

Instituto Nacional de Vitivinicultura

VITIVINICULTURA

Resolución 23/2006

Oficialízase el método "Determinación por HPLC de Nueve Antocianos Principales en Vinos Tintos y Rosados".

Mza., 23/10/2006

VISTO el Expediente N° 311-000461/2006-2, por el cual se tramita la oficialización del método de determinación por HPLC de NUEVE (9) antocianos principales en vinos tintos y rosados, y

CONSIDERANDO:

Que la mencionada determinación posibilita el control de la autenticidad de vinos tintos y rosados con relación a la variedad que le dio origen a través de la determinación del perfil de antocianos por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC).

Que desde el año 2003 esta determinación es método oficial de la ORGANIZACION INTERNACIONAL DE LA VIÑA Y EL VINO (O.I.V.).

Que la REPUBLICA ARGENTINA es país miembro de la O.I.V., representación ejercida por el INSTITUTO NACIONAL VITIVINICULTURA, y ha participado en la aprobación de este método.

Que el mencionado método ha sido validado con la participación de Laboratorios de reconocido prestigio internacional y la misma ha sido publicada conjuntamente con el método en la Resolución OENO 22/2003.

Que esta determinación tiene el respaldo científico suficiente como para adoptarse como norma de control oficial por el I.N.V.

Que Subgerencia de Asuntos Jurídicos ha tomado la intervención de su competencia.

Por ello, y en uso de las facultades conferidas por las Leyes Nros. 14.878 y 24.566 y los Decretos Nros. 1279/03 y 1241/05,

EL PRESIDENTE DEL INSTITUTO NACIONAL DE VITIVINICULTURA

RESUELVE:

1° — Oficialízase el método "DETERMINACION POR HPLC de NUEVE (9) ANTOCIANOS PRINCIPALES EN VINOS TINTOS Y ROSADOS" que, junto a su VALIDACION, obran como ANEXO en la presente Resolución, en sus versiones en idioma español.

2° — Regístrese, comuníquese, publíquese, dése a la Dirección Nacional del Registro Oficial para su publicación y cumplimiento, archívese. — Raúl H. Guiñazú.

ANEXO A LA RESOLUCION N° C.23/06.

DETERMINACION POR HPLC DE NUEVE (9) ANTOCIANOS PRINCIPALES EN EL

VINO TINTO Y ROSADO

1. CAMPO DE APLICACION

El método analítico concierne a la determinación de la composición relativa de los antocianos en el vino tinto y rosado. La separación es realizada por HPLC con una columna de fase reversa y detección UV-VIS.

2. PRINCIPIO

Separación de los CINCO (5) antocianos no acilados más importantes (ver Figura 1 picos 1-5) y de los cuatro antocianos acilados principales (ver Figura 1, picos 6-9).

Análisis del vino tinto o rosado por separación directa en HPLC utilizando una columna de fase reversa con una elución por gradiente de agua/ácido fórmico/acetonitrilo con una detección a 518 nm.

3. REACTIVOS y MATERIALES

Acido fórmico (p.a. 98 %) (CAS 64-18-6)

Agua, pureza HPLC

Acetonitrilo, pureza HPLC (CAS 75-08-8)

Solventes HPLC:

Solvente A: Agua/ácido fórmico/acetonitrilo 87:10:3 (v/v/v)

Solvente B: Agua/ácido fórmico/acetonitrilo 40:10:50 (v/v/v)

Filtro de membrana para desgasificar los solventes HPLC y preparar las muestras a analizar.

Productos de referencia para la identificación de los picos.

La dosificación por HPLC de los antocianos del vino es difícil de realizar debido a la ausencia de productos puros disponibles en el comercio. Además, los antocianos son extremadamente inestables en solución.

