

RESOLUTION OENO 12/2006

DETERMINATION DE L'ACIDE ACETIQUE DE SYNTHESE DANS LES VINAIGRES DE VIN AU MOYEN DE LA DETERMINATION DE LA RADIOACTIVITE $\square$ DU ^{14}C DE L'ACIDE ACETIQUE PAR SCINTILLATION LIQUIDE

L'ASSEMBLEE GENERALE,

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 et d'appréciation des vins,

DECIDE d'introduire dans le Recueil des méthodes internationales d'analyse des vinaigres de vins, la méthode de type IV suivante:

TITRE	Type de Methode
Détermination de l'acide acétique de synthèse dans les vinaigres de vin au moyen de la détermination de la radioactivité $\square$ du ^{14}C de l'acide acétique par Scintillation Liquide	IV

1. Introduction

Les vinaigres naturels présentent des teneurs en ^{14}C qui dépendent étroitement de l'année de production des vins correspondants.

Des valeurs inférieures aux teneurs de l'année traduisent l'addition de tout ou en partie d'acide acétique de synthèse.

2. Principe

L'acide acétique est d'abord extrait du vinaigre au moyen de l'éther éthylique puis ajouté au Liquide Scintillant (LS), et "compté" en scintillation liquide pendant 400 minutes. L'acide acétique d'origine minérale (bruit de fond) est compté de la même

manière.

Le résultat du “comptage net”, obtenu en enlevant la lecture du bruit de fond de celle de l'échantillon, représente la valeur de la radioactivité $\square$ de l'échantillon qui, compte tenu des corrections statistiques, est rapporté à la valeur moyenne de la radioactivité $\square$ de l'éthanol des vins naturels de la dernière vendange.

3. Réactifs

- 3.1. Hydroxyde de sodium pastilles
- 3.2. Hydroxyde de sodium en solution 40%
- 3.3. Ether éthylique pur pour analyse.
- 3.4. Acide sulfurique 10 M
- 3.5. Sulfate de sodium anhydre
- 3.6. Charbon décolorant
- 3.7. Hydroxyde de sodium 0,1 M
- 3.8. Mélange scintillant – exemple : PicoFluor LLT Camberra Packard (LS)
- 3.9. Hexadecane ^{14}C (Activité $\square 1 \square 10^6$ dpm/gC)
- 3.10. Nitrométhane
- 3.11. Acide acétique de synthèse
- 3.12. Phénolphthaléine : solution à 1% (m/v) dans l'alcool à 95% vol.

4. Appareillage

- 4.1. Hotte aspirante
- 4.2. Evaporateur rotatif sous vide
- 4.3. Bouteille d'azote munie d'un manodétendeur
- 4.4. Spectromètre à scintillation liquide
- 4.5. Flacons de comptage en polyéthylène munis de couvercles en matière plastique à fermeture hermétique
- 4.6. Verrerie de laboratoire
- 4.7. Bain à ultrasons

5. Préparation de l'échantillon

Homogénéiser l'échantillon par agitation.

6. Mode opératoire

6.1. Extraction de l'acide acétique

Dans un ballon de 2 l, placer 450 ml de vinaigre ayant une acidité totale de 60 g/l exprimé en acide acétique (ou la quantité correspondante si le vinaigre présente une autre acidité totale) ajouter ($A \pm 0,1 \pm 16$) g d'hydroxyde de sodium en pastilles (3.1) (A = nombre de ml d'hydroxyde de sodium 0,1 M nécessaires pour neutraliser 1,0 ml de vinaigre) et, si nécessaire, quelques ml de solution d'hydroxyde de sodium à 40% (3.2) pour amener le pH à 9-10.

Dans un évaporateur rotatif distiller sous vide à 50 °C un volume de 300 ml environ jusqu'à consistance sirupeuse du résidu et écarter le distillat.

A. Après refroidissement, transférer le résidu dans un ballon de 1 l muni d'un bouchon et extraire par l'éther éthylique (100 ml) dans un bain à ultrasons.

Transférer dans une ampoule à décanter, séparer les phases et écarter la phase étherée. Répéter à nouveau l'extraction dans le bain à ultrasons avec 100 ml d'éther éthylique.

Transférer dans une ampoule à décanter, séparer les phases et écarter la phase étherée.

Ajouter au résidu aqueux 25-30 ml d'acide sulfurique 10M (pH 2-3) et extraire par l'éther éthylique (3 aliquotes de 100 ml) pendant 5 minutes dans un bain à ultrasons.

