

RÉSOLUTION OIV/OENO 346/2009

ANALYSE DES AMINES BIOGENES DES MOUTS ET DES VINS PAR HPLC

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 « Méthodes d'analyse »,

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

Titre	Type de la méthode
Analyse des amines biogènes des moûts et des vins par HPLC	II

1. DOMAINE D'APPLICATION

Cette méthode est applicable à l'analyse des amines biogènes dans les moûts et les vins :

Ethanolamine : jusqu'à 20 mg/L ;

Histamine : jusqu'à 15 mg/L ;

Méthylamine : jusqu'à 10 mg/L ;

Sérotonine : jusqu'à 20 mg/L ;

Ethylamine : jusqu'à 20 mg/L ;

Tyramine : jusqu'à 20 mg/L ;

Isopropylamine : jusqu'à 20 mg/L ;

Propylamine : normalement absente ;

Isobutylamine : jusqu'à 15 mg/L ;

Butylamine : jusqu'à 10 mg/L ;

Tryptamine : jusqu'à 20 mg/L ;

Phenyléthylamine : jusqu'à 20 mg/L ;

Putrescine ou 1,4-diaminobutane : jusqu'à 40 mg/L ;

2-Méthylbutylamine : jusqu'à 20 mg/L ;

3-Méthylbutylamine : jusqu'à 20 mg/L ;

Cadavérine ou 1,5-diaminopentane : jusqu'à 20 mg/L ;

Hexylamine : jusqu'à 10 mg/L.

2. Définition

Les amines biogènes dosées sont :

Ethanolamine : C_2H_7NO – CAS [141 – 43 – 5]

Histamine : $C_5H_9N_3$ – CAS [51 – 45 – 6]

Méthylamine : CH_5N – CAS [74 – 89 – 5]

Sérotonine : $C_{10}H_{12}N_2O$ – CAS [153 – 98 – 0]

Ethylamine : C_2H_7N – CAS [557 – 66 – 4]

Tyramine : $C_8H_{11}NO$ – CAS [60 – 19 – 5]

Isopropylamine : C_3H_9N – CAS [75 – 31 – 0]

Propylamine : C_3H_9N – CAS [107 – 10 – 8]

Isobutylamine : $C_4H_{11}N$ – CAS [78 – 81 – 9]

Butylamine : $C_4H_{11}N$ – CAS [109 – 73 – 9]

Tryptamine : $C_{10}H_{12}N_2$ – CAS [61 – 54 – 1]

Phenyléthylamine : $C_8H_{11}N$ – CAS [64 – 04 – 0]

Putrescine ou 1,4-diaminobutane : $C_4H_{12}N_2$ – CAS [333 – 93 – 7]

2-Méthylbutylamine : $C_5H_{13}N$ – CAS [96 – 15 – 1]

3-Méthylbutylamine : $C_5H_{13}N$ – CAS [107 – 85 – 7]

Cadavérine ou 1,5-diaminopentane : $C_5H_{14}N_2$ – CAS [1476 – 39 – 7]

1,6-Diaminohexane : $C_6H_{16}N_2$ – CAS [124 – 09 – 4]

Hexylamine : $C_6H_{15}N$ – CAS [111 – 26 – 2]

3. PRINCIPE

Les amines biogènes sont directement dosées par HPLC à l'aide d'une colonne C_{18} après dérivation à l' O-phthaldialdéhyde (OPA) et détectés par fluorimétrie.

