

RÉSOLUTION OIV-OENO 552-2016

DOSAGE DES SUCRES DANS LES MOUTS ET LES VINS PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE À HAUTE PERFORMANCE - MISE A JOUR DE LA METHODE OIV-MA-AS311-03

L'ASSEMBLÉE GÉNÉRALE

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,

SUR PROPOSITION de la Sous-commission « Méthodes d'analyse »,

DÉCIDE, sur proposition de la Commission II « Œnologie », de modifier la méthode OIV-MA-AS311-03 du *Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des mûts*, en apportant les modifications suivantes:

Méthode de type II^[1]

DOSAGE DES SUCRES DANS LES MOÛTS ET LES VINS PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE À HAUTE PERFORMANCE

1. DOMAINE D'APPLICATION

Cette méthode s'applique au dosage direct des sucres dans les mûts et les vins jusqu'à 20 g/L et après dilution au-delà.

Le glycérol (entre 0,5 et 15 g/L) et le saccharose (entre 1 et 40 g/L) peuvent également être dosés de la même manière.

2. PRINCIPE

Les sucres et le glycérol sont séparés par CLHP au moyen d'une colonne alkylamine et détectés par réfractométrie.

3. RÉACTIFS

- 3.1. Eau déminéralisée de type I (ISO 3696) ou équivalent (qualité CLHP) ;
- 3.2. Acétonitrile [75-05-8] (limite inférieure de transmission : 200 nm - pureté ≥ 99 %) ;
- 3.3. Fructose [57-48-7] (pureté ≥ 99 %) ;
- 3.4. Glucose [492-62-6] (pureté ≥ 99 %) ;

3.5. Saccharose [57-50-1] (pureté ≥ 99 %) ;

3.6. Glycérol [56-81-5] (pureté ≥ 99 %).

PRÉPARATION DES SOLUTIONS RÉACTIVES

3.9. Eau déminéralisée (3.1) : filtrée sur une membrane en cellulose de 0,45 μm ;

3.10. Éluant : acétonitrile (3.2)/eau (3.9) dans un rapport de 80/20.

Note 2: le rapport eau/acétonitrile peut être adapté en fonction des objectifs.

4. APPAREILLAGE

4.1. Membrane de filtration 0,45 μm en cellulose ;

4.2. Cartouche de filtration en silice greffée par des groupes octadécyles (par ex., Sep-Pak C₁₈) ;

4.3. Appareillage courant de chromatographie liquide à haute performance ;

4.4 . Colonne alkylamine (5 μm , 250 x 4,6 mm) ;

Note 3 : il est possible d'utiliser des colonnes de longueurs, de diamètres internes et de tailles des particules différentes, mais la méthode de type II se réfère aux valeurs fournies.

4.5. Détecteur d'indice réfractométrique (RID) ;

4.6. Matériel courant de laboratoire.

5. ÉCHANTILLONNAGE

Les échantillons sont préalablement dégazés si nécessaire (par exemple avec de l'azote ou de l'hélium ou dans un bain à ultrasons).

6. MODE OPÉRATOIRE

6.1. Préparation de l'échantillon

6.1.1. Dilution

Les vins contenant moins de 20 g/L de (glucose + fructose) sont analysés sans dilution. Les moûts et les vins contenant plus de 20 g/L doivent être dilués jusqu'à atteindre la plage d'étalonnage.

6.1.2. Filtration

Filtrer les échantillons sur membrane de 0,45 μm (4.1) avant analyse.

6.1.3. Élimination des composés phénoliques (si nécessaire)

Pour un moût ou un vin : passer sur une cartouche de filtration C₁₈ (4.2).

6.2. Analyses

6.2.1. Conditions analytiques

Note 4 : Les instructions suivantes sont à caractère obligatoire pour la méthode de type II.

Note 5 : Les conditions peuvent être adaptées par le laboratoire avec perte de la référence à la méthode de type II.

Système CLHP (4.3) équipé d'une colonne (4.4) et d'un RID (4.5).

