RESOLUCIÓN OIV-OENO 662H-2022

MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE LA RELACIÓN ISOTÓPICA $^{18}O/^{16}O$ DEL AGUA EN EL ZUMO DE UVA

Métodos de tipo IV

LA ASAMBLEA GENERAL,

VISTO el artículo 2, párrafo iv del Acuerdo del 3 de abril de 2001 por el que se crea la Organización Internacional de la Viña y el Vino,

A PROPUESTA de la Subcomisión "Métodos de Análisis",

CONSIDERANDO que, en el caso del zumo de uva, la determinación se podría lleva a cabo según el Método OIV-MA-AS2-12 del Compendio de Métodos Internacionales de Análisis de Vinos y Mostos, con las modificaciones que se detallan a continuación,

DECIDE incorporar el siguiente método:

MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE LA RELACIÓN ISOTÓPICA $^{18}O/^{16}O$ DEL AGUA EN EL ZUMO DE UVA

1. Ámbito de aplicación

Este método permite determinar la relación isotópica $^{18}O/^{16}O$ del agua en el zumo de uva, previamente equilibrado con CO_2, por espectrometría de masas de relaciones isotópicas.

2. Definiciones

La relación isotópica del oxígeno ($^{18}O/^{16}O$) se utiliza para detectar la adición de agua al zumo de uva.

3. Fundamento

El método se basa en el equilibrio que se establece entre el CO_2 y el agua presente en el zumo de uva, según la siguiente reacción de intercambio isotópico:

Certificado conforme Ensenada, 4 de noviembre de 2022
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea General
Pau ROCA

© OIV 2022

C16O2 + H218O ⇌ C16O18O + H216O

Alcanzado el equilibrio, se analiza el dióxido de carbono de la fase gaseosa mediante espectrometría de masas de relaciones isotópicas (IRMS) para determinar la relación isotópica $^{18}O/^{16}O$ del CO_2 procedente del equilibrio.

4. Reactivos y materiales

El instrumental y los materiales fungibles dependen del método elegido. En los sistemas habituales se utiliza CO_2 para inducir el equilibrio del agua presente en el zumo de uva.

Pueden utilizarse los siguientes materiales de referencia, patrones internos y materiales fungibles:

4.1. Materiales de referencia

Denominación	Organismo suministrador	$\delta^{18}O$ comparada con V-SMOW
VSMOW2	NIST/OIEA	0 ‰
GISP	NIST	−24,78 ‰
SLAP	NIST/OIEA	−55,5 ‰

4.2. Patrones internos

4.2.1. Dióxido de carbono para el equilibrado (o bien la mezcla de gases helio-dióxido de carbono, en el caso de los cilindros con sistema de flujo continuo).

4.2.2. Patrones internos con valores de $\delta^{18}O_{V\text{-}SMOW}$ calibrados frente a materiales de referencia internacionales.

4.3. Materiales fungibles

Certificado conforme Ensenada, 4 de noviembre de 2022
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea General
Pau ROCA

© OIV 2022

- Helio de calidad analítica (CAS 07440-59-7)
- Dióxido de carbono de calidad analítica, como gas de referencia (CAS 00124-38-9)

5. Equipo

El equipo y las interfaces dependen del método y se pueden utilizar como sigue:

5.1. Espectrómetro de masas de relaciones isotópicas (IRMS)

Espectrómetro de masas de relaciones isotópicas (IRMS) que permita determinar el contenido relativo de ^{18}O del CO_2 presente de forma natural, con una precisión interna del 0,05‰ o, preferiblemente, expresado en forma de valor relativo. El espectrómetro de masas de relaciones isotópicas suele disponer de tres colectores para medir simultáneamente las intensidades para m/z = 44, m/z = 45 y m/z = 46.

5.2. Instrumental y material auxiliar

Las características de los instrumentos y los materiales deben corresponder a las exigencias del método o del equipo utilizado (especificadas por el fabricante). No obstante, se pueden utilizar otros instrumentos o materiales que tengan las mismas prestaciones.

5.2.1. Frascos con septo adaptado al sistema empleado

5.2.2. Pipetas aforadas y conos adaptados

5.2.3. Sistema de control de la temperatura para que la reacción de intercambio isotópico se lleve a cabo a una temperatura constante (normalmente a ± 1°C)

5.2.4. Bomba de vacío (si el sistema lo requiere)

5.2.5. Muestreador automático (si el sistema lo requiere)

5.2.6. Jeringuillas para las muestras (si el sistema lo requiere)

5.2.7. Columna de cromatografía de gases para separar el CO_2 de gases elementales (si el sistema lo requiere)

Certificado conforme Ensenada, 4 de noviembre de 2022
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea General
Pau ROCA

© OIV 2022

5.2.8. Sistema de extracción de agua (p. ej., membrana permeable selectiva)

6. Preparación de las muestras

Las muestras de zumo y los materiales de referencia se utilizan para el análisis sin tratamiento previo. Se deben evitar posibles fermentaciones; para ello, añadir ácido benzoico (u algún otro inhibidor de la fermentación) o filtrar con un filtro de membrana con un tamaño de poro de 0,22 µm.