Réunir les phases étherée, les sécher avec du sulfate de sodium anhydre (2 g environ) (3.5), ajouter du charbon décolorant (3 g environ) et filtrer sur filtre plissé en papier.

Evaporer l'éther à 40 °C et écarter les dernières traces d'éther par barbotage d'azote, à froid. L'acide acétique obtenu, qui présente une légère coloration jaune, est filtré à travers une petite colonne remplie de charbon décolorant (1,5 g).

L'acide acétique obtenu, environ 15 ml, a une teneur qui varie de 84 à 87 %.

6.2. Détermination de la teneur

- Dans une fiole jaugée de 20 ml pipeter 2 ml de l'acide acétique extrait et ajouter de l'eau jusqu'au trait de jauge.
- Prélever 1 ml de la solution diluée et titrer avec l'hydroxyde de sodium 0,1M

(3.7) en présence de phénolphtaléine (3.12).

- Calculer le pourcentage d'acide acétique qui est la valeur moyenne de 4 déterminations calculées selon la formule (1)
- Ac. Acétique % = $a \times M \times 60$

Ou a est le volume en ml d'hydroxyde de sodium 0,1 M utilisés dans le titrage ; M est la molarité de l'hydroxyde de sodium (ici 0,1) et 60 est le poids d'un équivalent d'acide acétique.

7. Mesures spectrométriques

7.1. Courbe de “Quenching”

7.1.1. Solution standard

Dans une fiole jaugée dissoudre avec le Liquide Scintillant, une quantité exactement pesée d'hexadécane ^{14}C afin que la solution ait une activité de 6000 dpm/ml environ. Solution Standard (S)

7.1.2. Préparation des flacons pour la Courbe de “Quenching”

Préparer 10 flacons contenant 16,5 ml de Liquide Scintillant et 1 ml de solution standard (S).

Effectuer le comptage pour chaque flacon pendant 20 minutes par la méthode ET (Efficiency Tracing) pour déterminer exactement l'activité.

Choisir les 5 flacons qui présentent l'activité la plus comparable et ajouter à chaque flacon la quantité de nitrométhane indiquée dans le tableau suivant :

Flacon	Nitrométhane μl	Quantité de quenching	Activité ajoutée
1	0,0	0.0	A_{aj}
2	20,0	+	A_{aj}
3	40,0	++	A_{aj}

4	80,0	+++	A_{aj}
5	100,0	++++	A_{aj}

7.1.3. Comptage

Introduire les flacons dans l'appareil et procéder au comptage selon les conditions suivantes:

- Temps de comptage : 10 minutes
- Cycles : 4
- Nuclide : Manuel
- Fenêtre de comptage: low level (LL) = 1,5 kev; upper level (UL) = 29 kev
- Soustraction du bruit de fond : non
- Modalité de comptage: Cpm
- Correction automatique du "quenching": non

Calculer la valeur moyenne de l'activité mesurée A_m (Cpm) et calculer l'efficacité en pourcentage (E%) pour chaque flacon par rapport à l'activité ajoutée A_{aj} (Dpm) :

- $E\% = A_m \square 100 / A_{aj}$

Reporter sur un diagramme les efficacités E% calculées et les paramètres de "quenching" correspondants donnés par l'appareil pendant le comptage et calculer l'équation de la courbe.

La courbe représente toutes les situations possibles de "quenching" qui peuvent avoir lieu pendant la mesure de chaque valeur d'E%.

Il est donc possible de calculer le rendement (E%) d'un flacon en introduisant dans l'équation de la courbe le paramètre de "quenching" donné par l'appareil.

8. Comptage de l'échantillon

8.1. Préparation des flacons à mesurer

- Dans un flacon (flacon de mesure) mettre 4,5 ml de l'acide acétique extrait et 17,5 ml de Liquide Scintillant
- Dans un flacon (flacon de mesure) mettre 4,5 ml de l'acide acétique de synthèse et 17,5 ml de Liquide Scintillant
- Effectuer le comptage pour chaque flacon pendant 400 minutes (4 cycles de 100 minutes)
- On obtient respectivement les valeurs de comptage Cpm_e et Cpm_f .

