RÉSOLUTION OENO 11/2008

DOSAGE SIMULTANE DE L'ACIDE L-ASCORBIQUE ET DE L'ACIDE D-ISOASCORBIQUE (ACIDE ERYTHORBIQUE) DANS LE VIN PAR HLPC ET DÉTECTION UV

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 des méthodes d'analyse,

DÉCIDE de compléter l'annexe A du Recueil International des méthodes d'analyse par la méthode de type II suivante :

Titre	Type de la méthode
Dosage simultané de l'acide L-ascorbique et de l'acide D-isoascorbique (acide érythorbique) dans le vin par HLPC et détection UV	**II**

1. Introduction

L'acide ascorbique est un antioxydant présent naturellement dans toute une série de denrées alimentaires. La quantité normale d'acide ascorbique dans le raisin diminue lors de l'élaboration des moûts et au cours de la vinification. Il peut être ajouté aux moûts et aux vins dans certaines limites.

La méthode décrite a été validée dans le cadre d'essais interlaboratoires, par des analyses d'échantillons de vin avec des quantités ajoutées d'acide L-ascorbique et d'acide D-isoascorbique respectivement de 30 mg/L à 150 mg/L et de 10 mg/L à 100 mg/L.

2. Domaine d'application

Cette méthode convient au dosage simultané de l'acide L-ascorbique et de l'acide D-isoascorbique (acide érythorbique) dans le vin par chromatographie liquide haute

Exemplaire certifié conforme Verone, 20 juin 2008
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2008

performance et détection UV dans une plage de 3 à 150 mg/L.
Pour des teneurs supérieures à 150 mg/L, une dilution de l'échantillon est nécessaire.

3. Principe

Les échantillons sont directement injectés dans le système HLPC après filtration sur membrane. Les analytes sont séparés sur une colonne à phase inversée et sont soumis à une détection UV à 266 nm. La quantification de l'acide L-ascorbique et de l'acide D-isoascorbique est effectuée par rapport à un étalon externe.

Remarque : Les colonnes et les conditions de fonctionnement sont données à titre d'exemple. D'autres types de colonnes peuvent également assurer une bonne séparation.

4. Réactifs et produits

4.1. Réactifs

4.1.1. n-octylamine, pureté ≥ 99,0 %

4.1.2. Acétate de sodium x 3 H_2O, pureté ≥ 99,0 %

4.1.3. Acide acétique pur, 100 %

4.1.4. Acide phosphorique, approx. à 25 %

4.1.5. Acide oxalique, pureté ≥ 99,0 %

4.1.6. Ascorbate oxydase

4.1.7. Acide L-ascorbique, ultra ≥ 99,5 %

4.1.8. Acide D-isoascorbique, pureté ≥ 99,0 %

4.1.9. Eau bidistillée

4.1.10. Méthanol, p.A. 99,8 %

4.2. Préparation de la phase mobile

4.2.1. Solutions pour la phase mobile

Préparer les solutions suivantes pour la phase mobile :

4.2.1.1. 12,93 g de n-octylamine dans 100 mL de méthanol

4.2.1.2. 68,05 g d'acétate de sodium x 3 H_2O dans 500 mL d'eau bidistillée

4.2.1.3. 12,01 g d'acide acétique pur dans 200 mL d'eau bidistillée

4.2.1.4. Solution tampon (pH 5,4) : 430 mL de solution d'acétate de sodium (4.2.1.2) et

Exemplaire certifié conforme Verone, 20 juin 2008
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2008

70 mL de solution d'acide acétique (4.2.1.3)

4.2.2. Préparation de la phase mobile

Ajouter 5 mL de solution de n-octylamine (4.2.1.1) à environ 400 mL d'eau bidistillée dans un bécher. Ajuster cette solution à un pH de 5,4 à 5,6, en ajoutant goutte à goutte de l'acide phosphorique à 25% (4.1.4). Ajouter 50 mL de la solution tampon (4.2.1.4) et transférer le composé dans une fiole jaugée de 1000 mL, puis compléter avec de l'eau bidistillée. Avant utilisation, la phase mobile doit être filtrée à l'aide d'une membrane (cellulose régénérée de 0,2 µm) et si possible dégazée avec de l'hélium (pendant environ 10 minutes) selon les besoins du système HLPC utilisé.

4.3. Préparation de la solution étalon

Remarque :

Toutes les solutions étalons (solution mère 4.3.1. et solutions de travail 4.3.2) doivent être préparées chaque jour et de préférence stockées dans un réfrigérateur avant injection.

4.3.1. Préparation de la solution mère (1 mg/mL)

Préparer une solution aqueuse d'acide oxalique à 2% et éliminer l'oxygène dissout par barbotage à l'azote.

