



RESOLUTION OIV-OENO 572-2017

MONOGRAPHIE VON KALIUMPOLYASPARTAT

DIE GENERALVERSAMMLUNG,

GESTÜTZT auf Artikel 2 Absatz 2 iv des Übereinkommens vom 3. April 2001 zur Gründung der Internationalen Organisation für Rebe und Wein,

auf Vorschlag der Sachverständigengruppe „Spezifikationen önologischer Erzeugnisse“,

GESTÜTZT auf die Resolution OIV-TECHNO 14-543 „Behandlung von Wein mit Kaliumpolyaspartat“,

BESCHLIESST, den internationalen önologischen Kodex durch folgende Monographie zu ergänzen:

MONOGRAPHIE VON KALIUMPOLYASPARTAT

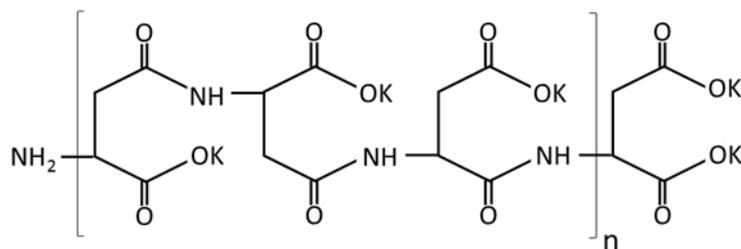
KALIUMPOLYASPARTAT

Chemische Bezeichnung:

L-Kaliumaspartat-Homopolymer oder Kaliumpolyaspartat

Chemische Formel: $[\text{C}_4\text{H}_5\text{NO}_3\text{K}]_n$

Strukturformel



wobei $n \approx 30$

CAS-Nr. 64723-18-8

*Beglaubigte Ausführung
Sofia, den 2. Juni 2017
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung*

Jean-Marie AURAND

1 . GEGENSTAND, URSPRUNG UND ANWENDUNGSGBIET

Kaliumpolyaspartat wird für önologische Verwendungszwecke ausschließlich aus L-Asparaginsäure hergestellt.

Die bei dem Verfahren verwendete monomere L-Asparaginsäure wird durch Fermentation gebildet. Durch ein thermisches Verfahren wird monomere L-Asparaginsäure in unlösliches Polysuccinimid umgewandelt. Das Polysuccinimid wird anschließend unter kontrollierten Bedingungen mit Kaliumhydroxid behandelt, um Kaliumpolyaspartat zu erhalten. Kaliumpolyaspartat besitzt die Wirkung eines Schutzkolloids und hemmt somit die Weinsteinausscheidung. Es kann die Weinstabilisierung wirksam unterstützen.

2. SYNONYME

Kaliumpolyaspartat, A-5D K/SD, A-5D K SD, A-5DK/SD, A-5DK, KPA

3. KENNZEICHNUNG

Das Verpackungsetikett muss folgende Angaben enthalten:

- Name oder Verkehrsbezeichnung
- „Produkt für önologische Verwendungszwecke, begrenzte Anwendung“
- ggf. Zusatzstoffe
- Anwendungsbedingungen
- die Chargen-Nummer und den Gehalt an Kaliumpolyaspartat (Reinheit) sowie das Verfallsdatum und die Lagerbedingungen (Temperatur, Feuchtigkeit und Belüftung)
- Name oder Firma und Adresse des Herstellers, Verpackers oder Händlers
- Netto Gewicht
- ggf. die Angabe, dass die Asparaginsäure aus gentechnisch veränderten Organismen stammt und Art der veränderten Eigenschaft

4. EIGENSCHAFTEN

4.1 Beschreibung

Geruchloses, hellbraunes Pulver mit 90 % Trockensubstanz. Es ist vollständig in Wasser löslich, (> 1000 g/L), in organischen Lösungsmitteln jedoch unlöslich (< 5 g/L). Bei Lagerung bei Umgebungstemperatur ist es 4 Jahre haltbar.

4.2 Chemische Formel

Kaliumpolyaspartat ist ein Polymer von Asparaginsäure-Einheiten mit folgender allgemeiner Formel: $[C_4H_5NO_3K]_n$, wobei n der durchschnittliche Polymerisationsgrad ist ($n \approx 30$).

