Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin, 1992, **26**, N° 4, 287-293

DOSAGE DU SÉLÉNIUM DANS LE VIN PAR SPECTROFLUORIMÉTRIE. APPLICATION À QUELQUES VINS FRANCAIS

J. BELLANGER*, J.C. BOUVIER** et Claudine LAB*

*Maladies Nutritionnelles, Institut National de la Recherche Agronomique
CRZV Theix, 63122 Saint-Genès-Champanelle (France)
**Station expérimentale de Pech Rouge-Narbonne,
Institut National de la Recherche Agronomique,
Bd du Général de Gaulle, BP 429,11104 Narbonne (France)

Résumé : *Le sélénium du vin est déterminé par spectrofluorimétrie. La destruction de la matière organique s'effectue par voie humide (acides nitrique et perchlorique). Le sélénium forme avec la 2-3 diaminonaphtalène un complexe fluorescent extrait dans le cyclohexane. La teneur de quelques vins français varie entre 0,2 et 0,8 µg de sélénium par litre. Le seuil de détection est de 0.,07 µg/l.*

INTRODUCTION

La teneur en sélénium dans le vin a été peu étudiée. La plupart des méthodes sont basées sur la spectrométrie d'absorption atomique après formation d'hydrures (ESCHNAUER, 1988). La méthode fluorimétrique développée ci-dessous permet d'atteindre des valeurs inférieures à 1 µg/l. Elle est une adaptation de la méthode de LAMAND (1969). Le principe du dosage est le suivant : le sélénium tétravalent réagit avec une diamine aromatique (la 2-3 diamino-naphtalène) pour former un piazsélénole extrait dans le cyclohexane et dont la fluorescence est mesurée à 520 nm.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1) Appareillage

Spectrofluorimètre Perkin-Elmer LS 30.

2) Verrerie

La verrerie doit être d'une très grande propreté. Toute trace de contamination organique est une source potentielle de fluorescence parasite. Nous utilisons habituellement un trempage dans un bain de détergent (RBS), suivi de trois rinçages à l'eau ordinaire et trois rinçages à l'eau désionisée. A ce stade la verrerie ne doit pas être manipulée sans précautions (traces de doigs...). Aucun bouchon caoutchouc ne doit être employé. Le bouchage des récipients doit se faire avec des bouchons rodés.

3) Réactifs

Les réactifs sont de qualité pour analyse :
- acide nitrique concentré (65 p. cent) redistillé au laboratoire sous un courant d'azote,
- acide perchlorique concentré (70-72 p. cent),
- acide chlorhydrique concentré (37 p. cent) et en solutions aqueuses à 0,1 M et 2 M,
- ammoniaque concentrée,
- sélénium dioxyde : solution à 1 g/l dans l'acide nitrique 0,5 mol/l (Merck n°19.796),
- E.D.T.A. sel disodique : solution aqueuse à 0,04 M,
- orange de méthyle (hélianthine) : solution aqueuse à 0,04 p. cent, chauffée à 60°C et filtrée,
- cyclohexane pour spectrophotométrie,
- 2-3 diaminonaphtalène hydrochlorure (D.A.N.) recristallisé (Aldrich) : la solution de D.A.N. étant sensible à la lumière, la préparation du réactif s'effectue dans la pénombre. Elle est préparée extemporanément par dilution à 0,1 p. cent dans HCl 0,1 M. La solution est chauffée 20 minutes au bain-marie à 60°C. Elle est ensuite refroidie à la température du laboratoire et extraite 3 fois avec 25 ml de cychohexane. La troisième extraction est filtrée.

4) Destruction de la matière organique

La destruction par voie humide s'effectue dans des matras de 30 ml munis d'un rodage 14/23 destiné à recevoir un réfrigérant à eau ascendant de 15 cm (longueur totale rodage, réfrigérant, embout libre : 25 cm) et de 8 mm de diamètre.