4. REACTIFS ET PRODUITS

- 4.1. Eau ultra pure de résistivité $\geq 18\text{M}\Omega\text{cm}$;
- 4.2. Di-sodium hydrogénophosphate dihydrate - pureté $\geq 99\%$;
- 4.3. Acétonitrile - Minimum de transmission à 200 nm - pureté $\geq 99\%$;
- 4.4. O-phthaldialdéhyde (OPA) - Application pour fluorescence - pureté $\geq 99\%$;
- 4.5. Di-sodium tétraborate décahydrate - pureté $\geq 99\%$;
- 4.6. Méthanol - pureté $\geq 99\%$;
- 4.7. Acide chlorhydrique 32 % ;
- 4.8. Hydroxyde de sodium en pastilles - pureté $\geq 99\%$;
- 4.9. Ethanolamine - Pureté $\geq 99\%$;
- 4.10. Histamine dichlorhydrate - Pureté $\geq 99\%$;
- 4.11. Ethylamine chlorhydrate - Pureté $\geq 99\%$;
- 4.12. Sérotonine - Pureté $\geq 99\%$;
- 4.13. Méthylamine chlorhydrate - Pureté $\geq 98\%$;
- 4.14. Tyramine chlorhydrate - Pureté $\geq 99\%$;
- 4.15. Isopropylamine pureté $\geq 99\%$;
- 4.16. Butylamine - Pureté $\geq 99\%$;
- 4.17. Tryptamine chlorhydrate - pureté $\geq 98\%$;
- 4.18. Phényléthylamine - Pureté $\geq 99\%$;
- 4.19. Putrescine dichlorhydrate - Pureté $\geq 99\%$;
- 4.20. 2-Méthylbutylamine - Pureté $\geq 98\%$;
- 4.21. 3-Méthylbutylamine - Pureté $\geq 98\%$;
- 4.22. Cadavérine dichlorhydrate - Pureté $\geq 99\%$;
- 4.23. 1-6-Diaminohexane - Pureté $\geq 97\%$;
- 4.24. Héxylamine - Pureté $\geq 99\%$;
- 4.25. Azote (impuretés maximales : $\text{H}_2\text{O} \leq 3\text{ mg/L}$; $\text{O}_2 \leq 2\text{ mg/L}$; $\text{C}_n\text{H}_m \leq 0.5\text{ mg/L}$) ;
- 4.26. Hélium (impuretés maximales : $\text{H}_2\text{O} \leq 3\text{ mg/L}$; $\text{O}_2 \leq 2\text{ mg/L}$; $\text{C}_n\text{H}_m \leq 0.5\text{ mg/L}$) .

Préparation des solutions réactives :

4.27. Préparation des éluants

Solution A phosphate : sur une balance (5.27), dans un bécher de 50 mL (5.5), peser 11,12 g $\pm$ 0,01 g de phosphate disodique (4.2). Transvaser dans une fiole jaugée de 2 litres (5.9), ajuster à 2 litres avec de l'eau déminéralisée (4.1). Homogénéiser à l'aide

d'un agitateur magnétique (5.30), filtrer sur membrane 0,45 µm (5.17). Mettre dans la bouteille de 2 litres (5.12)

Solution B : l'acétonitrile (4.3) est directement utilisé.

4.28. Solution d'OPA - Préparation journalière

Peser dans une fiole de 50 mL (5.7) sur la balance de précision (5.27), 20 mg $\pm$ 0,1 mg d'OPA (4.4). Ajuster à 50 mL avec du méthanol (4.6). Homogénéiser.

4.29. Préparation du tampon borate (4.29) - Préparation hebdomadaire

Peser 3,81 g $\pm$ 0,01 g de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (4.5) dans un bécher de 25 mL (5.6), sur la balance de précision (5.27). Transvaser dans une fiole jaugée de 100 mL (5.8), ajuster à 100 mL avec de l'eau déminéralisée (4.1). Homogénéiser à l'aide d'un agitateur magnétique (5.30), transvaser dans un bécher de 150 mL (5.4), ajuster à pH 10,5 à l'aide du pHmètre (5.28 et 5.29) avec de la soude 10N (4.8).

4.30. Solution d'acide chlorhydrique à 0,1M : dans une fiole jaugée de 2 L (5.9), mettre un peu d'eau déminéralisée (4.1). Ajouter 20 mL d'acide chlorhydrique (4.7) à l'aide d'une pipette automatique de 10 mL (5.24 et 5.25)

4.31. Solution de calibration dans l'acide chlorhydrique 0.1 N

Concentration indicative de la solution de calibration, peser à $\pm$ 0.1 mg

			concentration indicative finale dans le mélange étalon en mg/L
Ethanolamine			5
Histamine			5
Méthylamine			1
Sérotonine			20
Ethylamine			2
Tyramine			7
Isopropylamine			4

Propylamine			2.5
Isobutylamine			5
Butylamine			5
Tryptamine			10
Phényléthylamine			2
Putrescine			12
2-Méthylbutylamine			5
3-Méthylbutylamine			6
Cadavérine			13
1,6-Diaminohexane			8
Hexylamine			5

La concentration réelle de la solution de calibration est consignée avec le numéro de lot des produits utilisés.

