

RÉSOLUTION OIV/OENO 374/2009

RECHERCHE ET DOSAGE DES POLYCHLOROPHENOLS ET DES POLYCHLOROANISOLE, DANS LES VINS, LES BOUCHONS, LES BOIS ET LES BENTONITES UTILISEES COMME PIEGES D'ATMOSPHERE – REVISION DE LA RESOLUTION OENO 8/2006

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

CONSIDERANT la résolution oeno 8/2006 relatif à la recherche et au dosage des polychlorophénols et des polychloroanisoles, dans les vins, les bouchons, les bois et les pièges d'atmosphère,

CONSIDERANT les travaux de la Sous-Commission des méthodes d'analyse et la nécessité de réviser ladite résolution

DECIDE, sur proposition de la Commission Œnologie de modifier la méthode d'analyse AS315-13-PCAPCP figurant actuellement dans le recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts de l'OIV par la méthode de type IV suivante:

Titre	Type de Méthode
RECHERCHE ET DOSAGE DES POLYCHLOROPHENOLS ET DES POLYCHLOROANISOLE, DANS LES VINS, LES BOUCHONS, LES BOIS ET LES BENTONITES UTILISEES COMME PIEGES D'ATMOSPHERE	IV

1. DOMAINE D'APPLICATION

Tous les vins, les bouchons en liège, bentonites (pièges d'atmosphère) et bois.

2. PRINCIPE

Dosage du 2,4,6-trichloroanisole, du 2,4,6-trichlorophénol, du 2,3,4,6-tétrachloroanisole, du 2,3,4,6-tétrachlorophénol, du pentachloroanisole et du

pentachlorophénol en chromatographie en phase gazeuse par injection d'un extrait à l'hexane du vin et à l'éther/hexane des échantillons solides à analyser et étalonnage interne.

3. REACTIFS

Note préalable : tous les réactifs et solvants doivent être exempts des composés à doser listés en 2 au seuil de détection.

3.1. Hexane de pureté $\geq 99 \%$

3.2. Ether éthylique de pureté $\geq 99 \%$

3.3. Mélange éther/hexane (50/50 ; v/v)

3.4. Étalon interne : 2,5-Dibromophénol, de pureté $\geq 99 \%$

3.5. Ethanol absolu

3.6. Eau désionisée pure, exempte de TCA, type II selon la Norme ISO EN 3696.

3.7. Solution hydroalcoolique à 50 % vol. placer 100 ml d'éthanol absolu (3.5) dans une fiole jaugée de 200 ml (4.9.9) et compléter à 200 ml avec de l'eau désionisée (3.6), homogénéiser.

3.8. Etalon interne :

3.8.1. Solution mère à 200 mg/L. Placer 20 mg de étalon interne (3.4) dans une fiole jaugée de 100 ml (4.9.8) compléter avec la solution hydroalcoolique à 50 % vol. (3.7) et homogénéiser.

3.8.2. Solution d'étalon interne (2 mg/L). Placer 1 ml de la solution mère d'étalon interne (3.8.1) dans une fiole jaugée de 100 ml (4.9.8), compléter avec la solution hydroalcoolique à 50 % vol. (3.7) et homogénéiser.

3.8.3. Solution d'étalon interne (20 µg/L). Placer 1 ml de la solution mère d'étalon interne (3.8.2) dans une fiole jaugée de 100 ml (4.9.8), compléter avec la solution hydroalcoolique à 50 % vol. (3.7) et homogénéiser.

3.9. Produits purs

3.9.1. 2,4,6-trichloroanisole : $\geq 99 \%$, cas : 87-40-1

3.9.2. 2,4,6-trichlorophénol : $\geq 99 \%$, cas : 88-06-2

3.9.3. 2,3,5,6-tétrachloroanisole : $\geq 99 \%$, cas : 6936-40-9 (remarque : le produit recherché dans les échantillons est le 2,3,4,6-tétrachloroanisole mais il n'existe pas dans le commerce)

3.9.4. 2,3,4,6-tétrachlorophénol : $\geq 99 \%$, cas : 58-90-2

3.9.5. pentachloroanisole : $\geq 99 \%$, cas : 1825-21-1

3.9.6. pentachlorophénol : ≥ 99 %, cas : 87-86-5

3.10. Réactifs pour la derivatisation - Pyridine:anhydride acétique (1:0,4) vol.

3.10.1. Pyridine: ≥ 99 %

3.10.2. Anhydride acétique: ≥ 98 %

3.11. Solution mère de calibrage à 200 mg/l

Dans une fiole jaugée de 100 ml (4.9.8), placer 20 mg environ des produits purs (3.9.1 à 3.9.6) de poids exactement connu (4.7), compléter avec de l'éthanol absolu (3.5). Homogénéiser.

