

II

(Comunicazioni)

COMUNICAZIONI PROVENIENTI DALLE ISTITUZIONI, DAGLI ORGANI E
DAGLI ORGANISMI DELL'UNIONE EUROPEA

COMMISSIONE EUROPEA

Elenco e descrizione dei metodi di analisi di cui all'articolo 120 *octies*, primo comma, del regolamento (CE) n. 1234/2007 del Consiglio ⁽¹⁾

[pubblicati a norma dell'articolo 15, paragrafo 2, del regolamento (CE) n. 606/2009 della Commissione, del 10 luglio 2009 ⁽²⁾]

(2010/C 43/01)

La tabella seguente riporta l'elenco dei metodi di analisi da applicare per il controllo dei limiti e dei requisiti fissati dalla normativa comunitaria per i prodotti vitivinicoli. La terza colonna reca, per ciascun parametro considerato, il riferimento al corrispondente metodo di analisi descritto nell'ultima edizione (2009) della Raccolta dei metodi internazionali d'analisi dei vini e dei mosti dell'OIV disponibile al momento della presente pubblicazione. Per ogni parametro sono descritti soltanto i metodi di riferimento («tipo I» o «tipo II» della classificazione dell'OIV), ad eccezione dei parametri per i quali non esiste attualmente alcun metodo convalidato di tipo I o di tipo II. La descrizione dei metodi è riportata in allegato alla presente comunicazione.

N.B.:

La Raccolta dell'OIV reca, nell'allegato A, sezione I, la definizione dei vari tipi di metodi di analisi, in particolare il tipo I (metodo di riferimento criterio), il tipo II (metodo di riferimento) e il tipo IV (metodo provvisorio).

I metodi di analisi per il piombo e il cadmio sono attualmente descritti nel regolamento (CE) n. 333/2007 della Commissione, del 28 marzo 2007 (allegato C-3) ⁽³⁾. Inoltre, il regolamento (CE) n. 401/2006 del 23 febbraio 2006 ⁽⁴⁾ stabilisce, nell'allegato II, sezione 4, criteri generali relativi ai metodi di analisi per l'ocratossina A, sicché non è necessario descrivere, per questa sostanza, un metodo specifico da applicare ai prodotti vitivinicoli.

ELENCO DEI METODI DI ANALISI

N.	Parametro	Metodo della Raccolta dell'OIV	Tipo
1	Massa volumica / densità	AS-2-01-MASVOL	I
2	Indice rifrattometrico	AS-2-02-SUCREF	I
3	Estratto secco totale	AS-2-03-EXTSEC	I
4	Rapporto isotopico $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ dell'acqua del vino	AS-2-09-MOUO18	II

⁽¹⁾ GU L 299 del 16.11.2007.

⁽²⁾ GU L 193 del 24.7.2009, pag. 1.

⁽³⁾ GU L 88 del 29.3.2007, pag. 29.

⁽⁴⁾ GU L 70 del 9.3.2006, pag. 12.

N.	Parametro	Metodo della Raccolta dell'OIV	Tipo
5	Indice di Folin	AS-2-10-INDFOL	IV
6	Tenore di zuccheri (= glucosio+fruttosio)	AS-311-02-GLUFRO	II
7	Tenore di saccarosio (metodo di misura HPLC)	AS-311-03-SUCRES	II
8	Risonanza magnetica nucleare – deuterio dell'etanolo del vino	AS-311-05-ENRRMN (<i>in via di revisione</i>)	I
9	Titolo alcolometrico volumico in % (TAV)	AS-312-01-TALVOL	I
10	Rapporto isotopico $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ dell'etanolo del vino	AS-312-06-ETHANO	II
11	Acidità totale	AS-313-01-ACITOT	I
12	Acidità volatile	AS-313-02-ACIVOL	I
13	Acido citrico	AS-313-09-ACIENZ	II
14	Acido sorbico	AS-313-14-ACISOR	IV
15	pH dei mosti	AS-313-15-PH	I
16	Acido ascorbico	AS- 313-22 ACASCO	II
17	CO ₂ in g/l	AS-314-01-DIOCAR	II
18	CO ₂ in g/l (manometria)	AS-314-04-CO2MAN	II
19	Sovrappressione CO ₂	AS-314-02-SURPRES	I
20	Lisozima	AS-315-14-LYSOZY	IV
21	Solfato di potassio	AS-321-05-SULFAT	II
22	Ferro	AS-322-05-FER	IV
23	Rame	AS-322-06-CUIVRE	IV
24	Solfiti (SO ₂) o Anidride solforosa totale	AS-323-04-DIOSU	II

La descrizione di alcuni metodi di analisi è sottoposta ad aggiornamento da parte dei responsabili dell'OIV. Le descrizioni in questione verranno prossimamente pubblicate in un'ulteriore comunicazione della Commissione non appena l'OIV avrà pubblicato il testo aggiornato nell'edizione 2010 della Raccolta dei metodi internazionali d'analisi.

ALLEGATO

INDICE

1	MASSA VOLUMICA A 20°C E DENSITÀ RELATIVA A 20 °C (OIV - AS2 - 01- MASVOL) — Metodo di tipo I	4
2	DETERMINAZIONE DEL TENORE ZUCCHERINO DEI MOSTI, DEI MOSTI CONCENTRATI E DEI MOSTI CONCENTRATI RETTIFICATI MEDIANTE RIFRATTOMETRIA (OIV - AS2 - 02- SUCREF) — Metodo di tipo I	8
3	ESTRATTO SECCO TOTALE (OIV-AS-2-03-EXTSEC) Sostanze secche totali — Metodo di tipo I	10
4	DETERMINAZIONE DEL RAPPORTO ISOTOPICO $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ DELL'ACQUA CONTENUTA NEI VINI (OIV-AS-2-09-MOUO18) — Metodo di tipo II	11
5	INDICE DI FOLIN-CIOCALTEU (OIV-AS-2-10-INDFOL) — Metodo di tipo IV	12
6	GLUCOSIO E FRUTTOSIO (OIV-AS-311-02-GLUFRU) — Metodo di tipo II	14
7	DOSAGGIO DEGLI ZUCCHERI CON IL METODO DI MISURA HPLC (SACCAROSIO) (OIV-AS-311-03-SUCRES) — Metodo di tipo II	17
8	RIVELAZIONE DELL'AUMENTO DEL TITOLO ALCOLOMETRICO NATURALE DEI MOSTI DI UVE, DEI MOSTI DI UVE CONCENTRATI, DEI MOSTI DI UVE CONCENTRATI RETTIFICATI E DEI VINI MEDIANTE LA RISONANZA MAGNETICA NUCLEARE DEL DEUTERIO (OIV-AS-311-05-ENRRMN) — Metodo di tipo I	18
9	TITOLO ALCOLOMETRICO VOLUMICO (OIV-AS-312-01-TALVOL) — Metodo di tipo I	19
10	DETERMINAZIONE DEL RAPPORTO ISOTOPICO $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ PER SPETTROMETRIA DI MASSA ISOTOPICA DELL'ETANOLO DEL VINO O DELL'ETANOLO OTTENUTO PER FERMENTAZIONE DEI MOSTI, DEI MOSTI CONCENTRATI O DEI MOSTI CONCENTRATI RETTIFICATI (OIV-AS-312-06-ETHANO) Metodo di tipo II	20
11	ACIDITÀ TOTALE (OIV-AS-313-01-ACITOT) — Metodo di tipo I	27
12	ACIDITÀ VOLATILE (OIV-AS-313-02-ACIVOL) — Metodo di tipo I	30
13	ACIDO CITRICO (OIV -AS-313-09-ACIENZ) — Metodo di tipo II	33
14	ACIDO SORBICO (OIV-AS-313-14-ACISOR) — Metodo di tipo IV	36
15	pH (OIV-AS-313-15-PH) — Metodo di tipo I	39
16	DOSAGGIO SIMULTANEO DELL'ACIDO L-ASCORBICO E DELL'ACIDO D-ISOASCORBICO MEDIANTE HPLC E RIVELAZIONE UV (OIV-AS-313-22-ACASCO) — Metodo di tipo II	41
17	ANIDRIDE CARBONICA (OIV-AS-314-01-DIOCAR) — Metodo di tipo II	45
18	DOSAGGIO DELL'ANIDRIDE CARBONICA NEL VINO CON IL METODO MANOMETRICO (OIV-AS-314-04-CO2MAN) — Metodo di tipo II	47
19	MISURAZIONE DELLA SOVRAPPRESSIONE DEI VINI SPUMANTI E FRIZZANTI (OIV-AS-314-02-SURPRES) — Metodo di tipo I	48
20	DOSAGGIO DEL LISOZIMA NEL VINO MEDIANTE HPLC (OIV-AS-315-14) — Metodo di tipo IV	51
21	SOLFATI (OIV- AS-321-05-SULFAT) — Metodo di tipo II	54
22	FERRO (OIV-AS-322-05-FER) — Metodo di tipo IV	55
23	RAME (OIV-AS-322-06) — Metodo di tipo IV	56
24	ANIDRIDE SOLFOROSA (OIV-AS-323-04-DIOSU) — Metodo di tipo II	58

1 MASSA VOLUMICA A 20 °C E DENSITÀ RELATIVA A 20 °C (OIV - AS2 - 01- MASVOL) — METODO DI TIPO I

1. DEFINIZIONI

La massa volumica è il rapporto fra la massa di un certo volume di vino o di mosto a 20 °C e il volume stesso. Si esprime in grammi per millilitro ed il suo simbolo è $\rho_{20\text{ °C}}$.

La densità relativa a 20 °C o densità 20 °C/20 °C è il rapporto, espresso in numeri decimali, fra la massa di un certo volume di vino o di mosto a 20 °C e la massa dello stesso volume di acqua alla stessa temperatura. Il suo simbolo è $d_{20\text{ °C}}$.

2. PRINCIPIO DEI METODI

La massa volumica e la densità relativa a 20 °C vengono determinati sul campione di analisi:

mediante picnometria: metodo di riferimento;

oppure mediante densimetria con bilancia idrostatica o densimetria elettronica.

Nota

Per determinazioni molto precise, la massa volumica deve essere corretta dell'azione del biossido di zolfo.

$$\rho_{20\text{ °C}} = \rho'_{20\text{ °C}} - 0,0006 \times S$$

$$\rho_{20\text{ °C}} = \text{massa volumica corretta}$$

$$\rho'_{20\text{ °C}} = \text{massa volumica osservata}$$

$$S = \text{biossido di zolfo totale in g/l}$$

3. TRATTAMENTO PRELIMINARE DEL CAMPIONE

Se il vino o il mosto contengono quantità notevoli di biossido di carbonio, eliminarne la maggior parte agitando 250 ml di campione in un pallone da 1 000 ml o filtrando sotto vuoto su 2 g di cotone collocato in un'allunga.

4. METODO DI RIFERIMENTO

4.1. Apparecchiatura

Comune dotazione di laboratorio, in particolare:

- 4.1.1. Picnometro ⁽¹⁾ in vetro pyrex da circa 100 ml provvisto di un termometro mobile con raccordo smerigliato, graduato in decimi di grado da 10 °C a 30 °C. Tale termometro deve essere controllato (fig. 1).

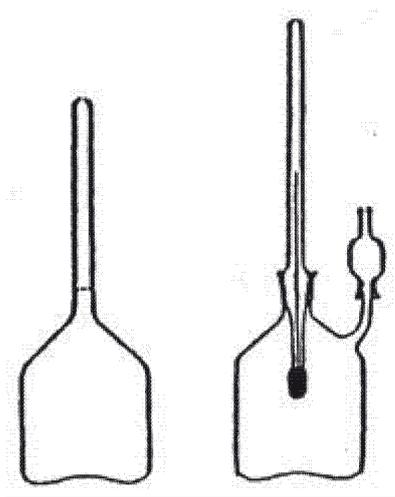


Figura 1

Picnometro e relativo pallone tara

Detto picnometro porta un tubo laterale di 25 mm di lunghezza e di 1 mm al massimo di diametro interno, terminante con una parte conica smerigliata. Questo tubo laterale può essere chiuso da un «tappo ricevitore» costituito da un tubo conico smerigliato terminante con una parte affilata. Questo tappo serve da camera di dilatazione.

⁽¹⁾ Si può usare qualsiasi picnometro avente caratteristiche equivalenti.

Le due smerigliature dell'apparecchiatura devono essere realizzate con la massima cura.

- 4.1.2. Pallone tara avente lo stesso volume esterno del picnometro (a meno di circa 1 ml) e di massa uguale alla massa del picnometro pieno di un liquido di densità 1,01 (soluzione al 2 % m/v di cloruro di sodio).

Involucro coibentato che si adatta perfettamente al corpo del picnometro.

- 4.1.3. Bilancia a due piatti con portata di almeno 300 g e sensibilità di 0,1 mg,

oppure

bilancia monopiatto con portata di almeno 200 g e sensibilità di 0,1 mg.

4.2. **Taratura del picnometro**

La taratura del picnometro comporta la determinazione delle seguenti caratteristiche:

- tara a vuoto,
- volume a 20 °C,
- massa dell'acqua a 20 °C.

4.2.1. *Utilizzazione di una bilancia a due piatti*

Una volta collocato il pallone tara sul piatto sinistro della bilancia ed il picnometro pulito ed asciutto munito del relativo «tappo ricevitore» sul piatto destro, raggiungere l'equilibrio ponendo accanto al picnometro i pesi necessari: p grammi.

Riempire con cura il picnometro con acqua distillata a temperatura ambiente ed immergere il termometro; asciugare con cura il picnometro e collocarlo nell'involucro coibentato; agitare capovolgendo finché la temperatura letta al termometro sia costante. Portare il livello esattamente al bordo superiore del tubo laterale. Asciugare questo tubo ed applicare il tappo ricevitore; leggere la temperatura t °C con accuratezza ed effettuare l'eventuale correzione della scala del termometro. Pesare il picnometro pieno d'acqua: sia p' la massa in grammi che realizza l'equilibrio.

Calcoli

Tara del picnometro vuoto:

Tara a vuoto= p + m

m= massa d'aria contenuta nel picnometro

m= 0,0012 (p - p').

Volume a 20 °C:

$V_{20\text{ °C}} = (p + m - p') \times F_t$

F_t = fattore ricavato dalla tabella I per la temperatura t °C

$V_{20\text{ °C}}$ deve essere noto con l'approssimazione di $\pm 0,001$ ml.

Massa dell'acqua a 20 °C.

$M_{20\text{ °C}} = V_{20\text{ °C}} \times 0,998203$

0,998203= massa volumica dell'acqua a 20 °C.

4.2.2. *Utilizzazione di una bilancia monopiatto*

Determinare:

- la massa del picnometro pulito ed asciutto: P
- la massa del picnometro pieno d'acqua, a t °C: P₁ seguendo le indicazioni di cui al punto 4.2.1
- la massa del pallone tara T₀

Calcoli

Tara del picnometro vuoto:

tara a vuoto: = $P - m$

m = massa d'aria contenuta nel picnometro

$m = 0,0012 (P_1 - P)$

Volume a 20 °C:

$V_{20\text{ °C}} = [P_1 - (P - m)] \times F_t$

F_t = fattore ricavato nella tabella I in corrispondenza alla temperatura $t\text{ °C}$

Il volume a 20 °C deve essere noto con l'approssimazione di $\pm 0,001$ ml.

Massa dell'acqua a 20 °C:

$M_{20\text{ °C}} = V_{20\text{ °C}} \times 0,998203$

0,998203 = massa volumica dell'acqua a 20 °C

4.3. **Modo di operare**

4.3.1. *Utilizzazione di una bilancia a due piatti*

Pesare il picnometro riempito con il campione preparato per l'analisi (punto 3), seguendo le istruzioni riportate al punto 4.2.1.

Sia p'' la massa in grammi che realizza l'equilibrio a $t\text{ °C}$.

Massa del liquido contenuto nel picnometro = $p + m - p''$

Massa volumica apparente a $t\text{ °C}$:

$\rho_{t\text{ °C}} = (p + m - p'') / (V_{20\text{ °C}})$

Calcolare la massa volumica a 20°C con l'aiuto di una delle tabelle di correzione riportate di seguito, in funzione della natura del liquido studiato: vino secco (tabella II), mosto naturale o concentrato (tabella III), vino dolce (tabella IV).

Si esprime la densità 20 °C/20 °C del vino dividendo la massa volumica a 20 °C per 0,998203.

4.3.2. *Utilizzazione di una bilancia monopiatto*

Pesare il pallone tara, sia T_1 la sua massa.

Calcolare $dT = T_1 - T_0$

Massa del picnometro vuoto al momento della misurazione = $P - m + dT$

Pesare il picnometro riempito con il campione preparato per l'analisi (punto 3), seguendo le istruzioni riportate al punto 4.2.1. Sia P_2 la massa misurata a $t\text{ °C}$.

Massa del liquido contenuto nel picnometro a $t\text{ °C}$ = $P_2 - (P - m + dT)$

Massa volumica apparente a $t\text{ °C}$:

$\rho_{t\text{ °C}} = (P_2 - (P - m + dT)) / (V_{20\text{ °C}})$

Calcolare la massa volumica a 20 °C del liquido studiato (vino secco, mosto naturale e concentrato, vino dolce) con il procedimento indicato al punto 4.3.1.

La densità 20 °C/20 °C si ottiene dividendo la massa volumica a 20 °C per 0,998203.

4.3.3. Ripetibilità sulla massa volumica:

per i vini secchi e amabili: $r = 0,00010$

per i vini dolci: $r = 0,00018$

4.3.4. Riproducibilità sulla massa volumica:

per i vini secchi e amabili: $R = 0,00037$

per i vini dolci: $R = 0,00045$

TABELLA I

Fattori F

per i quali bisogna moltiplicare la massa dell'acqua contenuta nel picnometro in pyrex a t °C per calcolare il volume del picnometro a 20 °C

[Cfr. allegato II, tabella I, del metodo AS2 - 01 descritto nella Raccolta dei metodi internazionali d'analisi dell'OIV]

TABELLA II

Correzioni c della temperatura sulla massa volumica dei vini secchi e dei vini secchi privati dell'alcole, misurata a t °C con un picnometro in pyrex per ricondurre il risultato a 20 °C

[Cfr. allegato II, tabella II, del metodo AS2 - 01 descritto nella Raccolta dei metodi internazionali d'analisi dell'OIV]

$$\rho_{20} = \rho_t \pm (c/1\ 000) \quad \begin{array}{l} - \text{ se } t\text{ °C è inferiore a } 20\text{ °C} \\ + \text{ se } t\text{ °C è superiore a } 20\text{ °C} \end{array}$$

TABELLA III

Correzioni c della temperatura sulla massa volumica dei mosti naturali e dei mosti concentrati misurata a t °C con un picnometro in pyrex per ricondurre il risultato a 20 °C

[Cfr. allegato II, tabella III, del metodo AS2 - 01 descritto nella Raccolta dei metodi internazionali d'analisi dell'OIV]

$$\rho_{20} = \rho_t \pm (c/1\ 000) \quad \begin{array}{l} - \text{ se } t\text{ °C è inferiore a } 20\text{ °C} \\ + \text{ se } t\text{ °C è superiore a } 20\text{ °C} \end{array}$$

TABELLA IV

Correzioni c della temperatura sulla massa volumica dei vini di 13 % vol. o più contenenti zucchero residuo misurata con picnometro in pyrex a t °C per ricondurre il risultato a 20 °C

[Cfr. allegato II, tabella IV, del metodo AS2 - 01 descritto nella Raccolta dei metodi internazionali d'analisi dell'OIV]

$$\rho_{20} = \rho_t \pm (c/1\ 000) \quad \begin{array}{l} - \text{ se } t\text{ °C è inferiore a } 20\text{ °C} \\ + \text{ se } t\text{ °C è superiore a } 20\text{ °C} \end{array}$$

2 DETERMINAZIONE DEL TENORE ZUCCHERINO DEI MOSTI, DEI MOSTI CONCENTRATI E DEI MOSTI CONCENTRATI RETTIFICATI MEDIANTE RIFRATTOMETRIA (OIV - AS2 - 02- SUCREF) — METODO DI TIPO I

1. PRINCIPIO DEL METODO

Si riporta l'indice di rifrazione a 20 °C, espresso in valore assoluto o in percentuale in massa di saccarosio, nella tabella corrispondente per ottenere il grado zuccherino in grammi per litro o in grammi per chilogrammo di mosto, di mosto concentrato e di mosto concentrato rettificato.

