

REGLAMENTO (CE) Nº 440/2003 DE LA COMISIÓN
de 10 de marzo de 2003
que modifica el Reglamento (CEE) nº 2676/90 por el que se determinan los métodos de análisis
comunitarios aplicables en el sector del vino

LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Europea,

Visto el Reglamento (CE) nº 1493/1999 del Consejo, de 17 de mayo de 1999, por el que se establece la organización común del mercado vitivinícola ⁽¹⁾, cuya última modificación la constituye el Reglamento (CE) nº 2585/2001 ⁽²⁾, y, en particular, el primer párrafo del apartado 3 de su artículo 46,

Considerando lo siguiente:

- (1) El Reglamento (CEE) nº 2676/90 de la Comisión ⁽³⁾, cuya última modificación la constituye el Reglamento (CE) nº 1622/2000 ⁽⁴⁾, describe estos métodos de análisis en su anexo.
- (2) Se ha desarrollado y validado según criterios reconocidos internacionalmente un método de análisis del ácido D-málico adaptado a la medición de las bajas concentraciones de este ácido en los vinos. La Oficina Internacional de la Viña y del Vino adoptó la descripción de este nuevo método en su asamblea general de junio de 2002.
- (3) Se ha desarrollado y validado según criterios reconocidos internacionalmente un nuevo método de análisis de la relación isotópica del carbono del etanol del vino o del etanol obtenido por fermentación de mosto de uva, de mosto de uva concentrado o de mosto de uva concentrado y rectificado. La Oficina Internacional de la Viña y del Vino adoptó la descripción de este nuevo método en su asamblea general de 2001.
- (4) La utilización de estos métodos de análisis puede permitir un mejor control de la calidad y de la autenticidad de los vinos y evitar los litigios debidos a la aplica-

ción de métodos de control menos precisos, particularmente en relación con el aumento del grado alcohólico natural por mezcla de azúcares de distintas procedencias y con el control de la acidificación de los vinos por medio del ácido málico.

- (5) Es conveniente completar el método existente de determinación del ácido D-málico, descrito en el anexo del Reglamento (CEE) nº 2676/90, mediante la descripción del procedimiento aplicable a la determinación de bajas concentraciones y añadir la descripción del nuevo método isotópico para analizar el carbono del etanol.
- (6) Las medidas previstas en el presente Reglamento se ajustan al dictamen del Comité de gestión del vino.

HA ADOPTADO EL PRESENTE REGLAMENTO:

Artículo 1

El anexo del Reglamento (CEE) nº 2676/90 se modificará como sigue:

- 1) En el capítulo 20 «Ácido D-málico», el punto 8 será sustituido por el texto que figura en el anexo I del presente Reglamento.
- 2) Se añadirá el capítulo 45 que figura en el anexo II del presente Reglamento.

Artículo 2

El presente Reglamento entrará en vigor el séptimo día siguiente al de su publicación en el *Diario Oficial de la Unión Europea*.

El presente Reglamento será obligatorio en todos sus elementos y directamente aplicable en cada Estado miembro.

Hecho en Bruselas, el 10 de marzo de 2003.

Por la Comisión

Franz FISCHLER

Miembro de la Comisión

⁽¹⁾ DO L 179 de 14.7.1999, p. 1.

⁽²⁾ DO L 345 de 29.12.2001, p. 10.

⁽³⁾ DO L 272 de 3.10.1990, p. 1.

⁽⁴⁾ DO L 194 de 31.7.2000, p. 1.

ANEXO I

«8. DETERMINACIÓN DEL ÁCIDO D-MÁLICO (D(+)-MÁLICO) EN VINOS A BAJA CONCENTRACIÓN

8.1. **Ámbito de aplicación**

El método descrito es aplicable a la determinación enzimática del ácido D-málico de los vinos a concentraciones inferiores a 50 mg/l.

8.2. **Principio**

El fundamento del método se describe en el punto 1. La formación de NADH, medida por el aumento de la absorbancia a la longitud de onda de 340 nm, es proporcional a la cantidad de D-malato presente, tras la introducción en la cubeta de medición de una cantidad de ácido D-málico equivalente a 50 mg/l.

8.3. **Reactivos**

Solución de ácido D-málico de 0,199 g/l, además de los reactivos indicados en el punto 2.

8.4. **Equipo**

El equipo se indica en el punto 3.

