato a partire da 1 mg/l~~).

3. Principio del metodo

Gli antisettici vengono dosati con CLHP mediante iniezione diretta del campione in una colonna che funziona per suddivisione in fasi inverse e isocratica con rilevamento **nell'ultravioletto a 235 nm.**^[1]

4.11. Soluzione idroalcolica a 50% vol. o altra concentrazione adeguata. Mettere 500 ml di alcol puro (4.10) in un matraccio da 1 l e completare con acqua distillata (4.1).

5.7. Rivelatore in grado di funzionare nell'ultravioletto a 235 nm(1) munito di una vaschetta a circolazione per HPLC (per esempio di 8 □l con 1 cm di tragitto ottico).

5.8. Colonna per CLHP di fase stazionaria da 5 □m del tipo silice innestata con gruppi funzionali ottadecilenici (C18) lunghi 20 cm e dal diametro interno di 4 mm(1).

6.2. Degasificare il solvente d'eluizione (4.6) per 5 minuti mediante bagno a ultrasuoni (5.2) o qualsiasi altro metodo adatto.

6.3. Filtrare il solvente utilizzando il dispositivo (5.43).

8. Espressione di calcolo

Dopo aver individuato i picchi degli acidi da dosare nel campione, paragonare l'area dei picchi con quelle degli acidi di una soluzione figlia (4.13) di concentrazione C nota. Sia data, per esempio, s l'area del picco dell'acido da dosare. S l'area del picco della soluzione (4.13) di concentrazione C

$$X_{(nel\ campione)} = C \times \frac{s}{S} \text{ in. mg/l}$$

È anche possibile utilizzare una curva di calibrazione e determinare la concentrazione per interpolazione.

9. Caratteristiche del metodo

9.1 Per l'acido sorbico

La prova interlaboratorio e i relativi risultati sono riportati nell'allegato A.

- $r = 0.0148 x + 0.5498$
- $R = 0.0936 x + 1.5542$
- x: concentrazione di acido sorbico (mg/l)

9.2 Per gli acidi benzoico e salicilico

	Acido sorbico	Acido benzoico	Acido salicilico
Intervallo di linearità	0 a 200 mg/l	0 a 200 mg/l	0 a 200 mg/l
Accuratezza (tasso di recupero)	>90%	>90%	>90%
Ripetibilità: r*	2%	3%	8%
Riproducibilità: R*	8%	9%	12%
Limite di determinazione	3 mg/l	3 mg/l	3 mg/l
Limite di quantificazione	5 mg/l	6 mg/l	7 mg/l
Incertezza	11%	12%	13%

ALLEGATO A - Dati statistici ottenuti dai risultati delle prove interlaboratorio

I parametri illustrati di seguito sono stati definiti durante una prova interlaboratorio. Questa prova è stata condotta dal laboratorio dell'Instituto dos Vinhos do Douro e do Porto (Portogallo).

Anno in cui è stata condotta la prova interlaboratorio: 2020

1. Laboratori: 23 laboratori di 14 paesi diversi



HBLA und Bundesamt für Wein- und Obstbau Klosterneuburg	Austria
Department of Agriculture	Cyprus
Czech Agriculture and Food Inspection Authority	Czech Republic
Comité Interprofessionnel du Vin de Champagne	France
Laboratoires Dubernet	France
Service Commun des Laboratoires-Laboratoire de Montpellier	France
Service Commun des Laboratoires-Laboratoire de Bordeaux	France
Landesuntersuchungsamt, Institut für Lebensmittelchemie	Germany
Lebensmittel- u. Veterinärinstitut Braunschweig/Hannover	Germany
National Food Chain Safety Office	Hungary
Unione Italiana Vini Servizi	Italy
Vassanelli Lab s.r.l.	Italy
AsureQuality Ltd Laboratory Services	New Zealand
Arcus Norway AS	Norway
ASAE-Autoridade de Segurança Alimentar e Económica	Portugal
Instituto dos Vinhos do Douro e do Porto	Portugal
RUDN University	Russian Federation
National Laboratory of Health, Environment and Food (Novo Gorica)	Slovenia
National Institute of Chemistry	Slovenia
National Laboratory of Health, Environment and Food (Novo Mesto)	Slovenia
Laboratorio Arbitral Agroalimentario.	Spain
Estación Enológica de Haro- La Rioja	Spain
Cukurova University Food Engineering Dept.	Turkey