2. APPARECCHIATURA

2.1. Rifrattometro tipo Abbé

Il rifrattometro deve essere dotato di una scala che indichi:

- la percentuale in massa di saccarosio con l'approssimazione dello 0,1 %
- oppure gli indici di rifrazione con quattro cifre decimali.

Il rifrattometro deve essere provvisto di un termometro con una scala compresa almeno tra + 15 °C e + 25 °C e di un dispositivo di circolazione d'acqua che consenta di effettuare le misurazioni a una temperatura di 20 °C ± 5 °C.

Occorre seguire scrupolosamente le istruzioni per l'impiego dello strumento, in particolare per quanto riguarda la taratura e la sorgente luminosa.

3. PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

3.1. Mosti e mosti concentrati

Filtrare eventualmente i mosti con una garza asciutta piegata in quattro e, dopo aver eliminato le prime gocce di filtrato, effettuare la determinazione sul prodotto filtrato.

3.2. Mosti concentrati rettificati

Utilizzare, a seconda della concentrazione, il mosto concentrato rettificato oppure la soluzione ottenuta portando a 500 g, con acqua, 200 g di mosto concentrato rettificato pesato accuratamente.

4. MODO DI OPERARE

Portare il campione ad una temperatura prossima ai 20 °C. Deposare una piccola presa di campione sul prisma inferiore del rifrattometro, avendo cura che, premendo i prismi l'uno contro l'altro, il campione copra uniformemente la superficie del vetro, ed effettuare la misura seguendo le istruzioni per l'uso dell'apparecchio in questione.

Leggere la percentuale in massa di saccarosio con la precisione dello 0,1 % oppure l'indice di rifrazione con 4 cifre decimali.

Effettuare almeno due determinazioni sullo stesso campione preparato. Rilevare la temperatura t °C.

5. CALCOLI

5.1. Correzione di temperatura

5.1.1. Apparecchi graduati in % in massa di saccarosio: per la correzione della temperatura ricorrere alla tabella I.

5.1.2. Apparecchi graduati in indice di rifrazione: riportare l'indice misurato a t °C nella tabella II per ottenere (colonna 1) il corrispondente valore della percentuale in massa di saccarosio a t °C. Tale valore viene quindi corretto rispetto alla temperatura ed espresso a 20 °C per mezzo della tabella I.

5.2. Tenore zuccherino dei mosti e dei mosti concentrati

Riportare nella tabella II la percentuale in massa di saccarosio a 20 °C per ottenere il tenore zuccherino in grammi/litro e in grammi/chilogrammo. Il tenore zuccherino è espresso in zucchero invertito con una cifra decimale.

5.3. Tenore zuccherino del mosto concentrato rettificato

Riportare nella tabella III la percentuale in massa di saccarosio a 20 °C per ottenere il tenore zuccherino in grammi/litro e in grammi/chilogrammo. Il tenore zuccherino è espresso in zucchero invertito con una cifra decimale.

Se la misura è stata effettuata sul mosto concentrato rettificato diluito, moltiplicare il risultato per il fattore di diluizione.

5.4. Indice di rifrazione dei mosti, dei mosti concentrati e dei mosti concentrati rettificati

Riportare nella tabella II la percentuale in massa di saccarosio a 20 °C per ricavare l'indice di rifrazione a 20 °C. Tale valore è espresso con quattro cifre decimali.

Nota: il titolo alcolometrico potenziale dei mosti, dei mosti concentrati e dei mosti concentrati rettificati può essere determinato ricorrendo alla tabella di corrispondenza che figura nell'allegato I del regolamento (CE) n. 1623/2000 della Commissione, del 25 luglio 2000 (GUCE L 194 del 31 luglio 2000).

TABELLA I

Correzione da apportare nel caso in cui la percentuale in massa di saccarosio sia stata determinata a una temperatura diversa da 20 °C

[Cfr. tabella I dell'allegato del metodo AS2 - 02 descritto nella Raccolta dei metodi internazionali d'analisi dell'OIV]

TABELLA II

Tabella recante il tenore zuccherino dei mosti e dei mosti concentrati espresso in grammi/litro e in grammi/chilogrammo, determinato per mezzo di un rifrattometro graduato in percentuale in massa di saccarosio a 20 °C o in indice di rifrazione a 20 °C. È riportata anche la massa volumica a 20 °C.

[Cfr. tabella II dell'allegato del metodo AS2 - 02 descritto nella Raccolta dei metodi internazionali d'analisi dell'OIV]

TABELLA III

Tabella recante il tenore zuccherino dei mosti concentrati rettificati espresso in grammi/litro e in grammi/chilogrammo, determinato per mezzo di un rifrattometro graduato in percentuale in massa di saccarosio a 20 °C o in indice di rifrazione a 20 °C. È riportata anche la massa volumica a 20 °C.

[Cfr. tabella III dell'allegato del metodo AS2 - 02 descritto nella Raccolta dei metodi internazionali d'analisi dell'OIV]

3 ESTRATTO SECCO TOTALE (OIV-AS-2-03-EXTSEC) SOSTANZE SECCHHE TOTALI — METODO DI TIPO I**1. DEFINIZIONE**

L'estratto secco totale o sostanze secche totali è costituito dall'insieme di tutte le sostanze che, in condizioni fisiche determinate, non volatilizzano. Queste condizioni fisiche devono essere fissate in modo tale che le sostanze componenti tale estratto subiscano il minimo di alterazione possibile.

L'estratto non riduttore è l'estratto secco totale dal quale sono stati detratti gli zuccheri totali.

L'estratto ridotto è l'estratto secco dal quale sono stati detratti gli zuccheri totali eccedenti 1 g/l, il solfato di potassio eccedente 1 g/l, il mannitolo, se presente, e tutte le sostanze chimiche eventualmente aggiunte al vino.

Il resto di estratto è l'estratto non riduttore dal quale è stata detratta l'acidità fissa, espressa in acido tartarico.

L'estratto è espresso in grammi per litro e dev'essere determinato con l'approssimazione di 0,5 g.

2. PRINCIPIO DEL METODO

[La descrizione di questo metodo di analisi è sottoposta ad aggiornamento da parte dei responsabili dell'OIV e verrà prossimamente pubblicata in un'ulteriore comunicazione della Commissione non appena l'OIV avrà pubblicato il testo aggiornato nell'edizione 2010 della Raccolta dei metodi internazionali d'analisi. A titolo indicativo, nell'attesa di tale pubblicazione, si rimanda al capitolo 4 dell'allegato del regolamento (CEE) n. 2676/90 della Commissione.]

4 DETERMINAZIONE DEL RAPPORTO ISOTOPICO $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ DELL'ACQUA CONTENUTA NEI VINI (OIV-AS-2-09-MOUO18) — METODO DI TIPO II

(p.m.)

[La descrizione di questo metodo di analisi è sottoposta ad aggiornamento da parte dei responsabili dell'OIV e verrà prossimamente pubblicata in un'ulteriore comunicazione della Commissione non appena l'OIV avrà pubblicato il testo aggiornato nell'edizione 2010 della Raccolta dei metodi internazionali d'analisi. A titolo indicativo, nell'attesa di tale pubblicazione, si rimanda al capitolo 43 dell'allegato del regolamento (CEE) n. 2676/90 della Commissione.]

5 INDICE DI FOLIN-CIOCALTEU (OIV-AS-2-10-INDFOL) — METODO DI TIPO IV**1. DEFINIZIONE**

L'indice di Folin-Ciocalteu è il risultato che si ottiene applicando il metodo seguente.

2. PRINCIPIO

L'insieme dei composti fenolici del vino viene ossidato dal reagente di Folin-Ciocalteu. Quest'ultimo è costituito da una miscela di acido fosfotungstico ($H_3PW_{12}O_{40}$) e di acido fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$) che si riduce, con l'ossidazione dei fenoli, a una miscela di ossidi blu di tungsteno (W_8O_{23}) e di molibdeno (Mo_8O_{23}).

La colorazione blu prodotta ha un assorbimento massimo intorno a 750 nm. Essa è proporzionale al tenore di composti fenolici.

3. REAGENTI

I reagenti devono essere di qualità analitica. L'acqua utilizzata deve essere distillata o avere purezza equivalente.

3.1. Reagente di Folin-Ciocalteu

Questo reagente si trova in commercio pronto per l'uso. Può essere preparato nel modo seguente: sciogliere 100 g di tungstato di sodio ($Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$) e 25 g di molibdato di sodio ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$) in 700 ml di acqua distillata; aggiungere 50 ml di acido fosforico all'85 % ($\rho_{20} = 1,71$ g/ml) e 100 ml di acido cloridrico concentrato ($\rho_{20} = 1,19$ g/ml). Portare ad ebollizione in riflusso per 10 ore, aggiungere quindi 150 g di solfato di litio ($Li_2SO_4 \cdot H_2O$), alcune gocce di bromo e portare nuovamente ad ebollizione per 15 minuti. Raffreddare e portare ad 1 l con acqua distillata.

3.2. Soluzione al 20 % (m/v) di carbonato di sodio (Na_2CO_3) anidro.**4. APPARECCHIATURA**

Comune dotazione di laboratorio, in particolare:

4.1. Palloni tarati da 100 ml.**4.2. Spettrofotometro con lunghezza d'onda a 750 nm.****5. MODO DI OPERARE****5.1. Vini rossi**

In un matraccio da 100 ml (punto 4.1), versare nell'ordine:

1 ml di vino diluito a 1/5

50 ml di acqua distillata

5 ml di reagente di Folin-Ciocalteu (3.1)

20 ml di soluzione di carbonato di sodio (3.2)

Portare a 100 ml con acqua distillata.

Agitare per omogeneizzare. Attendere 30 minuti che la reazione sia completa. Determinare l'assorbanza a 750 nm per 1 cm rispetto al riferimento preparato con acqua distillata al posto del vino.

Se l'assorbanza letta non ha un valore prossimo a 0,3, è opportuno ricominciare il procedimento, modificando la diluizione del vino in modo da ottenere tale assorbanza.

5.2. Vini bianchi

Operare nelle stesse condizioni, su 1 ml di vino non diluito.

5.3. Mosti concentrati rettificati**5.3.1. Preparazione del campione**

Utilizzare la soluzione il cui tenore zuccherino è del 25 % (m/m) (25° Brix) preparata secondo le indicazioni del punto 4.1.2, al capitolo «pH».

5.3.2. *Misura*

Operare come descritto per i vini rossi (5.1) su 5 ml di campione preparato come in 5.3.1 e misurare l'assorbanza rispetto a un bianco preparato con 5 ml di una soluzione al 25 % (m/m) di zucchero invertito.

6. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

6.1. **Calcoli**

Esprimere il risultato sotto forma di un indice ottenuto moltiplicando l'assorbanza per 100, nel caso dei vini rossi diluiti a 1/5 (o per il fattore corrispondente alla diluizione operata) e per 20 nel caso dei vini bianchi. Nel caso dei mosti concentrati rettificati, l'assorbanza deve essere moltiplicata per 16.

6.2. **Ripetibilità**

La differenza tra i risultati di due determinazioni effettuate simultaneamente o rapidamente l'una dopo l'altra dallo stesso analista non deve essere superiore a 1.

Una buona ripetibilità dei risultati dipende dall'impiego di un'apparecchiatura (palloni tarati e celle) rigorosamente pulita.

6 GLUCOSIO E FRUTTOSIO (OIV-AS-311-02-GLUFRU) — METODO DI TIPO II

1. DEFINIZIONE

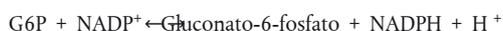
Il glucosio e il fruttosio possono essere determinati singolarmente con un metodo enzimatico, al solo scopo di calcolare il rapporto glucosio/fruttosio.

2. PRINCIPIO

Il glucosio e il fruttosio sono fosforilati con adenosina-trifosfato (ATP) con una reazione enzimatica catalizzata dall'esochinasi (HK) e danno glucosio-6-fosfato (G6P) e fruttosio-6-fosfato (F6P):



In un primo tempo il glucosio-6-fosfato viene ossidato a gluconato-6-fosfato dal nicotinammide-adenina-dinucleotide-fosfato (NADP) in presenza dell'enzima glucosio-6-fosfato-deidrogenasi (G6PDH). La quantità di nicotinammide-adenina-dinucleotide-fosfato ridotto (NADPH) che si forma corrisponde alla quantità di glucosio-6-fosfato e quindi a quella del glucosio.



Il nicotinammide-adenina-dinucleotide-fosfato ridotto si dosa per assorbimento a 340 nm.

Al termine di questa reazione, il fruttosio-6-fosfato viene trasformato dall'azione della fosfoglucosio-isomerasi (PGI) in glucosio-6-fosfato:



Il glucosio-6-fosfato reagisce di nuovo con il nicotinammide-adenina-dinucleotide-fosfato per dare gluconato-6-fosfato e nicotinammide-adenina-dinucleotide-fosfato ridotto; questo viene quindi dosato.

3. APPARECCHIATURA

— Spettrofotometro in grado di effettuare misurazioni a 340 nm, valore massimo di assorbimento del NADPH. Trattandosi di misure assolute (senza curva di taratura, ma con riferimento al coefficiente di estinzione del NADPH), le scale delle lunghezze d'onda e delle assorbanze dell'apparecchio devono essere controllate.

In mancanza di quest'apparecchiatura, utilizzare uno spettrofotometro a spettro discontinuo che consenta di effettuare le misure a 334 nm o a 365 nm.

— Celle di vetro con un cammino ottico di cm o celle monouso.

— Pipette per prova enzimatica da 0,02— 0,05— 0,1— 0,2 ml.

4. REAGENTI

- 4.1. **Soluzione 1:** tampone (trietanolammina 0,3 M; pH = 7,6; 4×10^{-3} M in Mg^{2+}): sciogliere 11,2 g di cloridrato di trietanolammina ($\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{N}\cdot\text{HCl}$) e 0,2 g di $\text{Mg SO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ in 150 ml di acqua bidistillata, aggiungere circa 4 ml di soluzione 5 M di idrossido di sodio (NaOH) per ottenere un pH uguale a 7,6 e portare a 200 ml.

Questa soluzione tampone si conserva a + 4 °C per quattro settimane.

- 4.2. **Soluzione 2:** soluzione di nicotinammide-adenina-dinucleotide-fosfato (circa $11,5 \times 10^{-3}$ M): sciogliere 50 mg di nicotinammide-adenina-dinucleotide-fosfato bisodico in 5 ml di acqua bidistillata

Questa soluzione si conserva a + 4 °C per quattro settimane.

- 4.3. **Soluzione 3:** soluzione di adenosina-5'-trifosfato (circa 81×10^{-3} M): sciogliere 250 mg di adenosina-5'-trifosfato disodico e 250 mg di bicarbonato di sodio Na H CO_3 in 5 ml di acqua bidistillata.

Questa soluzione si conserva a + 4 °C per quattro settimane.

- 4.4. **Soluzione 4:** esochinasi/glucosio-6-fosfato-deidrogenasi: miscelare 0,5 ml di esochinasi (2 mg di proteina/ml, cioè 280 U/ml) e 0,5 ml di glucosio-6-fosfato-deidrogenasi (1 mg di proteina per ml).

Questa soluzione si conserva a + 4 °C per un anno.

- 4.5. **Soluzione 5:** fosfoglicosio-isomerasi (2 mg di proteina per ml, cioè 700 U/ml). La sospensione viene utilizzata senza diluizione.

Questa soluzione si conserva a + 4 °C per un anno.

Nota:

L'insieme dei reagenti necessari per la determinazione si trova pronto in commercio.

5. MODO DI OPERARE

5.1. **Preparazione del campione**

Effettuare le seguenti diluizioni in funzione della quantità presunta di glucosio + fruttosio per litro:

Misura a 340 e 334 nm	Misura a 365 nm	Diluizione con acqua	Fattore F di diluizione
Fino a 0,4 g/l	0,8 g/l	—	—
Fino a 4,0 g/l	Fino a 8,0 g/l	1 + 9	10
Fino a 10,0 g/l	Fino a 20,0 g/l	1 + 24	25
Fino a 20,0 g/l	Fino a 40,0 g/l	1 + 49	50
Fino a 40,0 g/l	Fino a 80,0 g/l	1 + 99	100
Al di sopra di 40,0 g/l	Al di sopra di 80,0 g/l	1 + 999	1 000

5.2. **Dosaggio**

Regolato lo spettrofotometro sulla lunghezza d'onda di 340 nm, effettuare le misure rispetto all'aria (senza la cella sul cammino ottico) o rispetto all'acqua.

Temperatura 20-25° C.

In 2 celle aventi un cammino ottico di 1 cm, introdurre:

	Bianco	Dosaggio
Soluzione 1 (4.1) (portata a 20 °C)	2,50 ml	2,50 ml
Soluzione 2 (4.2)	0,10 ml	0,10 ml
Soluzione 3 (4.3)	0,10 ml	0,10 ml
Campione da determinare		0,20 ml
Acqua bidistillata	0,20 ml	

Mescolare e dopo circa 3 minuti leggere l'assorbanza delle soluzioni (A_1). Provocare la reazione aggiungendo:

Soluzione 4 (4.4)	0,02 ml	0,02 ml
-------------------	---------	---------

Mescolare; aspettare 15 minuti; effettuare la misura dell'assorbanza e verificare dopo 2 minuti che la reazione sia terminata (A_2).

Aggiungere immediatamente:

Soluzione 5 (4.5)	0,02 ml	0,02 ml
-------------------	---------	---------

Mescolare; effettuare la lettura dopo 10 minuti; verificare dopo 2 minuti che la reazione sia terminata (A_3).

Determinare le differenze di assorbanza:

$A_2 - A_1$ corrispondente al glucosio,

$A_3 - A_2$ corrispondente al fruttosio,

per la prova in bianco e il dosaggio.

Determinare la differenza di assorbanza tra la prova in bianco (ΔA_T) e il dosaggio (ΔA_D) e fissare:

per il glucosio: $\Delta A_G = \Delta A_D - \Delta A_T$

per il fruttosio: $\Delta A_F = \Delta A_D - \Delta A_T$

Nota:

Il tempo necessario per l'azione degli enzimi può variare da un lotto all'altro. Quello sopra riportato è dato soltanto a titolo indicativo. Si raccomanda di determinarlo per ciascun lotto.

5.3. Espressione dei risultati

5.3.1. Calcoli

La formula generale per il calcolo delle concentrazioni è la seguente:

$$C = ((V \times PM)/(\epsilon \times d \times v \times 1\,000)) \times \Delta A \text{ (g/l)}$$

V = volume della soluzione impiegata per la prova (ml)

v = volume del campione (ml)

PM = massa molecolare della sostanza da dosare

d = cammino ottico della cella (cm)

ϵ = coefficiente di assorbimento dell'NADPH a 340 nm = 6,3 (mmole⁻¹ × l × cm⁻¹)

V = 2,92 ml per la determinazione del glucosio

V = 2,94 ml per la determinazione del fruttosio

v = 0,20 ml

PM = 180

d = 1.

