



RESOLUCIÓN OIV-OENO 479-2017

DETERMINACIÓN DE LA RELACIÓN ISOTÓPICA $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ DE LA GLUCOSA, LA FRUCTOSA, EL GLICEROL Y EL ETANOL EN PRODUCTOS DE ORIGEN VITIVINÍCOLA POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE RELACIONES ISOTÓPICAS

LA ASAMBLEA GENERAL,

Visto el artículo 2 párrafo 2 iv del Acuerdo por el que se crea la Organización Internacional de la Viña y el Vino,

A propuesta de la Subcomisión “Métodos de Análisis”,

DECIDE, a propuesta de la Comisión II “Enología”, incorporar el siguiente método —de tipo II para la glucosa, la fructosa y el glicerol y de tipo III para el etanol— en el Compendio de Métodos Internacionales de Análisis de Vinos y Mostos:

Título	Tipo de método
DETERMINACIÓN DE LA RELACIÓN ISOTÓPICA $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ DE LA GLUCOSA, LA FRUCTOSA, EL GLICEROL Y EL ETANOL EN PRODUCTOS DE ORIGEN VITIVINÍCOLA POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE RELACIONES ISOTÓPICAS	II y III

1. Ámbito de aplicación

Este método se aplica a productos de origen vitivinícola.

Este método es:

- de tipo II para la glucosa, la fructosa y el glicerol,
- de tipo III para el etanol.

2. Fundamento

Tras su dilución y, si fuese necesario, filtración, las muestras se inyectan en el equipo de HPLC. La relación isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de los compuestos se determina, tras su oxidación en una interfase para

*Certificado conforme
Sofía, 2 de junio de 2017
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea general*

Jean-Marie AURAND

líquidos, por espectrometría de masas de relaciones isotópicas. Dicha interfase para líquidos, que se simboliza mediante el acrónimo “co”, produce la oxidación química de la materia orgánica a CO₂. El acoplamiento HPLC-co-IRMS permite determinar de forma simultánea las relaciones isotópicas de los siguientes compuestos: glucosa, fructosa, glicerol y etanol.

3. Reactivos

3.1 Agua pura para HPLC, resistividad > 18 MΩ cm

3.2 Persulfato de amonio de pureza analítica (N.º CAS: 7727-54-0)

3.3 Ácido ortofosfórico (concentración 85 %) de pureza analítica (N.º CAS: 7664-38-2)

3.4 Helio de grado analítico, se utiliza como gas portador (N.º CAS: 07440-59-7)

3.5 Gas de referencia: CO₂, dióxido de carbono de grado analítico, se utiliza como gas de referencia secundaria (N.º CAS: 00124-38-9).

3.6 Patrones internacionales

4. Material

4.1 Material normal de laboratorio

4.2 Equipo de cromatografía de líquidos de alta resolución

4.3 Interfase para líquidos para la oxidación de los compuestos eluidos

4.4 Espectrómetro de masas de relaciones isotópicas

*Certificado conforme
Sofía, 2 de junio de 2017
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea general*

Jean-Marie AURAND

5. Análisis de las muestras

5.1 Preparación de las muestras

Según la cantidad de azúcares, glicerol y etanol, las muestras se deben diluir previamente en agua (3.1) para obtener una concentración observable en condiciones experimentales. Según la concentración de los compuestos, podría ser necesario realizar dos medidas con diferentes diluciones.

5.2 Ejemplo de condiciones analíticas

Duración total del análisis: 20 minutos

El factor de dilución de los zumos de uva y vinos es del orden de 1/200, mientras que en el caso de los mostos concentrados es del orden de 1/500 (valores orientativos).

HPLC:

Columna: columna para carbohidratos (por ej.: Carbohydrate column 700 CH, HyperRez XP Carbohydrate H⁺)

Volumen a inyectar: 25 µL

Fase móvil: agua (3.1)

Caudal: 0,4 mL/min

Temp. columna: 80 °C

Interfase para líquidos:

Solución de persulfato de amonio (3.2) (15 % en masa) y ácido ortofosfórico (3.3) (2,5 % en volumen)

Caudal de la bomba peristáltica: 0,6 mL/min

Temperatura de calentamiento: 93 °C

Flujo de helio portador: 15 mL/min

Flujo de helio de secado: 50 mL/min

*Certificado conforme
Sofía, 2 de junio de 2017
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea general*

