



RESOLUCIÓN OENO 10/2006

DETERMINACIÓN CONJUNTA DE LA GLUCOSA Y LA FRUCTOSA EN LOS VINOS POR PH-METRÍA DIFERENCIAL

LA ASAMBLEA GENERAL,

Visto el artículo 2 párrafo 2 iv del acuerdo del 3 de abril de 2001 sobre la creación de la Organización Internacional de la Viña y el Vino

A propuesta de la Subcomisión de métodos de análisis y de valoración de los vinos,

DECIDE completar el Anexo A del Compendio de métodos internacionales de análisis de los vinos y los mostos con el método siguiente y adoptarlo como método de tipo II:

Titulo	Método Tipo
DETERMINACION CONJUNTA DE LA GLUCOSA Y DE LA FRUCTOSA EN LOS VINOS POR pH METRIA DIFERENCIAL	III

1. ALCANCE Y ÁMBITO DE APLICACIÓN

Este método es aplicable al análisis de la glucosa y de la fructosa en los vinos entre 0 y 60 g/l (nivel medio) o entre 50 y 270 g/l (nivel alto).

2. PRINCIPIO

La determinación conjunta de la glucosa y la fructosa por pH métrica diferencial consiste en una fosforilación de la glucosa y la fructosa mediante hexoquinasa. A continuación se cuantifican los iones H⁺ presentes de forma estequiométrica respecto a las cantidades de glucosa y de fructosa.

3. REACCIONES

La glucosa y la fructosa presentes se fosforilan con adenosina trifosfato (ATP) tras una reacción enzimática catalizada con hexoquinasa (HK) (EC 2.7.1.1)



*Certificado conforme
Paris, 28 de julio de 2006
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea general*

Federico CASTELLUCCI



4. REACTIVOS

4.1 Agua desmineralizada (18 M Ω) o bidestilada

4.2 2-Amino-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol (TRIS) pureza \geq 99%

4.3 Adenosina trifosfato disódico (ATP, 2Na) pureza \geq 99%

4.4 Fosfato trisódico con doce moléculas de agua ($\text{Na}_3\text{PO}_{4,11}\text{H}_2\text{O}$) pureza \geq 99%

4.5 Hidróxido de sodio (NaOH) pureza \geq 98%

4.6 Cloruro de magnesio con seis moléculas de agua ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) pureza \geq 99%

4.7 Tritón X 100

4.8 Cloruro de potasio (KCl) pureza \geq 99%

4.9 2-Bromo-2-nitropropano-1,3-diol (Bronopol) ($\text{C}_3\text{H}_6\text{BrNO}_4$)

4.10 Hexoquinasa (EC 2.7.1.1) 1 mg \cong 145 U (ej. Hoffman La Roche, Mannheim, Alemania ref HEXO-70-1351)

4.11 Glicerol pureza \geq 98%

4.12 Glucosa pureza \geq 99%

4.13 **Tampón de reacción pH 8,0** comercial o preparado según el método siguiente:

En un matraz aforado de 100 ml (5.2) vierta aproximadamente 70 ml (5.3) de agua (4.1) y agite de forma continua (5.5). Añada 0,242 g \pm 0,001 g (5.4) de TRIS (4.2), 0,787 g \pm 0,001 g (5.4) de ATP (4.3), 0,494 g \pm 0,001 g (5.4) de fosfato de sodio (4.4), 0,009 mg \pm 0,001 g (5.4) de hidróxido de sodio (4.5), 0,203 g \pm 0,001 g (5.4) de cloruro de magnesio (4.6), 2,000 \pm 0,001 g (5.4) de Tritón X 100 (4.7), 0,820 g \pm 0,001 g (5.4) de cloruro de potasio (4.8) y 0,010 \pm 0,001 g (5.4) de bronopol (4.9). Ajuste hasta la línea de enrase con agua (4.1). E pH final debe ser de 8,0 \pm 0,1 (5.6). De lo contrario, ajuste con hidróxido de sodio o ácido clorhídrico. El tampón así preparado es estable durante dos meses a 4°C.

