

RÉSOLUTION OIV-OENO 419C-2015

MÉTHODES SPÉCIFIQUES POUR L'ANALYSE DU SUCRE DE RAISIN (MOÛTS DE RAISIN CONCENTRÉS RECTIFIÉS) □ DOSAGE DU MÉSO-INOSITOL, DU SCYLLO-INOSITOL ET DU SACCHAROSE

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,

CONSIDÉRANT les travaux de la Sous-commission « Méthodes d'analyses » sur la mise à jour du Recueil avec des méthodes spécifiques de l'analyse du sucre de raisin (moûts de raisin concentrés rectifiés,

CONSIDÉRANT la résolution OENO 47-2000 concernant les spécifications des moûts concentrés et rectifiés, les méthodes correspondantes et la nécessité de mettre à jour ces méthodes,

ÉTANT DONNÉ que les méthodes suivantes sont déjà reconnues par les autorités internationales,

DÉCIDE de créer une annexe F intitulée « Méthodes spécifiques pour l'analyse des moûts de raisin concentrés rectifiés »,

DÉCIDE d'insérer en annexe F du *Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts*, les méthodes décrites ci-après,

DÉCIDE donc d'adapter la résolution OENO 47-2000 incluse dans le *Codex œnologique international*.

Méthodes spécifiques pour l'analyse DU SUCRE DE RAISIN (moûts de raisin concentrés rectifiés) - Dosage du méso-inositol, du scyllo-inositol et du saccharose

ANNEXE F : MÉSO-INOSITOL, SCYLLO-INOSITOL ET SACCHAROSE

1. PRINCIPE

Le moût concentré rectifié (MCR) est principalement composé des sucres, des polyalcools et de l'eau contenus dans les raisins. Tous les autres composés organiques

et minéraux sont éliminés au cours du processus de rectification.

Le méso-inositol, le scyllo-inositol et le saccharose sont dosés par chromatographie en phase gazeuse après la silanisation.

Le saccharose possiblement présent en faibles quantités dans le MCR est stable pour plusieurs mois, l'hydrolyse étant fortement ralentie par l'absence d'acidité due à l'élimination des acides organiques et minéraux lors du processus de rectification, par la teneur en eau extrêmement faible ainsi que par les teneurs élevées en fructose et glucose.

2. RÉACTIFS

2.1. Xylitol (n° CAS 87-99-0)

Étalon interne : solution aqueuse de concentration connue avec exactitude d'environ 10 g/L préparée sur le moment ;

2.2. Méso-inositol ($C_6H_{12}O_6$) (n° CAS 87-89-8) ;

2.3. Scyllo-inositol ($C_6H_{12}O_6$) (n° CAS 488-59-5) ;

2.4. Glucose ($C_6H_{12}O_6$), fructose ($C_6H_{12}O_6$), saccharose ($C_{12}H_{22}O_{11}$) ;

2.5. Bistriméthylsilyltrifluoroacétamide - BSTFA - ($C_8H_{18}F_3NOSi_2$) (n° CAS 25561-30-2)

Avertissement : ce produit est inflammable et dangereux. Les liquides et vapeurs inflammables peuvent provoquer des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves. Porter des vêtements/gants de protection. Protéger les yeux et le visage ;

2.6. Triméthylchlorosilane (C_3H_9ClSi) □ (TMCS) □ (n° CAS 75-77-4)

Avertissement : ce produit est inflammable et dangereux. Nocif pour la peau. Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves. Toxique en cas d'inhalation. Peut irriter les voies respiratoires. Maintenir éloigné des sources de chaleur/étincelles/flammes nues/surfaces chaudes. Ne pas fumer. Éviter toute inhalation des vapeurs. Porter des vêtements/gants de protection. Protéger les yeux et le visage ;

2.7. Pyridine p.a. (C_5H_5N) (n° CAS 110-86-1)

Avertissement : ce produit est inflammable et dangereux. Nocif en cas d'inhalation, de contact avec la peau ou d'ingestion ;

2.8. Éthanol absolu (C_2H_6O) (n° CAS 64-17-5)

Avertissement : ce produit est inflammable et dangereux. Le liquide et les vapeurs sont facilement inflammables. Maintenir éloigné des sources de chaleur/étincelles/flammes nues/surfaces chaudes. Ne pas fumer ;

2.9. Eau de type 1 conforme à la norme ISO 3696 ou eau déionisée d'une résistivité $\geq 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$;

2.10. Le réactif de silanisation peut également être trouvé prêt à l'emploi sous forme de kit (par ex. HMDS+TMCS+Pyridine 3:1:9 Supelco cod. 33038) ;

2.11 . Gaz techniques : azote, hydrogène, hélium et air pour le chromatographe en phase gazeuse et pour les phases de déshydratation.

