



RESOLUCION OIV-OENO 262-2014

COPOLÍMEROS ADSORBENTES DE PVI-PVP - CODEX

La ASAMBLEA GENERAL,

Visto el artículo 2 párrafo 2 iv del Acuerdo del 3 de abril de 2001 por el que se crea la Organización Internacional de la Viña y el Vino,

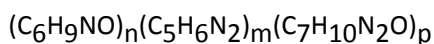
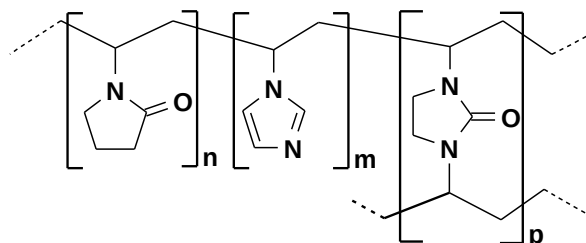
Por propuesta de la Subcomisión “Métodos de análisis” y del grupo de expertos “Especificación de los productos enológicos”,

Considerando los trabajos del grupo de expertos “Seguridad alimentaria” y la opinión favorable de este Grupo de expertos en su XXI sesión, que tuvo lugar el 27 de marzo de 2014,

Considerando las resoluciones Oeno 1/2007 y Oeno 2/2007 relativas a las prácticas enológicas,

DECIDE completar el *Codex enológico internacional* con la monografía siguiente y modificar en consecuencia las fichas correspondientes del Código internacional de las prácticas enológicas:

COPOLÍMEROS ADSORBENTES DE POLIVINILIMIDAZOL Y POLIVINILPIRROLIDONA (PVI-PVP)



Núm. CAS 87865-40-5

Certificado conforme
Mendoza, 14 de noviembre de 2014
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea general

Jean-Marie AURAND

1. Definición y ámbito de aplicación

Los copolímeros adsorbentes de PVI-PVP, son polvos insolubles y ligeramente higroscópicos. Se forman a partir de la polimerización en nódulos de N-vinilimidazol (núm. CAS 1072-63-5) y N-vinil-2-pirrolidona (núm. CAS 88-12-0), en una proporción de 9:1. El N,N'-divinilimidazolidin-2-ona (núm. CAS 13811-50) se utiliza como agente de reticulación en una cantidad inferior a 2wt% con respecto a la cantidad del monómero.

Los copolímeros adsorbentes de PVI-PVP se añaden al mosto o al vino de conformidad con las fichas del *Código de prácticas enológicas* de la OIV en dosis inferiores a 500 mg/l.

Los copolímeros adsorbentes de PVI/PVP pueden añadirse al mosto o al vino para evitar los problemas ligados a las concentraciones excesivas de metales o para disminuir dichas concentraciones cuando sean mayores de lo deseado.

El mosto o el vino deben filtrarse a través de un filtro con un diámetro de poro máximo de 3 micras (la presión de filtración no debe superar 0,8 bar).

2. Sinónimos

Terpolímero de 1-vinilimidazol, 1-vinilpirrolidona y 1,3-divinilimidazolidinona.

Copolímero reticulado de vinilimidazol y vinilpirrolidona.

3. Etiquetado

En las etiquetas debe constar que el copolímero adsorbente de PVI-PVP es para uso enológico. Deben figurar también las normas de conservación y de seguridad.

El etiquetado deberá mencionar una Fecha Límite de Utilización de 3 años.

4. Características

Polvo blanco o amarillento.

El copolímero adsorbente de PVI-PVP es insoluble en la práctica totalidad de los disolventes corrientes, por lo que resulta imposible determinar su peso molecular.

5. Ensayos

5.1 Pérdida de masa por desecación

Tarar una cápsula metálica de 50 mm de diámetro. Poner entre 0,8 y 1,4 gramos del copolímero de PVI-PVP, mezclado y pesado de forma precisa en el recipiente. Pesarlo todo en una balanza cerrada. Secar en una estufa a $140\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante una hora. Dejar enfriar en un desecador. Volver a pesar.

La pérdida de masa debe ser inferior al 5 %.

5.2 Cenizas

Calentar al rojo oscuro un crisol de porcelana, dejar que se enfríe en un desecador y pesar. Disponer 1,5 g del copolímero de PVI-PVP en el crisol e incinerar en un horno mufla a $800\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta que la masa sea constante, dejando enfriar el crisol en un desecador después de cada incineración. La primera incineración dura 6 horas. Si fuera necesario, se puede realizar una preincineración de la muestra.

El peso de las cenizas debe ser inferior al 0,02 %.

5.3 Preparación de la solución para ensayos

Una vez pesadas, las cenizas se disuelven en 1 ml de ácido clorhídrico concentrado (R) y 10 ml de agua destilada. Calentar la mezcla para facilitar la disolución. Enrasar a 20 ml con agua destilada. 1 ml de esta disolución contiene los minerales de 0,075 g de copolímero adsorbente de PVI-PVP.

*Certificado conforme
Mendoza, 14 de noviembre de 2014
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea general*

Jean-Marie AURAND

5.4 Zinc

A partir de la disolución del punto anterior, determinar la concentración de zinc según el método descrito en el capítulo II.

Debe ser inferior a 1 mg/kg.

5.5 Hierro

A partir de la disolución del punto 5.3, determinar la concentración de hierro según el método descrito en el capítulo II.

El contenido de hierro deberá ser inferior a 1 mg/kg.

5.6 Cobre

A partir de la disolución del punto 5.3, determinar la concentración de cobre según el método descrito en el capítulo II.

El contenido de cobre deberá ser inferior a 1 mg/kg.

5.7 Plomo

A partir de la disolución del punto 5.3, determinar la concentración de plomo según el método descrito en el capítulo II.

El contenido de plomo deberá ser inferior a 2 mg/kg.

5.8 Cadmio

A partir de la disolución del punto 5.3, determinar la concentración de cadmio según el método descrito en el capítulo II.

El contenido de cadmio deberá ser inferior a 1 mg/kg.

5.9 Arsénico

En este caso no se utiliza la disolución del punto 5.3.

Determinar la concentración de arsénico según el método descrito en el capítulo II.

El contenido de arsénico deberá ser inferior a 2 mg/kg.

5.10 Mercurio

En este caso no se utiliza la disolución del punto 5.3.

Determinar la concentración de mercurio según el método descrito en el capítulo II.

El contenido de mercurio deberá ser inferior a 1 mg/kg.

5.11 Impurezas orgánicas

Determinar la concentración de las impurezas orgánicas según el método descrito en el anexo 1.

Los límites máximos se especifican a continuación:

- Vinilpirrolidona: menos de 5 mg/kg
- Vinilimidazol: menos de 10 mg/kg
- Divinilimidazolidinona: menos de 2 mg/kg
- Pirrolidona: menos de 50 mg/kg
- Imidazol: menos de 50 mg/kg

*Certificado conforme
Mendoza, 14 de noviembre de 2014
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea general*

Jean-Marie AURAND

5.12 Nitrógeno total

Poner alrededor de 450 mg del copolímero adsorbente PVI-PVP (toma de ensayo *m* en mg) en un matraz, añadir 10 g de catalizador Missouri¹ y 3 cuentas de vidrio. Aclarar con un poco de ácido sulfúrico (R) para que no queden partículas pegadas al cuello del matraz. Añadir un total de 20 ml de ácido sulfúrico (R) haciendo que resbale por las paredes del matraz y mezclar con un movimiento giratorio. Continuar el análisis según el método descrito en el capítulo II.

