

RÉSOLUTION OIV-OENO 619-2019

MÉTHODE DE DOSAGE DU POLYASPARTATE DE POTASSIUM DANS LE VIN PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE À HAUTE PERFORMANCE COUPLÉE À UN DÉTECTEUR DE FLUORESCENCE

Méthode de type IV

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 »,

CONSIDÉRANT la résolution OIV-OENO 543-2016 relative au traitement du vin avec le polyaspartate de potassium,

DECIDE de compléter le *Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts* avec la méthode suivante :

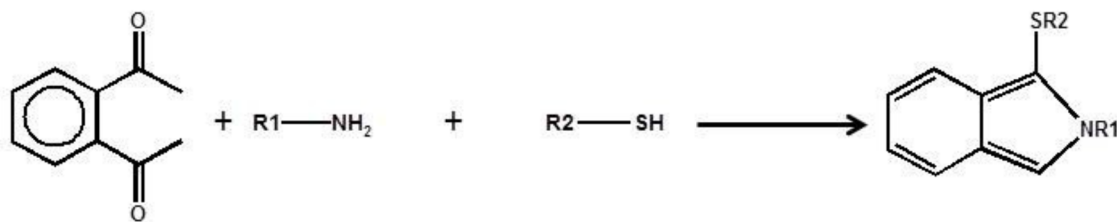
METHODE DE DOSAGE DU POLYASPARTATE DE POTASSIUM DANS LE VIN PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE A HAUTE PERFORMANCE COUPLEE A UN DETECTEUR DE FLUORESCENCE

1. Domaine d'application

Cette méthode s'applique à l'analyse du polyaspartate de potassium (PAK) dans les vins à des concentrations supérieures à 40 mg/L.

2. Principe

La procédure consiste à réaliser le dosage de l'acide aspartique dans le vin avant et après hydrolyse acide, par l'intermédiaire d'une dérivatisation avec de l'ortho-phthalaldéhyde (OPA) suivie d'une analyse chromatographique couplée à un détecteur de fluorescence. La différence de teneur en acide aspartique entre l'échantillon hydrolysé et celui non hydrolysé indiquera le niveau d'addition de polyaspartate.



Ortho-phthalaldéhyde (OPA)

AA dérivatisé

R1-NH₂ : acide aspartique

R2-SH : mercaptoéthanol

3. Réactifs et produits

Utiliser de l'eau ultra-pure (EN ISO 3696 de classe 3 ou eau bidistillée).

Pour l'hydrolyse acide :

3.1. Solution de métabisulfite de sodium (Na₂S₂O₅, n° CAS : 7681-57-4) à 10 g/L : peser 5 g de métabisulfite de sodium dans une fiole jaugée de 500 mL de classe A et compléter avec de l'eau ultra-pure.

3.2. Acide chlorhydrique (HCl, n° CAS : 7647-01-0) 6 M

3.3. Hydroxyde de sodium (NaOH, n° CAS : 1310-73-2) 5 M

Solutions étalons :

3.4. Acide aspartique (acide DL-aspartique, C₄H₇NO₄, pureté ≥ 99 %, n° CAS : 617-45-8)

3.4.1. Solution mère 1 : solution d'acide aspartique à 8000 mg/L dans de l'eau ultra-pure

3.4.2. Solution mère 2 : solution d'acide aspartique à 200 mg/L dans de l'eau ultra-pure

3.5. Acide aminocaproïque (C₆H₁₃NO₂, pureté ≥ 99 %, n° CAS : 60-32-2)

3.5.1. Solution mère d'acide aminocaproïque à 1000 mg/L dans de l'eau ultra-pure (étalon interne)

Solutions d'étalonnage préparées par dilution des solutions mère 1 et 2 dans de l'eau bidistillée. Les valeurs de référence sont les suivantes :

- **ÉT1 à 2 mg/L** : prélever 0,200 mL de la solution mère 2 (3.4.2.) et compléter à 20 mL dans une fiole jaugée avec de l'eau ultra-pure,

- **ÉT2 à 10 mg/L** : prélever 1,000 mL de la solution mère 2 (3.4.2.) et compléter à 20 mL dans une fiole jaugée avec de l'eau ultra-pure,
- **ÉT3 à 50 mg/L** : prélever 5,000 mL de la solution mère 2 (3.4.2.) et compléter à 20 mL dans une fiole jaugée avec de l'eau ultra-pure,
- **ÉT4 à 100 mg/L** : prélever 0,250 mL de la solution mère 1 (3.4.1) et compléter à 20 mL dans une fiole jaugée avec de l'eau ultra-pure,
- **ÉT5 à 250 mg/L** : prélever 0,625 mL de la solution mère 1 (3.4.1.) et compléter à 20 mL dans une fiole jaugée avec de l'eau ultra-pure,
- **ÉT6 à 500 mg/L** : prélever 1,250 mL de la solution mère 1 (3.4.1.) et compléter à 20 mL dans une fiole jaugée avec de l'eau ultra-pure.

