

Méthode automatisée de dosage colorimétrique du dioxyde de soufre total dans les vins

Marc DUBERNET* et Françoise GRASSET*

Laboratoire DUBERNET - 9, quai d'Alsace - 11100 Narbonne – France

1. Objet

Méthode de dosage du dioxyde de soufre total dans les vins utilisant un réactif organique spécifique des sulfites en milieu tamponné. Le protocole présenté est applicable aux analyseurs automatiques séquentiels pour des concentrations de dioxyde de soufre total de 0 à 500 mg/l.

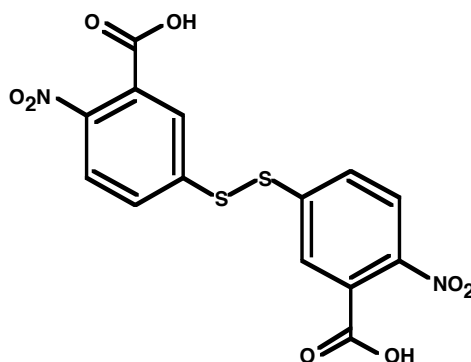
2. Préambule

Le dosage du dioxyde de soufre total qui est, en œnologie, réglementairement, commercialement et technologiquement fondamental, reste problématique pour beaucoup de laboratoires. La méthode de référence décrite dans le *Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts* de l'OIV est précise et sûre mais fait intervenir une manipulation lourde et longue qui en limite l'utilisation pour les grandes séries. Les méthodes automatisées en flux continu, beaucoup plus rapides, manquent un peu de fiabilité et présentent une sensibilité insuffisante pour les faibles valeurs (inférieures à 30 mg/l).

La méthode présentée met en oeuvre un process simple et spécifique qui permet une automatisation rationnelle et couvre une gamme de mesure allant, pour les applications courantes, de 0 à 500 mg/l. La sensibilité est excellente y compris pour les valeurs faibles et les valeurs obtenues sont directement raccordables à celles données par la méthode de référence OIV.

3. Principe de la méthode

L'échantillon à doser est dilué dans une solution tampon phosphate de pH 8. Après stabilisation, le milieu de réaction reçoit une solution tamponnée de DTNB (5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (3,3'-6) ou 3-Carboxy-4-nitrophenyl disulfide, connu sous le vocable « Réactif d'Ellman ». Il s'agit d'un réactif spécifique permettant la modification et la détection quantitative des liaisons disulfites dont la formule développée est donnée ci-dessous :



La réaction développe une coloration jaune mesurable à une longueur d'onde de 405 nm.

4. Protocole de mesure

4.1 Matériel

Tout matériel d'analyse séquentiel permettant l'utilisation de deux réactifs et autorisant une mesure à 405 nm peut être utilisé.

4.2 Réactifs

Deux réactifs sont mis en oeuvre :

- Réactif 1

K_2HPO_4 17,4 g
Eau bidistillée q.s.p. 1000 ml

Le pH de la solution tampon ainsi préparée est ajusté par addition de H_3PO_4 pur pour obtenir une valeur de 8 (écart maximum tolérable : $\pm 0,2$ unité pH).