4.3 Substitutionsgrad

Der Substitutionsgrad des Kaliumsalzes beträgt mindestens 91,5 % (bezogen auf die Trockensubstanz), um eine optimale Löslichkeit zu gewährleisten.

Die Berechnung des Substitutionsgrads erfolgt nach der in Anhang 1 beschriebenen Methode.

*Beglaubigte Ausführung
Sofia, den 2. Juni 2017
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung*

Jean-Marie AURAND

4.4 Molare Masse

Die mittlere molare Masse wird durch Gelpermeationschromatographie bestimmt und beträgt 5.000 g/mol und ist für die Wirksamkeit des Produkts am geeignetsten.

4.5 Zusammensetzung

Die Reinheit des Erzeugnisses wird nach der Gesamthydrolyse des Polymers durch Bestimmung der Asparaginsäure überprüft, wobei dieser Wert mit dem theoretischen Wert des Monomers von Kaliumpolyaspartat gemäß seiner Summenformel verglichen wird. Die Methode ist in Anhang 2 beschrieben.

Der Gehalt an Kaliumpolyaspartat muss mindestens 98 % der wasserfreien Substanz betragen.

5. TESTS

5.1 Gehalt an freier Asparaginsäure in Kaliumpolyaspartat

Der Gehalt an freier Asparaginsäure muss $\leq 2,0$ % sein.

Die Bestimmung erfolgt nach der Methode in Anhang 3.

5.2 Feuchtigkeit – Trocknungsverlust

Zur Bestimmung des Gewichtsverlusts wird 1 g Trockenprodukt 12 – 24 Stunden bei $105\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ in den Trockenschrank gestellt. Das Gewicht muss konstant sein, und der Gewichtsverlust muss weniger als 10 % betragen.

5.3 Metallgehalt

Vor der Bestimmung der Metalle wird die Probe durch Säureaufschluss (HNO_3 , H_2O_2 und HCl) mineralisiert. Die Mineralisierung erfolgt in einem Mikrowellengerät. Die Probe darf vor der Mineralisierung nicht gemahlen und getrocknet werden.

Für die Mineralisierung werden folgende Reagenzien verwendet: HNO_3 (65 %) (ultrarein oder ähnliches), HCl (37 %) (ultrarein oder ähnliches), H_2O_2 (35 %).

Die Polyaspartat-Probe (0,5 - 2 g) wird in einen 100 mL-Messkolben gegeben, dem 25 mL HNO_3 , 2 mL HCl und 3 mL H_2O_2 zugesetzt werden. Das Ganze wird in einem Mikrowellengerät mit einer Höchstleistung von 1200 W aufgeschlossen: 60 % Leistung 1 min, 30 % Leistung 10 min, 15 % Leistung 3 min und 40 % Leistung 15 min. Der Messkolben wird dann mit bidestilliertem Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Anhand der so erhaltenen Lösung wird die quantitative Bestimmung von Metallen durchgeführt.

5.3.1. Eisen

Die quantitative Bestimmung von Eisen erfolgt nach der Methode in Kapitel II des *internationalen önologischen Kodex*. Der Eisengehalt muss weniger als 10 mg/kg betragen.

5.3.2. Arsen

Die quantitative Bestimmung von Arsen erfolgt nach der Methode in Kapitel II des *internationalen önologischen Kodex*. Der Arsengehalt muss weniger als 3 mg/kg betragen.

Beglaubigte Ausführung
Sofia, den 2. Juni 2017
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung

Jean-Marie AURAND

5.3.3. Blei

Die quantitative Bestimmung von Blei erfolgt nach der Methode in Kapitel II des *internationalen önologischen Kodex*. Der Bleigehalt muss weniger als 2 mg/kg betragen.

5.3.4. Quecksilber

Die quantitative Bestimmung von Quecksilber erfolgt nach der Methode in Kapitel II des *internationalen önologischen Kodex*. Der Quecksilbergehalt muss weniger als 1 mg/kg betragen.

5.3.5. Cadmium

Die quantitative Bestimmung von Cadmium erfolgt nach der Methode in Kapitel II des *internationalen önologischen Kodex*. Der Cadmiumgehalt muss weniger als 1 mg/kg betragen.

