



RESOLUCIÓN OIV-OENO- 589-2017

MÉTODO DE DETERMINACIÓN DEL PROPANO-1,2-DIOL Y DEL BUTANO-2,3-DIOL

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 Compendio de Métodos Internacionales de Análisis de Vinos y Mostos con el siguiente método:

DETERMINACIÓN DEL PROPANO-1,2-DIOL Y DEL BUTANO-2,3-DIOL

Método de tipo IV

1. INTRODUCCIÓN

Se forman cantidades cuantificables de propano-1,2-diol y del butano-2,3-diol a partir de los procesos de fermentación. Estos compuestos están prácticamente ausentes en los mostos no fermentados, pero están presentes, con ciertos límites, en los vinos.

2. FUNDAMENTO DEL MÉTODO

Los analitos y el patrón interno se extraen con éter etílico. El aumento de la fuerza iónica en la matriz del vino o del mosto de partida favorece la transferencia a la fase orgánica. Por esta razón, se añade una gran cantidad de K_2CO_3 a las muestras (desestabilización salina). Los extractos se analizan directamente por GC-MS en una columna polar. La detección se efectúa en función del tiempo de retención y del espectrómetro de masas.

3. ÁMBITO DE APLICACIÓN

El método se aplica a la determinación del propano-1,2-diol y del butano-2,3-diol en los mostos y vinos con un contenido de azúcar superior a 20 g/L y con concentraciones de analitos comprendidas entre 1 mg/L y 500 mg/L aproximadamente.

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

Jean-Marie AURAND

4. ABREVIATURAS

C	Concentración
PG	Propano-1,2-diol
GC-MS	Cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas
H ₂	Hidrógeno
PI	Patrón interno: butano-1,3-diol
m-z	Relación masa-carga
FR	Factor de respuesta
ML	Nivel de calibración de la matriz
SM	Solución madre
SP	Solución patrón
TR	Tiempo de retención
SP	Soluciones patrón para la cromatografía de gases
BG	Butano-2,3-diol
D	Vino con un contenido de azúcar > 20 g/L
M	Mosto

5. REACTIVOS

- 5.1. K₂CO₃ (CAS: 584-08-7)
- 5.2. Éter etílico (CAS: 60-29-7)
- 5.3. Etanol absoluto (CAS: 64-17-5)
- 5.4. Fructosa (CAS: 57-48-7)
- 5.5. Glucosa (CAS: 50-99-7)
- 5.6. Glicerol (CAS: 56-81-5)
- 5.7. Propano-1,2-diol, pureza > 99 % (CAS: 57-55-6)
- 5.8. Butano-2,3-diol, pureza >99 %, mezcla de isómeros de forma (R,R) y (R,S) (CAS: 513-85-9). Evaluar la abundancia relativa de forma (R,R) y de forma (R,S) del siguiente modo:
 - 5.8.1. preparar una solución de 100 mg/L siguiendo las instrucciones que figuran en los puntos 7.2.1 y 7.3 y diluyendo la mezcla de isómeros del butano-2,3-diol (5.8) en agua (5.10) en vez de en la solución modelo de la matriz;
 - 5.8.2. inyectarla en el GC de acuerdo con las condiciones que figuran en el punto 7.6 y calcular el porcentaje de forma (R,R) y de forma (R,S) a partir del porcentaje de las áreas de los dos picos;
 - 5.8.3. tener en cuenta la abundancia relativa de ambas formas para calcular la concentración de las soluciones patrón C_{SP,i} que figuran en el punto 8.2.1 para el cálculo de los FR_i relativos a las formas (R,R) y (R,S).

