

DOSAGE DU CARBAMATE D'ÉTHYLE DANS LES VINS ET LES EAUX-DE-VIE

A. BERTRAND* et P. BARROS**

* Institut d'Oenologie, Université de Bordeaux II
351, cours de la Libération, 33405 Talence Cedex (France)

** Faculdades de Farmácia, Universidade de Porto
Rua Aníbal Cunha, 164, 4000 Porto (Portugal)

INTRODUCTION

La teneur en carbamate d'éthyle est officiellement règlementée au Canada. Elle ne doit pas dépasser par litre 30 μg pour les vins, 100 μg pour les vins de liqueur (vins fortifiés), 400 μg pour les eaux-de-vie de fruits, dont les eaux-de-vie de vins et 150 μg pour les autres eaux-de-vie. D'autres pays sans norme officielle, font des difficultés pour importer des produits dont les teneurs en carbamate d'éthyle leur paraissent élevés. La situation est particulièrement préoccupante dans des eaux-de-vie de fruits à noyaux; une étude bibliographique sur ce sujet est présentée par LAUGEL et al., (1987).

Pour le dosage du carbamate d'éthyle dans les boissons, plusieurs détecteurs sont utilisés; en 1971, une technique par dilution radio-isotopique est établie par LOFROTH et GEJWALL. WALKER et al., (1974) et OUGH (1976) emploient le détecteur Coulson à conductivité électrolytique. La spectrométrie de masse, les détecteurs thermoioniques, à ionisation de flamme et d'autres peuvent être également mis en œuvre. Le tableau I résume ces différentes conditions analytiques.

Dans ce travail nous étudions une méthode de dosage du carbamate d'éthyle qui soit simple, fiable et bien adaptée à un laboratoire ne disposant pas de spectromètre de masse.

MÉTHODE ANALYTIQUE

I — APPAREILLAGE

L'analyse est effectuée par chromatographie en phase gazeuse, on utilise :

- une colonne capillaire de Carbowax 20M (QSL 332 de AML: DB WAX de J.W.) de 30 m x 0,32 mm de diamètre intérieur;

- un injecteur de type «splitless», l'injection de 2 μl d'échantillon s'effectue sans division durant 20 secondes:

- le gaz vecteur est de l'hydrogène «U» sa pression d'entrée est de 60 kPa, le débit dans la colonne est de 4 ml/minute, au diviseur de 50 ml/minute et au balayage du septum de 0,5 ml/minute;

TABLEAU I

Différentes conditions du dosage du carbamate d'éthyle

Détecteurs	Préparation échantillon	Sensibilité µg/l	Utilisateurs
Spectrométrie de masse (1)	Extraction : dichlorométhane + chlorure de sodium + sulfate de sodium, extracteur Kuderna-Danish	10	Joe et al., (1977)
	Extraction : dichlorométhane + sulfate de sodium + Extrelut, extracteur Kuderna-Danish	1	Dennis et al., (1986)
	Extraction : dichlorométhane	1	Gaetano et Matta (1987)
	Extraction : dichlorométhane + acétate d'éthyle	20	Preuss et al., (1987)
	Extraction : dichlorométhane + acétate d'éthyle Extrelut / chlorure de sodium (+ Pentane)	1	Huebschmann et Matter (1986)
	Injection directe après addition étalon interne et ajustement des eaux-de-vie à 70 % éthanol	—	Shultz et Renner (1986)
	Extraction : acétone + dichlorométhane + chlorure de sodium + éther de pétrole + florisil extracteur Kuderna-Danish	20	Cairns et al., (1987)
Détecteur à ionisation de flamme (FID) (2)	Extraction: dichlorométhane à pH = 10 (hydroxyde de sodium) + chlorure de potassium	1	Van Ingen et al., (1986)
	Extraction : dichlorométhane + acétate d'éthyle Extrelut / chlorure de sodium (+ Pentane)	1	Huebschmann et Matter (1986)
	Extraction : dichlorométhane + chlorure de sodium + sulfate de sodium + extracteur Kuderna-Danish	20	Joe et al., (1977)
Détecteur à ionisation de flamme (FID) sel alcalin (3)		20	Joe et al., (1977)
	Dérivé N-trifluoroacétylé	1	Walker et al., (1974)
Détecteur Thermoionique type N/P, sel de silicate de rubidium dans FID (4)	Extraction : éther éthylique + di-sodium hydrogéo- phosphate + sulfate de sodium	20	Bertrand et Triquet-Pissard (1986)
	Extraction : dichlorométhane + acétate d'éthyle + sulfate de sodium + Extrelut / chlorure de sodium	20	Baumann et Zimmerli (1986)
	dérivé diméthylé	1	Bailey et al. (1986)
Détecteur à conductivité électrolytique (Coulson, Hall) (5)	Extraction : chlorure de sodium + sulfate de sodium	—	Walker et al., (1974)
	Extraction : chlorure de sodium + sulfate de sodium	—	Ough (1976)
	Extraction : acétone + dichlorométhane + chlorure de sodium + éther de pétrole + florisil extracteur Kuderna-Danish	20	Cairns et al., (1987)
Capture d'électrons (6)	Dérivé N-trifluoroacétylé	1	Walker et al., (1974)