Si ottiene:

per il glucosio: $C \text{ (g/l)} = 0,417 \times \Delta A_G$

per il fruttosio: $C \text{ (g/l)} = 0,420 \times \Delta A_F$

Se per preparare il campione è stata effettuata una diluizione, moltiplicare il risultato per il fattore F.

Nota:

Per misure effettuate alle lunghezze d'onda 334 o 365 nm si ottiene:

— misura a 334 nm: $\epsilon = 6,2 \text{ (mmole}^{-1} \times \text{l} \times \text{cm}^{-1}\text{)}$

per il glucosio: $C \text{ (g/l)} = 0,425 \times \Delta A_G$

per il fruttosio: $C \text{ (g/l)} = 0,428 \times \Delta A_F$

— misura a 365 nm: $\epsilon = 3,4 \text{ (mmole}^{-1} \times \text{l} \times \text{cm}^{-1}\text{)}$

per il glucosio: $C \text{ (g/l)} = 0,773 \times \Delta A_G$

per il fruttosio: $C \text{ (g/l)} = 0,778 \times \Delta A_F$

5.3.2. Ripetibilità (r)

$$r = 0,056 x_i$$

5.3.3. Riproducibilità (R)

$$R = 0,12 + 0,076 x_i$$

x_i = tenore di glucosio o fruttosio in grammi per litro.

7 DOSAGGIO DEGLI ZUCCHERI CON IL METODO DI MISURA HPLC (SACCAROSIO) (OIV-AS-311-03-SUCRES) — METODO DI TIPO II

(p.m.)

[La descrizione di questo metodo di analisi è sottoposta ad aggiornamento da parte dei responsabili dell'OIV e verrà prossimamente pubblicata in un'ulteriore comunicazione della Commissione non appena l'OIV avrà pubblicato il testo aggiornato nell'edizione 2010 della Raccolta dei metodi internazionali d'analisi. A titolo indicativo, nell'attesa di tale pubblicazione, si rimanda al capitolo 6, paragrafo 3, dell'allegato del regolamento (CEE) n. 2676/90 della Commissione.]

8 RIVELAZIONE DELL'AUMENTO DEL TITOLO ALCOLOMETRICO NATURALE DEI MOSTI DI UVE, DEI MOSTI DI UVE CONCENTRATI, DEI MOSTI DI UVE CONCENTRATI RETTIFICATI E DEI VINI MEDIANTE LA RISONANZA MAGNETICA NUCLEARE DEL DEUTERIO (OIV-AS-311-05-ENRRMN) — METODO DI TIPO I

(p.m.)

[La descrizione di questo metodo di analisi è sottoposta a riesame da parte degli esperti scientifici dell'OIV e verrà pubblicata in un'ulteriore comunicazione della Commissione non appena l'Assemblea generale dell'OIV avrà adottato il testo definitivo. A titolo indicativo, nell'attesa della decisione dell'OIV, si rimanda al capitolo 8 dell'allegato del regolamento (CEE) n. 2676/90 della Commissione.]

9 TITOLO ALCOLOMETRICO VOLUMICO (OIV-AS-312-01-TALVOL) — METODI DI TIPO I**(p.m.)**

[La descrizione di questi metodi di analisi è sottoposta ad aggiornamento da parte dei responsabili dell'OIV e verrà prossimamente pubblicata in un'ulteriore comunicazione della Commissione non appena l'OIV avrà pubblicato il testo aggiornato nell'edizione 2010 della Raccolta dei metodi internazionali d'analisi. A titolo indicativo, nell'attesa di tale pubblicazione, si rimanda al capitolo 3 dell'allegato del regolamento (CEE) n. 2676/90 della Commissione.]

10 DETERMINAZIONE DEL RAPPORTO ISOTOPICO $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ PER SPETTROMETRIA DI MASSA ISOTOPICA DELL'ETANOLO DEL VINO O DELL'ETANOLO OTTENUTO PER FERMENTAZIONE DEI MOSTI, DEI MOSTI CONCENTRATI O DEI MOSTI CONCENTRATI RETTIFICATI (OIV-AS-312-06-ETHANO) — METODO DI TIPO II

1. CAMPO DI APPLICAZIONE

Il metodo consente la misurazione del rapporto isotopico $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ dell'etanolo del vino e di quello dell'etanolo ottenuto per fermentazione dei prodotti derivati della vite (mosto, mosto concentrato, mosto concentrato rettificato).

2. RIFERIMENTI NORMATIVI

ISO: 5725:1994 «Esattezza dei risultati e metodi di misura — Determinazione della ripetibilità e della riproducibilità di un metodo di misura normalizzato mediante test interlaboratori»

V-PDB: Vienna-Pee-Dee Belemnite ($R_{\text{PDB}} = 0,0112372$).

Metodo OIV AS-311-O5-ENRRMN «Rivelazione dell'aumento di titolo alcolometrico naturale dei mosti di uve, dei mosti di uve concentrati, dei mosti di uve concentrati rettificati e dei vini mediante la risonanza magnetica nucleare del deuterio (RMN-FINS)».

3. TERMINI E DEFINIZIONI

$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$: Rapporto tra il numero di isotopi del carbonio 13 (^{13}C) e del carbonio 12 (^{12}C) per un campione determinato.

$\delta^{13}\text{C}$: Tenore di carbonio 13 (^{13}C) espresso in parti per mille (‰).

RMN-FINS: Frazionamento isotopico naturale specifico studiato per risonanza magnetica nucleare.

V-PDB: Vienna-Pee-Dee Belemnite. Il PDB, riferimento primario per la misura delle variazioni naturali dei tenori isotopici di carbonio 13, era un carbonato di calcio proveniente da un rostro di belemnite del periodo Cretaceo della formazione «Pee-Dee» dello Stato della Carolina del Sud (USA). Il suo rapporto isotopico $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ o R_{PDB} è $R_{\text{PDB}} = 0,0112372$. Il PDB è esaurito da parecchio tempo, ma è rimasto il riferimento primario per esprimere le variazioni naturali dei tenori isotopici di carbonio 13, rispetto al quale vengono tarati i materiali di riferimento, disponibili presso l'Agenzia internazionale dell'energia atomica (AIEA) a Vienna (Austria). Le determinazioni isotopiche dell'abbondanza naturale di carbonio 13 sono pertanto espresse, per convenzione, rispetto al V-PDB.

m/z: Rapporto massa/carico.

4. PRINCIPIO

Nella fotosintesi, l'assimilazione di anidride carbonica da parte dei vegetali avviene secondo due principali tipi di metabolismo: il C_3 (ciclo di Calvin) e il C_4 (Hatch e Slack). Questi due meccanismi di fotosintesi presentano un frazionamento isotopico differente. I prodotti delle piante C_4 , quali gli zuccheri e l'alcole da fermentazione, presentano dei tenori di carbonio 13 più elevati di quelli dei loro omologhi provenienti dalle piante C_3 . La maggior parte dei vegetali, quali la vite e la barbabietola, appartengono al gruppo C_3 . La canna da zucchero e il granturco appartengono al gruppo C_4 . La misurazione del tenore di carbonio 13 consente quindi di rivelare e di valutare lo zucchero di origine C_4 (zucchero di canna o isoglucosio di granturco) aggiunto ai prodotti derivati dall'uva (mosti di uve, vini, ecc.). Le informazioni combinate del tenore di carbonio 13 con quelle ottenute per RMN-FINS consentono anche di quantificare l'aggiunta di miscele di zuccheri o di alcoli originari delle piante C_3 e C_4 .

Il tenore di carbonio 13 è determinato sull'anidride carbonica risultante dalla combustione completa del campione. Le abbondanze dei principali isotopomeri di massa 44 ($^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2$), 45 ($^{13}\text{C}^{16}\text{O}_2$ e $^{12}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O}$) e 46 ($^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$), risultanti dalle varie combinazioni possibili degli isotopi ^{18}O , ^{17}O , ^{16}O , ^{13}C e ^{12}C , vengono determinate a partire dalle correnti ioniche misurate su tre collettori differenti di uno spettrometro di massa isotopica. I contributi degli isotopomeri $^{13}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O}$ e $^{12}\text{C}^{17}\text{O}_2$ possono essere trascurati, data la loro abbondanza molto scarsa. La corrente ionica per $m/z = 45$ viene corretta, per tener conto del contributo di

$^{12}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O}$ che viene calcolato in funzione dell'intensità della corrente misurata per $m/z = 46$, considerando le abbondanze relative di ^{18}O e ^{17}O (correzione di Craig). La comparazione con un riferimento tarato in base al riferimento internazionale V-PDB consente il calcolo del tenore di carbonio 13 sulla scala relativa $\delta^{13}\text{C}$.

5. REAGENTI

I materiali e le sostanze consumabili dipendono dall'apparecchiatura (6) utilizzata dal laboratorio. I sistemi generalmente utilizzati sono quelli basati sull'analizzatore elementare. Quest'ultimo può essere progettato per l'introduzione di campioni posti in capsule metalliche sigillate o per l'iniezione di campioni liquidi attraverso una membrana con una siringa.

A seconda del tipo di apparecchiatura utilizzata, possono essere utilizzati i seguenti materiali di riferimento, reagenti e sostanze consumabili:

— materiali di riferimento

— disponibili presso l'AIEA:

Nome	Materiale	$\delta^{13}\text{C}$ rispetto a V-PDB (9)
— IAEA-CH-6	saccarosio	– 10,4 ‰
— IAEA-CH-7	polietilene	– 31,8 ‰
— NBS22	olio	– 29,7 ‰
— USGS24	grafite	– 16,1 ‰

— disponibili presso l'Istituto dei materiali e misure di riferimento (IRMM) di Geel (BE):

Nome	Materiale	$\delta^{13}\text{C}$ rispetto a V-PDB (9)
— CRM/BCR 656	alcole di vino	– 26,93 ‰
— CRM/BCR 657	glucosio	– 10,75 ‰
— CRM/BCR 660	soluzione idroalcolica (TAV 12%)	– 26,72 ‰

— Campione standard di lavoro con rapporto $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ noto, tarato su materiali di riferimento internazionali.

— Il seguente elenco indicativo delle sostanze consumabili vale per i sistemi a flusso continuo:

— elio per analisi (CAS 07440-59-7),

— ossigeno per analisi (CAS 07782-44-7),

— biossido di carbonio per analisi, utilizzato come gas di riferimento secondario per il tenore di carbonio 13 (CAS 00124-38-9),

— reagente di ossidazione per il forno del sistema di combustione, ad esempio ossido di rame (II) per analisi elementare (CAS 1317-38-0),

— essiccante per eliminare acqua prodotta dalla combustione, ad esempio anidrone per analisi elementare (perclorato di magnesio) (CAS 10034-81-8) (non necessario per le apparecchiature dotate di un sistema di eliminazione dell'acqua per criocattura o mediante un capillare selettivamente permeabile).

6. APPARECCHIATURA E MATERIALE

6.1. Spettrometro di massa per rapporto isotopico (SMRI)

Spettrometro di massa per rapporto isotopico (SMRI) che consente di determinare il tenore relativo di ^{13}C del gas CO_2 in abbondanza naturale con una precisione interna dello 0,05 ‰ o meglio espresso in valore relativo (9). La precisione interna viene qui definita come la differenza tra due misure dello stesso campione di CO_2 . Lo spettrometro di massa per la misurazione dei rapporti isotopici è generalmente munito di un collettore triplo per misurare simultaneamente le intensità per $m/z = 44$, 45 e 46. Lo spettrometro di massa per rapporto isotopico deve essere munito di un sistema di introduzione doppio, per misurare in alternanza il campione in esame e un campione di riferimento oppure deve disporre di un sistema integrato che effettui la combustione quantitativa dei campioni e separi il biossido di carbonio dagli altri prodotti della combustione prima della misurazione nello spettrometro di massa.

6.2. Apparecchiatura di combustione

Apparecchiatura di combustione in grado di convertire quantitativamente l'etanolo in biossido di carbonio ed eliminare tutti gli altri prodotti di combustione (acqua compresa) senza alcun frazionamento isotopico. L'apparecchiatura può essere costituita da un sistema a flusso continuo incorporato nella strumentazione di spettrometria di massa (6.2.1) o da un sistema di combustione distinto (6.2.2). Essa deve consentire di ottenere una precisione almeno equivalente a quella indicata al punto 11.

6.2.1. Sistemi a flusso continuo

Questi sistemi sono costituiti da un analizzatore elementare o da un cromatografo in fase gassosa munito di un sistema di combustione in linea.

Per i sistemi atti all'introduzione dei campioni contenuti in capsule metalliche, viene utilizzato il seguente materiale di laboratorio:

- microsiringa o micropipetta volumetrica con punte adeguate,
- bilancia con sensibilità di lettura almeno di 1 µg,
- pinza per incapsulamento,
- capsule di stagno per campioni liquidi,
- capsule di stagno per campioni solidi.

Nota:

per limitare i rischi di evaporazione dei campioni di etanolo, è possibile porre nelle capsule una sostanza assorbente (ad esempio *chromosorb W 45-60 maglie*) di cui si sarà preventivamente verificato, con una misurazione in bianco, che non contiene quantità significative di carbonio tali da alterare le misurazioni.

Nel caso di un analizzatore elementare con iniettore per liquidi o di un sistema di preparazione per cromatografia-combustione, viene utilizzato il seguente materiale di laboratorio:

- siringa per liquidi,
- flaconi a chiusura stagna e setti inerti.

Questi materiali di laboratorio sono qui indicati a titolo esemplificativo e possono essere sostituiti con altri materiali che offrano prestazioni equivalenti, a seconda del tipo di apparecchiatura di combustione e di spettrometria di massa utilizzata dal laboratorio.

6.2.2. Sistemi di preparazione autonomi

In questo caso, i campioni di biossido di carbonio derivanti dalla combustione dei campioni in esame e del riferimento sono raccolti in fiale che sono successivamente poste nel doppio sistema di entrata dello spettrometro per l'analisi isotopica. Si possono utilizzare diversi tipi di apparecchiature di combustione descritte nella letteratura:

- sistema chiuso di combustione riempito con gas ossigeno circolante,
- analizzatore elementare con flusso di elio e di ossigeno,
- fiala sigillata in vetro riempita con ossido di rame (II), come agente ossidante.

7. PREPARAZIONE DEI CAMPIONI PER IL TEST

L'etanolo deve essere estratto a partire dal vino prima della determinazione isotopica. Questa estrazione viene effettuata per distillazione del vino, come descritto al punto 3.1 del metodo RMN-FINS (OIV – MA-E-AS311-05-ENRRMN).

Nel caso di mosto di uve, di mosto di uve concentrato e di mosto di uve concentrato rettificato, gli zuccheri devono essere fermentati in etanolo, innanzitutto come descritto al punto 3.2 del metodo RMN-FINS (OIV – MA-E-AS311-05-ENRRMN).

8. MODO DI OPERARE

Tutte le fasi preparatorie devono essere effettuate senza perdita significativa di etanolo per evaporazione, il che altererebbe la composizione isotopica del campione.

La descrizione qui in appresso fa riferimento alle procedure generalmente utilizzate per la combustione dei campioni di etanolo mediante sistemi automatici di combustione esistenti in commercio. Per la preparazione del biossido di carbonio per l'analisi isotopica può essere utilizzato qualsiasi altro metodo che assicuri che il campione di etanolo sia quantitativamente convertito in biossido di carbonio, senza alcuna perdita di etanolo per evaporazione.

Procedura sperimentale basata sull'utilizzazione di un analizzatore elementare:

a) incapsulamento dei campioni:

- utilizzare capsule, pinze e un vassoio di preparazione puliti,
- prendere una capsula della dimensione adeguata con le pinze,
- introdurre il volume necessario di liquido nella capsula con la micropipetta,
- *Nota:*
per ottenere 2 mg di carbonio sono necessari 3,84 mg di etanolo assoluto oppure 4,17 mg di distillato con titolo alcolometrico del 92 % m/m. La quantità appropriata di distillato deve essere calcolata nello stesso modo a seconda della quantità di carbonio necessaria in funzione della sensibilità della strumentazione di spettrometria di massa;
- richiudere la capsula con le pinze,
- ogni capsula dev'essere chiusa a tenuta assolutamente stagna; in caso contrario deve essere scartata e occorre prepararne un'altra,
- per ogni campione, preparare due capsule,
- porre le capsule adeguatamente sul dispositivo automatico di inserimento dei campioni nell'analizzatore elementare; ogni capsula deve essere accuratamente identificata con un numero d'ordine,
- disporre sistematicamente capsule contenenti i riferimenti di lavoro all'inizio e alla fine della serie di campioni,
- inserire regolarmente campioni di controllo nella serie di campioni;

b) controllo e regolazione della strumentazione d'analisi elementare e di spettrometria di massa:

- regolare la temperatura dei forni dell'analizzatore elementare e i flussi di gas elio ed ossigeno per una combustione ottimale del campione,
- verificare che non vi siano perdite nel sistema d'analisi elementare e di spettrometria di massa (ad esempio controllando la corrente ionica per $m/z = 28$ corrispondente a N_2),
- regolare lo spettrometro di massa per misurare le intensità delle correnti ioniche per $m/z = 44, 45$ e 46 ,
- verificare il sistema mediante i campioni di controllo noti, prima di iniziare le misurazioni sui campioni;

c) svolgimento di una serie di misurazioni

I campioni posti sul dispositivo automatico di inserimento dei campioni per l'analizzatore elementare (o del cromatografo) vengono introdotti in successione. Il biossido di carbonio di ogni combustione di campione viene eluito verso lo spettrometro di massa che misura le correnti ioniche. Il computer collegato con la strumentazione registra le intensità delle correnti ioniche e calcola i valori δ per ogni campione (9).

9. CALCOLI

L'obiettivo del metodo consiste nel misurare il rapporto isotopico $^{13}C/^{12}C$ dell'etanolo estratto a partire dal vino o dai prodotti derivati dell'uva dopo fermentazione. Il rapporto isotopico $^{13}C/^{12}C$ può essere espresso dalla sua deviazione da un riferimento di lavoro. La deviazione isotopica del carbonio 13 ($\delta^{13}C$) viene quindi calcolata su una scala delta per mille ($\delta/1000$) per comparazione dei risultati ottenuti per il campione in esame rispetto a quelli del riferimento di lavoro precedentemente tarato in base al riferimento primario internazionale (V-PDB). I valori $\delta^{13}C$ sono espressi in base al riferimento di lavoro mediante la seguente formula:

$$\delta^{13}C_{ech/ref} \text{‰} = 1000 \times (R_{ech} - R_{ref}) / R_{ref}$$

dove R_{ech} e R_{ref} sono rispettivamente i rapporti isotopici $^{13}C/^{12}C$ del campione e quelli del biossido di carbonio utilizzato come gas di riferimento.

I valori $\delta^{13}\text{C}$ sono allora espressi rispetto al V-PDB secondo la formula

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{ech/V-PDB}} \text{‰} = \delta^{13}\text{C}_{\text{ech/ref}} + \delta^{13}\text{C}_{\text{ref/V-PDB}} + (\delta^{13}\text{C}_{\text{ech/ref}} \times \delta^{13}\text{C}_{\text{ref/V-PDB}})/1\ 000$$

dove $\delta^{13}\text{C}_{\text{ref/V-PDB}}$ è la deviazione isotopica preventivamente determinata del riferimento di lavoro rispetto al V-PDB.