Phase mobile : éluant isocratique - acétonitrile/eau (3.10).

Débit : 1 mL/min.

Volume injecté : entre 10 et 50 µL à adapter selon le matériel utilisé.

Des exemples de chromatogrammes sont montrés en annexe B, figures 1 et 2.

Il est recommandé que la résolution fructose-glucose soit ≥ 2 .

6.2.2. Étalonnage externe

La solution d'étalonnage pour tous les composés décrits dans cette procédure peut contenir :

- glycérol (3.6) 10 g/L $\pm$ 0,01 g/L,
- fructose (3.3) 10 g/L $\pm$ 0,01 g/L,
- glucose (3.4) 10 g/L $\pm$ 0,01 g/L,
- saccharose (3.5) 10 g/L $\pm$ 0,01 g/L.

Note 6 : en cas de quantification d'un seul de ces composés, il est possible de préparer une solution ne contenant que celui requis.

6.3. Calcul des facteurs de réponse pour l'étalonnage externe utilisé pour les analyses de routine

$$RF_i = \text{surface}_i / C_i$$

où :

surface_i = surface du pic du produit dans la solution d'étalonnage,

et C_i = quantité du produit présent dans la solution d'étalonnage.

Il est également possible d'utiliser une courbe d'étalonnage.

7. EXPRESSION DES RÉSULTATS

7.1. Calcul des concentrations

$$C_e = \text{surface}_e / RF_i$$

où :

surface_e = surface du pic du produit présent dans l'échantillon.

Les résultats sont exprimés en g/L.

Note 7 : les résultats sont indiqués avec au maximum une décimale.

8. ASSURANCE QUALITÉ ET CONTRÔLE

- A. Le raccordement aux étalons internationaux se fait par la masse, le volume et la température
- B. Des mélanges synthétiques ou des échantillons provenant, par exemple, de circuit d'aptitude sont utilisés comme contrôle qualité interne. Des cartes de contrôle peuvent être tracées.

9. PERFORMANCES DE LA MÉTHODE

Aucun composé connu ne coélue avec le fructose, le glucose ou le saccharose.

Robustesse : l'analyse est sensible à de faibles variations de température. Les colonnes doivent être protégées des variations de température.

10. FIDÉLITÉ

(Voir annexe B.3)

10.1. Glucose (teneurs ≥ 3 g/L)

Limite de répétabilité $\square$ limite de reproductibilité = 13%

10.2. Fructose (teneurs ≥ 2 g/L)

Limite de répétabilité = 7%

Limite de reproductibilité = 10%

10.3. Glucose + fructose (teneurs ≥ 5 g/L)

Limite de répétabilité $\square$ limite de reproductibilité = 10%

Annexe A

(informative)

Exemples de chromatogrammes CLHP

Annexe A (informative) Exemples de chromatogrammes CLHP

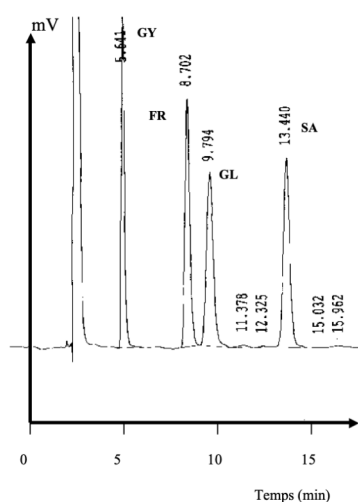


Figure 1 - Chromatogramme d'une solution étalon (sucres et glycérol à 10 g/L.)

