

Resolución INV N° 10 - E/2017

VISTO el Expediente N° S93:0011755/2016 del Registro del INSTITUTO NACIONAL DE VITIVINICULTURA, la Ley General de Vinos N° 14.878 y la Resolución N° C.23 de fecha 23 de octubre de 2006, y

CONSIDERANDO:

Que mediante el expediente citado en el Visto, se tramita la oficialización del Método de Determinación de Materias Colorantes no permitidas en Vino, por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) y Detección Ultravioleta-Visible.

Que la industria de los alimentos emplea colorantes grado alimentario, con el objeto de reestablecer, modificar y favorecer las preferencias del consumidor, en virtud que el color es uno de los principales atributos de un alimento.

Que estos colorantes se encuentran disponibles en el mercado y son potencialmente comercializables en la industria vitivinícola para aumentar la intensidad de color de los vinos tintos.

Que la adición de estos compuestos a los vinos no está permitida por la Ley General de Vinos N° 14.878, Artículo 20, inciso a).

Que el INSTITUTO NACIONAL DE VITIVINICULTURA (INV), como organismo oficial, procedió a realizar un estudio para obtener una metodología analítica que permita determinar la adulteración de vinos tintos con colorantes.

Que dicha determinación posibilita el control de la autenticidad de los vinos, en relación a la presencia de materias colorantes no permitidas que le proporcionan color.

Que para la aplicación metodológica se ha utilizado como base la “Determinación por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) y Detección Ultravioleta-Visible de NUEVE (9) Antocianos Principales En Vinos Tintos y Rosados” oficializada por la Resolución N° C.23 de fecha 23 de octubre de 2006 de este Organismo.

Que la Subgerencia de Asuntos Jurídicos de este Instituto, 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 el Decreto N°

155/16,

EL PRESIDENTE DEL INSTITUTO NACIONAL DE VITIVINICULTURA

RESUELVE:

ARTÍCULO 1° — Oficialízase el método “DETERMINACIÓN DE MATERIAS COLORANTES NO PERMITIDAS EN VINO, POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC) Y DETECCIÓN ULTRAVIOLETA-VISIBLE”, que obra como Anexo N° IF-2016-04809345-APN- SIF#INV, que forma parte integrante de la presente resolución.

ARTÍCULO 2° — La adopción del presente método, entrará en vigencia a partir del día siguiente al de su publicación en el Boletín Oficial de la REPÚBLICA ARGENTINA.

ARTÍCULO 3° — A los productos que se detecte presencia de colorantes no permitidos, serán clasificados como producto “NO GENUINO - ADULTERADO” de conformidad con lo establecido por el Artículo 23, inciso a) de la Ley General de Vinos N° 14.878.

ARTÍCULO 4° — Regístrese, comuníquese, publíquese, dese a la Dirección Nacional del Registro Oficial para su publicación y cumplido, archívese. — Carlos Raul Tizio Mayer.

NOTA: El/los Anexo/s que integra/n este(a) Resolución no se publica/n. El/los mismo/s podrá/n ser consultado/s en www.inv.gov.ar

e. 16/01/2017 N° 2001/17 v. 16/01/2017



República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
2016 - Año del Bicentenario de la Declaración de la Independencia Nacional

Anexo

Número: IF-2016-04809345-APN-SIF#INV

CIUDAD DE BUENOS AIRES
Martes 20 de Diciembre de 2016

Referencia: MATERIAS COLORANTES NO PERMITIDAS EN VINO POR HPLC

**DETERMINACIÓN DE MATERIAS COLORANTES NO PERMITIDAS EN VINO POR
CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA Y DETECCIÓN ULTRAVIOLETA-VISIBLE
(UV-VIS)**

1. CAMPO DE APLICACIÓN

El método analítico concierne a la determinación de presencia de materias colorantes no permitidas en vinos tintos y rosados.

2. PRINCIPIO

La separación de los compuestos naturales del vino (antocianos) y los colorantes agregados, es realizada por HPLC, con una columna de fase reversa y detección UV-VIS, mediante elución por gradiente de agua/ácido fórmico/acetonitrilo y detección a una longitud de onda de 518 nm.