Les échantillons (20 ml) sont introduits dans le matras et évaporés à sec à 37°C sous un jet d'air comprimé filtré. On ajoute deux billes de verre et 5 ml d'acide nitrique concentré. Les échantillons sont laissés en contact une nuit avec l'acide pour éviter les mousses abondantes en début de chauffage. Le lendemain matin, les matras reçoivent leur réfrigérant et le chauffage s'effectue rapidement pour atteindre une température légèrement supérieure à la température d'ébullition de l'acide nitrique. La condensation de l'acide doit se faire dans la moitié inférieure du réfrigérant.

Lorsque la solution est très éclaircie, sans matière organique en suspension (au bout d'une heure environ), 2 ml d'acide perchlorique sont ajoutés par l'extrémité du réfrigérant pour le rincer de ses traces de condensat. Après un reflux d'une demi-heure, le réfrigérant est enlevé, l'acide nitrique est évaporé et le chauffage est maintenu jusqu'à l'apparition des fumées blanches de l'acide perchlorique. Cette ébullition est alors continuée pendant 30 mn.

5) Mesure de la concentration en sélénium

L'attaque perchlorique terminant la minéralisation oxyde partiellement le sélénium en sa valence 6 (séléniate). Or seule la valence 4 (sélénite) réagit avec le réactif. Une réduction est donc indispensable. Elle s'effectue par addition, dans le matras, de 1 ml d'acide chlorhydrique concentré. Le matras, muni des réfrigérants décrits ci-dessus (le courant d'eau n'est pas établi), est maintenu 30 minutes au bain-marie bouillant. Le contenu du matras est transvasé quantitativement dans un erlenmeyer de 100 ml avec 15 ml d'eau désionisée.

Parallèlement une gamme est préparée, dans des erlenmeyers de 100 ml, avec 0,005 µg, 0,010 µg, 0,020 µg, 0,040 µg, 0,080 µg, 0,120 µg et 0,160 µg de sélénium à partir d'une solution à 0,2 µg/ml de sélénium dans l'acide chlorhydrique 0,1 M. On ajoute à 15 ml d'eau, 1 ml d'acide chlorhydrique concentré, 1ml d'acide perchlorique et les quantités de sélénium correspondantes.

Les étalons et les échantillons sont ensuite traités ainsi :

- ajouter 50 µl d'hélianthine,
- alcaliniser la solution avec de l'ammoniaque concentrée. La solution vire du rose au jaune,
- la solution est ajustée de nouveau au rose avec quelques gouttes d'acide chlorhydrique 2M,
- ajouter 2 ml d'EDTA 0,04 M,
- ajouter 5 ml de la solution de D.A.N. à 0,1 p. cent dans HCl 0,1 M. Le pH est voisin de 1,8,
- après l'addition du réactif, les opérations sont effectuées dans une pièce très obscurcie,
- mettre au bain-marie à 60°C pendant 30 mn,
- laisser refroidir dans la glace,
- ajouter 5 ml de cyclohexane et agiter une minute et 30 secondes sur un agitateur alternatif,
- verser l'ensemble des phases aqueuse et organique dans un tube à essai en verre,
- mesurer la fluorescence du cyclohexane pour la gamme et les échantillons (excitation : 375 nm; émission : 520 nm).

RÉSULTATS ET DISCUSSION

1) Précision

a) Répétabilité : la répétabilité a été mesurée sur 20 déterminations d'un même échantillon de vin rouge. La teneur de ce vin est de 0,65 ± 0,10 µg/l (Moy. ±2 σ),le cœfficient de variation est de 7,9 p. cent.

b) Variabilité intralaboratoire : La variabilité a été déterminée sur un vin rouge pendant 7 séries de mesures. La moyenne de cet échantillon est de 0,76 ± 0,10 µg/l, le cœfficient de variation est de 7,0 p. cent.

