



## RESOLUCIÓN OIV-OENO 552-2016

### DETERMINACIÓN DE AZÚCARES EN MOSTOS Y VINOS POR CROMATOGRFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN - ACTUALIZACIÓN DEL MÉTODO OIV-MA-AS311-03

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, a propuesta de la Comisión II “Enología”, introducir en el método OIV-MA-AS311-03 del Compendio de Métodos Internacionales de Análisis de Vinos y Mostos las siguientes modificaciones:

Método de tipo II<sup>1</sup>

### DETERMINACIÓN DE AZÚCARES EN MOSTOS Y VINOS POR CROMATOGRFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN

#### 1. ÁMBITO DE APLICACIÓN

Este método puede aplicarse para la cuantificación directa de los azúcares de mostos y vinos hasta los 20 g/L y por encima de esta concentración previa dilución.

También permite determinar el glicerol (entre 0,5 g/L y 15 g/L) y la sacarosa (entre 1 g/L y 40 g/L).

#### 2. FUNDAMENTO

Los azúcares y el glicerol se separan por HPLC en una columna de gel de sílice con alquilamina. La detección se realiza por refractometría.

#### 3. REACTIVOS Y PRODUCTOS

3.1 Agua desmineralizada de tipo I (ISO 3696) o equivalente (grado de pureza HPLC)

3.2 Acetonitrilo [75-05-8] (transmisión mínima a 200 nm; pureza  $\geq$  99 %)

3.3 Fructosa [57-48-7] (pureza  $\geq$  99 %)

3.4 Glucosa [492-62-6] (pureza  $\geq$  99 %)

3.5 Sacarosa [57-50-1] (pureza  $\geq$  99 %)

3.6 Glicerol [56-81-5] (pureza  $\geq$  99 %)

#### PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES DE REACTIVOS

3.9 Agua desmineralizada (3.1): filtrar con una membrana de celulosa (0,45  $\mu$ m).

3.10 Eluyente: solución de acetonitrilo (3.2) y agua (3.9) en una proporción de 80/20.

*Nota 2: la proporción de agua y acetonitrilo se puede ajustar en función de los objetivos.*

<sup>1</sup> De tipo II para la suma de la glucosa y la fructosa; de tipo IV para la sacarosa y el glicerol.

*Certificado conforme  
Bento Gonçalves, 28 de octubre de 2016  
El Director General de la OIV  
Secretario de la Asamblea general*

*Jean-Marie AURAND*

#### 4. MATERIALES Y EQUIPO

4.1 Membrana de celulosa (0,45 µm)

4.2 Columna de gel de sílice con grupos octadecilo (por ejemplo, cartuchos Sep-Pak C<sub>18</sub>)

4.3. Equipo habitual de HPLC

4.4 Columna de gel de sílice con alquilamina (5 µm, 250 × 4,6 mm)

*Nota 3: pueden emplearse columnas de longitud, diámetro interno y tamaño de partícula distintos de los indicados, que se refieren a los métodos de tipo II.*

4.5 Detector de índice de refracción (RID)

4.6 Material habitual de laboratorio

#### 5. PRETRATAMIENTO DE LA MUESTRA

En caso necesario, desgasificar las muestras previamente con nitrógeno, helio o en un baño de ultrasonidos, por ejemplo.

#### 6. PROCEDIMIENTO

6.1 Preparación de la muestra

6.1.1 Dilución

Los vinos con concentraciones inferiores a 20 g/L de glucosa+fructosa se analizan sin diluir. Los mostos y vinos con concentraciones superiores a 20 g/L se diluyen para ajustarlas al intervalo de calibrado.

6.1.2 Filtración

Filtrar la muestra con un filtro de 0,45 µm (4.1) antes de analizarla.

6.1.3 Eliminación de los compuestos fenólicos

En los casos en los que sea necesario, pasar el vino o el mosto por un cartucho C<sub>18</sub> (4.2).