Los siguientes pigmentos antociánicos se encuentran en el comercio:

Cianidina-3-glucósido (igualmente Clorhidrato de cumarina); $M = 484,84 \text{ g/mol}$

Peonidina-3-glucósido; $M = 498,84 \text{ g/mol}$

Malvidina-3-glucósido (igualmente Clorhidrato de enonina); $M = 528,84 \text{ g/mol}$

Malvidina-3,5-diglucósido (igualmente Clorhidrato de malvidina); $M = 691,04 \text{ g/mol}$

4. APARATOS:

Un sistema de HPLC con:

- Una bomba binaria a gradiente, un sistema de inyección para volúmenes de muestra de 10 a 200 μI .
- Un detector con arreglo de diodos o un detector UV de rango visible
- Un integrador o un ordenador con un programa informático de adquisición de datos
- Un horno que permita calentar las columnas a 40° C

e. Un sistema de desgasificación de solventes

f. Una columna analítica, por ejemplo: LiChrospher 100 RP18 (5 µm) en LiChroCart 250-4

g. Una pre-columna, por ejemplo: RP18 (30-40 µm) en cartucho de 2 mm de diámetro x 20 mm de largo

5. PROCEDIMIENTO

5.1. Preparación de las muestras

Los vinos límpidos son inyectados directamente sin preparación previa o colocados en los viales del inyector automático de muestras. Las muestras turbias, previo a analizarse por HPLC, deben ser filtradas por filtro-membrana de 0,45 µm. La primera parte del filtrado debe ser descartada.

Dado que el rango de linealidad de la absorción en función de la concentración de los antocianos es extensa, es posible regular los volúmenes de inyección entre 10 y 200 µI en función de la intensidad del color del vino.

No se ha observado ninguna diferencia significativa entre los resultados obtenidos para diferentes volúmenes de inyección.

5.2. Análisis

Condiciones HPLC

El análisis HPLC se desarrolla en las siguientes condiciones:

Volumen de inyección:	50 µI (vino tinto) hasta 200 µI (vino rosado)
Caudal:	0,8 ml/minuto
Temperatura:	40°C
Tiempo de análisis:	45 minutos
Tiempo de retorno a las condiciones iniciales:	5 minutos
Detección:	518 nm

Gradiente de elución:

Tiempo (min)	Solvente A % (v/v)	Solvente B % (v/v)
0	94	6
15	70	30
30	50	50
35	40	60
41	94	6

Para verificar la eficacia de la columna, la cantidad de platos teóricos (N) calculada con relación a la malvidina-3-glucósido no debe ser inferior a 20000, la resolución (R) entre la peonidina-3-cumarilado glucósido y malvidina-3-cumarilado glucósido no debe ser inferior a 1,5. Por debajo de estos valores, se recomienda utilizar una nueva columna.

La Figura 1 muestra un cromatograma, donde se separan las siguientes antocianinas:

Grupo 1: "antocianos no acilados -3- glucósidos":	Delphinidina-3- glucósido.	1
	Cianidina-3- glucósido.	2
	Petunidina-3- glucósido.	3
	Peonidina-3- glucósido.	4
	Malvidina-3- glucósido.	5
Grupo 2: "antocianos acilados -3- glucósidos":	Peonidina-3-acetilo glucósido.	6
	Malvidina-3- acetilo glucósido.	7
Grupo 3: "cumarilados antocianos-3- glucósidos".	Peonidina-3-cumarilado glucósido.	8
	Malvidina-3-cumarilado glucósido	9

6. EXPRESION DE LOS RESULTADOS

Informar que los valores son expresados en cantidades relativas con relación a la totalidad de los NUEVE (9) antocianos definidos en este método.

7. PARAMETROS DE FIDELIDAD

Los valores de la repetibilidad "r" y la reproductividad "R" para los NUEVE (9) antocianos, están indicados en la Tabla 2 y dependen de la superficie relativa del pico. La medición de la incertidumbre de una superficie de un pico específico es determinada por el valor de r y R que corresponde al valor más próximo indicado en el Tabla 2.

