RÉSOLUTION OENO 23/2004

DOSAGE DES ACIDES ORGANIQUES ET ANIONS MINERAUX DANS LES VINS PAR CHROMATOGRAPHIE IONIQUE

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 de compléter l'Annexe A du Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts, par la méthode de type IV suivante:

DOSAGE DES ACIDES ORGANIQUES ET ANIONS MINERAUX DANS LES VINS PAR CHROMATOGRAPHIE IONIQUE

Préambule

Le développement de la chromatographie ionique haute performance dans les laboratoires a permis d'étudier le dosage par cette technique des acides organiques et anions minéraux dans les boissons alcoolisées ou non.

S'agissant particulièrement de l'analyse des vins, les résultats des essais d'intercomparaison et les mesures des taux de recouvrement ont permis de valider une méthodologie analytique.

L'intérêt majeur de cette méthode tient au fait que les colonnes échangeuses d'ions permettent une séparation de la plupart des acides organiques et anions et la détection par conductimétrie affranchit l'analyste des interférences dues à la présence de composés phénoliques. Or, ce type d'interférences est très notable dans les méthodes chromatographiques qui comportent une détection dans l'ultra-violet à 210 nm.

1. Objet et domaine d'application

La méthode de dosage des anions minéraux et acides organiques par chromatographie ionique est applicable aux boissons alcoolisées (vins, eaux-de-vie et liqueurs). Elle permet de doser les acides organiques dans les domaines de concentration, rapportés

Exemplaire certifié conforme Vienne, 30 juillet 2004
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2004

dans le tableau 1; ces concentrations sont obtenues par dilution des échantillons.

Tableau 1 : Domaine de concentration des anions pour leur analyse par chromatographie ionique

- Sulfate 0,1 à 10 mg/l
- Ortho-phosphate 0,2 à 10 mg/l
- Acide malique 1 à 20 mg/l
- Acide tartrique 1 à 20 mg/l
- Acide citrique 1 à 20 mg/l
- Acide isocitrique 0,5 à 5 mg/l

Les gammes de travail mentionnées ci-dessus sont données à titre indicatif. Elles englobent les modes d'étalonnage couramment pratiqués et sont donc modulables en fonction du type d'appareillage utilisé (nature de la colonne, sensibilité du détecteur, ...) et du mode opératoire (volume d'échantillon injecté, dilution, ...).

2. Principe

Séparation des anions minéraux et acides organiques sur une résine échangeuse d'ions.

Détection par conductimétrie.

Identification d'après le temps de rétention et quantification au moyen d'une courbe d'étalonnage.

3. Réactifs

Tous les réactifs utilisés lors de l'analyse doivent être de qualité analytique. L'eau servant à la préparation des solutions doit être de l'eau distillée ou désionisée d'une conductivité inférieure à 0,06 µS, exempte des anions dosés à des seuils compatibles avec les limites de détection que permet d'atteindre l'appareillage utilisé.

3.1. Eluant

La composition de l'éluant dépend de la nature de la colonne de séparation et de la nature de l'échantillon à analyser. Elle est cependant toujours préparée à partir de solutions aqueuses d'hydroxyde de sodium.

Exemplaire certifié conforme Vienne, 30 juillet 2004
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2004

Les performances de l'analyse chromatographique sont altérées par carbonatation de la solution d'hydroxyde de sodium; en conséquence, les flacons de phase mobile sont balayés à l'hélium avant adjonction d'hydroxyde de sodium et il faut prendre toutes les précautions afin d'éviter de les contaminer par l'air ambiant.

Enfin, ce sont des solutions d'hydroxyde de sodium concentrées commerciales qui seront utilisées.

Remarque

Le tableau du chapitre 7 rappelle les principaux interférents susceptibles d'être présents dans les échantillons.

Il est donc nécessaire de savoir au préalable s'ils coéluent avec les ions à doser et s'ils sont présents à une concentration telle que l'analyse est perturbée.

Les boissons fermentées contiennent de l'acide succinique qui peut interférer avec l'acide malique. A cet effet, il est nécessaire d'ajouter du méthanol dans l'éluant pour améliorer la résolution de la colonne au niveau de ces deux substances (20 % de méthanol).

3.2. Solutions mères étalons

Préparer des solutions mères étalons de concentrations précises voisines de celles indiquées sur le tableau suivant. Dissoudre dans l'eau, dans des fioles jaugées de 1000 ml, des quantités de sels ou d'acides correspondants. (Tableau 2)

Tableau 2 : Concentration des anions dosés dans les solutions mères étalons

Anions et composés	Composé pesés	Concentration finale (mg/l)	Quantité pesée (mg)
Sulfate	Na_2SO_4	500	739,5
Orthophosphate	KH_2PO_4	700	1003,1
Ac. malique	Ac. malique	1000	1000,0
Ac. tartrique	Ac. tartrique	1000	1000,0
Ac. citrique	Ac. Citrique.H_2O	1000	1093,8
Ac. isocitrique	Isocitrate 3Na.2H_2O	400	612,4

Exemplaire certifié conforme Vienne, 30 juillet 2004
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2004

Remarque

Le laboratoire doit prendre les précautions nécessaires au regard du caractère hygroscopique de certains sels.