8.5. **Preparación de la muestra**

La preparación de la muestra se indica en el punto 4.

8.6. **Procedimiento**

El procedimiento se indica en el punto 5, pero introduciendo en la cubeta de medición de una cantidad de ácido D-málico equivalente a 50 mg/l (introducción de 0,025 ml de una solución de ácido D-málico de 0,199 g/l, en sustitución de un volumen equivalente de agua); los valores obtenidos se rebajan en 50 mg/l.

8.7. **Validación interna**

El cuadro siguiente resume los datos de validación interna del método de determinación del ácido D-málico previa adición de 50 mg/l de este isómero.

Gama de trabajo	De 0 mg a 70 mg de ácido D-málico por litro. Entre estos límites, el método es lineal, con un coeficiente de correlación entre 0,990 y 0,994
Límite de cuantificación	24,4 mg/l
Límite de detección	8,3 mg/l
Sensibilidad	0,0015 abs/mg/l
Tasa de recuperación	De 87,5 a 115,0 % en los vinos blancos y de 75 a 105 % en los vinos tintos
Repetibilidad	= 12,4 mg/l en los vinos blancos (según el método de la OIV, = 12,5 mg/l) = 12,6 mg/l en los vinos tintos (según el método de la OIV, = 12,7 mg/l)
Coefficiente de variación	De 4,2% a 7,6 % (vinos blancos y vinos tintos)
Variabilidad intralaboratorios	CV = 7,4 % (s=4,4 mg/l; media = 59,3 mg/l)»

ANEXO II

«45. DETERMINACIÓN DE LA RELACIÓN ISOTÓPICA $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ POR ESPECTROMETRÍA DE MASA ISOTÓPICA DEL ETANOL DEL VINO O DEL ETANOL OBTENIDO POR FERMENTACIÓN DE MOSTOS, MOSTOS CONCENTRADOS O MOSTOS CONCENTRADOS RECTIFICADOS

1. ÁMBITO DE APLICACIÓN

El método permite la medición de la relación isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ del etanol del vino y del etanol obtenido por fermentación de productos derivados de la vid (mosto, mosto concentrado, mosto concentrado rectificado).

2. REFERENCIAS NORMATIVAS

ISO:	5725 :1994 "Fidelidad de los métodos de ensayo: Determinación de la repetibilidad y de la reproducibilidad de un método de ensayo normalizado por ensayos interlaboratorios".
V-PDB:	Belemnite Viena Pee-Dee ($R_{\text{PDB}} = 0,0112372$).
Método 8 del anexo del presente Reglamento:	"Detección del aumento del grado alcohólico natural de mostos, mostos concentrados, mostos concentrados rectificados y vinos por aplicación de la resonancia magnética nuclear del deuterio (FINE-RMN)"

3. TERMINOLOGÍA Y DEFINICIONES

$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$:	Relación de los isótopos del carbono 13 (^{13}C) y del carbono 12 (^{12}C) en una muestra dada.
$\delta^{13}\text{C}$:	Contenido en carbono 13 (^{13}C) expresado en partes por mil (‰).
FINE-RMN:	Fraccionamiento isotópico natural específico estudiado por resonancia magnética nuclear.
V-PDB:	Belemnite Viena Pee-Dee. El PDB, referencia primaria para la medición de las variaciones naturales de los contenidos isotópicos en carbono 13, era un carbonato de calcio procedente de un rostró de Belemnite del Cretácico, de la formación Pee-Dee de Carolina del Sur (EEUU). Su relación isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ o R_{PDB} es $R_{\text{PDB}} = 0,0112372$. El PDB está agotado desde hace mucho tiempo, pero sigue siendo la referencia primaria para expresar las variaciones naturales de los contenidos isotópicos en carbono 13, frente a la que se calibran los materiales de referencia, disponibles en el Organismo Internacional de la Energía Atómica (OIEA) de Viena (Austria). Las determinaciones isotópicas de la presencia natural de carbono 13 se expresan entonces, por convención, respecto al V-PDB.
m/z:	Relación masa/carga.