(1) Parfait pour l'identification; relativement peu sensible; se prête mal au dosage de très faibles quantités

(2) Chromatographie bidimensionnelle (2 colonnes). (3) Plus sélective que FID

(4) Bon marché; sensible; fiable. (5) Sélectif; relativement coûteux; emploi difficile.

(6) Préparation longue; interférences.

- la température du four est programmée de 60°C à 200°C à raison de 5°C/minute; le palier isotherme final dure 5 minutes;

- le détecteur est de type «N,P» de marque CARLO-ERBA; c'est un détecteur à ionisation de flamme classique, dans lequel le constructeur a introduit un sel cylindrique de silicate de rubidium placé sur un étrier réglable en hauteur, il faut se placer à environ 2 mm au-dessus de la position la plus basse; ce sel doit être changé environ tous les 3 mois. La polarisation négative est branchée sur la position «P» et le sélecteur du détecteur est sur la position «NP»;

- le réglage des gaz qui alimentent la flamme est exactement le même que pour un détecteur à ionisation de flamme classique : 25 ml/minute pour l'hydrogène et 330 ml/minute pour l'air, toutefois on effectue un apport supplémentaire d'hélium de 21 ml/minute (make-up) les pressions respectives de ces trois gaz sont de 50, 100 et 80 kPa; le chauffage du détecteur est maintenu en permanence ainsi que le courant d'hélium;

- les températures de l'injecteur et du détecteur sont réglées à 210°C.

REMARQUE : Les réglages qui sont préconisés ci-dessus ne sont pas ceux qui fournissent la plus grande sensibilité, mais ils permettent d'avoir une grande longévité du sel et les résultats sont relativement constants.

II — PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

1°) *L'étalon interne*

L'étalon interne utilisé est du carbamate de méthyle. En fait, on prépare une solution hydroalcoolique à 50 p. 100 contenant par litre :

- 100 mg de carbamate de méthyle et
- 100 mg de carbamate de butyle

ce dernier servant à vérifier la bonne fiabilité des résultats (le rapport des surfaces des 2 étalons internes doit être sensiblement constant). Le carbamate de propyle qui peut sortir en mélange avec une autre substance dans les vieilles eaux-de-vie, est à déconseiller.

Le coefficient de réponse du carbamate de méthyle par rapport au carbamate d'éthyle est d'environ 0,6.

2°) *Eaux-de-vie*

On ajoute 50 μ l de la solution d'étalon interne à 5 ml d'eau-de-vie, l'étalon interne est alors à la concentration de 1 mg/l dans l'échantillon; après homogénéisation on injecte directement 2 μ l du mélange dans le chromatographe (figure 1).

