# RESOLUTION OENO 61/2000

# X. VINAIGRES DE VIN - DETERMINATION DE LA TENEUR EN ACIDE ASCORBIQUE TOTAL

## 1. Introduction

Dans l'industrie des vinaigres de vin, l'utilisation technologique de l'acide ascorbique est réglementée dans les différents pays producteurs et consommateurs. Il faut contrôler l'application de cette pratique, ainsi que quantifier sa présence éventuelle.

## 2. Principe

Oxydation de l'acide ascorbique par l'iode, avec transformation en acide déhydroascorbique, précipitation de celui-ci par la 2,4-dinitrophénylhydrazine sous la forme de bis(2,4-dinitrophénylhydrazone). Séparation par chromatographie en couche mince, solubilisation en milieu acétique et détermination colorimétrique à 500 nm.

## 3. Réactifs

3.1. Solution d'acide métaphosphorique à environ de 30 g pour 100 ml.

Peser 30 g d'acide métaphosphorique vitreux, préalablement trituré.

Laver rapidement en couvrant avec de l'eau et agiter. Rejeter l'eau de lavage. Introduire dans une fiole jaugée de 100 ml, dissoudre avec de l'eau, agiter et porter au trait de jauge.

Cette solution se conserve au maximum pendant une semaine au réfrigérateur.

3.2. Solution d'acide métaphosphorique à 3% (v/v).

Préparer au moment de l'utilisation par dilution de 3.1.

3.3. Solution d'acide métaphosphorique à 1% (v/v).

Préparer au moment de l'utilisation par dilution de 3.1.

3.4. Suspension de polyamide

Peser 10 g de polyamide en poudre pour la chromatographie et introduire dans une fiole conique de 250 ml. Ajouter 60 ml d'eau, agiter et laisser en contact pendant 2 h (cette quantité est suffisante pour 4 déterminations).

3.5. Thiourée.



Exemplaire certifié conforme Paris, 23 juin 2000
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Georges DUTRUC-ROSSET

© OIV 2000

3.6. Solution d'iode 0,05 M.

3.7. Acide acétique glacial.

3.8. Acide sulfurique (□□20 = 1,84 g/ml).

3.9. Solution acéto-sulfurique de 2,4-dinitrophénylhydrazine.

Introduire dans un ballon 6 g de 2,4-dinitrophénylhydrazine et 50 ml d'acide acétique glacial. Il se forme une suspension. Ajouter 50 ml d'acide sulfurique pour dissoudre la 2,4-dinitrophénylhydrazine.

3.10. Acétate d'éthyle additionné d'acide acétique glacial (98+2, en volume).

3.11. Chloroforme.

3.12. Gel de silice G pour chromatographie.

3.13. Solution d'amidon soluble à 0,5 g/100 ml.

3.14 . Solution étalon d'acide L-ascorbique.

Dans une fiole jaugée de 100 ml, introduire 100 mg d'acide L-ascorbique pesés à 0,1 mg près, dissoudre avec la solution 3.3 et porter au trait de jauge.

3.15. Eluant

Acétate d'éthyle-chloroforme-acide acétique glacial (50 : 60 : 5, v/v/v). Utiliser seulement 12 h après de sa préparation.

## 4. Matériel

Matériel de laboratoire d'usage courant, y compris :

4.1. Chambre de développement pour chromatographie.

4.2. Matériel approprié à la préparation des plaques.

4.3. Plaques en verre pour chromatographie en couche mince, de 20 x 20 cm, préparées de la manière suivante :

Dans une fiole conique de 250 ml, introduire 30 g de gel de silice, 70 ml de solution d'amidon (3.13) et agiter pendant 1 min. Etaler cette suspension sur les plaques, de manière à obtenir une couche uniforme de 0,3 mm d'épaisseur. Sécher les plaques à l'air et les garder ensuite dans un dessiccateur contenant du gel de silice. Les activer avant utilisation en les maintenant dans une étuve à 105 °C pendant 1h 30 min. Les quantités indiquées sont suffisantes pour la préparation de 5 plaques.

Ces plaques sont aussi disponibles dans le commerce.

4.4. Spectrophotomètre permettant des lectures à 500 nm avec des cuves de 1 cm de parcours optique.

4.5. Centrifugeuse à 1200 rpm, au moins, et tubes de 50 ml bouchon vissé.



Exemplaire certifié conforme Paris, 23 juin 2000
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Georges DUTRUC-ROSSET

© OIV 2000

# 5. Préparation de l'échantillon

Homogénéiser l'échantillon par agitation et filtrer si nécessaire.

