

RÉSOLUTION OIV-OENO 599-2018

DOSAGE DE L'ACIDE L-MALIQUE DANS LES VINS PAR METHODE ENZYMATIQUE AUTOMATISEE

*AVERTISSEMENT : cette résolution amende la résolution suivante :
- OIV-OENO 391-2010*

(Méthode de type III)

L'ASSEMBLÉE GÉNÉRALE,

CONFORMEMENT à 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 »,

CONSIDÉRANT l'intérêt exprimé par certains experts de la SCMA d'inclure les méthodes automatiques dans le *Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts*

DECIDE de supprimer l'exemple pratique concernant l'analyte dans la résolution OIV-OENO 391/2010 au fur et à mesure qu'une méthode automatique est adoptée.

DÉCIDE de compléter le *Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts* avec la méthode suivante :

Dosage de l'acide L-malique dans les vins par méthode enzymatique automatisée

Méthode de type III

1. Domaine d'application

Cette méthode permet le dosage de l'acide L-malique dans les vins par analyse enzymatique spécifique en utilisant un analyseur automatique séquentiel.

Dans le présent document l'étude collaborative a permis de caractériser la méthode sur une échelle de mesure de 0,12 à 2,30 g/L.

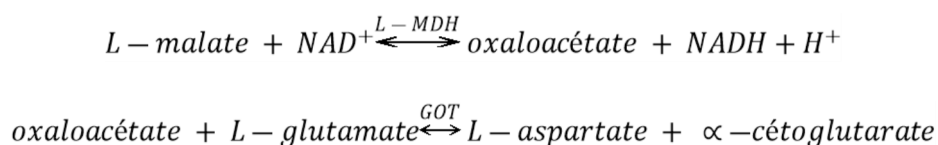
Note : Le cas échéant, il appartient à chaque laboratoire utilisant cette méthode de redéfinir, éventuellement en l'élargissant, ce domaine par un travail de validation.

2. Références normatives

- Recueil des méthodes internationales d'analyses - OIV: Acide L-malique - méthode enzymatique OIV-MA-AS313-11
- ISO 78-2 : Chimie - Plans de normes

3. Principes réactionnels

En présence de nicotinamide adénine dinucléotide (NAD), l'acide L-malique est oxydé en oxaloacétate par une réaction catalysée par la L-malate déshydrogénase (L-MDH). L'équilibre de la réaction étant en faveur du malate, il convient d'éliminer l'oxaloacétate formé qui est transformé en L-aspartate en présence de L-glutamate. Cette réaction est catalysée par la glutamate oxaloacétate transaminase (GOT)



La nicotinamide adénine dinucléotide réduite produite (NADH) est mesurée grâce à son absorption à 340 nm. Elle est proportionnelle à la quantité d'acide L-malique.

4. Réactifs et solutions de travail

Au cours de l'analyse, sauf indications contraires, utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue et de l'eau distillée ou déminéralisée, ou de l'eau de pureté équivalente.

4.1. Réactifs

- 4.1.1. Eau pour usage analytique (norme ISO 3696) qualité I ou II.
- 4.1.2. Glycylglycine ; (CAS 556-50-3)
- 4.1.3. Acide glutamique ; (CAS 56-86-0)
- 4.1.4. NAD (nicotinamide-adénine dinucléotide) ; (CAS 53-84-9)
- 4.1.5. LMDH (L-malate déshydrogénase) ; (CAS 9001-64-3)

4.1.6. GOT (glutamate oxaloacétate transaminase) ; (CAS 9000-97-9)

4.1.7. Acide L-malique pureté $\geq 95\%$; (CAS 97-67-6)

4.1.8. Optionnel : Polyvinylpyrrolidone (PVP) ; (CAS 9003-39-8) (ou éventuellement PVPP (CAS 25249-54-1))

4.1.9. Hydroxyde de sodium ; (CAS 1310-73-2)

Remarque 1 : Il existe des kits commerciaux pour la détermination de l'acide L-malique. L'utilisateur se doit d'en vérifier la composition pour s'assurer que ceux-ci comprennent bien les réactifs indiqués ci-dessus.