Solution de dérivation :

3.6. Tétraborate de sodium décahydraté (solide, pureté ≥ 99 %, n° CAS : 1303-96-4)

3.6.1. Solution tampon à pH 10,5 de tétraborate de sodium décahydraté à 0,1 M : dissoudre 19,1 g de tétraborate de sodium dans une fiole jaugée de 500 mL avec de l'eau ultra-pure et compléter à 500 mL. Vérifier la valeur du pH.

3.7. Ortho-phthalaldéhyde (OPA) ($C_8H_6O_2$, pureté ≥ 99 %, n° CAS : 643-79-8)

3.8. Mercaptoéthanol (C_2H_6OS , pureté ≥ 99 %, n° CAS : 60-24-2)

3.9. Solution de dérivation : dans une fiole jaugée de 10 mL, introduire 100 mg d'OPA, 200 μ L de mercaptoéthanol et 1 mL de méthanol, compléter au volume avec la solution tampon à pH 10,5 de tétraborate de sodium décahydraté à 0,1 M. La solution doit être préparée au moment de l'utilisation.

Phases mobiles pour CLHP :

3.10. Méthanol de qualité CLHP (liquide)

3.11. Tétrahydrofurane de qualité CLHP (liquide)

3.12. Acétate de sodium anhydre (n° CAS : 127-09-3)

3.12.1. Solution tampon d'acétate de sodium 0,05 M : dissoudre 2,05 g d'acétate de sodium anhydre dans une fiole jaugée de 500 mL avec de l'eau ultrapure et compléter à 500 mL.

3.13. Acétonitrile (CH_3CN) de qualité CLHP (liquide)

3.14. Eau ultrapure (par exemple de qualité EN ISO 3696 de classe 3 ou eau bidistillée)

3.15. Phase mobile :

- [éluent A] : eau ultra-pure
- [éluent B] : solution tampon d'acétate de sodium à 0,05 M/tétrahydrofurane (96:4)
- éluent C] : méthanol
- [éluent D] : acétonitrile

4. Matériel et appareillage

Sauf mention contraire, la verrerie nécessaire pour la préparation des solutions devra être de classe A.

- 4.1. Plaque chauffante
- 4.2. Flacon de 4 mL en verre teinté avec bouchon à vis
- 4.3. Micropipette de 0,100-1,000 mL
- 4.4. Filtre seringue à membrane en acétate de cellulose avec une porosité de 0,20 µm
- 4.5. Balance de précision
- 4.6. Fioles jaugées
- 4.7. Système CLHP incluant une pompe quaternaire, un échantillonneur automatique, un compartiment thermostaté pour la colonne et un détecteur FLD
- 4.8. Colonne : C18 à extrémités polaires ou « end-capping » (par exemple Synchronis aQ 4,6 x 250 mm ; 5 µm)

5. Mode opératoire

Le mode opératoire comporte trois étapes : l'hydrolyse acide à chaud de l'échantillon de vin, la procédure de préparation des échantillons (aussi bien des solutions étalons que des vins avant et après hydrolyse) à soumettre à l'analyse par CLHP-FLD pour la détermination de la concentration en acide aspartique et à l'analyse par CLHP-FLD.

Étape 1 : hydrolyse acide

- Dans un flacon de 4 mL (4.2.) en verre teinté avec bouchon à vis, introduire successivement :
- 0,2 mL de la solution de métabisulfite de sodium à 10 g/L (3.1.)
- 2 mL d'échantillon de vin
- 2 mL de HCl 6 M (3.2.)

- Chauffer à 108 °C ($\pm$ 2 °C) sur la plaque chauffante pendant 72 heures
- Transférer dans une fiole jaugée de 10 mL, ajouter 2,5 mL de NaOH 5 M (3.3.) et compléter au volume à 10 ml avec de l'eau ultra-pure.

La vérification de l'intégralité du processus d'hydrolyse acide est détaillée au point 6.

Étape 2 : préparation pour l'analyse CLHP

La méthode consiste en une réaction de dérivation de l'acide aspartique avec l'ortho-phthalaldéhyde (OPA).

La préparation des échantillons pour l'analyse CLHP est la suivante

Solutions d'étalonnage et échantillons de vin avant hydrolyse :

- Prélever et microfiltrer (filtre de 0,20 μ m) 1 mL de la solution à analyser dans une fiole jaugée de 20 mL,
- Ajouter 0,2 mL d'étalon interne (3.5.1.),
- Compléter à 20 ml avec de l'eau ultra-pure.