7. Procedimiento

A continuación, se describe cómo suele determinarse la relación isotópica $^{18}O/^{16}O$ induciendo el equilibrio en el agua con un patrón de CO_2 y posterior análisis mediante IRMS. Dado que existen diversos tipos de sistemas de equilibrado que difieren en su funcionamiento, pueden introducirse cambios en función del equipo y el instrumental del fabricante. Pueden utilizarse dos procedimientos técnicos principales para la introducción de CO_2 en el IRMS, ya sea a través de un sistema de doble entrada o un sistema de flujo continuo. Los sistemas y las condiciones analíticas se dan a modo de ejemplo.

Nota: Los volúmenes, temperaturas, presiones y tiempos se dan a título indicativo. Los valores adecuados deben buscarse en las especificaciones del fabricante o determinarse experimentalmente.

7.1. Equilibrio inducido manualmente

Con una pipeta, transferir una alícuota de la muestra o del patrón a un matraz.

Ajustar el matraz al colector.

Enfriar a menos de −80 °C para que se congelen las muestras (los colectores equipados con tubos capilares no requieren esta etapa de congelado). A continuación, se produce el vacío en todo el sistema. Una vez alcanzado un vacío estable, dejar que el patrón de CO_2 se distribuya en el interior de los matraces. Para inducir el equilibrio se utiliza un baño María a 25 °C ($\pm$ 1 °C) durante 12 horas (por la noche). Es muy importante que la temperatura del baño María se mantenga constante y homogénea.

Una vez terminado el proceso de equilibrado, transferir el CO_2 resultante de los matraces al lado de la muestra del sistema de doble entrada. Las mediciones se llevan a cabo comparando varias veces las relaciones isotópicas del CO_2 contenido en el lado de la muestra y en el lado del patrón (patrón de referencia de CO_2) del sistema de

Certificado conforme Ensenada, 4 de noviembre de 2022
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea General
Pau ROCA

© OIV 2022

doble entrada.

Repetir hasta que se hayan medido todas las muestras de la serie.

7.2. Equilibrio inducido automáticamente

Con una pipeta, transferir una alícuota de la muestra o del patrón a un frasco.

Los frascos de muestras se ajustan al aparato y se enfrían a menos de −80□°C para que se congelen las muestras (los sistemas equipados con tubos de apertura capilar no requieren esta etapa de congelado). A continuación, producir el vacío en todo el sistema.

Una vez alcanzado un vacío estable, se deja que el patrón de CO_2 se distribuya en los frascos. El equilibrio se alcanza a 22□°C $\pm$ 1□°C transcurridas 5 horas como mínimo y, a ser posible, con agitación suave. Dado que la duración del proceso depende de varios parámetros (por ejemplo, la forma del frasco, la temperatura y la agitación), el tiempo mínimo requerido ha de determinarse experimentalmente.

Una vez terminado el proceso, el CO_2 resultante se transfiere de los frascos al lado de la muestra del sistema de doble entrada. Las mediciones se llevan a cabo comparando varias veces las relaciones isotópicas del CO_2 contenido en el lado de la muestra y en el lado del patrón (patrón de referencia de CO_2) del sistema de doble entrada.

Repetir hasta que se hayan medido todas las muestras de la serie.

7.3. Preparación manual para equilibrado manual y automático y análisis con doble entrada IRMS

Introducir un volumen definido de muestra/patrón (ej. 200 µL) en un tubo de ensayo con ayuda de una pipeta. Los tubos de ensayo abiertos se colocan en una cámara cerrada que contiene el CO_2 utilizado para el equilibrado (4.2.1). Después de varias purgas para eliminar todo resto de aire, los tubos se cierran y se colocan en la bandeja con termostato del intercambiador de muestras. El equilibrado se alcanza después de al menos 8 horas a 40□°C. Una vez terminado el proceso de equilibrado, secar el CO_2 obtenido y transferir al lado de la muestra del sistema de doble entrada. Las mediciones se realizan comparando varias veces las relaciones isotópicas del CO_2 contenido en el lado de la muestra y en el lado del patrón (patrón de referencia de CO_2) del sistema de doble entrada.