3. MATÉRIEL ET APPAREILLAGE

3.1. Chromatographe en phase gazeuse

3.2. Colonne capillaire capable de garantir une efficacité minimale de 250 000 plaques/colonne pour le saccharose à 1 g/L.

Par exemple, OV-1 (25 m x 0,30 mm x 0,15 μm) ou DB-5 (60 m x 0,25 mm x 0,10 μm).

Conditions opératoires (à titre d'exemple) :

- Gaz vecteur : hydrogène ou hélium pur pour chromatographie en phase gazeuse,

Hydrogène ▯ Avertissement : il s'agit d'un gaz extrêmement inflammable. Stocker dans un conteneur placé dans un endroit bien aéré et maintenir éloigné de toute flamme ou étincelle. Ne pas fumer. Éviter l'accumulation de charges électrostatiques.

- Débit du gaz vecteur : 2 mL/min environ,
- Température de l'injecteur : 250 °C,
- Température du détecteur à ionisation de flamme (FID) : 300 °C,
- Programmation de température : 1 minute à 160 °C, 4 °C/minute jusqu'à 260 °C, isotherme à 260 °C pendant 15 minutes,
- Rapport de dissociation : 1 à 20 environ,
- Gaz auxiliaires : hydrogène pur et air pour chromatographie en phase gazeuse.

3.3. Intégrateur

3.4. Seringue micrométrique 10 μL

3.5. Micropipettes de 10, 100, 400 et 1000 μL

3.6. Flacons de 2 mL avec un bouchon en téflon

3.7. Étuve

3.8. Balance technique, balance analytique capable de garantir une exactitude de ± 1 mg

3.9. Fioles jaugées de 50 et 100 mL

3.10 Séchoir

4. MODE OPÉRATOIRE

4.1. Préparation de l'échantillon

Dans une fiole de 50 mL, peser une quantité « p » de moût concentré rectifié située entre 4,9 et 5,1 g, en notant la masse de la substance avec une précision de $\pm 0,1$ mg.

Puis additionner 1 mL de solution-étalon de xylitol (2.1) et mettre à niveau avec de l'eau (2.9).

4.2. Déshydratation de l'échantillon

Après homogénéisation, prélever 100 μ L de solution et l'introduire dans un flacon (3.6) et la laisser sécher dans un léger courant d'azote.

Il est possible d'additionner 100 μ L d'éthanol absolu (2.8) afin de faciliter l'évaporation.

Remarque 1 : si une dose de saccharose précise est souhaitée, la solution diluée doit être préparée juste avant la silanisation afin de limiter l'hydrolyse du saccharose dans la solution aqueuse diluée.

Remarque 2 : les mesures successives de la teneur en saccharose doivent être réalisées sur des solutions diluées préparées systématiquement avant chaque silanisation.

4.3. Dérivatisation

Dissoudre soigneusement le résidu dans 100 μ L de pyridine (2.7), ajouter 100 μ L de bistriméthylsilyltrifluoroacétamide (2.5) et 10 μ L de triméthylchlorosilane (2.6). Fermer le flacon avec le bouchon de téflon et placer en étuve à 70 °C pendant 70 minutes.

Extraire les flacons bouchés de l'étuve et laisser refroidir dans un séchoir, à l'obscurité et à température ambiante, pendant une heure avant injection dans le chromatographe en phase gazeuse.

La substance silanisée conservée dans les flacons bouchés et maintenue à l'obscurité et à température ambiante est stable pour trois jours.

Remarque 3 : en cas d'utilisation du kit de silanisation, utiliser 400 μ L de réactif pour chaque 100 μ L d'échantillon dilué et déshydraté conformément au paragraphe 4.1.

Remarque 4 : la silanisation est considérée comme atteinte si la solution se présente en une seule phase limpide ou laisse un léger résidu blanc. Aucun résidu foncé ne devrait être présent, car cela indiquerait un excès de sucres non dérivés ou une substance de silanisation âgée.

Remarque 5 : en cas de présence d'une suspension blanche, attendre jusqu'à ce que la matière solide se dépose au fond de la fiole sans centrifugation.

4.4. Analyse chromatographique en phase gazeuse

Prélever 1 μL avec une seringue (3.4) et injecter dans le chromatographe avec le rapport de dissociation susmentionné.

Le chromatogramme ne doit pas présenter une superposition des pics (signe d'une silanisation incorrecte), mais des pics caractéristiques similaires à ceux illustrés dans les figures jointes (fig.9-fig.12).