Glycérol (GY), fructose (FR), glucose (GL), saccharose (SA)

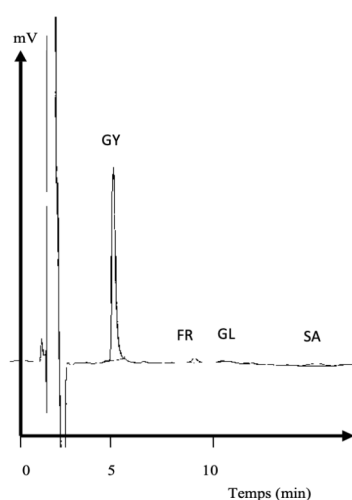


Figure 2 - Chromatogramme d'un vin rosé

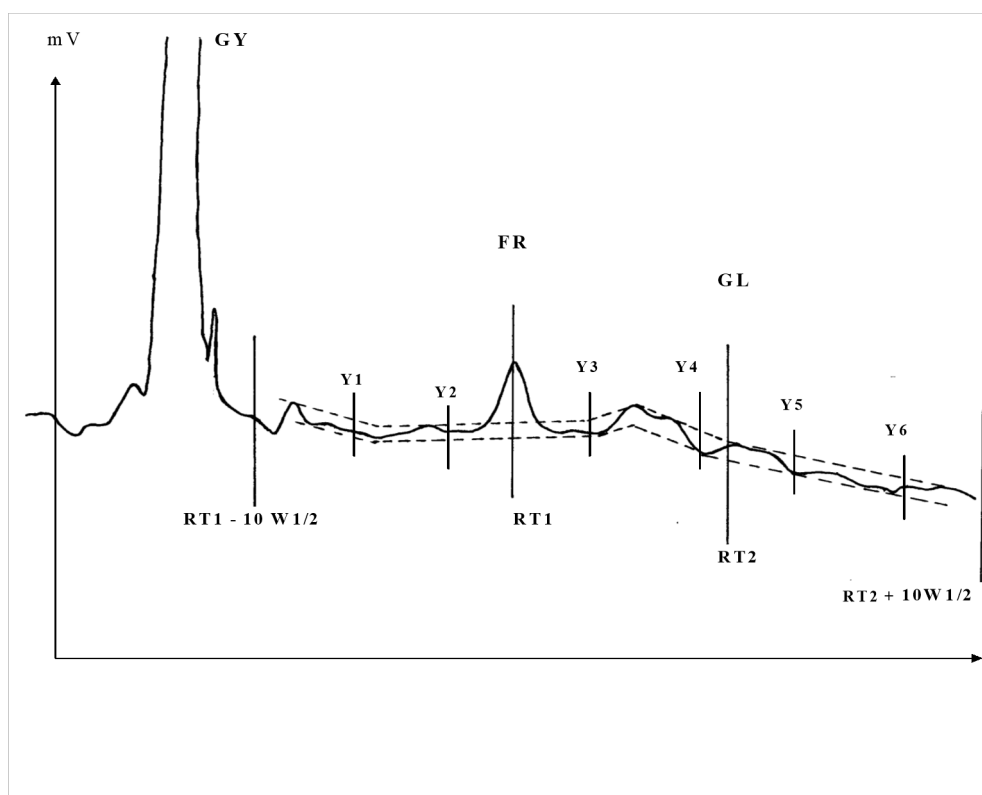


Figure 3 – Mesure des hauteurs du bruit de fond après agrandissement du chromatogramme.

Fructose (FR), glucose (GL), saccharose (SA), Glycérol (GY),

RT1 : temps de rétention du fructose ; RT2 : temps de rétention du glucose

W1/2 : largeur du pic à mi-hauteur ; Yi : hauteur du bruit de fond au point i

Annexe B

(informative)

Données de fidélité

B.1 - Echantillons de l'essai inter laboratoire

Cette étude a été conduite par le Laboratoire Interrégional de la Répression de Fraudes de Bordeaux. L'essai a porté sur 12 échantillons (6 échantillons différents répliqués en aveugle) identifiés de A à J (4 vins blancs et 4 vins rouges ; 2 vins de Porto blancs et 2 vins de Porto rouges) contenant du glucose et du fructose et dont les teneurs en chaque sucre étaient comprises entre 2 et 65 g/L. Les vins provenant de la région de Bordeaux ont été supplémentés en glucose et fructose et stabilisés par 100 mg/L de SO₂ (TRICARD et MEDINA 2003).

