



Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca
Instituto Nacional de Vitivinicultura

MENDOZA, 31 de mayo de 2010.

VISTO el Expediente N° S93:0002892/2010, del Registro del INSTITUTO NACIONAL DE VITIVINICULTURA, y

CONSIDERANDO:

Que por el expediente mencionado en el Visto se tramita la oficialización del método de determinación de natamicina en vinos por cromatografía líquida de ultra alta resolución y detección masa – masa.

Que la adición de natamicina no constituye una práctica permitida en la REPÚBLICA ARGENTINA, como tampoco en los países miembros de la UNION EUROPEA (UE) y en otros países vitivinícolas,

Que su uso tampoco es práctica recomendada por la ORGANIZACIÓN INTERNACIONAL DE LA VIÑA Y EL VINO (OIV).

Que por ello, se hace necesario proceder a su control tanto en los vinos argentinos como en los importados.

Que dicha determinación posibilita el control de la aptitud para el consumo de los vinos en relación a este compuesto por Cromatografía Líquida de Ultra Alta Resolución.

Que el INSTITUTO NACIONAL DE VITIVINICULTURA (INV) ha incorporado recientemente tecnología analítica de última generación para optimizar tal cometido, mediante la adquisición de un Cromatógrafo Líquido de Ultra Alta Resolución Masa-Masa.



*Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca
Instituto Nacional de Vitivinicultura*

Que durante el año en curso, se iniciaron las gestiones ante la OIV a los fines de oficializar el método mediante el cual se establezca un límite de detección de la precitada sustancia, vinculado a posibles contaminaciones indirectas.

Que sobre el particular, la REPÚBLICA FEDERAL DE ALEMANIA y el REINO UNIDO, han aceptado como criterio tecnológico un límite de CINCO MICROGRAMOS POR LITRO ($5 \mu\text{g.L}^{-1}$).

Que Subgerencia de Asuntos Jurídicos del INV 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° 1.306/08,

EL PRESIDENTE DEL
INSTITUTO NACIONAL DE VITIVINICULTURA

RESUELVE:

1º.- Oficialízase el método “DETERMINACIÓN DE NATAMICINA EN EL VINO POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ULTRA ALTA RESOLUCIÓN MASA / MASA” que, junto a su VALIDACIÓN, obra como ANEXO en la presente Resolución, en su versión en idioma español.

2º.- A través de Subgerencia de Investigación para la Fiscalización dependiente de Gerencia de Fiscalización, continúense las gestiones iniciadas ante la ORGANIZACIÓN INTERNACIONAL DE LA VIÑA Y EL VINO (OIV) para la adopción, por parte de dicha Organización, del método que por la presente se oficializa para



Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca
Instituto Nacional de Vitivinicultura

vinos, el cual fija el límite de detección de CINCO MICROGRAMOS POR LITRO (5 $\mu\text{g.L}^{-1}$), en previsión de posibles contaminaciones indirectas.

3º.- Regístrese, comuníquese, publíquese, dese a la Dirección Nacional del Registro Oficial para su publicación y cumplido, archívese.

RESOLUCIÓN Nº C.19

I.N.V.

C.P.N. GUILLERMO DANIEL GARCIA
PRESIDENTE
INSTITUTO NACIONAL DE VITIVINICULTURA



*Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca
Instituto Nacional de Vitivinicultura*

ANEXO A LA RESOLUCIÓN N° C.19/10.-

DETERMINACIÓN DE NATAMICINA EN VINOS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA
DE ULTRA ALTA RESOLUCIÓN MASA/MASA

1. ÁMBITO DE APLICACIÓN:

Este método se utiliza para la identificación y cuantificación de Natamicina en vinos blancos, rosados y tintos.

2. PRINCIPIO:

El método determina la presencia de natamicina en vinos, mediante cromatografía líquida de Ultra Alta Resolución - MS/MS, basándose en la identificación de la masa del ión molecular 666,3 y de sus transiciones (hijos): 485,2 y 503,2.

3. REACTIVOS Y SUSTANCIAS:

3.1 Productos Químicos:

3.1.1 Natamicina Marca Sigma P9703-25 mg o equivalente.

3.1.2 Acetonitrilo f.d. HPLC, z.B. gradiente Fisher A 996-4 CAS 75-05-8 o equivalente.

3.1.3 Agua W 7-4 filtrada por 0,5 micrones CAS 7732-18-5 o equivalente.

3.1.4 Ácido fórmico 98% - 100%, z.B. P.A. Merck Art. Nr.: 1.11670 o equivalente.