Certains amines biogènes sont sous forme de sel, il faut tenir compte du poids du sel pour déterminer le poids réel de l'amine biogène.

La solution mère est faite dans une fiole jaugée de 100 mL (5.8).

La solution fille est faite dans une fiole jaugée de 250 mL (5.10).

4.32. Standard interne 1,6 Diaminohexane

Peser exactement 119 mg dans un erlenmeyer de 25 mL (5.1) sur une balance (5.27). Transvaser dans une fiole jaugée de 100 mL (5.8). Ajuster au trait de jauge avec l'acide chlorhydrique 0.1 N (4.30) ;

4.33. 2-Mercaptoéthanol - Pureté $\geq$ 99 %.

5. APPAREILLAGE

5.1. Erlenmeyers de 25 mL ;

5.2. Erlenmeyers de 250 mL ;

- 5.3. Béchers de 100 mL ;
- 5.4. Béchers de 150 mL ;
- 5.5. Bécher de 50 mL ;
- 5.6. Bécher de 25 mL;
- 5.7. Fioles jaugées de 50 mL;
- 5.8. Fioles jaugées de 100 mL;
- 5.9. Fioles jaugées de 2 000 mL;
- 5.10. Fiole jaugée de 250 mL;
- 5.11 . Bouteilles de 1 litre;
- 5.12. Bouteille de 2 litres;
- 5.13. Flacons de 2 mL à vis adaptés au passeur d'échantillons;
- 5.14. Seringue de 50 mL;
- 5.15. Aiguille;
- 5.16. Porte filtre;
- 5.17. Membrane de 0,45 µm en cellulose;
- 5.18. Membrane de 0,8 µm en cellulose;
- 5.19. Membrane de 1,2 µm en cellulose;
- 5.20. Membrane de 5 µm en cellulose;
- 5.21. Préfiltre en cellulose;
- 5.22. Pipette automatique de 1 mL;
- 5.23. Pipette automatique de 5 mL;
- 5.24. Pipette automatique de 10 mL
- 5.25. Cônes pour pipette automatique de 10 mL, 5 mL et 1 mL;
- 5.26. Système de filtration;
- 5.27. Balances pour des pesées de 0 à 205 g à $\pm 0,01$ mg;
- 5.28. pHmètre;
- 5.29. Electrode;
- 5.30. Agitateur magnétique
- 5.31. Pompe HPLC;
- 5.32. Passeur-préparateur équipé d'un four

Note : le four est indispensable, si un passeur-préparateur est utilisé pour injecter plusieurs échantillons à la suite, cette opération peut aussi se faire manuellement mais les résultats risquent d'être moins précis ;

5.33. Boucle d'injection;

5.34. Colonne C₁₈ de 5 µm, 250 mm × 4 (qui doit conduire à un chromatogramme proche de celui présenté en annexe B);

5.35. Détecteur fluorimétrique;

5.36. Intégrateur;

5.37. Tube en verre borosilicaté de 15 mL avec bouchon et obturateur recouvert de PTFE.

6. PREPARATION DES ECHANTILLONS

Les échantillons sont préalablement dégazés à l'azote (4.25).

6.1. Filtration

Filtrer environ 120 mL d'échantillon sur membrane:

- Pour un vin : 0.45µm (5.17),
- Pour un moût ou un vin non clarifié, empiler les filtres dans l'ordre suivant, l'échantillon étant poussé par le dessus : 0,45µm (5.17) + 0,8 µm (5.18) + 1,2 µm (5.19) + 5 µm (5.20) + préfiltre (5.21) +.