*Beglaubigte Ausführung
Sofia, den 2. Juni 2017
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung*

Jean-Marie AURAND

ANHANG 1

1. Bestimmung des Substitutionsgrads

1.1 Prinzip

Der Substitutionsgrad von handelsüblichen Kaliumpolyaspartat wird durch Analyse des Kaliumgehalts mittels ICP-OES festgelegt.

Die quantitative Bestimmung von Kalium erfolgt anhand einer Kalibrierkurve, die durch Einspritzen einer Referenzstandardlösung in fünf verschiedenen Konzentrationen erhalten wird.

Zur Berechnung des Substitutionsgrads wird der gemessene Kaliumgehalt mit dem theoretischen Gehalt bei 100 % iger Substitution verglichen.

1.2 Material

- 1.2.1 100 mL-Messkolben (Klasse A)
- 1.2.2 Zyklonsprühkammer, Standard-Quarzlampe
- 1.2.3 Ultraschallbad
- 1.2.4 Membranfilter, 0,45 µm Porengröße

1.3 Reagenzien

- 1.3.1 Salpetersäure (HNO₃), 65 %
- 1.3.2 Kaliumstandardlösung (K), 10000 mg/l (ICP/DCP-Kaliumstandardlösung, 10000 µg/ml HNO₃, 5 %)
- 1.3.3 Bidestilliertes Wasser mit einem spezifischen von Widerstand von > 10 MΩ.cm
- 1.3.4 Eine Lösung aus angesäuertem Wasser, 0,5 % HNO₃ (Kalibrierblindwert), wird als Verdünnungsmittel bei der Herstellung der Standardlösungen verwendet.
- 1.3.5 Die Standardlösungen werden durch Verdünnung der Stammlösung (1.3.2) hergestellt; die Richtwerte sind nachfolgend angeführt:

	std 1	std 2	std 3	std 4	std 5
Kalium (mg/L)	200	400	600	1000	2000

1.4 Durchführung

Das zu analysierende Produkt (KPA) wird in bidestilliertem Wasser gelöst.

- 1.4.1 KPA-Lösung, 5000 mg/L (a): etwa 500 mg (genauen Wägewert notieren) direkt in einen 100 ml-Messkolben einwiegen und mit bidestilliertem Wasser (1.3.3) zur Marke auffüllen; im Ultraschallbad (1.2.3) mindestens 10 Minuten homogenisieren und über eine Membrane (0,45 µm Porengröße) filtrieren.
- 1.4.2 Die Kalibrierkurve mit 5 Messpunkten wird anhand der Standardlösungen wie unter Ziffer 1.3.5 beschrieben festgelegt.

Die Ergebnisse werden anhand von drei Messungen berechnet.

Überschreitet die Konzentration den Kalibrierbereich, ist die Probe entsprechend zu verdünnen.

*Beglaubigte Ausführung
Sofia, den 2. Juni 2017
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung*

Jean-Marie AURAND

Zur Berechnung des Substitutionsgrads wird der gemessene Kaliumgehalt mit dem theoretischen Gehalt bei 100 %iger Substitution gemessen (siehe Ziffer 1.5).

1.5 Berechnung

Der Kaliumgehalt wird von der Datenerfassungssoftware berechnet. Die Berechnung erfolgt nach folgender Gleichung:

$$(a) A = A' \times n$$

wobei:

A: Konzentration der Probe in mg/L

A': Konzentration der verdünnten Probe in mg/L

n: Verdünnungsfaktor

Der Gehalt an Kalium bezogen auf das Trockengewicht der KPA-Probe wird nach der Formel (b) berechnet:

$$\%K_{\text{(Trockengewicht)}} = A \cdot \frac{100}{w} \cdot \frac{100}{(100 - h\%)} \quad (b)$$

wobei:

A: Ergebnis der Gleichung (a)

w: mg/L Kaliumpolyaspartat

h%: Feuchtigkeit der Probe (Prozent Feuchtigkeit)