4.14 **Solución enzimática** comercial o preparada según el método siguiente: mediante una pipeta aforada (5.7) vierta 5 ml de glicerol (4.11) en un matraz aforado de 10 ml, ajuste hasta la línea de enrase con agua (4.1) y homogeneice. Disuelva 20 mg \pm 1 mg (5.4) de hexoquinasa (4.10) y 5 mg de bronopol (4.9) en 10 ml de la solución de glicerol. La actividad de la solución enzimática debe ser de 300 U \pm 50 U por ml para la hexoquinasa. La solución enzimática es estable durante 6 meses a 4°C.

*Certificado conforme
Paris, 28 de julio de 2006
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea general*

Federico CASTELLUCCI



4.15 Preparación de la solución de calibrado (nivel medio si el contenido supuesto es inferior a 50 g/l de glucosa + fructosa)

Introduzca 3,60 g \pm 0,01 g (5.4) de glucosa (4.12) (previamente secada durante 12 horas a 40 °C hasta lograr un peso constante), 0,745 g \pm 0,001 g (5.4) de cloruro de potasio (4.8) y 0,010 g \pm 0,001 g (5.4) de bronopol (4.9) en un matraz aforado de 100 ml (5.2). Añada agua (4.1). Homogeneice bien (5.5). Ajuste hasta la línea de enrase con agua (4.1) tras retirar la barreta magnética. La concentración final es de 36 g/l de glucosa. La solución es estable 6 meses a 4°C.

4.16 Preparación de la solución de calibrado (nivel alto si el contenido supuesto es superior a 50 g/L de glucosa + fructosa)

Introduzca 18,0 g \pm 0,01 g (5.4) de glucosa (4.12) (previamente secada durante 12 horas a 40 °C hasta lograr un peso constante), 0,745 g \pm 0,001 g (5.4) de cloruro de potasio (4.8) y 0,010 g \pm 0,001 g de bronopol (4.9) en un matraz aforado de 100 ml (5.2). Añada agua (4.1). Homogeneice bien (5.5). Ajuste hasta la línea de enrase con agua (4.1) tras retirar la barreta magnética. La concentración final es de 180 g/l de glucosa. La solución es estable 6 meses a 4°C.

5. MATERIAL

5.1 Aparato de pH-metría diferencial (EUROCHEM CL 10 plus, Microlab EFA o equivalente) véase Anexo A

5.2 Matraz aforado de 100 ml clase A

5.3 Probeta graduada con pie de 100 ml

5.4 Balanza de precisión que permita pesar al mg

5.5 Agitador magnético y barreta magnética de teflón

5.6 pH-metro

5.7 Pipetas aforadas de 3ml, 5 ml clase A

5.8 Matraz aforado de 10 ml clase A

5.9 Pipetas automáticas de pistón de 25 y 50 μ l

6. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Las muestras no deben estar demasiado cargadas de materias en suspensión. De lo contrario, centrifúguelas o fíltrelas. Los vinos espumosos deben desgasearse.

*Certificado conforme
Paris, 28 de julio de 2006
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea general*

Federico CASTELLUCCI



7. PROCEDIMIENTO

El operario debe respetar las instrucciones de uso de los aparatos (5.1). Antes de cualquier utilización, debe estabilizarse la temperatura de los instrumentos. Los circuitos deben lavarse con la solución tampón (4.13) y, si es preciso, limpiarse.

7.1 - Determinación del blanco (determinación de la señal de la enzima)

Llene los compartimientos electrodos (EL₁ y EL₂) del pH-metro diferencial (5.1) con el tampón (4.13). La diferencia de potencial entre los dos electrodos (D₁) debe estar comprendida entre ± 150 mpH

Añada 24 µl de solución enzimática (4.14) en la cámara de reacción (con la micropipeta 5.9 o el preparador) y llene el electrodo EL₂;

mida la diferencia de potencial (D₂) entre los dos electrodos;

calcule la diferencia de pH, ΔpH_o, para el blanco según el cálculo siguiente:

$$\Delta\text{pH}_o = D_2 - D_1$$

donde

ΔpH_o = diferencia de pH entre las dos mediciones para el blanco;

D₁ = valor de la diferencia de pH entre los dos electrodos rellenos de tampón;

D₂ = valor de la diferencia de pH entre los dos electrodos, uno de los cuales relleno de tampón y el otro de tampón y enzima.