Échantillons après hydrolyse :

- Prélever et microfiltrer (filtre de 0,20 μ m) 5 mL de la solution à analyser dans une fiole jaugée de 20 mL,
- Ajouter 0,2 mL d'étalon interne (3.5.1.),
- Compléter à 20 ml avec de l'eau ultra-pure.

Étape 3 : analyse CLHP

Paramètres instrumentaux pour l'analyse CLHP-FLD, à titre d'exemple :

- Température du four : 40 °C
- Injection : 10 μ L
- Longueur d'onde du détecteur FLD (λ) : λ_{ex} = 340 nm ; λ_{em} = 450 nm
- La séparation est réalisée en mode gradient (voir les éluents au point 3.15.) :

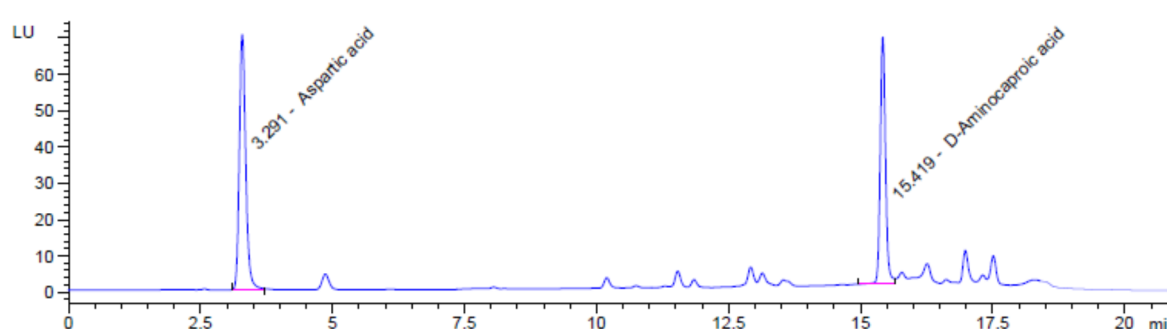
Temps	% B	% C	% D	Débit
0,00	100,0	0,0	0,0	1,1
3,00	100,0	0,0	0,0	1,1
15,00	50,0	25,0	25,0	1,1
17,00	84,0	8,0	8,0	1,1
18,00	100,0	0,0	0,0	1,1
Temps d'exécution : 21 min + 2 min de temps d'arrêt				

Exemple de dérivation automatisée réalisée par un échantillonneur automatique :

- Position des réactifs dans l'échantillonneur :
 - Position 1 : méthanol
 - Position 3 : OPA
 - Position 4 : flacon vide
 - Position 11 : eau ultra-pure
- Étapes de dérivation :
 - prélever 2,0 µL d'air,
 - prélever 20,0 µL du flacon 1,
 - transférer 20,0 µL dans le flacon 4,
 - prélever 5,0 µL de l'échantillon,
 - transférer 5,0 µL dans le siège,
 - prélever 0,0 µL du flacon 1 (pour nettoyer l'extérieur de l'aiguille),
 - prélever 5,0 µL du flacon 3,
 - transférer 5,0 µL dans le siège,
 - mélanger 10,0 µL dans le siège, 10 fois,

- attendre 0,50 min,
- injecter.

Si les résultats excèdent la limite supérieure de la courbe d'étalonnage, diluer l'échantillon de manière appropriée et répéter la procédure analytique.



Chromatogramme issu d'un vin rouge

6. Contrôle qualité

Pour chaque série d'analyses, il convient d'effectuer un contrôle qualité par l'analyse d'un échantillon de vin additionné de 100 mg/L d'acide aspartique.

L'échantillon, préparé selon les indications du point 5, est analysé au début de la série. Les résultats obtenus, exprimés par le taux de rendement, sont reportés sur une carte de contrôle.

7. Caractéristiques DE LA MÉTHODE : PARAMÈTRES DE VALIDATION INTRALABORATOIRE

- Linéarité

Des solutions d'étalonnage non hydrolysées ni dérivatisées de concentration connue sont utilisées pour simuler la totalité du processus analytique. Pour être acceptée, chaque séquence doit présenter une courbe d'étalonnage avec un $R^2 > 0,990$ (figure 1).