3.3. Solutions d'étalonnage

Les solutions d'étalonnage sont obtenues par dilution dans l'eau des solutions mères de chaque ion ou acide.

Ces solutions doivent contenir l'ensemble des ions ou acides dosés dans une gamme de concentrations recouvrant nécessairement celle correspondant aux échantillons à analyser. Elles doivent être préparées le jour de leur emploi.

Au moins deux solutions d'étalonnage et un blanc doivent être analysés de façon à établir, par substance, des courbes d'étalonnage à l'aide de trois points (0, demi-concentration maximale, concentration maximale).

Remarque

Le tableau 1 donne des indications sur les concentrations maximales en anions et acides dans les solutions d'étalonnage mais les performances des colonnes chromatographiques sont meilleures avec des solutions très diluées.

Il faut donc rechercher au mieux l'adéquation entre les performances de la colonne et le niveau de dilution des échantillons.

En général, on est amené à diluer l'échantillon entre 50 et 200 fois au maximum, sauf cas particulier.

Pour améliorer la durée de vie des solutions filles, il est souhaitable de les préparer en solution dans un mélange eau/ méthanol (80/20).

4. Appareillage

Matériel courant de laboratoire et,

4.1. Ensemble instrumental pour la chromatographie ionique comprenant:

4.1.1 Réservoir(s) d'éluant(s)

4.1.2. Pompe à débit constant, sans effet de pulsation

4.1.3. Dispositif d'injection, soit manuel, soit automatique, constitué d'une vanne à boucle d'échantillonnage (par exemple 25 ou 50 µl).

4.1.4. Colonnes de séparation

Ensemble constitué d'une colonne échangeuse d'anions, de performance contrôlée, éventuellement d'une précolonne de même nature que la colonne principale. A titre

Exemplaire certifié conforme Vienne, 30 juillet 2004
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2004

d'exemple, il est possible d'utiliser les colonnes AS11 et précolonne AG11 de DIONEX.

4.1.5. Système de détection

Cellule de conductivité à circulation, de très faible volume, reliée à un conductimètre comportant plusieurs gammes de sensibilité.

Afin d'abaisser la conductivité de l'éluant, un dispositif de suppression chimique, échangeur de cations est installé en amont de la cellule de conductivité.

4.1.6. Enregistreur, intégrateur ou autre dispositif de traitement des signaux.

4.2. Balance sensible au 1 mg

4.3. Fioles jaugées de 10 à 1000 ml

4.4. Pipettes calibrées de 1 à 50 ml

4.5. Membranes filtrantes de diamètre moyen de pore de 0,45 µm.

5. Echantillonnage

Les échantillons sont dilués en tenant compte des anions minéraux et des acides organiques que l'on souhaite doser.

Si leur concentration est très variable dans l'échantillon, deux niveaux de dilution seront nécessaires afin de respecter les domaines de concentration couverts par les solutions d'étalonnage.

6. Mode opératoire

Mettre en marche l'appareillage en suivant les instructions du constructeur.

Régler les conditions de pompage (flux d'éluant) et de détection de manière à obtenir une séparations sélective des pics dans la gamme de concentrations des ions à analyser.

Laisser le système s'équilibrer jusqu'à obtention d'une ligne de base stable.

6.1. Etalonnage

Préparer les solutions d'étalonnage comme indiqué en 3.3.

Injecter les solutions d'étalonnage de façon à ce que le volume injecté soit au moins de 5 fois celui de la boucle d'échantillonnage pour permettre le rinçage du système.

Tracer les courbes d'étalonnage pour chaque ion. Celles-ci doivent être normalement des droites.

Exemplaire certifié conforme Vienne, 30 juillet 2004
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2004

6.2. Essai à blanc

Injecter l'eau utilisée dans la préparation des solutions d'étalonnage et des échantillons.

Contrôler l'absence de pics parasites et quantifier les anions minéraux présents (chlorure, sulfate..).

6.3. Analyse

Diluer l'échantillon éventuellement à deux niveaux différents comme indiqué en 5, de sorte que les anions et acides à doser soient présents dans la gamme des concentrations des solutions d'étalonnage.

Filtrer l'échantillon dilué sur une membrane filtrante (4.5) avant injection.

Procéder ensuite comme pour l'étalonnage (6.1).