B.2 - Conditions chromatographiques

Compte tenu des facteurs de réponse de ces deux sucres et des échelles des chromatogrammes, le bruit de fond correspond à une concentration en fructose de 0,04 g/L et en glucose de 0,06 g/L (voir figure A3).

On obtient alors les seuils de détection (3 fois le bruit de fond) et de quantification (10 fois le bruit de fond) :

- LD fructose = 0,12 g/L
- LD glucose = 0,18 g/L
- LQ fructose = 0,4 g/L
- LQ glucose = 0,6 g/L

Ces résultats sont conformes à ceux déterminés par TUSSEAU et BOUNIOL (1986) et répétables sur d'autres chromatogrammes.

B.3 - Fidélité

Neuf laboratoires ont participé à cette étude :

Neuf laboratoires ont participé à l'étude interlaboratoire:

Istituto Sperimentale Per L'Enologia, Asti, Italie ;

Laboratoire de la DGCCRF de Montpellier, France ;

Laboratoire LARA, Toulouse, France ;

Instituto do vinho do Porto, Porto, Portugal ;

Instituto de Vinha E Do Vinho, Unhos, Portugal ;

Estacion de Viticultura y Enologia, Vilafranca del Penedes, Espagne ;

Comité Interprofessionnel du vin de Champagne, Epèrnay, France ;

Station fédérale de Changins, Suisse ;

Laboratoire de la DGCCRF de Talence, France.

Les analyses des 3 points de gamme d'étalonnage et des 12 échantillons ont été réalisées à la suite en appliquant la méthode d'analyse transmise.

Les résultats ont été exploités selon le protocole OIV (Protocole de validation des méthodes d'analyse – Résolution OENO 6/1999).

Ce protocole demande que les analyses ne soient pas répétées ; or, 4 laboratoires ont transmis les résultats des analyses répétées 3 fois. Une seule série a été choisie (la première) pour l'exploitation des résultats conformément au protocole OIV.

Les calculs de répétabilité selon Youden, de reproductibilité et les tests de Cochran et de Grubbs ont été effectués.

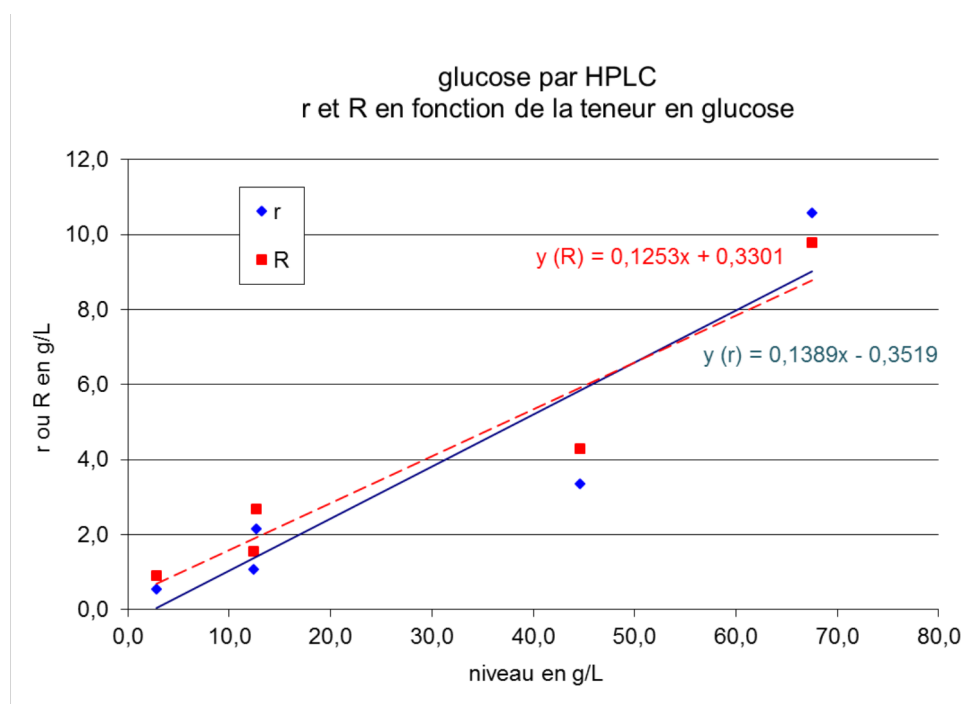
Les données sur les répétitions ont permis de calculer d'une autre manière les écarts-type de répétabilité (selon ISO 5725).