4. PRINCIPIO

En la fotosíntesis, la asimilación del gas carbónico por los vegetales se efectúa según dos tipos principales de metabolismo, que son los metabolismos C_3 (ciclo de Calvin) y C_4 (Hatch y Slack). Estos dos mecanismos de fotosíntesis presentan un fraccionamiento isotópico diferente. De esta manera, los productos de las plantas C_4 , como los azúcares y el alcohol obtenido por fermentación, presentan contenidos en carbono 13 más elevados que los de sus homólogos procedentes de plantas C_3 . La mayoría de los vegetales, como la vid y la remolacha, pertenecen al grupo C_3 , mientras que la caña de azúcar y el maíz pertenecen al grupo C_4 . La medición del contenido en carbono 13 permite, así pues, la detección y la evaluación del azúcar de origen C_4 (azúcar de caña o isoglucosa de maíz) añadido a los productos derivados de la uva (mosto de uva, vinos, etc.). La combinación de la información sobre el contenido en carbono 13 con la obtenida mediante FINE-RMN permite igualmente la cuantificación de la adición de mezclas de azúcares o de alcoholes procedentes de plantas C_3 y C_4 .

El contenido en carbono 13 se determina en el gas carbónico resultante de la combustión completa de la muestra. La concentración de los principales isotopómeros de masas 44 ($^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2$), 45 ($^{13}\text{C}^{16}\text{O}_2$ y $^{12}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O}$) y 46 ($^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$), resultado de las diferentes combinaciones posibles de los isótopos ^{18}O , ^{17}O , ^{16}O , ^{13}C y ^{12}C , se determina a partir de las corrientes iónicas medidas en tres colectores diferentes de un espectrómetro de masa isotópica. Las aportaciones de los isotopómeros $^{13}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O}$ y $^{12}\text{C}^{17}\text{O}_2$ pueden despreciarse debido a su escasísima proporción. La corriente iónica correspondiente a $m/z = 45$ se corrige para tener en cuenta la aportación de $^{12}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O}$, que se calcula en función de la intensidad de la corriente medida correspondiente a $m/z = 46$, considerando las concentraciones relativas de ^{18}O y ^{17}O (corrección de Craig). La comparación con una referencia calibrada frente a la referencia internacional V-PDB permite calcular el contenido en carbono 13 en la escala relativa de $\delta^{13}\text{C}$.

5. REACTIVOS

Las sustancias de referencia y los materiales fungibles dependen del equipo (6) utilizado por el laboratorio. Los sistemas generalmente utilizados se basan en el analizador elemental. Este puede estar diseñado para la introducción de muestras colocadas en cápsulas metálicas herméticamente cerradas, o para la inyección de muestras líquidas a través de una membrana mediante una jeringa.

Según el tipo de instrumentación utilizado, pueden utilizarse las siguientes sustancias de referencia, reactivos y materiales fungibles:

- Sustancias de referencia
- disponibles en el OIEA:

Nombre	Sustancia	$\delta^{13}\text{C}$ frente a V-PDB (9)
— IAEA-CH-6	sacarosa	- 10,4 ‰
— IAEA-CH-7	polietileno	- 31,8 ‰
— NBS22	aceite	- 29,7 ‰
— USGS24	grafito	- 16,1 ‰

- disponibles en el IRMM de Geel (B) (Instituto de Materiales y Medidas de Referencia):

Nombre	Sustancia	$\delta^{13}\text{C}$ frente a V-PDB (9)
— CRM/BCR 656	alcohol de vino	- 26,93 ‰
— CRM/BCR 657	glucosa	- 10,75 ‰
— CRM/BCR 660	solución hidroalcohólica (graduación alcohólica 12 % vol.)	- 26,72 ‰

- Patrón de trabajo con una relación $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ conocida, calibrado frente a materiales de referencia internacionales.
- La lista indicativa de materiales fungibles que figura a continuación corresponde a los sistemas de flujo continuo:
 - helio para análisis (CAS 07440-59-7),
 - oxígeno para análisis (CAS 07440-44-7),
 - dióxido de carbono para análisis, utilizado como gas de referencia secundaria del contenido en carbono 13 (CAS 00124-38-9),
 - reactivo de oxidación para el horno del sistema de combustión, como por ejemplo óxido de cobre (II) para análisis elemental (CAS 1317-38-0),
 - desecante para eliminar el agua producida por la combustión, por ejemplo anhídrona para análisis elemental (perclorato de magnesio) (CAS 10034-81-8) (innecesario en los equipos dotados de un sistema de eliminación del agua por separación mediante el frío o mediante un capilar con permeabilidad selectiva).