2. Numero di campioni: 6 campioni in duplicato

- 2 vini bianchi: A/G, C/K
- 1 vino bianco - vendemmia tardiva: I/O
- 1 vino rosso: D/M
- 1 vino rosé: B/F
- 1 vino rosso fortificato (titolo alcolometrico 19% vol.): E/N

3. Condizioni analitiche

Le condizioni analitiche sono riassunte nella tabella 1.

4. Risultati individuali

I risultati individuali per l'acido sorbico (mg/L) sono riassunti nella tabella 2.

5. Analisi dei dati

- L'analisi statistica è stata eseguita secondo le raccomandazioni dell'OIV al fine di ottenere dati di precisione.
- I valori inferiori al limite di quantificazione sono stati considerati come valori normali.
- La determinazione dei valori aberranti è stata valutata mediante i test di Cochran e Grubbs.
- I risultati sono riassunti nelle tabelle 3 e 4.
- I limiti di ripetibilità e riproducibilità in funzione della concentrazione di acido sorbico sono rappresentati in figura 1.
- Il punteggio Z di ogni laboratorio è stato valutato rispetto ai valori complessivi dei diversi campioni. I risultati sono riportati in figura 2.

TABELLA 1 - CONDIZIONI ANALITICHE

Codice lab.	Curva di calibrazione	Colonna	Rilevamento	Fase mobile	Portata (mL/min)	Temperatura della colonna (°C)	Vol. di iniezione (µL)
1	sì	Altima C18LL (250 x 4,6 mm, 5 µm)	□ = 235 nm	H ₂ O pH=2,0/MeOH/THF (650/280/70)	1	ambiente	20
2	sì	Luna Phenomenex C18 (250 x 4,6 mm)	□ = 235 nm	0,389 acetato di ammonio in 1 L H ₂ O + 250 mL ACN (aggiustato a pH=4, con CH ₃ COOH)	1,25	35	20
3	sì	Poreshell 120 EC-C18 (150 x 4,4 mm, 2,7 µm)	□ = 235 nm	A: 0,7% THF in H ₂ O (pH=2)/B: MeOH (80% A e 20% B)	1,5	40	5
4	sì	RP-18 (250-4)	□ = 254 nm	tampone di acetato di ammonio pH 4,4: MeOH = 70:30	1	40	20
6	sì	PerfectSil Target ODS-3 HD (250 x 4,6 mm, 5 µm)	□ = 235 nm	ACN:soluzione tampone (35:65); soluzione tampone = acetato di ammonio (1,8 g/L) + acido acetico pH=4,3	1	40	2
7	sì	PoroShell C18 (4,6 x 75 mm, 2,7 µm)	□ = 235 nm	isocratica: 80% H ₂ O acidificata con acido solforico; 20% ACN	1,5	25	20
8	sì	Rezex-ROA - acido organico H+ 8 % (300 x 7,8 mm)	□ = 254 nm	solvente di eluizione: acido solforico 0,025M	1	90	50
9	sì	Colonna Ultrasphere ODS HICROM (250 x 4,6 mm, 5 µm)	□ = 235 nm	650 mL H ₂ O pH 2 con 280 mL MeOH + 7 mL THF	0,6	25	20
10	sì	Teknokroma Trace Excel 120 ODSB (20 x 0,4 cm, 5 µm)	□ = 235 nm	650 mL H ₂ O pH 2 (HCl 0,1M) + 280 mL MeOH + 7 mL THF	1	24	20
11	sì	C18 (200 x 4 mm)	□ = 235 nm				