Repetir hasta que se hayan medido todas las muestras de la serie

Certificado conforme Ensenada, 4 de noviembre de 2022
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea General
Pau ROCA

© OIV 2022

7.4. Equilibrio inducido automáticamente y con sistema de flujo continuo

Con una pipeta, transferir una alícuota de la muestra o del patrón a un frasco.

Disponer los frascos en una bandeja con control de temperatura.

Con una jeringa de gases, introducir en los frascos una mezcla de He y CO_2. El CO_2 se queda en la parte superior de los frascos.

La temperatura de trabajo y el tiempo de equilibrio deben buscarse en las especificaciones del fabricante y/o determinarse experimentalmente. El equilibrio se suele alcanzar transcurridas, como mínimo, 18 horas, normalmente a una temperatura de 25□°C ± 1□°C.

Una vez terminado el proceso, transferir el CO_2 obtenido al espectrómetro de masas mediante el sistema de flujo continuo.

También se utiliza el flujo continuo para introducir el patrón de CO_2. La medición se efectúa según el protocolo propio de cada espectrómetro.

8. Cálculos

Se registran las intensidades para m/z = 44, 45 y 46 de cada muestra y de cada material de referencia. El ordenador y el *software* del equipo de espectrometría de masas de relaciones isotópicas calculan las relaciones isotópicas ($^{18}O/^{16}O$). En la práctica, las relaciones isotópicas se cotejan con un patrón interno previamente comparado con el V□SMOW. Los cambios en las condiciones instrumentales pueden causar pequeñas variaciones en la medición *online*. Si esto ocurriera, se ha de corregir el valor de □^{18}O de las muestras teniendo en cuenta la diferencia entre el valor de □^{18}O del patrón interno y su valor asignado, previamente cotejado con el V□SMOW. La corrección que se aplica a los resultados es la variación entre dos mediciones del patrón interno. El patrón interno se intercala al principio y al final de cada serie. De este modo, se puede calcular la corrección para cada muestra por interpolación entre dos valores (la diferencia entre el valor asignado del patrón interno y los valores obtenidos).

$$\delta^{18}O_{V-SMOW} = \left[\frac{(\frac{^{18}O}{^{16}O})_{sample} - (\frac{^{18}O}{^{16}O})_{V-SMOW}}{(\frac{^{18}O}{^{16}O})_{V-SMOW}}\right] \times 1000[\%]$$

© OIV 2022

El valor de □^{18}O normalizado (V-SMOW/SLAP) se calcula con la fórmula siguiente:

$$\delta^{18}O_{V-SMOW/SLAP} = \left[\frac{\delta^{18}O_{échantillon} - \delta^{18}O_{V-SMOW}}{\delta^{18}O_{V-SMOW} - \delta^{18}O_{SLAP}}\right] \times 55{,}5[\%]$$

9. Características del método

Se llevó a cabo un estudio de validación para evaluar la adecuación del método a las matrices en cuestión. Se determinaron la linealidad, los límites de detección y cuantificación y la exactitud del método. La exactitud se determinó a partir de la precisión y la veracidad del método.

9.1. Precisión del método

Se tuvieron en cuenta la repetibilidad y la reproducibilidad intralaboratorio, cuyos valores figuran en la tabla 1. La repetibilidad se determinó como ‰ de mediciones repetidas en las mismas condiciones y el mismo día para todos los zumos de uva. La reproducibilidad se determinó como la media del ‰ de mediciones con una misma muestra de zumo de uva realizadas por dos operadores distintos.

9.2. Veracidad del método

El porcentaje de recuperación se determinó a partir de una muestra de zumo de uva con 6 cantidades distintas de agua del grifo (desde un 20□% a un 99,5□%). Cada concentración se analizó 5 veces. Para determinar la veracidad expresada como sesgo, se utilizó un material de referencia y se calculó el error relativo.

Table 1. Características del método

	Coeficiente de correlación (r^2)	Repetibilidad (n□=□16) ‰	Reproducibilidad (n□=□7) ‰	Recuperación (%) ± DS	Veracidad (MR) (‰)
	0,998	0,20	0,29	101□±□2,16	0,17

Certificado conforme Ensenada, 4 de noviembre de 2022
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea General
Pau ROCA

© OIV 2022

10. Bibliografía

1. OIV. Método de determinación de la relación isotópica $^{18}O/^{16}O$ del agua en vinos y mostos. Método OIV-MA-AS2-12.

Certificado conforme Ensenada, 4 de noviembre de 2022
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea General
Pau ROCA

© OIV 2022