Los valores de los datos de validaciones pueden ser calculados siguiendo las reglas estadísticas apropiadas. Para calcular el error total (Sr) de la suma, por ejemplo de los antocianos acetilados, deben totalizarse las varianzas (Sr²) de las superficies específicas de cada pico correspondiente a los antocianos acetilados.

El error total de las relaciones, por ejemplo, la relación de los antocianos acetilados/cumarilados, es el resultado de la suma de los cuadrados de los errores relativos (Sr/ai, ai = superficie del pico). Con estas reglas, todos los valores de fidelidad pueden ser calculados utilizando los datos presentados en el Tabla 2.

8. ESTUDIO Y EVALUACION DEL RENDIMIENTO DEL METODO

Resultados estadísticos

DIECISIETE (17) laboratorios de CINCO (5) Estados Europeos participaron en el estudio de la validación del método bajo la coordinación del Laboratorio Oficial del Estado Alemán para Química Alimentaria en Trier. Los participantes figuran en la Tabla 3. En la Figura 1, se presenta un ejemplo de un cromatograma y en la Tabla 2, los resultados detallados.

La evaluación estadística ha sido efectuada según la Resolución OENO 6/99 y la Norma ISO 5725-1994.

Los cromatogramas enviados con las hojas de resultados cumplieron todas las exigencias relativas al rendimiento de la columna analítica. Ningún laboratorio tuvo que ser totalmente eliminado, por ejemplo, a causa de una falsa identificación de pico.

Los valores aberrantes fueron determinados por los tests de Dixon y de Grubbs según el procedimiento del "Protocolo armonizado IUPAC 1994" y de la Resolución OIV Oeno 19/2002. Los valores de Sr, SR, r y R fueron calculados para NUEVE (9) antocianos característicos y a CINCO (5) niveles de concentraciones. Para los resultados analíticos, deben utilizarse los valores de los niveles más próximos.

Con el fin de obtener una visión global del rendimiento del método, todos los valores RSDr y RSDR reunidos son reagrupados por rangos de superficie en la Tabla siguiente:

Tabla 1: Resumen de los resultados del rendimiento del método

Rango de la superficie relativa del pico* (%)	Rango de RSDr (%)	Rango de RSDR (%)
>0,4 – 1,0	6,8 – 22,4	20,6 – 50,9
>1,1 – 1,5	4,2 – 18,1	11,8 – 28,1
>1,5 – 3,5	2,1 – 7,7	10,6 – 15,6
>3,5 – 5,5	2,7 – 5,7	18,7 – 7,5
>5,5 – 7,5	2,4 – 3,9	6,5 – 10,0
>10 – 14	1,1 – 2,9	3,7 – 9,2
>14 – 17	1,0 – 3,9	3,2 – 5,4
>50 – 76	0,3 – 1,0	2,1 – 3,1
* independiente del antociano.		

Esto lleva a concluir que las repetibilidades y las reproductibilidades dependen de las sumas de las superficies relativas de los picos. Cuanto más elevadas son estas sumas, mejores son los RSDr y RSDR. Para los tenores de antocianos próximos al límite de detección (ej. Cianidina-3-glucósido) con pequeñas superficies relativas, inferiores a UNO POR CIENTO (1 %) los valores de RSDr y RSDR pueden aumentar de una manera bastante significativa. Para los antocianos cuyas superficies relativas exceden UNO POR CIENTO (1 %), los valores RSDr y RSDR son razonables.