Remarque 2 : L'utilisation de PVP est recommandée pour éliminer une éventuelle action négative des tanins du vin sur les molécules protéiques des enzymes. Dans le cas où l'utilisation de PVP n'est pas effective, le laboratoire doit s'assurer de l'absence d'interférence des tanins du vin sur les enzymes.

4.2. Solutions de travail

4.2.1 Tampon pH 10 (Glycylglycine 0,60 M, acide L-glutamique 0,1 M)

La préparation peut être la suivante :

- Glycylglycine (4.1.2) : 4,75 g
- Acide glutamique (4.1.3) : 0,88 g
- PVP (4.1.8) : 1 g
- Eau pour usage analytique (4.1.1) : 50 mL

Le mélange est ajusté à pH 10 avec une solution d'hydroxyde de sodium 10 M puis complété à 60 mL avec de l'eau pour usage analytique. Le tampon se conserve au moins 4 semaines à 2 - 8° C (environ).

4.2.2. Solution de travail R1 (exemple) :

- Eau pour usage analytique (4.1.1) : 12 mL
- NAD (4.1.4) : 420 mg

La solution se conserve au moins 4 semaines à 2 - 8° C (environ).

4.2.3. Solution de travail R2 (exemple) :

- Eau pour usage analytique (4.1.1) : 1,2 mL

- L-MDH (4.1.5) : 4800 U
- GOT (4.1.6) : 320 U

La solution se conserve au moins 4 semaines à 2 - 8° C (environ).

4.3. Solutions d'étalonnage

Afin d'assurer le raccordement au plus près au Système International d'Unité (S.I.) la gamme d'étalonnage doit être réalisée avec des solutions pures d'acide L-malique préparées par pesée et couvrant la gamme de mesure.

5. Appareillage

5.1. Analyseur

5.1.1. Type de matériel

Analyseur automatique séquentiel équipé d'un spectrophotomètre avec détecteur UV. La température de réaction doit être précisément régulée (en général 37°C). Les cuvettes de réaction sont en verre, en méthacrylate ou en quartz. L'équipement est piloté par un logiciel assurant son fonctionnement, l'acquisition des données et les calculs utiles.

5.1.2. Lecture des absorbances

La concentration des analytes est une fonction directe d'une différence d'absorbance lue par le spectrophotomètre. La précision de la lecture d'absorbance doit être au minimum de 0.1 unité d'absorbance (AU). Il est préférable de ne pas utiliser les valeurs d'absorbance supérieures à 2.0.

5.1.3. Précision des volumes prélevés

La précision des volumes de réactifs et d'échantillons prélevés par les pipettes de l'analyseur ont une influence sur le résultat de mesure. Un contrôle qualité des résultats par des stratégies adaptées (par exemple selon les guides publiés à l'OIV) est recommandé.

5.1.4. Durée et température de réaction

En général, le temps de réaction est de 10 minutes et la température de 37°C. Certains appareils peuvent utiliser des valeurs un peu différentes.

5.1.5. Utilisation d'un blanc réactif

La lecture des résultats se fait par comparaison de l'intensité lumineuse absorbée à la longueur d'onde choisie entre une cuvette dans laquelle la réaction est réalisée et une cuvette dans laquelle la réaction n'a pas lieu (blanc réactif).

5.1.6. Longueur d'onde

La longueur d'onde d'absorption maximale du NADH formé par la réaction est de 340 nm.

5.2. Balance

Celle-ci doit être raccordée au Système international d'unités et avoir une précision de 1 mg.

5.3. pH-mètre

5.4. Verrerie de mesure

Les verreries de mesure pour la préparation des réactifs et des solutions d'étalonnage sont de classe A.

6. Echantillonnage

6.1. Préparation des échantillons pour les moûts et les vins tranquilles

Dans la majorité des cas, les échantillons de vins et de moûts peuvent être analysés sans préparation. Dans certains cas une préparation peut être introduite :

- Une filtration ou une centrifugation doit être utilisée pour les échantillons fortement turbides.
- Une dilution de l'échantillon (manuelle ou automatique) avec de l'eau pour usage analytique doit être utilisée pour les valeurs supérieures à la gamme de mesure.

