

DOCUMENTO
TECNICO

**Valerio Carinci,
Antonietta Di Deo**

*Centro Enologico Meridionale -
Ortona (Chieti)*

DETERMINAZIONE SIMULTANEA DEI SOLFATI, CLORURI ED ACIDI ORGANICI NEI VINI

Nel presente lavoro viene determinato il contenuto degli anioni solfato, cloruro e degli acidi organici nei vini, mediante cromatografia ionica, tecnica alternativa sia a quelle tradizionali in HPLC, sia alle metodologie ufficiali. Tale metodo è facilmente estendibile alla determinazione di altri importanti acidi e anioni.

Introduzione

Per una matrice quale è il vino, non è sempre semplice la determinazione di importanti parametri chimici, spesso, infatti, i campioni devono essere pretrattati, decolorati, filtrati ecc.; questo fa sì che si allunghino enormemente i tempi di analisi, in contrapposizione ad una urgenza dei risultati analitici sempre più pressante. Si è pensato, quindi, di mettere a punto un nuovo metodo analitico per la determinazione in simulta-

nea di solfati, cloruri, acidi lattico, malico, tartarico e citrico, che non richiedesse alcun pretrattamento del campione, utilizzando una tecnica ormai consolidata: la cromatografia a scambio ionico (IC).

Il dosaggio degli acidi organici, utile per completare il panorama relativo alla composizione del vino ed alla sua genuinità, è importante nei processi fermentativi ove si formano numerosi composti acidi la cui quantificazione risulta fondamentale sia

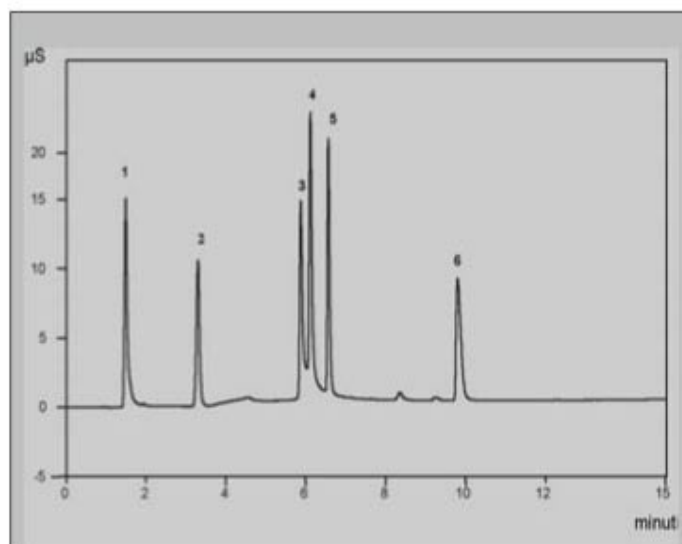
perché marker di processo nel caso di fermentazioni guidate (fermentazione malo-lattica), sia perché indice di qualità quando la fermentazione è indesiderata (formazione di acido D(-)Lattico). Il contenuto di solfati e cloruri è invece importante per valutare la rispondenza del prodotto ai requisiti di legge.

La tecnica IC permette la separazione di miscele di anioni e cationi utilizzando colonne cromatografiche riempite di resine ad oppor-



Tab. 1 - Profilo del gradiente

Tempo (min)	KOH (mM)
0,00 - 2,00	2
2,01 - 7,00	20
7,01 - 18,00	40
18,01 - 22,00	2
22,01 - 25,00	2

Fig. 1 - Profilo cromatografico della soluzione standard

1 Acido Lattico, 2 Cloruro, 3 Acido Malico, 4 Acido Tartarico, 5 Solfato, 6 Acido Citrico

tuno scambio ionico. Il rivelatore utilizzato è quello classico per le applicazioni di questo tipo: quello conduttometrico. Quest'ultimo, molto sensibile, universale nei confronti delle specie cariche e rispondente in modo prevedibile alle variazioni di concentrazione, ha sempre avuto come principale limitazione il fatto che la fase mobile, caratterizzata da elevati valori di conducibilità, tende a sommergere quella indotta dalla presenza degli ioni dell'analita, riducendo in modo drastico la sensibilità nelle determinazioni. Il problema è stato risolto grazie all'introduzione della soppressione ionica che è in grado di convertire in modo efficace gli ioni dell'eluente in specie molecolari scarsamente ionizzate prima che esse raggiungano il rivelatore, senza alterare, nel contempo, gli ioni dell'analita. Anche il

problema della carbonatazione degli eluenti (NaOH, KOH) è stato superato, automatizzando la preparazione degli stessi tramite cartucce di KOH che provvedono alla generazione degli ioni OH⁻ a concentrazioni variabili fino a 100 mM.