B.3.1 – GLUCOSE

Glucose par HPLC (en g/L)						
Nombre de laboratoires	9	9	9	9	9	9
Nombres d'échantillons	2	2	2	2	2	2
Valeur moyenne	2,9	2,9	12,6	12,4	44,6	67,5
Ecart-type de répétabilité	0,44	0,17	0,67	0,34	1,05	3,31
Limite de répétabilité	1,42	0,55	2,15	1,07	3,35	10,58
Ecart-type de reproductibilité	0,78	0,30	0,90	0,52	1,43	3,28
Limite de reproductibilité	2,32	0,90	2,68	1,55	4,28	9,78

Valeur Horrat	5,7*	2,1	1,84	1,08	1,01	1,62
---------------	------	-----	------	------	------	------

* non pris en compte pour l'expression de la fidélité

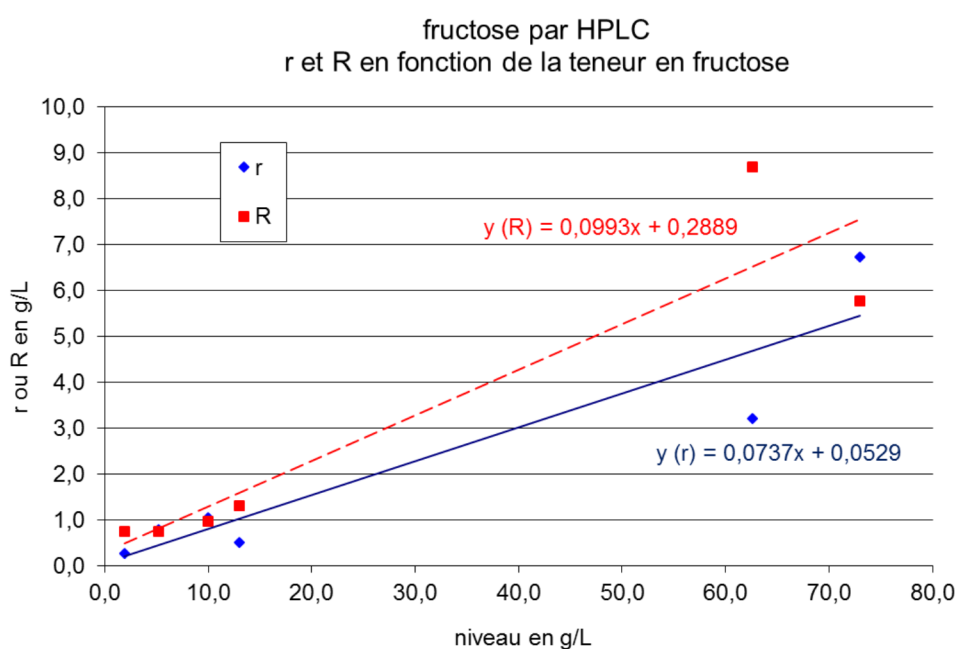


Corrélation entre r et R et la concentration pour le glucose (ISO 5725)

B.3.2 – FRUCTOSE

Fructose par HPLC (en g/L)						
Nombre de laboratoires	9	9	9	9	9	9
Nombres d'échantillons	2	2	2	2	2	2
Valeur moyenne	1,9	5,2	10,0	13,0	62,6	73,0
Ecart-type de répétabilité	0,09	0,24	0,32	0,16	3,20	2,10