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

Jean-Marie AURAND

- 5.9. Butano-1,3-diol, pureza > 99 %, anhidro o deshidratado con sulfato de sodio durante 24 horas (CAS: 107-88-0)
- 5.10. Agua para uso en análisis de laboratorio y de calidad EN ISO 3696
- 5.11. Nitrógeno

6. EQUIPO

- 6.1. Material habitual de laboratorio, incluidos matraces aforados de 1000 mL, 200 mL y 100 mL de clase A
- 6.2. Balanza analítica con una resolución de $\pm 0,0001$ g
- 6.3. Centrífuga de laboratorio (al menos 4000 rpm o 2000 xg)
Nota 1: "xg" indica la aceleración que sufren las partículas dentro de la centrífuga, mientras que "rpm" se refiere al número de vueltas que da el rotor de la centrífuga en un minuto. La relación entre estas dos unidades de medida viene dada por la siguiente fórmula: $xg = 1,1178 \cdot 10^{-3} \cdot n^2 \cdot r$. En el laboratorio que ha puesto a punto este método, $r = 0,115$ m.
- 6.4. Cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas con inyector con y sin divisor de flujo
- 6.5. Micropipetas de precisión y pipetas de Pasteur
- 6.6. Tubos de 30 mL para la centrífuga, resistentes al éter y con tapón
- 6.7. Baño termostatzado
- 6.8. Agitador vertical vorticial

7. PROCEDIMIENTO

7.1. Preparación de las soluciones modelo que imitan a las matrices

Para obtener una mejor respuesta a la GC-MS durante la cuantificación, resulta útil preparar distintas soluciones que se asemejen, lo máximo posible, a la matriz de la muestra que se vaya a analizar, ya que la respuesta al análisis de los glicoles varía enormemente en función de la matriz en la que se solubilizan.

Cuadro 1. Preparación de las soluciones modelo en matraces aforados de 1000 mL

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

Jean-Marie AURAND

	Soluciones modelos	
	M	D
Fructosa	100 g/L	50 g/L
Glucosa	100 g/L	50 g/L
Glicerol	1 g/L	4 g/L
Etanol absoluto	1 % v/v	5 % v/v

7.2. Preparación de las soluciones de referencia

7.2.1. SM: solución madre de PG y BG

Pesar, con una precisión de 0,1 mg, unos 0,10 g de propano-1,2-diol (PG) y unos 0,10 g de butano-2,3-diol (BG) en un matraz aforado de 10 mL y enrasar con agua (5.10). Anotar el peso. Cerrar herméticamente el matraz aforado y agitar.

La concentración de esta solución es de aproximadamente 10 mg/mL de PG y de 10 mg/mL de BG.

Si las cantidades de PG y de BG difieren en más de 0,1 g, calcular las concentraciones exactas en función del peso anotado.

7.2.2. PI: solución de PI

Pesar, con una precisión de 0,1 mg, unos 0,10 g de butano-1,3-diol (PI) en un matraz aforado de 10 mL y enrasar con agua. Anotar el peso. Cerrar herméticamente el matraz aforado y agitar. La concentración de esta solución es de 10 mg/mL. Si la cantidad del PI difiere en más de 0,1 g, calcular la concentración exacta en función del peso anotado.

7.3. Preparación de la solución patrón en la matriz

Preparar las soluciones patrón diluyendo la solución SM en una solución modelo cuya composición se parezca lo máximo posible a la de la muestra que se vaya a analizar (para el vino dulce, la solución modelo D; para el mosto, la solución modelo M):

Cuadro 2. Preparación de las soluciones patrón (SP) en los matraces aforados de 100 mL

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

Jean-Marie AURAND

	SP-M	SP-D
Solución SM	1 mL	1 mL
Para alcanzar un volumen final de 100 mL, enrasar con:	Solución modelo M	Solución modelo D

Cada solución patrón (SP) contiene la matriz seleccionada; la concentración de PG y de BG es de 100 mg/L. El patrón interno se añadirá antes de la extracción, tal y como se recoge en el punto 7.5.

7.4. Preparación de las muestras

Si la concentración del analito en la muestra es superior a la concentración máxima prevista en el ámbito de aplicación, diluir la muestra con la solución modelo (7.1).

Homogeneizar la muestra y, a continuación, tomar una fracción de 10 mL para la extracción.

En el caso de los mostos y de los vinos turbios, tomar el vino límpido y filtrado.

En el caso de los vinos espumosos o de aguja, efectuar una desgasificación según se describe en el método de la OIV "Acidez total" (OIV-MA-AS313-01, punto 5.1). Repetir íntegramente el proceso de preparación y analizar por duplicado.