6.2 Análisis

6.2.1 Condiciones analíticas

*Nota 4: Las indicaciones siguientes tienen carácter obligatorio para los métodos de tipo II.*

*Nota 5: Las condiciones analíticas se pueden modificar en función del laboratorio, en cuyo caso el método deja de considerarse de tipo II.*

Equipo de HPLC (4.3) con columna (4.4) y detector de índice de refracción (4.5)

Fase móvil: eluyente isocrático acetonitrilo/agua (3.10)

Flujo: 1 mL/min

Volumen inyectado: entre 10 µL y 50 µL (ajustar en función del material)

Pueden verse ejemplos de cromatogramas en las figuras 1 y 2 del anexo B.

Resolución fructosa-glucosa ≥ 2 es recomendada.

6.2.2 Calibrado externo

La solución de calibrado para los compuestos a los que se refiere el método podrá contener:

glicerol (3.6) 10 g/L ± 0,01 g/L,

fructosa (3.3) 10 g/L ± 0,01 g/L,

glucosa (3.4) 10 g/L ± 0,01 g/L,

sacarosa (3.5) 10 g/L ± 0,01 g/L.

*Nota 6: para las determinaciones de un único compuesto, puede prepararse una solución que contenga solamente dicho compuesto.*

*Certificado conforme  
Bento Gonçalves, 28 de octubre de 2016  
El Director General de la OIV  
Secretario de la Asamblea general*

*Jean-Marie AURAND*

6.3 Cálculo de los factores de respuesta para el calibrado externo utilizado en los análisis de rutina

$$RF_i = \text{área}_i / C_i$$

donde

$\text{área}_i$  = área del pico del producto de la solución de calibrado

$C_i$  = cantidad de producto presente en la solución de calibrado

También se puede emplear una recta de calibrado.

## 7. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

7.1 Cálculo de las concentraciones

$$C_e = \text{área}_e / RF_i$$

donde

$\text{área}_e$  = área del pico del producto presente en la muestra

Los resultados se expresan en g/L.

*Nota 7: los resultados deberán expresarse con un decimal como máximo.*

## 8. GARANTÍA Y CONTROL DE LA CALIDAD

La trazabilidad de la comparación entre referencias internacionales será hecha según la masa, el volumen y la temperatura. Las mezclas sintéticas de las que provengan las muestras, por ejemplo de inter comparación entre laboratorios serán utilizadas como control de calidad interno. Gráficos de control pueden ser utilizados.

## 9. EFICACIA DEL MÉTODO

Ningún compuesto conocido coeluye con la fructosa, la glucosa o la sacarosa.

Robustez: el análisis es sensible a pequeñas variaciones de temperatura. Las columnas deben estar termostalizadas.

## 10. PRECISIÓN

(Véase el anexo B.3).

10.1 Glucosa (concentración  $\geq 3$  g/L)

Límite de repetibilidad  $\cong$  límite de reproducibilidad = 13 %

10.2 Fructosa (concentración  $\geq 2$  g/L)

Límite de repetibilidad = 7 %

Límite de reproducibilidad = 10 %

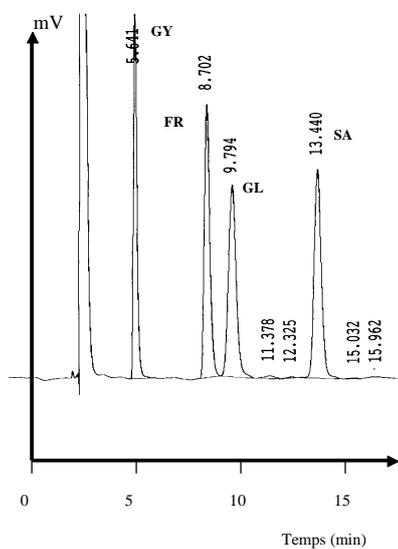
10.3 Glucosa + fructosa (concentración  $\geq 5$  g/L)

Límite de repetibilidad  $\cong$  límite de reproducibilidad = 10 %

*Certificado conforme  
Bento Gonçalves, 28 de octubre de 2016  
El Director General de la OIV  
Secretario de la Asamblea general*