4.5. Critères d'intégration des pics

Intégrer les pics chromatographiques en phase gazeuse par rapport à ligne de base. En cas de pics non parfaitement définis, tracer la ligne de base à partir des vallées les plus profondes qui délimitent le pic en question. Tracer une ligne verticale vers le bas à partir de la vallée des pics jusqu'à la ligne de base afin d'identifier l'aire du pic.

Ne pas utiliser la méthode vallée à vallée.

Un exemple d'application de ces critères est fourni dans la figure 10 pour l'étalon interne, dans la figure 11 pour les inositols et dans la figure 12 pour le saccharose.

Remarque 6 : si une dose de saccharose précise est souhaitée, il s'avère important de respecter les critères d'intégration indiqués au paragraphe 4.4 et présentés dans la figure 12.

5. CALCULS

5.1. Calcul des facteurs de réponse

Note : Une courbe d'étalonnage peut être utilisée en alternative au calcul des facteurs de réponse.

5.1.1. Préparer une solution contenant :

- 60 g/L de glucose,
- 60 g/L de fructose

- 1 g/L de méso-inositol,
- 1 g/L de saccharose,

peser 60 g de glucose et 60 g de fructose avec une fidélité de $\pm 0,1$ g, puis 1 g de méso-inositol et 1 g de saccharose avec une précision de $\pm 0,1$ mg et porter enfin le volume à 1 L avec de l'eau.

5.1.2. Silanisation de la solution de référence

Réaliser les opérations décrites au paragraphe 4.1 en commençant avec 5 mL de cette solution au lieu des 5 g de MCR

Prélever 5 mL de cette solution et procéder conformément au paragraphe 4.

5.1.3. Facteurs de réponse chromatographique en phase gazeuse

À partir du chromatogramme obtenu, calculer les facteurs de réponse du méso-inositol et du saccharose par rapport au xylitol.

Pour le scyllo-inositol, dont le temps de rétention est compris entre le dernier pic des formes anomériques du glucose et celui du méso-inositol (voir figure 11), utiliser le même facteur de réponse que celui du méso-inositol.

Où : $A_{\text{méso-inositol}}$ = aire du pic de méso-inositol ; $A_{\text{saccharose}}$ = aire du pic de saccharose ; A_{ei} = aire du pic de l'étalon interne ; $C_{\text{méso-inositol}}$ = concentration du méso-inositol en mg/L ; $C_{\text{saccharose}}$ = concentration du saccharose en mg/L ; C_{ei} = concentration de l'étalon interne en mg/L, résultant en la formule suivante :

$$FR_{\text{méso-inositol}} = \frac{A_{\text{méso-inositol}}}{A_{\text{ei}}} \times \frac{C_{\text{ei}}}{C_{\text{méso-inositol}}}$$

$$FR_{\text{saccharose}} = \frac{A_{\text{saccharose}}}{A_{\text{ei}}} \times \frac{C_{\text{ei}}}{C_{\text{saccharose}}}$$

La solution pour le calcul des facteurs de réponse doit être préparée et analysée le même jour (voir remarque 1 au paragraphe 4.1).

5.2. Expression des résultats

Le méso-inositol, le scyllo-inositol et le saccharose sont exprimés en milligrammes par kilogrammes de sucres totaux (mg/kg ST), avec au moins deux chiffres significatifs et sans décimale.

5.2.1. Concentrations exprimées en mg/L pour la solution de MCR à 10 % (m/v) (4.1) :

$$C_{\text{mésos-inositol}}\left(\frac{\text{mg}}{\text{l}}\right) = \frac{C_{ei}}{FR_{\text{mésos-inositol}}} \times \frac{A_{\text{mésos-inositol}}}{A_{ei}}$$

$$C_{\text{saccharose}}\left(\frac{\text{mg}}{\text{l}}\right) = \frac{C_{ei}}{FR_{\text{saccharose}}} \times \frac{A_{\text{saccharose}}}{A_{ei}}$$

5.2.2. Concentrations exprimées en mg/kg de sucres totaux (mg/kg ST) pour le méso-inositol, le scyllo-inositol et le saccharose dans le MCR.

Avec « i » correspondant à l'un ou l'autre des trois composés :

$$CONC_i\left(\frac{\text{mg}}{\text{kg ST}}\right) = C_i \times \frac{5000}{p \times G}$$

Où « p » est le poids en g du MCR et « G » la teneur en sucres du MCR exprimée en °Brix [° % (m/m) of sucrose]. La teneur en sucres de l'échantillon de MCR doit être mesurée en suivant la méthode OIV-MA-AS2-02.