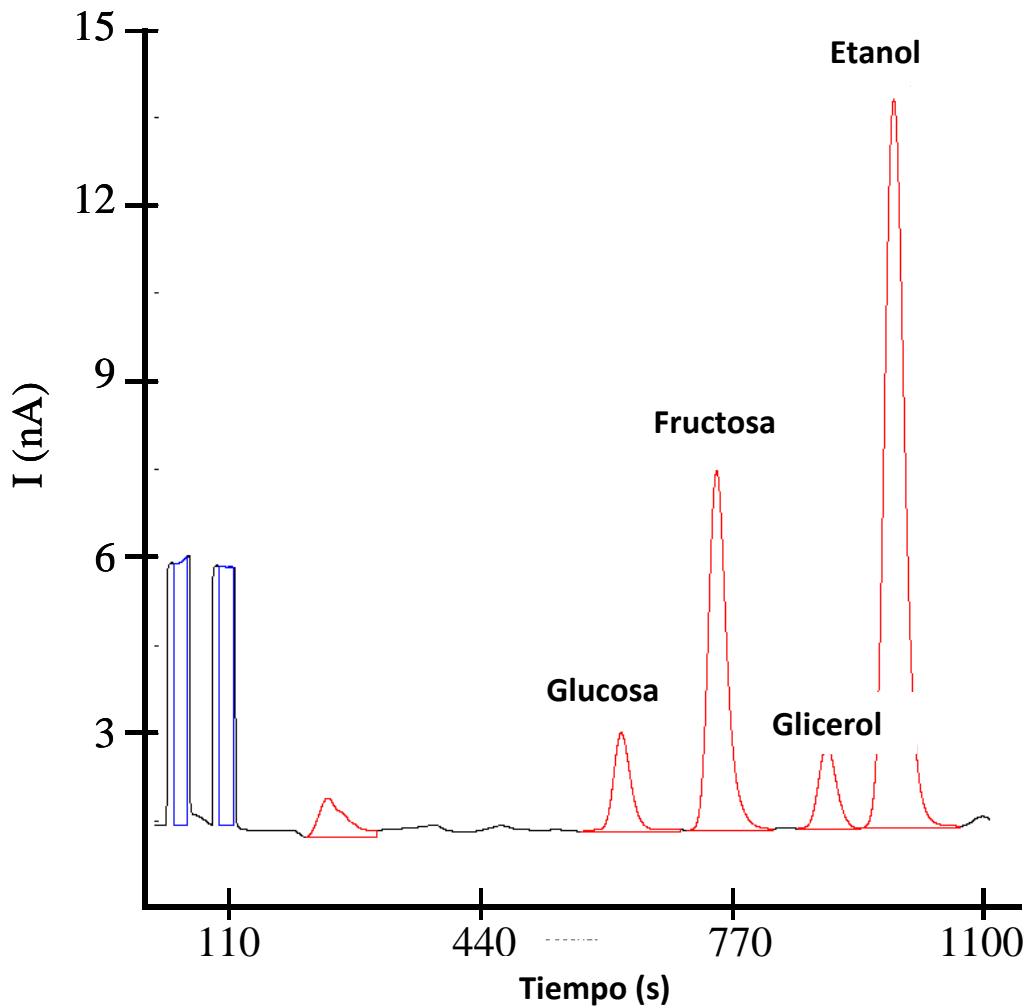
Jean-Marie AURAND

IRMS:

Corriente de la trampa: 300 μA

5.3 Ejemplo de cromatograma

Cromatograma de un vino dulce analizado mediante HPLC-co-IRMS



6. Determinación de las relaciones isotópicas

El gas de referencia, el CO_2 , se calibra según estándares internacionales comerciales. Las relaciones isotópicas se expresan en δ ‰ con respecto al PDB (*Pee Dee Belemnite*) y se definen de la siguiente

*Certificado conforme
Sofía, 2 de junio de 2017
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea general*

Jean-Marie AURAND

manera:

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{Mues.}} (\text{‰}) = [(R_{\text{Mues.}} / R_{\text{Est.}}) - 1] * 10^3$$

Siendo: Mues.: muestra; Est.: estándar; R: relaciones isotópicas $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$

7. Características del método

Las características del método de determinación de la relación isotópica $\delta^{13}\text{C}$ de la glucosa, la fructosa, el glicerol y el etanol por HPLC-co-IRMS se han obtenido a partir de los resultados de un ensayo de interlaboratorio con cuatro muestras (vino seco, vino dulce, zumo de uva y mosto concentrado rectificado). En el anexo figuran los resultados por compuesto y matriz.

8. Bibliografía

1. Cabanero, Al.; Recio, JL.; Rupérez, M. (2008) Isotope ratio mass spectrometry coupled to liquid and gas chromatography for wine ethanol characterization. Rapid Commun. Mass Spectrom. 22: 3111-3118.
2. Cabanero, Al.; Recio, JL.; Rupérez, M. (2010) Simultaneous stable carbon isotopic analysis of wine glycerol and ethanol by liquid chromatography coupled to isotope ratio mass spectrometry. J. Agric. Food Chem. 58: 722-728.
3. Guyon, F.; Gaillard, L.; Salagoity, MH.; Médina, B. (2011) Intrinsic Ratios of Glucose, Fructose, Glycerol and Ethanol $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Isotopic Ratio Determined by HPLC-co-IRMS: Toward Determining Constants for Wine Authentication. Anal. Bioanal. Chem. 401: 1551-1558.