- Réactif 2

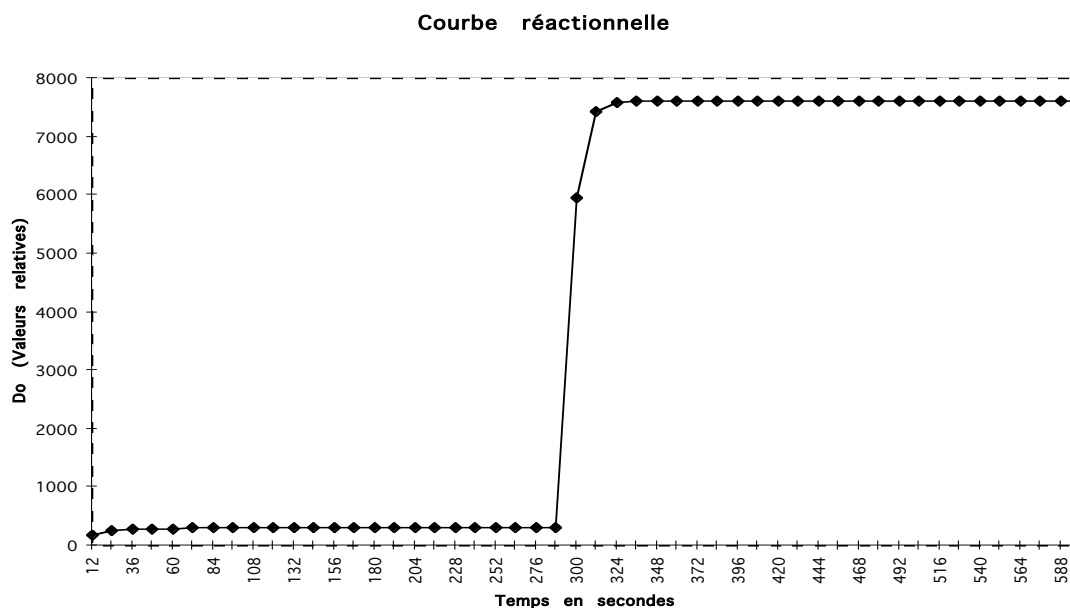
DNTB 760 mg
Réactif 1 900 ml
Ethanol pur 100 ml

4.3 Mise en oeuvre

Le tableau suivant résume les différentes quantités d'échantillon de vin et de réactifs à ajouter dans la cuvette de réaction au cours du temps :

Temps en minutes	Echantillon en μl	Réactif 1 en μl	Réactif 2 en μl	Eau bidistillée en μl
0	8	80		170
5			80	

La lecture de la densité optique à 405 nm est effectuée régulièrement au cours du temps dont la durée totale est de 10 minutes mais qui peut éventuellement être raccourci compte tenu de la rapidité de la réaction qui est pratiquement instantanée. Le graphe suivant montre le type de courbe réactionnelle obtenu :



Après l'addition du réactif N° 1, la stabilisation est rapide. L'addition du réactif N° 2 contenant le DNTB est suivie d'une réaction colorée très rapide dont le plateau est atteint en quelques secondes. Celui-ci est ensuite stable. La lecture se fait par différence entre la Do 1 lue après stabilisation du réactif N° 1 et la Do 2 lue au plateau. Cette différence de Do est proportionnelle à la teneur en SO₂ total de l'échantillon mis en oeuvre.

La calibration est réalisée soit avec des vins étalons dont les valeurs en SO₂ total sont connues et couvrent la gamme de mesure envisagée, soit à l'aide de solutions de métabisulfite de potassium stabilisées en milieu sulfurique et de concentration connue. En général, la courbe de calibration n'étant pas tout à fait linéaire, 4 à 5 points de calibration sont nécessaires.

5. Caractérisation de la méthode

La caractérisation de la méthode a été réalisée selon le protocole présenté dans le feuillet vert OIV N° 1057 « Protocole de validation d'une méthode d'analyse usuelle par rapport à la méthode de référence OIV ».

5.1 Répétabilité

5.1.1 Définitions

La répétabilité est l'étroitesse de l'accord entre les résultats d'analyse indépendants entre eux obtenus avec la méthode considérée sur un même vin, dans le même laboratoire, avec le même opérateur utilisant le même matériel, dans un court intervalle de temps. La valeur de répétabilité (r) est la valeur en dessous de laquelle on peut estimer que se situe la différence absolue entre deux résultats d'analyse unique, obtenus dans les conditions de répétabilité définies ci-dessus, et ce, avec une probabilité de 95 %. L'écart type de répétabilité (S_r) est l'écart type des résultats obtenus dans les conditions de la répétabilité. C'est un paramètre de la dispersion des résultats, obtenu dans les conditions de la répétabilité.