Peser exactement 100 mg d'acide L-ascorbique et 100 mg d'acide D-isoascorbique dans une fiole jaugée de 100 mL, et la remplir de solution aqueuse d'acide oxalique à 2%.

4.3.2. Préparation des solutions de travail

Pour les solutions de travail, diluer la solution mère (4.3.1) aux concentrations désirées avec la solution d'acide oxalique à 2%. Des concentrations entre 10 mg/L et 120 mg/L sont recommandées. Par exemple 100 µl, 200 µl, 400 µl, 800 µl 1200µl à 10 mL, correspondant à 10, 20, 40, 80 et 120 mg/L.

5. Appareillage

Matériel courant de laboratoire, en particulier les équipements suivants :

5.1. Pompe HLPC

5.2. Injecteur à boucle de 20 µl

5.3. Détecteur UV

Exemplaire certifié conforme Verone, 20 juin 2008
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2008

6. Échantillonnage

Des échantillons de vin sont filtrés sur une membrane d'un diamètre de pore de 0,2 µm avant injection.

Pour des teneurs supérieures à 150 mg/L, une dilution de l'échantillon est nécessaire.

7. Mode opératoire

7.1. Conditions d'utilisation du système HLPC

Injecter dans l'appareil chromatographique 20 µl de l'échantillon filtré sur membrane.

Précolonne : par exemple Nucléosil 120 C18 (4 cm x 4 mm x 7 µm)

Colonne : par exemple Nucléosil 120 C18 (25 cm x 4 mm x 7 µm)

Volume d'injection : 20 µl

Phase mobile : voir 4.2.2, isocratique

Débit : 1mL/min

Détection UV : 266 nm

Cycle de rinçage : au moins 30 mL d'eau bidistillée suivis de 30mL de méthanol et de 30 mL d'acétonitrile

7.2. Identification/Confirmation

L'identification des pics s'effectue par comparaison des temps de rétention des étalons et des échantillons. Avec le système chromatographique décrit en exemple, les temps de rétention sont respectivement de 7,7 min pour l'acide L-ascorbique et 8,3 min pour l'acide D-isoascorbique (voir figure 1, chromatogramme A).

Pour confirmer des résultats positifs, ces échantillons doivent être traités avec une spatule d'ascorbate oxydase et mesurés de nouveau (voir figure 1, chromatogramme B).

En raison de la dégradation de l'acide L-ascorbique et de l'acide D-isoascorbique provoquée par l'ascorbate oxydase, aucun signal ne devrait être trouvé au temps de rétention de l'acide L-ascorbique et de l'acide D-isoascorbique. En cas de détection de pics parasites, leur surface doit être prise en compte dans le calcul de la concentration des analytes.

Exemplaire certifié conforme Verone, 20 juin 2008
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2008

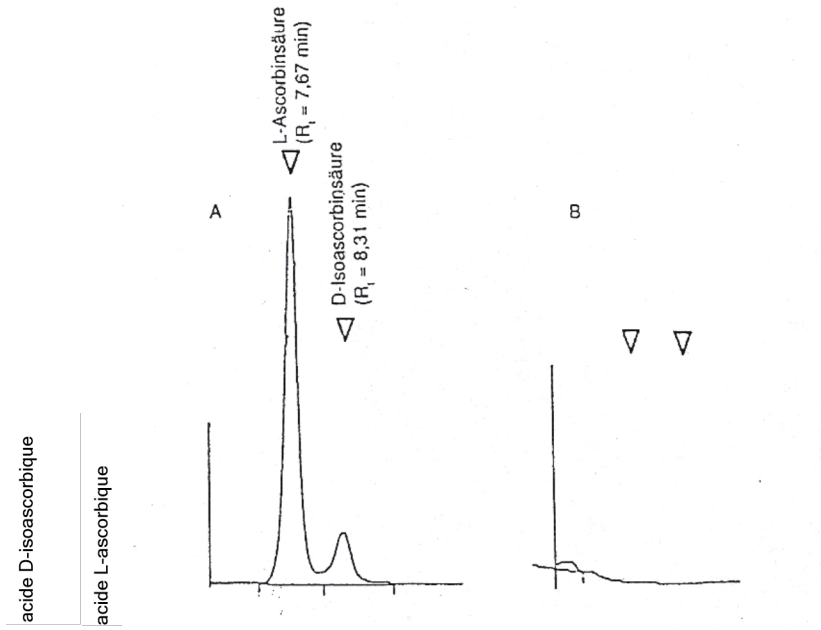


Figure 1 : Exemple de chromatogramme d'un vin blanc : A avant le traitement à l'ascorbate oxydase ; B après traitement

Remarque : Il est recommandé d'analyser les échantillons traités à l'ascorbate oxydase à la fin d'une séquence suivie du cycle de rinçage pour éliminer les restes d'ascorbate oxydase de la colonne, faute de quoi l'acide L-ascorbique et l'acide D-isoascorbique pourraient être convertis par les restes d'ascorbate oxydase lors de la mesure HPLC et le résultat pourrait s'en trouver affecté.