El valor de la concentración total de nitrógeno debe estar comprendido entre el 26,0 y el 29,0 por ciento (en peso seco).

5.13 Solubilidad en medio acuoso

Añadir 10 g del copolímero adsorbente de PVI-PVP a 100 ml de agua en un matraz aforado de 200 ml. Agitar y dejar en reposo 24 horas. Filtrar a través de un filtro de membrana de 2,5 µm de diámetro de poro y después a través de otro de 0,8 µm. El residuo seco obtenido tras la evaporación al baño maría del producto de la filtración debe ser inferior al 0,5 %.

5.14 Solubilidad en ácido y en alcohol

Introducir 1 g del copolímero adsorbente de PVI-PVP en un frasco que contenga 500 ml de la mezcla siguiente:

Ácido acético	3 g
Etanol	10 ml
Agua	100 ml

Dejar en reposo 24 horas. Filtrar a través de un filtro de membrana de 2,5 µm de diámetro de poro y después a través de otro de 0,8 µm. Concentrar el filtrado al baño maría. Acabar la evaporación al baño maría en una cápsula de sílice de 70 mm de diámetro previamente tarada. El residuo seco obtenido tras la evaporación debe ser inferior al 1 %, teniendo en cuenta la totalidad del residuo de evaporación de los 500 ml de la mezcla de ácido acético, etanol y agua.

5.15 Determinación y límites de los monómeros en los mostos y en los vinos

5.15.1. Método analítico

Proceder a la determinación según el método descrito en el anexo 2.

5.15.2. Límites máximos de monómeros en mostos y vinos²

La concentración de Vinilpirrolidona debe ser inferior a 10 µg/l

La concentración de Vinilimidazol debe ser inferior a 10 µg/l

La concentración de Pirrolidona debe ser inferior a 25 µg/l

¹ Catalizador Missouri (= 49,9 % K₂SO₄ + 49,8 % Na₂SO₄ + 0,3 % CuSO₄), Merck, Darmstadt o equivalente.

² El cálculo del límite superior se basa en los resultados obtenidos en las pruebas de migración = la dosis recomendada de 0,5 g/l, la aplicación máxima de 48 horas y a una temperatura de 20 °C, multiplicado por el factor 2.

En condiciones ácidas (valor de pH más bajo), la divinilimidazolidinona (urea de divinil etileno) no es estable y, en consecuencia, degenera en imidazolidinona y vinilalcohol. Además, la imidazolidinona degenera en urea y etilenglicol. El vinilalcohol es un equilibrio químico con acetaldehído.

La imidazolidinona, el acetaldehído, la urea y el etilenglicol fueron incluidos en la evaluación toxicológica.

*Certificado conforme
Mendoza, 14 de noviembre de 2014
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea general*

Jean-Marie AURAND

La concentración de Imidazol debe ser inferior a 150 µg/l

6. Conservación

El copolímero adsorbente de PVI-PVP se debe guardar en un lugar fresco, en recipientes secos y cerrados herméticamente.

*Certificado conforme
Mendoza, 14 de noviembre de 2014
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea general*

Jean-Marie AURAND

Anexo 1

Determinación de los monómeros constitutivos y de las posibles impurezas presentes en los copolímeros de vinilpirrolidona y vinilimidazol (vinilimidazol, vinilpirrolidona, pirrolidona, diviniletilenurea e imidazol) mediante cromatografía de gases

1. Fundamento

Detección y determinación cuantitativa de los monómeros constitutivos y de las posibles impurezas presentes en los copolímeros de vinilpirrolidona y vinilimidazol (vinilimidazol, vinilpirrolidona, pirrolidona, diviniletilenurea e imidazol).

El análisis se realiza mediante cromatografía de gases en columna capilar con detector de compuestos nitrogenados (NSD). Las sustancias que se van a analizar se extraen previamente del polímero con acetona.

2. Gama de concentraciones

Vinilimidazol:	2-55 µg/g
Vinilpirrolidona:	2-50 µg/g
Pirrolidona:	2-70 µg/g
Diviniletilenurea:	2-33 µg/g
Imidazol:	2-50 µg/g

3. Reactivos y material de referencia

3.1. Copolímeros de vinilpirrolidona y vinilimidazol

3.2. Vinilimidazol, $M(C_5H_6N_2) = 94,12 \text{ g/mol}$
pureza > 99 % (CG), por ej. Fluka, artículo n.º 95005
(R: 22-34, S: 26-36/37/39-45)

3.3. Vinilpirrolidona (1-vinil-2-pirrolidona), $M(C_6H_9NO) = 111,14 \text{ g/mol}$
pureza = 99,8 % (CG), por ej. Fluka, artículo n.º 95060
(R: 20/21/22-36/37/38-40, S: 26-36/37/39)

3.4. Pirrolidona (2-pirrolidona), $M(C_4H_7NO) = 85,11 \text{ g/mol}$
pureza > 99 % (CG), por ej. Fluka, artículo n.º 83300
(R: 36/37/38, S: 26-36)

3.5. Diviniletilenurea (N,N-divinilimidazolidona), $M(C_7H_{10}N_2O) = 138,17 \text{ g/mol}$
pureza ≥ 99 % (CG), material de referencia BASF
(R: 36/38-40, S: 26-36/37)

3.6. Imidazol, $(C_3H_4N_2) = 68,08 \text{ g/mol}$
pureza > 99,5 % (CG), por ej. Fluka, artículo n.º 56748
(R: 22-34, S: 26-36/37/39-45)

3.7. Benzonitrilo
pureza > 99 % (CG), por ej. Merck-Schuchardt, artículo n.º 801800

*Certificado conforme
Mendoza, 14 de noviembre de 2014
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea general*

Jean-Marie AURAND

(R: 10-35, S: 23-26-45)

3.8. Acetona

pureza > 99 % (CG), por ej. Fluka, artículo n.º 00585

(R: 11, S: 9-16-23-33)

4. Instrumental

4.1. Cromatógrafo de gases con cambiador de muestras automático, inyector con válvula de división de flujo y detector de compuestos nitrogenados (NSD).

4.2. Columna capilar de sílice fundida con recubrimiento de polietilenglicol (por ej. DB-Wax o J&W Scientific)

Longitud: 30 m

Diámetro interior: 0,25 mm

Grosor del recubrimiento: 0,5 µm

4.3. Sistema informático para la obtención de datos

4.4. Balanza analítica de 0,1 mg de precisión

4.5. Instrumental de vidrio y aparatos típicos de laboratorio

4.6. Agitador para recipientes pequeños (ej. 50 ml)

5. Soluciones

5.1. Solución de patrón interno

Benzonitrilo en acetona (3.8) a una concentración de 250 µg/ml.