6. EQUIPO Y MATERIAL

6.1. Espectrómetro de masa de relación isotópica (EMRI)

Espectrómetro de masa de relación isotópica (EMRI), que permita determinar el contenido natural relativo en ^{13}C del gas CO_2 con una precisión interna del 0,05 ‰ o mejor expresado en valor relativo (9). La precisión interna se define aquí como la diferencia entre dos medidas de la misma muestra de CO_2 . El espectrómetro de masa, destinado a la medida de relaciones isotópicas, está equipado generalmente con un colector triple para medir simultáneamente las intensidades correspondientes a $m/z = 44, 45$ y 46 . El espectrómetro de masa de relación isotópica debe estar equipado con un sistema de introducción doble para medir en alternancia la muestra problema y una referencia, o bien utilizar un sistema integrado que efectúe la combustión cuantitativa de las muestras y separe el dióxido de carbono de los demás productos de combustión antes de la medición en el espectrómetro de masa.

6.2. Equipo de combustión

Equipo de combustión capaz de convertir cuantitativamente el etanol en dióxido de carbono y de eliminar todos los demás productos de combustión, incluida el agua, sin ningún fraccionamiento isotópico. El equipo puede ser un sistema de flujo continuo integrado en la instrumentación de espectrometría de masa (6.2.1), o bien un sistema autónomo de combustión (6.2.2). El equipo debe permitir la obtención de una precisión al menos equivalente a la indicada en (11).

6.2.1. Sistemas de flujo continuo

Están constituidos por un analizador elemental o por un cromatógrafo de fase gaseosa dotado de un sistema de combustión en línea.

En caso de sistemas equipados para la introducción de muestras contenidas en cápsulas metálicas, se utiliza el material de laboratorio siguiente:

- microjeringa o micropipeta aforada con puntas apropiadas,
- balanza con escala de lectura de 1 µg al menos,
- pinzas para encapsular,
- cápsulas de estaño para muestras líquidas,
- cápsulas de estaño para muestras sólidas.

Nota: A fin de limitar los riesgos de evaporación de las muestras de etanol, es posible poner en las cápsulas un material absorbente (por ejemplo, *chromosorb W 45-60 mesh*) del cual se habrá comprobado previamente, mediante un ensayo en blanco, que no lleva ninguna cantidad significativa de carbono que pueda alterar los resultados.

Si se emplea un analizador elemental dotado de inyector para líquidos o en caso de sistema de preparación por cromatografía-combustión, se utiliza el material de laboratorio siguiente:

- jeringa para líquidos,
- frascos provistos de cierres estancos y de membranas inertes.

Los materiales de laboratorio indicados en las listas anteriores se dan a título de ejemplo y pueden sustituirse por otros materiales de características equivalentes según el tipo de equipo de combustión y de espectrometría de masa utilizado por el laboratorio.

6.2.2. Sistemas autónomos de preparación

En este caso, las muestras de dióxido de carbono procedentes de la combustión de las muestras problema y de la referencia se recogen en ampollas que se instalan a continuación en el doble sistema de entrada del espectrómetro para efectuar el análisis isotópico. Puede utilizarse varios tipos de equipos de combustión descritos en la bibliografía:

- sistema cerrado de combustión llenado con gas oxígeno circulante,
- analizador elemental con flujo de helio y de oxígeno,
- ampolla herméticamente cerrada, de cristal, rellena de óxido de cobre (II) como agente de oxidación.

7. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PROBLEMA

El etanol debe extraerse del vino antes de la determinación isotópica. Esta extracción se efectúa mediante destilación del vino, como se describe en el punto 3.1 del método nº 8 (FINE-RMN).

Cuando se trate de mosto de uva, de mosto de uva concentrado y de mosto de uva concentrado rectificado, los azúcares deben fermentarse en primer lugar para convertirse en etanol, como se describe en el punto 3.2 del método nº 8.

8. PROCEDIMIENTO

Todas las etapas preparatorias deben efectuarse evitando que se pierda por evaporación cualquier cantidad significativa de etanol, lo que podría cambiar la composición isotópica de la muestra.