Figura 1

Separación de NUEVE (9) antocianos en un vino tinto

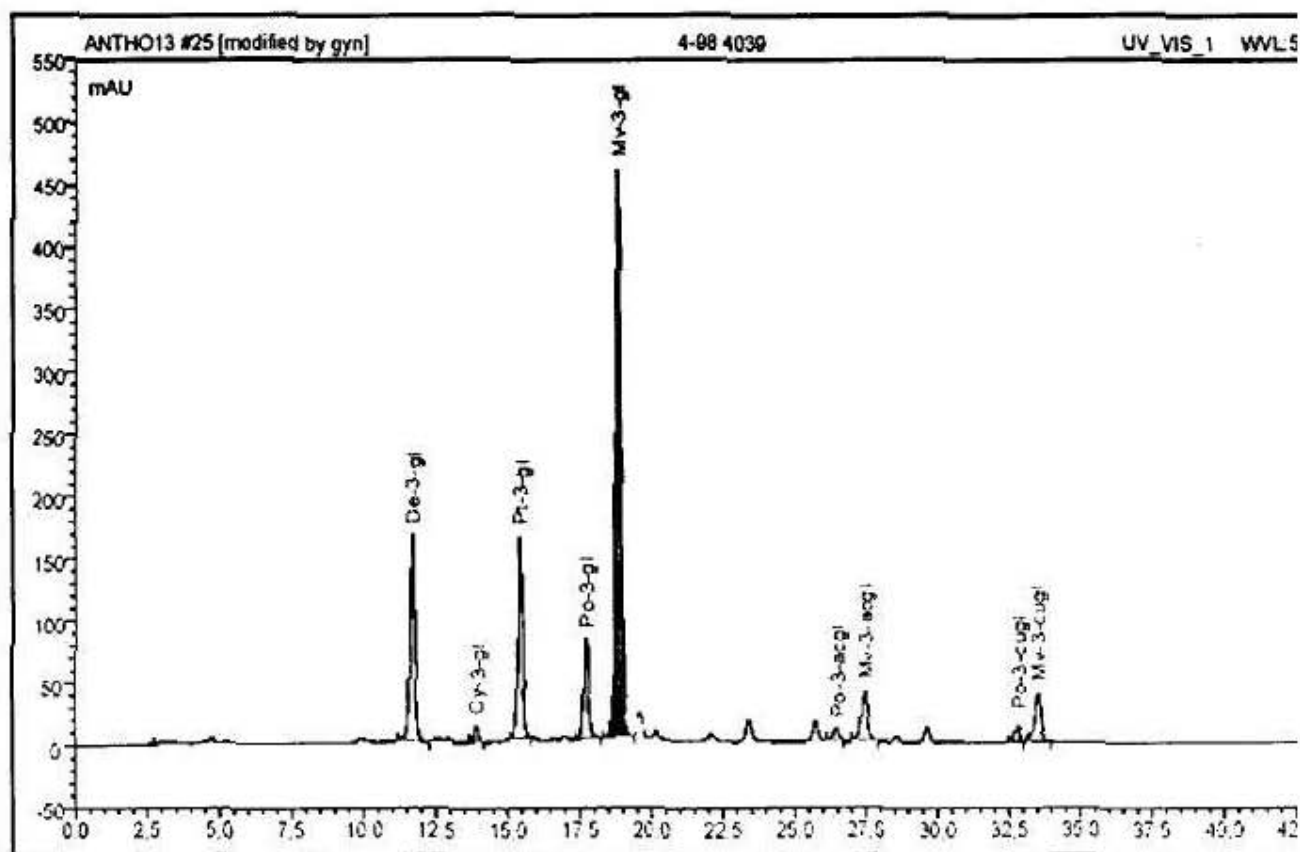


Tabla 2: Resultados del estudio de rendimiento del método

Antocianos	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5
<i>Delphinidol-3-glucoside</i>					
n	14	14	16	15	16
Media	6,75	14,14	3,45	16,68	3,54
S _r	0,163	0,145	0,142	0,142	0,108
RSD _r (%)	2,4	1,0	4,1	0,8	3,1
R	0,46	0,41	0,40	0,40	0,30
S _R	0,544	0,462	0,526	0,704	0,490
RSD _R (%)	8,1	3,3	15,2	4,2	3,8
R	1,52	1,29	1,47	1,97	1,37
<i>Cyanidol-3-glucoside</i>					
n	16	17	16	15	14
Media	2,18	1,23	0,61	1,46	0,34
S _r	0,086	0,053	0,043	0,110	0,031
RSD _r (%)	4,0	4,3	7,1	7,5	9,2
R	0,24	0,15	0,12	0,31	0,09
S _R	0,460	0,211	0,213	0,180	0,158
RSD _R (%)	21,2	17,2	34,9	12,3	46,7
R	1,29	0,59	0,60	0,50	0,44
<i>Petunidol-3-glucoside</i>					
n	15	17	16	14	15
Media	10,24	14,29	5,75	12,21	6,19
S _r	0,233	0,596	0,157	0,097	0,196
RSD _r (%)	2,3	4,2	2,7	0,8	3,2
r	0,65	1,67	0,44	0,27	0,55
S _R	0,431	0,996	0,495	0,469	0,404
RSD _R (%)	4,2	7,0	8,6	3,8	6,5
R	1,21	2,79	1,39	1,31	1,13
<i>Peonidol-3-glucoside</i>					
n	16	15	17	17	16
media	11,88	6,23	13,75	7,44	4,12
S _r	0,241	0,166	0,144	0,232	0,174
RSD _r (%)	2,0	2,7	1,0	3,1	4,2
r	0,68	0,47	0,40	0,65	0,49
S _R	0,981	0,560	1,227	0,602	0,532
RSD _R (%)	8,3	9,0	8,9	8,1	12,9
R	2,75	1,57	3,44	1,69	1,49
<i>Malvidol-3-glucoside</i>					
n	16	15	17	16	16
media	55,90	55,04	76,11	52,60	61,04
S _r	0,545	0,272	0,251	0,298	0,377
RSD _r (%)	1,0	0,5	0,3	0,6	0,6
r	1,53	0,76	0,70	0,83	1,06
S _R	2,026	2,649	2,291	1,606	1,986
RSD _R (%)	3,6	4,8	3,0	3,1	3,3
