

RÉSOLUTION OIV-OENO 595-2018

DOSAGE DE L'ÉTHANAL TOTAL DANS LES VINS PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE À HAUTE PERFORMANCE

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 d'introduire dans l'annexe A, section 3 du Recueil des méthodes internationales d'analyses des vins et des moûts la méthode suivante :

Méthode de type IV

DOSAGE DE L'ÉTHANAL TOTAL DANS LES VINS PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE À HAUTE PERFORMANCE

DOMAINE D'APPLICATION

La méthode décrite est appropriée au dosage de l'éthanal total (libre et lié au dioxyde de soufre) dans les vins pour des concentrations comprises entre 0,2 et 80 mg/L.

1. PRINCIPE

L'identification de l'analyte est établie par l'intermédiaire d'une dérivation de la molécule avec la 2,4-dinitrophénylhydrazine (DNPH) suivie d'une élution par la technique CLHP. La détection est évaluée par le temps de rétention à la longueur d'onde de 365 nm.

2. RÉACTIFS ET PRODUITS

2.1. 2,4-dinitrophénylhydrazine (DNPH), CAS n° [119-26-6](#), pureté $\geq 99,0$ % (CLHP)

2.2. Dioxyde de soufre (SO_2), en tant que $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$, CAS n° [16731-55-8](#), pureté ≥ 98 %

2.3. Acide sulfurique (H_2SO_4), CAS n° [7664-93-9](#), pureté 95,0 - 98,0 %

2.4. Acide formique (CH_2O_2), CAS n° [64-18-6](#), pureté ≈ 98 %

2.5. Acétonitrile ($\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$), CAS n° [75-05-8](#), pureté $\geq 99,9$ %

2.6. Éthanal (CH_3CHO), CAS n° [75-07-0](#), pureté $\geq 99,5 \%$

2.7. Eau ultra-pure pour CLHP, CAS n° 7732-18-5 de type I selon les normes ASTM D1193 et ISO 3696

2.8. Acide perchlorique (HClO_4), CAS n° 7601-90-3, pureté 70 %

Préparation des solutions de réactifs

Solution fraîchement préparée de dioxyde de soufre à une concentration de 1120 mg/L de SO_2 , obtenue en élaborant une solution de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (2.2) à 2 g/L.2.10. Solution d'acide sulfurique à 25 % v/v préparée par dilution de l'acide sulfurique concentré (2.3) avec de l'eau ultra-pure pour CLHP.

2.11. Solution d'acétonitrile acidifié à l'acide perchlorique à 2,8 % obtenue par dilution de l'acide perchlorique (2.8) dans de l'acétonitrile (2.5).

2.12. Solution fraîchement préparée de 2,4-dinitrophénylhydrazine (2.1) dans de l'acétonitrile acidifié (2.11) à une concentration de 2 g/L de DNPH.

2.13. Préparation des solutions d'étalonnage

La solution mère est préparée par dilution d'une quantité appropriée d'éthanal (densité = 0,785 g/mL) dans de l'eau ultra-pure pour CLHP afin d'obtenir une concentration située entre 300 et 400 mg/L. Étant donné que l'éthanal pur est très volatil, il convient de préparer la solution mère en prélevant des volumes constants d'éthanal en utilisant des fioles jaugées (3.1). Pour préparer la solution mère, mesurer 10 mL d'éthanal pur dans une fiole jaugée, transférer l'éthanal pur dans une autre fiole jaugée de 20 mL et compléter avec de l'eau ultra-pure pour CLHP. Les solutions diluées sont préparées en complétant avec de l'eau ultra-pure pour CLHP dans des fioles jaugées de plus grande contenance. Les solutions d'étalonnage, qui présentent des concentrations de 10 mg/L, 30 mg/L, 50 mg/L, 70 mg/L et 100 mg/L, sont obtenues par dilution de la solution mère dans des fioles jaugées de 50 mL. Prélever par exemple les volumes nécessaires de solution mère à l'aide d'une micropipette de précision (3.2) dans des fioles jaugées (3.1) et compléter avec de l'eau ultra-pure pour CLHP.