La descripción que figura a continuación hace referencia a los procedimientos utilizados generalmente para la combustión de muestras de etanol por medio de sistemas automatizados de combustión presentes en el comercio. Para la preparación del dióxido de carbono a fines de análisis isotópico pueden convenir otros métodos, siempre que garanticen que la muestra de etanol se convierte cuantitativamente en dióxido de carbono, sin ninguna pérdida de etanol por evaporación.

Procedimiento experimental basado en la utilización de un analizador elemental:

a) Encapsulado de las muestras

- utilizar cápsulas, pinzas y placa de preparación limpias,
- con ayuda de las pinzas, tomar una cápsula de dimensiones apropiadas,
- introducir el volumen necesario de líquido en la cápsula mediante la micropipeta,
- *Nota:* Para obtener 2 mg de carbono hacen falta 3,84 mg de etanol absoluto o 4,17 mg de destilado con un grado alcohólico de 92 % m/m. Debe calcularse de la misma manera la cantidad adecuada de destilado según la cantidad de carbono necesaria en función de la sensibilidad del equipo de espectrometría de masa,
- cerrar la cápsula con ayuda de las pinzas,

- cada cápsula debe cerrarse de forma totalmente hermética; en caso contrario, hay que eliminar la cápsula defectuosa y preparar una nueva,
 - preparar dos cápsulas de cada muestra,
 - poner las cápsulas en el lugar adecuado sobre la placa del introductor automático de muestras del analizador elemental; cada cápsula debe identificarse cuidadosamente con un número de orden,
 - poner sistemáticamente cápsulas que contengan referencias de trabajo al principio y al final de la serie de muestras,
 - introducir regularmente muestras de control en la serie de muestras.
- b) Control y ajuste del equipo de análisis elemental y de espectrometría de masa
- ajustar la temperatura de los hornos del analizador elemental y los flujos de gas de helio y de oxígeno para una combustión óptima de la muestra,
 - verificar la ausencia de fugas en el sistema de análisis elemental y de espectrometría de masa (por ejemplo, controlando la corriente iónica de $m/z = 28$, correspondiente al N_2),
 - ajustar el espectrómetro de masa para medir las intensidades de las corrientes iónicas correspondientes a $m/z = 44, 45$ y 46 ,
 - verificar el sistema con ayuda de muestras de control conocidas antes de comenzar las mediciones de las muestras.

c) Desarrollo de una serie de mediciones

Se introducen sucesivamente las muestras situadas en el introductor automático de muestras del analizador elemental (o del cromatógrafo). El dióxido de carbono de cada combustión de una muestra se eluye hacia el espectrómetro de masa que mide las corrientes iónicas. El ordenador acoplado al equipo registra las intensidades de corriente iónica y calcula los valores δ correspondientes a cada muestra (9).

9. CÁLCULO

El objetivo del método consiste en medir la relación isotópica $^{13}C/^{12}C$ del etanol extraído a partir del vino o a partir de productos derivados de la uva previa fermentación. La relación isotópica $^{13}C/^{12}C$ puede expresarse mediante su desviación respecto a una referencia de trabajo. La desviación isotópica del carbono 13 ($\delta^{13}C$) se calcula entonces en una escala delta por mil ($\delta/1000$) comparando los resultados obtenidos con la muestra problema frente a los de la referencia de trabajo, calibrada anteriormente respecto a la referencia primaria internacional (V-PDB). Los valores $\delta^{13}C$ se expresan respecto a la referencia de trabajo según la fórmula siguiente:

$$\delta^{13}C_{\text{muestra/ref}} \text{‰} = 1\,000 \times (R_{\text{muestra}} - R_{\text{ref}}) / R_{\text{ref}}$$

donde R_{muestra} y R_{ref} son, respectivamente, las relaciones isotópicas $^{13}C/^{12}C$ de la muestra y del dióxido de carbono utilizado como gas de referencia.

Los valores $\delta^{13}C$ se expresan entonces respecto a la referencia V-PDB según la fórmula siguiente:

$$\delta^{13}C_{\text{muestra/V-PDB}} \text{‰} = \delta^{13}C_{\text{muestra/ref}} + \delta^{13}C_{\text{ref/V-PDB}} + (\delta^{13}C_{\text{muestra/ref}} \times \delta^{13}C_{\text{ref/V-PDB}}) / 1\,000,$$

donde $\delta^{13}C_{\text{ref/V-PDB}}$ es la desviación isotópica, determinada previamente, de la referencia de trabajo respecto al V-PDB.