3°) *Liqueurs*

On opère selon le principe décrit précédemment (BERTRAND et TRIQUET-PISSARD, 1986). On extrait le carbamate d'éthyle par l'éther éthylique en déshydratant l'échantillon par le sulfate de sodium à pH neutre; ceci permet d'éliminer les sucres qui, lorsqu'ils sont injectés finissent par boucher la colonne. Prendre :

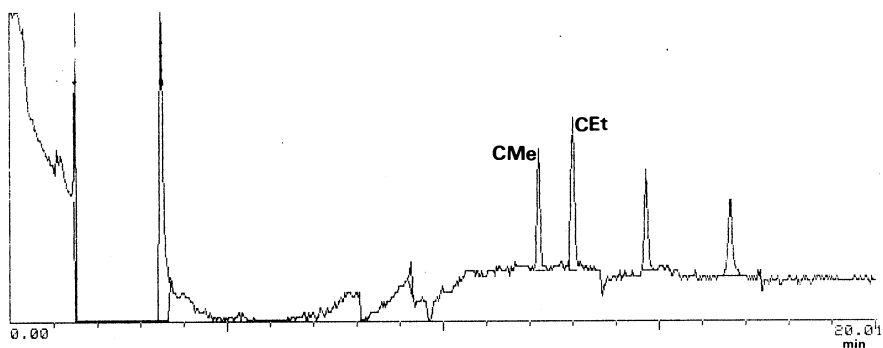


Fig. 1. — Chromatogramme d'une eau-de-vie.
(CEt : carbamate d'éthyle (624 µg/l); CMe : carbamate de méthyle (étalon interne).

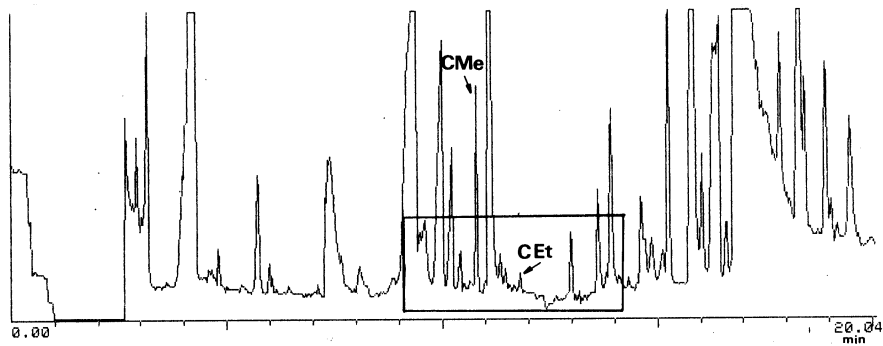


Fig. 2. — Chromatogramme d'un vin.
(CEt : carbamate d'éthyle (9 µg/l); CMe : carbamate de méthyle (étalon interne).

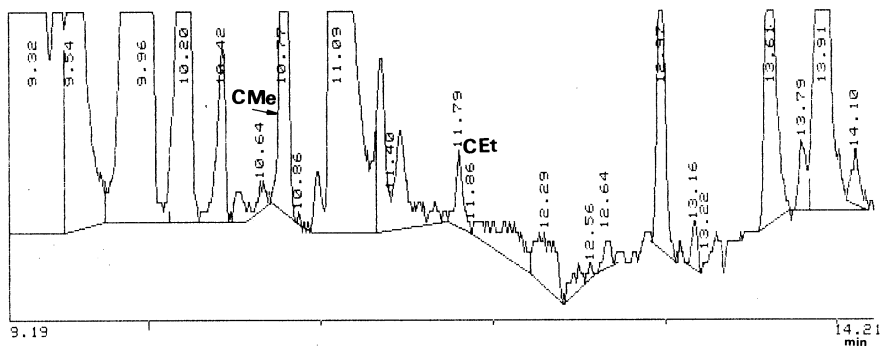


Fig. 3. — Chromatogramme du vin présenté à la figure 4, avec effet zoom.