6.2. Préparation de l'échantillon

Mettre 100 mL d'échantillon (6.1) dans une fiole de 100 mL (5.8) ;

Ajouter 0.5 mL de 1-6-diaminohexane (4.32) à 119 mg/100 mL à l'aide d'une pipette automatique de 1 mL (5.21 et 25) ;

Prélever 5 mL d'échantillon à l'aide de la pipette (5.23 et 5.25) ; les verser dans un erlenmeyer de 25 mL (5.1) ;

Y ajouter 5 mL de méthanol (4.6) à l'aide de la pipette (5.23 et 5.25) ;

Homogénéiser par agitation ;

Transférer dans des flacons (5.13) ;

Lancer la pompe HPLC (5.31) puis l'injection 1 µL (5.32 et 5.33).

6.3. Dérivatisation

Dans un tube en verre borosilicaté (5.37), verser 2 mL de solution d'OPA (4.28), 2 mL de tampon borate (4.29), 0,6 mL de 2-mercaptoéthanol (4.33). Boucher, agiter (5.30). Ouvrir et verser 0,4 mL d'échantillon. Boucher, agiter (5.30). **Injecter immédiatement,**

le dérivé n'étant pas stable. Rincer immédiatement la vaisselle après injection, à cause de l'odeur.

Note : la dérivatisation peut être réalisée par un préparateur/injecteur automatique. Dans ce cas, il sera programmé pour s'approcher des proportions de la dérivatisation manuelle.

6.4. Nettoyage courant

Seringue (5.13) et aiguille (5.14) rincées à l'eau déminéralisée (4.1) après chaque échantillon ;

Porte-filtre (5.16) rincé à l'eau chaude, puis MeOH (4.6). Laisser sécher à l'air.

7. MODE OPERATOIRE

Phase mobile (5.31)

- A : tampon phosphate (4.2) ;
- B : acétonitrile (4.3).

Gradient d'élution :

temps (en min)	% A	% B
0	80	20
15	70	30
23	60	40
42	50	50
55	35	65
60	35	65
70	80	20

95	80	20
----	----	----

Note : le gradient peut être ajusté pour obtenir un chromatogramme proche de celui présenté en annexe B

Débit : 1 mL/min ;

Température de colonne 35°C (5.32) ;

Détecteur (5.35) : Exc = 356 nm, Em = 445 nm (5.30);

Etalonnage interne

La solution de calibration est injectée à chaque série ;

Calibration par standard interne ;

Calcul des facteurs de réponse :

- $RF = C_{cis} \square \text{surface } i / \text{surface } is \square C_{ci}$

C_{ci} = concentration du composant dans la solution de calibration et

C_{cis} = concentration du standard interne dans la solution de calibration (1-6-diaminohexane).

Surface i = surface du pic du produit présent dans l'échantillon

Surface is = surface du pic du standard interne dans l'échantillon

Calcul des concentrations :

- $C_{ci} = (XF \square \text{surface } i) / (\text{surface } is \square RF)$

Surface i = surface du pic du produit présent dans l'échantillon

Surface is = surface du pic du standard interne dans l'échantillon

XF = quantité d'étalon interne ajoutée aux échantillons à analyser

- $XF = 119 \square 0.5/100 = 5.95.$

8. EXPRESSION DES RESULTATS

Les résultats sont exprimés en mg/L avec un chiffre significatif après la virgule.

9. FIDÉLITE

	r (mg/L)	R (mg/L)
Histamine	$0.07x + 0.23$	$0.50x + 0.36$
Méthylamine	$0.11x + 0.09$	$0.40x + 0.25$
Ethylamine	$0.34x - 0.08$	$0.33x + 0.18$
Tyramine	$0.06x + 0.15$	$0.54x + 0.13$
Phényléthylamine	$0.06x + 0.09$	$0.34x + 0.03$
Diaminobutane	$0.03x + 0.71$	$0.31x + 0.23$
2-méthylbutylamine et 3-méthylbutylamine	$0.38x + 0.03$	$0.38x + 0.03$
Diaminopentane	$0.14x + 0.09$	$0.36x + 0.12$

Les détails de l'essai interlaboratoires portant sur la fidélité de la méthode sont résumés dans l'annexe A.