3.1.5 Metanol f.d. HPLC, z.B. pro análisis filtrado por 0,2 micrones Fisher A 454-4 CAS 67-56-1 o equivalente.



Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca
Instituto Nacional de Vitivinicultura

4. MATERIALES E INSTRUMENTAL:

- 4.1 Matraz aforado de 100 ml.
- 4.2 Matraz aforado de 50 ml.
- 4.3 Pipeta de doble aforo de 25 ml.
- 4.4 Pipeta de doble aforo de 10 ml.
- 4.5 Pipeta de doble aforo de 5 ml.
- 4.6 Pipeta de doble aforo de 1 ml.
- 4.7 Propipeta.
- 4.8 Sistema de Filtración al vacío Millipore o equivalente.
- 4.9 Filtro de Nylon de poro de 0,22 μm x 47 mm de diámetro marca microclar Y02047WPH o equivalente.
- 4.10 Membrana de nitrocelulosa blanca reticulada 0,45 μm x 47 mm Gamafil N04-047 o equivalente.
- 4.11 Probeta de 1000 ml graduada.
- 4.12 Frasco Genna de 1000 ml o equivalente.
- 4.13 Jeringa de volumen variable.
- 4.14 Filtro de jeringa para soluciones hidroalcohólicas de 0,45 μm Pall preferred (PVDF) 13 mm PG-4457 o equivalente.
- 4.15 Balanza de precisión + 0,01 mg.
- 4.16 Vial UPLC de 1,8 ml 12x32 Gls Srw Cap VI w/Bnd pre-slt septa o equivalente.
- 4.17 Ultrasonido COLE – PALMER.
- 4.18 Columna: Acquity UPLC® BECH C18 1.7 μm 2.1 x 50 mm.



*Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca
Instituto Nacional de Vitivinicultura*

4.19 Precolumna.

4.20 Cromatógrafo UPLC-MS/MS equipado con ionización electro spray marca Waters.

5. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES:

5.1 Solución primaria de natamicina (100 mg.L^{-1})

Pesar 10 mg (4.15) de sustancia estándar (3.1.1), transferir a matraz de 100 ml y enrasar con metanol.

5.2 Solución secundaria de natamicina (5 mg.L^{-1})

Tomar 5 ml de la solución primaria (5.1), transferir a matraz de 100 ml y enrasar con metanol.

5.3 Soluciones estándar de calibración en vino ($5 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$; $10 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$; $25 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ y $50 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$). Utilizar vinos libre de natamicina.

Tabla Nº 1: Descripción de Diluciones.

Solución a diluir	Dilución	Concentración de la solución estándar
100 mg.L^{-1}	5 ml / 100 ml	5 mg.L^{-1}
5 mg.L^{-1}	1 ml / 100 ml	$50 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$
$50 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$	25 ml / 50 ml	$25 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$
$50 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$	10 ml / 50 ml	$10 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$
$10 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$	25 ml / 50 ml	$5 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$

Filtrar las soluciones estándar de calibración en vino antes de la inyección a través de un filtro de jeringa (4.14).



Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca
Instituto Nacional de Vitivinicultura

5.4 Fase móvil:

5.4.1 Eluyente A: Agua, 0,1 % de Ácido Fórmico.

Medir aproximadamente 1000 ml de agua (3.1.3) en probeta graduada (4.11). Agregar 1 ml de ácido fórmico (3.1.4) y enrasar con agua (3.1.3). Homogeneizar y filtrar con membrana de nitrocelulosa (4.10) y sistema de filtración (4.8). Envasar en frasco Genna (4.12).

5.4.2 Eluyente B: Acetonitrilo + 0,1 % de Ácido Fórmico.

Medir aproximadamente 1000 ml de acetonitrilo (3.1.2) en probeta graduada (4.11). Agregar 1 ml de ácido fórmico (3.1.4) y enrasar con acetonitrilo (3.1.2). Homogeneizar y filtrar con filtro de nylon (4.9) y sistema de filtración (4.8). Envasar en frasco Genna (4.12).

6. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA:

Filtrar el vino a través de filtro de jeringa (4.14), recibir en un vial (4.16) y colocar en el inyector automático.

7. PROCEDIMIENTO:

Establecer los parámetros de trabajo:

Caudal: 0,3 ml/min.

Temperatura de la columna: 30 °C.

Temperatura de la muestra: 15 °C.

Volumen de inyección: 10 µl.

