RESOLUTION OENO 8/98

DOSAGE DU CARBAMATE D'ETHYLE DANS LES BOISSONS ALCOOLISEES

L'ASSEMBLEE GENERALE,

VU l'Article 5, alinéa 4 de la Convention internationale d'unification des méthodes d'analyse et d'appréciation des vins du 13 octobre 1954,

SUR PROPOSITION de la Sous-Commission des méthodes d'analyse et d'appréciation des vins,

DECIDE :

DE REMPLACER dans l'Annexe A du Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins, la méthode décrite par la méthode suivante :

DOSAGE DU CARBAMATE D'ETHYLE DANS LES BOISSONS ALCOOLISEES : METHODE DE DETECTION SELECTIVE PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE/SPECTROMETRIE DE MASSE

(Applicable à la détermination du carbamate d'éthyle pour des concentrations comprises entre 10 et 200 µg/l).

(*Attention* : Respecter les consignes de sécurité pour les manipulations des produits chimiques, pour l'éthanol, l'acétone et les produits carcinogènes : carbamate d'éthyle et dichlorométhane. Se débarrasser des solvants usés de manière appropriée compatible avec les règles et les règlements écologiques applicables).

A. Principe de la méthode :

Le Carbamate de propyle est ajouté à un échantillon comme étalon interne, la solution est diluée avec de l'eau et est placée dans une colonne d'extraction en phase solide de 50 ml. Le carbamate d'éthyle et le carbamate de propyle sont élués avec du dichlorométhane.

L'éluat est concentré à l'aide d'un évaporateur rotatif sous vide. Le concentré est analysé par chromatographie en phase gazeuse (CG) la détection est effectuée par spectrométrie de masse par fragmentométrie en mode SIM (Selected ions monitoring).

Exemplaire certifié conforme Lisbonne, 26 juin 1998
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
GEORGES DUTRUC-ROSSET

© OIV 1998

B. Appareillage et conditions chromatographiques (donnés à titre d'exemple)

a) *Chromatogramme en phase gazeuse/spectromètre de masse (CG/SM)* et éventuellement un passeur d'échantillons et système de traitement de données ou équivalent.

Colonne capillaire en silice greffée 30 m[1]* x 0,25 mm ▫ int., 0,25 µm de film de type Carbowax 20M.

Mode opératoire : injecteur 180°C, gaz vecteur hélium à 1 ml/min. et à 25°C, injection selon la méthode « Splitless / split ».

Programme de température: 40°C pendant 0,75 min., puis programmation à 10°C/min.

jusqu'à 60°C, puis 3°C/min. jusqu'à 150°C[2]**, aller jusqu'à 220°C puis maintenir pendant 4,25 min. à 220°C. Le temps de rétention spécifique du carbamate d'éthyle est de 23-27 min., celui du carbamate de propyle est de 27-31 min.

Chromatographe en phase gazeuse/spectromètre (CG/SM) interface: ligne de transfert 220°C. Paramètres du spectromètre de masse mis au point manuellement avec de la perfluorotributylamine et optimisé pour une sensibilité de masse plus basse, mode acquisition SIM, délai solvant et temps de commencement de l'acquisition 22 min., temps de maintien/ion 100 ms.

b) *Evaporateur rotatif sous vide ou système de concentration de type Kuderna Danish.* (NB. le taux de récupération du carbamate d'éthyle de l'échantillon test, C(g) doit être compris entre 90-110% pendant le processus).

c) *Fiole* - en forme de poire, 300 ml, col unique à rodage.

d) *Tube de concentration* - 4 ml, gradué, avec un joint à pellicule de téflon et bouchon.