Der Substitutionsgrad K (SG_K) wird nach der Gleichung (c) berechnet:

$$\%DS_K = \frac{\%K_{\text{(pesosecco)}}}{\frac{MA_K}{MM_{\text{monomeroKPA}}} \cdot 100} \quad (c)$$

$$DS_K = SG_K - (\text{peso secco}) = (\text{Trockengewicht}) - MA_K = AM_K$$

wobei:

AM_K: Atommasse von Kalium

MM_{Monomer KPA}: berechnete molare Masse des Monomers von Polyaspartat

*Beglaubigte Ausführung
Sofia, den 2. Juni 2017
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung*

Jean-Marie AURAND

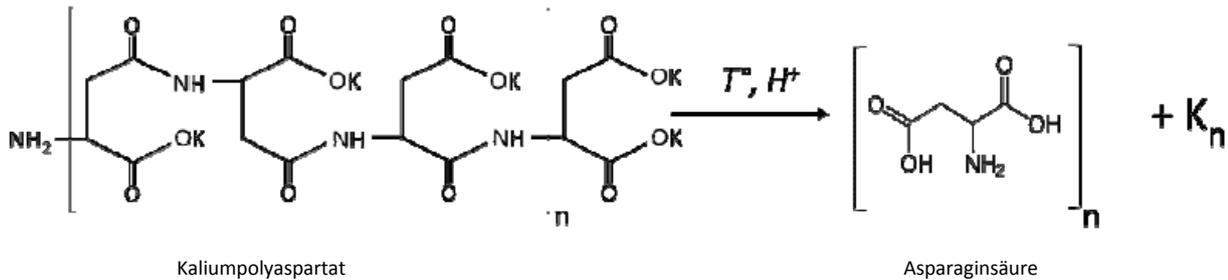
ANHANG 2

2 BESTIMMUNG DER REINHEIT VON KALIUMPOLYASPARTAT

2.1 PRINZIP

HPLC-FLD-Analyse des Gehalts an freier Asparaginsäure nach saurer Hydrolyse

Bei dem Verfahren wird die durch saure Hydrolyse von KPA freigesetzte Asparaginsäure mittels HPLC bestimmt. Die saure Hydrolyse wird unter Bedingungen durchgeführt, die eine vollständige Depolymerisation von KPA ermöglichen:



2.2 MATERIAL

- 2.2.1 Heizplatte für die saure Hydrolyse
- 2.2.2 4 ml-Fläschchen aus dunklem Glas mit Schraubkappe
- 2.2.3 Präzisionswaage, Genauigkeit 1 mg
- 2.2.4 Messkolben
- 2.2.5 HPLC-System mit quaternärer Pumpe, automatischer Probengeber, Thermostat, FLD
- 2.2.6 C18 Säule (z.B. Synchronis aQ C18, 4,6 x 250 mm; 5 μ m (Thermo))
- 2.2.7 Membranfilter, 0,2 μ m Porengröße

2.3 REAGENZIEN UND VORBEREITUNG DER PROBE

Saure Hydrolyse

- 2.3.1 Natriummetabisulfit-Lösung ($Na_2S_2O_5$), (CAS-Nr. 16731-55-8), 10 g/L
- 2.3.2 6M Salzsäure (HCl)
- 2.3.3 5M Natriumhydroxid (NaOH)
- 2.3.4 Bidestilliertes Wasser, spezifischer Widerstand größer 10 $m\Omega \cdot cm$
- 2.3.5 Kaliumpolyaspartat

Vorbereitung der Probe

- 2.3.6 Aminocaprinsäure ($C_6H_{13}NO_2$, CAS-Nr. 60-32-2)

Beglaubigte Ausführung
Sofia, den 2. Juni 2017
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung

Jean-Marie AURAND

2.4 DURCHFÜHRUNG

Das Verfahren besteht aus 3 Phasen:

- Saure Hydrolyse der Kaliumpolyaspartat-Probe durch Erhitzen
- Vorbereitung der Probe für die HPLC-FLD-Analyse der Standardlösungen zur Bestimmung des Gehalts an Asparaginsäure
- Analyse der freien Asparaginsäure im Anschluss an die Hydrolyse mittels HPLC (siehe Anhang 3)

2.4.1 Phase 1: Saure Hydrolyse

2.4.1.1 In ein 4 mL-Fläschchen (2.2.2) überführen:

0,2 ml Natriummetabisulfit-Lösung, 10 g/L (2.3.1)

0,5 g auf 1 mg genau gewogenes Kaliumpolyaspartat

2 mL HCl 6 M (2.3.2)

2.4.1.2 72 Stunden bei $108\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ erhitzen (2.2.1),

2.4.1.3 in einen 10 ml-Messkolben überführen, 2,4 ml 5M NaOH (2.3.3) zugeben und mit ultrareinem Wasser (2.3.4) bis zur Marke auffüllen.