9. Résultats

9.1. Calcul de l'activité spécifique

La valeur de la radioactivité $\square$ du ^{14}C de l'échantillon (A_{sp}) est calculée selon la formule suivante :

$$\bullet A_{sp} = (Cpm_e - Cpm_f) \square 100 / E\% \square gC$$

10. Présentation

La valeur de la radioactivité $\square$ du ^{14}C A_{sp} mesurée est exprimée en Désintégrations par minute de ^{14}C par g de carbone (Dpm/gC) ou en centiBequerel par gramme de carbone (cBq/gC) arrondie à la première décimale.

11. Interprétation des résultats

Le résultat obtenu, compte tenu des corrections statistiques, est rapporté à la valeur moyenne de la radioactivité $\square$ du ^{14}C de l'éthanol des vins naturels de la dernière vendange.

Il faut observer toutefois que pour l'interprétation la plus exacte du résultat, les données sur le vinaigre et celles sur l'éthanol devraient être mesurées par le même

laboratoire et avec le même appareillage.

12. Caractéristiques de la méthode

12.1. Procédure de Validation interne

En raison de la difficulté de trouver un nombre adéquat de laboratoires qui possédaient l'appareillage nécessaire pour pouvoir participer à la validation selon les procédures recommandées par l'OIV, une méthode interne a été préparée et mise en place, comme prévu par la Résolution OENO 8/2005.

12.1.1. Calcul de l'incertitude de mesure

12.1.2. Procédure:

- 10 échantillons de vinaigre, 6 issus de la production et 4 issus du marché, ont été extraits et comptés en double.
- La déviation standard et l'incertitude sur tous les paramètres de comptage qui contribuent à la formation du résultat final ont été calculées.
- La répétitivité et l'incertitude de répétitivité de la Courbe de Quenching (ou Courbe d'Efficacité) ont été également calculées.

Les résultats sont rapportés dans le tableau 1

Tab 1

Echantillon	Cpm B	Brut Cpm	Net Cpm	tSIE	Eff%	Eff	Eff Courbe	G-H	(G-H) ²	Dpm	gC	Dpm/g C
A1	10,10	28,85	18,75	194,08	77,61	0,77609	0,78177	-0,00568	0,00003	24,16	1,67	14,47
A1	10,25	27,83	17,58	206,76	78,11	0,78112	0,79318	-0,01206	0,00015	22,51	1,54	14,64
A2	10,32	27,52	17,20	217,12	78,43	0,78428	0,80251	-0,01823	0,00033	21,93	1,57	14,01
A2	10,38	28,13	17,75	217,27	78,43	0,78431	0,80264	-0,01833	0,00034	22,63	1,62	13,96
A3	10,21	29,09	18,88	205,99	78,09	0,78085	0,79249	-0,01164	0,00014	24,18	1,62	14,93
A3	10,40	26,67	16,27	217,71	78,44	0,78443	0,80304	-0,01861	0,00035	20,74	1,48	14,01
A4	10,10	27,31	17,21	227,04	78,65	0,78649	0,81144	-0,02494	0,00062	21,88	1,54	14,21

A4	10,21	27,74	17,53	204,88	78,05	0,78046	0,79149	-0,01104	0,00012	22,46	1,62	13,86
A5	10,52	27,7	17,18	195,99	77,69	0,77693	0,78349	-0,00656	0,00004	22,11	1,56	14,17
A5	10,18	27,33	17,15	211,84	78,28	0,78278	0,79776	-0,01498	0,00022	21,91	1,54	14,23
A6	10,33	29,19	18,86	202,26	77,95	0,77948	0,78913	-0,00965	0,00009	24,20	1,66	14,58
A6	10,24	28,31	18,07	210,16	78,23	0,78225	0,79624	-0,01399	0,00020	23,10	1,61	14,35
A7(*)	9,95	27,82	17,87	198,27	77,79	0,77790	0,78554	-0,00765	0,00006	22,97	1,63	14,09
A7(*)	10,01	27,35	17,34	214,25	78,35	0,78349	0,79993	-0,01644	0,00027	22,13	1,59	13,92
A8(*)	10,35	27,63	17,28	204,1	78,02	0,78017	0,79079	-0,01062	0,00011	22,15	1,54	14,38
A8(*)	10,12	26,76	16,64	197,63	77,76	0,77763	0,78497	-0,00734	0,00005	21,40	1,48	14,46
A9(*)	10,18	28,54	18,36	211,14	78,26	0,78256	0,79713	-0,01457	0,00021	23,46	1,58	14,89
A9(*)	9,87	28,53	18,66	202,84	77,97	0,77970	0,78966	-0,00995	0,00010	23,93	1,62	14,77
A10(*)	10,21	28,67	18,46	189,48	77,39	0,77395	0,77763	-0,00368	0,00001	23,85	1,62	14,76
A10(*)	10,15	28,3	18,15	189,46	77,39	0,77394	0,77761	-0,00367	0,00001	23,45	1,67	14,04