12	sì	Chromolith RP18 (100 x 4,6 mm, 5 µm)	□ = 235 nm	770 H ₂ O pH=2,3 (0,8 mL H ₃ PO ₄): isopropanolo 200 mL, ACN 30 mL	1	25	10
13	sì	Phenomenex Gemini C18 (150 x 2 mm, 5 µm)	□ = 240 nm	0,925 g acetato di ammonio + 1,2 L H ₂ O + 0,8 L MeOH (pH 5,5 acido acetico)	0,4	40	10
15	sì	C18 (200 x4 mm, 5 µm)	□ = 235 nm	90% v/v H ₂ O 15 mL acido acetico + 15 g acetato di ammonio 10% v/v MeOH	1	40	10
16	sì	Prodigy ODS-3 100 (150 x 4,6 mm, 5 µm) w/ colonna di guardia C18	□ = 261 nm	80% v/v H ₂ O pH=4 (acido acetico puro) + acetato di ammonio 0,005M 20% v/v ACN	1,2	40	50
17		Kinetex RP-C18 (150x4,6 mm, 5 µm)	□ = 230 nm	11/89. MeOH: tampone (tampone = 3,0 g KH ₂ PO ₄ + 3,0 g K ₂ HPO ₄ + 100 mL H ₂ O)	0,6	40	6
18	sì	Luna Phenomenex C18	□ = 224 nm	tampone fosfato 95%:ACN 5 %	1,2	ambiente	20
19	sì	Phenomenex Aqua C18 125A (250 x 4,6 mm, 5 µm)	□ = 235 nm	acetato di ammonio 0,005M (pH 4):ACN = 8:2	1	25	2
20	sì	Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 x 150 mm, 5 µm)	□ = 235 nm	650 mL H ₂ O pH 2 (HCl 0,1M) + 280 mL MeOH + 7 mL THF	1	ambiente	5
21	sì	Nuclodur RP-18 100-C18 (50 mm, 3 µm)	□ = 262 nm	A:B = 80:20; A: acetato di ammonio 0,002 mol/L. pH=4,1 (aggiustato con acido acetico conc.); B: MeOH/ACN 2:1	1	60	6
22	sì	HYPERSIL ODS (250 X 4,6 mm, 5 µm)	□ = 235 nm		1,8	40	20

23	sì	RP-C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm)	φ = 235 nm		1	25	20
24	sì	Purospher RP-C18 (125 x 4 mm, 5 µm)	φ = 235 nm	MeOH/tampone di acetato di sodio 0,02M pH 4,4 = (30/70 v/v)	0,8	40	5
26	sì	Kinetex XB-C18 (100 x 4,6 mm, 2,6 µm)	φ = 254 nm	Acqua 0,1% TFA; ACN 0,1% TFA	1,5	30	10

TABELLA 2 - RISULTATI INDIVIDUALI PER L'ACIDO SORBICO (mg/L)