*Certificado conforme
Sofía, 2 de junio de 2017
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea general*

Jean-Marie AURAND

Anexo

Tratamiento estadístico del ensayo interlaboratorio de HPLC-co-IRMS para determinar la precisión del método (repetibilidad y reproducibilidad)

Lista de laboratorios por orden alfabético de países

País	Laboratorio
Alemania	INTERTEK
Alemania	UNI DUE
Alemania	ELEMENTAR
Alemania	QSI
Alemania	LVI
Bélgica	IRMM
China	CNRIFFI
República Checa	SZPI
España	MAGRAMA
Francia	SCL-33
Italia	FLORAMO
Japón	AKITA Univ.

Respuestas:

12 laboratorios / 14 respuestas

Tratamiento de los resultados del ensayo interlaboratorios según la norma ISO 5725-2

Muestras:

- 1 vino seco (vino A)
- 1 vino dulce (vino B)
- 1 mosto concentrado rectificado (MCR)
- 1 zumo de uva

Condiciones analíticas:

Análisis de cada muestra por duplicado (repetibilidad) y con doble ciego (reproducibilidad)
Expresión de los resultados en tanto por mil (‰) con respecto al patrón PDB

*Certificado conforme
Sofía, 2 de junio de 2017
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea general*

Jean-Marie AURAND

Precisión de la medición de la glucosa

Repetibilidad y reproducibilidad

	Vino B	MCR	Zumo de uva
Número de laboratorios	12	12	12
Número de respuestas	14	13	14
Número de respuestas aceptadas (tras eliminar los valores atípicos)	13	13	12
Valor mínimo	-26,33	-25,04	-25,78
Valor máximo	-23,72	-23,74	-24,62
Valor medio	-25,10	-24,24	-25,19
Varianza de la repetibilidad	0,02	0,01	0,01
Desviación estándar de la repetibilidad (S_r)	0,14	0,10	0,09
Límite de repetibilidad (r ‰)	0,40	0,29	0,24
Varianza de la reproducibilidad	0,39	0,14	0,11
Desviación estándar de la reproducibilidad (S_R)	0,62	0,38	0,33
Límite de reproducibilidad (R ‰)	1,77	1,06	0,94

*Certificado conforme
Sofía, 2 de junio de 2017
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea general*

Jean-Marie AURAND

Precisión de la medición de la fructosa
Repetibilidad y reproducibilidad

	Vino B	MCR	Zumo de uva
Número de laboratorios	12	11	12
Número de respuestas	14	13	14
Número de respuestas aceptadas (tras eliminar los valores atípicos)	13	13	13
Valor mínimo	-25,56	-24,19	-25,33
Valor máximo	-24,12	-23,19	-23,98
Valor medio	-24,87	-23,65	-24,56
Varianza de la repetibilidad	0,02	0,03	0,02
Desviación estándar de la repetibilidad (S_r)	0,14	0,16	0,14
Límite de repetibilidad (r ‰)	0,40	0,46	0,39
Varianza de la reproducibilidad	0,15	0,10	0,18
Desviación estándar de la reproducibilidad (S_R)	0,39	0,32	0,42
Límite de reproducibilidad (R ‰)	1,10	0,90	1,19

*Certificado conforme
Sofía, 2 de junio de 2017
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea general*

Jean-Marie AURAND

Precisión de la medición del glicerol
Repetibilidad y reproducibilidad

	Vino A	Vino B
Número de laboratorios	12	12
Número de respuestas	12	12
Número de respuestas aceptadas (tras eliminar los valores atípicos)	11	11
Valor mínimo	-32,91	-30,74
Valor máximo	-30,17	-28,27
Valor medio	-31,75	-29,54
Varianza de la repetibilidad	0,13	0,04
Desviación estándar de la repetibilidad (S_r)	0,36	0,19
Límite de repetibilidad (r ‰)	1,03	0,55
Varianza de la reproducibilidad	0,57	0,37
Desviación estándar de la reproducibilidad (S_R)	0,76	0,61
Límite de reproducibilidad (R ‰)	2,14	1,72

Certificado conforme
Sofía, 2 de junio de 2017
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea general

Jean-Marie AURAND

Precisión de la medición del etanol

Repetibilidad y reproducibilidad

	Vino A	Vino B
Número de laboratorios	12	12
Número de respuestas	11	12
Número de respuestas aceptadas (tras eliminar los valores atípicos)	10	12
Valor mínimo	-27,85	-27,60
Valor máximo	-26,50	-26,06
Valor medio	-27,21	-26,82
Varianza de la repetibilidad	0,03	0,03
Desviación estándar de la repetibilidad (S_r)	0,16	0,17
Límite de repetibilidad (r ‰)	0,47	0,47
Varianza de la reproducibilidad	0,16	0,23
Desviación estándar de la reproducibilidad (S_R)	0,40	0,47
Límite de reproducibilidad (R ‰)	1,14	1,34

*Certificado conforme
Sofía, 2 de junio de 2017
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea general*

Jean-Marie AURAND