C. Réactifs

a) *Acétone* - qualité LC. NB: Vérifier chaque lot avant usage par CG/SM concernant l'absence de réponse pour les ions de m/z 62, 74 et 89.

b) *Dichlorométhane* - NB.: Analyser chaque lot avant usage par CG/SM après concentration 200 fois, concentration pour vérifier l'absence de réponse pour les ions de m/z 62, 74 et 89.

c) *Ethanol* - anhydre

d) *Carbamate d'éthyle (CE) solutions standards*

Exemplaire certifié conforme Lisbonne, 26 juin 1998
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
GEORGES DUTRUC-ROSSET

© OIV 1998

- (1) Solution « mère » - 1,00 mg/ml. Peser 100 mg CE (≥ 99% pureté) dans une fiole volumétrique de 100 ml et diluer avec de l'acétone.
- (2) Solution standard de travail - 10,0 µg/ml. Transférer 1 ml de la solution « mère » CE dans une fiole volumétrique de 100 ml et diluer avec de l'acétone jusqu'au trait de jauge.

e) *Carbamate de propyle* (CP), solutions standards.

- (1) Solution « mère » - 1,00 mg/ml. Peser 100 mg CP (qualité réactif) dans une fiole volumétrique de 100 ml et diluer avec de l'acétone jusqu'au trait de jauge.
- (2) Solution standard de travail 10,0 µg/ml. Transférer 1ml de la solution « mère » CP dans une fiole volumétrique de 100 ml et diluer avec de l'acétone jusqu'au trait de jauge.
- (3) Solution standard interne CP - 400 ng/ml. Transférer 4 ml de solution standard de travail CP dans une fiole volumétrique de 100 ml et diluer avec de l'eau jusqu'au trait de jauge.

f) *Solutions standards calibrées* CE - CP - Diluer les solutions standards de travail de CE, (d) (2), et CP (e) (2), avec du dichlorométhane pour obtenir :

- (1) (100 ng CE et 400 ng CP)/ml,
- (2) (200 ng CE et 400 ng CP)/ml,
- (3) (400 ng CE et 400 ng CP)/ml,
- (4) (800 ng CE et 400 ng CP)/ml,
- (5) (1.600 ng CE et 400 ng CP)/ml.

g) *Echantillon test* - 100 ng CE/ml dans 40 % d'éthanol. Transférer 1 ml des solutions standards de travail CE, (d) (2) dans une fiole volumétrique de 100 ml et diluer avec 40 % d'éthanol jusqu'jusqu'au trait de jauge.

h) *Colonne d'extraction en phase solide* - Matériel jetable, pré-emballé avec de la terre de diatomées, capacité 50 ml.

NB. Avant analyse, vérifier chaque lot de colonnes d'extraction pour la récupération du CE et CP et l'absence de réponses pour les ions de m/z 62, 74 et 89. Préparer 100 ng CE/ml d'échantillon test (g). Analyser 5,00 ml de l'échantillon test comme décrit dans

Exemplaire certifié conforme Lisbonne, 26 juin 1998
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
GEORGES DUTRUC-ROSSET

© OIV 1998

D(a), E et F. La récupération de 90-110 ng de CE/ml est satisfaisante. Des absorbants dont le diamètre des particules est irrégulier peuvent entrainer des débits très lents qui affectent la récupération du CE et du CP. Si, après plusieurs essais, 90-110 % de la valeur de l'échantillon test n'est pas obtenue, changer la colonne ou utiliser une courbe de calibration de récupération corrigée pour quantifier le CE. Pour obtenir la courbe de calibration corrigée, préparer des solutions standards comme décrites dans (f) en utilisant 40 % d'éthanol au lieu du dichlorométhane.

Analyser 1 ml de la solution standard de calibration comme décrit en D, E et F.

Construire une nouvelle courbe d'étalonnage en utilisant le rapport CE/CP des standards extraits.

D. Préparation de l'échantillon test

Placer le matériel test dans 2 bechers séparés de 100 ml en utilisant les quantités suivantes:

a) Vins contenant plus de 14 % vol. d'alcool: 5,00 ml ▫ 0,01 ml.

b) Vins contenant au plus 14% vol. d'alcool: 20,00 ml ▫ 0,01 ml.

Dans chaque becher, ajouter 1 ml de solution CP d'étalon interne, C(e) (3) et de l'eau, afin d'obtenir un volume total de 40 ml (ou 40 g).

E. Extraction

Exécuter l'extraction sous la « hotte aspirante » avec une ventilation adéquate.

Transférer la préparation réalisée en D dans la colonne d'extraction.

Rincer le becher avec 10 ml de l'eau et transférer l'eau de rinçage dans la colonne.