6.2. Préparation des échantillons de vins chargés en CO₂

Les échantillons de vins chargés en CO₂, peuvent produire des effets de bullage. Ils doivent être préalablement dégazés par agitation sous vide, passage aux ultrasons ou tout moyen permettant le dégazage requis.

7. Mode opératoire

Etant donné que des analyseurs différents peuvent être utilisés, il est recommandé que les conditions d'utilisation données par le constructeur soient strictement respectées. Cela est aussi valable pour les différents kits enzymatiques existant sur le marché.

Le mode opératoire se déroule de la façon suivante :

1. L'échantillon (E) est placé dans une cuvette de réaction,
2. La solution de travail R1 (4.2.2) est ensuite introduite dans la cuvette,
3. Une homogénéisation est réalisée. Un temps de latence est alors observé, afin de garantir la stabilité de l'absorbance. Ce temps de latence peut durer de 1 à 5 mn, il est défini par le laboratoire, en fonction des caractéristiques de l'équipement utilisé.
4. La solution de travail R2 (4.2.3) est ajoutée, et la réaction se déclenche.

A titre d'exemple, les quantités des différents éléments peuvent être :

- Echantillon : 2,5 µL
- Mélange de tampon (3.2.1) à 80% et R1 (3.2.2) à 20% : 120 µL
- R2 (3.2.3) : 15 µL

L'appareil effectue des mesures régulières qui permettent d'obtenir une courbe de réaction dont un exemple est donné dans la figure 1 :