6. CARACTÉRISTIQUES DE LA MÉTHODE

6.1. Points critiques

Cette méthode se rapporte à l'analyse des sucres et des polyalcools présents en quantités extrêmement faibles dans une matrice de glucose et fructose en concentrations très élevées. Il s'avère donc nécessaire de contrôler la capacité de la méthode à fournir des réponses linéaires dans l'intervalle de concentration proposé et avec une exactitude suffisante par rapport aux valeurs connues.

D'autre part, la méthode permet l'analyse chromatographique en phase gazeuse des substances silanisées obtenues par dérivation des sucres. Ces composés sont sensibles à l'humidité et tendent à se détériorer avec le temps. Il s'avère donc important de contrôler le respect des instructions en termes de conservation et de manipulation de ces composés.

Enfin, le saccharose est sujet à une hydrolyse en raison de la quantité d'eau résiduelle contenue dans le MCR (entre 30 et 45 %). Néanmoins, la faible acidité de la matrice et la concentration élevée en glucose et fructose ralentit le processus d'hydrolyse et

permet de procéder à des mesures exactes. Il s'avère donc important de contrôler que les temps d'analyse soient rapides par rapport au processus d'hydrolyse afin de permettre de procéder à des mesures répétées du saccharose.

6.2. Linéarité

Une série de six échantillons synthétiques ont été préparés (blanc compris), contenant une matrice de glucose et de fructose obtenue en pesant des quantités similaires des deux sucres par rapport à une teneur en sucres totaux de 60 % (m/m) dans le MCR initial.

Des quantités précises et croissantes de méso-inositol et de saccharose ont été additionnées à cinq de ces échantillons synthétiques afin d'atteindre les concentrations indiquées dans le tableau suivant :

concentration additionnée		
n°	méso-inositol	saccharose
	(mg/kg ST)	(mg/kg ST)
1	0 (blanc)	0 (blanc)
2	214,7	427,3
3	420,0	857,7
4	840,2	1675,8
5	1727,0	3338,0
6	2514,0	6719,0

Les échantillons ont été ensuite dilués (4.1), la solution diluée déshydratée (4.2), silanisée (4.3) et analysée par CPG (4.4 et 4.5).

Les échantillons ont été ensuite silanisés et analysés par CPG. Les résultats ont été contrôlés en termes de linéarité ; le graphique suivant montre le rapport entre les aires des pics de méso-inositol et celles de l'étalon interne ($A_{\text{méso}}/A_{\text{ei}}$), ainsi que le rapport entre les concentrations (en mg/L) en méso-inositol et celles de l'étalon

interne en ($C_{\text{més}}/C_{\text{ei}}$). L'analyse CPG a été réalisée en double, les données présentées ci-après correspondant à la moyenne des deux valeurs.

Le même traitement a été appliqué au saccharose, avec pour résultat le graphique correspondant.

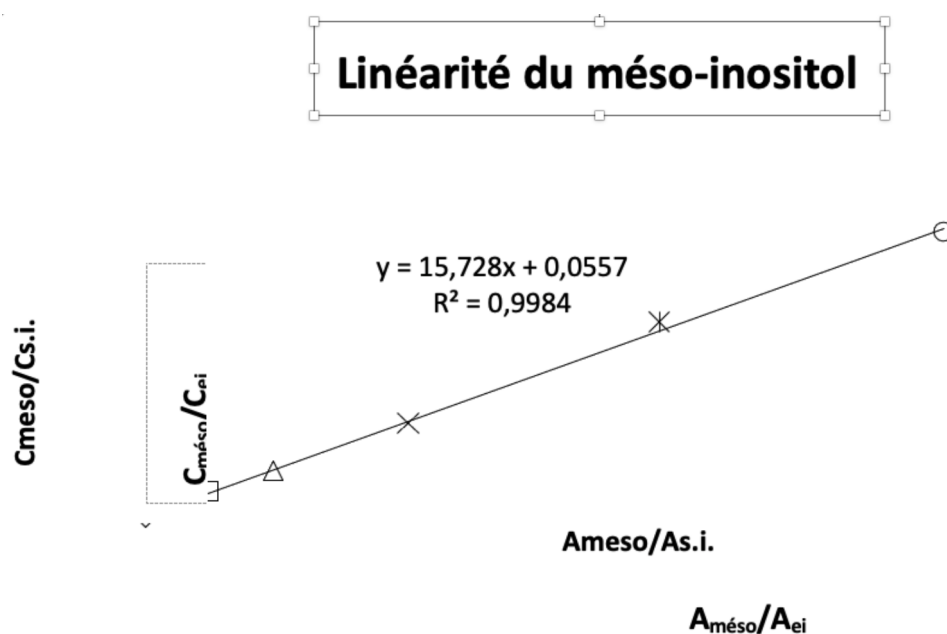


Fig 1 : Linéarité du méso-inositol

$A_{\text{meso}}/A_{\text{ei}}$ La linéarité du méso-inositol est hautement satisfaisante ($R > 0,998$) sur l'ensemble de l'intervalle de concentration étudié.