Durante la misurazione in linea, possono essere rilevate piccole derive dovute alla variazione delle condizioni strumentali. In tal caso, le $\delta^{13}\text{C}$ dei campioni devono essere corrette in funzione della differenza tra il valore $\delta^{13}\text{C}$ misurato per il riferimento di lavoro e il suo valore vero, precedentemente tarato sul V-PDB per comparazione con uno dei materiali di riferimento internazionali. Tra due misure del riferimento di lavoro si può assumere che la deriva, e quindi la correzione da apportare ai risultati dei campioni, siano lineari. Il riferimento di lavoro deve essere misurato all'inizio e alla fine di ogni serie di campioni. Si può quindi calcolare una correzione per ogni campione mediante un'interpolazione lineare.

10. GARANZIA DI QUALITÀ E CONTROLLO

Controllare che il valore ^{13}C per il riferimento di lavoro non differisca di oltre lo 0,5 ‰ dal valore ammesso. In caso contrario, dovrà essere controllata ed eventualmente riaggiustata la regolazione della strumentazione dello spettrometro.

Per ogni campione, verificare che la differenza di risultato tra le due capsule misurate successivamente sia inferiore allo 0,3 ‰. Il risultato finale per un campione determinato è allora il valore medio delle due capsule. Se la differenza è maggiore dello 0,3 ‰, la misura deve essere ripetuta.

Un controllo del funzionamento corretto della misura può essere basato sull'intensità della corrente ionica per $m/z = 44$, che è proporzionale alla quantità di carbonio iniettata nell'analizzatore elementare. Nelle condizioni standard, l'intensità di questa corrente ionica dovrebbe essere praticamente costante per i campioni in esame. Una deviazione significativa deve far sospettare un'evaporazione di etanolo (ad esempio, una capsula non perfettamente sigillata) oppure una instabilità dell'analizzatore elementare o dello spettrometro di massa.

11. CARATTERISTICHE DI PRESTAZIONE DEL METODO (PRECISIONE)

È stato effettuato un primo studio in collaborazione (11.1) su distillati contenenti alcoli di origine vinica, alcoli di canna e di barbabietola e varie miscele di queste tre origini. Questo studio non ha tenuto conto della fase di distillazione, pertanto sono state considerate anche informazioni complementari ottenute da altri test interlaboratorio effettuati su vini (11.2) e segnatamente circuiti di test di attitudine (11.3) per le misure isotopiche. Ne risulta che i differenti sistemi di distillazione utilizzati in condizioni soddisfacenti – e in particolare quelli per le misure RMN-FINS – non comportano variabilità significative per le determinazioni $\delta^{13}\text{C}$ dell'etanolo del vino. I parametri di fedeltà osservati per i vini sono pressoché identici a quelli ottenuti nello studio in collaborazione (11.1) sui distillati.

11.1. Studio in collaborazione sui distillati

Anno della prova interlaboratorio: 1996

Numero di laboratori: 20

Numero di campioni: 6 campioni in doppio cieco

Analita: $\delta^{13}\text{C}$ dell'etanolo

Codice dei campioni	Alcole d'origine vinica	Alcole di barbabietola	Alcole di canna
A & G	80 %	10 %	10 %
B & C	90 %	10 %	0 %
D & F	0 %	100 %	0 %
E & I	90 %	0 %	10 %
H & K	100 %	0 %	0 %
J & L	0 %	0 %	100 %

Campioni	A/G	B/C	D/F	E/I	H/K	J/L
Numero di laboratori considerati, dopo eliminazione dei risultati aberranti	19	18	17	19	19	19
Numero di risultati accettati	38	36	34	38	38	38
Valore medio ($\delta^{13}\text{C}$) ‰	-25,32	-26,75	-27,79	-25,26	-26,63	-12,54
S_r^2	0,0064	0,0077	0,0031	0,0127	0,0069	0,0041
Deviazione standard della ripetibilità (S_r) ‰	0,08	0,09	0,06	0,11	0,08	0,06
Limite di ripetibilità r ($2,8 \times S_r$) ‰	0,22	0,25	0,16	0,32	0,23	0,18
S_R^2	0,0389	0,0309	0,0382	0,0459	0,0316	0,0584
Deviazione standard della riproducibilità (S_R) ‰	0,20	0,18	0,20	0,21	0,18	0,24
Limite di riproducibilità R ($2,8 \times S_R$) ‰	0,55	0,49	0,55	0,60	0,50	0,68

11.2. Studio interlaboratorio su due vini e un alcole

Anno della prova interlaboratorio: 1996

Numero di laboratori: 14 per la distillazione dei vini, di cui 7 anche per la misura $\delta^{13}\text{C}$ dell'etanolo dei vini, 8 per la misura $\delta^{13}\text{C}$ del campione di alcole

Numero di campioni: 3 (vino bianco TAV 9,3 % vol., vino bianco TAV 9,6 % vol. e alcole di titolo alcolometrico 93 % m/m)

Analita: $\delta^{13}\text{C}$ dell'etanolo

Campioni	Vino rosso	Vino bianco	Alcole
Numero di laboratori	7	7	8
Numero di risultati accettati	7	7	8
Valore medio ($\delta^{13}\text{C}$) ‰	-26,20	-26,20	-25,08
Varianza della riproducibilità S_R^2	0,0525	0,0740	0,0962
Deviazione standard della riproducibilità (S_R) ‰	0,23	0,27	0,31
Limite di riproducibilità R ($2,8 \times S_R$) ‰	0,64	0,76	0,87

I laboratori partecipanti hanno utilizzato differenti sistemi di distillazione. Le determinazioni isotopiche $\delta^{13}\text{C}$ effettuate da un solo laboratorio sull'insieme dei distillati rispediti dai partecipanti non rivelano alcun valore aberrante né alcun valore significativamente differente dai valori medi. La varianza dei risultati ($S^2 = 0,0059$) è comparabile alle varianze della ripetibilità S_r^2 dello studio in collaborazione sui distillati (11.1).

11.3. Risultati delle serie di prove di attitudine ai test isotopici

Dal dicembre 1994 vengono organizzati regolarmente degli esercizi di attitudine internazionali per le determinazioni isotopiche sui vini e sugli alcoli (distillati di TAV 96 % vol.). I risultati consentono ai laboratori partecipanti di controllare la qualità delle loro analisi. L'utilizzazione statistica dei risultati consente di apprezzare la variabilità delle determinazioni in condizioni di riproducibilità e quindi di stimare i parametri della varianza e del limite di riproducibilità. I risultati ottenuti per le determinazioni $\delta^{13}\text{C}$ dell'etanolo dei vini e dei distillati sono riassunti nella tabella seguente:

Data	Vini				Distillati			
	N	S_R	S_R^2	R	N	S_R	S_R^2	R
Dicembre 1994	6	0,210	0,044	0,59	6	0,151	0,023	0,42
Giugno 1995	8	0,133	0,018	0,37	8	0,147	0,021	0,41
Dicembre 1995	7	0,075	0,006	0,21	8	0,115	0,013	0,32
Marzo 1996	9	0,249	0,062	0,70	11	0,278	0,077	0,78
Giugno 1996	8	0,127	0,016	0,36	8	0,189	0,036	0,53
Settembre 1996	10	0,147	0,022	0,41	11	0,224	0,050	0,63
Dicembre 1996	10	0,330	0,109	0,92	9	0,057	0,003	0,16
Marzo 1997	10	0,069	0,005	0,19	8	0,059	0,003	0,16
Giugno 1997	11	0,280	0,079	0,78	11	0,175	0,031	0,49
Settembre 1997	12	0,237	0,056	0,66	11	0,203	0,041	0,57
Dicembre 1997	11	0,127	0,016	0,36	12	0,156	0,024	0,44
Marzo 1998	12	0,285	0,081	0,80	13	0,245	0,060	0,69
Giugno 1998	12	0,182	0,033	0,51	12	0,263	0,069	0,74
Settembre 1998	11	0,264	0,070	0,74	12	0,327	0,107	0,91
Media ponderata		0,215	0,046	0,60		0,209	0,044	0,59

N: numero di laboratori partecipanti.

11.4. Limiti di ripetibilità e di riproducibilità

I dati delle varie prove interlaboratorio presentati nelle precedenti tabelle consentono pertanto di stabilire per questo metodo (inserendo anche la fase di distillazione) i limiti di ripetibilità e di riproducibilità seguenti:

Limite di ripetibilità r: 0,24

Limite di riproducibilità R: 0,6.

11 ACIDITÀ TOTALE (OIV - AS-313-01-ACITOT) — METODO DI TIPO I

1. DEFINIZIONE

L'acidità totale è la somma delle acidità titolabili allorché si porta il pH a 7 per addizione di una soluzione alcalina titolata.

Il biossido di carbonio non è compreso nell'acidità totale.

2. PRINCIPIO DEL METODO

Titolazione potenziometrica o titolazione in presenza di blu di bromotimolo, come indicatore di fine reazione, per confronto con un campione colorato.

3. REAGENTI

3.1. Soluzione tampone a pH 7,0:

fosfato monopotassico KH_2PO_4 : 107,3 g

soluzione M di idrossido di sodio (NaOH): 500 ml

acqua q.b. a: 1 000 ml.

Possono essere impiegate anche le soluzioni tampone di riferimento reperibili in commercio.

3.2. Soluzione 0,1 M di idrossido di sodio (NaOH).

3.3. Soluzione di blu di bromotimolo a 4 g/l.

Blu di bromotimolo ($\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{Br}_2\text{O}_5\text{S}$) 4 g

Alcool neutro a 96 % vol 200 ml

Dopo aver solubilizzato aggiungere:

Acqua esente da CO_2 200 ml

Soluzione M di idrossido di sodio

q.b. a colorazione blu-verde (pH 7) 7,5 ml

Acqua q.b. a 1 000 ml

4. APPARECCHIATURA

4.1. Pompa per vuoto ad acqua.

4.2. Beuta da vuoto da 500 ml.

4.3. Potenzimetro con scala tarata in unità di pH e relativi elettrodi. L'elettrodo di vetro deve essere conservato in acqua distillata. L'elettrodo al calomelano-cloruro di potassio saturo deve essere conservato in una soluzione satura di cloruro di potassio. Nella maggior parte dei casi si usa un elettrodo combinato; conservarlo in acqua distillata.

4.4. Recipiente cilindrico da 50 ml per i vini e da 100 ml per i mosti concentrati rettificati.

5. MODO DI OPERARE

5.1. Preparazione del campione

5.1.1. Vini

Eliminazione del biossido di carbonio. Porre in una beuta da vuoto 50 ml di vino; agitare e fare contemporaneamente il vuoto mediante la pompa ad acqua. L'agitazione deve durare 1 o 2 minuti.

5.1.2. Mosti concentrati rettificati

Introdurre 200 g di mosto concentrato rettificato pesato esattamente, in un pallone tarato da 500 ml. Portare a volume con acqua. Omogeneizzare.

5.2. Titolazione potenziometrica**5.2.1. Taratura del pHmetro**

Si effettua a 20 °C seguendo le istruzioni date per l'apparecchio utilizzato con la soluzione tampone a pH 7 a 20 °C.

5.2.2. Tecnica di misurazione

In un recipiente cilindrico (4.4) versare una quantità del campione preparato come descritto al punto 5.1, pari a 10 ml nel caso del vino ed a 50 ml nel caso del mosto concentrato rettificato. Aggiungere 10 ml circa di acqua distillata e aggiungere con la buretta la soluzione 0,1 M di idrossido di sodio (3.2) sino a portare il pH a 7 a 20 °C. Il liquido alcalino va aggiunto lentamente agitando in continuazione la soluzione. Sia n il numero di ml di NaOH 0,1 M utilizzati.

5.3. Titolazione con indicatore (blu di bromotimolo)**5.3.1. Prova preliminare: fissazione dello standard di colorazione**

Versare in un recipiente cilindrico (4.4) 25 ml di acqua distillata bollita, 1 ml di soluzione di blu di bromotimolo (3.3) e una quantità di campione preparato come descritto al punto 5.1 pari a 10 ml nel caso del vino ed a 50 ml nel caso del mosto concentrato rettificato. Aggiungere la soluzione 0,1 M di idrossido di sodio (3.2) sino ad ottenere una colorazione blu-verde. Aggiungere 5 ml della soluzione tampone a pH 7 (3.1).

5.3.2. Dosaggio

Versare in un recipiente cilindrico (4.4) 30 ml di acqua distillata bollita, 1 ml di soluzione di blu di bromotimolo (3.3) e un volume di campione preparato come descritto al punto 5.1 pari a 10 ml nel caso del vino ed a 50 ml nel caso del mosto concentrato rettificato. Aggiungere la soluzione 0,1 M di idrossido di sodio (3.2) sino ad ottenere una colorazione identica a quella ottenuta con il saggio preliminare (5.3.1). Sia n il numero di ml di soluzione di idrossido di sodio 0,1 M utilizzati.

6. ESPRESSIONE DEI RISULTATI**6.1. Calcoli****6.1.1. Vini**

L'acidità totale, espressa in milliequivalenti per litro, sarà:

$$A = 10 n$$

il valore è dato con una cifra decimale.

L'acidità totale, espressa in grammi di acido tartarico per litro, sarà:

$$A' = 0,075 \times A$$

il valore è dato con una cifra decimale.

6.1.2. Mosti concentrati rettificati

— Acidità totale espressa in milliequivalenti per chilogrammo di mosto concentrato rettificato: $a = 5 \times n$

— Acidità totale espressa in milliequivalenti per chilogrammo di zuccheri totali:

$$A = (500 \times n)/P$$

P tenore percentuale (m/m) di zuccheri totali.

Il valore è dato con una cifra decimale.

6.2. Ripetibilità (r) per la titolazione con l'indicatore (5.3)

$$r = 0,9 \text{ meq/l}$$

$$r = 0,07 \text{ g di acido tartarico/l}$$

per i vini bianchi, rosati e rossi.

6.3. Riproducibilità (R) per la titolazione con l'indicatore (5.3)

Per i vini bianchi e rosati:

$$R = 3,6 \text{ meq/l}$$

$$R = 0,3 \text{ g di acido tartarico/l.}$$

Per i vini rossi:

$$R = 5,1 \text{ meq/l}$$

$$R = 0,4 \text{ g di acido tartarico/l.}$$

12 ACIDITÀ VOLATILE (OIV - AS-313-02-ACIVOL) — METODO DI TIPO I

1. DEFINIZIONE

L'acidità volatile è costituita dagli acidi appartenenti alla serie acetica che si trovano nel vino allo stato libero o come sali.

2. PRINCIPIO DEL METODO

Titolazione degli acidi volatili separati dal vino per trascinarsi in corrente di vapore d'acqua e rettifica dei vapori.

Il vino viene prima liberato dal biossido di carbonio.

Occorre sottrarre dall'acidità del distillato l'acidità del biossido di zolfo libero e combinato che è stato distillato in queste condizioni.

Occorre anche detrarre l'acidità dovuta all'acido sorbico eventualmente aggiunto al vino.

Nota:

L'acido salicilico utilizzato in taluni paesi prima dell'analisi per stabilizzare i vini si ritrova in parte nel distillato. È quindi necessario dosarlo e detrarre dall'acidità volatile. Il metodo di dosaggio è riportato al punto 7 al presente capitolo.

3. REAGENTI

3.1. Acido tartarico cristallizzato ($C_4H_6O_6$)

3.2. Soluzione 0,1 M di idrossido di sodio (NaOH)

3.3. Soluzione di fenoltaleina all'1 % in alcol neutro al 96 % vol.

3.4. Acido cloridrico ($p_{20} = 1,18 - 1,19$ g/ml) diluito $\frac{1}{4}$ (v/v)

3.5. Soluzione 0,005 M di iodio (I_2)

3.6. Ioduro di potassio cristallizzato (KI)

3.7. Salsa di amido a 5 g/l:

Disperdere 5 g di amido in circa 500 ml di acqua. Portare all'ebollizione agitando e mantenerla per 10 minuti; aggiungere 200 g di cloruro di sodio. Dopo aver lasciato raffreddare portare a 1 l.

3.8. Soluzione satura di tetraborato di sodio ($Na_2B_4O_7 \cdot 10 H_2O$), cioè circa 55 g/l a 20 °C.

4. APPARECCHIATURA

4.1. Apparecchio di distillazione in corrente di vapore di acqua composto da:

1) un generatore di vapore d'acqua; il vapore d'acqua prodotto deve essere esente da biossido di carbonio;

2) un gorgogliatore;

3) una colonna di rettifica;

4) un refrigerante.

L'apparecchio deve soddisfare alle condizioni definite dai seguenti tre saggi:

a) versare nel gorgogliatore 20 ml di acqua bollita; raccogliere 250 ml di distillato e addizionarvi 0,1 ml di soluzione 0,1 M di idrossido di sodio (3.2) e 2 gocce della soluzione di fenoltaleina (3.3); la colorazione rosa deve mantenersi stabile per almeno 10 secondi (vapore d'acqua esente da biossido di carbonio);

b) versare nel gorgogliatore 20 ml di una soluzione 0,1 M di acido acetico; raccogliere 250 ml di distillato; titolare con la soluzione 0,1 M di idrossido di sodio (3.2); il volume impiegato deve essere almeno pari a 19,9 ml (acido acetico trascinato $\geq 99,5$ %);

c) versare nel gorgogliatore 20 ml di una soluzione M di acido lattico; raccogliere 250 ml di distillato e titolarne l'acidità con la soluzione 0,1 M di idrossido di sodio (3.2);

il volume impiegato deve essere inferiore o uguale a 1,0 ml (acido lattico distillato $\leq 0,5\%$).

Gli apparecchi o le tecniche che soddisfano a questi saggi sono da considerare apparecchi o tecniche ufficiali internazionali.

4.2. Pompa per vuoto a caduta d'acqua.

4.3. Beuta da vuoto.

5. MODO DI OPERARE

5.1. **Preparazione del campione: eliminazione del biossido di carbonio**

Versare circa 50 ml di vino in una beuta da vuoto; agitare e creare contemporaneamente il vuoto per mezzo della pompa per vuoto a caduta d'acqua. L'agitazione deve durare 1 o 2 minuti.

5.2. **Trascinamento in corrente di vapore d'acqua**

Versare nel gorgogliatore 20 ml di vino privato, come descritto al punto 5.1, del biossido di carbonio. Aggiungere circa 0,5 g di acido tartarico (3.1). Raccogliere almeno 250 ml di distillato.

5.3. **Titolazione**

Titolare con la soluzione 0,1 M di idrossido di sodio (3.2) in presenza di 2 gocce di soluzione di fenolfaleina (3.3), sia n il volume in ml impiegato.

Aggiungere 4 gocce di acido cloridrico diluito $\frac{1}{4}$ (3.4), 2 ml di salda di amido (3.7) ed alcuni cristalli di ioduro di potassio (3.6). Titolare il biossido di zolfo libero con la soluzione 0,005 M di iodio (3.5). Sia n' il volume in ml impiegato.

Aggiungere la soluzione satura di tetraborato di sodio (3.8) sino al ritorno del colore rosa. Titolare il biossido di zolfo combinato con la soluzione 0,005 M di iodio (3.5). Sia n'' il volume in ml impiegato.

6. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

6.1. **Calcoli**

L'acidità volatile espressa in milliequivalenti per litro, con una cifra decimale, sarà:

$$A = 5 (n - 0,1 n' - 0,05 n'')$$

L'acidità volatile espressa in grammi di acido acetico per litro, con due cifre decimali, sarà:

$$0,300 (n - 0,1 n' - 0,05 n'')$$

6.2. **Ripetibilità (r)**

$$r = 0,7 \text{ me/l}$$

$$r = 0,04 \text{ g di acido acetico/l.}$$

6.3. **Riproducibilità (R)**

$$R = 1,3 \text{ meq/l}$$

$$R = 0,08 \text{ g di acido acetico/l.}$$

6.4. **Vini addizionati di acido sorbico**

Poiché con i primi 250 ml di distillato viene trascinata il 96 % dell'acido sorbico, occorre detrarre la sua acidità dall'acidità volatile tenendo conto che 100 mg di acido sorbico corrispondono ad una acidità di 0,89 milliequivalenti o di 0,053 g di acido acetico e conoscendo il tenore di acido sorbico (mg/l) determinato a parte.