Materiali e metodi

Gli standard degli acidi L(+)-lattico, L(-)-malico, L(+)-tartarico e citrico sono stati acquistati dalla Sigma (St. Louis, MO, USA), il cloruro di sodio ed il solfato di potassio sono invece stati acquistati dalla Fluka (Buchs, CH), l'etanolo (per HPLC) è stato fornito dalla Carlo Erba Reagenti (Milano, Italia).

Le analisi sono state effettuate utilizzando un cromatografo ionico DX 600 (Dionex Corporation, Sunnyvale,

CA, USA) provvisto di pompa isocratica IP25, rivelatore elettrochimico in conducibilità ED50, autogeneratore di eluente EG40 (che permette la variazione della concentrazione dell'eluente anche durante la corsa analitica, eliminando la necessità di una pompa a gradiente), soppressore SRS ultra da 4 mm, autocampionatore AS50 munito di iniettore con loop da 25 µl, colonna AS11 250 x 4mm munita di precolumna IonPac AG11 4 x 50 mm (entrambe Dionex).

La corsa cromatografica con durata di 25 minuti è stata condotta a temperatura ambiente con un flusso pari a 1,5 ml/min, impostando la corrente sul soppressore a 100 mA ed utilizzando come fase eluente una soluzione di KOH a concentrazione variabile secondo il profilo riportato in Tab. 1.

La soluzione standard madre contenente la miscela degli analiti (acidi ed anioni) è stata preparata in soluzione idroalcolica al 10% e conservata a 4°C. Gli standard di calibrazione sono stati ottenuti diluendo opportunamente la madre con acqua deionizzata a conducibilità ≤ 2 µS/cm.

Al fine di determinare la linearità, l'accuratezza e la precisione del metodo, sono state costruite cinque curve di calibrazione indipendenti (per ciascun analita); la linearità è stata valutata calcolando il coefficiente di correlazione r², la precisione (CV%) e l'accuratezza (Acc%) del metodo sono state ottenute utilizzando le seguenti equazioni:

$$CV\% = SD / A_{STD} \times 100$$

dove:

CV% = coefficiente di variazione percentuale
SD = deviazione standard
A_{STD} = Area media dello standard

$$Acc\% = (C_{rSTD} - C_{nSTD}) / C_{nSTD}$$

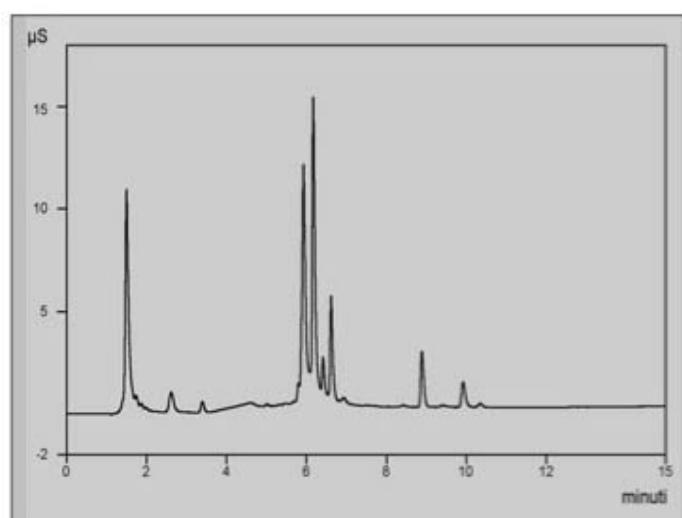
dove:

Acc% = Accuratezza percentuale



Tab. 2 - Equazioni delle rette di calibrazione e relativi coefficienti di correlazione (r^2)