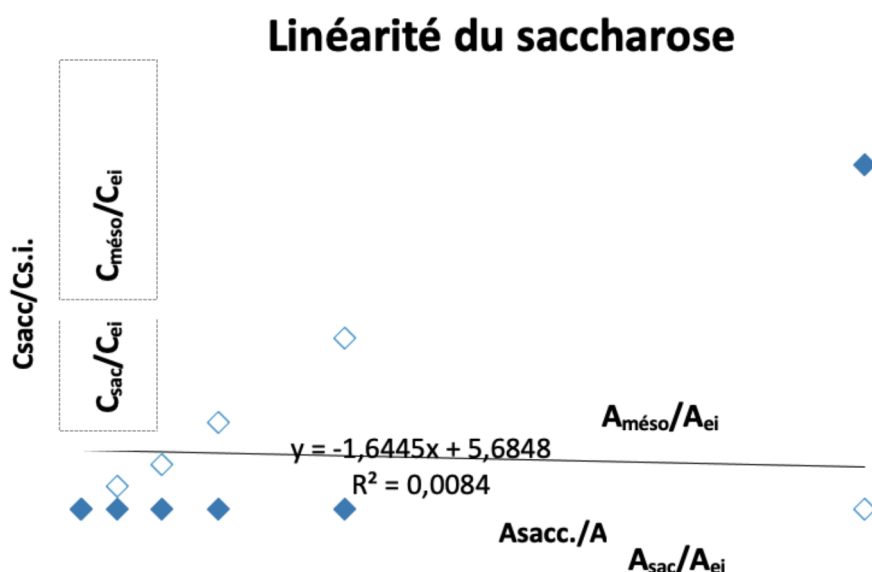


Fig 2: Linéarité du saccharose

Dans le cas du saccharose, la relation linéaire supposée sur l'ensemble de l'intervalle de concentration étudié ne s'est pas traduite par une corrélation satisfaisante ($R = 0,967$) ; cependant, la corrélation devient comparable à celle obtenue pour le méso-inositol ($R > 0,997$) si l'on restreint le champ de linéarité à l'échantillon synthétique n° 5.

Les facteurs de réponse suivants ont été obtenus en suivant les instructions du paragraphe 5.1 :

FR rel. méso-inositol / e.i. de xylitol	FR rel. saccharose / e.i. de xylitol
$1,04 \pm 0,03$ (moyenne $\pm \sigma$; $n = 4$)	$0,36 \pm 0,06$ (moyenne $\pm \sigma$; $n = 4$)

6.3. Spécificité

La relation entre le méso-inositol additionné et celui déterminé par CPG est linéaire sur l'ensemble de l'intervalle de mesure étudié, et la pente de la droite est très proche de un et l'intersection est très proche de 0.