7. DETERMINAZIONE DELL'ACIDO SALICILICO TRASCINATO NEL DISTILLATO DELL'ACIDITÀ VOLATILE

7.1. **Principio**

Una volta determinata l'acidità volatile ed effettuata la correzione per il biossido di zolfo, la presenza di acido salicilico è caratterizzata, dopo acidificazione, dalla colorazione violetta che si forma per addizione di un sale di ferro III.

La determinazione dell'acido salicilico trascinato nel distillato con l'acidità volatile è effettuata su un secondo distillato avente lo stesso volume di quello su cui è stato effettuato il dosaggio dell'acidità volatile. In tale distillato, si determina l'acido salicilico con un metodo colorimetrico per confronto. Lo si detrae quindi dall'acidità del distillato.

7.2. **Reagenti**

- 7.2.1. Acido cloridrico (HCl) ($\rho_{20} = 1,18 - 1,19$ g/ml).
7.2.2. Tiosolfato di sodio ($\text{Na}_2 \text{S}_2 \text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$) in soluzione 0,1 M.
7.2.3. Soluzione di solfato ferrico III ammonico [$\text{Fe}_2 (\text{SO}_4)_3 \times (\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4 \times 24 \text{H}_2\text{O}$] al 10 % (m/v).
7.2.4. Soluzione di salicilato di sodio 0,01 M. Soluzione contenente 1,60 g/l di salicilato di sodio ($\text{Na C}_7 \text{H}_5 \text{O}_3$).

7.3. **Modo di operare**

7.3.1. *Caratterizzazione dell'acido salicilico nel distillato dell'acidità volatile*

Subito dopo avere determinato l'acidità volatile ed averla corretta per il biossido di zolfo libero e combinato, aggiungere nella beuta 0,5 ml di acido cloridrico (7.2.1), 3 ml della soluzione 0,1 M di tiosolfato di sodio (7.2.2) ed 1 ml della soluzione di solfato ferrico ammonico (7.2.3).

In presenza di acido salicilico si ha la formazione di una colorazione violetta.

7.3.2. *Dosaggio dell'acido salicilico*

Nella beuta conica di cui al punto precedente segnare con una tacca di riferimento il volume del distillato. Svotare e risciacquare la beuta.

Sottoporre a distillazione in corrente di vapore d'acqua una nuova presa di campione da 20 ml di vino e raccogliere il distillato nella beuta riempiendola sino alla tacca di riferimento. Aggiungere 0,3 ml di acido cloridrico (7.2.1) e 1 ml della soluzione di solfato ferrico ammonico (7.2.3). Il contenuto della beuta assume una colorazione violetta.

Versare, in una beuta identica a quella recante la tacca di riferimento, acqua distillata sino a raggiungere lo stesso livello del distillato. Aggiungere 0,3 ml di acido cloridrico (7.2.1) e 1 ml di soluzione di solfato ferrico ammonico (7.2.3). Aggiungere con una buretta la soluzione di salicilato di sodio 0,01 M (7.2.4) sino ad ottenere una colorazione violetta della stessa intensità di quella della beuta contenente il distillato di vino.

Sia n''' il numero di millilitri utilizzati.

7.4. **Correzione dell'acidità volatile**

Detrarre $0,1 \times n'''$ dal volume di n ml di soluzione di idrossido di sodio 0,1 M impiegato per titolare l'acidità del distillato in sede di dosaggio dell'acidità volatile.

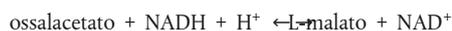
13 ACIDO CITRICO (OIV -AS-313-09-ACIENZ) — METODO DI TIPO II

1. PRINCIPIO DEL METODO

L'acido citrico viene trasformato in ossalacetato e acetato in una reazione catalizzata dalla citrato-liasi (CL):



In presenza della malato-deidrogenasi (MDH) e della lattato-deidrogenasi (LDH), l'ossalacetato e il suo derivato di decarbossilazione, il piruvato, vengono ridotti dal nicotinammide-adenina-dinucleotide ridotto (NADH) a L-malato ed a L-lattato:



In queste reazioni, la quantità di NADH ossidato a NAD^+ è proporzionale al citrato presente. L'ossidazione dell'NADH viene misurata dalla diminuzione della sua assorbanza alla lunghezza d'onda di 340 nm.

2. REAGENTI

2.1. Tampone a pH 7,8

(glicilglicina 0,51 M; pH = 7,8; Zn^{2+} : $0,6 \times 10^{-3}$ M):

sciogliere in circa 70 ml di acqua bidistillata 7,13 g di glicilglicina;

portare il pH a 7,8 con circa 13 ml di soluzione di idrossido di sodio 5 M; aggiungere 10 ml di soluzione di cloruro di zinco ZnCl_2 a 80 mg/100 ml; portare a 100 ml con acqua bidistillata.

Alla temperatura di + 4 °C la soluzione si mantiene stabile per almeno 4 settimane.

2.2. Soluzione di nicotinammide-adenina-dinucleotide ridotto (NADH), circa $6 \cdot 10^{-3}$ M: sciogliere 30 mg di NADH e 60 mg di NaHCO_3 in 6 ml di acqua bidistillata.

2.3. Soluzione di malato deidrogenasi/lattato deidrogenasi (MDH/LDH) (0,5 mg MDH/ml; 2,5 mg LDH/ml):

miscelare 0,1 ml di MDH (5 mg MDH/ml), 0,4 ml di soluzione di solfato di ammonio (3,2 M) e 0,5 ml di LDH (5 mg/ml). A + 4 °C questa sospensione si mantiene stabile per almeno un anno.

2.4. Citrato-liasi CL (5 mg di proteina/ml): sciogliere in 1 ml di acqua ghiacciata 168 mg di liofilizzato. Alla temperatura di + 4 °C la soluzione si mantiene stabile per almeno una settimana e se congelata per almeno 4 settimane.

Prima del dosaggio si raccomanda di procedere alla verifica dell'attività dell'enzima

2.5. Polivinilpirrolidone (PVPP)

Nota: l'insieme dei reagenti necessari per la determinazione si trova pronto in commercio.

3. APPARECCHIATURA

3.1. Spettrofotometro in grado di effettuare misurazioni a 340 nm, massimo di assorbimento del NADH.

In alternativa può essere utilizzato un fotometro a spettro discontinuo con lunghezza d'onda a 334 nm o a 365 nm. Poiché si tratta di misurazioni assolute di assorbanza (senza curva di taratura, ma riferite al coefficiente di estinzione dell'NADH), occorre controllare le scale delle lunghezze d'onda e delle assorbanze dell'apparecchio.

3.2. Celle di vetro con un cammino ottico di 1 cm o celle monouso.

3.3. Micropipette per il prelievo di volumi compresi tra 0,02 e 2 ml.

4. PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

Il dosaggio del citrato si effettua in genere direttamente sul vino senza preventiva decolorazione o diluizione, a condizione che il tenore in acido citrico sia inferiore a 400 mg/l. In caso contrario diluire il vino in modo che la concentrazione in citrato sia compresa tra 20 e 400 mg/l (quantità di citrato nella presa di campione compresa fra 5 µg e 80 µg).

Nel caso del vino rosso ricco di composti fenolici, si raccomanda di trattarlo preliminarmente con la PVPP: mettere in sospensione nell'acqua 0,2 g circa di PVPP, lasciare riposare per 15 minuti. Filtrare su filtro a pieghe.

Aggiungere a 10 ml di vino versato in una beuta conica da 50 ml, il PVPP umido prelevato dal filtro con la spatola. Agitare per 2-3 minuti. Filtrare.

5. MODO DI OPERARE

Regolato lo spettrofotometro sulla lunghezza d'onda di 340 nm, effettuare le misure di assorbanza in celle da 1 cm dopo aver aggiustato l'apparecchio allo zero di assorbanza contro aria (senza la cella sul percorso ottico). Introdurre nelle celle da 1 cm:

	Bianco	Dosaggio
Soluzione 2.1	1,00 ml	1,00 ml
Soluzione 2.2	0,10 ml	0,10 ml
Campione	—	0,20 ml
Acqua bidistillata	2,00 ml	1,80 ml
Soluzione 2.3	0,02 ml	0,02 ml

Mescolare; dopo circa 5 minuti leggere le assorbanze della soluzione del bianco e di quella del campione (A_1).

Aggiungere:

Soluzione 2.4	0,02 ml	0,02 ml
---------------	---------	---------

Mescolare; attendere che la reazione abbia termine (circa 5 minuti) e leggere le assorbanze della soluzione del bianco e del campione (A_2).

Determinare le differenze delle assorbanze ($A_1 - A_2$) del bianco e del campione.

Detrarre la differenza delle assorbanze del bianco dalla differenza delle assorbanze del campione:

$$\Delta A = \Delta A_D - \Delta A_T$$

Nota: il tempo necessario per l'azione degli enzimi può variare da un lotto all'altro. Quello sopra riportato è dato soltanto a titolo indicativo. Si raccomanda di determinarlo per ciascun lotto.

6. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

Il tenore in acido citrico è dato in milligrammi per litro (mg/l) senza cifre decimali.

6.1. Calcoli

La concentrazione in milligrammi per litro è data dalla seguente formula generale:

$$C = \frac{(V \times PM)}{(\epsilon \times d \times v)} \times \Delta A$$

V = volume in millilitri della soluzione impiegata per la prova (in questo caso 3,14 ml)

v = volume del campione in millilitri (in questo caso 0,2 ml)

P.M = peso molecolare della sostanza da dosare (in questo caso acido citrico anidro = 192,1)

d = cammino ottico della cella in centimetri (in questo caso 1 cm)

ϵ = coefficiente di assorbimento dell'NADH; a 340 nm,

$$\epsilon = 6,3 \text{ mmole}^{-1} \times 1 \times \text{cm}^{-1}.$$

Si ottiene:

$$C = 479 \times \Delta A$$

Se nella preparazione del campione è stata effettuata una diluizione, moltiplicare il risultato per il fattore di diluizione.

Nota: a 334 nm: $C = 488 \times \Delta A$ ($\epsilon = 6,2 \text{ mmole}^{-1} \times 1 \times \text{cm}^{-1}$)

a 365 nm: $C = 887 \times \Delta A$ ($\epsilon = 3,4 \text{ mmole}^{-1} \times 1 \times \text{cm}^{-1}$)

6.2. Ripetibilità (r)

Tenore in acido citrico inferiore a 400 mg/l: $r = 14$ mg/l.

Tenore in acido citrico superiore a 400 mg/l: $r = 28$ mg/l.

6.3. Riproducibilità (R)

Tenore in acido citrico inferiore a 400 mg/l: $R = 39$ mg/l.

Tenore in acido citrico superiore a 400 mg/l: $R = 65$ mg/l.

14 ACIDO SORBICO (OIV - AS-313-14-ACISOR) — METODO DI TIPO IV

1. PRINCIPIO DEI METODI

1.1. **Metodo di dosaggio per spettrofotometria di assorbimento nell'ultravioletto**

L'acido sorbico (acido 2,4 esadienoico trans, trans) estratto per distillazione in corrente di vapor d'acqua, viene dosato nel distillato del vino per spettrofotometria di assorbimento nell'ultravioletto. Le sostanze che interferiscono sulla misura dell'assorbimento nell'ultravioletto vengono eliminate per evaporazione a secco dell'aliquota di distillato prelevata, leggermente alcalinizzata con una soluzione di idrossido di calcio. I tenori inferiori a 20 mg/l devono essere confermati per cromatografia su strato sottile (sensibilità: 1 mg/l).

1.2. **Metodo di dosaggio per gascromatografia**

L'acido sorbico estratto con etere etilico è dosato per cromatografia in fase gassosa in presenza di uno standard interno.

1.3. **Metodo di ricerca di tracce per cromatografia su strato sottile**

L'acido sorbico, estratto con etere etilico, viene preparato per cromatografia su strato sottile. Se ne determina quindi semiquantitativamente la concentrazione.

2. METODO DI DOSAGGIO PER SPETTROFOTOMETRIA DI ASSORBIMENTO NELL'ULTRAVIOLETTO

2.1. **Reagenti**

2.1.1. Acido tartarico ($C_4H_6O_6$), cristallizzato.

2.1.2. Soluzione di idrossido di calcio, $Ca(OH)_2$ circa 0,02 M.

2.1.3. Soluzione di riferimento di acido sorbico a 20 mg per litro.

Sciogliere 20 mg di acido sorbico, $C_6H_8O_2$, in 2 ml circa di soluzione 0,1 M di idrossido di sodio. Versarli in un matraccio da 1 000 ml e portare a volume con acqua. Si possono anche sciogliere 26,8 mg di sorbato di potassio, $C_6H_7KO_2$, in acqua e portarli a 1 000 ml con acqua.

2.2. **Apparecchiatura**

2.2.1. Apparecchio di distillazione in corrente di vapore d'acqua (vedi «Acidità volatile»).

2.2.2. Bagnomaria a 100°C.

2.2.3. Spettrofotometro che consenta misurazioni alla lunghezza d'onda di 256 nm con celle in quarzo a cammino ottico da 1 cm.

2.3. **Modo di operare**2.3.1. *Distillazione*

Versare nel gorgogliatore dell'apparecchio di distillazione in corrente di vapore 10 ml di vino, aggiungere 1-2 g di acido tartarico (2.1.1). Raccogliere 250 ml di distillato.

2.3.2. *Curva di taratura*

Preparare, per diluizione con acqua della soluzione di riferimento (2.1.3), quattro soluzioni di riferimento aventi rispettivamente concentrazione di 0,5 - 1 - 2,5 e 5 mg di acido sorbico per litro; misurare con lo spettrofotometro le rispettive assorbanze a 256 nm rispetto all'acqua distillata. Tracciare la curva delle variazioni dell'assorbanza in funzione della concentrazione delle soluzioni. La variazione è lineare.

2.3.3. *Dosaggio*

Porre 5 ml di distillato in una capsula di 55 mm di diametro; aggiungere 1 ml di soluzione di idrossido di calcio (2.1.2). Portare a secco su bagnomaria bollente.

Riprendere il residuo con alcuni millilitri di acqua distillata, versare quantitativamente in un matraccio da 20 ml e portare a volume con le acque di lavaggio. Misurare con uno spettrofotometro l'assorbanza a 256 nm rispetto a una soluzione in bianco ottenuta per diluizione con acqua a 20 ml di 1 ml di soluzione di idrossido di calcio (2.1.2).

Portare il valore dell'assorbanza misurato sulla retta di taratura e determinare la concentrazione C della soluzione in acido sorbico.

Nota: nella pratica corrente l'evaporazione a secco può essere trascurata. Effettuare direttamente la misura dell'assorbanza sul distillato diluito 1:4 contro acqua distillata.

2.4. Espressione dei risultati

2.4.1. Calcoli

La concentrazione in acido sorbico del vino espressa in milligrammi per litro è uguale a:

$$100 \times C$$

C = concentrazione in acido sorbico della soluzione analizzata per spettrofotometria, espressa in milligrammi per litro.

3. METODO DI DOSAGGIO PER CROMATOGRAFIA IN FASE GASSOSA

3.1. Reagenti

3.1.1. Etere etilico, (C₂H₅)₂O, distillato al momento dell'impiego.

3.1.2. Soluzione dello standard interno: soluzione di 1 g per litro di acido undecanoico, C₁₁H₂₂O₂, in etanolo al 95 % (vol.).

3.1.3. Soluzione acquosa di acido solforico, H₂SO₄ (ρ₂₀ = 1,84 g/ml) diluito a 1/3 (v/v).

3.2. Apparecchiatura

3.2.1. Gasromatografo corredato di un rivelatore a ionizzazione di fiamma e da una colonna in acciaio inossidabile (4 m × 1/8 di pollice) trattata preliminarmente con dimetildiclorosilano e riempita con una fase stazionaria costituita da una miscela di dietilenglicol succinato (5 %) e di acido fosforico (1 %) (DEGS - H₃ PO₄) o da una miscela di dietilenglicol adipato (7 %) e di acido fosforico (1 %) (DEGA - H₃ PO₄) fissato su Gaschrom Q 80 - 100 mesh.

Per il trattamento con il dimetilclorosilano (DMDCS) far passare nella colonna una soluzione in toluene di 2-3 g di DMDCS. Lavare immediatamente la colonna con metanolo, far passare una corrente di azoto, poi esaano e nuovamente corrente di azoto. Quindi riempire la colonna.

Condizioni operative:

Temperatura del forno: 175 °C

Temperatura dell'iniettore e del rivelatore: 230 °C

Gas vettore: azoto (flusso 20 ml/minuto).

3.2.2. Microsiringa da 10 microlitri graduata in 0,1 microlitri.

Nota: altri tipi di colonne possono ugualmente permettere una buona separazione, in particolare la colonna capillare (FFAP, per esempio).

Il modo di operare descritto di seguito è dato a titolo di esempio.

3.3. Modo di operare

3.3.1. Preparazione del campione

In una provetta in vetro da circa 40 ml, dotata di tappo smerigliato, introdurre 20 ml di vino, aggiungere 2 ml di soluzione di standard interno (3.1.2) e 1 ml di soluzione diluita di acido solforico (3.1.3).

Dopo aver agitato capovolgendo più volte, aggiungere al contenuto della provetta 10 ml di etere etilico (3.1.1). Estrarre l'acido sorbico nella fase organica agitando la provetta per 5 minuti. Lasciar decantare.

3.3.2. Preparazione della soluzione di riferimento

Scegliere un vino il cui estratto in etere etilico dia un cromatogramma che non presenti alcun picco con tempo di ritenzione dell'acido sorbico; aggiungere a questo vino 100 mg/l di acido sorbico. Trattare 20 ml del campione così ottenuto secondo il modo di operare descritto al punto 3.3.1.

3.3.3. Cromatografia

Iniettare successivamente nel cromatografo con una microsiringa 2 µl della fase eterea ottenuta al punto 3.3.2 e 2 µl della fase eterea ottenuta al punto 3.3.1.

Registrare i rispettivi cromatogrammi; verificare che i rispettivi tempi di ritenzione dell'acido sorbico e dello standard interno siano identici. Misurare l'altezza (o la superficie) di ciascuno dei picchi ottenuti.

3.4. **Espressione dei risultati**

3.4.1. *Calcoli*

La concentrazione in acido sorbico del vino espressa in milligrammi per litro è uguale a:

$$100 \times (h/H) \times (l/i)$$

H = altezza del picco dell'acido sorbico nella soluzione di riferimento

h = altezza del picco dell'acido sorbico nel campione da analizzare

l = altezza del picco dello standard interno nella soluzione di riferimento

i = altezza del picco dello standard interno nel campione da analizzare

Nota: la concentrazione in acido sorbico può essere determinata nello stesso modo prendendo in considerazione la misura della superficie dei rispettivi picchi.

15 PH (OIV-AS-313-15-PH) — METODO DI TIPO I

1. PRINCIPIO

Misura della differenza di potenziale fra due elettrodi immersi nel liquido in esame. Uno degli elettrodi ha un potenziale che è una funzione definita del pH del liquido, mentre l'altro ha un potenziale fisso e noto e costituisce l'elettrodo di riferimento.

