



"2014 - Año de Homenaje al Almirante Guillermo Brown,
en el Bicentenario del Combate Naval de Montevideo"

C.P.

Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca
Instituto Nacional de Vitivinicultura

MENDOZA, 24 de octubre de 2014.-

VISTO el Expediente N° S93:0001809/2014 del Registro del INSTITUTO NACIONAL DE VITIVINICULTURA y la Resolución OENO N° 33 de fecha 30 de julio de 2004, y

CONSIDERANDO:

Que por el expediente citado en el Visto, Departamento Normas Analíticas Especiales dependiente de Subgerencia de Investigación para la Fiscalización de Gerencia de Fiscalización del INSTITUTO NACIONAL DE VITIVINICULTURA (INV) tramita la oficialización del Método de Determinación de Ácido Shikímico en Vinos por Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento y Detección UV.

Que dicha determinación individual o como complemento a otros sistemas analíticos, posibilita el control de la autenticidad de vinos en relación a la variedad que le dio origen a través de la determinación del contenido de ácido shikímico por Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (CLAR/HPLC).

Que desde 2004 esta determinación es método oficial de la ORGANIZACIÓN INTERNACIONAL DE LA VIÑA Y EL VINO (OIV).

Que la REPÚBLICA ARGENTINA es país miembro de la OIV, representación ejercida por el INV, y ha participado en la aprobación de éste método.

Que el mencionado método ha sido validado con la participación de Laboratorios de reconocido prestigio internacional y dicha validación ha sido publicada conjuntamente con el método en la Resolución OENO N° 33 de fecha 30 de julio de 2004.

Que el referido procedimiento, al utilizar el banco de datos de origen



"2014 - Año de Homenaje al Almirante Guillermo Brown,
en el Bicentenario del Combate Naval de Montevideo"

Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca
Instituto Nacional de Vitivinicultura

indudable de contenido de ácido shikímico, permite evaluar la autenticidad varietal por análisis comparativo o discriminante.

Que esta determinación tiene el respaldo científico suficiente como para adoptarse como norma de control oficial por este Organismo.

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

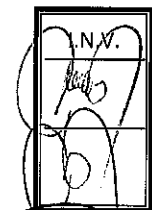
RESUELVE:

1º.- Oficialízase el Método de "DETERMINACIÓN DE ÁCIDO SHIKÍMICO EN VINOS POR CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTO RENDIMIENTO Y DETECCIÓN UV" que, junto a su VALIDACIÓN, obran como Anexo de la presente resolución.

2º.- La adopción del presente método, entrará en vigencia a partir del día siguiente al de publicación del presente acto administrativo en el Boletín Oficial de la REPÚBLICA ARGENTINA.

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

RESOLUCIÓN N° C. 34



df

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



DETERMINACIÓN DE ÁCIDO SHIKÍMICO EN VINOS POR
CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTO RENDIMIENTO (CLAR/HPLC) Y
DETECCIÓN UV

1. DESCRIPCIÓN

El contenido de ácido shikímico en vinos se expresa en unidades de concentración: MILIGRAMO POR LITRO ELEVADO A LA MENOS UNO (mg.L^{-1}).

El método se aplica para la determinación cuantitativa en un rango de concentraciones de 5 mg.L^{-1} a 100 mg.L^{-1} .

2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El ácido shikímico se determina directamente, sin preparación de muestra, por cromatografía líquida de alta resolución, mediante un sistema de columnas.

En un primer paso, se realiza una separación preliminar de los ácidos orgánicos contenidos en el vino sobre una columna de fase inversa de tipo Octa Decil Silano (ODS), la segunda columna es de tipo intercambiadora de cationes. Esta última se calienta a $65 \text{ }^\circ\text{C}$.

Se utiliza como solvente de elución ácido Sulfúrico $0,02 \text{ N}$ (fase móvil), se obtiene una buena resolución del ácido shikímico, no observándose interferencia de la matriz del vino. Debido a la doble ligadura del ciclohexeno, el ácido shikímico presenta un máximo de absorción a los 210 nm lo cual permite ser detectado por un detector UV.

3. REACTIVOS - PATRONES

a) Ácido shikímico (CAS 138-59-0), de una pureza mayor o igual al 99 % como



Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca
Instituto Nacional de Vitivinicultura

mínimo.