Analita	LOD (mg/l)	LOQ (mg/l)	Equazione della retta	r^2
Acido lattico	0,625	2,50	$Y = 0,0456 x + 0,0655$	0,9935
Acido malico	0,625	2,50	$Y = 0,0431 x + 0,0252$	0,9970
Acido tartarico	0,625	2,50	$Y = 0,0548 x + 0,0754$	0,9987
Acido citrico	0,625	2,50	$Y = 0,0441 x + 0,0469$	0,9981
Ione cloruro	0,09	0,19	$Y = 0,1288 x + 0,0171$	0,9947
Ione solfato	0,75	1,50	$Y = 0,0790 x - 0,0052$	0,9997

Fig. 2 - Profilo cromatografico rappresentativo di un Trebbiano d'Abruzzo Doc 2002

$C_{r_{STD}}$ = Concentrazione ricalcolata dello standard
 $C_{n_{STD}}$ = Concentrazione nominale (o teorica) dello standard

Infine sono stati determinati il limite di rilevabilità (LOD) cioè quella concentrazione il cui picco non supera in altezza tre volte il rumore di fondo ed il limite di determinazione (LOQ) ovvero la più bassa concentrazione analitica determinabile con una precisione ed una accuratezza $\leq 20\%$.

Preparazione del campione

I vini da sottoporre ad analisi vengono diluiti con acqua deionizzata a bassa conducibilità, filtrati attraverso filtri di nylon con porosità 0,45 mm ed analizzati. Le diluizioni effettuate (solitamente intorno a 100) posso-

no variare a seconda della natura del vino.

Risultati e discussione

Il metodo di determinazione per IC, risulta lineare nel range 2,50 - 25,00 mg/l per gli acidi, tra 0,19 - 7,50 mg/l per i cloruri ed infine tra 1,50 - 15,00 mg/l per i solfati. I valori di r^2 ottenuti sono riportati nella Tab. 2 assieme alle equazioni delle rette di calibrazione ed ai valori del LOD e del LOQ. Gli altri parametri di validazione: accuratezza, precisione, sono riassunti nelle Tabb. 3 e 4.

Dai dati ottenuti si osserva che il metodo proposto è molto preciso, con un ottimo grado di accuratezza, molto sensibile ed offre un'ottima separazione cromatografica (Fig. 1).

Il metodo è stato applicato all'analisi di alcuni vini tipici della Regione Abruzzo, Figg. 2 e 3; è particolarmente interessante notare che anche per i vini con elevato corredo antocianico e polifenolico quale è ad esempio il Montepulciano, non si hanno interferenze di sorta nella quantificazione degli analiti, nonostante non venga effettuato alcun tipo di purificazione sul campione.

Conclusioni

Il metodo per la determinazione simultanea degli acidi organici e degli anioni solfato e cloruro, descritto, comporta l'utilizzo di quantità minime di campione e risulta affidabile, ripetibile, rapido, economico e facilmente applicabile per analisi di routine; si può sostituire, quindi, pienamente, sia alle metodologie ufficiali enzimatiche sia alle tradizionali tecniche HPLC che richiedono rispetto di rigidi protocolli o macchinose operazioni nella preparazione del campione.

Questo metodo può essere esteso anche alla quantificazione di altri importanti analiti presenti nel vino o aggiunti in modo fraudolento, quali ad esempio: acidi succinico, ascorbico e gli anioni nitrato e fosfato.

Summary

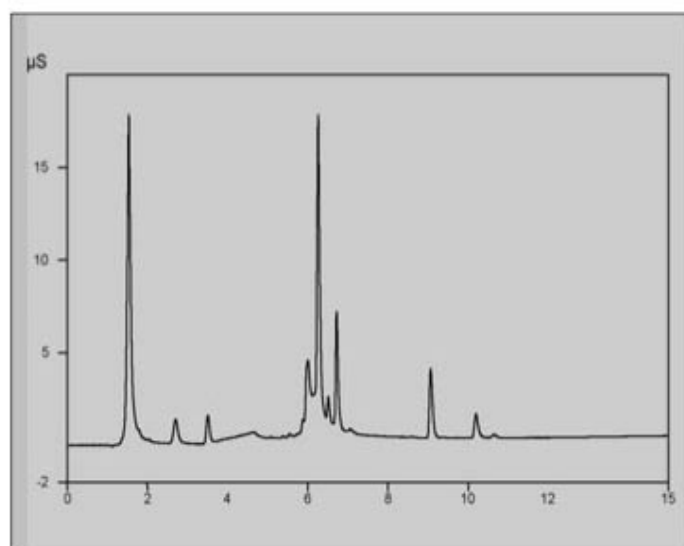
We describe a ion chromatography (IC) method for the qualitative and quantitative simultaneous determination of organic acids: lactic, ma-