R	5,67	7,42	6,41	4,50	5,56
n = Cantidad de laboratorios retenidos luego de la eliminación de los valores aberrantes. S_r = desviación estándar de la repetibilidad. RSD_r (%) = desviación estándar de la repetibilidad relativa. r = repetibilidad. S_R = desviación estándar de la reproductibilidad. RSD_R (%) = desviación estándar de la reproductibilidad relativa. R = reproductibilidad.					

Antocianos	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5
<i>Peonidol-3-glucoside</i>					

Tabla 3: Lista de participantes

ABC Labor Dahmen, Mülheim/Mosel	D
Chemisches Landes- und Staatliches Veterinäruntersuchungsamt Münster	D
Institut für Lebensmittelchemie Koblenz	D
Institut für Lebensmittelchemie Speyer	D
Institut für Lebensmittelchemie Trier	D
Institut für Lebensmittelchemie und Arzneimittelprüfung Mainz	D
Labor Dr. Haase-Aschoff, Bad Kreuznach	D
Labor Dr. Klaus Millies, Hofheim-Wildsachsen	D
Labor Heidger, Kesten	D
Landesveterinär- und Lebensmitteluntersuchungsamt Halle	D
Staatliche Lehr- und Forschungsanstalt für Landwirtschaft, Weinbau und Gartenbau, Neustadt/Weinstraße	D
Staatliches Institut für Gesundheit und Umwelt, Saarbrücken	D
Staatliches Medizinal-, Lebensmittel- und Veterinäruntersuchungsamt Wiesbaden	D
Laboratoire Interrégional de la D.G.C.C.R.F de Bordeaux, Talence/France	F
Unidad de Nutrición y Bromatología, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, Salamanca/España	E
University of Glasgow, Div. of Biochem. and Molek. Biology	UK
Höhere Bundeslehranstalt und Bundesamt für Wein- und Obstbau Klosterneuburg.	A