Durante la medición en línea, pueden observarse pequeñas desviaciones debidas a la variación de las condiciones instrumentales. En este caso, las $\delta^{13}C$ de las muestras deben corregirse en función de la diferencia entre el valor $\delta^{13}C$ medido con el patrón de trabajo y su verdadero valor, calibrado previamente frente al V-PDB, comparando con uno de los materiales de referencia internacionales. Puede aceptarse que, entre dos mediciones del patrón de trabajo, son lineales la desviación y, por tanto, la corrección que debe aplicarse a los resultados de las muestras. El patrón de trabajo debe medirse al principio y al final de todas las series de muestras. Después puede calcularse la corrección respecto a cada muestra por medio de una interpolación lineal.

10. CONTROL Y GARANTÍA DE CALIDAD

Controlar que el valor ^{13}C de la referencia de trabajo no difiere en más del 0,5 ‰ del valor admitido. En caso contrario, habrá que controlar los ajustes del equipo de espectrometría y, eventualmente, proceder a un reajuste.

Con cada muestra, verificar que la diferencia de resultados entre las dos cápsulas medidas sucesivamente es inferior al 0,3 ‰. El resultado final correspondiente a una muestra dada es el valor medio de las dos cápsulas. Si la diferencia es superior al 0,3 ‰, debe repetirse la medición.

El control de la corrección de la medición puede basarse en la intensidad de la corriente iónica correspondiente a $m/z = 44$, que es proporcional a la cantidad de carbono inyectado en el analizador elemental. En condiciones típicas, la intensidad de esta corriente iónica debería ser prácticamente constante con las muestras analizadas. Una desviación significativa debe hacer sospechar una evaporación de etanol (por ejemplo, en caso de una cápsula mal cerrada) o bien una inestabilidad del analizador elemental o del espectrómetro de masa.

11. CARACTERÍSTICAS DEL MÉTODO (PRECISIÓN)

Se realizó un primer estudio en colaboración (11.1) con destilados de alcoholes de origen vínico, y de alcoholes de caña y de remolacha, así como diferentes mezclas de estos tres orígenes. Dado que este estudio no tenía en cuenta la etapa de destilación, se ha prestado atención asimismo a datos complementarios procedentes de otros ensayos interlaboratorios realizados con vinos (11.2) y, especialmente, de grupos de ensayos de aptitud (11.3) para las mediciones isotópicas. Los resultados demuestran que los diferentes sistemas de destilación utilizados en condiciones satisfactorias y, en particular, los aplicables en las mediciones FINE-RMN no introducen una variabilidad significativa en las determinaciones de $\delta^{13}\text{C}$ del etanol del vino. Los parámetros de fidelidad observados respecto a los vinos son casi idénticos a los obtenidos en el estudio en colaboración (11.1) con los destilados.

11.1. Estudio en colaboración sobre los destilados

Año del estudio interlaboratorios: 1996
 Número de laboratorios: 20
 Número de muestras: 6 muestras con ocultación doble
 Analito: $\delta^{13}\text{C}$ del etanol

Código de las muestras	Alcohol de origen vínico	Alcohol de remolacha	Alcohol de caña
A & G	80 %	10 %	10 %
B & C	90 %	10 %	0 %
D & F	0 %	100 %	0 %
E & I	90 %	0 %	10 %
H & K	100 %	0 %	0 %
J & L	0 %	0 %	100 %

Muestras	A/G	B/C	D/F	E/I	H/K	J/L
Número de laboratorios seleccionados previa eliminación de los valores anómalos	19	18	17	19	19	19
Número de resultados aceptados	38	36	34	38	38	38
Valor medio ($\delta^{13}\text{C}$) ‰	- 25,32	- 26,75	- 27,79	- 25,26	- 26,63	- 12,54
S_r^2	0,0064	0,0077	0,0031	0,0127	0,0069	0,0041
Desviación típica de la repetibilidad (S_r) ‰	0,08	0,09	0,06	0,11	0,08	0,06
Límite de repetibilidad r ($2,8 \times S_r$) ‰	0,22	0,25	0,16	0,32	0,23	0,18
S_R^2	0,0389	0,0309	0,0382	0,0459	0,0316	0,0584
Desviación típica de la reproducibilidad (S_R) ‰	0,20	0,18	0,20	0,21	0,18	0,24
Límite de reproducibilidad R ($2,8 \times S_R$) ‰	0,55	0,49	0,55	0,60	0,50	0,68

