RÉSOLUTION OIV-OENO 665-2022

DÉTERMINATION DES ÉDULCORANTS DANS LE VIN BLANC ET LES BOISSONS À BASE DE VIN BLANC PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE COUPLÉE À UN DETECTEUR À BARRETTE DE DIODES ET UN DÉTECTEUR À AÉROSOL CHARGÉ

L'ASSEMBLÉE GÉNÉRALE,

Vu l'article 2, paragraphe 2 iv de l'Accord du 3 avril 2001 portant création de l'Organisation internationale de la vigne et du vin,

SUR PROPOSITION de la Sous-commission « Méthodes d'analyse »,

DECIDE de compléter l'annexe A du Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts avec la méthode suivante :

Détermination des édulcorants dans le vin blanc et les boissons à base de vin blanc par Chromatographie Liquide Haute Performance couplée à un détecteur à barrette de diodes et un détecteur à aérosol chargé

Méthode Type IV

1. Domaine d'application

Cette méthode permet de doser cinq édulcorants artificiels (Acésulfame-K, Aspartame, Saccharine, Cyclamate de sodium, Sucralose) dans les vins blancs (et boissons à base de vin blanc), dans des plages de concentration allant jusqu'à 50 mg/L pour la saccharine, 125 mg/L pour l'acésulfame-K et 250 mg/L pour le sucralose, le cyclamate de sodium et l'aspartame.

Pour des concentrations plus élevées, une dilution de l'échantillon est nécessaire.

Remarque : la présence des anthocyanes gêne le dosage de ces édulcorants dans les vins rosés et les vins rouges.

2. Principe

Les cinq édulcorants sont analysés par chromatographie liquide haute performance par séparation dans une colonne en phase inverse C18 couplée à un détecteur à

Exemplaire certifié conforme Ensenada, 4 novembre 2022
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Pau ROCA

© OIV 2022

barrette de diodes et à un détecteur d'aérosol chargé disposés en série (CLHP/UV-CAD).

3. Réactifs et solutions

3.1. Réactifs :

3.1.1. Eau selon EN ISO 3696 ou équivalent

3.1.2. Acésulfame K (pureté ≥ 99%) (n° CAS 55589-62-3)

3.1.3. Aspartame (pureté ≥ 98%) (n° CAS 22839-47-0)

3.1.4. Cyclamate de sodium (pureté ≥ 98%) (n° CAS 139-05-9)

3.1.5. Saccharine, sel de sodium dihydraté (pureté ≥ 98%) (n° CAS 6155-57-3)

3.1.6. Sucralose (pureté ≥ 98%) (n° CAS 56038-13-2)

3.1.7. Acide formique (pureté ≥ 98%) (n° CAS 64-18-6)

3.1.8. Bicarbonate d'ammonium (pureté ≥ 98%) (n° CAS 1066-33-7)

3.1.9. Méthanol pour CLHP (pureté ≥ 99,9%) (n° CAS 67-56-1)

3.1.10. Acétone pour CLHP (pureté ≥ 99,8%) (n° CAS 67-64-1)

3.2. Préparation de la solution tampon

Préparer une solution tampon de bicarbonate d'ammonium (3.1.8) à 0,4 g/L dans de l'eau (3.1.1) et ajuster le pH à 4,6 avec de l'acide formique (3.1.7).
Cette solution peut être conservée 1 mois à température ambiante.

4. Appareillage

4.1. Matériel courant de laboratoire

4.2. pH-mètre

Exemplaire certifié conforme Ensenada, 4 novembre 2022
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Pau ROCA

© OIV 2022

4.3. Agitateur

4.4. Bain à ultrasons

4.5. Balance analytique d'une précision de ± 0,1 mg

4.6. Fioles jaugées de classe A

4.7. Filtres seringues 0.45 µm cellulose régénérée (par exemple)

4.8. Colonne pour CLHP C18 (15 cm de longueur, 4,6 mm de diamètre interne, 5µm)

4.9. Système chromatographique composé :

- d'un système de pompage disposant d'un minimum de trois voies
- d'un passeur d'échantillons thermostaté
- d'un four à colonne
- d'un détecteur à barrette de diodes ou UV-Visible
- d'un détecteur d'aérosol chargé (CAD)
- d'un système d'acquisition de données, d'intégration et de calcul

5. Mode opératoire

5.1. Préparation des échantillons

Filtrer les échantillons avec des filtres seringues avant de mettre en flacon.
Si l'échantillon est trop concentré, réaliser une dilution avec la solution tampon de façon à obtenir une concentration comprise dans la gamme.