# 6. Technique

## 6.1. Oxydation de l'acide ascorbique

Dans une fiole jaugée de 100 ml, introduire une prise d'essai de 50 ml, ajouter 15 ml de suspension de polyamide et porter au trait de jauge avec la solution 3.2. Laisser en contact pendant 1 h en agitant fréquemment. Filtrer par un filtre de papier plissé.

Introduire 20 ml de filtrat dans un tube de centrifugeuse. Ajouter 1 ml de solution d'iode (3.6), agiter après 1 min., réduire l'excès par addition d'environ 25 mg de thiourée (3.5).

## 6.2. Formation et extraction de la bis(2,4-dinitrophénylhydrazone)

Introduire le tube dans un bain d'eau à une température comprise entre 5 et 10 °C, ajouter 4 ml de la solution de 2,4-dinitrophénylhydrazine (3.9). Boucher le tube et agiter avec précaution en évitant de mouiller le bouchon. Maintenir le tube bien bouché dans un bain à 20 °C pendant environ 16 h.

Ajouter 15 ml de la solution 3.9. Boucher le tube et agiter vigoureusement pendant 30 s. Centrifuger ensuite, pendant 5 min. à 1000-1200 rpm. Retirer 10 ml de la solution surnageante et introduire dans une fiole conique à bouchon émeri. Ajouter au tube 5 ml de la solution 3.10, agiter à nouveau pendant 30 s et centrifuger pendant 5 min. à 1000-1200 rpm. Retirer 5 ml de la solution surnageante et ajouter dans une fiole conique aux 10 ml de la première extraction. Agiter.

## 6.3. Séparation de la bis(2,4-dinitrophénylhydrazone) par chromatographie en couche mince

Faire cette séparation chromatographique pendant les 2 h qui suivent l'extraction. Sur une plaque pour chromatographie, le long d'une ligne distante de 2 cm des bords inférieurs et latéraux, déposer 0,2 ml de solution d'extraction obtenue en 6.2. Dans une chambre de développement préalablement saturée avec l'éluant (3.15) qui occupe environ 1 cm de hauteur, introduire la plaque et laisser migrer l'éluant jusqu'au bord supérieur. Retirer la plaque et la sécher pendant 1 h dans un lieu ventilé.

Maintenir la plaque en position verticale sur une feuille de papier brillant non poreux, gratter avec une spatule et perpendiculairement à la direction de migration la zone de



Exemplaire certifié conforme Paris, 23 juin 2000
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Georges DUTRUC-ROSSET

© OIV 2000

coloration rougeâtre caractéristique de la bis(2,4-dinitrophénylhydrazone) à l'abri de tout courant d'air.

Transférer totalement le produit pulvérulent obtenu dans un petit flacon de pesée avec couvercle rodé et ajouter 4 ml d'acide acétique glacial (3.7). Laisser en contact pendant 20 min., en agitant fréquemment. Filtrer à travers un petit papier filtre plissé directement dans la cuve du spectrophotomètre et faire passer à nouveau à travers le filtre les premières 25 à 30 gouttes du filtrat pour obtenir une parfaite limpidité.

### 6.4. Lecture de l'absorbance

Lire au spectrophotomètre l'absorbance du filtrat à la longueur d'onde de 500 nm en utilisant l'acide acétique glacial (3.7) comme référence.

### 6.5. Courbe d'étalonnage

Dans 3 fioles jaugées de 100 ml introduire respectivement 5, 10 et 15 ml de solution 3.14 et porter chaque fiole au trait de jauge avec la solution 3.3. Ces solutions contiennent, respectivement, 50, 100 et 150 mg d'acide L-ascorbique par l. Prélever 50 ml de chacune de ces solutions au lieu de l'échantillon et effectuer pour chacune et successivement les opérations décrites de 6.1 à 6.4.

Etablir la courbe d'étalonnage en portant les concentrations en abscisses et les absorbances en ordonnées. La représentation graphique est une droite qui passe par l'origine.

## 7. Résultats

### 7.1. Calcul

Déterminer la teneur en acide L-ascorbique, exprimée en milligrammes par l de vinaigre, sur la courbe d'étalonnage en fonction de l'absorbance obtenue en 6.4.

### 7.2. Présentation

Arrondir les résultats exprimés en milligrammes par l à l'unité.

## 8. Bibliographie

FAO / OMS, Commission du Codex Alimentarius, Doc. CX/EURO 82/3, Partie II, Roma (1982).



Exemplaire certifié conforme Paris, 23 juin 2000
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Georges DUTRUC-ROSSET

© OIV 2000