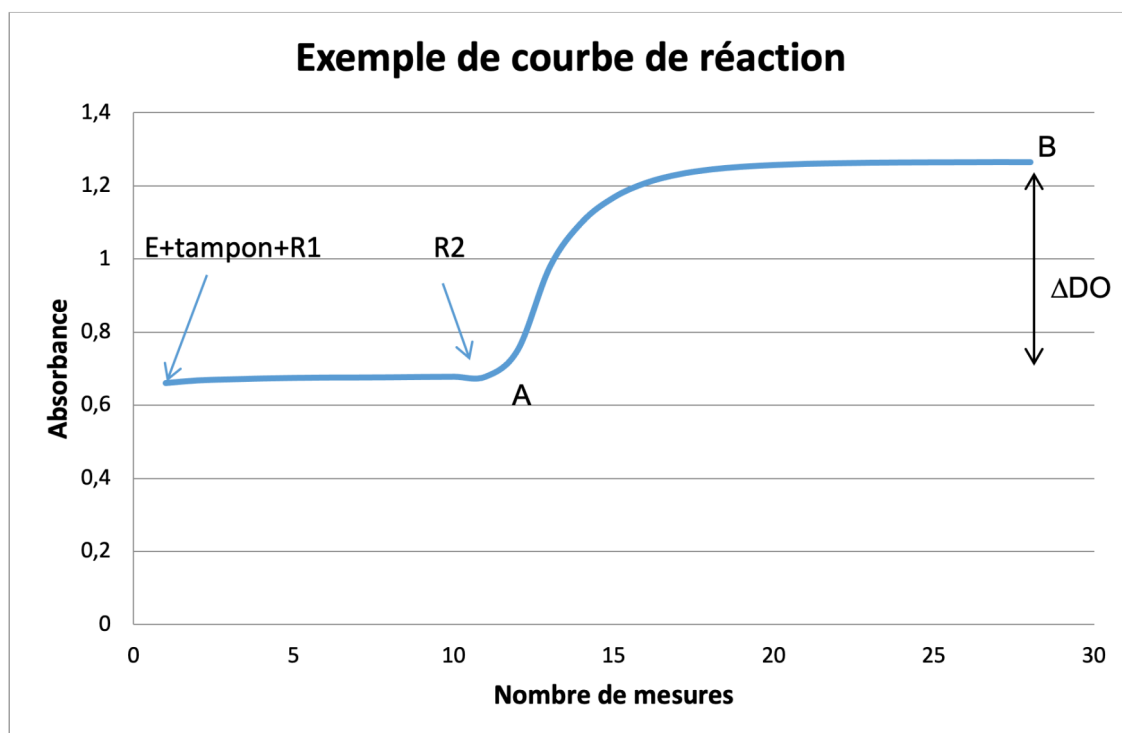


Figure 1 : Courbe de réaction

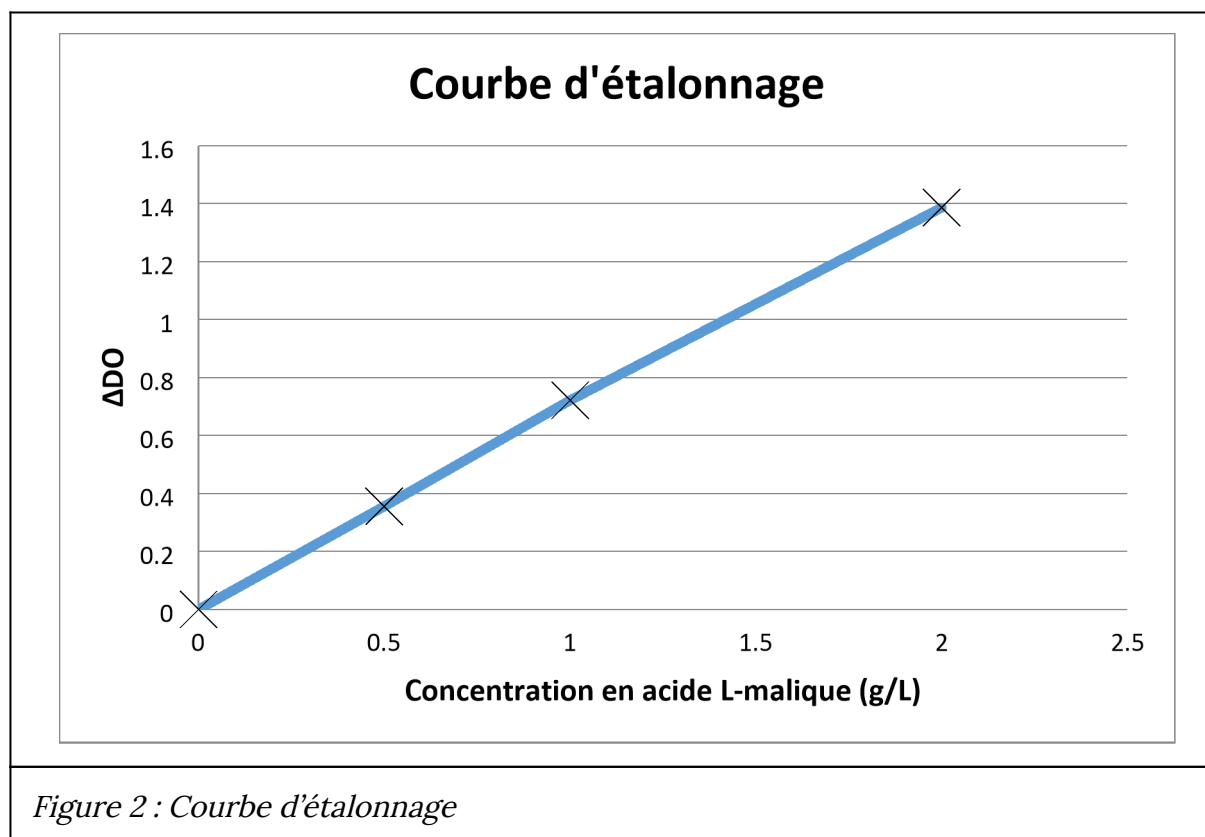
L'appareil permet de choisir les points de lecture de la différence d'absorbance recherchée, par exemple A et B dans la figure 1.

8. Calculs des résultats

La mesure utilisée pour la détermination du résultat est :

$$\Delta DO = (\text{Absorbance } B - \text{Absorbance } A)$$

Afin de corréliser cette valeur ΔDO à la concentration en acide L-malique recherchée, un étalonnage régulier de l'appareil est effectué en utilisant les solutions d'étalonnage (§4.3) en 3 points minimum recouvrant la gamme de mesure. Dans l'exemple donné en figure 2, la courbe d'étalonnage obtenue est une droite pour des valeurs allant de 0 à 2 g/L d'acide L-malique. Dans ce cas, pour des valeurs plus élevées, il est préférable de procéder à une dilution de l'échantillon. Par ailleurs, un blanc réactif est mis en œuvre comportant tous les réactifs, mais pas d'échantillon (point 0 de l'étalonnage).