7.5. Extracción

7.5.1. Adición del PI a la muestra

Preparar en un matraz aforado de 100 mL una solución que contenga 5 mL de la solución de PI (7.2.2) y enrasar con la muestra que se vaya a analizar. A continuación, agitar bien.

Esta solución contiene 500 mg/L del PI.

7.5.2. Mostos y vinos con un contenido de azúcar >20 g/L

7.5.2.1. Adición del K_2CO_3

Introducir, en el tubo para la centrifuga (6.6), 10 mL de la solución recién preparada, compuesta por la muestra que se vaya a analizar y la solución del PI. A continuación, añadir 10 g de K_2CO_3 (5.1) y esperar a que se enfríe. Para acelerar el enfriamiento, es posible utilizar un baño termostatizado a 20 °C (6.7).

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

Jean-Marie AURAND

7.5.2.2. Extracción con éter

Una vez fría, añadir 10 mL de éter etílico (5.2) y agitar con el agitador vertical vorticial. A continuación, introducir en la centrífuga (6.3) a unas 3500 rpm (o 1500 xg) durante 10 minutos.

7.5.3. Purificación para el análisis por GC-MS

Extraer el sobrenadante con una pipeta de Pasteur y transferirlo a un contuvo y evaporar en corriente de nitrógeno. Recuperar el residuo con aproximadamente 1 mL de éter etílico e introducirlo en un frasco para GC cerrado herméticamente y listo para el análisis por GC-MS.

7.5.4. Extracción de las soluciones patrón (SP)

También deberá seguirse este procedimiento para la solución patrón (SP) seleccionada (7.3). Las SP deberán considerarse como muestras a todos los efectos. Además, se deberá tratar de forma análoga a las muestras a partir de la adición del PI (7.5.1).

7.6. Análisis mediante GC-MS

A continuación, se recogen los parámetros específicos del análisis mediante GC-MS a modo de ejemplo. Es posible utilizar sistemas alternativos siempre que estos ofrezcan las prestaciones cromatográficas adecuadas y permitan separar los picos cromatográficos con una resolución mayor de 2.

7.6.1. Condiciones habituales de la GC

Columna: DB-WAX 60 m x 0,25 mm x 0,25 µm

Gas portador: He

Flujo del gas portador: 1,0 mL/min

Temperatura del inyector: 250 °C

Volumen de inyección: 1 µL

Corriente de ionización: 70 eV

Programación de la temperatura:

	Aumento (°C/min)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Inicio		50	8,00
Rampa 1	4,0	220	
Rampa 2		220	40

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

Jean-Marie AURAND

7.6.2. Condiciones específicas de la MS

Fuente: 230 °C

Detector del MS: 150 °C scan 35,00-350,00 a.m.u.

Tiempo de inicio: 10 min

El tiempo de adquisición para cada masa es de 250 μs

Modo de adquisición: Full Scan

8. EVALUACIÓN

8.1. Identificación

La identificación se realiza por la comparación del tiempo de retención de los patrones previstos y el espectro de masas encontrados en la biblioteca asociada a la GC-MS.

8.2. Cálculos

Para la cuantificación, se utiliza una relación m-z de 45, tanto para el PI como para el PG y las dos formas de BG.

8.2.1. Determinación de los factores de respuesta

La cuantificación se efectúa a partir del factor de respuesta (FR) obtenido del análisis de la solución de referencia:

$$FR_i = \frac{A_{PI}/C_{PI}}{A_{SP,i}/C_{SP,i}}$$

donde:

A_{PI} es el área del pico del patrón interno y C_{PI} su concentración,

$A_{SP,i}$ es el área del pico del PG o de las dos formas isométricas del BG en la solución patrón y $C_{SP,i}$ su concentración.

8.2.2. Cálculo de las concentraciones en las muestras

Tras calcular el valor del FR, puede procederse al cálculo de la concentración de PG y de las dos formas isoméricas del BG en las muestras utilizando la siguiente fórmula:

$$C_i = FR_i \cdot C_{PI} \cdot \frac{A_i}{A_{PI}}$$

donde:

A_i es el área del pico del PG o del isómero del BG en la muestra y C_i su concentración.

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

Jean-Marie AURAND

8.3. Expresión de los resultados

Los resultados se expresan en mg/L, sin decimales.