5.1.2 Mesure

Pour la méthode considérée, les mesures ont été effectuées sur 100 échantillons de valeurs différentes. Les résultats suivants ont été obtenus :

$$S_r = 2 \text{ mg/l}$$

$$r = 6 \text{ mg/l}$$

Ces valeurs sont comparables à celles indiquées pour la méthode de référence OIV.

5.2 Linéarité

5.2.1 Définition

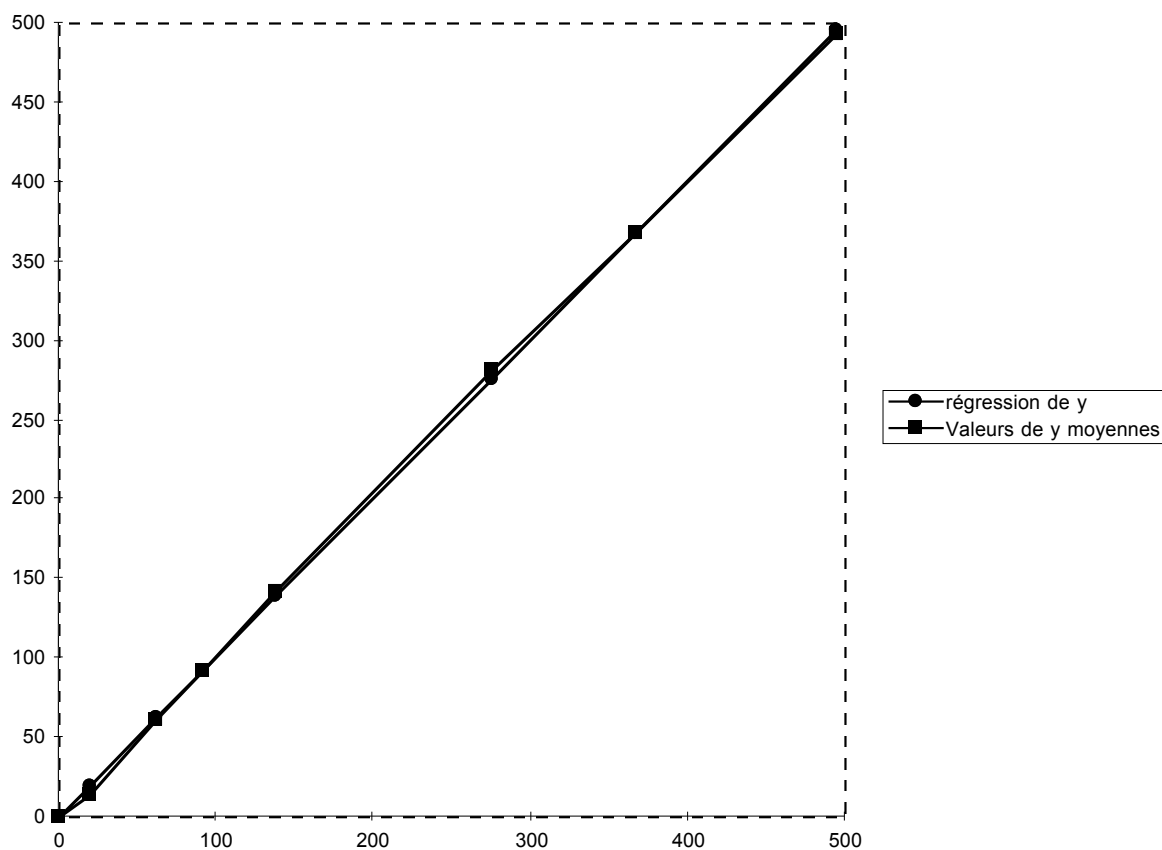
La linéarité est l'aptitude que présente une méthode à donner, dans la gamme de mesure retenue, des résultats proportionnels à la concentration du composé recherché dans le vin.