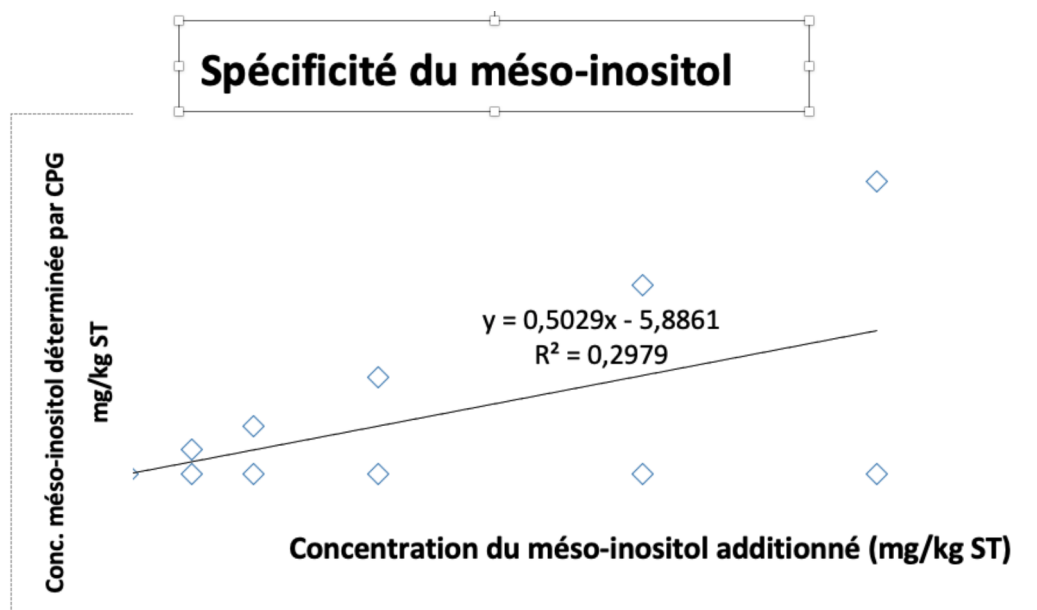


Fig 3 : Spécificité du méso-inositol

Concentration du méso-inositol additionné (mg/kg ST)

De même, le taux de recouvrement est satisfaisant, entre 95 et 105 %, comme indiqué dans le tableau suivant :

$C_{\text{méso}}$ additionnée (mg/kg ST)	$C_{\text{méso}}$ déterminée par CPG $\pm \sigma$ (n = 2) (mg/kg ST)	Recouvrement (%)
0	0	-
214,7	213 ± 2	99 %
420,0	419 ± 3	100 %
840,2	852 ± 20	102 %
1727,0	1668 ± 214	100 %
2514,0	2587 ± 36	99 %

En ce qui se réfère à la spécificité du saccharose, les concentrations obtenues à partir du calcul du saccharose additionné et celles déterminées par CPG concordent et présentent une relation linéaire, avec une pente de un et une intersection proche de zéro (à condition cependant de restreindre davantage l'intervalle de concentration par rapport à celui objet de l'étude).

Le graphique suivant montre que la relation linéaire ne s'étend pas jusqu'à la dernière concentration s'élevant à environ 6700 mg/kg ST.

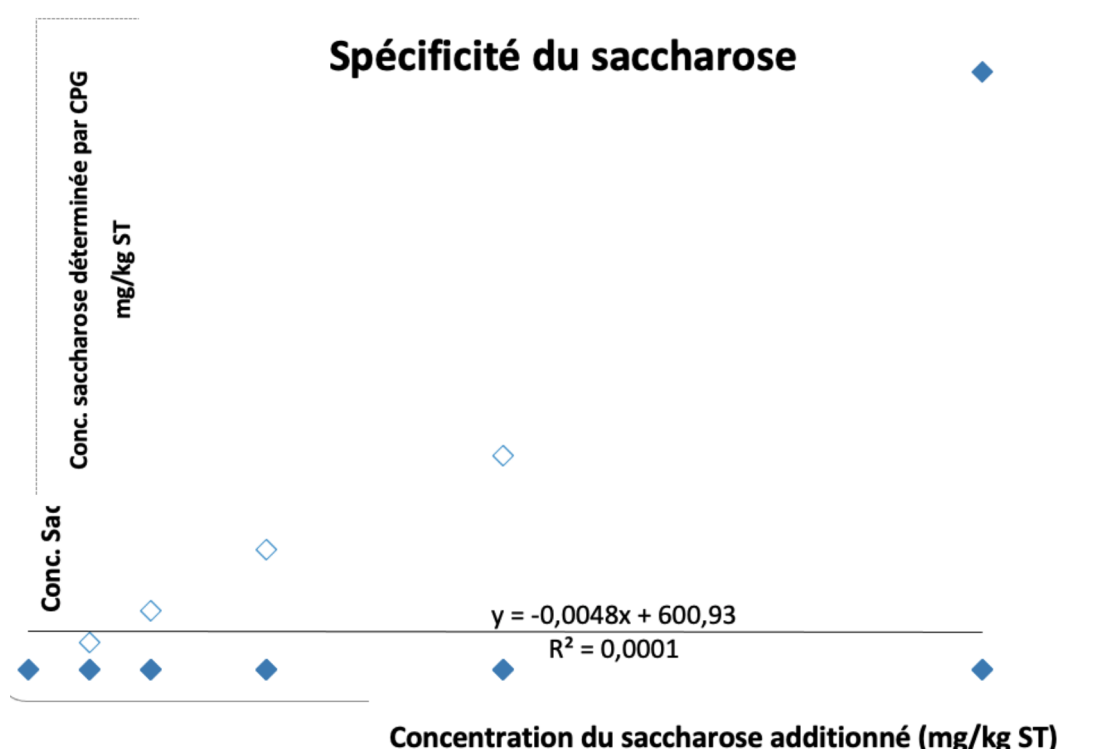


Fig 4 : Spécificité du saccharose

De même, le taux de recouvrement est satisfaisant, entre 90 et 110 %, comme indiqué dans le tableau suivant :