Expresar el butano-2,3-diol como la suma del butano-2,3-diol (R,R) y del butano-2,3-diol (R,S).

9. BIBLIOGRAFÍA

Fauhl, C., Wittkowski, R., Lofthouse, J., Hird, S., Brereton, P., Versini, G., Lees, M., y Guillou, C.: "Gas Chromatographic/Mass Spectrometric Determination of 3-Methoxy-1,2-Propanediol and Cyclic Diglycerols, By-Products of Technical Glycerol, in Wine: Interlaboratory Study", *JOURNAL OF AOAC INTERNATIONAL*, VOL. 87, NO. 5, 2004.

Di Stefano, R., García Moruno, E., y Borsa, D.: "Proposta di un metodo di preparazione del campione per la determinazione dei glicoli dei vini", *VINI D'ITALIA*, 4, 1992, pp. 61-64.

García Moruno, E., y Di Stefano, R.: "La determinazione del glicerolo, del 2,3-butandiolo e dei glicoli nei vini", *VINI D'ITALIA*, 5, 1989, pp. 41-46.

Di Stefano, R., Borsa, D., y García Moruno, E.: "Glicoli naturalmente presenti nei vini", *VINI D'ITALIA*, 5, 1988, pp. 39-44.

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

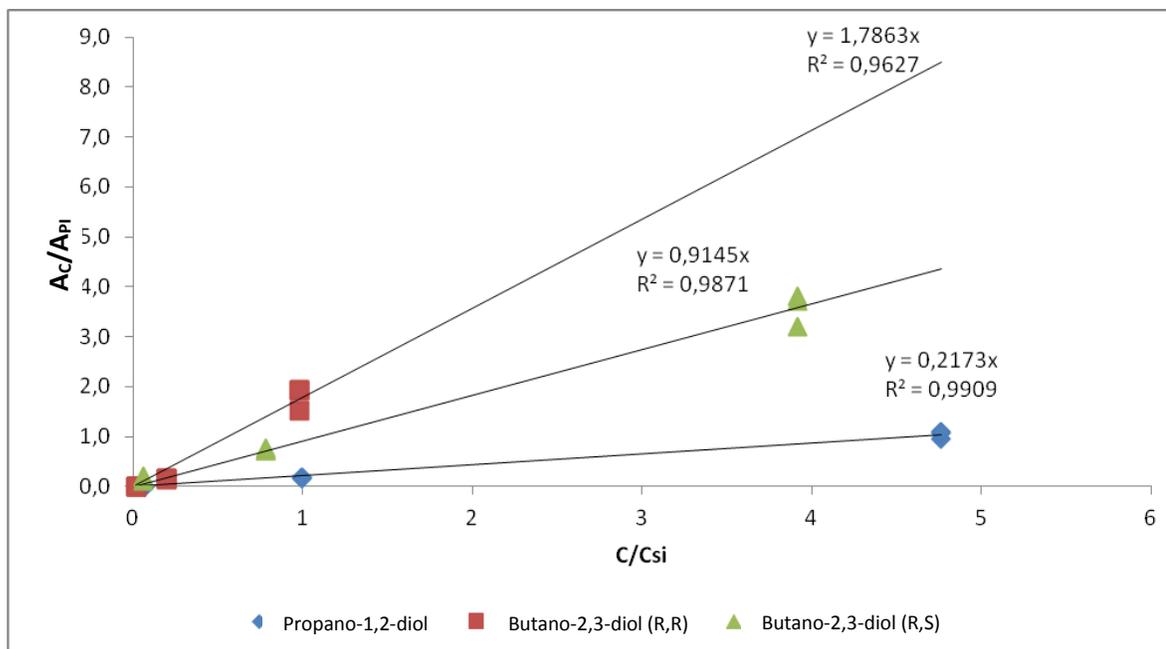
Jean-Marie AURAND

ANEXO 1

RENDIMIENTO DEL MÉTODO

1. Linealidad

Comprobación de la linealidad de la respuesta en una solución de sacarosa de 200 g/L (100 g/L de glucosa y 100 g/L de fructosa). Los analitos se añadieron a concentraciones de 10, 100 y 500 mg/L, mientras que el PI se añadió a una concentración de alrededor de 100 mg/L. Los análisis se repitieron tres veces.