Loop de inyección: 10 µl.

Tiempo de retención: 4.3 minutos.



Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca
Instituto Nacional de Vitivinicultura

Tabla N° 2: Gradiente de Elución.

Tiempo (en minutos)	% Eluyente A (5.4.1)	% Eluyente B (5.4.2)
0	90	10
10	40	60
15	40	60
16	90	10
20	90	10

Tabla N° 3: Parámetros de Detección.

Transición de Masas	Tiempo de retención Dwell (min)	Voltaje de Cono	Energía de Colisión
666,3>485,2	0,078	14	12
666,3>503,2	0,078	14	11

8. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS:

Los resultados se expresan en $\mu\text{g.L}^{-1}$ con una cifra significativa.

El ión de confirmación es la transición (ión hijo) 485,2.

El ión de cuantificación es la transición (ión hijo) 503,2.

9. PARÁMETROS DE VALIDACIÓN INTERNA:

Tabla N° 4: Parámetros de validación.

Validación interna	Vino blanco	Vino tinto
LD (Límite de Detección)	5 $\mu\text{g.L}^{-1}$	5 $\mu\text{g.L}^{-1}$
r (Índice de repetibilidad)	0,7 $\mu\text{g.L}^{-1}$	0,7 $\mu\text{g.L}^{-1}$
Cv % (coeficiente de variación porcentual)	2,4 %	3,4 %
R ² (coeficiente de correlación – regresión)	0,995	0,998



Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca
Instituto Nacional de Vitivinicultura

Tabla N° 5: Rango dinámico de natamicina en vino blanco.

Std. Vino Blanco ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Área de Pico de Natamicina	Área de Pico de Cuantificación 503,2	Concentración por punto de Natamicina ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
0	0	0	0,0
0	0	0	0,0
0	0	0	0,0
0	0	0	0,0
5	2177	980	5,1
5	2445	936	4,9
5	2427	947	5,0
5	2338	917	4,8
10	4181	1738	10,3
10	3968	1660	9,9
10	4133	1611	9,6
10	4242	1683	10,0
25	10113	4061	25,2
25	10029	3993	24,8
25	10171	4055	25,1
25	10478	3986	24,7
50	16815	6885	49,7
50	17541	6943	50,1
50	17218	7010	50,6
50	17079	6829	49,3

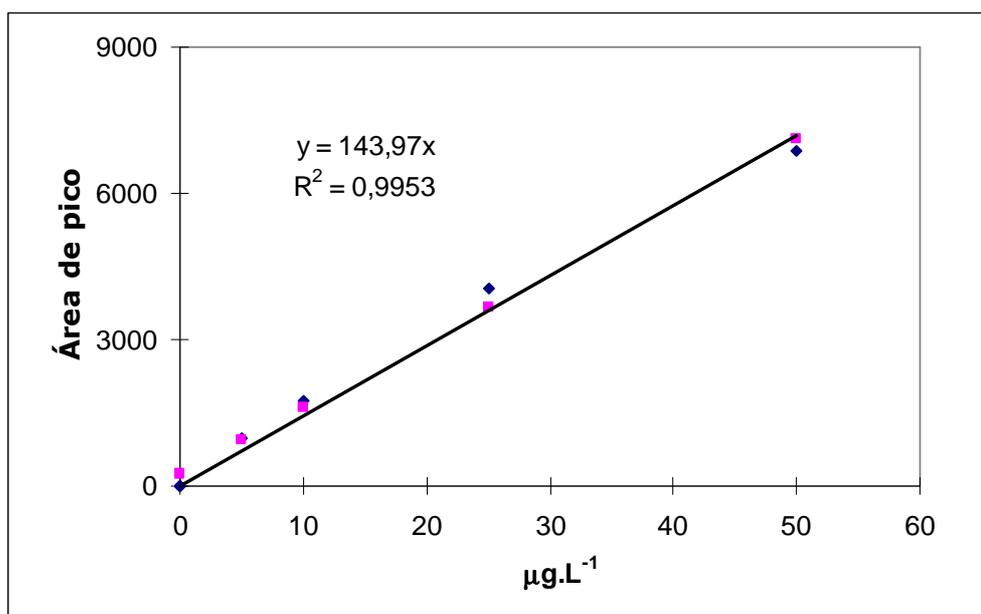


Gráfico N° 1: Rango Dinámico de Natamicina en Vino Blanco hasta 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$.



Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca
Instituto Nacional de Vitivinicultura

Tabla N° 6: Rango dinámico de natamicina en vino tinto.