Préparation de la phase mobile A pour l'analyse par CLHP

2.14. Solution d'acide formique à 0,5 % (v/v) obtenue par dilution de l'acide formique concentré (2.4) dans de l'eau ultra-pure pour CLHP (2.7).

3. APPAREILLAGE

3.1. Verrerie courante de laboratoire, dont fioles jaugées de 10, 20 et 50 mL de classe A, flacons de 2 mL et récipients d'un litre pour les solvants et les pipettes Pasteur.

Micropipettes de précision

3.3. Agitateur de type vortex

3.4. Filtres à membrane de 0,45 µm pour la préparation des échantillons, certifiés pour une utilisation en CLHP

3.5. Fiole à vide de 1 L (dans le cas où le dégazeur automatique des solvants n'est pas fourni avec l'appareil de CLHP)

3.6. Pompe à vide (dans le cas où le dégazeur automatique des solvants n'est pas fourni avec l'appareil de CLHP)

3.7. Balance analytique avec une précision de $\pm 0,0001$ g

3.8. Étuve à convection naturelle d'une précision de ± 1 °C à + 65 °C

3.9. Appareil de CLHP avec détecteur UV, équipé de deux pompes à gradient et d'un four pour le chauffage de la colonne

3.10. Colonne C18 (250 x 4,6 mm, diamètre des particules : 4 µm)

Note : Tout autre système peut être utilisé à condition que l'éthanal soit bien séparé des autres composés carbonylés dérivatisés. La résolution chromatographique entre le pic de l'éthanal et le plus grand pic voisin dans le chromatogramme doit être supérieure à 1.

4. ÉCHANTILLONNAGE

Le vin doit être prélevé et conservé dans un récipient en verre fermé avec un bouchon en Téflon et sous atmosphère inerte (azote ou argon).

5. MODE OPÉRATOIRE

Dérivatisation

La dérivatisation se déroule dans des flacons de 2 mL en verre fermés avec un bouchon en Téflon, à l'intérieur duquel sont additionnés successivement : 100 µL de vin ou de solution étalon, filtré à 0,45 µm, 20 µL d'une solution fraîchement préparée de dioxyde de soufre (2.2) à une concentration de 1120 mg/L de SO₂, 20 µL d'acide sulfurique à 25 % (2.3) et 140 µL d'une solution fraîchement préparée de 2,4-dinitrophénylhydrazine dans de l'acétonitrile à une concentration de 2 g/L de DNPH (2.12).

Après ces additions, la solution est immédiatement agitée par vortex, mise en étuve à 65 °C pendant 15 minutes puis refroidie à température ambiante.

Une fois la réaction terminée, la solution est refroidie à température ambiante

pendant 15 minutes avant d'être injectée dans l'appareil de CLHP. Les échantillons doivent être injectés moins de 10 heures à compter de la fin de la réaction de dérivation.

Analyse CLHP

Les paramètres spécifiques de l'analyse CLHP sont fournis ci-dessous à titre d'exemple.

Conditions habituelles de fonctionnement :