7. Répétabilité, reproductibilité

Cette méthode a été testée par un circuit interlaboratoire mais il ne s'agit pas d'une validation formelle selon le protocole OIV (Oeno 6/99).

La limite de répétabilité et la limite de reproductibilité du dosage de chaque ion dans les

vins ont été calculées selon la norme ISO 5725.

Chaque analyse a été répétée 3 fois.

Nombre de laboratoires participants: 11; Les résultats sont les suivants:

Vin blanc

	Nb labos retenus	Moyenne (mg/l)	Répétabilité (mg/l)	Reproductibilité (mg/l)
Acide malique	11/11	2745	110	559
Acide citrique	9/11	124	13	37
Acide tartrique	10/11	2001	96	527
Sulfate	10/11	253	15	43

Exemplaire certifié conforme Vienne, 30 juillet 2004
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2004

O. phosphate	9/11	57	5	18

Vin rouge

	Nb labos retenus	Moyenne (mg/l)	Répétabilité (mg/l)	Reproductibilité (mg/l)
Acide malique	8/11	128	16	99
Acide citrique	8/10	117	8	44
Acide tartrique	9/11	2154	48	393
Sulfate	10/11	324	17	85
O. phosphate	10/11	269	38	46

8. Calcul des taux de recouvrement

L'échantillon supplémenté est un vin blanc

Détermination	Nb labos retenus	Concentration initiale (mg/l)	Ajout réel (mg/l)	Ajout mesuré (mg/l)	Taux de récupération (%)
Ac. Citrique	11/11	122	25,8	24,2	93,8
Ac. Malique	11/11	2746	600	577	96,2
Ac. tartrique	11/11	2018	401	366	91,3

9. Risques d'interférences

Toute substance dont le temps de rétention coïncide avec celui de l'un des ions

Exemplaire certifié conforme Vienne, 30 juillet 2004
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2004

analysés peut constituer une interférence.

Les interférences les plus courantes sont les suivantes:

Anions ou acides : Interférents

Nitrate : bromure

Sulfate : oxalate, maléate

Orthophosphate : phtalate

Ac. Malique : Ac. succinique, Ac. citramalique

Ac. Tartrique :Ac. malonique

Ac. Citrique : -

Ac. Isocitrique : -

Remarque

L'ajout de méthanol dans la phase mobile peut résoudre certains problèmes analytiques.

Par exemple:

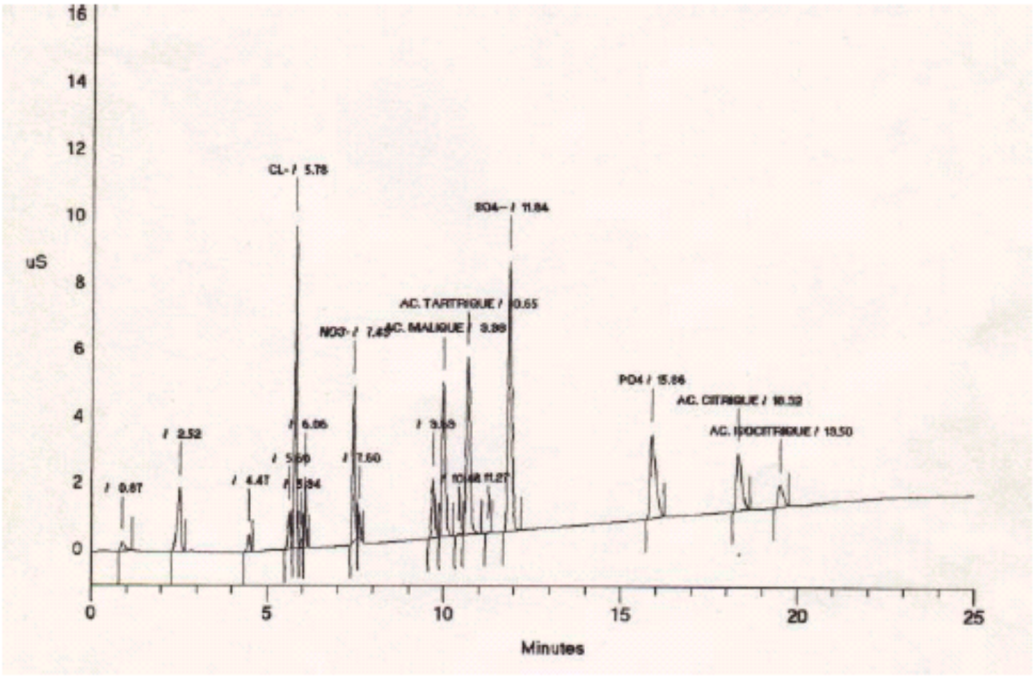
- La présence de méthanol dans la phase mobile n'est pas toujours requise; cependant elle est indispensable pour obtenir une résolution convenable entre acide succinique et acide malique lors de l'analyse des vins.
- Les ions oxalates et sulfates coéluent avec la plupart des conditions chromatographiques; il faut 13% de méthanol dans la phase mobile pour les séparer.
- La résolution des pics correspondant aux acides acétique et lactique est satisfaisante si l'on réalise un gradient d'élution en hydroxyde de sodium, sans méthanol.