10. AUTRES CARACTERISTIQUES DE L'ANALYSE

Influence de certains composants du vin : les acides aminés sortent au début de l'analyse et ne gênent pas la détection des amines biogènes.

Limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) selon une étude intralaboratoire :

	LOD (en mg/L)	LOQ (en mg/L)
Histamine	0,01	0,03
Méthylamine	0,01	0,02

Ethylamine	0,01	0,03
Tyramine	0,01	0,04
Phényléthylamine	0,02	0,06
Diaminobutane	0,02	0,06
2-méthylbutylamine	0,01	0,03
3-méthylbutylamine	0,03	0,10
Diaminopentane	0,01	0,03

11. CONTROLE QUALITE

Des contrôles qualité peuvent être réalisés avec des matériaux de référence certifiés, des vins dont les caractéristiques sont issues d'un consensus ou de vins surchargés insérés régulièrement dans les séries analytiques et en suivant les cartes de contrôle afférentes.

Annexe A

Données statistiques obtenues à partir des résultats des essais interlaboratoire

Les paramètres suivants ont été définis au cours d'un essai interlaboratoire. Cet essai a été conduit par l'Institut d'Œnologie de Bordeaux (France) sous la supervision de l'Office National Interprofessionnel des Vins (ONIVINS – France).

Année de l'essai interlaboratoire : 1994

Nombre de laboratoires : 7

Nombre d'échantillons : 9 en double aveugle

(Bulletin de l'O.I.V. novembre-décembre 1994, 765-766, p.916 à 962) valeurs recalculées conformément à l'ISO 5725-2:1994.

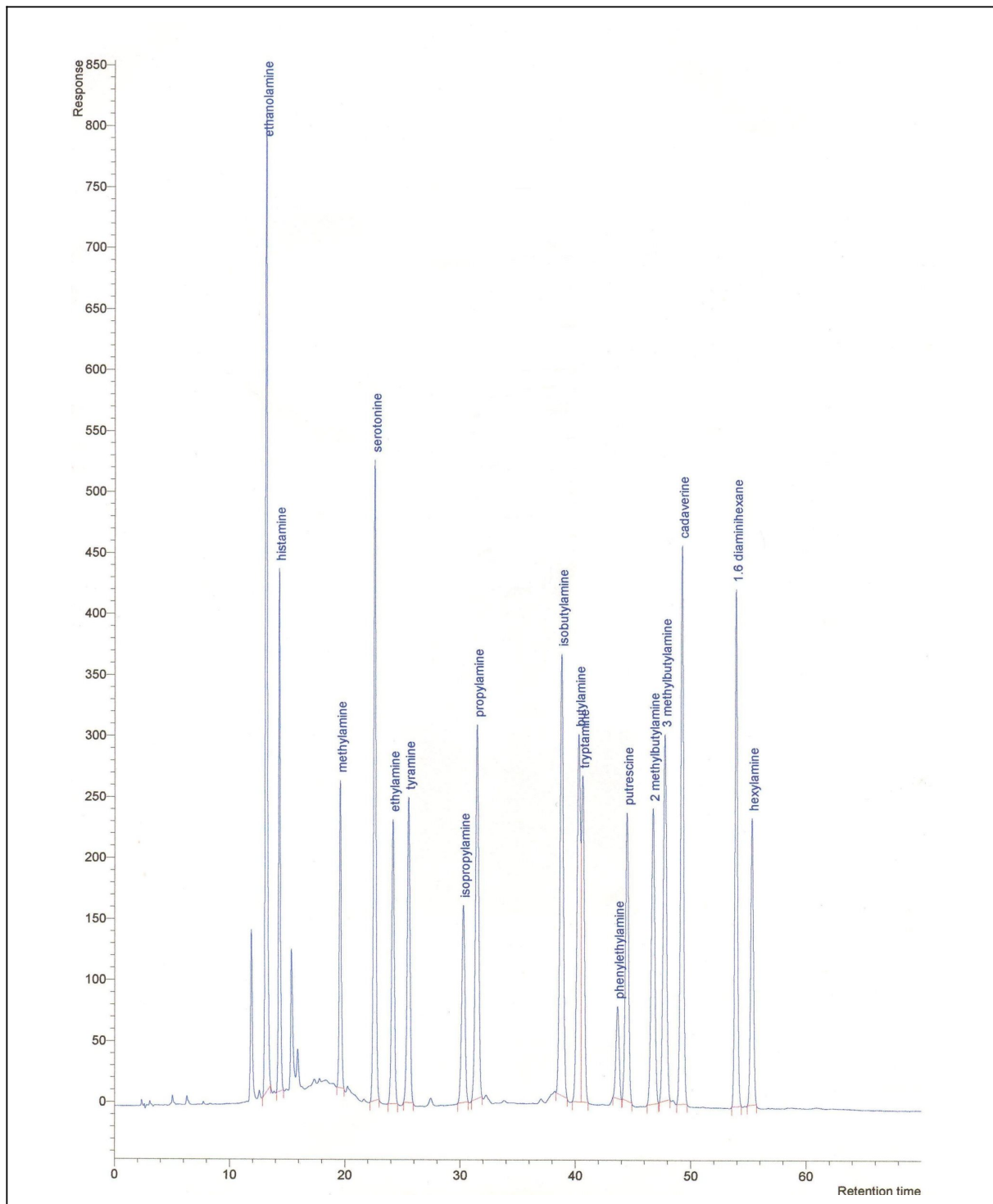
Types d'échantillons : vin blanc (BT), vin blanc (BT) surchargé = B1, vin blanc (BT) surchargé = B2, vin rouge n°1 (RT), vin rouge surchargé = R1, vin rouge (RT) surchargé =