La courbe d'étalonnage peut être d'ordre 1 ($Concentration = a.\Delta DO + b$) voire d'ordre 2 ($Concentration = a.\Delta DO^2 + b.\Delta DO + c$). Dans le cas d'utilisation d'une courbe d'étalonnage d'ordre 2, le laboratoire devra veiller à limiter le domaine d'étalonnage afin de maintenir une sensibilité suffisante de la méthode (risque d'écrasement de la courbe avec l'élévation de la concentration).

La valeur finale obtenue doit être multipliée par l'éventuel coefficient de la dilution utilisée.

9. Expression des résultats

Les résultats sont exprimés en g/L d'acide L-malique, avec deux décimales.

10. Précision

Reproductibilité interlaboratoire

$RSD_R = 5\%$ (à partir de 1 g/L)

$CV_R\% (k=2) = 2.RSD_R = 10\%$, (à partir de 1 g/L)

Répétabilité

$RSD_r = 2\%$ (à partir de 1 g/L)

$CV_r\% (k=2) = 2.RSD_r = 4\%$ (à partir de 1 g/L)

Limite de quantification

LQ validée = 0,12 g/L

(Concentration où $CV_R\% (k=2) = 60\%$)

ANNEXE

Résultats de l'étude interlaboratoire

Etude collaborative

16 Laboratoires de différents pays ont participé à l'étude collaborative organisée en 2016.

Labo	Pays
Miguel Torres S.A.- Finca Mas La Plana	ESPAGNE
Estación Enológica de Castilla y León	ESPAGNE
INGACAL -Consellería do Medio Rural Estación de Viticultura e Enoloxía de Galicia	ESPAGNE
Estación Enológica de Haro	ESPAGNE
Comissão de Viticultura da Região dos Vinhos Verdes	Portugal
Laboratoires Dubernet	France
Laboratoire Diœnos Rhône	France
Laboratoire Natoli	France
SCL Montpellier	France

Agricultural institute of Slovenia	SloveniE
Fachbereich: Wein, Weinüberwachung - Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Karlsruhe	ALLEMAGNE
HBLAuBA Wein - und Obstbau	AUTRICHE
Landesuntersuchungsamt Mainz	ALLEMAGNE
Hochschule GEISENHEIM University Institut Weinanalytik und Getränkeforschung	ALLEMAGNE
Unità Chimica Vitienologica e Agroalimentare - Centro Trasferimento Tecnologico - Fondazione Edmund Mach	ItaliE
Unione Italiana Vini soc. Coop.	ItaliE

2 x 10 échantillons en double aveugle ont été analysés, avec une répétition. Les vins analysés sont des vins originaires de France et du Portugal, vins secs et vins de liqueur.