2) Spécificité et justesse

A notre connaissance, il n'existe pas de méthode ou d'échantillon de référence pour déterminer le sélénium dans le vin. A défaut d'échantillon de référence, nous avons mesuré le taux de récupération d'un ajout de sélénium avant mise en solution (0,4 ml d'une solution à 0,2 µg/ml). Il est voisin de 90 p. cent lorsque le réfrigérant à air n'est pas ajouté pendant la réduction du Se VI et égal à 98,7 p. cent (n = 14; écart-type = 3,3 p. cent; CV = 3,8 p. cent), lorsque le réfrigérant est ajouté. La réduction du Se VI en Se IV est indispensable car le Se VI, état d'oxydation du sélénium après oxydation nitroperchlorique, ne réagit pas avec la 2-3 diaminonaphtalène. Selon SHIMOISY (1976) et NEVE et *al.* (1980), cette étape serait susceptible de provoquer des pertes de sélénium sous forme de $SeOCl_2$ et SeO_2, 2HCl. Le réfrigérant condenserait donc ces deux composés volatils.

Cette méthode de dosage a été appliquée aux aliments. Lors de cette étude, les échantillons de références suivants ont été dosés : poudre de lait dégraissé, muscle et foie de bovin, repas complet. Les résultats regroupés dans le tableau I sont en accord avec les valeurs certifiées.

TABLEAU I

Teneurs en Sélénium (µg/g MS) de quelques échantillons de référence

Echantillon	Teneurs mesurées (n = 6)	Teneurs certifiées
Poudre de lait dégraissé NIST* Réf. 1549	0,114 ± 0,004*** CV = 1,3 p. cent	0,11 ± 0,01
Foie de bovin NIST Réf. 1577 A	0,657 ± 0,026 CV = 2,0 p. cent	0,71 ± 0,07
Muscle de bovin BCR** Réf. CRM 184	0,171 ± 0,026 CV = 7,7 p. cent	0,183 ± 0,012
Repas NIST Réf. 8431 A	0,217 ± 0,012 CV = 2,0 p. cent	0,242 ± 0,030

*National Institute of Standards and Technology; **Community Bureau of Reference;
***Limite de confiance pour P = 0,05

3) Seuil de détection

La définition du seuil de détection n'est pas normalisée. Nous avons retenu celle de MILLER et MILLER (1988) : le seuil de détection est « la concentration de l'analyte donnant un signal égal au signal du blanc yBl auquel on ajoute 3 fois la valeur de l'écart type SBl ». L'écart type de la mesure de 10 blancs de réactifs (mise en solution comprise) est de 4,0 unités de fluorescence (CV = 7,8 p. cent).

Le seuil de détection absolu calculé à partir de la droite d'étalonnage est de 1,3 ng. Ce qui donne, pour une prise d'essai de 20 ml, un seuil de détection de 0,07 µg/l. Cette valeur se situe dans les valeurs les plus faibles relevées dans l'étude inter-laboratoires (n = 51) et interméthodes (n = 6) de KOH (1987); la fluorimétrie et la méthode des hydrures étant les plus sensibles.

APPLICATIONS

1) Détermination du sélénium dans quelques vins français

L'étude a porté sur 40 vins (rouge n = 25; rosé n = 4; blanc n = 11), en provenance de différentes régions vinicoles de France.

Les différents échantillons ont été dosés en double. Les résultats sont regroupés dans le tableau II.

TABLEAU II

Teneurs en Sélénium (µg/l) de quelques vins français

Vins rouges			
Origine	Teneurs		
Languedoc-Roussillon	0,5 - 0,3 - 0,5 - 0,3 - 0,5 0,4 - 0,5 - 0,6 - 0,7 - 0,6		
Provence	0,7 - 0,3 - 0,7 - 0,8		
Côtes-du-Rhône	0,5 - 0,5 - 0,6 - 0,6 - 0,6		
Beaujolais	0,5 - 0,6 - 0,2		
Bourgogne	0,5 - 0,4 - 0,4		
Vins blancs			
Origine	Teneurs	Origine	Teneurs
Bourgogne	0,3 - 0,4 - 0,3	Bandol	0,3
Arbois	0,5	Côteaux d'Aix	0,5
Côtes-du-Rhône	0,5	Corse	0,3
Languedoc-Roussillon	0,2 - 0,3	Var	0,3
Vins rosés			
Divers	0,2 - 0,5 - 0,6 - 0,3		