2. APPARECCHIATURA

2.1. **PHmetro a scala graduata in unità pH in modo da consentire misurazioni con un'approssimazione di almeno 0,05 unità.**2.2. **Elettrodi**

2.2.1. Elettrodo in vetro, da conservare in acqua distillata.

2.2.2. Elettrodo di riferimento a calomelano e cloruro di potassio saturo, conservati in una soluzione saturo di cloruro di potassio.

2.2.3. Oppure un elettrodo combinato da conservare in acqua distillata.

3. REAGENTI

3.1. **Soluzioni tampone**

3.1.1. Soluzione saturo di tartrato acido di potassio. Soluzione contenente almeno 5,7 g/l di tartrato acido di potassio ($C_4H_5KO_6$) a 20 °C. Tale soluzione può conservarsi fino a 2 mesi in presenza di 0,1 g di timolo per 200 ml.

$$\text{pH} \begin{cases} 3,57 \text{ to } 20 \text{ }^\circ\text{C} \\ 3,56 \text{ to } 25 \text{ }^\circ\text{C} \\ 3,55 \text{ to } 30 \text{ }^\circ\text{C} \end{cases}$$

3.1.2. Soluzione 0,05 M di ftalato acido di potassio. Soluzione contenente 10,211 g/l di ftalato acido di potassio ($C_8H_5KO_4$) a 20 °C. (Tempo massimo di conservazione: 2 mesi).

$$\text{pH} \begin{cases} 3,999 \text{ to } 15 \text{ }^\circ\text{C} \\ 4,003 \text{ to } 20 \text{ }^\circ\text{C} \\ 4,008 \text{ to } 25 \text{ }^\circ\text{C} \\ 4,015 \text{ to } 30 \text{ }^\circ\text{C} \end{cases}$$

3.1.3. Soluzione contenente:

Fosfato monopotassico, $KH_2 PO_4$	3,402 g
Fosfato dipotassico, $K_2 H PO_4$	4,354 g
Acqua q.b. a:	1 l

(Tempo massimo di conservazione: 2 mesi)

$$\text{pH} \begin{cases} 6,90 \text{ a } 15 \text{ }^\circ\text{C} \\ 6,88 \text{ a } 20 \text{ }^\circ\text{C} \\ 6,86 \text{ a } 25 \text{ }^\circ\text{C} \\ 6,85 \text{ a } 30 \text{ }^\circ\text{C} \end{cases}$$

Nota: possono essere impiegate anche le soluzioni tampone di riferimento reperibili in commercio.

4. MODO DI OPERARE

4.1 **Preparazione del campione**

4.1.1. *Mosto e vino*

Operare direttamente sul mosto o sul vino.

4.1.2. *Mosto concentrato rettificato*

Diluire il mosto concentrato rettificato con acqua per ottenere una concentrazione di $25 \pm 0,5$ % (m/m) in zuccheri totali (25°Brix).

Se P è il tenore percentuale (m/m) in zuccheri totali del mosto concentrato rettificato, pesare una quantità uguale a: $2\ 500/P$

e completare a 100 g con acqua. L'acqua utilizzata deve avere una conduttività inferiore a 2 microsiemens per centimetro.

4.2 **Azzeramento dell'apparecchio**

Prima di effettuare le misurazioni occorre azzerare l'apparecchio, seguendo le indicazioni date per l'apparecchio utilizzato.

4.3. **Taratura del pHmetro**

La taratura si effettua a 20 °C seguendo le indicazioni date per l'apparecchio utilizzato con le soluzioni tampone a pH 6,88 e 3,57 a 20 °C.

Utilizzare la soluzione tampone a pH 4,00 a 20 °C per controllare la calibratura della scala.

4.4. **Misura**

Immergere l'elettrodo nel campione da analizzare la cui temperatura dev'essere compresa fra 20 e 25 °C e il più possibile vicina a 20 °C. Leggere direttamente sulla scala il valore del pH.

Effettuare almeno due determinazioni sullo stesso campione.

Prendere come risultato la media aritmetica delle determinazioni.

5. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

Il pH del mosto, del vino o della soluzione al 25 % (m/m) (25°Brix) del mosto concentrato rettificato è espressa con 2 cifre decimali.

16 DOSAGGIO SIMULTANEO DELL'ACIDO L-ASCORBICO E DELL'ACIDO D-ISOASCORBICO MEDIANTE HPLC E RIVELAZIONE UV (OIV-AS-313-22-ACASCO) — METODO DI TIPO II

1. INTRODUZIONE

L'acido ascorbico è un antiossidante naturalmente presente in tutta una serie di alimenti. La quantità normale di acido ascorbico nell'uva diminuisce durante l'elaborazione dei mosti e nel corso della vinificazione. Può essere aggiunto, entro certi limiti, ai mosti e ai vini.

Il metodo di seguito descritto è stato convalidato in sede di prove interlaboratorio, mediante analisi di campioni di vino addizionati di 30 – 150 mg/l di acido L-ascorbico e di 10 – 100 mg/l di acido D-isoascorbico.

2. CAMPO DI APPLICAZIONE

Questo metodo è adatto al dosaggio simultaneo dell'acido L-ascorbico e dell'acido D-isoascorbico (acido eritorbico) nel vino mediante cromatografia liquida ad alta risoluzione e rivelazione UV in una gamma da 3 a 150 mg/l.

Per tassi superiori a 150 mg/l è necessario diluire il campione.

3. PRINCIPIO

I campioni vengono iniettati direttamente nel sistema HPLC previa filtrazione con membrana. Gli analiti sono separati su colonna a fase inversa e sottoposti a rivelazione UV a 266 nm. Il dosaggio dell'acido L-ascorbico e dell'acido D-isoascorbico viene effettuato rispetto ad uno standard esterno.

Nota: Le colonne e le condizioni operative sono riportate come esempio. Può essere ottenuta una buona separazione anche con altri tipi di colonne.

4. REAGENTI E MATERIALI

4.1 Reagenti

4.1.1 n-ottilammina, purezza $\geq 99,0\%$

4.1.2 Acetato di sodio $\times 3 H_2O$, purezza $\geq 99\%$

4.1.3 Acido acetico puro al 100 %

4.1.4 Acido fosforico al 25 % cca

4.1.5 Acido ossalico, purezza $\geq 99,0\%$

4.1.6 Ascorbato ossidasi

4.1.7 acido L-ascorbico ultra $\geq 99,5\%$

4.1.8 Acido D-isoascorbico, purezza $\geq 99,0\%$

4.1.9 Acqua bidistillata

4.1.10 Metanolo p.A. 99,8 %

4.2 Preparazione della fase mobile

4.2.1 Soluzioni per la fase mobile

Preparare le seguenti soluzioni per la fase mobile:

4.2.1.1 12,93 g di n-ottilammina in 100 ml di metanolo

4.2.1.2 68,05 g di acetato di sodio $\times 3 H_2O$ in 500 ml di acqua bidistillata

4.2.1.3 12,01 g di acido acetico puro in 200 ml di acqua bidistillata

4.2.1.4 Soluzione tampone (pH 5,4): 430 ml di soluzione di acetato di sodio (4.2.1.2) e 70 ml di soluzione di acido acetico (4.2.1.3)

4.2.2 Preparazione della fase mobile

Aggiungere 5 ml di soluzione di n-ottilammina (4.2.1.1) a 400 ml circa di acqua bidistillata in un becher. Regolare il pH di questa soluzione a 5,4 - 5,6 aggiungendo acido fosforico al 25 % (4.1.4) goccia a goccia. Aggiungere 50 ml della soluzione tampone (4.2.1.4) e travasare il composto in un matraccio da 1 000 ml e portare a livello con acqua bidistillata. Prima dell'uso la fase mobile deve essere filtrata mediante una membrana (cellulosa rigenerata da 0,2 µm) e possibilmente degassificata con elio (per circa 10 minuti) secondo quanto richiesto dal sistema HPLC utilizzato.

4.3 Preparazione della soluzione standard

Nota:

Tutte le soluzioni standard (soluzione madre 4.3.1 e soluzioni di lavoro 4.3.2) devono essere preparate il giorno stesso e preferibilmente conservate in frigorifero prima dell'iniezione.

4.3.1 Preparazione della soluzione madre (1 mg/ml)

Preparare una soluzione acquosa di acido ossalico al 2 % ed eliminare l'ossigeno disciolto con gorgogliamento all'azoto.

Pesare 100 mg esatti rispettivamente di acido L-ascorbico e di acido D-isoascorbico in un matraccio da 100 ml e portarlo a livello con la soluzione acquosa di acido ossalico al 2 %.

4.3.2 Preparazione delle soluzioni di lavoro

Per le soluzioni di lavoro diluire la soluzione madre (4.3.1) alle concentrazioni necessarie mediante la soluzione di acido ossalico al 2 %. Si raccomandano concentrazioni tra 10 mg/l e 120 mg/l. Ad esempio, 100 µl, 200 µl, 400 µl, 800 µl, 1 200 µl fino a 10 ml, corrispondono a 10, 20, 40, 80 e 120 mg/l.

5. APPARECCHIATURA

Normale apparecchiatura di laboratorio, in particolare:

5.1 Pompa HPLC

5.2 Iniettore loop da 20 µl

5.3 Rivelatore UV

6. CAMPIONATURA

Prima dell'iniezione, filtrare i campioni di vino con una membrana porosa da 0,2 µm.

Per tassi superiori a 150 mg/l è necessario diluire il campione.

7. MODO DI OPERARE

7.1 Condizioni operative del sistema HPLC

Iniettare 20 µl del campione filtrato con la membrana nell'apparecchiatura cromatografica.

Precolonna: p. es. Nucleosil 120 C18 (4 cm × 4 mm × 7 µm)

Colonna: p. es. Nucleosil 120 C18 (25 cm × 4 mm × 7 µm)

Volume di iniezione: 20 µl

Fase mobile: si veda 4.2.2, isocratica

Velocità: 1 ml/min

Rivelatore UV: 266 nm

Ciclo di risciacquo: almeno 30 ml di acqua bidistillata seguiti da 30 ml di metanolo e 30 ml di acetoni-trile

7.2 Individuazione/Conferma

L'individuazione dei picchi viene effettuata mediante comparazione dei tempi di ritenzione tra standard e campioni. Con il sistema cromatografico descritto come esempio, i tempi di ritenzione sono rispettivamente 7,7 min. per l'acido L-ascorbico e 8,3 min. per l'acido D-isoascorbico (si veda figura 1, cromatogramma A).

Per un'ulteriore conferma degli esiti positivi, questi campioni dovranno essere trattati con una spatula d'ascorbato ossidasi e misurati nuovamente (si veda figura 1, cromatogramma B).

A causa della degradazione dell'acido L-ascorbico e dell'acido D-isoascorbico causato dall'ascorbato ossidasi, non dovrebbero essere rilevati picchi al tempo di ritenzione dell'acido L-ascorbico e dell'acido D-isoascorbico. Se vengono rivelati picchi d'interferenza, la loro area di picco dovrà essere tenuta in conto per il calcolo della concentrazione degli analiti.

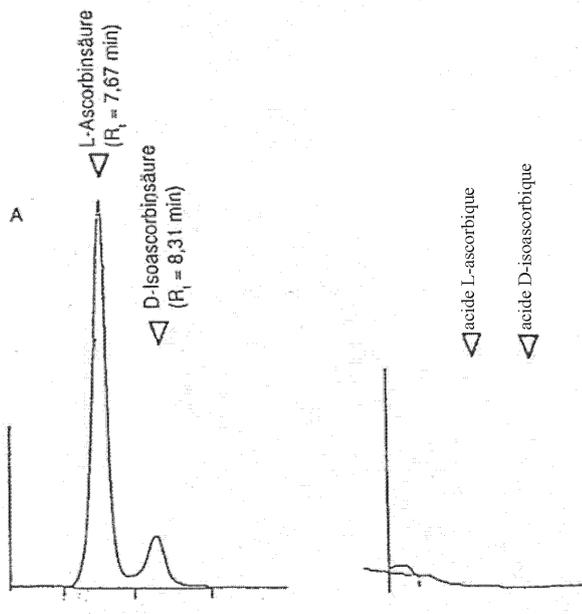


Figura 1

Esempio di cromatogramma di un vino bianco: A prima del trattamento all'ascorbato ossidasi; B dopo trattamento

Nota: si raccomanda di analizzare i campioni trattati con ascorbato ossidasi al termine di una sequenza seguita dal ciclo di risciacquo per rimuovere dalla colonna l'ascorbato ossidasi rimanente. In caso contrario, l'acido L-ascorbico e l'acido D-isoascorbico possono essere convertiti dall'ascorbato ossidasi rimanente durante la misurazione HPLC e il risultato potrebbe essere alterato.

8. CALCOLI

Preparare una curva di taratura a partire dalle soluzioni di lavoro (4.3.2). Seguendo il metodo degli standard esterni, la quantificazione dell'acido L-ascorbico e dell'acido D-isoascorbico è eseguita mediante misurazione delle aree di picco e comparazione alla concentrazione corrispondente nella curva di taratura.

Espressione dei risultati

I risultati sono espressi in mg/l rispettivamente di acido L-ascorbico e di acido D-isoascorbico con un decimale (p. es. 51,3 mg/l).

Per tassi superiori a 150 mg/l, tenere conto della diluizione.

9. FEDELTA'

Il metodo è stato testato mediante una prova collettiva condotta da 27 laboratori e organizzata dall'ex Ufficio federale di igiene pubblica (Bundesgesundheitsamt, Germania) nel 1994. Il programma della prova interlaboratorio ha seguito il § 35 della Legge tedesca sull'alimentazione che è stata accettata dall'OIV fino a quando non è stato introdotto il nuovo protocollo (OENO 6/2000).

Lo studio ha riguardato quattro campioni diversi di vino – due vini bianchi e due vini rossi – per ognuno dei quali sono state richieste cinque ripetizioni. Dato che non è stato possibile preparare campioni con sufficiente stabilità di analiti (diverse velocità di degradazione), si è deciso di inviare ai partecipanti quantità definite di sostanze standard pure insieme ai campioni di vino. È stato raccomandato ai laboratori di aggiungere gli standard nei campioni di vino e di analizzarli immediatamente. Sono stati analizzati quantitativi da 30 a 150 mg/l per l'acido L-ascorbico e da 10 a 100 mg/l per l'acido D-isoascorbico. Nell'ALLEGATO pubblicato dall'OIV sono riportati in dettaglio i risultati dello studio. La valutazione è stata compiuta secondo la norma DIN/ISO 5725 (versione 1988).

Le deviazioni standard di ripetibilità e di riproducibilità sono state correlate alle concentrazioni di acido L-ascorbico e di acido D-isoascorbico. Il parametro di precisione reale può essere calcolato mediante le seguenti equazioni:

Acido L-ascorbico

$$s_r = 0,011 x + 0,31$$

$$s_R = 0,064 x + 1,39$$

x: concentrazione di acido L-ascorbico (mg/l)

Acido D-isoascorbico

$$s_r = 0,014 x + 0,31$$

$$s_R = 0,079 x + 1,29$$

x: concentrazione di acido D-isoascorbico (mg/l)

Esempio:

Acido D-isoascorbico 50 mg/l $s_r = 1,0$ mg/l

$$s_R = 5,2 \text{ mg/L}$$

10. ALTRE CARATTERISTICHE DELL'ANALISI

10.1. Limite di rivelazione

Il limite di rivelazione di questo metodo è stimato a 3 mg/l per l'acido L-ascorbico e l'acido D-isoascorbico.

10.2. Esattezza

Il recupero medio calcolato mediante la prova interlaboratorio su quattro campioni (vedi ALLEGATO pubblicato nella Raccolta dell'OIV) è stato:

— 100,6 % per l'acido L-ascorbico

— 103,3 % per l'acido D-isoascorbico

17 ANIDRIDE CARBONICA (OIV - AS-314-01-DIOCAR) — METODO DI TIPO II

1. PRINCIPIO DEL METODO

1.1. **Vini tranquilli (sovrappressione $\text{CO}_2 \leq 0,5 \times 10^5 \text{ Pa}$) ⁽¹⁾**

Il volume di vino prelevato dal campione, portato a temperatura prossima a 0 °C, viene versato in un eccesso di soluzione titolata di idrossido di sodio, sufficiente a portare il pH a 10-11. Si titola con una soluzione acida in presenza di anidrasi carbonica. Il contenuto in CO_2 viene ricavato dal volume di soluzione acida impiegato per passare da pH 8,6 (forma bicarbonato) a pH 4,0 (acido carbonico). Una titolazione di riferimento, effettuata nelle stesse condizioni sul vino privato di CO_2 , permette di tener conto del volume di soluzione di idrossido di sodio consumata dagli acidi del vino.

1.2. **Vini frizzanti e spumanti**

Il campione di vino da analizzare viene portato a temperatura prossima al suo punto di congelamento. Dopo prelievo di un dato volume, destinato a servire da riferimento dopo eliminazione di CO_2 , si alcalinizza il resto della bottiglia per fissare tutta l'anidride carbonica sotto forma di Na_2CO_3 . Si titola con una soluzione acida in presenza di anidrasi carbonica. Il tenore di CO_2 viene ricavato dal volume di soluzione acida impiegata per passare da pH 8,6 (forma bicarbonato) a pH 4,0 (acido carbonico). Una titolazione di riferimento, effettuata nelle stesse condizioni sul vino privato di CO_2 , permette di tener conto del volume di soluzione di idrossido di sodio consumata dagli acidi del vino.

2. DESCRIZIONE DEL METODO

2.1. **Vini tranquilli (sovrappressione dell'anidride carbonica $\leq 0,5 \times 10^5 \text{ Pa}$).**2.1.1. *Apparecchiatura*

2.1.1.1. Agitatore magnetico.

2.1.1.2. pHmetro.

2.1.2. *Reagenti*

2.1.2.1. Soluzione di idrossido di sodio (NaOH), 0,1 M.

2.1.2.2. Soluzione di acido solforico (H_2SO_4), 0,05 M.

2.1.2.3. Soluzione di anidrasi carbonica a 1 g/l.

2.1.3. *Modo di operare*

Raffreddare a temperatura prossima a 0 °C tanto il campione di vino quanto la pipetta da 10 ml destinata al suo prelievo.

In un becher da 100 ml versare 25 ml di soluzione d'idrossido di sodio (2.1.2.1); aggiungere due gocce di soluzione acquosa di anidrasi carbonica (2.1.2.3). Introdurre 10 ml di vino mediante la pipetta raffreddata a 0 °C.

Porre il becher sull'agitatore magnetico, collocare l'elettrodo e la barretta magnetica e procedere ad agitazione moderata.

Quando il liquido è tornato a temperatura ambiente, titolare lentamente con la soluzione di acido solforico (2.1.2.2) fino a pH 8,6.

Continuare l'aggiunta di acido solforico (2.1.2.2) fino a pH 4,0. Sia n ml il volume utilizzato fra pH 8,6 e 4,0.

Procedere quindi all'eliminazione della CO_2 su 50 ml di vino circa, agitando sotto vuoto per tre minuti e riscaldando il recipiente in bagnomaria a 25 °C circa.

Ripetere su 10 ml di vino privato di CO_2 le operazioni sopra descritte: sia n' ml il volume utilizzato.

2.1.4. *Espressione dei risultati*

1 ml di soluzione titolata di acido solforico 0,05 M corrisponde a 4,4 mg di CO_2 .

La quantità di CO_2 , espressa in g per litro di vino, è data dall'espressione:

$$0,44 (n - n')$$

ed è espressa con due cifre decimali.

Nota: Nel caso dei vini a basso contenuto di CO_2 ($\text{CO}_2 < 1 \text{ g/l}$), l'aggiunta di anidrasi carbonica per catalizzare l'idratazione di CO_2 non è necessaria.

⁽¹⁾ 10^5 pascal (Pa) = 1 bar.