Tab. 3 - Dati di precisione ed accuratezza relativi agli ioni cloruro e solfato (n=5)

Concentrazione nominale (mg/l)	Concentrazione media ricalcolata (mg/l)		Precisione CV%		Accuratezza Acc%	
	Ione Cloruro	Ione Solfato	Ione Cloruro	Ione Solfato	Ione Cloruro	Ione Solfato
0,19	0,16		19,62		-16,02	
0,375	0,345		10,08		-7,88	
0,75	0,67		8,83		-11,18	
1,50	1,47	1,49	1,30	1,75	-2,19	-0,76
3,00	2,98	2,95	0,07	0,88	-0,67	-2,07
3,75	4,17		0,51		11,09	
6,00		6,16		2,06		2,72
7,50	7,32	7,42	1,71	1,20	-2,42	-1,08
15,00		14,98		1,66		-0,10

Tab. 4 - Dati di precisione ed accuratezza relativi agli acidi organici (n=5)

Concentr. nominale (mg/l)	Concentrazione media ricalcolata (mg/l)				Precisione CV%				Accuratezza Acc%			
	Acido Lattico	Acido Malico	Acido Tartarico	Acido Citrico	Acido Lattico	Acido Malico	Acido Tartarico	Acido Citrico	Acido Lattico	Acido Malico	Acido Tartarico	Acido Citrico
2,50	2,19	2,12	2,39	2,20	5,19	18,78	16,74	6,37	-12,21	-15,27	-4,60	-12,07
5,00	4,65	4,64	5,09	5,00	2,86	13,74	2,69	3,63	-6,93	-7,24	-1,75	0,05
10,00	10,31	10,43	10,19	10,34	4,20	4,88	0,69	1,77	3,12	4,32	1,88	3,36
12,50	13,60	13,03	12,34	13,02	1,79	1,06	1,87	2,52	8,78	4,22	-1,28	4,20
25,00	24,29	24,57	25,02	24,66	3,04	0,39	1,15	1,01	2,82	-1,73	0,07	-1,37

Fig. 3 - Profilo cromatografico rappresentativo di un Montepulciano d'Abruzzo Doc 2002

lic, tartaric, citric and anions chloride and sulfate.

Samples were prepared simply by dilution with deionised water, and after filtration through a 0,45 µm pore size filter they were injected directly into the chromatography system.

Bibliografia

E. F. Lopez e E. F. Gomez "Simultaneous determination of the major organic acid, sugar, glycerol and ethanol by HPLC in grape musts and white wines" *J. Chromatogr. Sci.*, 34, 254, 1995

S. Cavalli e C. Sarzanini "La cromatografia ionica nell'analisi alimentare"

Dionex "Better solutions for food and beverage analysis" 2th Edition

J. Weiss "Ion chromatography" 2th Edition VCH

G. H. Jeffery, J. Bassett, J. Mendham e R. C. Denney "Analisi chimica quantitativa" Ambrosiana

D. A. Skoog, D. M. West e F. J. Holler "Analytical chemistry" 7th Edition

A. Polesello "Il cromatografo ionico IC Metrohm" Laboratorio 2000, Anno 10, n° 8

Reg. CEE 2676/90 del 17/09/1990 GU CEE L272 del 03/10/1990 Allegati 12, 11, 18, 21, 16, 17

Dionex "Food and beverage" Aprile 1997

F. De Sio, M. Grimaldi e R. Loiudice "Introduzione all'HPLC e metodi analitici per alimenti vegetali" Centrostampa

R.W. Yost, L.S. Etre e R.D. Conlon "Introduzione pratica alla cromatografia in fase liquida" 2th edizione Morgan edizioni tecniche