5.2.2 Mesure

La linéarité a été vérifiée par dosage en double de 8 vins présentant des valeurs comprises entre 0 et 500 mg/l, préalablement dosés par la méthode de référence OIV. Les valeurs obtenues sont indiquées dans le tableau suivant :

N° de l'échantillon	Valeur obtenue par méthode OIV (mg/l)	Résultat N°1 (en mg/l)	Résultat N°2 (en mg/l)
1	0	0	0
2	19	14	14
3	62	60	62
4	91	91	93
5	138	143	142
6	275	280	283
7	366	368	368
8	494	493	492

La courbe suivante donne une comparaison de la droite théorique obtenue avec les valeurs données par la méthode de référence et des valeurs obtenues par la méthode alternative :



Les deux courbes sont pratiquement confondues. La linéarité de la réponse par rapport à la méthode de réf. peut être considérée comme bonne dans le domaine de mesure retenu (0 à 500 mg/l).

5.3 Seuil de détection

5.3.1 Définition

Le seuil de détection (SD) est la plus petite quantité du composé à doser pouvant être détectée mais non nécessairement quantifiée comme exacte.

5.3.2 Valeur

Celle-ci a été réalisée en mettant en œuvre 30 mesures d'un blanc constitué d'eau pure non déminéralisée. La valeur calculée est la suivante :

$$SD = 2 \text{ mg/l}$$

5.4 Seuil de quantification

5.4.1 Définition

Le seuil de quantification (SQ) est la plus petite quantité du composé pouvant être dosé par la méthode.

5.4.2 Valeur

La valeur calculée est la suivante :

$$SQ = 6 \text{ mg/l}$$

5.5 Robustesse

5.5.1 Définition

La robustesse est la capacité, pour une méthode, de donner des résultats proches en présence de faibles changements de conditions expérimentales susceptibles de se produire dans l'utilisation de la procédure.

5.5.2 Détermination

Les plans d'expérience mis en oeuvre introduisant les variabilités existant couramment dans le laboratoire (variation de température, d'hygrométrie etc ...) n'ont montré aucune dérive de la méthode testée.

5.6 Spécificité

5.6.1 Définition

La spécificité d'une méthode est sa capacité à ne mesurer que le composé recherché.

5.6.2 Détermination

Différents tests ont été effectués, faisant varier la concentration de composés naturels du vin ou après addition de composés exogènes pouvant être apportés au vin dans le cadre des pratiques œnologiques autorisées. Aucune dérive n'a été enregistrée. En particulier, l'addition d'acide ascorbique et la concentration en composés phénoliques totaux sont sans effet.

5.7 Raccordement de la méthode usuelle à la méthode de référence OIV

Le raccordement de la méthode usuelle à la méthode de référence OIV est réalisé en deux étapes, la première consiste à comparer les répétabilités des deux méthodes, la seconde à déterminer la justesse de la méthode usuelle par rapport à la méthode de référence.

5.7.1 Comparaison des répétabilités

La valeur de répétabilité établie pour la méthode testée est identique à celle donnée pour la méthode de référence OIV soit 6 mg/l.

5.7.2 Justesse de la méthode usuelle par rapport à la méthode de référence.

5.7.2.1 Définition

La justesse sera définie comme l'écart de l'accord entre les valeurs obtenues par la méthode de référence et celle obtenue par la méthode usuelle, indépendamment des erreurs de fidélité des deux méthodes.

5.7.2.2 Evaluation

Le test de la pente montre que celle-ci est significativement égale à 1. La comparaison des résultats donnés par les deux méthodes montre qu'il n'existe pas de biais entre elles. Les résultats obtenus par les deux méthodes peuvent être considérés comme comparables dans l'intervalle de mesure considéré (0 à 500 mg/l).

Références

(1) **OIV**, 1990. - Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts ; *OIV Ed., Paris*.

(2) **DUBERNET (M.)**, 1997. - Protocole de validation d'une méthode d'analyse usuelle par rapport à la méthode de référence OIV; *Feuille vert OIV N° 1057*.

(3) **ELLMAN (G.L.)**, 1959. For the modification and quantitative detection of sulfhydryl groups; *Arch. Biochem. Biophys.* 82,70.