Limite de répétabilité	0,27	0,79	1,03	0,51	3,20	6,72
Ecart-type de reproductibilité	0,25	0,25	0,32	0,43	2,91	1,93
Limite de reproductibilité	0,75	0,75	0,96	1,30	8,68	5,77
Valeur Horrat	2,54	1,09	0,81	0,87	1,53	0,89



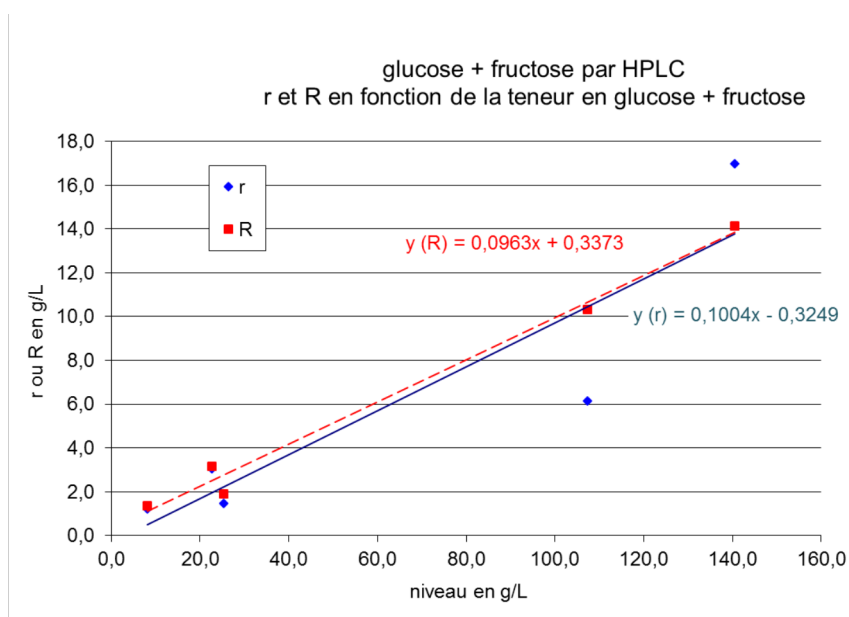
Corrélation entre r et R et la concentration pour le fructose (ISO 5725)

B.3.3 – GLUCOSE + FRUCTOSE

Glucose + fructose par HPLC (en g/L)						
Nombre de laboratoires	9	9	9	9	9	9
Nombres d'échantillons	2	2	2	2	2	2

Valeur moyenne	4,7	8,1	22,6	25,4	107,3	140,5
Ecart-type de répétabilité	0,48	0,38	1,06	0,46	1,92	5,30
Limite de répétabilité	1,52	1,21	3,07	1,48	6,13	17,0
Ecart-type de reproductibilité	0,89	0,46	1,06	0,64	3,47	4,74
Limite de reproductibilité	2,64	1,38	3,17	1,90	10,34	14,15
Valeur Horrat	4,17*	1,39	1,33	0,72	1,15	1,26

* non pris en compte pour l'expression de la fidélité



Corrélation entre r et R et la concentration pour le glucose + fructose (ISO 5725)

Bibliographie

1. TRICARD C. et MEDINA B. (2003) : Essai inter laboratoire OIV – Dosage des sucres dans les vins par HPLC. Feuille Vert n°1143, 8 pages.
2. TUSSEAU D. et BOUNIOL C., 1986. Sc. Alim., 6, 559-577.
3. TUSSEAU D., 1996. *Limite de détection - limite de quantification*. Feuille vert OIV 1000.
4. *Protocole pour la planification, la conduite et l'interprétation des études de performance des méthodes d'analyse*. Résolution OIV-OENO 6-2000.
5. Norme ISO 5725 (1994) : *Application de la statistique - Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure -...*

^[1] Type II pour le glucose et le fructose. Type IV pour le saccharose et le glycérol.