RÉSOLUTION OIV-OENO 457-2014

MÉTHODE DE DOSAGE DES AMINES BIOGÈNES DANS LE VIN PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE À HAUTE PERFORMANCE AVEC DÉTECTEUR À BARRETTE DE PHOTODIODES

L'ASSEMBLÉE GÉNÉRALE

VU l'article 2 paragraphe 2 iv de l'Accord portant création de l'Organisation internationale de la vigne et du vin,

SUR PROPOSITION de la Sous-commission des méthodes d'analyse,

DÉCIDE d'adopter et d'introduire dans le Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts la méthode de type IV suivante :

MÉTHODE DE DOSAGE DES AMINES BIOGÈNES DANS LE VIN PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE À HAUTE PERFORMANCE AVEC DÉTECTEUR À BARRETTE DE PHOTODIODES

Méthode de type IV

1. Domaine d'application

Cette méthode est applicable à l'analyse des amines biogènes dans les vins :

Amines	Domaine d'application
Histamine	0,500 à 20 mg/L
Méthylamine	0,250 à 20 mg/L
Ethylamine	0,450 à 20 mg/L
Tyramine	0,235 à 20 mg/L
Putrescine	0,098 à 20 mg/L
Cadavérine	0,480 à 20 mg/L

Exemplaire certifié conforme Mendoza, 14 novembre 2014
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Jean-Marie AURAND

© OIV 2014

Phénéthylamine (ou Phényléthylamine)	0,096 à 20 mg/L
Isoamylamine	0,020 à 20 mg/L

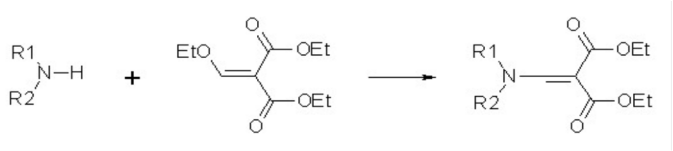
2. Définition

Le mot biogène signifie « engendré par la vie ». L'appellation « amines biogènes » est donc donnée pour toutes les amines provenant du métabolisme de cellules vivantes, animales, végétales ou microbiennes. Les amines biogènes du vin sont majoritairement d'origine microbienne. Les principales sont l'histamine, la putrescine, la cadavérine, la tyramine.

3. Principe

Les amines biogènes étudiées ici sont des amines primaires, secondaires ou tertiaires, aliphatiques ou aromatiques. Or, seules les amines aromatiques absorbent en UV. En effet, la détection des molécules par UV nécessite la présence d'un chromophore dans la molécule, généralement une séquence de doubles liaisons conjuguées.

Pour pouvoir utiliser l'HPLC/DAD, il faut donc coupler un chromophore aux amines biogènes. Pour cela, on utilise le 2-(éthoxyméthylène)malonate de diéthyle (DEEMM) qui par une alkylation, aussi appelée dérivation, nous permet d'obtenir des amines biogènes visibles par le détecteur à barrette de diodes [1].



Réaction de dérivation

NB : Le rendement de la dérivation est calculé grâce à l'ajout d'un étalon interne (chlorydrate de 2,4,6–Triméthylphénéthylamine ou 2,4,6 TPA). La quantification de chacune des amines biogènes est réalisée contre une gamme étalon.

4. Réactifs et produits

Exemplaire certifié conforme Mendoza, 14 novembre 2014
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Jean-Marie AURAND

© OIV 2014

4.1. Liste des réactifs

Références des produits :