- b) Ácido sulfúrico (H_2SO_4) P.A., pureza 98 g % g.
- c) Agua grado HPLC o tri-destilada: conductividad eléctrica 0,4 a 0,9 μS a 25 °C;
pH 5,1 a 5,5.
- d) Etanol absoluto o de pureza ≥ 95 % vol.

4. MATERIALES Y EQUIPOS

a) MATERIALES:

- I. Matraz aforado de 2.000 ml.
- II. Matraz aforado de 1.000 ml.
- III. Matraz aforado de 100 ml.
- IV. Matraz aforado de 50 ml.
- V. Pipeta de doble aforo de 20 ml.
- VI. Pipeta de doble aforo de 10 ml.
- VII. Pipeta de doble aforo de 25 ml.
- VIII. Pipeta automática 1:5.
- IX. Propipeta.
- X. Filtro de Nylon de poro de 0,22 μm por 47 mm de diámetro.
- XI. Jeringas descartables de volumen variable.
- XII. Filtros de jeringa de 0,45 μm de nylon o Fluoruro de Polivinilideno (PVDF).
- XIII. Frasco de cierre hermético tipo Genna o equivalente.
- XIV. Viales de vidrio de 1,5 ml con septa pre-ranurada o equivalente.
- XV. Papel de filtro técnico: Velocidad de filtración media-rápida - Densidad 60 a
65 g/m².

b) EQUIPOS:

- I. Sistema de filtración al vacío Millipore o equivalente.



"2014 - Año de Homenaje al Almirante Guillermo Brown,
en el Bicentenario del Combate Naval de Montevideo"

Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca
Instituto Nacional de Vitivinicultura

- II. Balanza analítica.
- III. Heladera (temperatura 1 °C a 10 °C).
- IV. Cromatógrafo Líquido de Alto Rendimiento (CLAR/HPLC) compuesto por los siguientes módulos:
 - i. Detector UV-VIS.
 - ii. Rulo (loop) de inyección automática de 100 µl.
 - iii. Sistema de bombas que permita flujo programable y constante con una precisión máxima.
 - iv. Calefactor u horno que permita calentar una columna de intercambio de 300 mm a 65 °C.
 - v. Sistema de integración de datos.
 - vi. Sistema de columnas analíticas:
 - Columna de acero inoxidable de fase reversa:
 - Marca: Phenomenex.
 - Modelo: Luna 5 µ.
 - Material de la fase estacionaria: esférico ODS.
 - Tamaño de poro: 100 Å
 - Largo: 250 mm.
 - Diámetro: 4,60 mm.
 - Diámetro de partículas: 5 µm.
 - Pre-columna para columna de fase reversa compuesta por:
 - Carcasa (holder):
 - Marca: Phenomenex.
 - Descripción: SecurityGuard / Guard Cartridge Kit.



"2014 - Año de Homenaje al Almirante Guillermo Brown,
en el Bicentenario del Combate Naval de Montevideo"

Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca
Instituto Nacional de Vitivinicultura

- Cartucho o precolumna:
 - Marca Phenomenex.
 - Largo: 4 mm.
 - Diámetro interno: 3 mm.
 - Material: ODS.
- Columna intercambiadora de cationes de acero inoxidable:
 - Marca: Phenomenex.
 - Modelo: Rezex Organic Acid H+.
 - Largo: 300 mm.
 - Diámetro: 7,80 mm.
- Pre-columna para columna intercambiadora de cationes.
 - Marca: Phenomenex.
 - Modelo: Rezex Organic Acid H+.
 - Largo: 50 mm.
 - Diámetro: 7,80 mm.

NOTA: Las marcas y modelos de las columnas pueden reemplazarse siempre y cuando cumplan con las características de relleno y dimensionales indicadas.

Las condiciones analíticas pueden variar de acuerdo al equipamiento utilizado siempre que se compruebe una adecuada performance del sistema.