Laisser le liquide s'absorber dans la colonne pendant 4 minutes - Eluer par 2 x 80 ml de dichlorométhane.

Recueillir l'éluat dans une fiole conique de 300 ml.

Evaporer l'éluat jusqu'à 2 à 3 ml à l'aide de l'évaporateur rotatif au bain marie à 30°C. (N.B. = ne pas laisser évaporer à sec).

Transférer le résidu concentré dans un tube gradué de 4 ml, à l'aide d'une pipette Pasteur.

Rincer la fiole avec 1 ml de dichlorométhane et transférer le liquide de rinçage dans le tube.

Concentrer l'échantillon à 1 ml sous un faible courant d'azote.

Transférer éventuellement le concentré dans une fiole du passeur d'échantillon pour

Exemplaire certifié conforme Lisbonne, 26 juin 1998
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
GEORGES DUTRUC-ROSSET

© OIV 1998

l'analyse CG/SM.

F. Analyse CG/SM

a) *Courbe de calibration* - injecter 1µl de chacune des solutions standards d'étalonnage C (f), en CG/SM.

Faire le graphique du rapport des aires CE-CP pour la réponse de l'ion m/z 62 sur l'axe des ordonnées et porter en abcisses la quantité de CE en ng/ml (soit 100,200, 400, 800, 1600 ng/ml).

b) CE *quantification* - injecter 1µl d'extrait concentré de E dans le système CG/SM et calculer le rapport des aires CE-CP pour l'ion m/z 62. Déterminer la concentration CE (ng/ml) dans l'extrait, en utilisant la courbe d'étalonnage standard interne. Calculer la concentration CE dans l'échantillon test (ng/ml) en divisant la quantité de CE (ng/ml) dans l'extrait par le volume de l'échantillon test (g).

c) *Vérification de la pureté du CE.*

Déterminer si les réponses pour les ions de m/z 62, 74 et 89 apparaissent au temps de retention du CE. Ces réponses sont les caractéristiques respectivement des principaux fragments $(M - C_2H_2)^+$ et $(M - CH_3)^+$ et de l'ion moléculaire (M). La présence de CE est confirmée si les proportions relatives de ces ions ne dépasse pas 20% des proportions pour le standard en CE. L'extrait peut avoir besoin d'être reconcentré pour obtenir une réponse suffisante pour l'ion de m/z 89.

G. Analyse collaborative.

Les tableaux 1 à 3 montrent les résultats individuels pour l'échantillon d'entraînement pratique et pour les deux types de vins.

L'application du test de Cochran a eu pour conséquence l'élimination d'un seul couple de résultats, tant pour le vin dont le titre alcoométrique est supérieur à 14% vol. que pour le vin dont le titre alcoométrique est inférieur ou égal à 14% vol., chacun venant d'un laboratoire différent.

La reproductibilité relative tend à décroître avec l'accroissement de la concentration en carbamate d'éthyle.

Tableau 1 : Performance de la méthode pour la détermination de carbamate d'éthyle CE dans les boissons alcooliques par CG/SM.

Exemplaire certifié conforme Lisbonne, 26 juin 1998
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
GEORGES DUTRUC-ROSSET

© OIV 1998

Echantillon	Moyenne de CE trouvé ng/g	Récupération de CE ajouté %	S_r	S_R	RSD_r%	RSD_R%
Vins de plus de 14% vol.	40		1,59	4,77	4,01	12,02
	80	89	3,32	7,00	4,14	8,74
	162	90	8,20	11,11	5,05	6,84
Vins de moins de 14% vol.	11		0,43	2,03	3,94	18,47
	25	93	1,67	2,67	6,73	10,73
	48	93	1,97	4,25	4,10	8,86

[1] * Pour certains vins particulièrement riches, il peut s'avérer souhaitable d'utiliser une colonne capillaire de 50 m de long.

[2] ** Pour certains vins particulièrement riches, il peut s'avérer souhaitable d'effectuer une programmation de température de 2°C par minute.

Exemplaire certifié conforme Lisbonne, 26 juin 1998
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
GEORGES DUTRUC-ROSSET

© OIV 1998