(*) Échantillons du commerce

Cpm B = Bruit de fond (désintégration par minute de l'acide acétique synthèse)

Cpm brut = Nombre total de coups

Net Cpm = Cpm brut - Cpm B

tSIE = Paramètre de quenching

Eff = Efficacité

L'efficacité du comptage (E) est calculée selon l'équation (1)

- (1) $E = ax^2 + bx + c$

Où x est un paramètre de quenching (indiqué comme tSIE) calculé automatiquement par l'appareillage.

Etant donné que les valeurs tSIE obtenues, pour un nombre élevé des mesures (quelques centaines), se situaient dans un intervalle très restreint, il a été décidé de considérer que la courbe de quenching était une droite, au moins pour cet intervalle, et donc représentée par l'équation (2)

- (2) $E = ax + b$

Les valeurs des efficacités calculées avec les deux équations, montrant des résultats très proches, ont permis de confirmer la justesse du choix adopté.

Avec les échantillons figurant dans le tableau 1 les paramètres statistiques suivants ont été calculés :

Variance = 0,04

Répétabilité (r) = 0,65

Incertitude (U) = 0,53 dpm/gC

12.2. Limite de détection (L.D.) et Limite de Quantification (L.Q.)

La Limite de détection et la Limite de Quantification ont été calculées en préparant en double 6 flacons d'acide acétique de synthèse et en exécutant le comptage.

Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau 2

Tableau 2 :

Cpm B	Moyenne	St Dev	L.D. (Cpm)	L.Q. (Cpm)
10,48	10,60	0,14	0,43	1,40
10,62				
10,45				
10,87				
10,64				
10,65				
10,83				
10,61				
10,45				
10,65				

10,41				
10,57				

A partir des comptages du Tableau 2 les valeurs suivantes de L.D. et de L.Q. ont été calculées.

L.D.= 0,43

L.Q. = 1,40

12.3. Linéarité du dosage

Pour vérifier la linéarité du dosage 6 flacons d'acide acétique provenant de vinaigre ont été préparés contenant des quantités connues et variables d'acide acétique de synthèse comprises entre 0% et 80%.

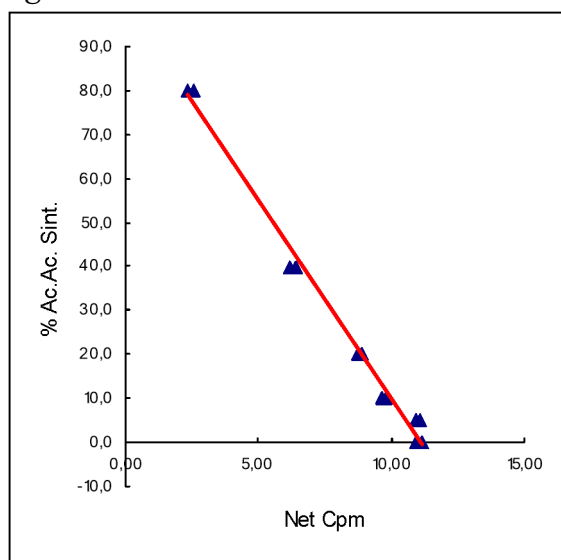
Les résultats du comptage en Cpm Net sont reportés dans le Tableau 3

Tableau 3

%AcH (synth.)	Ne Cpm
0,0	10,94
0,0	11,17
5,0	10,96
5,0	11,07
10,0	9,67
10,0	9,81
20,0	8,77
20,0	8,88
40,0	6,20
40,0	6,39
80,0	2,57
80,0	2,33

Dans la figure 1 est rapportée la courbe obtenue en rapportant en diagramme les valeurs du Tableau 3

Fig 1



En introduisant dans l'équation de la droite de la Figure 1 la valeur de L.Q. calculée en 13,1, le % d'acide acétique de synthèse quantifiable de façon sûre d'après l'exemple du Tableau 3, est = 13%.