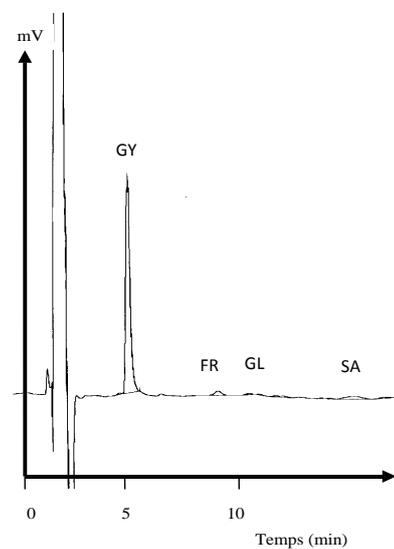
*Jean-Marie AURAND*

**Anexo A**  
(informativo)  
**Ejemplos de cromatogramas (HPLC)**



**Figura 1. Cromatograma de una solución patrón (azúcares y glicerol a 10 g/L)**

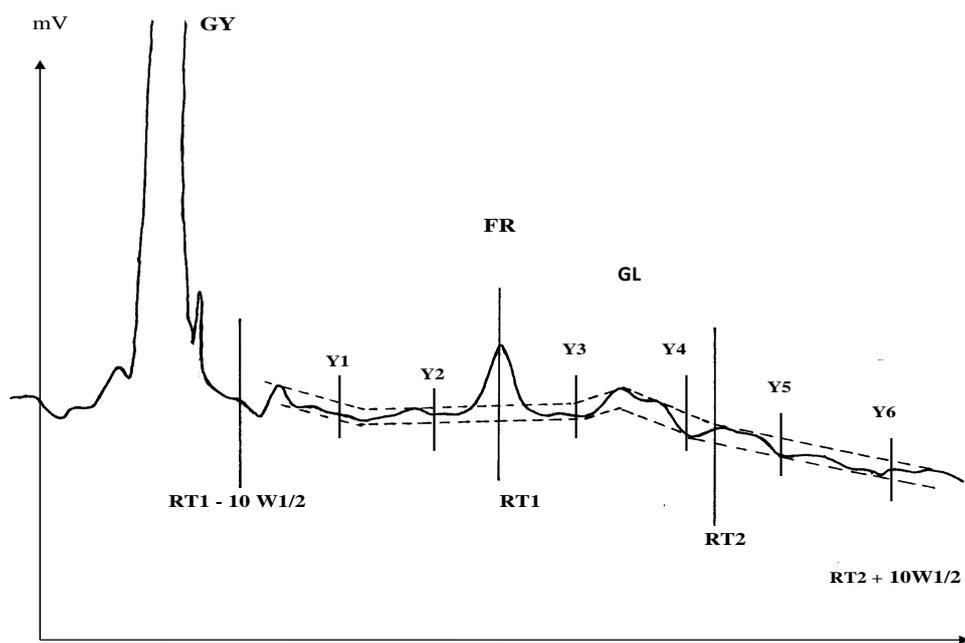
Glicerol (GY), fructosa (FR), glucosa (GL), sacarosa (SA)



**Figura 2. Cromatograma de un vino rosado**

*Certificado conforme*  
*Bento Gonçalves, 28 de octubre de 2016*  
*El Director General de la OIV*  
*Secretario de la Asamblea general*

*Jean-Marie AURAND*



**Figura 3. Medida de las alturas de ruido de fondo después de la ampliación del cromatograma**

fructosa (FR), glucosa (GL), sacarosa (SA) glicerol (GY);

RT1: tiempo de retención de la fructosa; RT2: tiempo de retención de la glucosa;  
 W1/2: anchura del pico a media altura; Yi: altura del ruido de fondo en el punto i

*Certificado conforme  
 Bento Gonçalves, 28 de octubre de 2016  
 El Director General de la OIV  
 Secretario de la Asamblea general*

*Jean-Marie AURAND*

## Anexo B

(informativo)

### Datos de precisión

#### **B.1 - Muestras del ensayo inter-laboratorios**

Este estudio fue dirigido por el Laboratorio Interregional de Lucha contra el Fraude de Burdeos. El ensayo fue realizado sobre 12 muestras (6 muestras distintas duplicadas ciegas) identificadas de A a J (4 vinos blancos y 4 vinos tintos; 2 vinos de Porto blancos y 2 vinos de Porto tintos) conteniendo glucosa y fructosa y cuyos contenidos de cada azúcar estaban comprendidos entre 2 y 65 g/L. Los vinos provienen de la región de Burdeos; fueron suplementados en glucosa y en fructosa y estabilizados con 100 mg/L de SO<sub>2</sub> (TRICARD y MEDINA 2003).