2.2. Vini frizzanti e spumanti

2.2.1. Apparecchiatura

2.2.1.1. Agitatore magnetico.

2.2.1.2. pHmetro.

2.2.2. Reagenti

2.2.2.1. Soluzione di idrossido di sodio (NaOH), al 50 % (m/m).

2.2.2.2. Soluzione di acido solforico (H₂SO₄), 0,05 M.

2.2.2.3. Soluzione di anidrasi carbonica a 1 g/l.

2.2.3. Modo di operare

Sulla bottiglia di vino da analizzare, tracciare un segno di riferimento al livello del riempimento e raffreddare fino a congelamento incipiente.

Lasciare che la bottiglia si riscaldi leggermente, agitando di continuo, fino a scomparsa dei cristalli di ghiaccio. Stappare rapidamente, e mettere da parte, in un cilindro graduato, da 45 a 50 ml di vino, che serviranno al dosaggio di riferimento. Il volume esatto (v ml) di questo prelievo sarà determinato leggendo sul cilindro, dopo il suo ritorno alla temperatura ambiente.

Appena effettuato il prelievamento, aggiungere 20 ml di soluzione di idrossido di sodio (2.2.2.1) nella bottiglia se questa ha una capacità di 750 ml.

Attendere che il vino sia tornato a temperatura ambiente.

In un becher da 100 ml introdurre 30 ml di acqua distillata bollita e due gocce della soluzione di anidrasi carbonica (2.2.2.3). Aggiungere 10 ml di vino alcalinizzato.

Porre il becher sull'agitatore magnetico, introdurre l'elettrodo e la barretta magnetica e procedere ad agitazione moderata.

Titolare lentamente con la soluzione di acido solforico (2.2.2.2) fino a pH 8,6.

Continuare l'aggiunta di acido solforico (2.2.2.2) fino a pH 4,0. Sia n ml il volume utilizzato fra pH 8,6 e 4,0.

Procedere quindi all'eliminazione della CO₂ dai v ml di vino messi da parte per il dosaggio di riferimento, agitando sotto vuoto per tre minuti e riscaldando il recipiente su bagnomaria a 25 °C circa. Introdurre 10 ml di vino privato di CO₂ in 30 ml di acqua distillata bollita e aggiungere 2 - 3 gocce di soluzione di idrossido di sodio (2.2.2.1) per portare il pH a 10 - 11. Operare poi nel modo più sopra descritto. Sia n' ml il volume di acido solforico 0,05 M utilizzato.

2.2.4. Espressione dei risultati

1 ml della soluzione di acido solforico 0,05 M corrisponde a 4,4 mg di CO₂.

Vuotare la bottiglia del vino alcalinizzato in essa contenuto e determinare con l'approssimazione di 1 ml il volume iniziale del vino riempiendola con acqua fino al segno di riferimento: sia V ml.

La quantità di CO₂, espressa in grammi per litro di vino, è data dall'espressione:

$$0,44(n - n') \times ((V - v + 20)/(V - v))$$

ed è espressa con due cifre decimali.

2.3. Calcolo della sovrappressione teorica

La sovrappressione a 20 °C, Paph₂₀, espressa in pascal, è data dalla seguente formula:

$$Paph_{20} = ((Q)/(1,951 \times 10^{-5}(0,86 - 0,01 A)(1 - 0,00144 S))) - Patm$$

dove:

Q: tenore di CO₂ in g/l di vino

A: titolo alcolometrico del vino a 20 °C

S: tenore zuccherino in g/l di vino

Patm: pressione atmosferica espressa in pascal

18 DOSAGGIO DELL'ANIDRIDE CARBONICA NEL VINO CON IL METODO MANOMETRICO (OIV – AS-314-04-CO2MAN) — METODO DI TIPO II

(p.m.)

[La descrizione di questo metodo di analisi è sottoposta ad aggiornamento da parte dei responsabili dell'OIV e verrà prossimamente pubblicata in un'ulteriore comunicazione della Commissione non appena l'OIV avrà pubblicato il testo aggiornato nell'edizione 2010 della Raccolta dei metodi internazionali d'analisi]

19 MISURAZIONE DELLA SOVRAPPRESSIONE DEI VINI SPUMANTE E FRIZZANTI (OIV - AS-314-02-SURPRES) — METODO DI TIPO I

1. PRINCIPIO

Dopo la stabilizzazione termica e l'agitazione della bottiglia, misurare la sovrappressione con un afometro (strumento per misurare la pressione). La sovrappressione è espressa in pascal (Pa) (metodo di tipo I). Il metodo è applicabile anche ai vini spumanti e frizzanti gassificati.

2. APPARECCHIATURA

Lo strumento che consente di misurare la sovrappressione nelle bottiglie di vini spumanti o frizzanti si chiama afometro. La sua forma è diversa a seconda della chiusura della bottiglia (capsula metallica, tappo a corona, tappo di sughero o di plastica).

2.1. Per le bottiglie munite di capsula

Consta di tre parti (figura 1):

- la parte superiore (o vite porta ago) comprende un manometro, un anello di serraggio manuale, una vite senza fine che scorre nella parte media e un ago che attraversa la capsula. Nell'ago c'è un foro laterale che trasmette la pressione al manometro. Un giunto garantisce l'impermeabilità del sistema sulla capsula della bottiglia;
- la parte media (o dado) serve a centrare la parte superiore e si avvita nella parte inferiore in modo da mantenerla saldamente unita alla bottiglia;
- la parte inferiore (o staffa) è munita di un dente che si infila sotto l'adattatore della bottiglia, in modo da mantenere insieme il tutto. Esistono adattatori per ogni tipo di bottiglia.

2.2. Per le bottiglie munite di tappo

Consta di due parti (figura 2):

- la parte superiore è identica a quella dell'apparecchio precedente, ma l'ago è più lungo ed è formato da un tubo lungo e cavo, all'estremità del quale è posta una punta che aiuta ad attraversare il tappo. La punta è amovibile e cade nel vino una volta attraversato il tappo;
- la parte inferiore è formata dal dado e da una base che poggia sul tappo. Quest'ultima è munita di quattro viti di serraggio che servono a mantenere il tutto sul tappo.

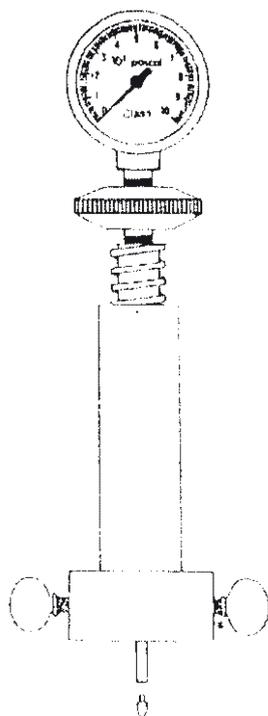


Figura 2: afometro per tappi

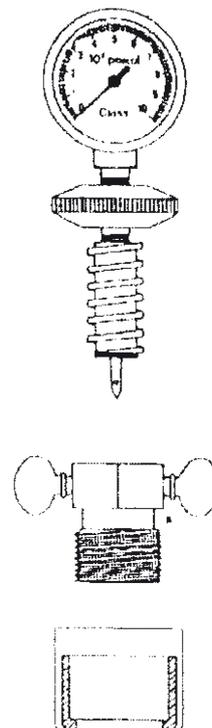


Figura 1: afometro per capsule

Osservazioni sui manometri che si trovano su questi due tipi di apparecchi:

- possono essere meccanici a tubo di Bourdon o digitali a trasduttore piezoelettrico. Nel primo caso il tubo di Bourdon deve essere obbligatoriamente di acciaio inossidabile;
- sono graduati in pascal (abbreviazione Pa). Per i vini spumanti è più pratico usare come unità il 10^5 pascal (10^5 Pa) o il kilopascal (kPa);
- ne esistono diverse classi. La classe di un manometro è data dalla precisione della lettura rispetto al fondo scala espressa in percentuale (ad esempio: «manometro 1 000 kPa classe 1» significa che il manometro ha una pressione di utilizzo massima di 1 000 kPa, lettura a ± 10 kPa). Per misure di precisione si raccomanda la classe 1.

3. MODO DI OPERARE

La misurazione deve essere effettuata su bottiglie la cui temperatura sia stabilizzata da almeno 24 ore. Dopo aver forato il tappo a corona, il tappo di sughero o il tappo di plastica, per effettuare la lettura occorre agitare vigorosamente la bottiglia sino a ottenere una pressione costante.

3.1. Bottiglie munite di capsula

Infilare il dente della staffa sotto l'adattatore della bottiglia. Avvitare il dado in modo che il tutto stringa la bottiglia. La parte superiore risulta così avvitata nel dado. Per evitare perdite di gas, la capsula deve essere forata il più rapidamente possibile in modo da portare il giunto a contatto con la capsula. Per effettuare la lettura occorre poi agitare vigorosamente la bottiglia sino a ottenere una pressione costante.

3.2. Bottiglie munite di tappo

Collocare una punta sull'estremità dell'ago e posizionare il tutto sul tappo; stringere le quattro viti sul tappo; avvitare la parte superiore (l'ago attraversa il tappo). La punta deve cadere nella bottiglia affinché la pressione possa essere trasmessa al manometro. Effettuare la lettura dopo avere agitato la bottiglia sino a ottenere una pressione costante. Recuperare la punta dopo la lettura.

4. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

La sovrappressione a 20 °C ($P_{ph_{20}}$) è espressa in pascal (Pa) o in kilopascal (kPa); deve essere coerente con la precisione del manometro (ad esempio: $6,3 \times 10^5$ Pa oppure 630 kPa e non $6,33 \times 10^5$ Pa o 633 kPa per un manometro di classe 1 e fondo scala 1 000 kPa).

Se la temperatura di misurazione è diversa da 20 °C, è opportuno correggerla moltiplicando la pressione misurata per il coefficiente riportato nella tabella 1.

Tabella 1

Rapporto tra la sovrappressione $P_{ph_{20}}$ di un vino frizzante o spumante a 20 °C e la sovrappressione P_{ph_t} a una temperatura t

°C		°C	
0	1,85	13	1,24
1	1,80	14	1,20
2	1,74	15	1,16
3	1,68	16	1,13
4	1,64	17	1,09
5	1,59	18	1,06
6	1,54	19	1,03
7	1,50	20	1,00
8	1,45	21	0,97
9	1,40	22	0,95
10	1,36	23	0,93
11	1,32	24	0,91
12	1,28	25	0,88

5. CONTROLLO DEI RISULTATI

Metodo di determinazione diretta di parametri fisici (metodo criterio di tipo I)

Verifica degli afrometri

Gli afrometri devono essere verificati periodicamente (almeno una volta l'anno).

La verifica è effettuata per mezzo di un banco di taratura che consente di confrontare il manometro da verificare con un manometro di riferimento di classe superiore, calibrato secondo gli standard nazionali, montato in parallelo. Il controllo è utilizzato per confrontare i valori indicati dai due apparecchi per pressioni crescenti e successivamente per pressioni decrescenti. Qualora venga riscontrata una differenza tra i due manometri, una vite di regolazione consente di effettuare le correzioni necessarie.

Tutti i laboratori e gli organismi autorizzati sono dotati di tali banchi di taratura, che sono disponibili anche presso i costruttori di manometri.

20 DOSAGGIO DEL LISOZIMA NEL VINO MEDIANTE HPLC (OIV-AS-315-14) — METODO DI TIPO IV**1. INTRODUZIONE**

È preferibile utilizzare un metodo analitico per il lisozima non basato sull'attività enzimatica.

2. CAMPO D'APPLICAZIONE

Questo metodo consente la quantificazione del lisozima (mg di proteina/l) presente in vini bianchi e rossi, indipendentemente dall'attività enzimatica (che potrebbe essere compromessa da parziale denaturazione o da fenomeni di complessazione e coprecipitazione) della matrice.

3. DEFINIZIONE

La cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC), presenta un approccio analitico basato sull'interazione di tipo sterico, polare o di adsorbimento fra la fase stazionaria e l'analita, quindi non legato all'effettiva attività enzimatica dimostrata dalla proteina.

4. PRINCIPIO

L'analisi è condotta mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) abbinando un rivelatore spettrofotometrico ad un rivelatore spettrofluorimetrico. Il contenuto ignoto nel campione di vino è calcolato in base all'area del picco cromatografico, utilizzando la metodologia dello standard esterno.

5. REAGENTI**5.1. Solventi e soluzioni**

Acetonitrile (CH₃CN) per analisi HPLC

Acido trifluoroacetico (TFA) puro

Acqua deionizzata per analisi HPLC

Soluzione standard: acido tartarico 1 g/l, alcol etilico 10 % v/v, portato a pH 3.2 con tartrato di potassio neutro

5.2. Eluenti

A: CH₃CN 1 %, TFA 0,2 %, H₂O= 98,8 %

B: CH₃CN 70 %, TFA 0,2 %, H₂O= 29,8 %

5.3. Soluzioni di riferimento

Da 1 a 250 mg/l di lisozima standard, disciolto in soluzione standard mediante agitazione continua per almeno 12 ore.

6. MATERIALE

6.1. Apparecchio HPLC dotato di sistema di pompaggio eluenti idoneo ad effettuare un'eluizione a gradiente

6.2. Alloggiamento colonna termostato (forno)

6.3. Rivelatore spettrofotometrico accoppiato a rivelatore spettrofluorimetrico

6.4. Loop, 20 µl

6.5. Colonna polimerica in fase inversa con gruppo funzionale fenile (diametro dei pori = 1 000 Å, limite di esclusione = 1 000 000 Da) Tosoh Bioscience TSK-gel Phenyl 5 PW RP 7,5 cm × 4,6 mm ID, a titolo di esempio

6.6. Precolonna dello stesso materiale della colonna, Tosoh Bioscience TSK-gel Phenyl 5PW RP Guardgel 1,5 cm × 3,2 mm ID, a titolo di esempio

7. PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

I campioni di vino sono acidificati con HCl (10 M) diluito a 1/10 e filtrati mediante filtro di poliammide i cui pori hanno un diametro di 0,22 µm, dopo 5 minuti dall'aggiunta. L'analisi cromatografica è condotta immediatamente dopo la filtrazione.

8. CONDIZIONI OPERATIVE

8.1. Flusso eluente: 1 ml/min

8.2. Temperatura della colonna: 30 °C

- 8.3. Rivelazione spettrofotometrica: 280 nm
- 8.4. Rivelazione spettrofluorimetrica: $\lambda_{ex} = 276$ nm; $\lambda_{em} = 345$ nm; incremento = 10
- 8.5. Programma del gradiente di eluizione

Tempo (min)	Sol A %	Sol B %	gradiente
0	100	0	
			isocratico
3	100	0	
			lineare
10	65	35	
			isocratico
15	65	35	
			lineare
27	40,5	59,5	
			lineare
29	0	100	
			isocratico
34	0	100	
			lineare
36	100	0	
			isocratico
40	100	0	

- 8.6. Tempo di ritenzione medio del lisozima: 25,50 minuti

9. CALCOLI

Sono analizzate in triplo le soluzioni di riferimento contenenti le seguenti concentrazioni di lisozima: 1; 5; 10; 50; 100; 200; 250 mg/l. Per ciascun cromatogramma, le aree del picco corrispondente al lisozima sono riportate su un diagramma in funzione delle rispettive concentrazioni, allo scopo di ottenere le rette di regressione lineare espresse dalla formula $Y = ax+b$. Il coefficiente di determinazione r^2 dovrà essere $> 0,999$.

10. CARATTERISTICHE DEL METODO

Con l'obiettivo di valutare l'adeguatezza del metodo allo scopo previsto, è stato eseguito uno studio di validazione, prendendo in considerazione la linearità, i limiti di rilevabilità e di quantificazione, nonché l'accuratezza del metodo. Quest'ultimo parametro è stato determinato mediante la definizione del livello di precisione e di esattezza del metodo.

	Gamma di linearità (mg/l)	Pendenza della retta	Coefficiente di determinazione (r^2)	LD (mg/l)	LQ (mg/l)	Ripetibilità (n=5) RSD %			Riproducibilità (n=5) RSD %
						Std ¹	R.W. ²	W.W. ³	Std ¹
UV	5-250	3,786	0,9993	1,86	6,20	4,67	5,54	0,62	1,93
FLD	1-250	52,037	0,9990	0,18	0,59	2,61	2,37	0,68	2,30

Tabella 1: dati relativi alla validazione del metodo: Std.¹ soluzione standard; V.R.² vino rosso; V.B.³ vino bianco

10.1. Linearità del metodo

Sulla base dei risultati ottenuti dall'analisi di regressione lineare, il metodo è risultato lineare nelle gamme riportate nella tabella 1.

10.2. Limite di rilevabilità e di quantificazione

Il limite di rilevabilità (LR) ed il limite di quantificazione (LQ) sono stati calcolati come il segnale equivalente a rispettivamente 3 e 10 volte il rumore di fondo cromatografico in condizioni di lavoro su matrice reale (tabella 1).

10.3. Precisione del metodo

I parametri presi in considerazione sono stati la ripetibilità e la riproducibilità. Nella tabella 1 sono riportati i valori di tali parametri (espressi come deviazione standard % di misure ripetute a diverse concentrazioni) riscontrati su soluzione standard, su vino bianco e su vino rosso.

10.4. Esattezza del metodo

È stato calcolato il recupero percentuale sulle soluzioni standard contenenti 5 e 50 mg/l di lisozima, aggiunte di quantità note di lisozima, come indicato nella tabella seguente.

	[C] iniziale nominale (mg/l)	Aggiunta (mg/l)	[C] theoretical (mg/l)	[C] found (mg/l)	Deviazione standard	Recupero %
UV 280 nm	50	13,1	63,1	62,3	3,86	99
FD	50	13,1	63,1	64,5	5,36	102
UV 280 nm	5	14,4	19,4	17,9	1,49	92,1
FD	5	14,4	19,4	19,0	1,61	97,7

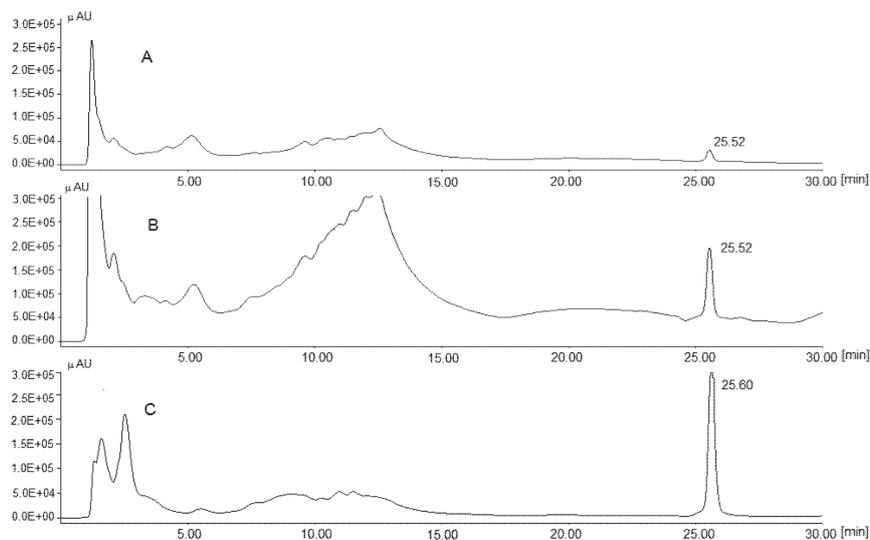


Fig. 1 Cromatogrammi di vino rosso aggiunto di lisozima puro (una soluzione standard contenente 1 000 mg/l di lisozima è stata aggiunta al vino per ottenere una concentrazione finale di 125 mg/l di lisozima). A: rivelatore UV a 280 nm; B: rivelatore UV a 225 nm; C: rivelatore FLD (λ ex 276 nm; λ em 345 nm).