El valor de ΔpH_o permite comprobar el estado de los electrodos en curso de dosificación y su eventual desviación con el tiempo; debe estar comprendido entre -30 y 0 mpH y ≤ 1,5 mpH entre dos mediciones consecutivas. De lo contrario, compruebe la calidad del tampón pH y la limpieza del circuito hidráulico y de los electrodos, y límpielos si es preciso. Vuelva a hacer el blanco.

7.2 - Calibrado

7.2.1 - Nivel medio

Llene los compartimientos de los electrodos (EL₁ y EL₂) con el tampón (4.13);

añada 25 µl (con la micropipeta 5.9 o el preparador) de solución de calibrado de glucosa (4.15) en la cámara de reacción;

llene los electrodos EL₁ y EL₂ con la mezcla tampón + la solución de calibrado;

mida la diferencia (D₃) de potencial entre los dos electrodos;

añada 24 µl de solución enzimática (4.14) y llene el electrodo EL₂ con la mezcla tampón + solución de calibrado + enzima;

transcurrido el tiempo necesario para la reacción enzimática, mida la diferencia de potencial (D₄) entre los dos electrodos;

calcule la diferencia de pH, ΔpH_c de la muestra de calibrado según el cálculo siguiente:

$$\Delta\text{pH}_c = (D_4 - D_3) - \Delta\text{pH}_o$$

donde

ΔpH_c = la diferencia de pH entre las dos mediciones D₃ y D₄ para la muestra de calibrado menos la diferencia obtenida para el blanco;

D₃ = valor de la diferencia de pH entre los dos electrodos rellenos con la mezcla tampón/solución de referencia;

*Certificado conforme
Paris, 28 de julio de 2006
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea general*

Federico CASTELLUCCI



D_4 = valor de la diferencia de pH entre los dos electrodos, uno de los cuales relleno con tampón/solución de referencia y el otro con tampón/solución de referencia/enzima.
Calcule la pendiente de la recta de calibrado:

$$s = C_u / \Delta pH_c$$

donde

C_u es la concentración de glucosa en la solución de calibrado expresada en g/l.

Compruebe la validez del calibrado analizando 25 μ l de solución de calibrado (ML) de glucosa (4.15) siguiendo el procedimiento (7.3). El resultado debe estar comprendido entre $\pm 2\%$ del valor de referencia. De lo contrario, vuelva a realizar el procedimiento de calibrado.

7.2.2 – Nivel alto HL

Llene los compartimientos de los electrodos (EL_1 y EL_2) con el tampón (4.13);
añada 10 μ l (con la micropipeta 5.9 o el preparador) de solución de calibrado (HL) de glucosa (4.16) en la cámara de reacción;
llene los electrodos EL_1 y EL_2 con la mezcla tampón + la solución de calibrado;
mida la diferencia (D_3) de potencial entre los dos electrodos;
añada 24 μ l de solución enzimática (4.14) y llene el electrodo EL_2 con la mezcla tampón + solución de calibrado + enzima;
transcurrido el tiempo necesario para la reacción enzimática, mida la diferencia de potencial (D_4) entre los dos electrodos;
calcule la diferencia de pH, ΔpH_c de la muestra de calibrado según el cálculo siguiente:

$$\Delta pH_c = (D_4 - D_3) - \Delta pH_o$$

donde

ΔpH_c = la diferencia de pH entre las dos mediciones D_3 y D_4 para la muestra de calibrado menos la diferencia obtenida para el blanco;

D_3 = valor de la diferencia de pH entre los dos electrodos relleno con la mezcla tampón/solución de referencia;

D_4 = valor de la diferencia de pH entre los dos electrodos, uno de los cuales relleno con tampón/solución de referencia y el otro con tampón/solución de referencia/enzima.

Calcule la pendiente de la recta de calibrado:

$$s = C_u / \Delta pH_c$$

donde

C_u es la concentración de glucosa en la solución de calibrado expresada en g/l.