	Produit	CAS	Pureté
4.1.1	Histamine	51–45–6	≥99%
4.1.2	Méthylamine	74–89–5	>99,5%
4.1.3	Ethylamine	557–66–4	97%
4.1.4	Tyramine	60–19–5	≥98%
4.1.5	Putrescine (diaminobutane)	333–93–7	≥98%
4.1.6	Cadavérine (diaminopentane)	1476–39–7	≥99%
4.1.7	Phénéthylamine	64–04–0	≥99%
4.1.8	Isoamylamine	107-85-7	99%
4.1.9	Acide Borique	10043-35-3	≥98.5%
4.1.10	Hydroxyde de Sodium	1310-73-2	≥98%
4.1.11	Azide de Sodium	26628-22-8	≥99.5%
4.1.12	Chlorhydrate de 2,4,6-Triméthylphénéthylamine	3167-10-0	97%
4.1.13	DEEMM (2-(éthoxyméthylène)malonate de diéthyle)	87-13-8	97%
4.1.14	Acide acétique glacial	64-19-7	≥99.7%
4.1.15	Méthanol HPLC	67-56-1	≥99.9%
4.1.16	Acétonitrile HPLC	75-05-8	≥99.93%
4.1.17	Acide chlorhydrique	7647-01-0	≥37%
4.1.18	Eau Ultrapure (18 MΩ)		

Exemplaire certifié conforme Mendoza, 14 novembre 2014
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Jean-Marie AURAND

© OIV 2014

5. Solution d'étalon interne

Préparation d'une solution à 2 g/L :

Peser 20 mg de Chlorydrate de 2,4,6–Triméthylphénéthylamine (4.1.12)

Dissoudre dans 10 mL d'HCl 0,1 M (5.1)

Conservation

La solution est conservée à température ambiante.

5.1. Solution HCL 0,1 M

Préparation d'une solution d'HCl à 0,1 M :

Prélever environ 900 ml d'eau ultrapure (4.1.18) à l'aide d'une éprouvette (6.13)

Verser environ 500 mL d'eau ultrapure (4.1.18) dans une fiole jaugée de 1 L (6.9)

Prélever 100 mL d'HCl 1 M (préparé à partir du produit commercial 4.1.17) à l'aide d'une éprouvette (6.11)

Verser les 100 mL d'HCl 1 M (4.1.17) dans la fiole jaugée (6.9)

Compléter à 1 L avec l'eau milli Q restante

Conservation

La solution est conservée à température ambiante.

5.2. Tampon borate 1M

Pour 100 mL de solution :

Peser 6,183 g d'acide borique (4.1.9)

Dissoudre dans un Bécher (6.2) en ajoutant 80 mL d'eau ultrapure (mesuré à l'éprouvette graduée)(6.11)

Ajuster le pH à 9 avec une solution de NaOH 4M (préparée à partir du produit commercial 4.1.10)

Ajuster à 100 mL dans une fiole jaugée (6.7)

Remarque : Afin d'obtenir une solution optimale, il convient que les cristaux d'acide borique se dissolvent au pH le plus bas possible. Pour ce faire ; l'ajout de NaOH devra être effectué par petites doses (10 gouttes de pipette pasteur)(6.30) sur une durée de 3 heures environ.

Conservation

La solution est conservée à température ambiante.

Exemplaire certifié conforme Mendoza, 14 novembre 2014
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Jean-Marie AURAND

© OIV 2014

5.3. Phase mobile HPLC

Phase mobile A : tampon acétate 25 mM + 0,02% d'azide de sodium pH 5,8 :

Prélever 1,8 L d'eau ultrapure dans un Bécher de 2 L (6.3)

Ajouter 2.86 mL d'acide acétique glacial (4.1.14) (bien rincer le cône dans le bécher)

Puis 0,4 g d'azide de sodium (4.1.11)

Agiter avec l'agitateur magnétique (6.24)

Ajuster le pH à 5,80 avec NaOH à 4M à l'aide d'une pipette pasteur (6.30) (environ 6,5 mL)

Ajuster à 2000 mL dans une fiole jaugée 2000 mL (6.10)

Phase mobile B : Acétonitrile/Méthanol (80/20) :

Pour 2 L de phase mobile

Prélever 400 mL de méthanol (4.1.15) à l'aide d'une éprouvette graduée (6.12) et les transvaser dans un flacon de 2L (6.20) et ajouter dans le même flacon1600 mL d'acétonitrile (4.1.16) mesuré à l'aide d'une éprouvette graduée (6.14).

Conservation

Les solutions sont conservées à température ambiante.