5.2. Solución madre

Preparar una disolución madre en acetona (3.8) con vinilimidazol, vinilpirrolidona, pirrolidona, diviniletilenurea e imidazol en concentraciones diferentes (de 250 mg/l a 1000 mg/l).

5.3. Soluciones patrón

Preparar al menos dos disoluciones patrón de concentraciones distintas en acetona (3.8). Cada disolución debe contener una cantidad adecuada de patrón interno y vinilimidazol, vinilpirrolidona, pirrolidona, diviniletilenurea e imidazol de forma que los puntos de calibrado engloben el valor que se quiere medir.

A modo de ejemplo:

4 µl-200 µl de disolución madre (5.2) + 24 ml de acetona (3.8) + 1 ml de disolución de patrón interno (5.1)

6. Condiciones cromatográficas a título de ejemplo

Temperaturas:

Inyector: 220 °C

Horno: 160 °C

Programar un aumento de 5 °C/min hasta 210 °C

Isoterma final: 210 °C, 7 min

*Certificado conforme
Mendoza, 14 de noviembre de 2014
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea general*

Jean-Marie AURAND

Detector (NSD):	250 °C
Gas vector:	helio
Presión de salida:	1,4 bar 140 kPa (1,4 bar)
División de flujo:	10 ml/min
Purga:	5 ml/min
Volumen inyectado:	1,0 µl

7. Comprobación previa del sistema de análisis

7.1. Resolución

Preparar una disolución de benzonitrilo y vinilimidazol (10 y 2 µg/ml en acetona).

Inyectar la disolución en el cromatógrafo en las condiciones descritas en el apartado 6.

El análisis se da por bueno cuando la resolución de los dos picos es al menos de 1,5 ($R > 1,5$), valor que indica que la separación es completa pues se produce un retorno a la línea base entre pico y pico.

7.2. Sensibilidad

Para comprobar la sensibilidad:

1) Efectuar un análisis previo de una muestra (8.1) en las condiciones que se describen en el apartado 6.

2) Añadir a la muestra 2 µg/g de diviniletilenurea y repetir el análisis en las condiciones que se describen en el apartado 6.

Si la muestra original no contenía diviniletilenurea, el sistema se considera adecuado si el pico de la diviniletilenurea añadida presenta una relación señal/ruido de al menos 10.

Si la muestra contenía diviniletilenurea, se debe obtener un aumento claro de la señal.

8. Procedimiento

8.1. Preparación de las muestras

Pesar 2 g de la muestra con una precisión exacta de 0,1 mg y mezclarlos con 1 ml de disolución de patrón interno (5.1) y 24 ml de acetona (3.8). A continuación, proceder a la extracción durante 4 horas en el agitador (4.6) y analizar el sobrenadante en las condiciones descritas en el apartado 6.

Normalmente cada muestra se analiza un par de veces.

8.2. Cromatografía de gases

Cromatograma del producto de la extracción de un copolímero con acetona (fig. 1)

Cromatograma del producto de la extracción con acetona de un copolímero enriquecido con los analitos (Fig. 2).

9. Cálculos

9.1. Factor de calibrado

Factor de calibrado de la cromatografía de gases $f(i)$:

*Certificado conforme
Mendoza, 14 de noviembre de 2014
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea general*

Jean-Marie AURAND

$$f(i) = \frac{A(i)_0 \times m(I.S.)_0}{m(i)_0 \times A(I.S.)_0}$$

$A(i)_0$ es el área del pico del analito i en el cromatograma de la disolución patrón (mVs)
 $m(i)_0$ es el peso inicial de producto de referencia i en la disolución patrón [mg]
 $A(I.S.)_0$ es el área del pico del patrón interno en el cromatograma de la disolución patrón (mVs)
 $m(I.S.)_0$ es el peso inicial de patrón interno en la disolución patrón [mg]

La proporción en masa de analito i se con la siguiente fórmula:

$$w(i) = \frac{A(i) \times m(I.S.)}{A(I.S.) \times m(s) \times f'(i)}$$

$w(i)$ es la proporción en masa de analito i [$\mu\text{g/g}$]
 $A(i)$ es el área del pico del analito i en el cromatograma de la muestra (mVs)
 $A(I.S.)$ es el área del pico del patrón interno en el cromatograma de la muestra (mVs)
 $m(I.S.)$ es el peso inicial de patrón interno añadido a la muestra [μg]
 $m(s)$ es el peso inicial de la muestra [g]
 $f'(i)$ el factor de calibrado medio de la cromatografía de gases
 Normalmente, el resultado se redondea a un valor entero.

10. Características del método

10.1. Especificidad, selectividad

Los picos de retención del cromatograma se identifican comparando los tiempos de retención de cada uno de ellos con los tiempos de retención de las disoluciones de sustancias puras (3.2-3.6) inyectadas en las mismas condiciones.

Se debe comprobar que los tiempos de retención de los componentes de la muestra sean distintos del tiempo de retención del patrón interno y que la resolución entre los picos sea superior a 1,5.

10.2. Linealidad

Los factores de calibrado de cada analito se determinan con 6 concentraciones distintas. Las funciones de calibrado son rectas (figs. 3-7) con los coeficientes de determinación siguientes:

Vinilimidazol	$R^2 = 0,9987$
Vinilpirrolidona	$R^2 = 0,9999$
Pirrolidona	$R^2 = 0,9956$
Diviniletilenurea	$R^2 = 0,9937$
Imidazol	$R^2 = 0,9982$

10.3. Límite de determinación

Las medidas de calibrado se obtienen los límites de determinación siguientes:

Vinilimidazol:	2 $\mu\text{g/g}$
Vinilpirrolidona:	2 $\mu\text{g/g}$
Pirrolidona:	2 $\mu\text{g/g}$

*Certificado conforme
 Mendoza, 14 de noviembre de 2014
 El Director General de la OIV
 Secretario de la Asamblea general*

Jean-Marie AURAND

Diviniletilenurea: 2 µg/g
 Imidazol: 2 µg/g

10.4. Precisión

Para determinar la precisión en condiciones de repetibilidad, se analizó 6 veces una muestra de copolímero.

Cuadro 1

		Vinilimidazol	Vinilpirrolidona	Pirrolidona	Diviniletilenurea	Imidazol
1. Análisis	[µg/g]	indeterm.*	indetect.**	4,1	indetect.	10,7
2. Análisis	[µg/g]	indeterm.	indetect.	4,3	indetect.	10,8
3. Análisis	[µg/g]	indeterm.	indetect.	4,2	indetect.	11,5
4. Análisis	[µg/g]	indeterm.	indetect.	4,3	indetect.	11,8
5. Análisis	[µg/g]	indeterm.	indetect.	3,9	indetect.	10,2
6. Análisis	[µg/g]	indeterm.	indetect.	3,9	indetect.	10,8
Media	[µg/g]	indeterm.	indetect.	4,1	indetect.	11,0
Desviación típica	[µg/g]			0,2		0,6
Coef. de variación	%			4,8		5,1
Incertidumbre	[µg/g]			0,6		1,7
Incertidumbre rel.	%			14		15

* indeterm. = indeterminable

** indetect. = indetectable

En la muestra, la vinilpirrolidona y la diviniletilenurea no se pudieron detectar y el vinilimidazol no se pudo cuantificar.