8. Calculs

Préparer une courbe d'étalonnage à partir des solutions de travail (4.3.2). Selon la méthode de l'étalon externe, la quantification de l'acide L-ascorbique et de l'acide D-isoascorbique est réalisée en mesurant les surfaces des pics et en les comparant à la concentration correspondante sur la courbe d'étalonnage.

Expression des résultats

Les résultats sont exprimés à une décimale en mg/L d'acide L-ascorbique et d'acide D-isoascorbique respectivement (par exemple 51,3 mg/L).

Pour des teneurs supérieures à 150 mg/L, prendre en compte la dilution.

Exemplaire certifié conforme Verone, 20 juin 2008
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2008

9. Fidélité

La méthode a été testée dans le cadre d'un essai interlaboratoire organisé en 1994 par l'ancien Office fédéral d'hygiène publique (Bundesgesundheitsamt, Allemagne), auquel ont participé 27 laboratoires. Le programme de l'essai interlaboratoire a suivi le § 35 de la loi allemande relative aux denrées alimentaires, qui a été accepté par l'O.I.V jusqu'à l'introduction du nouveau protocole (OENO 6/2000).

L'étude a porté sur quatre échantillons différents de vin - deux vins blancs et deux vins rouges – avec cinq répétitions de chaque échantillon demandées. Étant donné qu'il n'était pas possible de préparer des échantillons avec une stabilité suffisante des analytes(vitesses de dégradation différentes), il a été décidé d'envoyer aux participants des quantités définies de substances étalons pures ainsi que les échantillons de vin. Les laboratoires ont reçu pour consigne de transférer les étalons quantitativement dans les échantillons de vin et de les analyser immédiatement. Des volumes de 30 à 150 mg/L pour l'acide L-ascorbique et de 10 à 100 mg/L pour l'acide D-isoascorbique ont été analysés. Les résultats détaillés de l'étude sont présentés dans l'ANNEXE. L'évaluation a été réalisée selon DIN/ISO 5725 (version 1988).

Les écarts-types de répétabilité (s_r) et de reproductibilité (s_R) étaient en adéquation avec les concentrations d'acide L-ascorbiques et d'acide D-isoascorbique. Le paramètre de précision réelle peut être calculé à l'aide des équations suivantes :

Acide L-ascorbique

$s_r = 0{,}011\ x + 0{,}31$

$s_R = 0{,}064\ x + 1{,}39$

x : concentration d'acide L-ascorbique (mg/L)

Acide D-isoascorbique

$s_r = 0{,}014\ x + 0{,}31$

$s_R = 0{,}079\ x + 1{,}29$

x : concentration d'acide D-isoascorbique (mg/L)

Exemple :

50 mg/L d'acide D-isoascorbique

$s_r = 1{,}0$ mg/L

$s_R = 5{,}2$ mg/L

Exemplaire certifié conforme Verone, 20 juin 2008
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2008

10. Autres caractéristiques de l'analyse

10.1. Limite de détection

La limite de détection de cette méthode a été estimée à 3 mg/L pour l'acide L-ascorbique et l'acide D-isoascorbique.

10.2. Justesse

Le récupération moyenne calculée à partir de l'essai interlaboratoire mené sur quatre échantillons (voir l'ANNEXE) a été de :