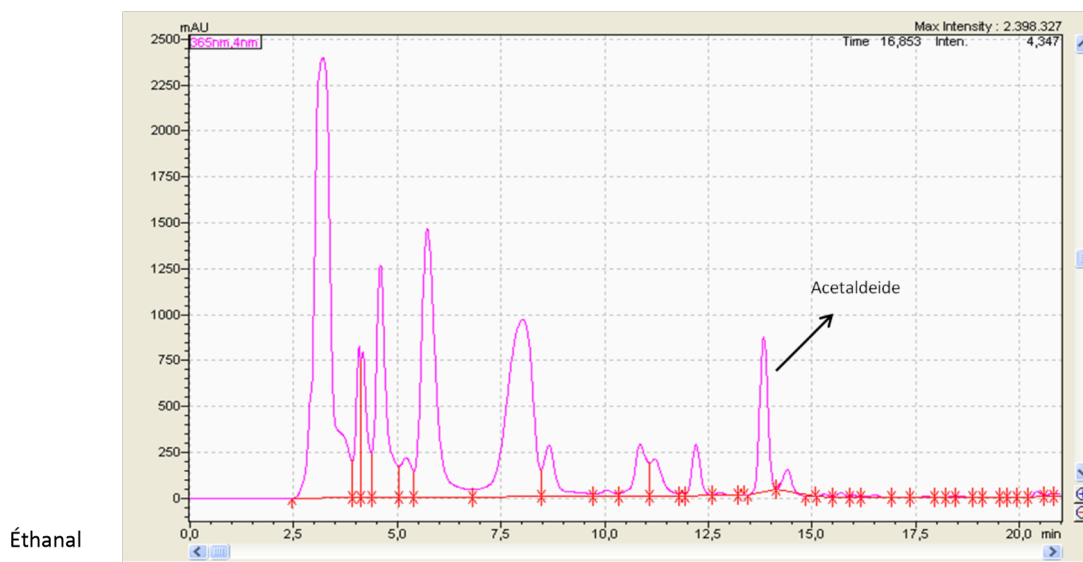
- Volume d'injection : 15 µL
- Débit : 0,75 mL/min
- Colonne C18 (5.10)
- Solvant de nettoyage de l'injecteur : acétonitrile
- Température de la colonne : 35 °C
- Solvant de phase mobile A : 0,5 % d'acide formique dans de l'eau ultra-pure pour CLHP
- Solvant de phase mobile B : acétonitrile
- Détection à 365 nm

Gradient d'élution

Le programme d'élution prévoit :

35 % d'éluant B (0,1 s)	65 % d'éluant A (0,1 s)
60 % d'éluant B (8 min)	40% d'éluant A (8 min)
90 % d'éluant B (13 min)	10% d'éluant A (13 min)
95 % d'éluant B (15 min)	5% d'éluant A (15 min)
95 % d'éluant B (17 min)	5% d'éluant A (17 min)
35 % d'éluant B (21 min)	65% d'éluant A (21 min)
35 % d'éluant B (25 min)	65% d'éluant A (25 min)

Exemple de chromatogramme



6. CALCUL

La concentration en éthanal est calculée sur la base de l'équation de la droite d'étalonnage obtenue après injection des solutions d'étalonnage (2.13).

7. FIDÉLITÉ ET PARAMÈTRES DE VALIDATION

Le coefficient de variation pour des analyses répétées au sein d'un même laboratoire est inférieur à 6 % (dans une plage de concentration comprise entre 10 mg/L et 100 mg/L). L'écart type de répétabilité est de 2,7 % pour une concentration de 14 mg/L, de 2,98 % pour une concentration de 18 mg/L, de 4,8 % pour une concentration de 22 mg/L, et de 1,3 % pour une concentration de 60 mg/L. La plage de linéarité est située entre 0,2 et 80,0 mg/L. La limite de détection est de 0,1 mg/L. Le taux de recouvrement dans le vin est compris entre 92 % et 102 % (m/m).

8. RÉSULTATS

Les résultats sont exprimés en mg d'éthanal total /L et avec 1 décimale.

9. BIBLIOGRAPHIE

1. Behforouz, M., Bolan, J. L., et Flynt, M. S., « 2, 4-Dinitrophenylhydrazones: a modified method for the preparation of these derivatives and an explanation of previous conflicting results », *The Journal of Organic Chemistry*, 50 (8), 1985, p. 1186-1189.
2. Elias, R. J., Laurie, V. F., Ebeler, S. E., Wong, J. W., et Waterhouse, A. L., « Analysis of selected carbonyl oxidation products in wine by liquid chromatography with diode array detection », *Analytica chimica acta*, 626 (1), 2008, p. 104-110.
3. Han, G., Wang, H., Webb, M. R., et Waterhouse, A. L., « A rapid, one step preparation for measuring selected free plus SO₂-bound wine carbonyls by HPLC-DAD/MS », *Talanta*, 134, 2015, p. 596-602.