10.4.1. Repetibilidad

La muestra de copolímero se enriqueció con todos los analitos y se analizó 6 veces. La precisión en las condiciones de repetibilidad se puede deducir de los porcentajes de repetición de la vinilpirrolidona, la diviniletilenurea y el vinilimidazol.

*Certificado conforme
 Mendoza, 14 de noviembre de 2014
 El Director General de la OIV
 Secretario de la Asamblea general*

Jean-Marie AURAND

Cuadro 2

		Vinilimidazol	Vinilpirrolidona	Pirrolidona	Diviniletilenurea	Imidazol
1. Análisis	[%]	102,3	112,4	97,0	103,3	90,7
2. Análisis	[%]	98,5	101,9	89,6	102,1	91,7
3. Análisis	[%]	111,8*	111,5	105,7	111,1	112,6*
4. Análisis	[%]	102,7	103,3	91,9	104,8	94,5
5. Análisis	[%]	104,2	101,0	89,3	102,7	97,0
6. Análisis	[%]	100,4	104,9	90,4	110,3	95,4
Media	[%]	101,6	105,8	94,0	105,7	93,9
Desviación típica	[%]	2,2	4,9	6,4	3,9	2,6
Coef. de variación	[%]	2,2	4,7	6,8	3,7	2,8
Incertidumbre	[%]	6,6	14,8	19,2	11,8	7,8
Incertidumbre rel.	[%]	7	14	20	11	8

* = valor aberrante (Dixon)

10.5. Tasa de recuperación de las adiciones

La tasa de recuperación se calcula con los datos de la tabla 2.

Vinilimidazol:	101,6 %
Vinilpirrolidona:	105,8 %
Pirrolidona:	94,0 %
Diviniletilenurea:	105,7 %
Imidazol:	93,9 %

Nota

Aplicación del método a otros copolímeros de vinilpirrolidona y vinilimidazol

El método es válido para el producto Divergan HM, pero en principio se puede aplicar a otros copolímeros de vinilpirrolidona y vinilimidazol.

*Certificado conforme
Mendoza, 14 de noviembre de 2014
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea general*

Jean-Marie AURAND

Figuras

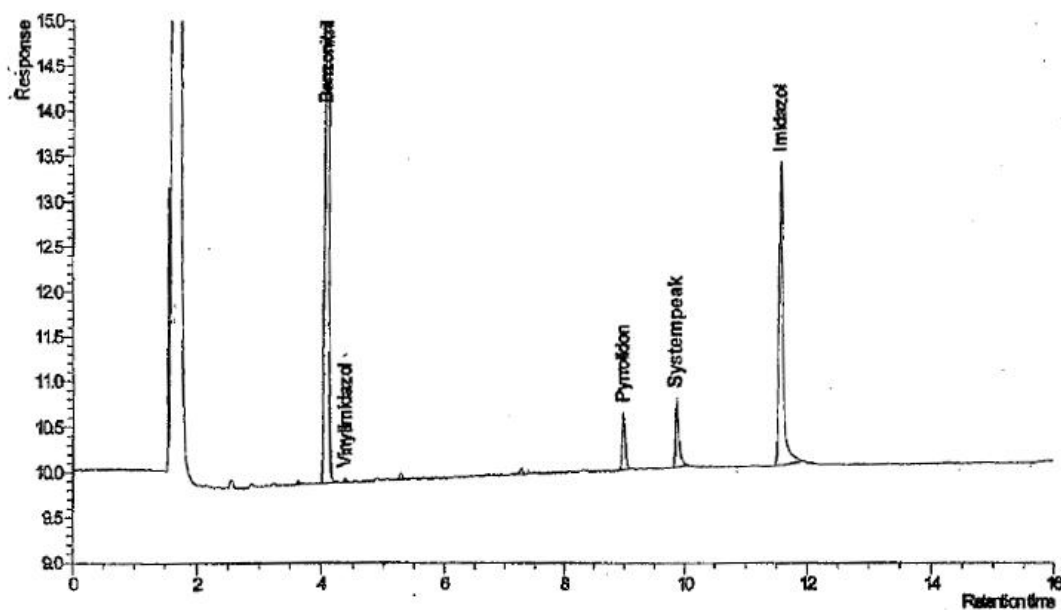


Fig. 1: Cromatograma del producto de la extracción del copolímero (con patrón interno)

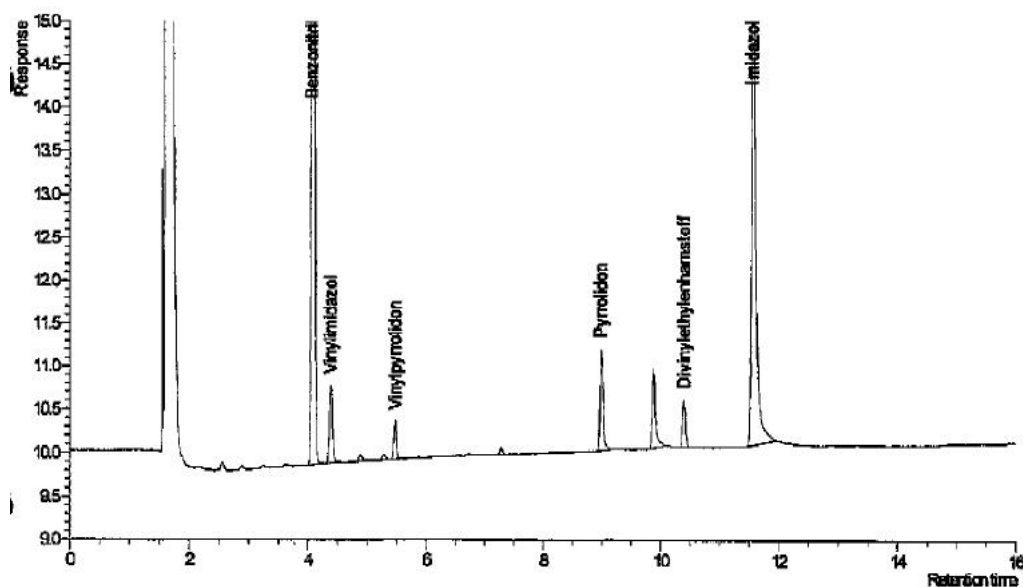


Fig. 2: Cromatograma del producto de la extracción del copolímero (con patrón interno) enriquecido con 2,1 µg/g de vinilimidazol, 2,1 µg/g de vinilpirrolidona, 3,9 µg/g de pirrolidona, 2,1 µg/g de diviniletilenurea y 12,7 µg/g de imidazol.