3.12. Solution intermédiaire de calibrage à 200 $\mu\text{g/l}$

Dans une fiole jaugée de 100 ml (4.9.8) remplie d'éthanol absolu (3.5), ajouter 100 μl de la solution mère de calibrage à 200 mg/l (3.11) à l'aide de la micro-seringue de 100 μl (4.9.1) et homogénéiser.

3.13. Solution fille de calibrage à 4 $\mu\text{g/l}$

Dans une fiole jaugée de 50 ml (4.9.7) contenant de solution hydroalcoolique à 50 % vol. (3.7) ajouter 1 ml de la solution intermédiaire de calibrage à 200 $\mu\text{g/l}$ (3.12) à l'aide d'une pipette de 1 ml (4.9.6). Compléter à 50 ml avec la solution hydroalcoolique à 50 % vol. (3.7) et homogénéiser.

3.14. Solutions de calibrage. Il est possible de préparer diverses solutions de calibrage à diverses concentrations en rajoutant, à l'aide de la micro-seringue de 100 μl (4.9.1), par exemple 50 μl de la solution fille de calibrage à 4 $\mu\text{g/l}$ (3.13) dans 50 ml de solution hydroalcoolique à 50 % vol. (3.7) pour obtenir un enrichissement de celui ci de 4 ng/l en substances à doser.

Le même raisonnement peut permettre de préparer des solutions de calibrage de diverses concentrations soit dans des solutions hydroalcooliques ou du vin ou encore d'enrichir un milieu d'extraction avec une quantité parfaitement connue de produits purs.

3.15. Bentonite du commerce.

4. MATERIEL

4.1. Chromatographe en phase gazeuse avec injecteur split-splitless couplé à un détecteur à capture d'électrons. (Il est également possible d'utiliser un spectromètre de masse)

4.2. Colonne capillaire de phase stationnaire apolaire, type phénylmethylpolysiloxane (0,32 mm x 50 m, épaisseur de film 0,12 μm), ou équivalent.

4.3. Conditions chromatographiques, à titre d'exemple:

4.3.1. Injection en mode "split-splitless" (temps de fermeture des vannes 30 secondes)

4.3.2. Débit gaz vecteur : 30 ml/min dont 1 ml dans la colonne – Hydrogène, de pureté chromatographique ($\geq 99,9990\%$). Il est également possible d'utiliser de l'hélium ou de l'azote.

4.3.3. Débit gaz auxiliaire : 60 ml/min – Azote, de pureté chromatographique ($\geq 99,9990\%$). Il est également possible d'utiliser argon-méthane.

4.3.4. Gradient de température du four, donné à titre d'exemple:

- De 40 °C à 160 °C à raison de 2 °C/min
- De 160 °C à 200 °C à raison de 5 °C/min
- Palier à 220 °C pendant 10 min

4.3.5. Température injecteur : 250 °C

4.3.6. Température détecteur : 250 °C

4.4. Acquisition et intégration : l'acquisition se fait sur un ordinateur. Les pics des différents composés identifiés par comparaison avec la référence, sont ensuite intégrés.

4.5. Agitateur.

4.6. Vortex avec adaptation pour flacon de 30 ml (4.9.3)

4.7. Balance de précision à 0,1 mg

4.8. Râpe de ménage pour rémoulade manuelle ou électrique

4.9. Matériel de laboratoire :

4.9.1. Micro Seringue de 100 μ l

4.9.2. Micro Seringue de 10 μ l

4.9.3. Flacon de 30 ml fermant avec un bouchon à vis et opercule à face téflonée

4.9.4. Pipette de 10 ml graduée au 1/10 de ml

4.9.5. Pipette de 5 ml graduée au 1/10 de ml

4.9.6. Pipette de précision de 1 ml

4.9.7. Fiole jaugée de 50 ml

4.9.8. Fiole jaugée de 100 ml

4.9.9. Fiole jaugée de 200 ml

4.9.10. Ampoule à décanter de 100 ml

4.9.11. Pipettes Pasteur et poire propipette adaptée

4.9.12. Feuille d'aluminium de ménage en rouleau.

4.9.13. Centrifugeuse

5. PREPARATION DE L'ECHANTILLON

5.1. Le bouchon est râpé (4.8) ou coupé en morceaux (dimension < 3 mm)

5.2. Le bois est débité avec une tenaille pour obtenir des morceaux (dimension < 3 mm)

5.3. La bentonite (3.15) (30 g par exemple) est étalée sur une feuille d'aluminium (4.9.12) d'environ 30 cm x 20 cm et exposée dans l'atmosphère à analyser pendant, au minimum, 5 jours.