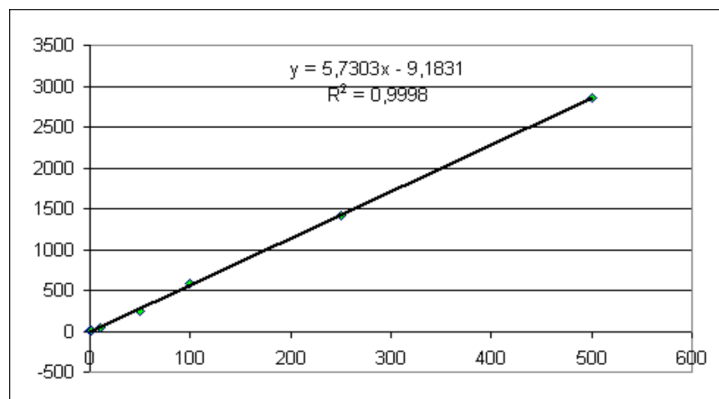


Figure 1

- Recouvrement et effet matrice

Solutions aqueuses :

La vérification du taux de recouvrement des processus d'hydrolyse acide et de dérivation est effectuée par comparaison entre les solutions étalons aqueuses d'acide aspartique avant et après hydrolyse. Trois solutions de concentration connue (25, 100 et 200 mg/L) ont été préparées et les valeurs obtenues sont reportées dans le tableau suivant :

	Test 1	Test 2	Test 3
Avant hydrolyse (mg/L)	25,4	109	213
Après hydrolyse (mg/L)	25,2	108	213
Taux de recouvrement (%)	99,2	99,1	100

Vin :

La méthode des ajouts dosés à un vin blanc et un vin rouge a été appliquée (ajouts graduels de polyaspartate de potassium à 50 et 200 mg/L, pour vérifier l'interférence de la matrice dans le dosage du PAK). Cinq essais de répétabilité ont été réalisés pour chacune de ces teneurs.

	Vin rouge brut (mg/L)	Vin rouge + 50 mg/L	Vin rouge + 200 mg/L	Vin blanc brut (mg/L)	Vin blanc + 50 mg/L	Vin blanc + 200 mg/L
Répétitions (acide asp.)	84,0	123,9	258,2	121,9	164,6	294,2
	85,4	127,3	259,4	123,2	163,3	291,5
	83,8	125,1	250,2	121,9	170,3	291,3
	87,7	124,4	253,5	119,5	161,9	284,8
	83,2	126,1	256,9	123,3	160,0	287,4
Moyenne (acide asp.)	84,8	125,4	255,6	122,0	164,0	289,8
S_r (acide asp.)	1,8	1,4	3,8	1,5	3,9	3,7
Moyenne (PAK ajouté)	-	46,6	196,3	-	48,3	193,0
S_r (PAK ajouté)	-	2,8	5,0	-	4,9	3,8
Horrat r	-	0,99	0,52	-	1,71	0,48
PAK théorique	-	50	200	-	50	200
Rec PAK %	-	93	98	-	94	96

S_r (acide asp.) : écart type des essais de répétabilité, exprimé en acide aspartique

S_r (PAK) : écart type des essais de répétabilité, exprimé en PAK

Rec PAK % : recouvrement, exprimé en PAK

Le taux de recouvrement doit être compris entre 80 et 110 %.

La répétabilité satisfait au critère d'Horrat.

Limites de détection et de quantification

En considérant que le vin contient naturellement de l'acide aspartique, il a été choisi de déterminer LD et LQ sur la base du rapport signal/bruit déterminé sur des échantillons de vin.

<i>CALCUL DES LIMITES DE DÉTECTION ET DE QUANTIFICATION</i>		
CAS n°3 : LE RAPPORT SIGNAL SUR BRUIT (S/B) EST CONNU POUR UNE CONCENTRATION BASSE		
C	24,74	Valeur de la concentration de l'échantillon de vin
S/B	122,5	Rapport signal/bruit
LD	0,7	Limite de détection
LQ	2,1	Limite de quantification (3 x LD)

8. Calcul et expression du résultat

Le calcul de la concentration en acide aspartique en milligrammes par litre (mg/L) présent dans les échantillons est réalisé par le programme d'acquisition.

La quantité de polyaspartate de potassium (PAK) additionnée correspond à la différence entre l'échantillon soumis à l'hydrolyse et l'échantillon brut non hydrolysé :

$$PAK (mg/L) = (acide\ aspartique_{vin_hydrolysé} - acide\ aspartique_{vin_brut}) \times f_{PAK}$$

où f_{PAK} est le facteur de conversion du polyaspartate de potassium en acide aspartique calculé comme le rapport entre les masses moléculaires du monomère de polyaspartate de potassium et l'acide aspartique, selon l'équation :

$$f_{PAK} = \frac{PM_{monomère\ PAK}}{PM_{acide\ aspartique}} = 1,15$$

Les résultats sont exprimés en mg/L avec un seul chiffre significatif après la virgule.

9. BIBLIOGRAPHIE

1. OIV-MA-AS1-10 (OENO 7-2000)