Codice laboratorio	Vino bianco (A)		Vino Rosé (B)		Vino bianco (C)		Vino rosso (D)		Vino fortificato (E)		Vino rosé (F)		Vino bianco (G)		Vino bianco (I)		Vino bianco (K)		Vino rosso (M)		Vino fortificato (N)		Vino bianco (O)	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
1	36.3	35.5	226.0	221.0	88.0	86.0	5.2	5.3	1.7	1.8	226.0	224.0	36.1	35.9	125.0	124.0	90.0	87.0	4.7	4.6	1.8	2.0	126.0	126.0
2	33.1	33.2	210.7	208.3	80.9	81.4	4.5	4.4	1.7	2.4	210.4	209.5	33.0	32.5	116.0	114.9	81.2	80.6	4.3	5.7	2.0	2.4	116.3	116.1
3	34.1	34.5	216.8	215.5	84.7	84.5	5.3	5.2	2.5	2.3	216.3	217.2	34.5	34.3	119.8	120.1	84.5	84.3	5.7	5.7	2.4	2.4	120.5	120.2
4	34.7	35.0	223.1	224.7	89.3	88.6	5.1	5.1	2.1	2.2	220.0	221.6	34.5	34.8	123.1	123.2	86.7	86.4	5.2	5.2	2.1	2.1	123.1	123.5
6	34.3	34.6	214.2	215.2	83.9	84.0	5.5	5.6	1.9	2.0	215.0	215.6	34.6	34.7	120.6	120.7	83.6	83.9	6.2	6.5	2.0	2.1	120.1	121.1
7	34.0	35.0	217.0	218.0	84.0	85.0	5.0	6.0	3.0	3.0	218.0	218.0	35.0	35.0	122.0	123.0	86.0	84.0	5.0	5.0	2.0	2.0	122.0	122.0
8	33.9	33.4	216.8	218.5	86.2	83.8	4.5	4.5	2.0	2.0	218.8	215.5	35.2	33.9	122.0	118.9	84.2	84.3	4.3	4.1	2.0	2.0	124.5	123.3
9	32.5	32.5	197.4	198.2	81.0	80.7	3.4	3.4	1.4	1.4	197.0	195.8	32.1	32.2	112.5	112.2	79.3	79.4	3.3	3.3	1.3	1.2	113.5	113.7
10	34.1	34.1	216.0	217.0	83.7	83.6	5.7	5.6	2.2	2.1	216.0	216.0	34.2	34.0	118.0	119.0	83.4	83.4	5.6	5.8	2.1	2.1	120.0	119.0
11	36.8	37.0	227.2	229.9	90.2	90.4	4.6	4.8	2.1	1.9	224.2	225.6	37.1	36.8	127.4	127.0	88.4	89.0	4.0	4.3	2.1	1.9	128.0	128.5
12	31.0	31.0	207.0	202.0	78.0	78.0	4.0	3.0	2.0	2.0	209.0	209.0	32.0	32.0	111.0	111.0	79.0	78.0	4.0	5.0	2.0	2.0	109.0	109.0
13	35.0	35.0	219.0	220.0	86.0	87.0	6.0	6.0	3.0	3.0	220.0	220.0	35.0	36.0	124.0	124.0	85.0	87.0	7.0	7.0	3.0	3.0	123.0	123.0
15	32.0	32.0	200.0	199.0	79.0	78.0	4.0	4.0	1.7	1.6	200.0	199.0	32.0	32.0	111.0	111.0	79.0	78.0	4.0	4.0	1.7	1.6	111.0	111.0
16	31.3	29.1	213.1	214.2	84.7	84.2	4.3	4.3	1.9	1.9	217.3	216.0	30.3	31.0	120.1	119.6	83.5	84.2	4.2	4.6	2.0	2.0	119.3	120.1
17	35.6	35.4	217.8	221.4	87.0	86.0	5.2	5.4	2.3	2.4	215.5	219.5	35.6	35.3	122.2	123.4	85.9	86.5	5.4	5.5	2.7	2.5	122.3	123.9
18	35.0	37.0	235.0	246.0	88.0	85.0	6.1	5.2	7.5	7.7	220.0	209.0	36.0	37.0	124.0	125.0	94.0	88.0	6.5	6.6	7.8	7.4	127.0	128.0

19	31.0	30.0	183.0	187.0	71.0	72.0	8.0	8.0	-2.0	0.0	177.0	179.0	30.0	27.0	105.0	106.0	67.0	71.0	4.0	5.0	-1.0	-1.0	116.0	115.0
20	36.2	34.8	217.4	217.0	84.9	84.4	7.1	8.9	1.9	2.7	219.0	217.1	35.1	34.4	121.2	119.0	85.8	84.3	5.6	5.9	2.4	2.3	121.9	119.2
21	32.2	32.2	204.1	204.2	79.3	79.1	4.3	4.4	1.9	2.0	204.9	204.4	32.6	32.3	111.9	112.4	78.6	78.7	4.3	4.4	1.9	2.0	115.0	114.2
22	34.0	34.0	216.0	216.0	83.0	83.0	6.0	6.0	3.0	3.0	216.0	217.0	34.0	34.0	121.0	121.0	83.0	83.0	6.0	6.0	3.0	3.0	121.0	121.0
23	35.3	35.0	219.3	217.6	87.3	86.1	4.1	4.5	1.6	1.7	219.3	217.9	35.4	35.9	124.3	123.0	87.0	86.0	3.9	4.1	1.6	1.8	124.6	123.5
24	34.2	34.0	214.0	216.0	81.8	82.1	4.1	4.1	2.7	2.8	215.0	215.0	33.7	33.8	117.0	118.0	83.7	83.4	4.1	4.1	2.8	2.7	119.0	119.0
26	35.1	35.2	214.4	214.5	86.2	86.2	5.0	5.1	2.2	2.2	214.9	214.2	35.0	35.1	122.3	122.5	86.0	86.3	5.1	5.1	2.2	2.2	122.2	122.5