Compruebe la validez del calibrado analizando 10 μ l de solución de calibrado de glucosa (4.16) siguiendo el procedimiento (7.3). El resultado debe estar comprendido entre $\pm 2\%$ del valor de referencia. De lo contrario, vuelva a realizar el procedimiento de calibrado.

7.3 – Cuantificación

Llene los compartimientos de los electrodos (EL_1 y EL_2) con el tampón (4.13);
añada 10 μ l (nivel alto) o 25 μ L (nivel medio) (con la micropipeta 5.9 o el preparador) de muestra en la cámara de reacción;
llene los electrodos EL_1 y EL_2 con la mezcla tampón + muestra;
mida la diferencia (D_5) de potencial entre los dos electrodos;
añada 24 μ l de solución enzimática (4.14) y llene el electrodo EL_2 con la mezcla tampón + muestra + enzima;

*Certificado conforme
Paris, 28 de julio de 2006
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea general*

Federico CASTELLUCCI



mida la diferencia de potencial (D_6) entre los dos electrodos;
calcule la cantidad de soluto en la muestra según el cálculo siguiente:

$$w = s \times [(D_6 - D_5) - \Delta pH_0]$$

donde

w = cantidad de soluto en la muestra (en g/l);

S = pendiente determinada por la recta de calibrado;

ΔpH_0 = diferencia de pH entre las dos mediciones para el blanco;

D_5 = valor de la diferencia de pH entre los dos electrodos rellenos con la muestra/solución de referencia;

D_6 = valor de la diferencia de pH entre los dos electrodos, uno de los cuales relleno con tampón/muestra y el otro con tampón/muestra/enzima.

8 EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados se expresan en g/l de glucosa + fructosa con una cifra significativa tras la coma.

9 FIDELIDAD

Los detalles de los ensayos interlaboratorio relativos a la fidelidad del método aparecen resumidos en el Anexo B.

9.1 Repetibilidad

La diferencia absoluta entre dos resultados individuales obtenidos con un material idéntico sometido a ensayo por un operario que utiliza los mismos aparatos, en el intervalo de tiempo más breve posible, no debe superar el valor de repetibilidad r en el 95% de los casos.

El valor es: $r = 0,021x + 0,289$, donde x es el contenido de glucosa + fructosa en g/l.

9.2 Reproducibilidad

La diferencia absoluta entre dos resultados individuales obtenidos con un material idéntico sometido a ensayo en dos laboratorios no debe superar el valor de repetibilidad R en el 95% de los casos.

El valor es: $R = 0,033x + 0,507$, donde x es el contenido de glucosa + fructosa en g/l.

10 OTRAS CARACTERÍSTICAS DEL ANÁLISIS

10.1 Límites de detección y de cuantificación

10.1.1 Límite de detección

Se determina a partir de 10 series de tres repeticiones de un blanco analítico y de la regresión lineal realizada con los vinos del ensayo de fidelidad, igual a tres desviaciones estándar. En este caso, el método ha dado como resultado un límite de detección de 0,03 g/l. Unos ensayos por dilución realizados de forma sucesiva han confirmado este valor.

*Certificado conforme
Paris, 28 de julio de 2006
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea general*

Federico CASTELLUCCI



10.1.2 límite de cuantificación

Se determina a partir de 10 series de tres repeticiones de un blanco analítico y de la regresión lineal realizada con los vinos del ensayo de fidelidad, igual a diez desviaciones estándar. En este caso, el método ha dado como resultado un límite de detección de 0,10 g/l. Unos ensayos por dilución realizados de forma sucesiva han confirmado este valor. Las cuantificaciones de vinos blancos y tintos realizadas por los laboratorios que han participado en el análisis interlaboratorio también confirman estas cifras

10.2 Exactitud

La exactitud se evalúa a partir del nivel de recuperación medio calculado de los vinos adicionados analizados en doble ciego durante el ensayo interlaboratorio (vinos A, B, C, D, F y J). Es del 98,9% con un intervalo de confianza del 0,22%.