Std. Vino Tinto ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Área de Pico de Natamicina	Área de Pico de Cuantificación 503,2	Concentración por punto de Natamicina ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
0	0	0	0,0
0	0	0	0,0
0	0	0	0,0
0	0	0	0,0
5	1730	726	5,0
5	1844	688	4,8
5	1642	746	5,2
5	1774	691	4,8
10	3310	1457	10,2
10	3395	1406	9,8
10	3456	1399	9,8
10	3383	1430	10,0
25	8267	3231	24,6
25	8018	3399	25,8
25	8447	3237	24,6
25	8089	3264	24,8
50	16199	6505	50,0
50	16451	6247	48,0
50	16248	6578	50,6
50	15735	6658	51,2

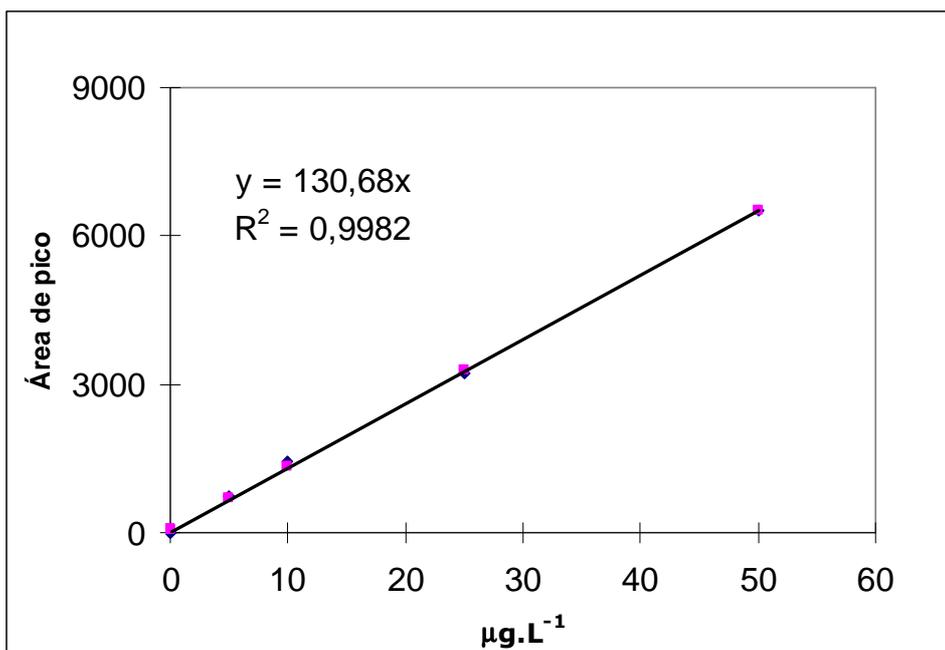


Gráfico N° 2: Rango Dinámico de Natamicina en Vino Tinto hasta $50 \mu\text{g.L}^{-1}$.



Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca
Instituto Nacional de Vitivinicultura