3. REACTIVOS Y MATERIALES

- Ácido fórmico (P.A. 98%) (CAS 64-18-6)
- Acetonitrilo pureza HPLC (CAS 75-08-8)
- Agua tridestilada o calidad superior

- 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)

- Membrana filtrante para desgasificar los solventes HPLC

- Filtros jeringa de acetato de celulosa de poro 0,22 μm .

- Jeringas descartables de volumen variable

4. APARATOS

Un sistema de HPLC con:

a. Una bomba binaria a gradiente, un sistema de inyección para volúmenes de muestra para 1 a 200 μl .

b. Un detector con arreglo de diodos, que permite leer en todo el rango UV-VIS.

c. Un integrador o un ordenador con un programa informático de adquisición de datos.

d. Un horno que permita calentar las columnas a 40°C.

e. Un sistema de desgasificación de solventes.

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

g. Una precolumna: RP18 (30-40 μm) en cartucho de 2mm de diámetro por 20 mm de largo.

5. PROCEDIMIENTO

5.1 Preparación de las muestras

Las muestras son filtradas por filtro jeringa de 0,22 μm y se colocan en viales que luego son ubicados en el inyector automático del equipo.

El volumen de inyección es de 20 μl .

5.2 Análisis

Condiciones del HPLC:	
Volumen de inyección:	20 μl
Caudal:	0,8 ml / min
Temperatura:	40 °C
Tiempo del análisis:	45 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

6. ESTUDIO DE DOS COLORANTES.

6.1 Primer caso de estudio: colorante carmín E-120

Uno de los colorantes no naturales del vino detectados por esta técnica, se corresponde con el tiempo de retención del colorante rojo carmín, identificado por el Código Alimentario Argentino como E-120, que se obtiene del ácido carmínico. Es una sal aluminica del ácido carmínico ($C_{22}H_{20}O_{13}$) producida por cochinillas, mayormente de la especie *Dactylopius coccus*, que se crían sobre los nopales o tunas (cactus del género *Opuntia*). Este producto se utiliza en pintura artística, tintorería, confitería y cosmética.

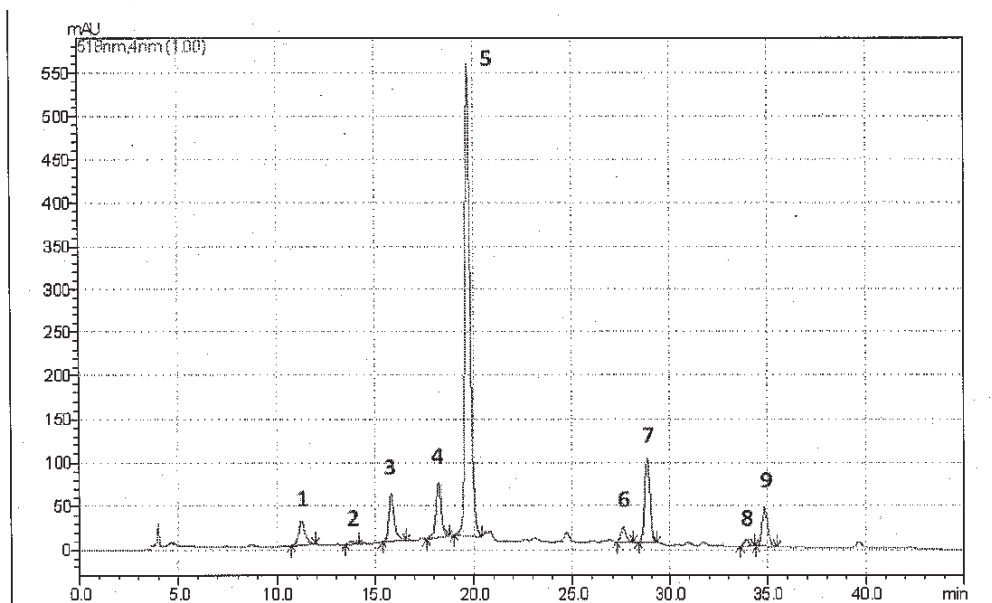


Figura N°1: Cromatograma de un vino testigo sin adición de colorantes

En la figura N°1 se pueden observar los antocianos naturales contenidos en el vino. Los nueve picos marcados corresponden a los siguientes antocianos:

- 1- Delfinidina 3-glucósido
- 2- Cianidina 3-glucósido
- 3- Petunidina 3-glucósido
- 4- Peonidina 3-glucósido
- 5- Malvidina 3-glucósido
- 6- Peonidina 3-glucósido acetilado
- 7- Malvidina 3-glucósido acetilado
- 8- Peonidina 3-glucósido cumarilado
- 9- Malvidina 3-glucósido cumarilado

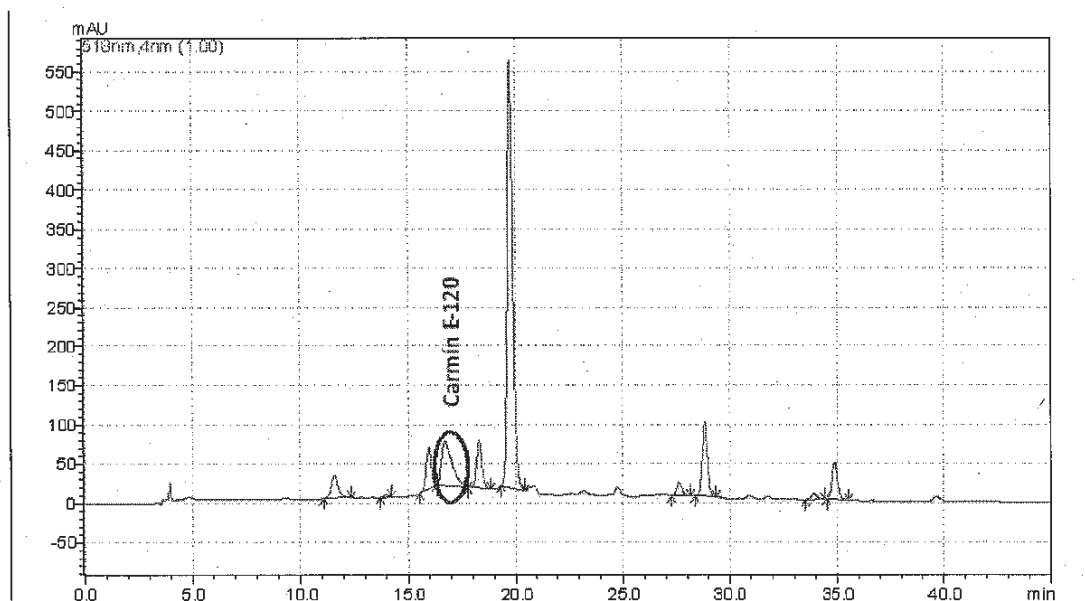


Figura N°2: Cromatograma de un vino testigo con adición de colorante Carmín E-120

En la figura N°2 se puede observar que la presencia de este colorante se evidencia fácilmente, ya que aparece como un pico entre la Petunidina y Peonidina 3-glucósido, tiempo de elución donde no aparece ningún antociano natural del vino.