$C_{\text{saccharose}}$ additionnée 1. (mg/kg ST)	$C_{\text{saccharose}}$ déterminée par CPG $\pm \sigma$ (n = 2) (mg/kg ST)	Recouvrement (%)
--	--	------------------

0	0	-
427,3	423 ± 16	99 %
857,7	913 ± 37	107 %
1675,8	1852 ± 344	111 %
3338,0	3297 ± 284	99 %
6719,0	9220 ± 19	137 %

6.4. Stabilité du saccharose dans le moût concentré rectifié

Un échantillon de MCR additionné de saccharose a été conservé à température ambiante et analysé à intervalles temporels réguliers afin d'observer l'incidence du phénomène d'hydrolyse du saccharose dans le MCR.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

	t = 0 jour	t = 9 jours	t = 53 jours
Méso-inositol (mg/kg ST)	2227	2100	2052
Scyllo-inositol (mg/kg ST)	424	430	394
Saccharose (mg/kg ST)	4631	5108	4969

Ni le méso-inositol, ni le scyllo-inositol, ni le saccharose ne montrent de variations de concentration significatives par rapport à la valeur initiale jusqu'à 53 jours après la préparation de l'échantillon.

Cela est parfaitement illustré au sein du graphique suivant :

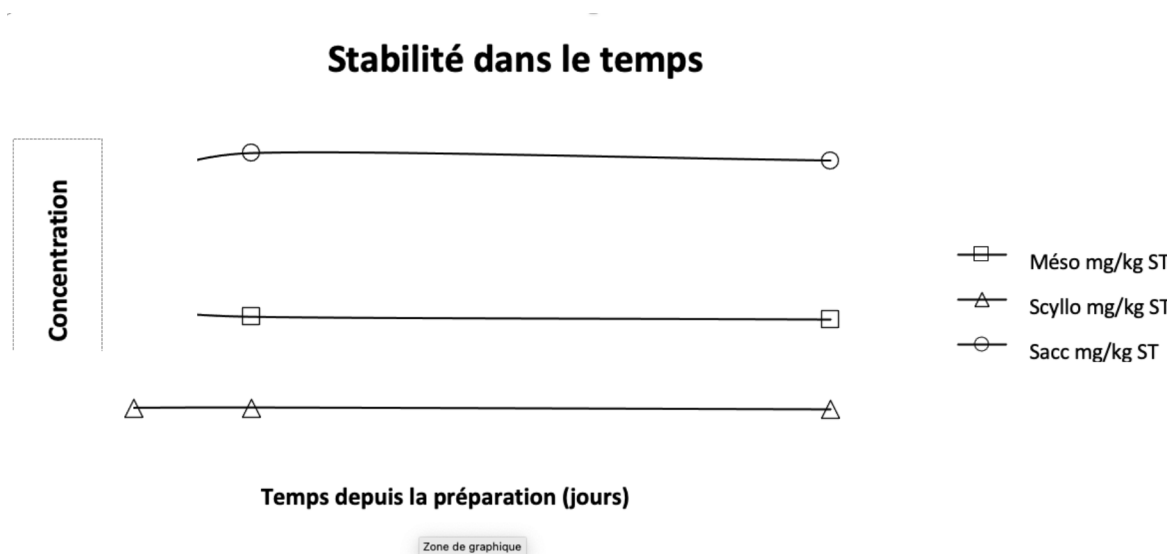


Fig 5 : Stabilité dans le temps

6.5. Stabilité de la substance silanisée

La substance silanisée obtenue conformément aux indications du paragraphe 4.2 a été conservée dans les conditions qui y sont décrites. Elle a ensuite été analysée par chromatographie en phase gazeuse à intervalles de 24 heures en suivant la procédure indiquée aux paragraphes 4.3 et suivants.

Les résultats sont indiqués dans le tableau suivant :

	t = 0 moyenne ± SD (n=3)	t = 24 h moyenne ± SD (n=3)	t = 48 h moyenne ± SD (n=3)	t = 72 h moyenne ± SD (n=3)	t = 96 h moyenne ± SD (n=3)
Mésositol (mg/kg ST)	2424 ± 109	2347 ± 44	2358 ± 17	2453 ± 39	2478 ± 15
Scyllo-inositol (mg/kg ST)	261 ± 7	254 ± 2	256 ± 4	257 ± 3	264 ± 1
Saccharose (mg/kg ST)	6233 ± 971	6500 ± 200	6633 ± 58	6733 ± 321	6600 ± 436

Il n'existe aucune différence significative entre les résultats obtenus pour le même échantillon de substance silanisée jusqu'à 4 jours après la silanisation, en adoptant les mesures de conservation décrites au paragraphe 4.2.