5.2. Préparation des solutions étalon

5.2.1. Préparation de la solution mère N3 (donnée à titre d'exemple)

Exemplaire certifié conforme Ensenada, 4 novembre 2022
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Pau ROCA

© OIV 2022

Dans une fiole de 100 mL, introduire environ exactement :

- 12,5 mg d'acésulfame de potassium (3.1.2)
- 25 mg d'aspartame (3.1.3)
- 25 mg de cyclamate de sodium (3.1.4)
- 5 mg de saccharine (3.1.5)
- 25 mg de sucralose (3.1.6)

Dissoudre dans environ 20 mL d'eau/méthanol (1:1) puis compléter au trait de jauge avec la solution tampon. Passer aux ultrasons si nécessaire.

Cette solution N3 est conservée entre 2°C et 8°C pendant 6 mois.

5.2.2. Préparation des solutions filles N2 et N1

Préparer deux autres niveaux à partir de la solution N3 :

N2 : solution N3 diluée au ½. Par exemple, dans une fiole de 20 mL, introduire 10 mL de N3 et compléter avec de la solution tampon

N1 : solution N3 diluée au 2/25. Par exemple, dans une fiole de 25 mL, introduire 2 mL de N3 et compléter avec de la solution tampon

Filtrer les solutions étalons avec des filtres seringues et mettre les flacons dans le passeur.

Tableau récapitulatif des solutions étalons (donné à titre d'exemple):

Edulcorants	Solution mère (N3)			Solution fille (N2)			Solution fille (N1)		
	Pesée (mg)	Volume fiole	Concentration en mg/L	Volume prélevé de N3	Volume fiole	Concentration en mg/L	Volume prélevé de N3	Volume fiole	Concentration en mg/L
Acésulfame K	12,5	100 mL	125	10mL	20mL	62,5	2mL	25mL	10
Aspartame	25		250			125			20
Cyclamate Na	25		250			125			20
Saccharine	5		50			25			4
Sucralose	25		250			125			20

Exemplaire certifié conforme Ensenada, 4 novembre 2022
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Pau ROCA

© OIV 2022

5.3. Conditions chromatographiques

A titre d'exemple, les conditions ayant permis d'atteindre les performances décrites en annexe sont les suivantes :

- Température du four colonne : 30°C
- Température du passeur : 20°C
- Composition de la phase mobile (réactifs de qualité HPLC) :
    - Phase A : 72% Méthanol / 25% Tampon / 3% Acétone
    - Phase B : 12% Méthanol / 88% Tampon
- Longueur d'onde de détection UV : 210 nm
- Débit : 1 mL/min
- Volume d'injection : 10 µL
- Paramètres du CAD :
- Filtre : 3,6
- Taux de collection de données : 10 Hz
- Température : High (50°C)
- Power function : de 0 à 13 min : 1,50 ; de 13 à 40 min : 1,48

Gradient d'élution à appliquer :

Temps (min)	Pourcentage de A	Pourcentage de B
0	0 %	100 %
4	0%	100 %
11	53 %	47 %
18,5	82 %	18 %

Exemplaire certifié conforme Ensenada, 4 novembre 2022
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Pau ROCA

© OIV 2022

25	82 %	18 %
27	100 %	0 %
31	100 %	0 %
32	0 %	100 %
40	0 %	100 %

Stabiliser le temps nécessaire la colonne avec la phase mobile B, ainsi que le CAD et le détecteur DAD.

6. Calculs

Les résultats sont calculés par étalonnage externe en fonction de l'aire du pic de chaque édulcorant, et exprimées en mg/L selon le calcul :

$$Concentration\ échantillon\ (mg/L) = \left(\frac{A_e - Int}{P}\right) \times Dilution$$

Avec A_e l'aire du pic de l'échantillon, Int l'ordonnée à l'origine de la courbe d'étalonnage et P la pente de la courbe d'étalonnage.

7. Expression des résultats

Pour les teneurs $<$ 10 mg/L, les résultats peuvent être exprimés en mg/L avec un chiffre significatif après la virgule.

Pour les teneurs $\geq$ 10 mg/L, les résultats peuvent être exprimés en mg/L, sans décimale.