100,6 % pour **l'acide L-ascorbique**

103,3 % pour **l'acide D-isoascorbique**

11. Annexe : Essai interlaboratoires

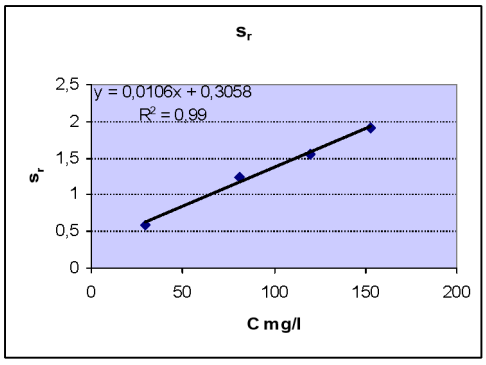
Acide L-ascorbique

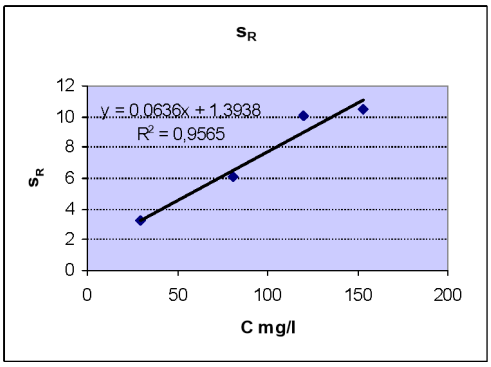
		Vin Rouge I	Vin Blanc II	Vin Rouge III	Vin Blanc IV
x	mg/L	**152,7**	**119,8**	**81,0**	**29,9**
Quantité ajoutée	mg/L	150	120	80	30
Récupération	%	101,8	99,8	101,3	99,7
n		25	23	25	23
Valeurs aberrantes		1	3	1	3
Répétabilité (s_r)	mg/L	1,92	1,55	1,25	0,58
Répétabilité relative (Rel. s_r)	%	1,3	1,3	1,5	1,9
Valeur de répétabilité d'Horrat		**0,17**	**0,17**	**0,19**	**0,20**

Exemplaire certifié conforme Verone, 20 juin 2008
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2008

R	mg/L	5,4	4,3	3,5	1,6
Reproductibilité (s_R)	mg/L	10,52	10,03	6,14	3,26
Reproductibilité relative (Rel. s_R)	%	6,9	8,4	7,6	10,9
Coefficient de variation de reproductibilité d'Horwitz	%	7,5	7,8	8,3	9,6
Valeur de reproductibilité d'Horrat		**0,92**	**1,08**	**0,92**	**1,14**
R	mg/L	29,5	28,1	17,2	9,1





Acide D-isoascorbique

		Vin Rouge I	Vin Blanc II	Vin Rouge III	Vin Blanc IV
x	mg/L	**102,4**	**79,8**	**11,3**	**29,4**

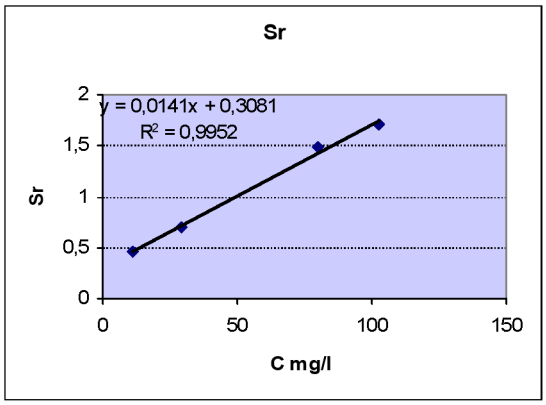
Exemplaire certifié conforme Verone, 20 juin 2008
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

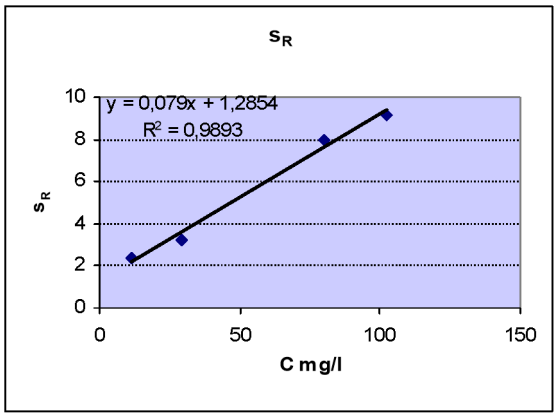
© OIV 2008

Quantité ajoutée	mg/L	100	80	10	30
Récupération	%	102,4	99,8	113,0	98,0
n		25	23	24	22
Valeurs aberrantes		1	3	2	4
Répétabilité (s_r)	mg/L	1,71	1,49	0,47	0,70
Répétabilité relative (Rel. s_r)	%	1,7	1,9	4,1	2,4
Valeur de répétabilité d'Horrat		**0,21**	**0,23**	**0,37**	**0,25**
r	mg/L	4,8	4,2	1,3	2,0
Reproductibilité (s_R)	mg/L	9,18	7,96	2,394	3,23
Reproductibilité relative (Rel. s_R)	%	9,0	10,0	21,2	11,0
Coefficient de variation de reproductibilité d'Horwitz	%	8,0	8,3	11,1	9,6
Valeur de reproductibilité d'Horrat		**1,12**	**1,21**	**1,91**	**1,14**
R	mg/L	25,7	22,3	6,7	9,0

Exemplaire certifié conforme Verone, 20 juin 2008
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2008





12. Bibliographie

1. B. Seiffert, H. Swaczyna, I. Schaefer (1992) : Deutsche Lebensmittelrundschau, 88 (2) p. 38-40
2. C. Fauhl: Simultaneous determination of L -ascorbic acid and D -isoascorbic acid (erythorbic acid) in wine by HPLC and UV-detection – OIV FV 1228, 2006

Exemplaire certifié conforme Verone, 20 juin 2008
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2008