5.4. Gamme étalon amines biogènes

Préparation des solutions A :

Solution mère A à 500 mg/L

Peser environ 50 mg (poids précisément connu) d'histamine (4.1.1), méthylamine (4.1.2), éthylamine (4.1.3), tyramine (4.1.4) et putrescine (4.1.5) et les dissoudre dans une même fiole de 100 mL (6.7) avec de l'HCl 0,1 M (5.1)

Solution fille A à 50 mg/L

Prélever 25 mL de la solution A à 500 mg/L et verser dans une fiole de 250 mL (6.8)

Compléter à 250 mL avec HCl 0,1 M (5.1)

Solution fille A à 40 mg/L

Prélever 50 mL d'HCl à 0,1 M (5.1) et verser dans une fiole de 250 mL (6.8)

Compléter à 250 mL avec la solution fille A à 50 mg/L

Préparation des solutions B

Solution mère B à 500 mg/L

Peser environ 50 mg (poids précisément connu) de cadavérine (4.1.6), phénéthylamine (4.1.7) et isoamylamine (4.1.8) et les dissoudre dans une même fiole de 100 mL (6.7) avec

Exemplaire certifié conforme Mendoza, 14 novembre 2014
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Jean-Marie AURAND

© OIV 2014

de l'HCl 0,1 M (5.1)

Solution fille B à 50 mg/L

Prélever 25 mL de la solution B à 500 mg/L et verser dans une fiole de 250 mL (6.8)

Compléter à 250 mL avec HCl 0,1 M (5.1)

Solution fille B à 10 mg/L

Prélever 50 mL de la solution fille B à 50 mg/L et verser dans une fiole de 250 mL (6.8)

Compléter à 250 mL avec HCl à 0,1 M (5.1)

Fusion des solutions A et B – Gamme étalon

Dans une fiole de 100 mL (6.7) ajouter 50 mL de la solution A à 40 mg/L à l'aide d'une fiole jaugée 50 mL (6.6)

Compléter à 100 mL avec la solution B à 10 mg/L afin d'obtenir la **solution à 20 (A) / 5 (B) mg/L**

Le tableau suivant explique comment préparer les points de concentration pour la gamme étalon :

Concentration de la solution initiale (mg/L)	Volume prélevé de solution initiale (mL)	Ajuster à 100 mL avec une solution d'HCl 0,1 M (mL)	Concentration de la solution finale (mg/L)
20(A) / 5 (B)	50	50	10(A) / 2,5 (B)
10(A) / 2.5 (B)	50	50	5(A) / 1,25 (B)
5(A) / 1.25 (B)	20	80	1(A) / 0,25 (B)

De cette manière sont obtenues quatre concentrations pour les amines biogènes contenues dans la solution A (20, 10, 5 et 1 mg/L), et quatre concentrations pour les amines biogènes contenues dans la solution B (5, 2,5, 1,25 et 0,25 mg/L).

Conservation

Les solutions sont conservées à -20 °C.

6. Matériel et Appareillage

6.1. Béchers 25 mL

6.2. Béchers 250 mL

6.3. Béchers 2000 mL

Exemplaire certifié conforme Mendoza, 14 novembre 2014
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Jean-Marie AURAND

© OIV 2014

6.4. Fioles jaugées 10 mL
6.5. Fioles jaugées 25 mL
6.6. Fioles jaugées 50 mL
6.7. Fioles jaugées 100 mL
6.8. Fioles jaugées 250 mL
6.9. Fioles jaugées 1000 mL
6.10. Fioles jaugées 2000 mL
6.11. Eprouvettes 100 mL
6.12. Eprouvettes 500 mL
6.13. Eprouvettes 1000 mL
6.14. Eprouvettes 2000 mL
6.15. Pipette automatique de 200 µL
6.16. Pipette automatique de 1 mL
6.17. Pipette automatique de 5 mL
6.18. Pipette automatique de 10 mL
6.19. Pointes pour pipette automatique de 1 mL, 5 mL et 10 mL
6.20. Flacon de 2 litres
6.21. tubes à hydrolyse Pyrex 10 mL à bouchon à vis
6.22. Flacons de 2 mL à vis adaptés au passeur d'échantillons
6.23. Balance pour des pesées de 0 à 205 g
6.24. Agitateur magnétique
6.25. Chromatographe en phase liquide Haute Performance (HPLC)
6.26. Logiciel d'acquisition des données
6.27. Détecteur DAD (barette de diodes ou UV)
6.28. Colonne de type octadécyle (par exemple HP® C_{18} - HL, 250 mm x 4,6 mm, 5 µm).
6.29. Bain sec à 70 °C
6.30. Pipette pasteur
6.31. Bain à ultra-sons