El factor de respuesta medio es el siguiente:

$$\text{Propano-1,2-diol} \quad \text{FR} = (C/C_{PI})/(A/A_{PI}) = 1/0,2173 = 4,60$$

$$\text{Butano-2,3-diol (R,R)} \quad \text{FR} = (C/C_{PI})/(A/A_{PI}) = 1/1,7863 = 0,56$$

$$\text{Butano-2,3-diol (R,S)} \quad \text{FR} = (C/C_{PI})/(A/A_{PI}) = 1/0,9145 = 1,09$$

2. Repetibilidad

La repetibilidad se evaluó con dos muestras de mosto.

Una se analizó tal cual (mosto n.º 1), mientras que la otra se analizó tras la adición de 100 mg/L de la solución madre SM (mosto n.º 2).

Las cifras del siguiente cuadro hacen referencia a 10 análisis repetidos y la repetibilidad (r) se

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

Jean-Marie AURAND

calcula de acuerdo con la fórmula $r = 2,8 \times Sr$ (Sr: desviación estándar de la repetibilidad; RSDr: desviación estándar relativa de la repetibilidad).

Componente	Mosto n.º 1				Mosto n.º 2			
	Media (mg/L)	Sr (mg/L)	RSDr %	r (mg/L)	Media (mg/L)	Sr (mg/L)	RSDr %	r (mg/L)
Propano-1,2-diol	1,5	0,5	36	1,5	107	9	9	30
Butano-2,3-diol (R,R)	3,2	1,6	52	4,6	30	3	9	9,0
Butano-2,3-diol (R,S)	5,4	1,7	33	4,9	104	11	10	34

Evaluación de la precisión del límite de repetibilidad de acuerdo con la ecuación de Horwitz y del valor de Horrat(r):

Mosto n.º 1

	Media (mg/L)	C·10 ⁶ (m/m)	RSD(R)	R Horwitz	Horrat(r)	r mín. H	r máx. H
Propano-1,2-diol	1,5	1,5	15	0,6	2,40	0,2	0,8
Butano-2,3-diol (R,R)	3,2	3,2	13	1,2	3,87	0,3	1,6
Butano-2,3-diol (R,S)	5,4	5,4	12	1,9	2,64	0,5	2,5

El límite de repetibilidad (r) no se ajusta al intervalo de aceptabilidad previsto por la ecuación de Horwitz ($r \text{ mín. } H < r < r \text{ máx. } H$) dada la volatilidad de las medidas en concentraciones bajas, cercanas al límite de cuantificación que figura en el punto 5 del anexo 1.

Mosto n.º 2

	Media (mg/L)	C·10 ⁵ (m/m)	RSD(R)	R Horwitz	Horrat(r)	r mín. H	r máx. H
Propano-1,2-diol	107	11	7,9	24	1,09	5,9	31,8
Butano-2,3-diol (R,R)	30	3	9,5	8	0,98	2,0	10,7
Butano-2,3-diol (R,S)	104	10	7,9	23	1,29	5,7	30,8

El límite de repetibilidad (r) se ajusta al intervalo de aceptabilidad previsto para la ecuación de Horwitz ($r \text{ mín. } H < r < r \text{ máx. } H$).

3. Tasa de recuperación

Se evaluó la tasa de recuperación del mosto n.º 2 antes y después de la adición de la solución de referencia SM según se describe en el punto 7.3 del método.

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

Jean-Marie AURAND

Componente	Conc. en el mosto (mg/L)	Conc. adición (mg/L)	Conc. teórica (mg/L)	Conc. cuantificada (mg/L)	Tasa de recuperación (%)
Propano-1,2-diol	0,7	99,5	100,2	107,5	107
Butano-2,3-diol (R,R)	12,6	21,7	34,3	29,9	87
Butano-2,3-diol (R,S)	11,4	86,8	98,2	103,7	106
<i>Butano-2,3-diol (R,R) + (R,S)</i>	<i>24,0</i>	<i>108,5</i>	<i>132,5</i>	<i>133,6</i>	<i>101</i>

La tasa de recuperación es satisfactoria tanto para el propano-1,2-diol como para el butano-2,3-diol evaluado como la suma de las dos formas.