#### **B.2 - Condiciones cromatográficas**

Teniendo en cuenta los factores de respuesta de estos dos azúcares y de las escalas de los cromatogramas, el ruido de fondo corresponde a una concentración de fructosa de 0,04 g/L y de glucosa de 0,06 g/L (ver figura A3).

Se obtienen entonces los límites de detección (3 veces el ruido de fondo) y de cuantificación (10 veces el ruido de fondo):

$$LD_{\text{fructosa}} = 0,12 \text{ g/L}$$

$$LD_{\text{glucosa}} = 0,18 \text{ g/L}$$

$$LQ_{\text{fructosa}} = 0,4 \text{ g/L}$$

$$LQ_{\text{glucosa}} = 0,6 \text{ g/L}$$

Estos resultados están de acuerdo con aquellos determinados por TUSSEAU y BOUNIOL (1986) y son repetibles sobre otros cromatogramas.

#### **B.3 Precisión**

En el estudio participaron nueve laboratorios:

Instituto Experimental de Enología, Asti (Italia);

Laboratorio de la DGCCRF de Montpellier (Francia);

Laboratorio LARA, Toulouse (Francia);

Instituto del Vino de Oporto, Oporto (Portugal);

Instituto de la Vid y el Vino, Unhos (Portugal);

Estación de Viticultura y Enología, Vilafranca del Penedès (España);

Comité Interprofesional del Vino de Champagne, Epernay (Francia);

Estación Federal de Changins (Suiza);

Laboratorio de la DGCCRF de Talence (Francia).

Los análisis de los 3 puntos del rango de calibración y de las 12 muestras fueron realizados en serie aplicando el método de análisis suministrado.

Los resultados fueron evaluados según el protocolo OIV (Protocolo de validación de los métodos de análisis - Resolución OENO 6/1999).

Este protocolo establece que los análisis no deben ser repetidos; sin embargo, 4 laboratorios enviaron los resultados de los análisis repetidos 3 veces. Una sola serie fue elegida (la primera) para la evaluación de los resultados según el protocolo OIV.

*Certificado conforme  
Bento Gonçalves, 28 de octubre de 2016  
El Director General de la OIV  
Secretario de la Asamblea general*

*Jean-Marie AURAND*

Se llevaron a cabo los cálculos de repetibilidad según Youden, de reproducibilidad y fueron efectuados los tests de Cochran y de Grubbs.

Los datos de las repeticiones permitieron calcular de otra manera las desviaciones estándar de repetibilidad (según ISO 5725).

*Certificado conforme  
Bento Gonçalves, 28 de octubre de 2016  
El Director General de la OIV  
Secretario de la Asamblea general*

