RESOLUCIÓN OIV-OENO 665-2022

DETERMINACIÓN DE EDULCORANTES EN VINOS BLANCOS Y EN BEBIDAS A BASE DE VINO BLANCO POR CORMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN ACOPLADA A UN DETECTOR DE FOTODIODOS EN SERIE Y A UN DETECTOR DE AEROSOL CARGADO

LA ASAMBLEA GENERAL,

VISTO el artículo 2, párrafo 2 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”,

DECIDE completar el anexo A del Compendio de Métodos Internacionales de Análisis de Vinos y Mostos con el siguiente método:

Determinación de edulcorantes en vinos blancos y en bebidas a base de vino blanco por cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a un detector de fotodiodos en serie y a un detector de aerosol cargado

Método de tipo IV

1. Ámbito de aplicación

Este método permite determinar cinco edulcorantes artificiales (acesulfamo de potasio, aspartamo, sacarina, ciclamato de sodio y sucralosa) en vinos blancos (y bebidas a base de vino blanco), en concentraciones de hasta 50 mg/L para la sacarina, 125 mg/L para el acesulfamo de potasio y 250 mg/L para la sucralosa, el ciclamato de sodio y el aspartamo.

Para valores de concentración superiores, es preciso diluir la muestra.

Nota: Los antocianos impiden determinar estos edulcorantes en vinos rosados y tintos.

2. Fundamento

La determinación de los cinco edulcorantes se realiza por cromatografía de líquidos de alta resolución en columna C18 de fase inversa, acoplada a un detector de

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

© OIV 2022

fotodiodos en serie y a un detector de aerosol cargado, dispuestos en serie (HPLC/UV-CAD).

3. Reactivos y sustancias

3.1. Reactivos

3.1.1. Agua según la norma EN ISO 3696 o equivalente

3.1.2. Acesulfamo de potasio (pureza ≥ 99 %) (CAS 55589-62-3)

3.1.3. Aspartamo (pureza > 98 %) (CAS 22839-47-0)

3.1.4. Ciclamato de sodio (pureza ≥ 98 %) (CAS 139-05-9)

3.1.5. Sacarina, sal de sodio dihidratada (pureza ≥ 98 %) (CAS 6155-57-3)

3.1.6. Sucralosa (pureza ≥ 98 %) (CAS 56038-13-2)

3.1.7. Ácido fórmico (pureza ≥ 98 %) (CAS 64-18-6)

3.1.8. Bicarbonato de amonio (pureza ≥ 98 %) (CAS 1066-33-7)

3.1.9. Metanol para HPLC (pureza ≥ 99,9 %) (CAS 67-56-1)

3.1.10. Acetona para HPLC (pureza ≥ 99,8 %) (CAS 67-64-1)

3.2. Preparación de la solución amortiguadora

Preparar una solución amortiguadora con 0,4 g/L de bicarbonato de amonio (3.1.8) en agua (3.1.1) y ajustar el pH a 4,6 con ácido fórmico (3.1.7).
Esta solución puede conservarse durante un mes a temperatura ambiente.

4. Equipo

4.1. Material habitual de laboratorio

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

© OIV 2022

4.2. pHmetro

4.3. Agitador

4.4. Baño de ultrasonidos

4.5. Balanza analítica con una resolución de ± 0,1 mg

4.6. Matraces aforados de clase A

4.7. Filtros de jeringa 0,45 µm de celulosa regenerada (por ejemplo)

4.8. Columna C18 para HPLC (15 cm de longitud, 4,6 mm de diámetro interno, 5 µm)

4.9. Sistema cromatográfico compuesto por:

- un sistema de bombeo con un mínimo de tres vías,
- un muestreador termostatizado,
- un horno de columna,
- un detector de fotodiodos en serie o UV-visible,
- un detector de aerosol cargado (CAD),
- un sistema de adquisición de datos, integración y cálculo.

5. Procedimiento

5.1. Preparación de las muestras

Filtrar las muestras con filtros de jeringa antes de introducirlas en los viales,

si la concentración de la muestra es demasiado elevada, diluir con la solución amortiguadora para obtener una concentración comprendida en el intervalo de trabajo.