7. Échantillonnage (Préparation de l'échantillon)

Cette méthode ne nécessite pas d'échantillonnage particulier dans la mesure où 1 mL de vin à analyser est prélevé et directement déposé dans un tube à hydrolyse Pyrex de

Exemplaire certifié conforme Mendoza, 14 novembre 2014
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Jean-Marie AURAND

© OIV 2014

10 mL à bouchon à vis (6.21) (voir mode opératoire).

Cependant, il est préconisé de réaliser la réaction de dérivation au DEEMM à réception de l'échantillon car la concentration en histamine peut diminuer dans le vin au cours du temps.

8. Mode opératoire

8.1. Prise d'essai

La manipulation doit impérativement s'effectuer sous hotte en raison de la toxicité de certains réactifs.

Si le tampon borate contient des cristaux, le faire chauffer à 50 °C tout en agitant (faiblement au départ, le temps que la solution se réchauffe).

Afin d'éviter tout risque d'adsorption sur les pointes de pipettes automatiques, il est conseillé d'utiliser la micropipette comme il suit :

- Pré-mouiller une fois le cône avec la solution à prélever
- Ajouter la solution dans le récipient sans rincer le cône avec le contenu du récipient sauf indication contraire

Bien agiter les solutions avant utilisation (en particulier le vin congelé)

Dans un tube à hydrolyse Pyrex 10 mL à bouchon à vis (6.21), introduire à l'aide de micropipettes adéquates:

- 1,75 mL de tampon borate (5.2)
- 750 µL de méthanol (4.1.15)
- 1 mL d'échantillon à dériver (pipette automatique de 1 mL) (6.16)
- 40 µL d'étalon interne (2, 4, 6 TPA à 2 g/L) (5.)
- 30 µL de DEEMM (4.1.13)

Fermer le tube (serrer bien fort afin d'éviter toute évaporation) et agiter manuellement.

Allumer le bain sec (6.29) à 70 °C.

Mettre le tube au bain à ultrasons (6.31) pendant 30 minutes (2 fois 15 minutes en agitant toutes les 5 minutes). Utiliser impérativement un portoir en plastique adapté

Exemplaire certifié conforme Mendoza, 14 novembre 2014
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Jean-Marie AURAND

© OIV 2014

au bain d'eau car la dérivation se fait mal lorsque l'on utilise un portoir métallique.

Chauffer le mélange réactionnel à 70 °C pendant 1h dans le bain sec (6.29) pour dégrader le DEEMM en excès.

Éteindre le bain sec.

Après retour à température ambiante, remplir les flacons de 2 mL à l'aide de pipette pasteur (6.30) (changer de pipette pasteur à chaque tube). Agiter les tubes manuellement avant de prélever.

8.2. Conditions opératoires

Les conditions opératoires ci-dessous sont données à titre d'exemple.

Phase mobile :

- A : tampon acétate 25 mM + 0,02 % d'azide de sodium pH 5,8 :
- B : Acétonitrile/Méthanol (80/20) :

Gradient d'élution suivant avec un débit de 0,9 mL/min :

Temps (min)	% A	% B
0	90	10
5	90	10
10	83	17
35	60	40
43	28	72
48	18	82
52	0	100
57	0	100

Température de la colonne : 15 °C

Exemplaire certifié conforme Mendoza, 14 novembre 2014
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Jean-Marie AURAND

© OIV 2014

Longueur d'onde de détection : 280 nm

Débit : 0,9 mL/min

Volume injecté : 50 µL

Durée d'analyse : 57 minutes

Identification des amines biogènes :

Les amines biogènes sont identifiées en fonction de leur temps de rétention. Pour cela, chacune d'elles a été analysée individuellement afin de déterminer son temps de rétention (Tr).