TABELLA 3 - RISULTATI PER L'ACIDO SORBICO (mg/L)

Codice laboratorio	Vino bianco		Vino Rosé		Vino bianco		Vino rosso		Vino fortificato		Vino bianco	
	A	G	B	F	C	K	D	M	E	N	I	O
1	35.90	36.00	223.50	225.00	87.00	88.50	5.25	4.65	1.75	1.90	124.50	126.00
2	33.15	32.25	209.50	209.95	81.15	80.80	4.45	5.00	2.05	2.20	115.45	116.20
3	34.30	34.40	216.15	216.75	84.60	84.40	5.25	5.70	2.40 ^(c)	2.40 ^(c)	119.95	120.35
4	34.85	34.65	223.90	221.00	88.95	86.55	5.10	5.20	2.15	2.10	123.15	123.30
6	34.45	34.65	214.70	215.30	83.95	83.75	5.58 ^(c)	6.34	1.95 ^(c)	2.08 ^(c)	120.65	120.60
7	34.50	35.00	217.50	218.00	84.50	85.00	5.50	5.00	3.00 ^(b)	2.00 ^(b)	122.50	122.00
8	33.65	34.55	217.65	217.15	85.00	84.25	4.50	4.20	2.00	2.00	120.45	123.90
9	32.49	32.16	197.83	196.38	80.81	79.40	3.42	3.32	1.41	1.25	112.38	113.56
10*	34.10	34.10	216.50	216.00	83.65	83.40	5.66	5.68	2.15 ^(c)	2.13 ^(c)	118.50	119.50
11*	36.90	36.95	228.55	224.90	90.30	88.70	4.70	4.15	2.00 ^(c)	2.00 ^(c)	127.20	128.25
12	31.00	32.00	204.50	209.00	78.00	78.50	3.50	4.50	2.00	2.00	111.00	109.00
13	35.00	35.50	219.50	220.00	86.50	86.00	6.00	7.00	3.00	3.00	124.00	123.00
15*	32.00	32.00	199.50	199.50	78.50	78.50	4.00	4.00	1.65	1.65	111.00	111.00
16	30.20	30.65	213.65	216.65	84.45	83.85	4.28	4.38	1.94	1.96	119.85	119.70
17	35.53	35.44	219.61	217.53	86.51	86.19	5.30	5.47	2.38	2.61	122.82	123.12
18	36.00	36.50	240.50 ^(b)	214.50 ^(b)	86.50 ^(b)	91.00 ^(b)	5.65	6.55	7.60 ^(b)	7.60 ^(b)	124.50	127.50
19	30.50 ^(b)	28.50 ^(b)	185.00 ^(a)	98.00 ^(a)	71.50 ^(a)	69.00 ^(a)	8.00 ^(b)	4.50 ^{(c)(b)}	-1.00 ^{(c)(a)}	-1.00 ^{(c)(a)}	105.50 ^(b)	115.50 ^(b)
20	35.50	34.75	217.20	218.05	84.65	85.05	8.00 ^(b)	5.75 ^(b)	2.30 ^(c)	2.35 ^(c)	120.10	120.55
21	32.20	32.45	204.15	204.65	79.20	78.65	4.36	4.36	1.94	1.94	112.15	114.60

22	34.00	34.00	216.00	216.50	83.00	83.00	6.00	6.00	3.00	3.00	121.00	121.00
23	35.15	35.65	218.45	218.60	86.70	86.50	4.30	4.00	1.65 ^{c)}	1.70 ^{c)}	123.65	124.05
24	34.10	33.75	215.00	215.00	81.95	83.55	4.10 ^{c)}	4.10 ^{c)}	2.75 ^{c)}	2.75 ^{c)}	117.50	119.00
26	35.13	35.06	214.45	214.58	86.21	86.15	5.07	5.07	2.17	2.17	122.37	122.35