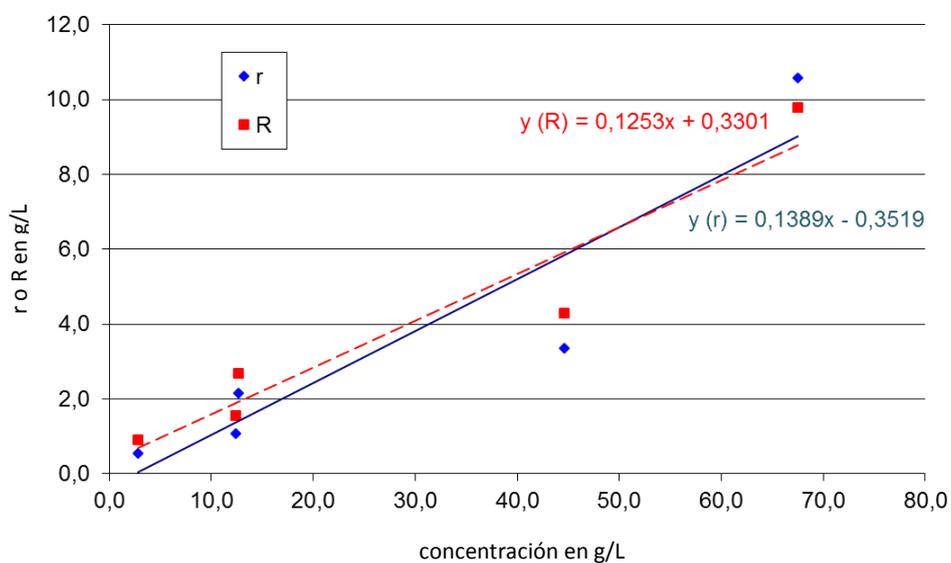
*Jean-Marie AURAND*

### B.3.1 - GLUCOSA

Glucosa por HPLC (en g/L)						
Número de laboratorios	9	9	9	9	9	9
Número de muestras	2	2	2	2	2	2
Valor medio	2,9	2,9	12,6	12,4	44,6	67,5
Desviación estándar de la repetibilidad	0,44	0,17	0,67	0,34	1,05	3,31
Límite de repetibilidad	1,42	0,55	2,15	1,07	3,35	10,58
Desviación estándar de la reproducibilidad	0,78	0,30	0,90	0,52	1,43	3,28
Límite de reproducibilidad	2,32	0,90	2,68	1,55	4,28	9,78
Horrat	5,7*	2,1	1,84	1,08	1,01	1,62

\* Valor no utilizado para calcular la precisión

Glucosa por HPLC  
r y R en función de la concentración de glucosa



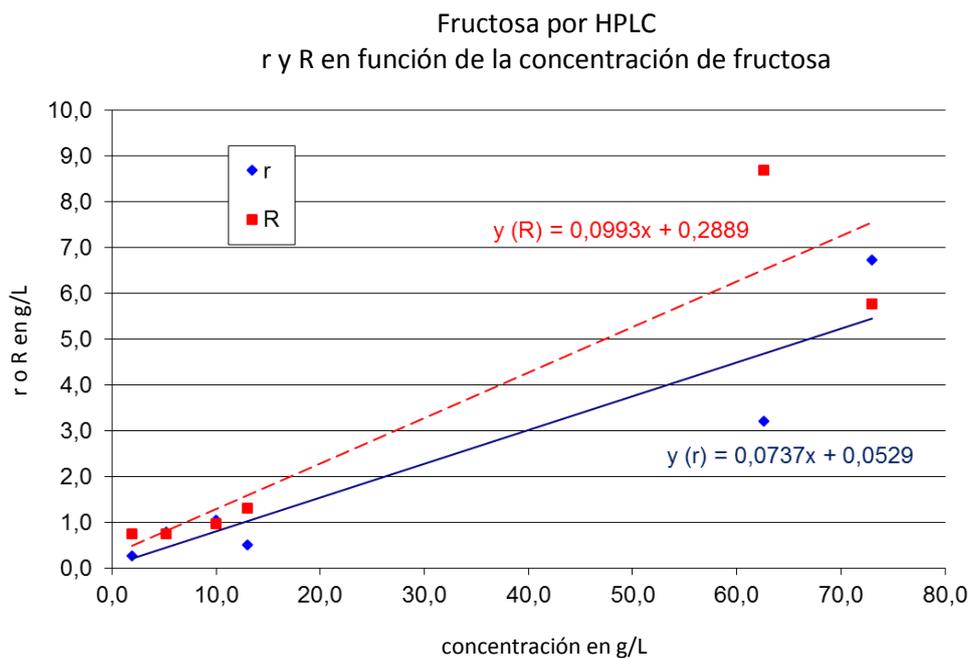
Correlación entre r y R y la concentración de glucosa (ISO 5725)

Certificado conforme  
Bento Gonçalves, 28 de octubre de 2016  
El Director General de la OIV  
Secretario de la Asamblea general

Jean-Marie AURAND

### B.3.2 - FRUCTOSA

Fructosa por HPLC (en g/L)						
Número de laboratorios	9	9	9	9	9	9
Número de muestras	2	2	2	2	2	2
Valor medio	1,9	5,2	10,0	13,0	62,6	73,0
Desviación estándar de la repetibilidad	0,09	0,24	0,32	0,16	3,20	2,10
Límite de repetibilidad	0,27	0,79	1,03	0,51	3,20	6,72
Desviación estándar de la reproducibilidad	0,25	0,25	0,32	0,43	2,91	1,93
Límite de reproducibilidad	0,75	0,75	0,96	1,30	8,68	5,77
Horrat	2,54	1,09	0,81	0,87	1,53	0,89