Amines		**Tr moyen (min)**
Histamine	HI	25,46
Méthylamine	ME	33,11
Ethylamine	ET	39,00
Tyramine	TY	41,50
Putrescine	PU	46,00
Cadavérine	CA	48,00
Phénéthylamine	PH	48,75
Isoamylamine	IS	50,25
Etalon Interne	2,4,6 TPA	54,75

9. Calculs (Résultats)

Les biais causés par l'incertitude sur le rendement de dérivation et sur le volume d'injection peuvent être corrigés par l'utilisation de l'étalon interne.

Une fois la valeur du pic corrigée, la concentration en amine biogène est calculée à partir de la valeur de la pente de la gamme étalon de l'amine biogène correspondante. Pour cela, pour chaque série d'analyse une gamme étalon est aussi dérivée puis

Exemplaire certifié conforme Mendoza, 14 novembre 2014
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Jean-Marie AURAND

© OIV 2014

injectée.

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

10. Contrôle Qualité

Des contrôles qualité peuvent être réalisés avec des matériaux de référence certifiés, des vins dont les caractéristiques sont issues d'un consensus ou de vins sur lesquels des ajouts dosés ont été réalisés régulièrement dans les séries analytiques et en suivant les cartes de contrôle afférentes.

11. Caractéristiques de la méthode : paramètres de validation intralaboratoires

Les paramètres de validation ont été déterminés selon [4].

11.1. Linéarité

L'approche adoptée pour l'étude de la linéarité consiste à comparer les écarts-types résiduels à partir d'un modèle de régression linéaire et d'un modèle de régression polynomiale de degré 2.

L'étude a été conduite sur deux vins différents dopés avec des amines biogènes à des concentrations de 0, 1, 5 10 et 20 mg/L (solution A) et 0, 0,25, 1,25, 2,5 et 5 mg/L (solution B).

Synthèse des résultats des amines biogènes :

Amines Biogènes	S_{res} Linéaire	S'_{res} Ordre 2	DS^2	PG	F(5%)	Conclusion
Méthylamine	0,766	0,606	3,218	8,757	4,75	Linéaire
Ethylamine	0,371	0,371	0,140	1,014		Linéaire
Tyramine	1,065	1,065	1,135	1,000		Linéaire
Putrescine	0,524	0,523	0,286	1,043		Linéaire
Cadavérine	0,276	0,267	0,134	1,881		Linéaire
Phénéthylamine	0,251	0,248	0,082	1,328		Linéaire
Isaoamylamine	0,216	0,215	0,055	1,199		Linéaire
Histamine	0,591	0,589	0,316	1,084		Linéaire

11.2. Spécificité

Le principe de la mesure de la spécificité consiste à étudier la droite de régression $r = a + bv$ et vérifier que la pente b est équivalente à 1 (Tobs < Tcritique) et que l'ordonnée

Exemplaire certifié conforme Mendoza, 14 novembre 2014
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Jean-Marie AURAND

© OIV 2014

à l'origine *a* est équivalente à 0 (T'obs < Tcritique). Les hypothèses sont testées à l'aide d'un test de Student associé au risque d'erreur de 1 %.

La valeur de Tcritique, bilatérale [p−2; 1%] associé au risque d'erreur de 1 % pour 3 degré de liberté est de 4,541.