- 5 ml de liqueur;
- 50 μ l de la solution d'étalon interne;
- 20 ml d'éther;
- 2 g de phosphate disodique ($\text{Na}_2\text{HPO}_4, 12\text{H}_2\text{O}$);
- 20 g de sulfate disodique (Na_2SO_4);

après agitation durant 5 minutes, dans un flacon de 50 ml fermant à vis, et dans lequel on a placé un gros barreau d'agitateur magnétique, on recueille la phase liquide, on lave le sel à deux reprises par 10 ml d'éther et on concentre l'ensemble à froid (20°C) à l'aide d'un évaporateur rotatif jusqu'à 1 ml environ. On injecte 2 μ l dans le chromatographe.

4°) Vins

On prépare une solution d'étalon interne à partir de celle utilisée pour les eaux-de-vie par dilution au 1/5° (soit 20 mg/l de carbamate de méthyle en solution hydroalcoolique à 10 p. 100). On prend :

- 10 ml de vin;
- 100 μ l de la solution d'étalon interne;
- 40 ml d'éther;
- 2 g de phosphate disodique ($\text{Na}_2\text{HPO}_4, 12\text{H}_2\text{O}$);
- 40 g de sulfate disodique (Na_2SO_4);

après agitation durant 5 minutes, dans un flacon de 100 ml fermant à vis, et dans lequel on a placé un gros barreau d'agitateur magnétique, on recueille la phase liquide, on lave le sel à deux reprises par 20 ml d'éther et on concentre l'ensemble à froid (20°C) à l'aide d'un évaporateur rotatif jusqu'à 2 ml environ.

On procède alors à une nouvelle extraction car on se trouve généralement en présence de 2 phases; on rajoute dans le ballon évaporateur :

- 4 g de sulfate disodique;
- 10 ml d'éther;

- on agite 5 minutes et on recueille la phase liquide; on lave le sel à deux reprises par 6 ml d'éther; l'ensemble est concentré sous vide jusqu'à 1 ml (0,5 ml si on veut avoir des pics plus grands). On injecte 2 μ l dans le chromatographe (figure 2).

REMARQUES : on peut opérer sur 5 ml de vin en réduisant toutes les quantités de moitié lorsqu'on est bien entraîné ou que la précision requise n'est pas trop grande.

Il est indispensable de vérifier fréquemment que le dosage effectué sur un vin est bien correct en analysant le même vin supplémenté par une quantité connue de carbamate d'éthyle (environ 10 μ g par litre).

La ligne de base du chromatogramme est instable, l'intégration des pics pour la détermination des surfaces est difficile dans le cas des vins; pour une plus grande fia-

bilité, il est bon de disposer d'un système de retraitement des chromatogrammes pour effectuer des corrections de ligne de base d'intégration, de grossissement de la zone où apparait le carbamate d'éthyle (effet zoom), (figure 3). Dans ces conditions on peut déterminer des quantités faibles de l'ordre de 1 μg par litre.

Nous préférons utiliser l'éther plutôt que le dichlorométhane pour une plus grande durée de vie de la colonne capillaire.

Seul, à notre connaissance, le détecteur CARLO-ERBA est suffisamment sensible et fiable au cours du temps.

III — RÉSULTATS

1°) Sensibilité

Pour une injection de 2 μl la sensibilité est d'environ 20 μg . Elle est largement suffisante pour les eaux-de-vie; par contre dans les vins il est indispensable d'effectuer une concentration d'environ 20 fois

2°) Linéarité

Les résultats de la figure 4, obtenus à partir de solutions synthétiques, montrent une bonne linéarité tant par l'injection directe qu'après extraction. Des quantités connues rajoutées à un même vin sont retrouvées avec une précision satisfaisante (tableau II).