6. MODE OPERATOIRE

6.1. Processus d'extraction pour les échantillons solides :

6.1.1. Bouchon : dans un flacon de 30 ml (4.9.3), placer 1 g environ de bouchon râpé (5.1) de poids exactement connu (4.7)

6.1.2. Bois : dans un flacon de 30 ml (4.9.3), placer 2 g environ de morceaux de bois (5.2) de poids exactement connu (4.7)

6.1.3. Bentonite contrôle : dans un flacon de 30 ml (4.9.3), placer 5 g environ de bentonite (3.15) de poids exactement connu (4.7)

6.1.4. Bentonite échantillon : dans un flacon de 30 ml (4.9.3), placer 5 g environ de bentonite (5.3) de poids exactement connu (4.7)

6.1.5. Ajouter 10 ml (4.9.4) de mélange éther/hexane (3.3)

6.1.6. Ajouter à la micro-seringue (4.9.1) 50 µl de la solution d'étalon interne (3.8.3)

6.1.7. Agiter au vortex (4.6) pendant 3 min

6.1.8. Récupérer la phase liquide d'éther/hexane dans un flacon de 30 ml (4.9.3)

6.1.9. Recommencer l'opération d'extraction sur l'échantillon, avec 2 fois 5 ml de mélange éther/hexane (3.3)

6.1.10. Extrait final : mélanger les 3 phases d'éther/hexane.

6.2. Extraction du vin et des solutions de calibrage.

6.2.1. Prélever 50 ml de vin ou de solution de calibrage (3.14) à l'aide de la fiole jaugée (4.9.7)

6.2.2. Les placer dans la fiole jaugée de 100 ml (4.9.8)

6.2.3. Ajouter à la microseringue (4.9.1) 50 µl d'étalon interne (3.8.3)

- 6.2.4. Ajouter 4 ml (4.9.5) d'hexane (3.1)
- 6.2.5. Effectuer l'extraction à l'aide de l'agitateur magnétique (4.5) durant 5 min.
- 6.2.6. Décanter en ampoule (4.9.10)
- 6.2.7. Récupérer la phase organique avec l'émulsion dans un flacon de 30 ml (4.9.3) et la phase aqueuse dans la fiole jaugée de 100 ml (4.9.8)
- 6.2.8. Recommencer l'extraction du vin ou de solution de calibrage par 2 ml d'hexane (3.1)
- 6.2.9. Effectuer l'extraction à l'aide de l'agitateur magnétique (4.5) durant 5 min.
- 6.2.10. Décanter en ampoule (4.9.10)
- 6.2.11. Récupérer la phase organique avec l'émulsion dans le même flacon de 30 ml mentionné à 6.2.7 (contenant la phase organique obtenue au terme de la première extraction).
- 6.2.12. Casser l'émulsion de la phase organique par centrifugation (4.9.13), en éliminant la phase aqueuse inférieure à l'aide d'une pipette Pasteur (4.9.11) munie d'une poire propipette.
- 6.2.13. Extrait final du vin et des solutions de calibrage : il s'agit de l'extrait organique résiduel.
- 6.3. Analyse
- 6.3.1. Ajouter au extrait final (6.1.11 ou 6.2.13) 100 µl (4.9.1) de mélange réactif piridine:anhydride acétique (3.10) pour la dérivation.
- 6.3.2. Agiter à l'aide de l'agitateur magnétique (4.5) durant 10 min.
- 6.3.3. Injecter 2 µl de l'extrait final dérivatisé (6.3.2) dans le chromatographe.

7. CALCUL :

$$\text{concentration du produit} = \frac{\text{Aire du pic du produit}}{\text{Aire du pic de l'étalon interne}} \times \text{Coefficient de réponse}$$

Coefficient de réponse = concentration dans la solution de calibrage (3.14) * (Aire du pic de l'étalon interne / Aire du pic du produit pur dans la solution de calibrage).