8. Bibliographie

1. Organisation internationale de la vigne et du vin (OIV), *Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts*. Vol. 1 et 2.
2. NF EN 15911 : Simultaneous determination of nine sweeteners by high

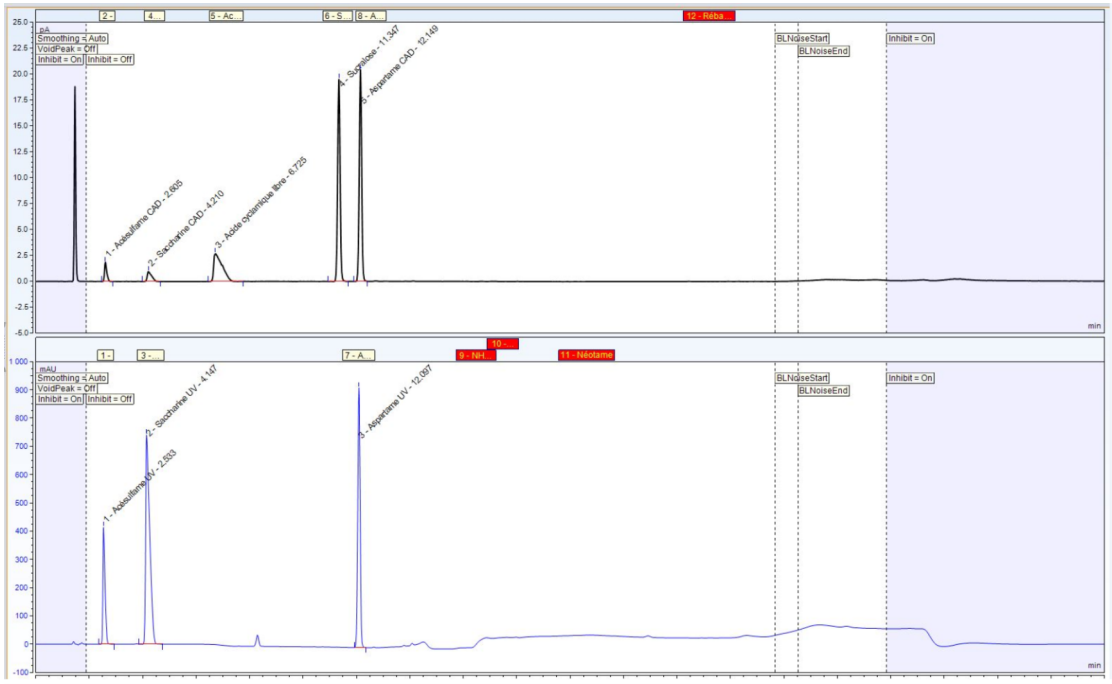
Exemplaire certifié conforme Ensenada, 4 novembre 2022
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Pau ROCA

© OIV 2022

performance liquid chromatography and evaporative light scattering detection in beverages and canned fruits.

3. ISO 3696 : Eau pour Laboratoire à usage analytique – Spécification et méthodes d'essai.
4. ISO 11352 : Qualité de l'eau — Estimation de l'incertitude de mesure basée sur des données de validation et de contrôle qualité.

Annexe 1 : Exemple de chromatogramme pour une solution étalon de niveau 3



Annexe 2 : Exemple de validation interne

La méthode a fait l'objet d'une évaluation des performances et une étude de validation interne a été menée pour la matrice vin blanc et boisson à base de vin blanc.

Les caractéristiques de la méthode obtenues suite à ce travail sont résumées dans ce tableau :

Exemplaire certifié conforme Ensenada, 4 novembre 2022
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Pau ROCA

© OIV 2022

Edulcorants	Répétabilité en % (r%)	Reproductibilité intralaboratoire en % (R%)	Limite de détection retenue en mg/L	Limite de quantification retenue en mg/L	Plage de linéarité en mg/L
Acésulfame K	2.5	8.5	2	5	5-125
Saccharine	1.7	6.8	1	2	2-50
Aspartame	1.9	8.7	4	10	10-250
Cyclamate Na	5.5	12.8	4	10	10-250
Sucralose	6.6	12.9	4	10	10-250

La limite de quantification retenue correspond au niveau 1, c'est le premier point de la gamme d'étalonnage.

La limite de détection retenue correspond à 1/3 de la limite de quantification.

La linéarité a été vérifiée par l'analyse de 5 niveaux de concentration pour chaque édulcorant à partir de 5 répétitions par niveau sur des jours différents.

La répétabilité et la reproductibilité ont été obtenues par l'analyse de chaque édulcorant dans chaque type de matrice sur 5 jours différents avec 2 répétitions à chaque fois, ceci sur 3 niveaux de concentration choisis dans le domaine de linéarité de la méthode.

Exemplaire certifié conforme Ensenada, 4 novembre 2022
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Pau ROCA

© OIV 2022