Certificado conforme
Mendoza, 14 de noviembre de 2014
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea general

Jean-Marie AURAND

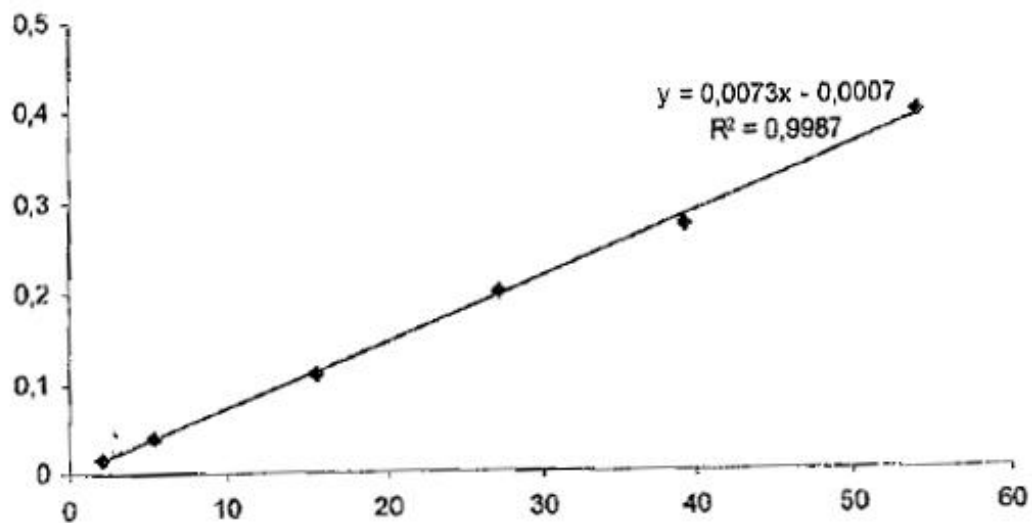


Fig. 3: recta de calibrado del vinilimidazol

µg/g

Área del pico analito*alícuota (std. int.)

Área del pico (std. int.) [mg]

Cantidad de analito frente a la cantidad de muestra [µg/g]

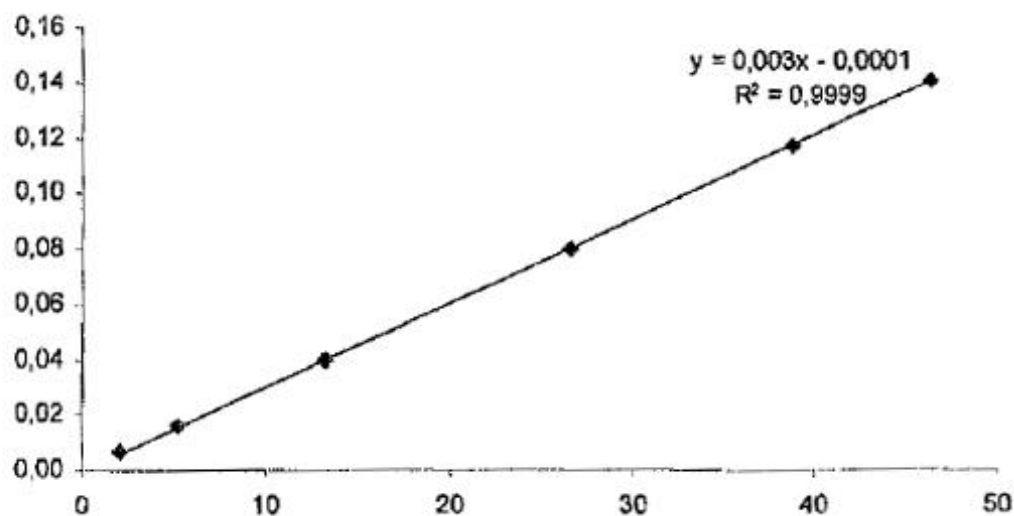


Fig. 4: recta de calibrado de la vinilpirrolidona

Área del pico analito*alícuota (std. int.)

Área del pico (std. int.) [mg]

Cantidad de analito frente a la cantidad de muestra [µg/g]

*Certificado conforme
Mendoza, 14 de noviembre de 2014
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea general*

Jean-Marie AURAND

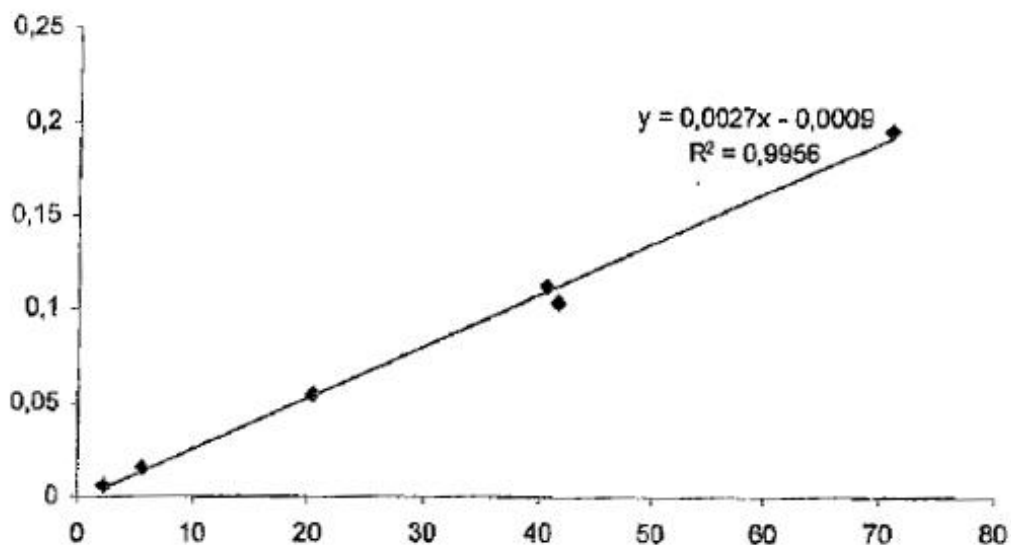


Fig. 5: recta de calibrado de la pirrolidona

Área del pico analito*alícuota (std. int.)

Área del pico (std. int.) [mg]

Cantidad de analito frente a la cantidad de muestra [μg/g]