DIECISIETE (17) Laboratorios D (13); A (1); F (1); E (1); UK (1)

REFERENCIAS

Marx, R., B. Holbach, H. Otteneder; Determination of nine characteristic Anthocyanins in Wine by HPLC; OIV, F.V.N° 11042713/100200

Holbach, B., R. Marx, M. Ackermann; Bestimmung der Anthocyanzusammensetzung van Rotwein mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) Lebensmittelchemie (1997) 51: 78 –80

Eder, R., S. Wendelin, J. Barna; Auftrennung der monomeren Rotweinanthocyane mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC). Methodenvergleich und Vorstellung einer neuen Methode. Mitt. Klosterneuburg (1990) 40: 68-75

ISO-5725-2: 1994 "Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results –Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility"

Otteneder, H., Marx, R., Olschimke, D.; Method-performance study on the determination of nine characteristic anthocyanins in wine by HPLC. O.I.V. F.V.N° 1130 (2001)

Mattivi F.; Scienza, A.; Failla, O.; Vika, P.; Anzani, R.; Redesco, G.; Gianazza, E.; Righetti, P. Vitis vinifera -a chemotaxonomic approach: Anthocyanins in the skin. Vitis (specialissue) 1990,119-133
Roggero, I.P.; Larice, I.L.; Rocheville-Divorne, C.; Archier, P.; Caen, V. Composition Antocyanique des cepages. Revue Francaise d'Oenologie 1998, 112, 41-48

Eder, R.; Wendelin, S; Barna, J. Classification of red wine cultivars by means of anthocyanin analysis. Mitt. Klosterneuburg 1994,44,201-212

Arozarena, I.; Casp, A.; Marin, R.; Navarro, M. Differentiation of some Spanish wines according to variety and region based on their anthocyanin composition. Eur. Food Res. Technol. 2000, 212, 108-112

Garcia-Beneytez, E.; Revilla, E.; Cabello, F. Anthocyanin pattern of several red grape cultivars and wines made from them. Eur. Food Res. Technol. 2002, 215, 32-37

Arozarena, I.; Ayestarán, B.; Cantalejo, M.J.; Navarro, M.; Vera, M.; Abril, K.; Casp, A. Eur. Food Res. Technol. 2002, 214, 313-309

Revilla, E.; Garcia-Beneytez, E.; Cabello, F.; Martin-Ortega, G.; Ryan, J-M. Value of high-performance liquid chromatographic analysis of anthocyanins in the differentiation of red grape cultivars and red wines made from them. J. Chromatogr A 2001, 915, 53-60

Heier, A.; Blaas, W.; Drof1, A.; Wittkowski, R.; Anthocyanin Analysis by HPLC/ESIMS,

Am.J.Enol.Vitic, 2002, 53, 78-86

Arozarena, I.; Casp, A.; Marin, R.; Navarro, M. Multivariate differentiation of Spanish red wines according to región and variety. J. Sci. FoodAgric, 2000,80,1909-1917

Anonymous. Bekanntmachung des Bundesinstituts für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinarmedizin. Bundesgesundheitsbl. Gesundheitsforsch. Gesundheitsschutz, 2001, 44, 748

[16] Burns, I.; Mullen, W.; Landrault, N.; Teissedre, P.-L.; Lean, M.E.I.; Crozier, A. Variations in the Profile and Content of Anthocyanins in Wines made from Cabernet Sauvignon and hybrid grapes. J. Agric. Food Chem. 2002, 50, 4096-4102

[17] Otteneder, H.; Holbach, B.; Marx, R.; Zimmer, M. Rebsortenbestimmung in Rotwein mittels Anthocyanspektrum. Mitt. Klosterneuburg, 2002,52,187-194-173

[18] L.W. Wulfand C.W. Nagel; High-Pressure liquid chromatographic separation of Anthocyanins of Vitis vinifera. Am.J.Enol.Vitic 1978, 29,42-49