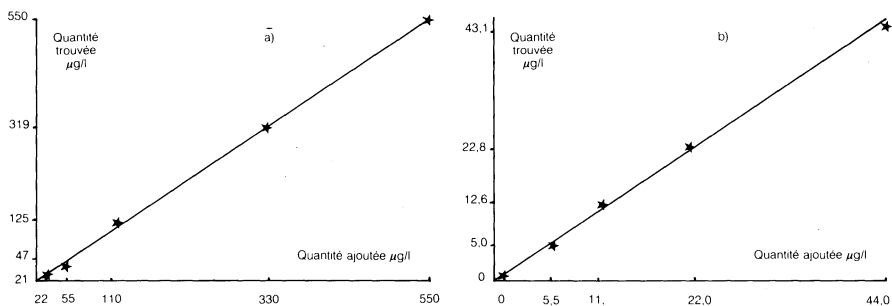


Fig. 4. — Étude de la linéarité du dosage du carbamate d'éthyle :
a) injection directe; b) extraction.

3°) Répétabilité

Le tableau III donne l'étude statistique basée sur 12 dosages consécutifs appliqués à un même vin. Le coefficient de variation est de l'ordre de 12 p. 100.

4°) Teneurs en carbamate d'éthyle des eaux-de-vie et des vins

Nous avons analysé plus de 1000 eaux-de-vie de natures et de provenances diverses; les résultats varient de moins de 10 μg à plus de 8000 μg par litre (eau-de-vie de prune).

Les eaux-de-vie de vin ne présentent que très rarement des teneurs supérieures à 400 μg par litre; les taux sont surtout fonction du mode de distillation.

TABLEAU II**Recherche des quantités de carbamate d'éthyle ajoutées à un vin.**Les teneurs sont exprimées en μg par litre.

Quantité ajoutée	Teneur prévue	Teneur trouvée
0	—	4,0
5,5	9,5	11,0
11,0	15,0	16,0
22,0	26,0	26,7
44,0	48,0	47,2

TABLEAU III**Répétabilité du dosage du carbamate d'éthyle dans les vins.**

Échantillon N°	Teneur ($\mu\text{g/l}$)	Échantillon N°	Teneur ($\mu\text{g/l}$)
1	10,20	7	8,01
2	7,67	8	7,98
3	7,76	9	8,44
4	8,10	10	8,70
5	6,59	11	7,80
6	6,51	12	7,20
Moyenne : 7,91 : Écart type : 0,98			
Coefficient de variation : 12,35 p. 100			

Nos résultats sont en bon accord, dans la limite de la précision de la méthode, avec ceux trouvés sur les mêmes échantillons par les laboratoires T.N.O. (HOLLANDE) et L.C.B.O. (CANADA).

Pour les vins (environ 400 échantillons analysés), on trouve une moyenne par litre de $5 \mu\text{g}$ pour les vins blancs et de $10 \mu\text{g}$ pour les vins rouges; des valeurs nettement plus élevées sont à l'heure actuelle totalement inexpliquées. On peut toutefois affirmer que compte tenu de la marge de sécurité (5000) prise en compte par le Législateur Canadien pour déterminer la dose limite acceptable ($30 \mu\text{g}$ par litre) la consommation des vins n'est pas susceptible de provoquer des tumeurs cancéreuses, même si certains échantillons dépassent légèrement la norme retenue.

Remerciements

Mademoiselle Corinne BLANCARD, technicienne, nous a beaucoup aidé pour la réalisation de ce travail; nous la remercions pour sa compétence et son efficacité.

Manuscrit reçu le 4 janvier 1988; accepté pour publication le 26 février 1988.

RÉSUMÉ

Le dosage du carbamate d'éthyle dans les boissons alcoolisées peut être réalisé de manière simple, avec une bonne précision et une bonne sensibilité par chromatographie en phase gazeuse capillaire en utilisant un détecteur à ionisation de flamme de type NP (un sel de silicate de rubidium est placé dans la flamme). On utilise le carbamate de méthyle comme étalon interne. Pour les eaux-de-vie on procède par injection directe; pour les vins une extraction par l'éther est réalisée sur l'échantillon déshydraté par le sulfate de sodium.