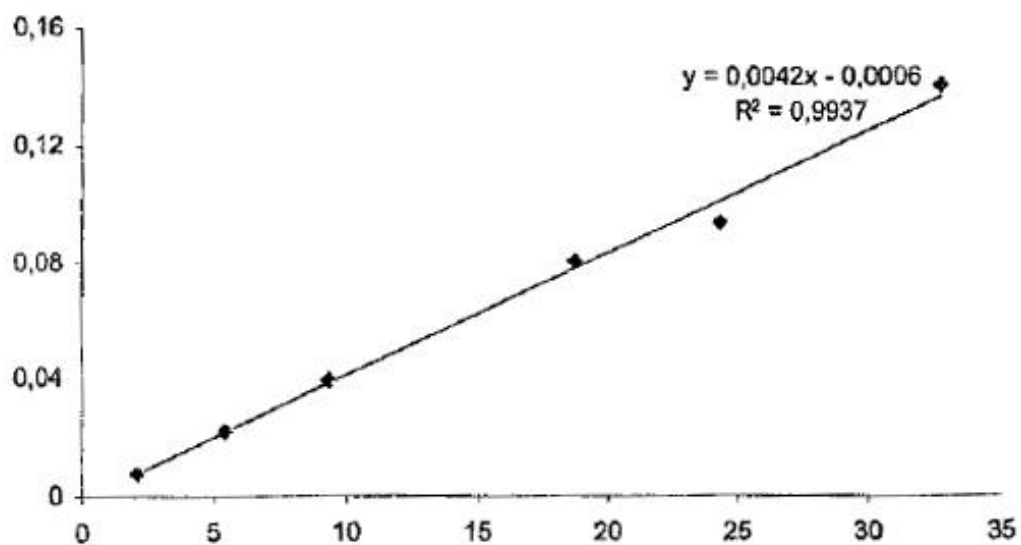


Fig. 6: recta de calibrado de la diviniletilenurea

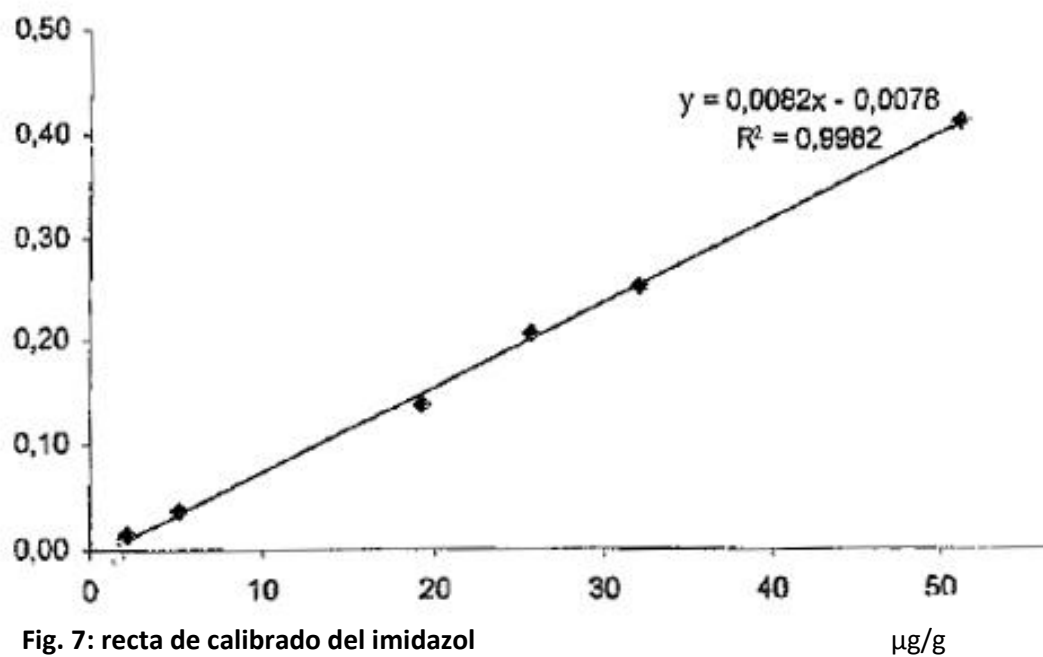
Área del pico analito*alícuota (std. int.)

Área del pico (std. int.) [mg]

Cantidad de analito frente a la cantidad de muestra [μg/g]

*Certificado conforme
Mendoza, 14 de noviembre de 2014
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea general*

Jean-Marie AURAND



Área del pico analito*alícuota (std. int.)

Área del pico (std. int.) [mg]

Cantidad de analito frente a la cantidad de muestra [µg/g]

Certificado conforme
Mendoza, 14 de noviembre de 2014
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea general

Jean-Marie AURAND

Anexo 2

Método analítico para la detección de imidazol, pirrolidona y monómeros residuales (vinilpirrolidona, vinilimidazol, divinilimidazolidinona) en vinos y mostos

1 Campo de aplicación

El método descrito es aplicable para la determinación de imidazol, pirrolidona, vinilimidazol y vinilpirrolidona en los vinos blancos, tintos, dulces y secos así como en el mosto.

La divinilimidazolidinona tiene una vida media de 3,75 min a un valor de pH de 3,7. Consecuentemente, no resulta apropiada una determinación ni en el vino ni en el mosto.

El estudio descrito abarca el grado de concentración: de 5 a 125 µg/l para imidazol, de 25 a 250 µg/l para pirrolidona, de 2 a 25 µg/l para vinilimidazol y de 2 a 12,5 µg/l para vinilpirrolidona.

2 Definiciones

HPLC	(High Performance Liquid Chromatography), cromatografía líquida de alta resolución
LC-MS	(Liquid Chromatography – Mass spectrometry), cromatografía líquida – espectrometría de masa
MRM	(Multiple Reaction Monitoring), supervisión de reacciones múltiples

3 Principio

Se analizan las muestras directamente por LC-MS sobre una columna de fase invertida (C18). Después se lleva a cabo la detección en el modo de supervisión de reacciones múltiples.

4 Reactivos y materiales

4.1 Productos químicos

- 4.1.1 Metanol (LiChrosolv) (CAS: 67-56-1) calidad para CL-SM
- 4.1.2 Agua bidestilada
- 4.1.3 Ácido heptafluorobutírico, puriss., ≥99,5% (CAS: 375-22-4)

4.2 Preparación de eluyentes

- 4.2.1 Solvente A:
En pipeta 0,6 ml de ácido heptafluorobutírico (4.1.3) a 1000 ml agua bidestilada (4.1.2), sacudir y desgasificar.
- 4.2.2 Solvente B:
Añadir 300 ml de agua bidestilada (4.1.2) a 700 ml de metanol (4.1.1) y sacudir. En pipeta 0,6 ml de ácido heptafluorobutírico (4.1.3) de esta solución, sacudir y desgasificar.

4.3 Estándares

- 4.3.1 Imidazol, ≥99,5 % (CAS: 288-32-4)
- 4.3.2 Pirrolidona, ≥99 % (CAS: 616-45-5)

*Certificado conforme
Mendoza, 14 de noviembre de 2014
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea general*

Jean-Marie AURAND

- 4.3.3 Vinilimidazol, $\geq 99\%$ (CAS: 1072-63-5)
- 4.3.4 Vinilpirrolidona, $\approx 99,8\%$ (CAS: 88-12-0)

4.4 Preparación de soluciones estándar

- 4.4.1 Preparación de las soluciones estándar de reserva (1,00 g/l):
Pese exactamente 100 mg de estándar (4.3.1-4.3.4), transfíralos sin pérdidas a un frasco volumétrico de 100 ml, llene con agua bidestilada (4.1.2) hasta cerca de 90 ml, sacúdalo y ajuste a 100 ml.
- 4.4.2 Preparación de la solución estándar común (imidazol: 62,5 mg/l; pirrolidona: 62,5 mg/l; vinilimidazol: 12,5 mg/l; vinilpirrolidona: 6,25 mg/l):
Pipeta con 6,25 ml de la solución común de imidazol (4.4.1), 6,25 ml de la solución común de pirrolidona (4.4.1), 1,25 ml de la solución común de vinilimidazol (4.4.1) y 0,625 ml de la solución común de vinilpirrolidona (4.4.1) pásese a un frasco volumétrico de 100 ml, llene con agua bidestilada (4.1.2) hasta unos 90 ml, sacúdase y ajústese a 100 ml.
- 4.4.3 Preparación de la solución estándar de trabajo:
Pipeta 40 μ l de solución estándar mezclada (4.4.2) en un frasco volumétrico de 25-ml, llénese con agua bidestilada hasta 25 ml y sacúdala.