10. Exemples de chromatogrammes

Annexe (a)

Exemplaire certifié conforme Vienne, 30 juillet 2004
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2004



Chromatogramme d'une solution d'étalonnage d'acides organiques et d'anions minéraux: Chlorure (1,96 mg/l), Nitrate (2,21 mg/l), Acide malique (5,35 mg/l), Acide tartrique (5,08 mg/l), Sulfate (2,8 mg/l), O.phosphate (3,9 mg/l), Acide citrique (3,24 mg/l), Acide isocitrique (1,6 mg/l).

Appareillage utilisé de marque DIONEX: Pompe, Détecteur PED, suppresseur AMMSII avec AUTOREGEN, colonne AS11 et précolonne AG11.

Débit 2ml/mn -

Phase mobile 1: Eau-NaOH 0,5mM/l, méthanol (80/20)

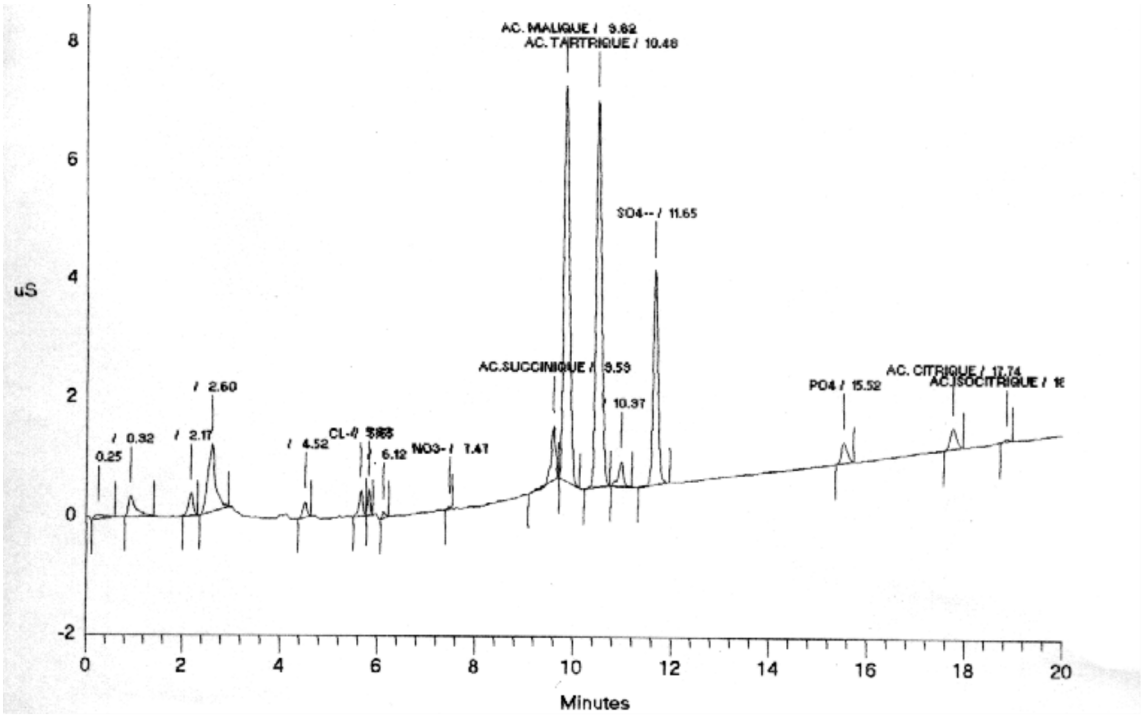
Phase mobile 2: Eau-NaOH 100mM/l, méthanol (80/20)

Gradient d'élution: 100% Phase mobile 1 à 65% phase mobile 1 en 25 mn.

Annexe (b)

Exemplaire certifié conforme Vienne, 30 juillet 2004
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2004



Chromatogramme d'un vin rosé dilué 200 fois:

Appareillage utilisé de marque DIONEX: Pompe, Détecteur PED, suppresseur AMMSII avec AUTOREGEN, colonne AS11 et précolonne AG11.

Débit 2ml/mn -

Phase mobile 1: Eau-NaOH 0,5mM/l, méthanol (80/20)

Phase mobile 2: Eau-NaOH 100mM/l, méthanol (80/20)

Gradient d'élution: 100% Phase mobile 1 à 65% phase mobile 1 en 25 mn.

Exemplaire certifié conforme Vienne, 30 juillet 2004
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2004