5. CONDICIONES AMBIENTALES

El equipo HPLC requiere de una instalación que contemple las siguientes condiciones ambientales para mantener su rendimiento:



Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca
Instituto Nacional de Vitivinicultura

- a) El laboratorio donde el instrumento se encuentre instalado debe estar ventilado.
- b) Evitar la presencia de polvos o gases corrosivos.
- c) Mantener alejado de equipamiento que genere campos magnéticos fuertes.
- d) La temperatura de la habitación debe encontrarse entre 4 °C y 35 °C con variaciones mínimas durante el día.
- e) Las corrientes de aire acondicionado frío-calor no deben dar directamente sobre el equipo.
- f) No exponer a la luz solar directa.
- g) Evitar vibraciones.
- h) Humedad entre el 20 % y el 85 %.
- i) Evitar condensaciones sobre el equipo.

6. TÉCNICA

a) Preparación de soluciones:

I. Solución H_2SO_4 1 N

Colocar en un matraz aforado de 1.000 ml un volumen aproximado de 250 ml de agua tridestilada, luego agregar 27,2 ml de Ácido sulfúrico 98 g % g, y llevar a volumen con el mismo agua. Conservar la solución con rótulo indicando contenido, concentración, fecha de preparación y nombre de los analistas responsables.

II. Solución de elución H_2SO_4 0,02 N

Colocar en un matraz aforado de 1.000 ml un volumen aproximado de 250 ml de agua tridestilada, luego tomar 20 ml de la solución de Ácido sulfúrico 1 N y llevar a volumen con el mismo agua. Filtrar la solución de elución por sistema de filtración con filtro de nylon de poro de 0,22 μm . Conservar la solución en heladera con rótulo indicando contenido, concentración, fecha



"2014 - Año de Homenaje al Almirante Guillermo Brown,
en el Bicentenario del Combate Naval de Montevideo"

Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca
Instituto Nacional de Vitivinicultura

de preparación y nombre de los analistas responsables. En caso que se utilice luego de DOS (2) o más días posteriores a su preparación, previamente se debe re-filtrar.

b) Preparación de la solución madre patrón de 100 mg. L⁻¹ de ácido shikímico:

I. Solución hidroalcohólica al 12 % vol.

Tomar una probeta de 250 ml, medir 31,25 ml de Etanol (para 96 % vol.), y enrasar con agua tridestilada. En el caso de utilizar etanol de una pureza distinta a 96 % vol., se recalcula el volumen 1 según el siguiente cálculo:
 $C1.V1=C2.V2$.

II. Solución primaria estándar 100 mg. L⁻¹ de ácido shikímico

Pesar 10 mg de ácido shikímico pureza ≥ 99 %, transferir cuantitativamente a un matraz aforado de 100 ml, llevar a volumen con solución hidroalcohólica al 12 % vol. y agitar. Conservar la solución primaria en heladera con rótulo indicando contenido, concentración, fecha de preparación y nombre de los analistas responsables.

Conservar el patrón de ácido shikímico en un espacio fresco, con el envase herméticamente cerrado en un lugar seco y ventilado.

c) Preparación de los estándares (5, 25 y 50 mg. L⁻¹ de ácido shikímico):

I. Estándar de 5 mg.L⁻¹ de ácido shikímico

Tomar un volumen de 2,5 ml de la solución primaria, transferir cuantitativamente a un matraz aforado de 50 ml, llevar a volumen con solución hidroalcohólica al 12 % vol. y agitar. Conservar el estándar en heladera con rótulo indicando contenido, concentración, fecha de preparación y nombre de los analistas responsables.

II. Estándar de 25 mg.L⁻¹ de ácido shikímico



Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca
Instituto Nacional de Vitivinicultura

Tomar un volumen de 12,5 ml de la solución primaria, transferir cuantitativamente a un matraz aforado de 50 ml, llevar a volumen con solución hidroalcohólica al 12 % vol. y agitar. Conservar el estándar en heladera con rótulo indicando contenido, concentración, fecha de preparación y nombre de los analistas responsables.

III. Estándar de 50 mg.L⁻¹ de ácido shikímico

Tomar un volumen de 25 ml de la solución primaria, transferir cuantitativamente a un matraz aforado de 50 ml, llevar a volumen con solución hidroalcohólica al 12 % vol. y agitar. Conservar el estándar en heladera con rótulo indicando contenido, concentración, fecha de preparación y nombre de los analistas responsables.

d) Preparación de la muestra:

La muestra de vino tranquilo se toma con jeringas descartables, luego se le anexa el filtro de membrana de 0,45 µm y con las DOS (2) primeras porciones de filtrado se enjuaga el vial, descartándose dicho contenido, la tercer porción es la que se utiliza para la determinación. Previo al llenado del vial se lo identifica con el número de ingreso de muestra asignado.