4.5 Preparación de la curva de calibración de la matriz

Las soluciones de calibración ajustadas a la matriz se preparan en un vino o mosto no contaminados. Diluya la solución estándar mezclada (4.4.2) de manera apropiada con la muestra para obtener cinco estándares de trabajo. Deberán prepararse estándares calibrados justo antes de la medida!

volumen final	Estándar mezclado	Imidazol	Pirrolidona	Vinilimidazol	Vinilpirrolidona
25 ml	0 μ l	0 μ g/l	0 μ g/l	0 μ g/l	0 μ g/l
25 ml	10 μ l	25 μ g/l	25 μ g/l	5 μ g/l	2,5 μ g/l
25 ml	20 μ l	50 μ g/l	50 μ g/l	10 μ g/l	5 μ g/l
25 ml	30 μ l	75 μ g/l	75 μ g/l	15 μ g/l	7,5 μ g/l
25 ml	40 μ l	100 μ g/l	100 μ g/l	20 μ g/l	10 μ g/l
25 ml	50 μ l	125 μ g/l	125 μ g/l	25 μ g/l	12,5 μ g/l

5 Aparatos

- 5.1 Balanza analítica, legibilidad $\pm 0,1$ mg
- 5.2 Varias pipetas de precisión y frascos volumétricos
- 5.3 Ampollas HPLC (4 ml)
- 5.4 Cromatógrafo líquido de alto rendimiento con detector espectrométrico de masa (Applied Biosystems API 4000 o equivalente)
- 5.5 Eurosfera Knauer 100-5 C18 con una columna preintegrada o equivalente

*Certificado conforme
Mendoza, 14 de noviembre de 2014
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea general*

Jean-Marie AURAND

Diámetro interno: 4,6 mm
Longitud: 250 mm
Fase estacionaria: C18, tamaño del poro: 100 Å, tamaño de partícula: 5 µm, extremo cerrado

6 Preparación de muestras

6.1 Solución del modelo de vino

La solución del modelo de vino se prepara de conformidad con Martínez-Rodríguez y Polo (2000) *Characterization of the Nitrogen Compounds Released during Yeast Autolysis in a Model Wine System*.

Se disuelven 4 gramos de ácido tartárico, 0,1 g de ácido acético y 120 ml de etanol en 800 ml de agua (bidest.). Tras ajustar el valor del pH con 2 N de hidróxido de sodio a 3,2, la solución alcanza los 1000 ml. La temperatura para la solución del modelo de vino debe ser de 20°C.

6.2 Preparación de muestras para análisis migratorios

Se añaden 0,5 g de Divergan HM a 1 litro de solución del modelo de vino y se agita a 20°C durante 48 horas (a unas 150 rpm).

Antes de proceder al análisis, la muestra se debe centrifugar (durante 3 minutos a 4500 rpm) y filtrar en un filtro de membrana de 0,45 µm.

6.3 Otras muestras (p. ej. mostos y vinos)

Las muestras claras se llenan en ampollas de muestras y se suministran directamente a la cromatografía sin ninguna preparación de muestras. Las muestras turbias de vino se filtran a través un filtro membrana antes de inyectarlas, descartándose las primeras fracciones del filtrado.

7 Análisis LC-MS

7.1 Condiciones operativas del HPLC:

Volumen de la inyección: 10 µl

Caudal: 1 ml/min

Gradiente: 85 : 15 (A : B) $\xrightarrow{10 \text{ min}}$ 85 : 15 $\xrightarrow{5 \text{ min}}$ 0 : 100 $\xrightarrow{10 \text{ min}}$ 0 : 100
 $\xrightarrow{5 \text{ min}}$ 85 : 15 $\xrightarrow{15 \text{ min}}$ 85 : 15

Calentador de la columna: 25 °C

Tiempo de pasada: 45 min

7.2 Condiciones MS:

Espectrómetro de masa: Applied Biosystems API 4000 o equivalente

Tipo de escaneo: MRM

Polaridad: Positiva

Fuente de iones: Turbo Spray

Duración: 20,005 min; 1364 ciclos

Cortina de gas: 40 psi

*Tensión al pulverizador
de iones:* 2500 V

Temperatura: 550 °C

Certificado conforme
Mendoza, 14 de noviembre de 2014
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea general

Jean-Marie AURAND

Gas 1 fuente de iones: 60 psi
 Gas 2 fuente de iones: 60 psi
 Gas de colisión: Medio
 Potencial de entrada: 10 V
 Collarín 2: 0

Compuesto	Masa Q1 (amu)	Masa Q3 (amu)	Dwell (mseg)	Parámetro	Inicio	Parada
Imidazol	69,08	42,20	75,00	DP	81,00	81,00
				CE	31,00	31,00
				CXP	2,00	2,00
Pirrolidona	86,10	44,10	75,00	DP	66,00	66,00
				CE	31,00	31,00
				CXP	6,00	6,00
	86,10	69,00	75,00	DP	66,00	66,00
				CE	23,00	23,00
				CXP	4,00	4,00
Vinilimidazol	95,09	41,10	75,00	DP	71,00	71,00
				CE	33,00	33,00
				CXP	0,00	0,00
	95,09	69,20	75,00	DP	71,00	71,00
				CE	29,00	29,00
				CXP	12,00	12,00
Vinilpirrolidona	112,08	69,20	75,00	DP	51,00	51,00
				CE	21,00	21,00
				CXP	4,00	4,00
	112,08	84,00	75,00	DP	51,00	51,00
				CE	17,00	17,00
				CXP	14,00	14,00

DP: Potencial de desaglomeración (en voltios)

CE: Energía de colisión (en voltios)

CXP: Potencial de salida de célula (en voltios)

8 Evaluación

8.1 Identificación

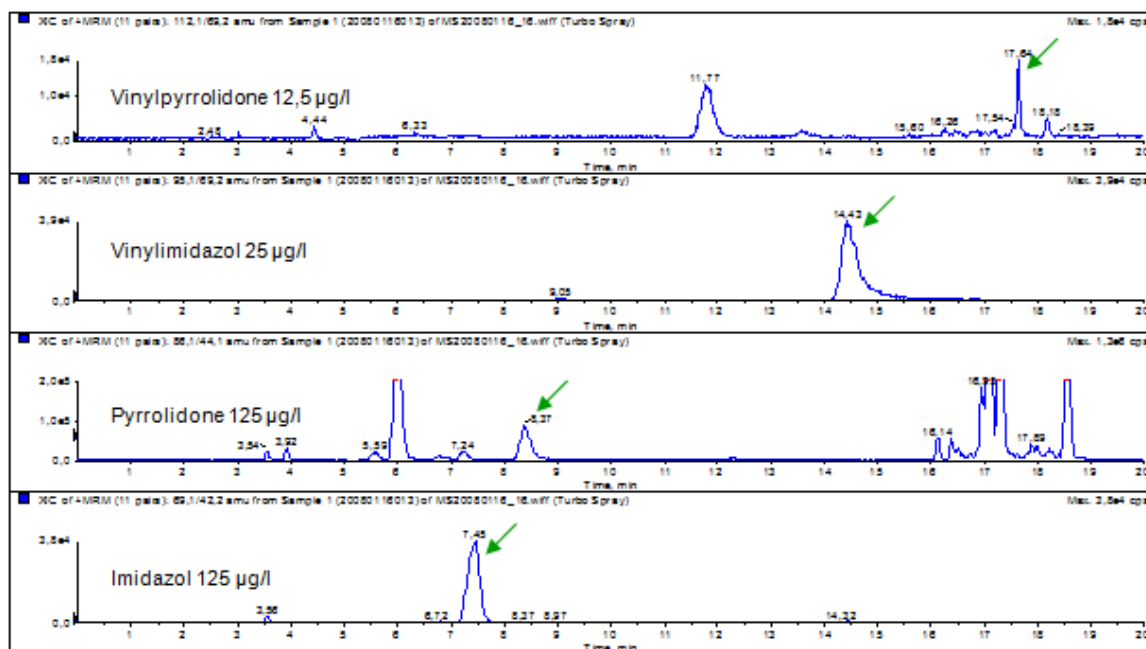
Inyecte 10 µl de la solución estándar de trabajo (4.4.3) para calcular los tiempos de retención.
 Tiempos aproximados de retención:

compuesto	tiempo de retención
Imidazol	7,45 min
Pirrolidona	8,37 min
Vinilimidazol	14,43 min
Vinilpirrolidona	17,64 min

Certificado conforme
 Mendoza, 14 de noviembre de 2014
 El Director General de la OIV
 Secretario de la Asamblea general

Jean-Marie AURAND

Cromatograma de una matriz de calibración estándar in vino blanco:



8.2 Cuantificación

Transferencias de masa para la cuantificación:

compuesto	transferencia de masa
Imidazol	69,1 → 42,2
Pirrolidona	86,1 → 44,1
Vinilimidazol	95,1 → 69,2
Vinilpirrolidona	112,1 → 69,2

Use la adición ordinaria para la cuantificación.

Certificado conforme
Mendoza, 14 de noviembre de 2014
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea general

Jean-Marie AURAND

8.3 Expresión de los resultados

Los resultados deberían expresarse en µg/l para imidazol, pirrolidona, vinilimidazol y vinilpirrolidona y sin ningún decimal (por ej. 3 µg/l).

8.4 Límite de detección y límite de cuantificación

El límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LQ) depende de condiciones individuales de medida del análisis químico y deben ser determinadas por el usuario del método.

El límite de detección (LD) y el límite de cuantificación fueron estimados utilizando la instrumentación y condiciones mencionadas (por ejemplo, (s. 7) siguiendo las instrucciones en la resolución OENO 7-2000 (E-AS1-10-LIMDET) “Estimación de los Límites de Detección y Cuantificación de un Método de Análisis”. A lo largo de la línea del „Diagrama Lógico para la Toma de Decisiones“, en el N° 3, la aproximación por gráfico debe ser aplicada según el párrafo 4.2.2. Con este propósito, parte de la reacción múltiple que supervisa el cromatograma se traza de forma extensa abarcando un grupo de unos diez picos a media altura ($w_{\frac{1}{2}}$) de un pico analito en una parte correspondiente del mismo. Además, se trazan dos líneas paralelas que enmarcan apretadamente la máxima amplitud de la ventana de señales. La distancia entre esas dos líneas proporcionan el h_{max} , expresado en unidades de abundancia y es multiplicado por 3 para LD, por 10 para LQ y finalmente convertido en unidades de concentración utilizando el factor individual de respuesta.

compuesto	límite de detección (LD)	límite de cuantificación (LQ)
Imidazol	5 µg/l	12 µg/l
Pirrolidona	25 µg/l	83 µg/l
Vinilimidazol	2 µg/l	6 µg/l
Vinilpirrolidona	2 µg/l	6 µg/l

9 Precisión y exactitud

En calidad de matrices, se utilizaron tres diferentes vinos (vino seco blanco, vino seco tinto y vino suave tinto) así como zumo de uva. La reproducibilidad dentro de laboratorio, la repetibilidad y la recuperación fueron calculadas basándose en una matriz de calibración y tres fortificaciones (imidazol: 40/60/80 µg/l; 2-pirrolidona: 40/60/80 µg/l; vinilimidazol: 8/12/16 µg/l; vinilpirrolidona: 4/6/8 µg/l).

*Certificado conforme
Mendoza, 14 de noviembre de 2014
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea general*

Jean-Marie AURAND

9.1 Imidazol

	fortificación	serie promedio	desviación estándar	corresponde a CV	rel. est. de Horwitz %
reproducibilidad dentro de laboratorio (SD_{wIR}):	40 µg/l	41	2	5 %	26
	60 µg/l	61	3	5 %	24
	80 µg/l	80	5	6 %	23
repetibilidad (SD_r):	40 µg/l	41	1	2 %	
	60 µg/l	61	2	3 %	
	80 µg/l	80	4	5 %	
recuperación (WDF):	40 µg/l	102 %			
	60 µg/l	101 %			
	80 µg/l	101 %			
	Ø	101 %			

9.2 Pirrolidona

	fortificación	serie promedio	desviación estándar	corresponde a CV	rel. est. de Horwitz %
reproducibilidad dentro de laboratorio (SD_{wIR}):	40 µg/l	42	9	22 %	26
	60 µg/l	60	9	15 %	24
	80 µg/l	81	9	11 %	23
repetibilidad (SD_r):	40 µg/l	42	5	12 %	
	60 µg/l	60	4	7 %	
	80 µg/l	81	8	9 %	
recuperación (WDF):	40 µg/l	105 %			
	60 µg/l	100 %			
	80 µg/l	101 %			
	Ø	102 %			

Certificado conforme
Mendoza, 14 de noviembre de 2014
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea general

Jean-Marie AURAND

9.3 Vinilimidazol

	fortificación	serie promedio	desviación estándar	corresponde a CV	rel. est. de Horwitz %
reproducibilidad dentro de laboratorio (SD_{wIR}):	8 µg/l	8	0	4 %	33
	12 µg/l	12	1	5 %	31
	16 µg/l	16	1	4 %	30
repetibilidad (SD_r):	8 µg/l	8	0	4 %	
	12 µg/l	12	0	3 %	
	16 µg/l	16	0	3 %	
recuperación (WDF):	8 µg/l	101 %			
	12 µg/l	102 %			
	16 µg/l	102 %			
	∅	102 %			

9.4 Vinilpirrolidona

	fortificación	serie promedio	desviación estándar	corresponde a CV	rel. est. de Horwitz %
reproducibilidad dentro de laboratorio (SD_{wIR}):	4 µg/l	3	1	31 %	37
	6 µg/l	4	1	26 %	35
	8 µg/l	5	2	29 %	33
repetibilidad (SD_r):	4 µg/l	3	1	25 %	
	6 µg/l	4	1	22 %	
	8 µg/l	5	1	26 %	
recuperación (WDF):	4 µg/l	66 %			
	6 µg/l	63 %			
	8 µg/l	66 %			
	∅	65 %			

Certificado conforme
Mendoza, 14 de noviembre de 2014
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea general

Jean-Marie AURAND