21 SOLFATI (OIV- AS-321-05-SULFAT) — METODO DI TIPO II

1. PRINCIPIO DEI METODI

1.1. **Metodo di riferimento**

Precipitazione del solfato di bario e pesata. Il fosfato di bario precipitato nelle stesse condizioni viene eliminato mediante lavaggio del precipitato con acido cloridrico.

Nel caso dei mosti o dei vini ricchi di anidride solforosa, è necessaria una desolfitazione preliminare mediante ebollizione al riparo dall'aria.

1.2. **Metodo rapido di prova**

Classificazione dei vini in diverse categorie mediante un metodo detto dei limiti, basato sulla precipitazione del solfato di bario mediante una soluzione titolata di ione bario.

2. METODO DI RIFERIMENTO

2.1. **Reagenti**

2.1.1. Acido cloridrico in soluzione 2 M.

2.1.2. Cloruro di bario in soluzione di 200 g/l di $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

2.2. **Modo di operare**2.2.1. *Caso generale*

In una provetta da centrifuga da 50 ml introdurre 40 ml di campione da analizzare; aggiungere 2 ml di acido cloridrico 2 M e 2 ml di soluzione di cloruro di bario di 200 g/l; agitare con una bacchetta di vetro; risciacquare la bacchetta con poca acqua distillata e lasciare a riposo per 5 minuti. Centrifugare per 5 minuti, poi decantare con precauzione il liquido surnatante.

Lavare quindi il precipitato di solfato di bario procedendo come segue: aggiungere 10 ml di acido cloridrico 2 M, mettere il precipitato in sospensione e centrifugare per 5 minuti. Separare con precauzione il liquido surnatante. Ripetere due volte il lavaggio del precipitato nelle stesse condizioni con 15 ml di acqua distillata ogni volta.

Travasare quantitativamente lavando con acqua distillata il precipitato in una capsula di platino tarata e sistemarla su un bagnomaria a 100 °C fino a evaporazione a secco. Il precipitato essiccato viene calcinato parecchie volte brevemente su fiamma fino a ottenimento di un residuo bianco. Lasciar raffreddare in un essiccatore e pesare.

Sia m la massa in milligrammi di solfato di bario ottenuta.

2.2.2. *Caso particolare: mosti solfitati e vino a elevato tenore di anidride solforosa*

Procedere in primo luogo all'eliminazione dell'anidride solforosa.

In una beuta da 500 ml munita di imbuto separatore e di tubo di scarico introdurre 25 ml d'acqua e 1 ml di acido cloridrico ($\rho_{20} = 1,15 - 1,18$ g/ml). Far bollire questa soluzione per eliminare l'aria e introdurre 100 ml di vino attraverso l'imbuto separatore, mantenendo l'ebollizione. Continuare l'ebollizione finché il volume del liquido contenuto nella beuta viene ridotto a circa 75 ml e travasarlo quantitativamente, previo raffreddamento, in un matraccio da 100 ml. Portare a volume con acqua. Procedere al dosaggio dei solfati su un'aliquota di 40 ml, come indicato al punto 2.2.1.

2.3. **Espressione dei risultati**2.3.1. *Calcoli*

Il tenore in solfati, espresso in milligrammi per litro di solfato di potassio, K_2SO_4 , è di:

$$18,67 \times m$$

Il tenore in solfati del mosto o del vino viene espresso in milligrammi per litro di solfato di potassio, senza decimali.

2.3.2. *Ripetibilità*

fino a 1 000 mg/l: $r = 27$ mg/l

circa 1 500 mg/l: $r = 41$ mg/l

2.3.3. *Riproducibilità*

fino a 1 000 mg/l: $R = 51$ mg/l

circa 1 500 mg/l: $R = 81$ mg/l

22 FERRO (OIV - AS-322-05-FER) — METODO DI TIPO IV

1. PRINCIPIO DEI METODI

METODO DI RIFERIMENTO

Il ferro viene dosato direttamente per spettrofotometria di assorbimento atomico previa opportuna diluizione del vino ed eliminazione dell'alcool.

METODO USUALE

Dopo mineralizzazione del vino mediante perossido di idrogeno, il ferro III viene portato allo stato di ferro II e viene quindi dosato grazie alla colorazione rossa che dà con l'ortofenantrolina.

2. METODO DI RIFERIMENTO

2.1. **Reagenti**

2.1.1. Soluzione di taratura concentrata di ferro III di 1 g/l.

Utilizzare una soluzione standard del tipo in commercio di 1 g/l. Tale soluzione può essere preparata sciogliendo 8,6341 g di solfato ferrico ammonico ($\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) in acqua distillata leggermente acidificata con acido cloridrico M e portando il volume ad 1 l.

2.1.2. Soluzione di taratura diluita di ferro di 100 mg/l.

2.2. **Apparecchiatura**

2.2.1. Evaporatore rotante con bagnomaria termostato.

2.2.2. Spettrofotometro di assorbimento atomico con un bruciatore alimentato ad aria/acetilene.

2.2.3. Lampada a catodo cavo al ferro.

2.3. **Modo di operare**2.3.1. *Preparazione del campione*

Eliminare l'alcol del vino per concentrazione del suo volume a circa la metà mediante un evaporatore rotativo (50-60 °C). Riportare al volume iniziale con acqua distillata.

Prima del dosaggio effettuare, se necessario, una diluizione.

2.3.2. *Taratura*

In cinque matracci da 100 ml, porre 1 - 2 - 3 - 4 - 5 ml della soluzione di ferro di 100 mg/l (2.1.2) e portare a 100 ml con acqua distillata. Le soluzioni preparate contengono rispettivamente 1 - 2 - 3 - 4 - 5 mg di ferro per litro.

Conservare queste soluzioni in flaconi di polietilene.

2.3.3. *Dosaggio*

Selezionare la lunghezza d'onda 248,3 nm, regolare lo zero della scala delle assorbanze con acqua bidistillata. Aspirare direttamente il campione diluito nel bruciatore dello spettrofotometro e dopo, una dopo l'altra, le soluzioni di taratura preparate in 2.3.2. Leggere le assorbanze. Effettuare le determinazioni in doppio.

2.4. **Espressione dei risultati**2.4.1. *Calcoli*

Tracciare la curva di variazione dell'assorbanza in funzione della concentrazione in ferro delle soluzioni di taratura. Riportare il valore medio delle assorbanze ottenute per il campione di vino diluito su tale curva e determinare la concentrazione in ferro C.

La concentrazione in ferro espressa in mg/l di vino, con una cifra decimale, è data da:

$$C \times F$$

F = fattore di diluizione.

23 RAME (OIV – AS-322-06) — METODO DI TIPO IV

1. PRINCIPIO DEL METODO

È basato sull'impiego della spettrofotometria di assorbimento atomico.

2. APPARECCHIATURA

2.1. Capsula di platino.

2.2. Spettrofotometro di assorbimento atomico.

2.3. Lampada a catodo cavo al rame.

2.4. Gas di alimentazione: aria/acetilene o protossido di azoto/acetilene.

3. REAGENTI

3.1. Rame metallo.

3.2. Acido nitrico concentrato 65 % (HNO₃, ρ₂₀ = 1,38 g/ml).

3.3. Acido nitrico diluito 1/2 (v/v).

3.4. **Soluzione di rame a 1 g/l**

Utilizzare una soluzione standard di rame del tipo in commercio, a 1 g/l. Questa soluzione può essere preparata pesando 1 000 g di rame metallico e trasferendo quantitativamente in un matraccio da 1 000 ml. Aggiungere acido nitrico diluito 1/2 (3.3) nella quantità esattamente necessaria a sciogliere il metallo e quindi 10 ml di acido nitrico concentrato (3.2); portare infine a volume con acqua bidistillata.

3.5. **Soluzione di rame a 100 mg/l**

Prelevare 10 ml della soluzione 3.4 e versarli in un matraccio da 100 ml portando a volume con acqua bidistillata.

4. MODO DI OPERARE

4.1. **Preparazione del campione e dosaggio del rame**

Prelevare 20 ml del campione e versarli in un matraccio da 100 ml portando a volume con acqua bidistillata. Modificare la diluizione se necessario.

Leggere allo spettrofotometro di assorbimento atomico l'assorbanza del campione diluito, sulla lunghezza d'onda di 324,8 nm, dopo aver regolato lo zero della scala delle assorbanze con acqua bidistillata. Se necessario preparare una diluizione appropriata con acqua bidistillata.

4.2. **Determinazione della curva di taratura**

Prelevare 0,5 - 1 - 2 ml della soluzione (3.5) (100 mg di rame per litro), porli in matracci da 100 ml portando a volume con acqua bidistillata; le soluzioni ottenute contengono rispettivamente 0,5 - 1 - 2 mg/l di rame. Tracciare la curva di taratura con i valori delle assorbanze di tali soluzioni, misurate come descritto al punto 4.1.

5. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

Riportare il valore dell'assorbanza letta per il campione di vino diluito sulla curva di taratura e rilevare la concentrazione C in mg/l.

Se F è il fattore di diluizione, il tenore in rame del vino, espresso in milligrammi per litro, è: $F \times C$.

Il valore è dato con due cifre decimali.

Note:

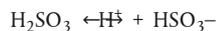
a) Le soluzioni per la determinazione della curva di taratura e le diluizioni del campione devono tuttavia essere scelte in funzione sia della sensibilità dell'apparecchiatura utilizzata che della concentrazione del rame presente nel campione.

- b) Per concentrazioni molto basse di rame nel campione in esame operare nel modo seguente: porre 100 ml del campione in una capsula di platino, evaporare su bagnomaria a 100 °C fino a consistenza sciropposa, aggiungere goccia a goccia 2,5 ml di acido nitrico concentrato (3.2) cercando di coprire tutto il fondo della capsula. Procedere cautamente all'incenerimento del residuo su piastra riscaldante elettrica oppure su piccola fiamma; introdurre quindi la capsula in forno a muffola regolato alla temperatura di 500 °C ± 25 °C, lasciandola per circa un'ora. Dopo raffreddamento umettare le ceneri con 1 ml di acido nitrico concentrato (3.2), spappolandole con una bacchetta di vetro; evaporare e carbonizzare nuovamente con le stesse modalità. Portare nuovamente la capsula in muffola per 15 minuti; ripetere almeno tre volte il trattamento con acido nitrico concentrato. Solubilizzare le ceneri aggiungendo nella capsula 1 ml di acido nitrico concentrato (3.2) e 2 ml di acqua bidistillata; travasare in un matraccio da 10 ml. Lavare tre volte la capsula con 2 ml per volta di acqua bidistillata, portare infine a volume con acqua bidistillata. Procedere al dosaggio come indicato al punto 4.1. utilizzando i 10 ml di soluzione e tenendo conto del fattore di concentrazione per l'espressione dei risultati.

24 ANIDRIDE SOLFOROSA (OIV - AS-323-04-DIOSU) — METODO DI TIPO II

1. DEFINIZIONI

Si chiama anidride solforosa l'anidride solforosa presente nel mosto o nel vino nelle forme seguenti: H_2SO_3 , H_2SO_3 il cui equilibrio dipende dal pH e dalla temperatura:



H_2SO_3 rappresenta l'anidride solforosa molecolare.

Si chiama anidride solforosa totale l'insieme delle varie forme di anidride solforosa presenti nel vino allo stato libero o combinato.

2. ANIDRIDE SOLFOROSA LIBERA E TOTALE

2.1. Principio dei metodi

2.1.1. Metodo di riferimento

2.1.1.1. Vini e mosti

L'anidride solforosa viene trascinata da una corrente di aria o di azoto e viene fissata ed ossidata per gorgogliamento in una soluzione diluita neutra di perossido di idrogeno. L'acido solforico formato viene dosato con una soluzione titolata di idrossido di sodio. L'anidride solforosa libera viene estratta dal vino per trascinamento a freddo (10 °C).

L'anidride solforosa totale viene estratta dal vino per trascinamento a caldo (100 °C circa).

2.1.1.2. Mosti concentrati rettificati

L'anidride solforosa totale è estratta per trascinamento a caldo (circa 100 °C) del mosto rettificato concentrato previamente diluito.

2.1.2. Metodo rapido (vini e mosti)

L'anidride solforosa libera viene dosata mediante titolazione iodometrica diretta.

Si dosa quindi l'anidride solforosa combinata mediante titolazione iodometrica effettuata dopo idrolisi alcalina. Sommandola all'anidride solforosa libera, si ottiene l'anidride solforosa totale.

2.2. Metodo di riferimento

2.2.1. Apparecchiatura

2.2.1.1. L'apparecchio utilizzato deve essere conforme allo schema qui riportato, in particolare per quanto riguarda il refrigerante.

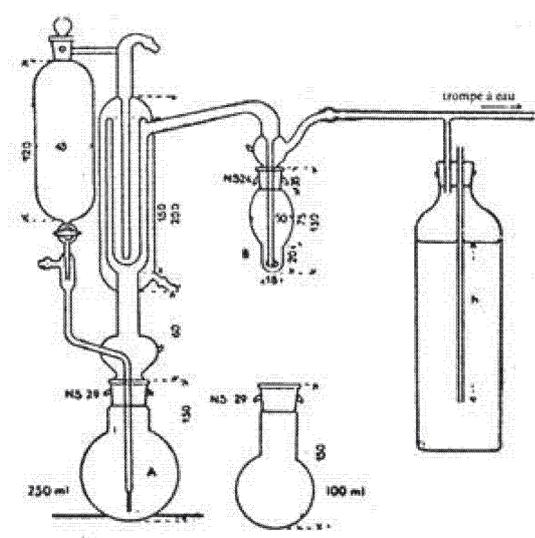


Figura 1

Le dimensioni sono riportate in millimetri. I diametri interni dei 4 tubi concentrici che costituiscono il refrigerante sono: 45, 34, 27 e 10 mm.

Il tubo di adduzione del gas nel gorgogliatore B termina con una sferetta dal diametro di 1 cm portante sulla circonferenza massima orizzontale 20 fori del diametro di 0,2 mm. Esso può ugualmente terminare con una piastra di vetro sinterizzato che assicuri la formazione di un elevato numero di bolle molto piccole che consentano di realizzare un buon contatto fra le fasi gassose e liquide.

Il flusso di gas attraverso l'apparecchio deve essere di circa 40 l/h. La bottiglia posta a destra dell'apparecchio ha lo scopo di limitare al valore di 20-30 cm di acqua la depressione prodotta dalla pompa a caduta d'acqua. Per poter regolare tale depressione in modo da avere un flusso corretto, è opportuno inserire fra il gorgogliatore e la bottiglia un flussimetro a tubo semicapillare.

2.2.1.2. Microburetta.

2.2.2. Reagenti

2.2.2.1. Acido fosforico all'85 % (H_3PO_4) ($\rho_{20} = 1,71$ g/ml).

2.2.2.2. Soluzione di perossido di idrogeno a 9,1 g di H_2O_2/l (3 volumi).

2.2.2.3. Reagente indicatore:

rosso di metile	100 mg
blu di metilene	50 mg
alcol a 50 % vol	100 ml

2.2.2.4. Soluzione di idrossido di sodio (NaOH), 0,01 M.

2.2.3. Dosaggio dell'anidride solforosa libera

2.2.3.1. Modo di operare

Prima del dosaggio il vino deve essere mantenuto per due giorni a 20 °C in una bottiglia piena e tappata.

— Porre nel gorgogliatore B da 2 a 3 ml di soluzione di perossido di idrogeno (2.2.2.2), 2 gocce di indicatore; neutralizzare quindi la soluzione di perossido di idrogeno con una soluzione 0,01 M di idrossido di sodio (2.2.2.4). Collegare il gorgogliatore all'apparecchiatura.

— Versare nel pallone A da 250 ml dell'apparecchio, 50 ml di campione e 15 ml di acido fosforico (2.2.2.1). Collegare il pallone con l'apparecchiatura.

— Fare quindi gorgogliare l'aria (o l'azoto) per 15 minuti. L'anidride solforosa libera trascinata viene ossidata ad acido solforico. Togliere il gorgogliatore dall'apparecchio e titolare l'acido formatosi con la soluzione di idrossido di sodio 0,01 M (2.2.2.4). Sia n il numero di millilitri utilizzati.

2.2.3.2. Espressione dei risultati

L'anidride solforosa libera è espressa in milligrammi per litro (mg/l) senza decimali.

2.2.3.2.1. CALCOLI

Anidride solforosa libera in mg/l: $6,4 n$.

2.2.4. Dosaggio dell'anidride solforosa totale

2.2.4.1. Modo di operare

2.2.4.1.1. Per i mosti concentrati rettificati, utilizzare la soluzione ottenuta diluendo il campione per l'analisi al 40 % (m/v) come indicato al punto 5.1.2 del capitolo «Acidità totale». Introdurre nel pallone A da 250 ml dell'apparecchio, 50 ml di tale soluzione e 5 ml di acido fosforico (2.2.2.1). Collegare il pallone con l'apparecchiatura.

2.2.4.1.2. Vini e mosti

Tenore presunto del campione ≤ 50 mg/l di SO_2 totale. Versare nel pallone A da 250 ml dell'apparecchio, 50 ml di campione e 15 ml di acido fosforico (2.2.2.1). Collegare il pallone con l'apparecchiatura.

Tenore presunto del campione ≥ 50 mg/l di SO_2 totale. Versare nel pallone A da 100 ml dell'apparecchio, 20 ml di campione e 5 ml di acido fosforico (2.2.2.1). Collegare il pallone con l'apparecchiatura.

Porre nel gorgogliatore B 2 × 3 ml di soluzione di perossido di idrogeno (2.2.2.2), neutralizzarla come sopra e portare il vino contenuto nel pallone A ad ebollizione per mezzo di una piccola fiamma alta 4-5 cm che deve lambire direttamente il fondo del pallone. Per evitare la piroschissione delle sostanze estrattive del vino sulle pareti del pallone, posarlo, anziché su una rete metallica, su un disco provvisto di un foro del diametro di 30 mm.

Mantenere l'ebollizione durante il passaggio della corrente d'aria (o di azoto). Entro 15 minuti l'anidride solforosa totale viene estratta ed ossidata. Dosare quindi l'acido solforico formatosi con la soluzione 0,01 M di idrossido di sodio (2.2.2.4).

Sia n il numero di millilitri utilizzati.

2.2.4.2. Espressione dei risultati

L'anidride solforosa totale è espressa in milligrammi/litro (mg/l) o in milligrammi/chilogrammo (mg/kg) di zuccheri totali senza cifre decimali.

2.2.4.2.1. Calcoli

— Vini e mosti

Anidride solforosa totale in milligrammi/litro.

— Campioni poveri di anidride solforosa (quantità di campione analizzata 50 ml):

$$6,4 \times n$$

— Altri campioni (quantità di campione analizzata 20 ml):

$$16 \times n$$

— Mosti concentrati rettificati

Anidride solforosa in milligrammi/chilogrammo di zuccheri totali (quantità di campione analizzata 50 ml, preparato come in 2.2.4.1.1):

$$(1,600 \times n)/P$$

tenore percentuale (m/m) in zuccheri totali

2.2.3.4.2. Ripetibilità (r)

Tenore < 50 mg/l (quantità di campione analizzata 50 ml), $r = 1$ mg/l

Tenore > 50 mg/l (quantità di campione analizzata 20 ml), $r = 6$ mg/l

2.2.3.4.3. Riproducibilità (R)

Tenore < 50 mg/l (quantità di campione analizzata 50 ml), $R = 9$ mg/l

Tenore > 50 mg/l (quantità di campione analizzata 20 ml), $R = 15$ mg/l