11 CONTROL DE CALIDAD

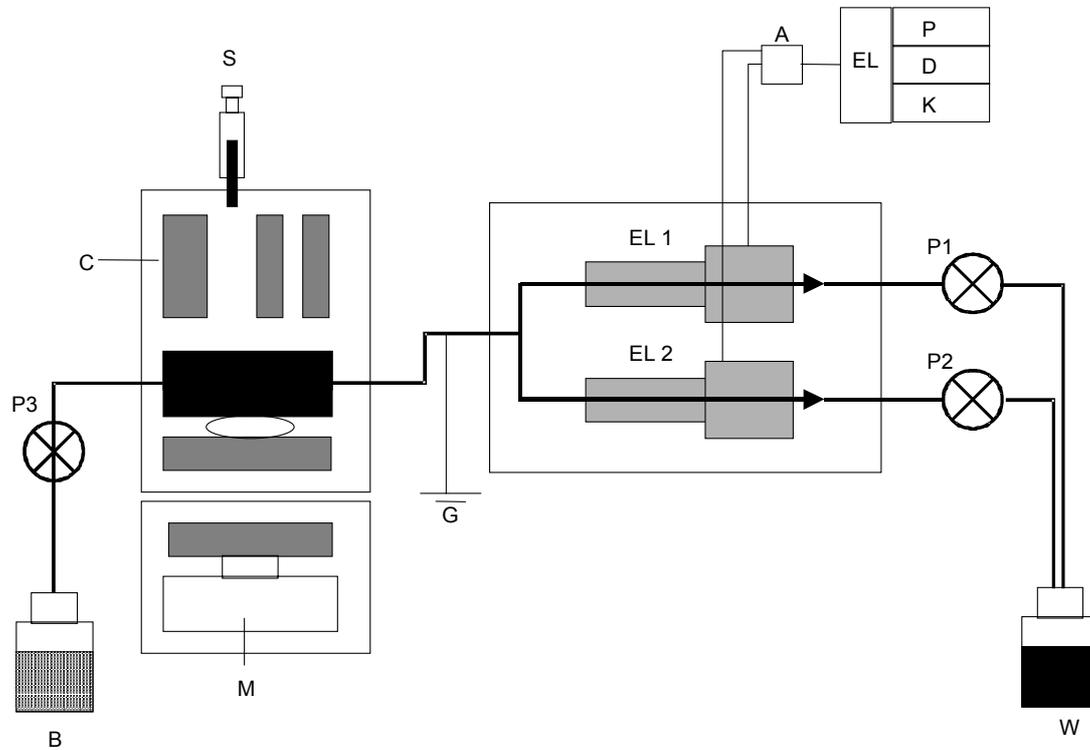
Pueden realizarse controles de calidad con materiales de referencia certificados, vinos cuyas características se derivan de un consenso o vinos adicionados insertados regularmente en las series analíticas, y siguiendo las fichas de control correspondientes.

*Certificado conforme
Paris, 28 de julio de 2006
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea general*

Federico CASTELLUCCI

Anexo A

Esquema del dispositivo de pH-metría diferencial



A: amplificador diferencial; B: solución de tampón; C: cámara de mezcla; D: indicador; EL1 y EL 2 electrodos capilares; EL: parte electrónica; G: toma de tierra; K: teclado; M: agitador magnético; P: impresora; P1 a P3: bombas peristálticas; S: jeringa de inyección de la muestra y de la enzima; W: líquido de desecho.

*Certificado conforme
Paris, 28 de julio de 2006
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea general*

Federico CASTELLUCCI



Anexo B

Datos estadísticos obtenidos a partir de los resultados de los ensayos interlaboratorio

De conformidad con la norma ISO 5725-2:1994, se han definido los parámetros siguientes durante un ensayo interlaboratorio. Dicho ensayo ha sido realizado por el laboratorio del Comité Interprofesional del Vino de Champaña en Epernay (Francia).