10. Cromatograma de vino con 25 µg.L⁻¹ de Natamicina.

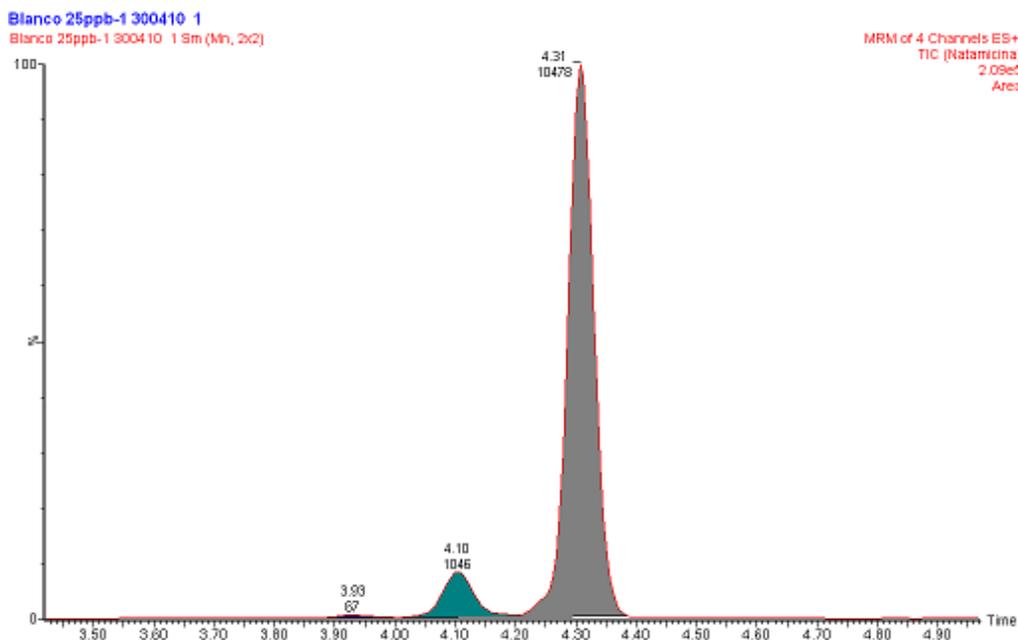


Figura N° 1: Ión molecular de natamicina.

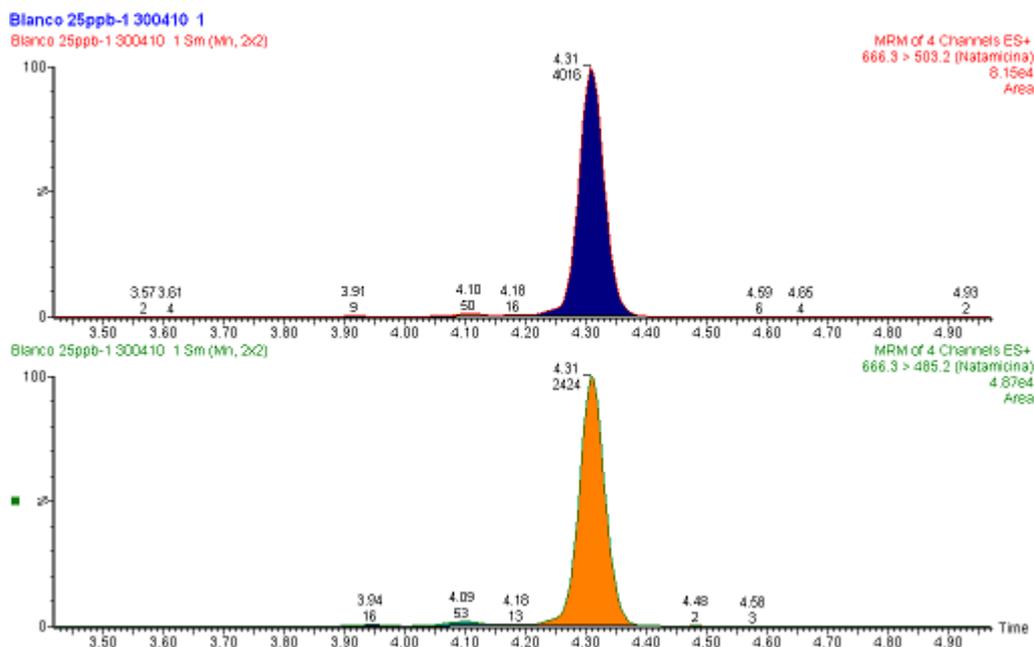


Figura N° 2: Iones de transición (hijos) de natamicina.



Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca
Instituto Nacional de Vitivinicultura

Nota 1: Tanto el equipamiento como las condiciones operativas se describen a modo de ejemplo.

Nota 2: En caso que la muestra contenga más de $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ se diluirá hasta que el valor ingrese dentro de la curva de calibración.

11. BIBLIOGRAFÍA:

- a) Perez, S; Barcelo, D “ Application of advanced MS techniques to analysis and identification of human and microbial metabolites of pharmaceuticals in the aquatic environment”. Review TRAC-TRENDS IN ANALYTICAL CHEMISTRY. Pages 494 -514. 2007.
- b) Jian Wang “Analysis of macrolide antibiotics, using liquid chromatography-mass spectrometry, in food, biological and environmental matrices” Mass Spectrometry Reviews Volume 28 Issue 1: 50 – 92. Published Online: 2008.
- c) S. Abuin, R. Codony, R. Compañó “Analysis of macrolide antibiotics in river water by solid-phase extraction and liquid chromatography–mass spectrometry” . Journal of Chromatography A. Volume 1114, Issue 1: 73-81. 2006.
- d) Compendium of International Methods of Wine and Must Análisis; Edición 2003. Anexo B; Resolución OENO 6/99.
- e) Kennet Felrich, Detección instrumental de antibióticos en alimentos; Edición 1990: AOAC.