Echantillon	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
position	1 9	2 13	3 4	5 15	6 10	16 20	7 11	12 17	8 19	14 18
Labo3	rep#1	1,12 1,09 2,16 2,21	0,08 0,08 1,38 1,39	0,16 0,16 0,05 0,04	0,07 0,06 1,31 1,35	1,24 1,27 0,07 0,07				
	rep#2	1,15 1,11 2,18 2,11	0,08 0,09 1,35 1,41	0,16 0,16 0,05 0,04	0,06 0,06 1,32 1,30	1,23 1,24 0,07 0,07				
Labo 6	rep#1	0,99 0,95 2,28 2,31	0,04 0,02 1,44 1,47	0,05 0,08 0,04 0,04	0,06 0,04 1,38 1,46	1,34 1,19 0,04 0,03				
	rep#2	0,93 0,93 2,15 2,16	0,05 0,03 1,23 1,37	0,08 0,09 0,03 0,05	0,03 0,04 1,28 1,30	1,20 1,28 0,03 0,03				
Labo7	rep#1	1,10 1,10 2,28 2,33	0,01 1,44 1,52 0,12	0,10 0,01	1,38 1,41 1,33 1,30	0,01 0,02				
	rep#2	1,13 1,13 2,35 2,33	0,03 0,04 1,47 1,49	0,14 0,13	0,02 1,40 1,43 1,32	1,33 0,02 0,03				
Labo9	rep#1	1,14 1,10 2,27 2,21	0,06 0,10 1,43 1,48	0,19 0,19 0,02 0,02	0,05 0,06 1,35 1,38	1,27 1,28 0,05 0,08				
	rep#2	1,15 1,20 2,20 2,23	0,10 0,06 1,50 1,51	0,15 0,14 0,03 0,01	0,09 0,11 1,31 1,37	1,22 1,28 0,04 0,06				
Labo12	rep#1	1,12 1,12 2,34 2,32	0,06 0,02 1,47 1,54	0,14 0,14 0,04 0,03	0,03 0,03 1,37 1,37	1,29 1,31 0,06 0,04				
	rep#2	1,12 1,12 2,38 2,34	0,07 0,01 1,46 1,46	0,16 0,19 0,04 0,05	0,03 0,04 1,32 1,33	1,28 1,30 0,06 0,04				
Labo13	rep#1	1,11 1,09 2,12 2,26	0,04 0,02 1,44 1,45	0,12 0,14 0,01 0,01	0,03 0,03 1,45 1,33	1,29 1,29 0,02 0,02				
	rep#2	1,18 1,17 2,20 2,29	0,03 0,01 1,47 1,50	0,11 0,12 0,02 0,03	1,39 1,38 1,32 1,33	0,01				
Labo 14	rep#1	1,32 1,30 2,66 2,68	1,69 1,67 0,08 0,08	1,65 1,60 1,51 1,52						
	rep#2	1,30 1,30 2,63 2,68	1,67 1,67 0,08 0,08	1,61 1,60 1,51 1,53						

Labo 15	rep#1	1,18	1,19	2,29	2,42	0,06	0,05	1,41	1,50	0,16	0,16	<i>0,04</i>	<i>0,04</i>	0,08	0,08	1,33	1,39	1,26	1,30	0,07	0,07
	rep#2	1,13	1,20	2,21	2,42	0,05	0,05	1,49	1,52	0,16	0,16	<i>0,04</i>	<i>0,04</i>	0,08	0,08	1,38	1,39	1,27	1,28	0,07	0,07
Labo16	rep#1	1,22	1,22	2,52	2,48			1,63	1,62	0,09	0,09					1,50	1,53	1,47	1,45		
	rep#2	1,21	1,20	2,45	2,55			1,62	1,61	0,09	0,09	<i>0,03</i>				1,52	1,51	1,44	1,45		
Labo17	rep#1	1,14	1,14	2,22	2,22	0,07	0,08	1,51	1,50	0,17	0,17	<i>0,07</i>	<i>0,07</i>	0,11	0,11	1,34	1,35	1,28	1,27	0,09	0,09
	rep#2	1,13	1,15	2,17	2,20	0,08	0,08	1,46	1,47	0,18	0,17	<i>0,08</i>	<i>0,07</i>	0,12	0,12	1,31	1,34	1,28	1,29	0,09	0,09
Labo18	rep#1	1,10	1,11	2,14	2,13	0,18	0,18	1,42	1,52	0,28	0,28	0,16	0,16	0,19	0,19	1,33	1,38	1,27	1,31	0,17	0,18
	rep#2	1,10	1,13	2,19	2,16	0,18	0,18	1,44	1,51	0,27	0,27	0,16	0,16	0,19	0,19	1,33	1,38	1,29	1,33	0,17	0,18
Labo19	rep#1	1,13	1,19	2,20	2,23	0,08	0,08	1,47	1,44	0,17	0,19	0,07	0,08	0,11	0,11	1,36	1,30	1,27	1,26	0,10	0,10
	rep#2	1,15	1,22	2,21	2,23	0,08	0,09	1,48	1,45	0,18	0,19	0,07	0,08	0,12	0,11	1,33	1,30	1,28	1,24	0,09	0,10
Labo20	rep#1	1,17	1,20	2,27	2,27	0,04	0,05	1,50	1,48	0,17	0,17	<i>0,04</i>	<i>0,03</i>	0,07	0,07	1,33	1,34	1,28	1,29	0,07	0,06
	rep#2	1,17	1,20	2,27	2,27	0,04	0,05	1,50	1,48	0,17	0,17	<i>0,04</i>	<i>0,03</i>	0,07	0,07	1,34	1,34	1,28	1,29	0,07	0,06
Labo21	rep#1	1,10	1,12	2,30	2,47	0,05	0,05	1,45	1,49	0,11	0,10	<i>0,05</i>	<i>0,05</i>	0,05	0,05	1,46	1,44	1,33	1,41	0,05	0,05
	rep#2	1,09	1,16	2,28	2,50	0,05	0,05	1,49	1,51	0,09	0,11	<i>0,05</i>	<i>0,05</i>	0,05	0,05	1,43	1,46	1,34	1,37	0,05	0,05
Labo22	rep#1	1,08	1,07	2,35	2,31	0,04	0,03	1,46	1,45	0,11	0,12	<i>0,01</i>	<i>0,02</i>	0,03	0,03	1,35	1,35	1,26	1,31	0,03	0,02
	rep#2	1,06	1,08	2,30	2,31	0,04	0,04	1,51	1,46	0,12	0,12	<i>0,01</i>	<i>0,03</i>	0,04	0,03	1,35	1,34	1,28	1,25	0,01	0,01