Vérification de l'étalonnage, en assurant des coefficients de réponse +/- 10 %.

8. RESULTATS

Les résultats sont exprimés en ng/l pour le vin et en ng/g pour les bouchons en liège, les bentonites et les bois.

9. CARACTERISTIQUES DE LA METHODE

9.1. Taux de recouvrement,

Le taux de recouvrement calculé par rapport à des quantités rajoutées dans des bois, de

polychloroanisoles et de polychlorophénols de 115 ng/g est de :

- 2,4,6-trichloroanisole : 96 %
- 2,4,6-trichlorophénol : 96 %
- 2,3,4,6-tétrachloroanisole : 96 %
- 2,3,4,6-tétrachlorophénol : 97 %
- pentachloroanisole : 96 %
- pentachlorophénol : 97 %

9.2. Répétabilité des mesures,

Calculées pour chaque produit, les valeurs de répétabilité sont les suivantes :

Dans un bouchon ng/g	Moyenne	Ecart type	répétabilité
2,4,6-trichloroanisole	1,2	0,1	0,3
2,4,6-trichlorophénol	26	3,3	9,2
2,3,4,6-tétrachloroanisole	1,8	0,4	1,2
2,3,4,6-tétrachlorophénol	2,6	0,3	0,9
pentachloroanisole	23,3	2,9	8,1

pentachlorophénol	7,4	1,9	5,4
-------------------	-----	-----	-----

Dans un bois à 23 ng/g	Ecart type	répétabilité
2,4,6-trichloroanisole	1,9	5,3
2,4,6-trichlorophénol	1,9	5,3
2,3,4,6-tétrachloroanisole	2,6	7,4
2,3,4,6-tétrachlorophénol	3,3	9,3
pentachloroanisole	2,7	7,5
pentachlorophénol	3,6	10,1

Dans un vin à 10 ng/l	Ecart type	répétabilité
2,4,6-trichloroanisole	0,4	1,1
2,4,6-trichlorophénol	2,1	5,9
2,3,4,6-tétrachloroanisole	0,6	1,7
2,3,4,6-tétrachlorophénol	4	11,2
pentachloroanisole	1,2	3,4
pentachlorophénol	6,5	18,2

Dans une bentonite à 15 ng/g	Ecart type	répétabilité
2,4,6-trichloroanisole	0,9	2,5
2,4,6-trichlorophénol	4	11,2

2,3,4,6-tétrachloroanisole	1,2	3,4
2,3,4,6-tétrachlorophénol	5,2	14,6
pentachloroanisole	4,3	12,0
pentachlorophénol	12,1	33,9

9.3. Limites de détection (L.D) et de quantification (L.Q) calculées selon la méthode OIV :

9.3.1. Bois

	L.D en ng/g	L.Q en ng/g
2,4,6-trichloroanisole	0,7	2,4
2,4,6-trichlorophénol	0,6	2,0
2,3,4,6-tétrachloroanisole	0,6	2,0
2,3,4,6-tétrachlorophénol	1,1	3,7
pentachloroanisole	0,4	1,4
pentachlorophénol	0,9	3,1

9.3.2. Bentonite

	L.D en ng/g	L.Q en ng/g
2,4,6-trichloroanisole	0,5	1

2,4,6-trichlorophénol	1	3
2,3,4,6-tétrachloroanisole	0,5	1
2,3,4,6-tétrachlorophénol	1	3
pentachloroanisole	0,5	1
pentachlorophénol	Non det.	Non det.

9.3.3. Bouchon

	L.D en ng/g	L.Q en ng/g
2,4,6-trichloroanisole	0,5	1,5
2,4,6-trichlorophénol	1	2
2,3,4,6-tétrachloroanisole	0,5	1,5
2,3,4,6-tétrachlorophénol	1	2
pentachloroanisole	0,5	1,5
pentachlorophénol	1	2

9.3.4. Vin

	L.D en ng/l	L.Q en ng/l
2,4,6-trichloroanisole	0,3	1
2,4,6-trichlorophénol	1	3

2,3,4,6-tétrachloroanisole	0,3	1
2,3,4,6-tétrachlorophénol	0,3	1
pentachloroanisole	0,5	3
pentachlorophénol	1	3

®² Air liquide