En el caso de vinos con presencia de anhídrido carbónico en solución, tales como espumantes, gasificados o frizantes, es necesario un tratamiento previo de desgasificación, mediante filtración con el uso de papel de filtro, como se indica a continuación:

Se coloca una porción de papel de filtro en un embudo sobre un Erlenmeyer para recibir el líquido filtrado. A posteriori se somete a una filtración de membrana al igual que un vino tranquilo.

e) Procedimiento analítico:



"2014 - Año de Homenaje al Almirante Guillermo Brown,
en el Bicentenario del Combate Naval de Montevideo"

Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca
Instituto Nacional de Vitivinicultura

I. Inyección de la muestra

Se procede a la colocación de la/s muestra/s en el autoinyector del cromatógrafo HPLC con los siguientes parámetros de operación:

- i. Volumen de inyección: 5 μ L.
- ii. Flujo: 0,6 ml/min.
- iii. Calentamiento de la columna intercambiadora de cationes a 65 °C.
- iv. Tiempo mínimo necesario para la estabilización inicial del sistema: 30 minutos.
- v. Longitud de onda de detección: 210 nm.

II. Funcionamiento de los sistemas cromatográficos

La respuesta del sistema cromatográfico se evalúa diariamente, a través de la respuesta del detector y la columna según se describe a continuación, y periódicamente en función de lo descrito en el procedimiento de Aseguramiento de la Calidad.

i. Verificación diaria:

• Detector

- Linealidad: se verifica a través de la observación del trazado de la línea base, la cual debe ser siempre lineal.
- Respuesta: el estudio se realiza a través del análisis de un estándar de ácido shikímico, de concentración conocida, previo a la inyección de muestra, verificando la relación de área y concentración obtenida.

• Columna

- Simetría: el estudio se realiza a través del análisis de un estándar de ácido shikímico, de concentración conocida, previo a la inyección de muestra, verificando que el pico posea forma de campana de Gauss.



Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca
Instituto Nacional de Vitivinicultura

ii. Análisis:

Las inyecciones para la determinación de ácido shikímico se realizan en el orden de Patrones, Muestras a analizar y Fase Móvil.

• Secuencia de inyección

• Patrones.

Se inyectan los estándares de ácido shikímico de concentración 5, 25, 50 y 100 mg.L⁻¹, con los cuales se realiza la curva de calibración.

– Muestras a analizar - Fase Móvil

Luego de cada inyección de muestra de vino es necesario un tiempo de equilibración con el fin de que todas las sustancias del vino hayan sido bien eluidas. Este tiempo es de TREINTA (30) minutos y se realiza en las mismas condiciones de análisis haciendo circular fase móvil por el sistema.

f) Procesamiento de datos:

I. Preparación de la curva de calibración

La determinación cuantitativa de ácido shikímico en las muestras es efectuada siguiendo el método de calibración externa.

La etapa de calibración y la obtención de la concentración de analito en una muestra constan de los siguientes pasos:

i. Paso 1: Preparación de los patrones [según punto 6. b) y c)].

ii. Paso 2: Obtención de la relación señal-concentración.

Se traza un gráfico con las señales (área del pico) frente a la concentración de analito y se calcula la recta que se ajusta a los datos mediante cálculo por mínimos cuadrados. De esta forma se obtiene la pendiente (a) y la ordenada al origen (b) que definen la



Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca
Instituto Nacional de Vitivinicultura

recta. El cálculo de ajuste por mínimos cuadrados se realiza automáticamente con el software que acompaña al equipo HPLC o manualmente mediante el uso de hoja de cálculo Excel.

iii. Paso 3: Uso de la recta de calibrado (cálculos).

Mediante la señal analítica obtenida para las muestras desconocidas, se interpola en la recta de calibrado para obtener el valor de concentración de ácido shikímico.

Esta interpolación la realiza automáticamente el software que acompaña el equipo HPLC. Manualmente, en función de los datos obtenidos ("a" y "b") de la curva de calibración, el valor de la concentración se calcula de la siguiente manera:

$$x = (y-b)/a$$

Donde:

x= concentración de ácido shikímico en mg.L⁻¹ de la muestra.

y= área correspondiente al pico de ácido shikímico de la muestra.

a= pendiente de la curva de calibración.

b= ordenada al origen de la curva de calibración.