6.2 Segundo caso de estudio: colorante no identificado

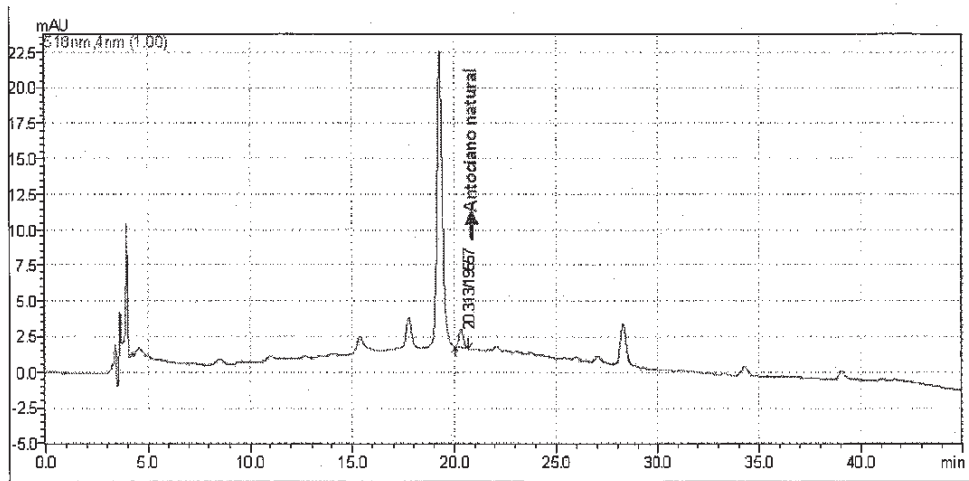


Figura N°3: Cromatograma de un vino testigo sin adición de colorante no identificado

La figura N°3 representa un vino testigo sin agregado de colorante. Se observa un pico a los 20.31 min que corresponde a un antociano natural del vino de área muy pequeña.

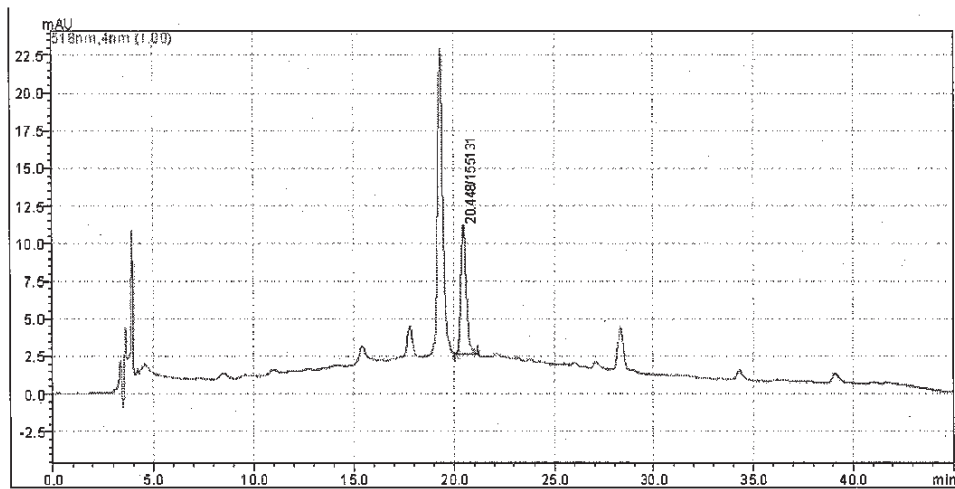


Figura N°4: Cromatograma del vino testigo con adición de colorante no identificado

La figura N°4 representa al vino testigo más la adición de colorante no identificado, cuyo tiempo de retención es similar al del antociano natural. Si bien ambos picos se superponen, el espectro se modifica profundamente cuando hay presencia de este colorante presente en la muestra.

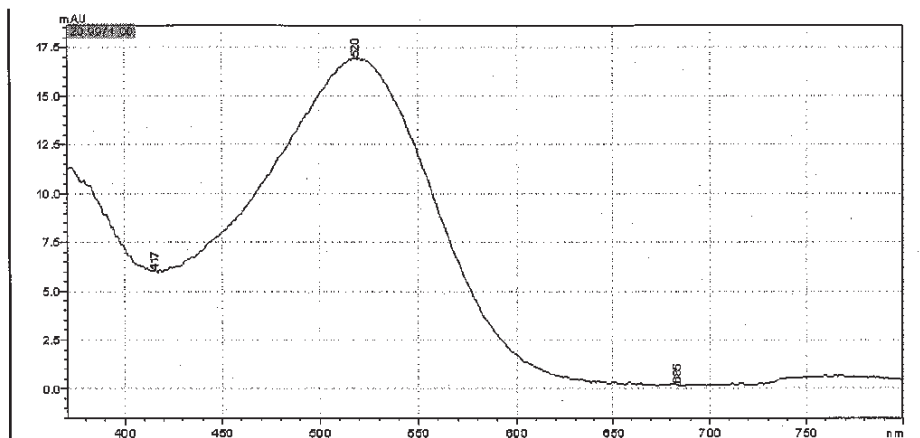


Figura N°5: Espectro del antociano natural que eluyó a los 20.31 minutos

Se observa en la figura N°5 que el pico del antociano natural tiene un solo máximo de Absorbancia a 520 nm asemejando a una curva gaussiana.