Tableau des données obtenues. Les valeurs en gras correspondent aux valeurs rejetées conformément au test de Cochran (variance aberrante) au niveau de rejet 2,5% (test unilatéral) et de Grubbs (moyennes aberrantes) au niveau de rejet de 2,5 % (test bilatéral).

Note : Les valeurs absentes n'ont pas été renseignées par le laboratoire concerné.

Echantillon	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Nb de laboratoires retenus	15	15	12	14	13	13	12	12	12	12
Nb de répétitions	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Mini	0,95	2,15	0,03	1,38	0,08	0,01	0,02	1,32	1,25	0,02
Maxi	1,31	2,66	0,08	1,68	0,28	0,08	0,19	1,45	1,36	0,10
Moyenne globale	1,14	2,30	0,05	1,49	0,14	0,04	0,07	1,36	1,29	0,05
Varianse de répétabilité	0,001	0,003	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000

Ecartype interlaboratoire	0,08	0,14	0,02	0,07	0,05	0,02	0,05	0,04	0,03	0,03
Variance de reproductibilité	0,006	0,021	0,001	0,006	0,003	0,000	0,002	0,002	0,001	0,001
Ecartype de répétabilité	0,03	0,05	0,01	0,03	0,01	0,01	0,01	0,03	0,02	0,01
Limite r	0,07	0,15	0,04	0,08	0,02	0,02	0,01	0,07	0,06	0,02
RSD _r répétabilité	2,2%	2,4%	25,0%	2,0%	6,2%	15,4%	7,4%	1,9%	1,6%	14,5%
Ecartype de reproductibilité	0,08	0,14	0,02	0,08	0,05	0,02	0,05	0,04	0,04	0,03
Limite R	0,22	0,41	0,07	0,21	0,16	0,06	0,14	0,12	0,10	0,08
RSD _R reproductibilité	6,9%	6,2%	46,9%	5,0%	39,1%	57,5%	71,2%	3,2%	2,8%	53,1%
Horwitz RSD _r	3,66	3,29	5,81	3,51	5,02	6,13	5,57	3,56	3,59	5,81
Horrat r	0,61	0,72	4,30	0,57	1,24	2,52	1,33	0,53	0,45	2,49
Horwitz RSD _R	5,55	4,99	8,80	5,32	7,60	9,29	8,44	5,40	5,44	8,81
Horrat R	1,25	1,25	5,33	0,95	5,14	6,19	8,43	0,59	0,51	6,02

Tableau des résultats obtenus

Note : Les résultats des échantillons C,F, G, et J sont à prendre avec réserve, en raison des niveaux très faibles de concentration, en dessous de la limite de quantification des laboratoires.