4. Efecto de la matriz de sacarosa en los factores de respuesta

Se compararon los FR obtenidos en las soluciones de sacarosa equimolares (glucosa y fructosa) en concentraciones de 200 g/L y 2 g/L de azúcares totales.

	Propano-1,2-diol		Butano-2,3-diol (R,R)		Butano-2,3-diol (R,S)	
Azúcares	200 g/L	2 g/L	200 g/L	2 g/L	200 g/L	2 g/L
FR	4,60	5,90	0,55	0,56	1,08	1,09
ΔFR %	22,0 %		1,8 %		0,9 %	

El efecto de la matriz en el propano-1,2-diol es muy significativo, mientras que el efecto de la matriz en el butano-2,3-diol es despreciable.

5. Límite de detección y límite de cuantificación

El límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LQ) dependen de las condiciones de medición concretas del análisis químico y deben determinarlos quienes utilicen el método.

Se evaluó el límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LQ) a partir del material y las condiciones que figuran en el punto 8 y de acuerdo con las instrucciones que se recogen en el punto 4.2, relativo al método gráfico, de la resolución OENO 7-2000 (OIV-MA-AS1-10) "Estimación del límite de detección y de cuantificación de un método de análisis".

	Propano-1,2-diol	Butano-2,3-diol (R,R)	Butano-2,3-diol (R,S)
LD (mg/L)	0,2	0,2	0,2
LQ (mg/L)	0,6	0,7	0,8

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

Jean-Marie AURAND

ANEXO 2

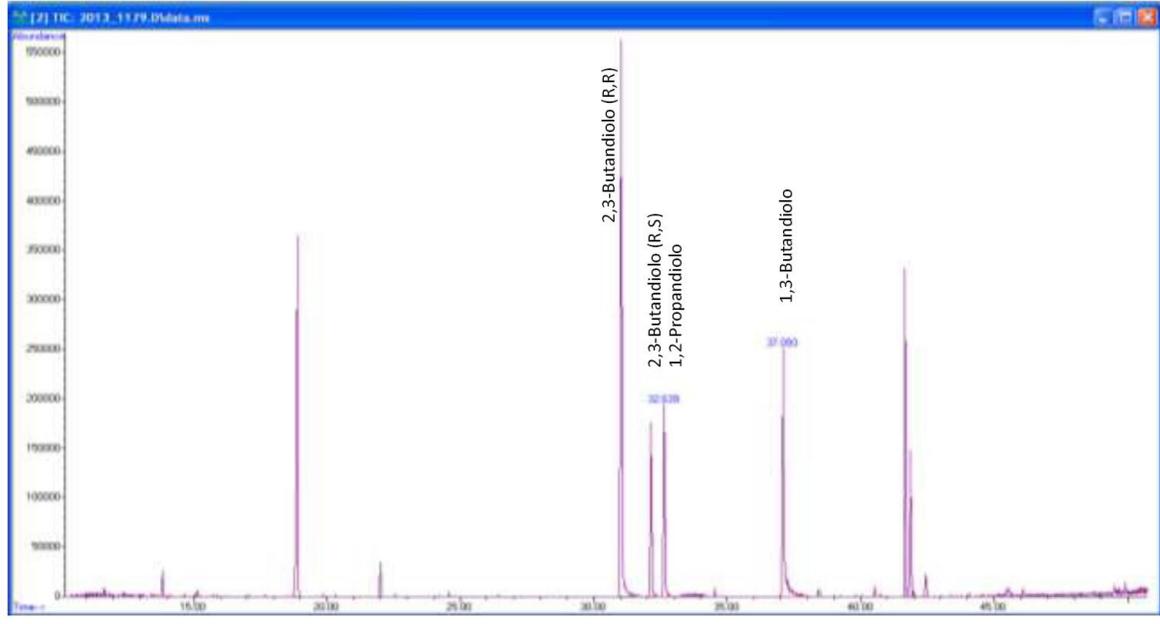


Fig. 1. Cromatograma de un vino

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

Jean-Marie AURAND