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. Preparación de las soluciones patrón

5.2.1. Preparación de la solución madre N3 (a modo de ejemplo)

En un matraz de 100□mL, introducir aproximadamente las siguientes cantidades, anotando el peso:

- 12,5 mg de acesulfamo de potasio (3.1.2),
- 25 mg de aspartamo (3.1.3),
- 25 mg de ciclamato de sodio (3.1.4),
- 5 mg de sacarina (3.1.5),
- 25 mg de sucralosa (3.1.6).

Disolver en unos 20□mL de agua/metanol (1:1) y enrasar con la solución amortiguadora. En caso necesario, someter a homogeneización ultrasónica.

Conservar esta solución N3 a entre 2□°C y 8□°C durante 6 meses como máximo.

5.2.2. Preparación de las soluciones de trabajo N2 y N1

Preparar dos niveles más a partir de la solución N3:

N2: solución N3 diluida 1/2. Por ejemplo, en un matraz de 20□mL, introducir 10□mL de N3 y enrasar con solución amortiguadora.

N1: solución N3 diluida 2/25. Por ejemplo, en un matraz de 25□mL, introducir 2□mL de N3 y enrasar con solución amortiguadora.

Filtrar las soluciones patrón con filtros de jeringa y poner los viales en el muestreador.

Tabla resumen de las soluciones patrón (a modo de ejemplo):

Edulcorantes	Solución madre (N3)			Solución de trabajo (N2)			Solución de trabajo (N1)		
	Pesada (mg)	Volumen del matraz	Concentración en mg/L	Volumen tomado de N3	Volumen del matraz	Concentración en mg/L	Volumen tomado de N3	Volumen del matraz	Concentración en mg/L

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

© OIV 2022

Acesulfamo de potasio	12,5	100□mL	125	10□mL	20□mL	62,5	2□mL	25□mL	10
Aspartamo	25		250			125			20
Ciclamato de sodio	25		250			125			20
Sacarina	5		50			25			4
Sucralosa	25		250			125			20

5.3. Condiciones cromatográficas

A continuación, se indican a modo de ejemplo las condiciones con las que se han obtenido los datos de eficacia que figuran en el anexo.

- Temperatura del horno de la columna: 30 °C
- Temperatura del muestreador: 20 °C
- Composición de la fase móvil (reactivos para HPLC):
  - Fase A: metanol (72 %)/sol. amortiguadora (25 %)/acetona (3 %)
  - Fase B: metanol (12 %)/sol. amortiguadora (88 %)
- Longitud de onda del detector UV: 210 nm
- Caudal: 1 mL/min
- Volumen de inyección: 10 µL
- Parámetros del CAD:
  - Filtro: 3,6
  - Frecuencia de adquisición de datos: 10 Hz
  - Temperatura: elevada (50 °C)
  - Factor de corrección (power function): de 0 a 13 min: 1,50; de 13 a 40 min: 1,48
- Gradiente de elución:

Tiempo (min)	Porcentaje de A	Porcentaje de B

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

© OIV 2022

0	0□%	100□%
4	0□%	100□%
11	53□%	47□%
18,5	82□%	18□%
25	82□%	18□%
27	100□%	0□%
31	100□%	0□%
32	0□%	100□%
40	0□%	100□%

Estabilizar durante el tiempo necesario la columna con la fase móvil B, y los detectores CAD y DAD.

6. Cálculos

Los resultados se calculan por calibración externa en función del área del pico de cada edulcorante y se expresan en mg/L, según la siguiente fórmula:

$$Concentración\ de\ la\ muestra\ (mg/L) = \left(\frac{A_m - Int}{P}\right) \times Dilución$$

Siendo A_m el área del pico de la muestra; *Int*, la ordenada en el origen de la curva de calibración; y *P*, la pendiente de la curva de calibración.

7. Expresión de los resultados

Cuando la concentración es <□10□mg/L, los resultados pueden expresarse en mg/L y con una cifra significativa después de la coma decimal.

Cuando la concentración es ≥□10□mg/L, los resultados pueden expresarse en mg/L y sin cifras decimales.