Año del ensayo interlaboratorio: 2005

Número de laboratorios: 13 en doble ciego

Nombre de muestras: 10

	Vino A	Vino B	Vino C	Vino D	Vino E	Vino F	Vino G	Vino H	Vino I	Vino J
Media en g/l	8.44	13.33	18.43	23.41	28.03	44.88	86.40	93.34	133.38	226.63
Nº de laboratorios	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13
Nº de laboratorios tras eliminación de las dispersiones más grandes	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13
Desv. estándar de repetibilidad	0.09	0.13	0.21	0.21	0.29	0.39	0.81	0.85	1.19	1.51
Límite de repetibilidad	0.27	0.38	0.61	0.62	0.86	1.14	2.38	2.51	3.52	4.45
RSDr, 100%	1.08	0.97	1.13	0.91	1.04	0.86	0.94	0.91	0.89	0.67
HORRAT r	0.26	0.25	0.31	0.26	0.30	0.27	0.32	0.32	0.33	0.47
Desv. estándar de reproducibilidad	0.17	0.27	0.37	0.59	0.55	0.45	1.27	1.43	1.74	2.69
Límite de reproducibilidad	0.50	0.79	1.06	1.71	1.60	1.29	3.67	4.13	5.04	7.78
RSDR, 100%	2.05	2.05	1.99	2.54	1.97	1.00	1.47	1.53	1.31	1.19
HORRAT R	0.50	0.54	0.55	0.72	0.58	0.31	0.51	0.53	0.48	0.47

Tipos de muestras:

Vino A: vino blanco que por su naturaleza contiene azúcar, sobrecargado con 2,50 g/l glucosa

Y de 2,50 g/l de fructosa;

Vino B: vino blanco que por su naturaleza contiene azúcar (vino A), sobrecargado con 5,00 g/l glucosa y de 50 g/l de fructosa;

Vino C: vino blanco que por su naturaleza contiene azúcar (vino A), sobrecargado con 7,50 g/l glucosa y de 7,50 g/l de fructosa;

Vino D: vino blanco que por su naturaleza contiene azúcar (vino A), sobrecargado con 10,0 g/l glucosa y de 10,0 g/l de fructosa;

Vino E: vino aromatizado;

Vino F: vino blanco que por su naturaleza contiene menos de 0,4 g/l de azúcar, sobrecargado con 22,50 g/l glucosa y de 22,50 g/l de fructosa;

Vino G: vino tinto de naturaleza suave;

Vino H: vino blanco suave;

Vino I: mistela;

Vino J: vino blanco que por su naturaleza contiene menos de 0,4 g/l de azúcar, sobrecargado con 115,00 g/l glucosa y de 115,00 g/l de fructosa;

*Certificado conforme
Paris, 28 de julio de 2006
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea general*

Federico CASTELLUCCI



BIBLIOGRAFÍA

LUZZANA M., PERELLA M. y ROSSI-BERNARDI L (1971): Anal. Biochem, 43, 556-563.

LUZZANA M., AGNELLINI D., CREMONESI P. y CARAMENTI G. (2001): Enzymatic reactions for the determination of sugars in food samples using the differential pH technique. Analyst, 126, 2149 -2152.

LUZZANA M., LARCHER R., MARCHITTI C. V. y BERTOLDI D. (2003): Quantificazione mediante pH-metria differenziale dell'urea negli spumanti metodo classico.in "Spumante tradizionale e classico nel terzo millennio" 27-28 giugno 2003, Istituti Agrario di San Mechele.

MOSCA A., DOSSI G., LUZZANA M., ROSSI-BERNARDI L., FRIAUF W. S., BERGER R.L., HOPKINS H. P. y CAREY V (1981): Improved apparatus for the differential measurement of pH: application to the measurement of glucosa. Anal. Biochem., 112, 287 - 294.

MOIO L., GAMBUTI A., Di MARZIO L. y PIOMBINO P. (2001): Differential pHmeter determination of residual sugars in wine. Am. J. Enol. Vitic, 52(3), 271 - 274.

TUSSEAU D., FENEUIL A., ROUCHAUSSE J.-M. et VAN LAER S. (2004) : Mesure de différents paramètres d'intérêt oenologique par pHmétrie différentielle. F.V. O.I.V. n° 1199, 5 pages.

*Certificado conforme
Paris, 28 de julio de 2006
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea general*

Federico CASTELLUCCI