La teneur en sélénium des vins varie entre 0,2 et 0,8 µg/l, ce qui est en accord avec ESCHNAUER (1988) qui a étudié des vins allemands et VARO et *al.* (1980) pour des vins achetés en Finlande (0,25 à 0,8 µg/kg). SNOOK et *al.* (1987) trouve une valeur plus élevée: 3 µg/l pour un seul échantillon de vin blanc américain. Compte-tenu du nombre faible de vins de chaque provenance, il semble difficile de mettre en évidence une corrélation entre les régions et la teneur en sélénium du vin, c'est-à-dire d'étudier la corrélation entre une teneur en sélénium du sol et une teneur en sélénium du vin.

Pour la même raison, bien que les vins rouges semblent être légèrement plus riches en sélénium que les vins blancs (moyenne (n25) = 0,49 µg/l; moyenne (n11) = 0,35 µg/l), il semble impossible d'affirmer que cette différence soit significative dans le cadre de cette étude

2) Détermination du sélénium dans les aliments français

Cette méthode a également été appliquée à la détermination du sélénium dans les aliments de l'Homme (fruits et légumes, produits carnés, poissons, produits laitiers…). Les résultats de cette étude seront publiés ultérieurement.

CONCLUSION

La méthode proposée permet de déterminer le sélénium dans le vin à des teneurs faibles avec un matériel peu coûteux. Les résultats sont en accord avec les résultats des autres auteurs. Elle a été par ailleurs appliquée avec succès à des analyses d'aliments. Son seuil de détection (0,07 µg/l) est comparable à celui des méthodes les plus sensibles (spectrométrie d'absorption atomique, fluorimétrie).

Manuscrit reçu le 27 juillet 1992; accepté pour publication le 26 octobre 1992

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ESCHNAUER H., 1988. *Selenium in wine.*, In « Neve J., Favier A. ». *Selenium in Medecine and Biology*. Walter de Gruyter and Co, Berlin-New-York, p 23-28.

KOH T. S., 1987. Interlaboratory study of blood selenium determinations. *J. Assoc. Anal. Chem.*, **70**, 664-667.

LAMAND M., 1969. Dosage du sélénium dans les produits biologiques et mélanges minéraux alimentaires. *Ann. Falsification et de l'expertise chimique*, p. 4-12.

MILLLER J.C.et MILLER J.N., 1988. *Statistics for analytical chemistry*. Halsted Press, New York, 115.

NEVE J., HANOCQ M.et MOLLE L.,1980. Critical study of some digestion methods for decom-

position of biological materials for the determination of total selenium and selenium (IV). *Mikrochem. Acta*, **I**, 259.

SHIMOISHI Y., 1976. The gas-chromatographic determination of selenium (VI) and total selenium in milk, milk products and albumin with 1,2-diamino-4-nitrobenzene. *Analyst*, **101**, 298.

SNOOK J.T., KINSEY D., PALMQUIST D.L., DELANY J.P., VIVIAN V.M. et MOXON A. L., 1987. Selenium content of foods purchased or produced in Ohio. *J. Am. Dietetic Assoc.*, **87**, 744-749.

VARO P., NUURTAMO M., SAARI E. et KOIVISTOINEN P., 1980. Mineral element composition of Finnish foods. IX. Beverages, confectionaries, sugar and condiments. In : Mineral element composition of Finnish foods : P, K, Mg, P, S , Fe, Cu, Mn, Zn, Mo, Co, Ni, Cr, F, Se, Si, Rb, Al, B, Br, Hg, As, Cd, Pb and ash. Ed KOIVISTOINEN P. *Acta Agricul. Scandinavica*, supplem. 22, 130.