Synthèse des résultats des amines biogènes

Amines Biogènes	vin A		vin B		vin C		vin D	
	T_{obs}	T'_{obs}	T_{obs}	T'_{obs}	T_{obs}	T'_{obs}	T_{obs}	T'_{obs}
Méthylamine	4,482	2,321	2,933	0,013	1,563	0,007	5,199	2,864
Ethylamine	0,411	0,002	0,081	0,010	0,546	10,556	0,169	2,537
Tyramine	1,834	0,005	0,636	0,005	2,151	4,485	3,420	37,419
Putrescine	7,605	0,041	0,604	0,000	3,257	0,064	2,135	0,011
Cadavérine	5,499	0,033	1,719	1,314	10,929	0,049	8,466	0,026
Phénéthylamine	3,348	0,016	1,265	0,001	10,238	0,034	5,925	0,009
Isaoamylamine	12,980	0,016	2,297	0,004	12,996	0,020	11,121	0,000
Histamine	4,978	0,250	1,222	0,006	3,128	0,014	1,229	0,004

11.3. Répétabilité

Pour cette étude de répétabilité, sept vins rouges différents ont été sélectionnés, et trois répétitions différentes ont été réalisées pour chacun d'eux. Les concentrations ont été comprises entre 0,5 et 15 mg/L en fonction de l'amine biogène et du vin.

Amine biogène	S_r (mg/L)	r (mg/L)	Plage de validation (mg/L)
Méthylamine	0,335	0,937	3 - 16
Ethylamine	0,173	0,486	2 - 7
Tyramine	0,276	0,773	2 - 20
Putrescine	0,500	1,400	7 - 26
Cadavérine	0,025	0,069	0,2 - 0,8
Phénéthylamine	0,028	0,079	0,3 - 1,1
Isoamylamine	0,017	0,048	0,1 - 0,8

Exemplaire certifié conforme Mendoza, 14 novembre 2014
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Jean-Marie AURAND

© OIV 2014

Histamine	0,108	0,303	5 - 16

11.4. Reproductibilité

Pour cette étude de reproductibilité, trois vins rouges différents ont été sélectionnés, et deux répétitions différentes ont été réalisées pour chacun d'eux.

Amine biogène	S_r (mg/L)	R (mg/L)	Plage de validation (mg/L)
Méthylamine	0,533	1,492	3 - 16
Ethylamine	0,884	2,475	2 - 7
Tyramine	0,341	0,955	2 - 20
Putrescine	0,419	1,172	7 - 26
Cadavérine	0,172	0,482	0,2 - 0,8
Phénéthylamine	0,053	0,150	0,3 - 1,1
Isoamylamine	0,056	0,157	0,1 - 0,8
Histamine	1,333	3,732	5 - 16

11.5. Limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ)

Selon une étude intralaboratoire utilisant la méthode des dilutions successives à partir d'une solution à 0,05 mg/L diluée successivement jusqu'à 0,01 mg/L :

Amines		LD (mg/L)	LQ (mg/L)
Histamine	HI	0,167	0,500
Méthylamine	ME	0,083	0,250

Exemplaire certifié conforme Mendoza, 14 novembre 2014
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Jean-Marie AURAND

© OIV 2014

Ethylamine	ET	0,150	0,450
Tyramine	TY	0,078	0,235
Putrescine	PU	0,033	0,098
Cadavérine	CA	0,160	0,480
Phénéthylamine	PH	0,032	0,096
Isoamylamine	IS	0,007	0,020

12. Bibliographie

1. Gomez-Alonzo S., Hermosin-Gutierrez I., Garcia-Romero E., 2007. Simultaneous HPLC analysis of biogenic amines, amino acids, and ammonium Ion as Aminoenone derivatives in wine and beer samples. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55, 608-613.
2. Tricard C., Cazabeil J.-M., Salagoïti M.H. (1991) : dosage des amines biogènes dans les vins par HPLC, Analusis, 19, M53-M55.
3. RECUEIL DES MÉTHODES INTERNATIONALES D'ANALYSES – OIV, Amines biogènes par HPLC, Méthode OIV-MA-AS315-18, Analyse des amines biogènes des moûts et des vins par HPLC (Résolution OIV-Oeno 346-2009).
4. « Guide pratique pour la validation, le contrôle qualité et l'estimation de l'incertitude d'une méthode d'analyse œnologique alternative ». Résolution Oeno 10/2005. OIV. Octobre 2005. www.oiv.int

Exemplaire certifié conforme Mendoza, 14 novembre 2014
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Jean-Marie AURAND

© OIV 2014