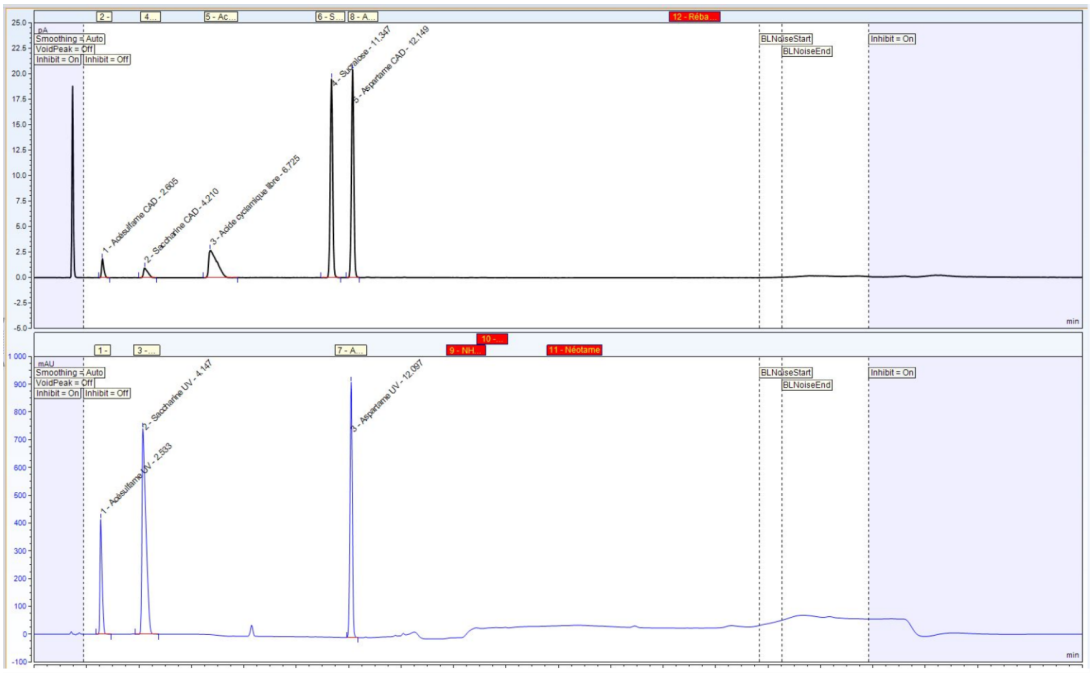
Certificado conforme Ensenada, 4 de noviembre de 2022
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea General
Pau ROCA

© OIV 2022

8. Bibliografía

1. Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV), Compendio de Métodos Internacionales de Análisis de Vinos y Mostos, vols. I y II, 2019.
2. NF EN 15911: Simultaneous determination of nine sweeteners by high performance liquid chromatography and evaporative light scattering detection in beverages and canned fruits.
3. ISO 3696: Agua para uso en análisis de laboratorio. Especificación y métodos de ensayo.
4. ISO 11352: Water quality. Estimation of measurement uncertainty based on validation and quality control data.

Anexo 1: Ejemplo de cromatograma de una solución patrón de nivel 3



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

© OIV 2022

Anexo 2: Ejemplo de validación interna

Se ha evaluado la eficacia del método y se ha llevado a cabo un estudio de validación interna para la matriz vino blanco y bebida a base de vino blanco.

Las características del método así obtenidas se resumen en la tabla siguiente:

Edulcorantes	Repetibilidad (%) (r%)	Reproducibilidad en el laboratorio (%) (R%)	Límite de detección seleccionado (mg/L)	Límite de cuantificación seleccionado (mg/L)	Intervalo de linealidad (mg/L)
Acesulfamo de potasio	2,5	8,5	2	5	5-125
Sacarina	1,7	6,8	1	2	2-50
Aspartamo	1,9	8,7	4	10	10-250
Ciclamato de sodio	5,5	12,8	4	10	10-250
Sucralosa	6,6	12,9	4	10	10-250

El límite de cuantificación seleccionado corresponde al nivel 1, que es el primer punto de la curva de calibración.

El límite de detección seleccionado corresponde a 1/3 del límite de cuantificación.

La linealidad se ha verificado mediante el análisis de 5 niveles de concentración para cada edulcorante a partir de 5 repeticiones por nivel en días diferentes.

La repetibilidad y reproductividad se obtuvieron mediante el análisis de cada edulcorante en cada tipo de matriz en 5 días diferentes con 2 repeticiones cada vez, estando en 3 niveles de concentración elegidos en el rango de linealidad del método.

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

© OIV 2022