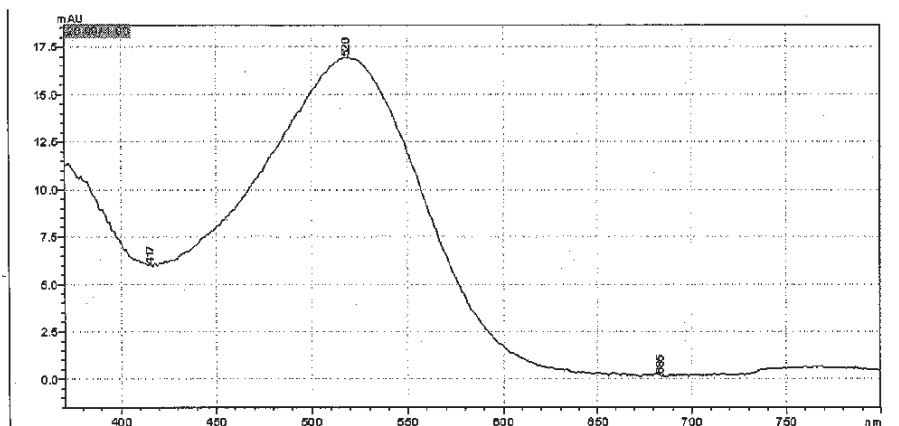


Figura N°6: Espectro del colorante no identificado que eluyó a los 20.41 minutos

Se observa en la figura N°6 que el pico de la materia colorante no identificada tiene dos máximos de absorbancia; a 525 nm y a 563 nm y un mínimo a 548 nm .

Por lo tanto la presencia de este colorante no identificado se confirma mediante el espectro característico de esta materia colorante.

6.2.1 Parámetros de validación interna

6.2.1.1 Linealidad

Para el cálculo de la linealidad se realizaron medidas de las áreas de pico de 5 concentraciones distintas del colorante no identificado en solución hidroalcohólica al 12% y pH 3,5, siendo estas, 0

ml/L; 0,5 ml/L; 1 ml/L, 1,5 ml/L; 2 ml/L, con las cuales se calculó, la ordenada al origen, la pendiente y el coeficiente de correlación.

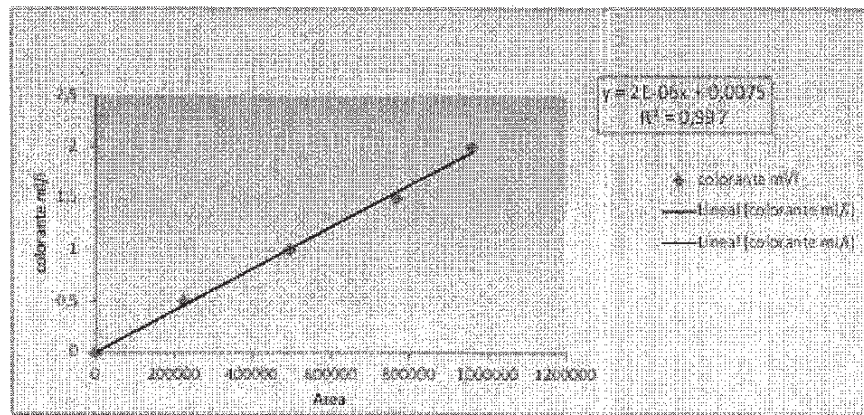


Figura 7: Rango dinámico de colorante en solución hidroalcohólica hasta 2ml/L

El siguiente gráfico muestra el análisis de residuales, los cuales se encuentran distribuidos regularmente alrededor de la línea $x = 0$.