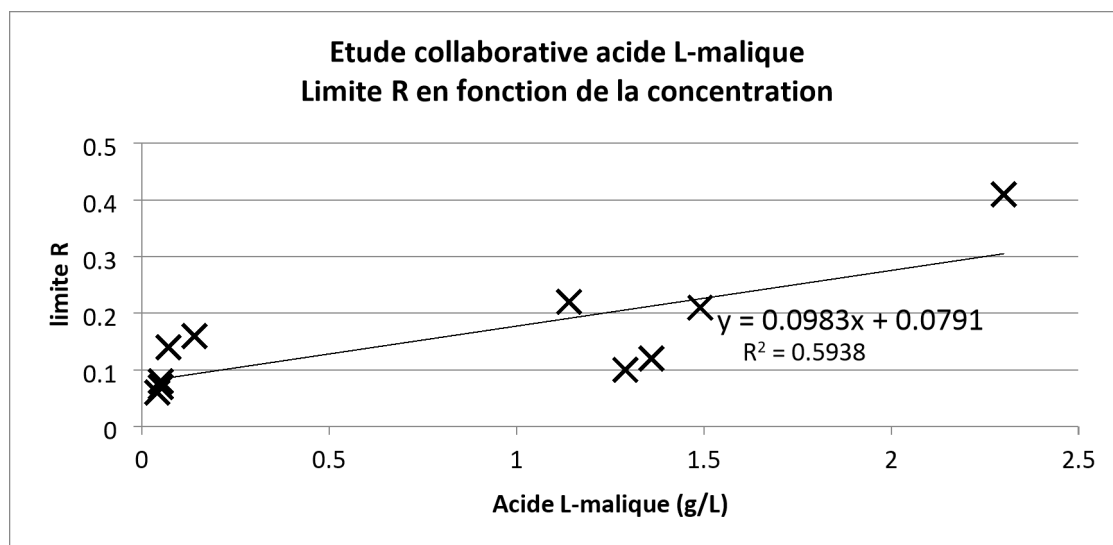


Figure 3 : Limite R en fonction de la concentration

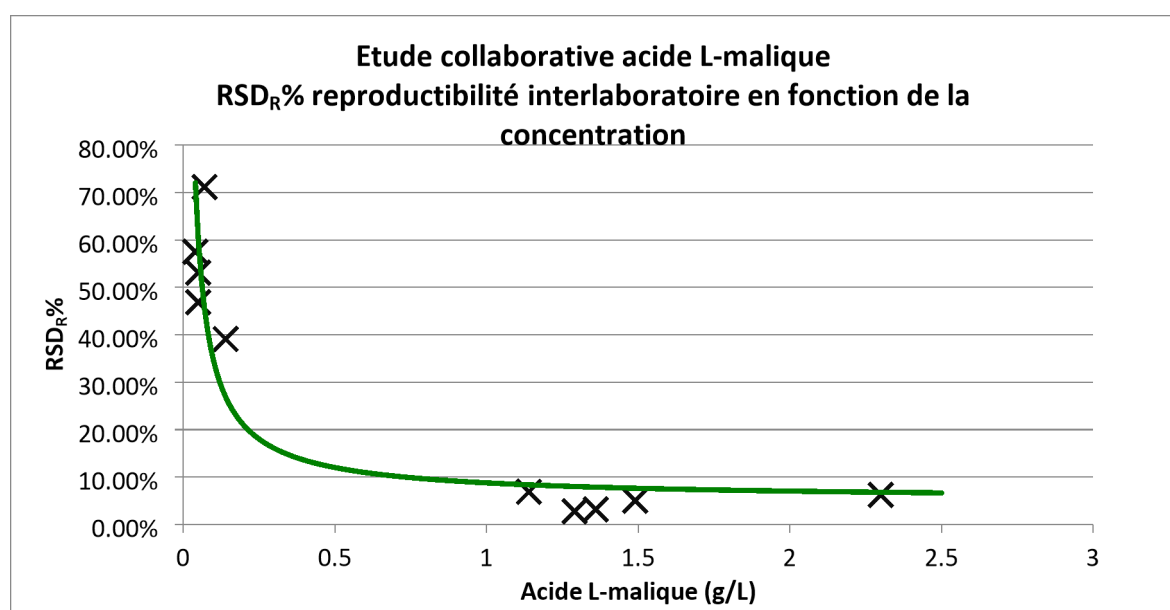


Figure 4 : RSD_R% en fonction de la concentration.

Modélisation : $CV\% = 3,763.C^{(-0,895)} + 5$