Los resultados, en concentración de ácido shikímico, se expresan en mg.L⁻¹ con DOS (2) cifras significativas.

7. VALIDACIÓN

a) Linealidad de la respuesta

Se ha preparado una serie de patrones en un intervalo de 5 a 100 mg.L⁻¹ de ácido shikímico en solución hidroalcohólica al 12 %. Cada solución fue



analizada CINCO (5) veces.

El intervalo de linealidad del método está comprendido entre 5 y 100 mg.L⁻¹ como muestra la recta de calibrado de la Figura 1.

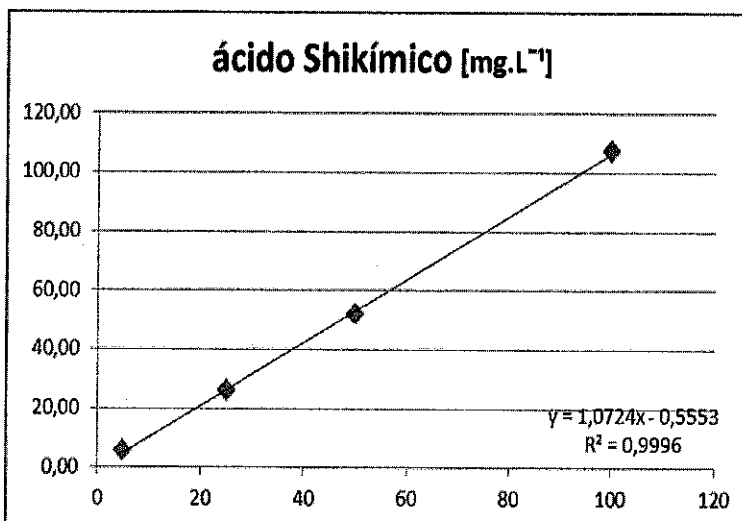


Figura 1: Linealidad de la determinación de la ácido shikímico por el equipo HPLC

b) Repetibilidad

La repetibilidad (r) de la determinación de ácido shikímico en los vinos, se ha determinado a partir de los resultados obtenidos en VEINTE (20) muestras de estándares de ácido shikímico y analizadas CINCO (5) veces seguidas de manera que estuvieran en condiciones idénticas. Los resultados se muestran en la Tabla 1:

Tabla 1: Repetibilidad de la determinación de ácido shikímico

Std 5 mg.L ⁻¹		Std 25 mg.L ⁻¹		Std 50 mg.L ⁻¹		Std 100 mg.L ⁻¹	
DS	0,0410	DS	0,2595	DS	0,0694	DS	0,3408
CV%	0,7328	CV%	0,9965	CV%	0,1338	CV%	0,3177
r	0,1159	r	0,7344	r	0,1965	r	0,9645



Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca
Instituto Nacional de Vitivinicultura

c) Reproducibilidad

La reproducibilidad (R) de la determinación del ácido shikímico en estándares en solución hidroalcohólica CINCO (5) veces en diferentes fechas. Los resultados se dan en la Tabla 2.

Tabla 2: Reproducibilidad de la determinación de ácido shikímico

5 mg.L ⁻¹		25 mg.L ⁻¹		50 mg.L ⁻¹		100 mg.L ⁻¹	
DS	0,245	DS	0,6861	DS	1,12740105	DS	3,9108
CV%	4,6363	CV%	2,7255	CV%	2,2367	CV%	3,8332
R	0,6927	R	1,9405	R	3,1888	R	11,0615

REFERENCIAS

- [1] Römpp Lexikon Chemie-Versión 2.0, Stuttgart/New York, Georg Thieme Verlag 1999.
- [2] Wallrauch S., Flüssiges Obst 3, 107 - 113 (1999).
- [3] 44th session SCMA, 23-26 march 2004, comparison of HPLC, GC, and GC-MS determination of Shikimic acid in wine, FV 1193.
- [4] Resolución N° OENO 33 de fecha 30 de julio de 2004 de la ORGANIZACIÓN INTERNACIONAL DE LA VIÑA Y EL VINO (OIV). Dosificación del ácido shikímico en el vino por Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento y Detección UV.