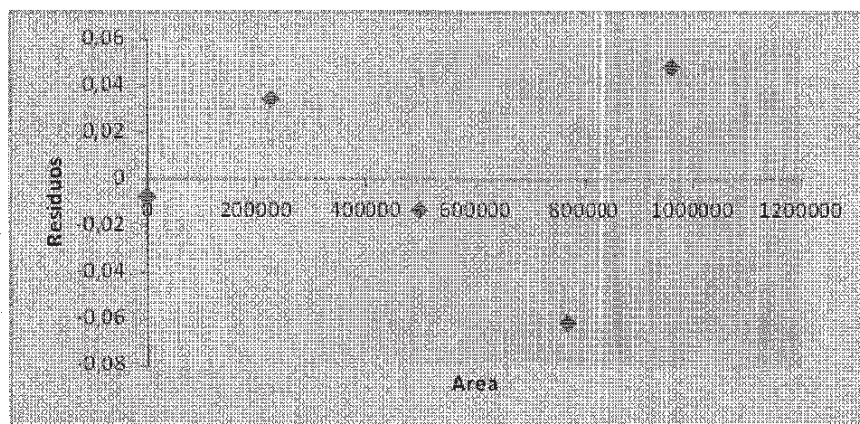


Figura 8: Análisis de residuales

6.2.1.2 Repetibilidad

La repetibilidad del método para este colorante, se estudió para la concentración de 1ml/L.

Los resultados obtenidos para la repetibilidad fueron los siguientes:

Desviación estándar de repetibilidad $S_r = 0,012$ ml/L

Repetibilidad $r = 0,034$ ml/L

El resultado confirma que a un nivel de confianza del 95%, el colorante en cuestión tendrá una

repetibilidad inferior a 0,034 ml/L. Siendo la desviación estándar de repetibilidad de 0,012 ml/L.

6.2.1.3 Reproducibilidad

La reproducibilidad del método se estudió para la concentración de 1ml/L.

Los resultados obtenidos para la reproducibilidad fueron los siguientes:

Desviación estándar de reproducibilidad SR = 0,051 ml/L

Reproducibilidad R= 0,143 ml/L

El resultado confirma que a un nivel de confianza del 95%, el colorante en cuestión tendrá una reproducibilidad inferior a 0,051 ml/L. Siendo la desviación estándar de reproducibilidad de 0,143 ml/L.

6.2.1.4 Límite de Detección

El límite de Detección para este colorante es de 0,10 ml/L en vino tinto.

6.2.1.5 Límite de Cuantificación

El límite de Cuantificación para este colorante es de 0,25 ml/L en vino tinto.

Nota:

1º- Los puntos 3, 4 y 5 se han detallado a modo de ejemplo, los que podrán modificarse dependiendo del sistema analítico con el que cuente el laboratorio.

2º- Este método podrá utilizarse para otras materias colorantes que se puedan separar adecuadamente de los antocianos naturales del vino.

7. BIBLIOGRAFÍA

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Heier, A; Blaas, W.; Drof1, A; Wittkowski, R.; Anthocyanin Analysis by HPLC/ESI-MS, Am.J.EnolVitie, 2002,53,78-86

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

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

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

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

Otteneder, H.; Holbaeh, B.; Marx, R.; Zimmer, M. Rebsortenbestimmung in Rotwein mittels Anthoeyanspektrum. Mitt. Klosterneuburg, 2002, 52, 187-194-173

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

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

Wulfand L.W. Wulfand C.W. Nagel; High-Pressure liquid chromatographic separation of Cjdocyanins otVitis vinifera. Am.J.Enol.Vitic 1978, 29, 42-49

Digitally signed by GESTION DOCUMENTAL ELECTRONICA - GDE
DN: cn=GESTION DOCUMENTAL ELECTRONICA - GDE, o=AR, o=MINISTERIO DE MODERNIZACION,
ou=SECRETARIA DE MODERNIZACION ADMINISTRATIVA, serialNumber=CUIT 30715117564
Date: 2016.12.20 08:37:55 -03'00'

Humberto Manzano
Subgerente
Subgerencia de Investigación para la Fiscalización
Instituto Nacional de Vitivinicultura

Digitally signed by GESTION DOCUMENTAL ELECTRONICA -
GDE
DN: cn=GESTION DOCUMENTAL ELECTRONICA - GDE, o=AR,
o=MINISTERIO DE MODERNIZACION, ou=SECRETARIA DE
MODERNIZACION ADMINISTRATIVA, serialNumber=CUIT
30715117564
Date: 2016.12.20 08:37:55 -03'00'