SUMMARY

A gas chromatographic method for the determination of ethyl carbamate in wines and brandies is established. We use a capillary carbowax 20M (30 m x 0,32 mm) column and a NP type FID detector (Carlo Erba). A rubidium silicate salt is placed in the flame. Methyl carbamate is used as internal standard. The method is sensitive to 20 µg/l (20 ppb) with a 2 µl injection volume in the splitless mode. Linearity is tested in brandies, wines and with quantified addition of ethyl carbamate. The reproducibility shows a 12 per cent variation coefficient. Assays in brandies are taken with direct injection. In wines, an extraction is performed at pH = 7 after deshydration by sodium sulphate followed by concentration. One µg/l (1 ppb) ethyl carbamate can be determined.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BAILEY R., NORTH, D., MYATT, D. et LAWRENCE, J.F., 1986. Determination of ethyl carbamate in alcoholic beverages by methylation gas chromatography with nitrogen phosphorus thermoionic detection *J. Chromatogr.*, **369**, 199-202.
- BAUMANN, U. et ZIMMERLY B., 1986. Gaschromatographic determination of urethane (ethylcarbamate) in alcoholic beverages. *Mitt. Gebiet Lebensm.*, **77**, 327-332.
- BERTRAND A. et TRIQUET-PISSARD Rosella, 1986. Le carbamate d'éthyle dans les eaux-de-vie de vin. Observations sur son origine. *Connaissance Vigne Vin*, **20**, N° 2, 131-136.
- CAIRNS T., SIEGMUND E.G., LUKE A.M. et DOOSE G.M., 1987. Residue levels of ethyl carbamate in wines and spirits by gas chromatography and mass spectrometry/mass spectrometry. *Anal. Chem.*, **59**, 2055-2099.
- DENNIS M.J., HOWARTH N., MASSEY R.C., PARKER I., SCOTTER M., et STARTIN J.R., 1986. Method for the analysis of ethyl carbamate in alcoholic beverages by capillary gas chromatography. *J. Chromatogr.*, **369**, 193-198.
- GAETANO G. et MATTA M., 1987. Dosage du carbamate d'éthyle dans les vins et spiritueux par chromatographie en phase gazeuse/spectrométrie de masse. *Bulletin de l'O.I.V.* N° 671-672, 37-42.

- HUEBSCHMANN H.J. et MATTER L., 1986. Analysis for ethyl carbamate in spirits : detection limite no problem. *Chem. Rundsch.*, **39**, (35), 14.
- JOE F.L. Jr, KLINE D.A., MILETTA E.M., ROACH J.A.G., ROSEBORD E.L. et FAZIO T., 1977. Determination of urethane in wines by gas-liquid chromatography and its confirmation by mass spectrometry. *J. AOAC*, **60**, N° 3, 509-516.
- LAUGEL P., BINDLER F. et GRIMM Ph., 1987. Le carbamate d'éthyle dans les eaux-de-vie de fruits. Point de la situation actuelle. *Ann. Fals. Exp. Chim.*, **80**, N° 862, 457-466.
- LOFROTH G. et GEJVALL T., 1971. Diethylpyrocarbonate formation of urethane in treated beverages. *Science*, **174**, 1248-1250.
- OUGH C., 1976. Ethyl carbamate in fermented beverages and food. 1. Naturally occurring ethyl carbamate. *J. Agric. Food Chem.*, **24**, N° 2, 323.
- PREUSS A., FRANK W. et MILDAU G., 1987. Determination of ethyl carbamate in spirits and other alcoholic beverages. *Lebensmittelchem. Gericht. Chem.*, **41**, N° 3, 66-67.
- SCHULTZ J. et RENNER R., 1986. Ethyl carbamate (urethan) in fruit brandy. Fast identification and qualitative determination with mass selective detector (MSD). *Git. Fachz. Lab.*, **30**, N° 12, 1215—1216, 1219-1220.
- VAN INGEN R.H.M., NIJSSEN L.M.I., VAN DER BERG F. et MAARSE H., 1987. Determination of ethyl carbamate in alcoholic beverages by two dimensional gas chromatography. *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, **10**, N° 3, 151-152.
- WALKER G., WINTERLIN W., FAUDA H et SEIBER J., 1974. Gas chromatographic analysis of urethane (ethylcarbamate) in wines. *J. Agric. Food Chem.*, **22**, 6, 944-947.