2.4.2 Phase 2: Vorbereitung der Probe für die HPLC-Analyse

2.4.2.1 5 ml Lösung (2.4.1.3) mikrofiltrieren ($0,20\ \mu\text{m}$, 2.2.7) und in einen 20 ml-Messkolben geben,

2.4.2.2 0,2 ml internen Standard (Aminocaprinsäure) (3.3.6) zugeben,

2.4.2.3 mit bidestilliertem Wasser zur Marke auffüllen.

2.4.3 Phase 3: Probenanalyse mittels HPLC (Siehe Anhang 3)

Berechnung

Der Gehalt an Polyaspartat (kPA) wird wie folgt berechnet:

$\text{KPA (mg/L)} = (\text{hydrolysierte Asparaginsäure} - \text{freie Asparaginsäure vor der Hydrolyse}) * f_{\text{KAP}}$

wobei $f_{\text{KAP}} = 1,15$ der Faktor für die Umrechnung von KPA in Asparaginsäure ist, der aus dem Verhältnis der molaren Masse des KPA-Monomers (mittlere MM der KPA-Monomere A5DK SD = 154) zur molaren Masse von Asparaginsäure (133,1) nach folgender Gleichung berechnet wird:

$$f_{\text{KPA}} = \frac{MM_{\text{monomero_KPA}}}{MM_{\text{acido_aspartico}}} = 1,15$$

KPA-Monomer
Asparaginsäure

Beglaubigte Ausführung
Sofia, den 2. Juni 2017
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung

Jean-Marie AURAND

$$f_{kpm} = \frac{MM_{KPA\text{-monomer}}}{MM_{Asparaginsäure}} = 1,15$$

wobei die Bestimmung von freier Asparaginsäure gemäß den Angaben in Anhang 3 erfolgt.

ANHANG 3

3. BESTIMMUNG VON FREIER ASPARAGINSÄURE

3.1 PRINZIP

Die Bestimmung von freier Asparaginsäure in Kaliumpolyaspartat erfolgt mittels HPLC mit fluorimetrischer Detektion (FLD) nach Derivatisierung von Asparaginsäure mit o-Phthalaldehyd (OPA). Die quantitative Bestimmung von Kalium erfolgt durch eine Kalibrierkurve, die durch Einspritzung der Referenzstandardlösungen erhalten wird.

3.2. GERÄTE

- 3.2.1 Messkolben
- 3.2.2 HPLC-System mit quaternärer Pumpe, automatischer Probengeber, Thermostat, Fluoreszenzdetektor
- 3.2.3 C18-Säule, z.B. Synchronis aQ C18 4,6 x 250 mm, 5 µm

3.3 REAGENZIEN

- 3.3.1 Asparaginsäure (DL-Asparaginsäure $C_4H_7NO_4 \geq 99\%$ CAS-Nr. 617-45-8)
- 3.3.2 Lösung 1: Asparaginsäure (8000 mg/L) in bidestilliertem Wasser
- 3.3.3 Lösung 2: Asparaginsäure (200 mg/l) in bidestilliertem Wasser
- 3.3.4 Aminocaprinsäure ($C_6H_{13}NO_2$ CAS-Nr. 60-32-2)
- 3.3.5 Stammlösung aus Aminocaprinsäure (1000 mg/l) in bidestilliertem Wasser
- 3.3.6 Standardlösung hergestellt durch Verdünnung der Lösung 1 (3.3.2) und Lösung 2 (3.3.3); nachfolgend sind die Richtwerte angegeben:

	std 1	std2	std3	std 4	std 5	std 6
mL H ₂ O	18,8	19,0	15,0	19,750	19,375	18,750
mL Lösung 1	-	-	-	0,250	0,625	1,250
mL Lösung 2	0,2	1,0	5,0	-	-	-
Asparaginsäure (mg/L)	2	10	50	100	250	500