R2, vin rouge n°2 (CT), vin rouge (CT) surchargé = C1 et vin rouge (CT) surchargé = C2.
Surcharges en mg/L.

	HistN	MétN	EthN	TyrN	PhEtN	DiNbut	IsoamN	DiNpen
vin B1	vin BT + 0,5	vine BT + 0,12	vinBT + 0,13	vin BT + 0,36	vine BT + 0,15	vin BT + 0,5	vine BT + 0,28	vinBT + 0,25
vin B2	vin BT + 2	vin BT + 0,40	vin BT + 0,50	vin BT + 1,44	vin BT + 0,60	vin BT + 2	vin BT + 0,174	vin BT + 1,04
vin C1	vin CT + 2	vin CT + 0,1	vin CT + 0,18	vin CT + 0,72	vin CT + 0,15	vin CT + 2	vin CT + 0,29	vin CT + 0,26
vinC2	vin CT + 4	vin CT + 0,41	vin CT + 0,50	vin CT + 2,90	vin CT + 0,58	vin CT + 8	vin CT + 1,14	vin CT + 1,04
vin R1	vin RT + 2	vin RT + 0,14	vin RT + 0,13	vin RT + 1,45	vin RT + 0,19	vin RT + 3	vin RT + 0,0,57	vin RT + 0,51
vin R2	vin RT + 5	vin RT + 0,41	vin RT + 0,50	vin RT + 2,88	vin RT + 0,59	vin RT + 10	vin RT + 2,28	vin RT + 2,08

HistN : histamine, MetN : méthylamine, EthN : éthylamine, TyrN : tyramine,
PhEtN : phényléthylamine, DiNbut : diaminobutane, IsoamN : isoamylamine et
DiNpen : diaminopentane.

Annex B Temps de rétention



Modèle de chromatogramme obtenu avec cette méthode

BIBLIOGRAPHIE

1. TRICARD C., CAZABEIL J.-M., SALAGOÏTI M.H. (1991) : dosage des amines biogènes dans les vins par HPLC, *Analisis*, 19, M53-M55.
2. PEREIRA MONTEIRO M.-J. et BERTRAND A. (1994) : validation d'une méthode de dosage – Application à l'analyse des amines biogènes du vin. *Bull. O.I.V.*, (765-766), 916-962.