a) Values rejected by Grubbs test on mean outliers

b) Values rejected by Cochran test variance outliers

c) Value identified by the laboratory below Quantification Limit

TABELLA 4 - DATI DI PRECISIONE

Indicatori	Vino bianco (A/G)	Vino rosé (B/F)	Vino bianco (C/K)	Vino rosso (D/M)	Vino fortificato (E/N)	Vino bianco (I/O)
N° di laboratori	22	21	21	21	20	22
N° di ripetizioni	2	2	2	2	2	2
Minimo (mg/L)	30,20	196,38	78,00	3,32	1,25	109,00
Massimo (mg/L)	36,95	228,55	90,30	7,00	3,00	128,25
Varianza della ripetibilità s_r^2	0,0942	1,5249	0,4191	0,1201	0,0037	0,9397
Varianza intergruppo s_L^2	2,6370	55,1140	9,7049	0,6418	0,1793	22,4914
Varianza della riproducibilità s_R^2	2,7312	56,6389	10,1240	0,7619	0,1830	23,4311
Media (mg/L)	34,16	214,72	83,96	4,92	2,15	120,07
Scarto tipo di ripetibilità (mg/L)	0,31	1,23	0,65	0,35	0,06	0,97
Limite di ripetibilità (mg/L)	0,869	3,495	1,832	0,981	0,172	2,743
RSD% di ripetibilità	0,9	0,6	0,8	7,0	2,8	0,8
Scarto tipo di riproducibilità (mg/L)	1,65	7,53	3,18	0,87	0,43	4,84
Limite di riproducibilità (mg/L)	4,677	21,298	9,005	2,470	1,211	13,699
RSD% di riproducibilità	4,8	3,5	3,8	17,7	19,9	4,0
HORRAT	0,5	0,5	0,5	1,4	1,4	0,5

FIGURA 1 – CORRELAZIONE TRA CONCENTRAZIONE DI ACIDO SORBICO E PRECISIONE

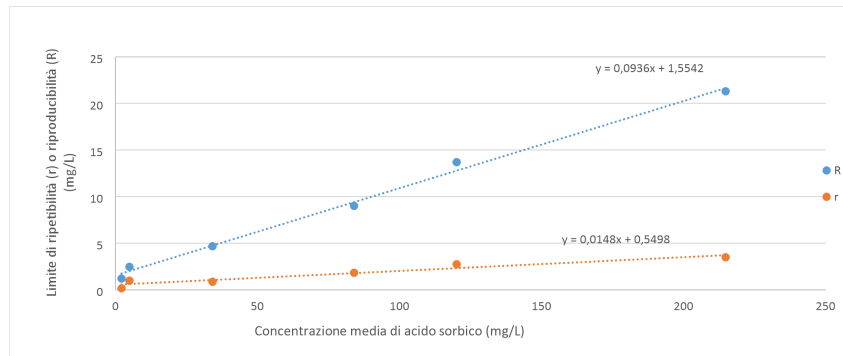
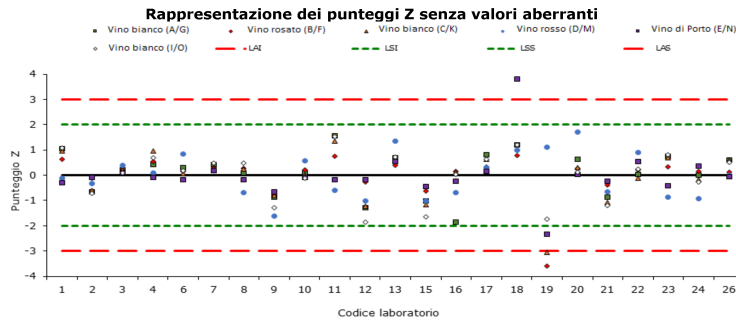


FIGURA 2 - RAPPRESENTAZIONE DEI PUNTEGGI Z SENZA VALORI ABERRANTI



*LAI: limite inferiore di azione; LAS: limite superiore di azione; LSI: limite inferiore di allarme; LSS: limite superiore di allarme

*LAI: limite inferiore di azione; LAS: limite superiore di azione; LSI: limite inferiore di allarme; LSS: limite superiore di allarme

[1] Per l'analisi dell'acido sorbico, la colonna e la lunghezza d'onda sono indicate a titolo di esempio.