- 3.3.7 Methanol, HPLC-Qualität
- 3.3.8 Tetrahydrofuran, HPLC-Qualität

*Beglaubigte Ausführung
Sofia, den 2. Juni 2017
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung*

Jean-Marie AURAND

- 3.3.9 wasserfreies Natriumacetat (CAS-Nr. 127-09-3)
- 3.3.10 Acetonitril (CH₃CN), HPLC-Qualität
- 3.3.11 Natriumtetraborat-Decahydrat (Na₂B₄O₇•10H₂O, CAS.-Nr. 1303-96-4)
- 3.3.12 Orthophtalaldehyd (OPA): (C₈H₆O₂ ≥ 99%, CAS.-Nr. 643-79-8)
- 3.3.13 Mercaptoethanol: (C₂H₆OS ≥ 99 %, CAS.-Nr. 60-24.2)
- 3.3.14 Bidestilliertes Wasser mit einem spezifischen Widerstand von > 10 MΩ.cm
- 3.3.15 Derivatisierungslösung: in einen 10 ml-Messkolben 100 mg OPA, 200 µl Mercaptoethanol und 1 ml Methanol geben und mit Pufferlösung aus 0,1 M Natriumtetraborat-Decahydrat (pH-Wert 10,5) zur Marke auffüllen.
Die Lösung ist unmittelbar vor ihrer Verwendung herzustellen, da sie sich innerhalb eines Tages zersetzt.

3.4 MOBILE PHASE

- 3.4.1 [Kanal A]: ultrareines Wasser
- 3.4.2 [Kanal B]: 0,05M Natriumacetat-Puffer/Tetrahydrofuran (96:4, v/v)
- 3.4.3 [Kanal C]: Methanol
- 3.4.4 [Kanal D]: Acetonitril

3.5 DURCHFÜHRUNG

Die Methode beruht auf einer Derivatisierungsreaktion von Asparaginsäure und o-Phthalaldehyd (OPA); die Wiederfindung beträgt 100 %.

Geräteparameter:

- Säulentemperatur: 40° C,
- Wellenlänge: FLD Ex 340 nm, Em 450 nm,
- Die Trennung erfolgt anhand eines Gradienten (Siehe Ziffer 3.4, mobile Phasen):

Zeit (min)	% B	% C	% D	Flussrate (ml/min)
0,00	100,0	0,0	0,0	1,1
3,00	100,0	0,0	0,0	1,1
15,00	50,0	25,0	25,0	1,1
17,00	84,0	8,0	8,0	1,1
18,00	100,0	0,0	0,0	1,1
Stoppzeit 21 min + 2 min Nachlaufzeit				

- 3.5.1 Herstellung der Standardlösungen: 5,0 ml Standardlösung (3.3.6) und 0,2 ml interne Standardlösung (3.3.5) in einen 20 ml-Messkolben geben und mit bidestilliertem Wasser bis zur Marke auffüllen und homogenisieren.
- 3.5.2 5,0 µl Probe (Anhang 2, Ziffer 2.4.2) mit 20 µl Methylalkohol verdünnen und mit 5,0 µl OPA derivatisieren. 10,0 µl dieser Lösung 10 Mal im Injektor mischen und nach 0,5 Minuten einspritzen.

Beglaubigte Ausführung
Sofia, den 2. Juni 2017
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung

Jean-Marie AURAND

3.5.3 Liegen die Ergebnisse oberhalb der Obergrenze der Kalibrierkurve, muss die Probe verdünnt und die Analyse wiederholt werden.

3.6 BERECHNUNG

Der Gehalt an Asparaginsäure der Probe, ausgedrückt in mg/l, wird nach folgender Formel berechnet:

$$Y = A \cdot f \cdot d$$

wobei:

Y: Gehalt an Asparaginsäure der Probe (mg/L),

A: Peakfläche des Chromatogramms

f: Responsefaktor

d: Verdünnungsfaktor.

*Beglaubigte Ausführung
Sofia, den 2. Juni 2017
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung*

Jean-Marie AURAND