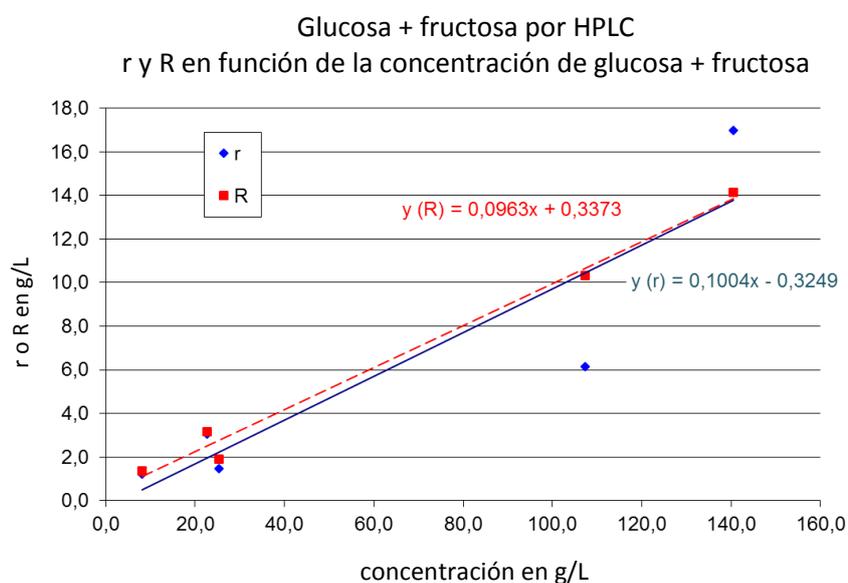
Certificado conforme  
Bento Gonçalves, 28 de octubre de 2016  
El Director General de la OIV  
Secretario de la Asamblea general

Jean-Marie AURAND

### B.3.3 - GLUCOSA + FRUCTOSA

Glucosa + fructosa por HPLC (en g/L)						
Número de laboratorios	9	9	9	9	9	9
Número de muestras	2	2	2	2	2	2
Valor medio	4,7	8,1	22,6	25,4	107,3	140,5
Desviación estándar de la repetibilidad	0,48	0,38	1,06	0,46	1,92	5,30
Límite de repetibilidad	1,52	1,21	3,07	1,48	6,13	17,0
Desviación estándar de la reproducibilidad	0,89	0,46	1,06	0,64	3,47	4,74
Límite de reproducibilidad	2,64	1,38	3,17	1,90	10,34	14,15
Horrat	4,17*	1,39	1,33	0,72	1,15	1,26

\* Valor no utilizado para calcular la precisión



Correlación entre r y R y la concentración de glucosa + fructosa (ISO 5725)

*Certificado conforme*  
Bento Gonçalves, 28 de octubre de 2016  
El Director General de la OIV  
Secretario de la Asamblea general

Jean-Marie AURAND

## Bibliografía

- TRICARD, C. y MEDINA, B., “Essai inter laboratoire OIV – Dosage des sucres dans les vins par HPLC”, *Feuille Vert 1143*, 2003, 8 páginas.
- TUSSEAU, D. y BOUNIOL, C., *Sc. Alim.*, n.º 6, 1986, pp. 559-577.
- TUSSEAU, D., “Limite de détection - limite de quantification”, *Feuille vert OIV 1000*, 1996.
- “Protocolo para la planificación, el desarrollo y la interpretación de los ensayos para la validación de los métodos de análisis”, *Resolución OIV-OENO 6-2000*.
- “Exactitud (veracidad y precisión) de resultados y métodos de medición”, *Norma ISO 5725*, 1994.

*Certificado conforme*  
*Bento Gonçalves, 28 de octubre de 2016*  
*El Director General de la OIV*  
*Secretario de la Asamblea general*

*Jean-Marie AURAND*