11.2. Estudio interlaboratorios con dos vinos y un alcohol

Año del estudio interlaboratorios:	1996
Número de laboratorios:	14 respecto a la destilación de los vinos, 7 de los cuales también respecto a la medición de $\delta^{13}\text{C}$ del etanol de los vinos 8 respecto a la medición de $\delta^{13}\text{C}$ de la muestra de alcohol
Número de muestras:	3 (vino blanco de graduación 9,3 % vol., vino blanco de graduación 9,6 % vol. y alcohol de graduación 93 % m/m).
Analito:	$\delta^{13}\text{C}$ del etanol

Muestras	Vino tinto	Vino blanco	Alcohol
Número de laboratorios	7	7	8
Número de resultados aceptados	7	7	8
Valor medio ($\delta^{13}\text{C}$) ‰	- 26,20	- 26,20	- 25,08
Varianza de la reproducibilidad S_R^2	0,0525	0,0740	0,0962
Desviación típica de la reproducibilidad (S_R) ‰	0,23	0,27	0,31
Límite de reproducibilidad R ($2,8 \times S_R$) ‰	0,64	0,76	0,87

Los laboratorios participantes han utilizado diferentes sistemas de destilación. Las determinaciones isotópicas de $\delta^{13}\text{C}$ realizadas en un solo laboratorio con el conjunto de los destilados devueltos por los participantes no muestran ningún valor anómalo ni significativamente distinto de los valores medios. La varianza de los resultados ($S^2 = 0,0059$) es comparable a las varianzas de la repetibilidad S_r^2 del estudio en colaboración sobre los destilados (11.1).

11.3. Resultados de los ejercicios de los grupos de aptitud para los ensayos isotópicos

Desde diciembre de 1994 se organizan regularmente ejercicios internacionales de aptitud para las determinaciones isotópicas de los vinos y alcoholes (destilados de graduación 96 % vol.). Los resultados permiten a los laboratorios participantes controlar la calidad de sus análisis. La explotación estadística de los resultados permite apreciar la variabilidad de las determinaciones en condiciones de reproducibilidad y, de esta manera, estimar los parámetros de varianza y de límite de reproducibilidad. Los resultados obtenidos con las determinaciones de $\delta^{13}\text{C}$ del etanol de los vinos y destilados se resumen en el cuadro siguiente:

Fecha	Vinos				Destilados			
	N	S_R	S_R^2	R	N	S_R	S_R^2	R
Diciembre 1994	6	0,210	0,044	0,59	6	0,151	0,023	0,42
Junio 1995	8	0,133	0,018	0,37	8	0,147	0,021	0,41
Diciembre 1995	7	0,075	0,006	0,21	8	0,115	0,013	0,32
Marzo 1996	9	0,249	0,062	0,70	11	0,278	0,077	0,78
Junio 1996	8	0,127	0,016	0,36	8	0,189	0,036	0,53
Septiembre 1996	10	0,147	0,022	0,41	11	0,224	0,050	0,63
Diciembre 1996	10	0,330	0,109	0,92	9	0,057	0,003	0,16
Marzo 1997	10	0,069	0,005	0,19	8	0,059	0,003	0,16
Junio 1997	11	0,280	0,079	0,78	11	0,175	0,031	0,49
Septiembre 1997	12	0,237	0,056	0,66	11	0,203	0,041	0,57
Diciembre 1997	11	0,127	0,016	0,36	12	0,156	0,024	0,44
Marzo 1998	12	0,285	0,081	0,80	13	0,245	0,060	0,69
Junio 1998	12	0,182	0,033	0,51	12	0,263	0,069	0,74
Septiembre 1998	11	0,264	0,070	0,74	12	0,327	0,107	0,91
Media ponderada		0,215	0,046	0,60		0,209	0,044	0,59

N: número de laboratorios participantes

11.4. Límites de repetibilidad y de reproducibilidad

Así pues, los datos de los diferentes ejercicios interlaboratorios presentados en los cuadros anteriores permiten establecer para el presente método, incluyendo igualmente la etapa de destilación, los límites de repetibilidad y de reproducibilidad siguientes:

Límite de repetibilidad r : 0,24

Límite de reproducibilidad R : 0,6.»