Cela est parfaitement illustré au sein des graphiques suivants :

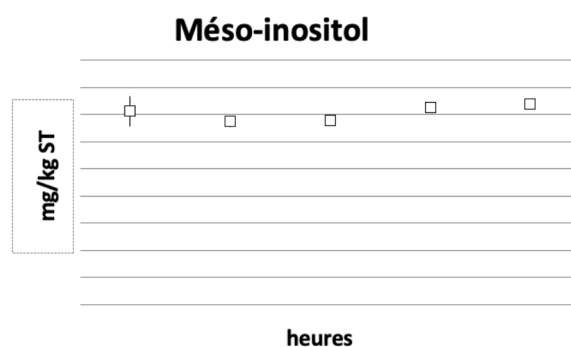


Fig 6 : stabilité du méso-inositol

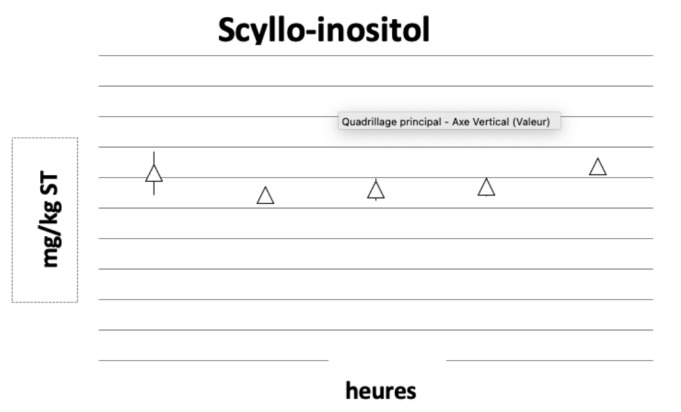


Fig 7 : stabilité du Scyllo-inositol

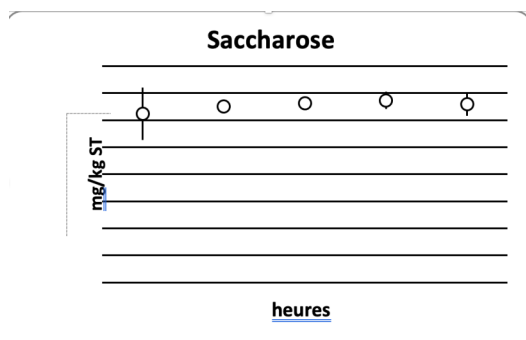


Fig 8 : stabilité du Saccharose

6.6. Fidélité

Paramètres de fidélité obtenus au cours de l'essai interlaboratoires conduit en avril 2014 entre 8 laboratoires italiens. Le programme de comparaison entre laboratoires a été conduit avec un échantillon supplémentaire de saccharose d'une concentration de 1 g de saccharose pour 1 kg de MCR.

	saccharose	méso-inositol	scyllo-inositol
Nombre de laboratoires participants	8	8	8
Nombre de résultats d'essais valides	23	23	23
Valeurs moyennes (mg/kg ST échantillon)	1665	954	145
Répétabilité			
Écart type de répétabilité (S_r)	78	52	11
Écart type de répétabilité relative (%RSD _r)	4,7	5,4	7,3
Limite de répétabilité (r)	219	146	29
HORRAT $r = RSD_r / RSD(R)$ Horwitz	0,9	1,0	1,0
Reproductibilité			
Écart type de reproductibilité (SR)	122	76	19

Écart type de reproductibilité relative (%RSD _R)	7,4	8,0	13
Limite de reproductibilité (R)	343	213	55
RSD(R) Horwitz %	5,2	5,7	7,6
HORRAT R = RSD _R / RSD(R) Horwitz	1,4	1,4	1,8
S _r /S _R	0,64	0,68	0,58

7. BIBLIOGRAPHIE

1. Versini G., Dalla Serra A., et Margheri G. (1984). Polialcool e zuccheri minori nei mosti concentrati rettificati. Possibili parametri di genuinità? Vignevini, 11(3), 41-47
2. Monetti A., Versini G., Dalpiaz G. et Raniero F. (1996). Sugar adulterations control in concentrated rectified grape musts by finite mixture distribution analysis of the myo-inositol and scyllo-inositol content and the D/H methyl ratio of fermentative ethanol. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44-8: 2194-2210.

8. FIGURES

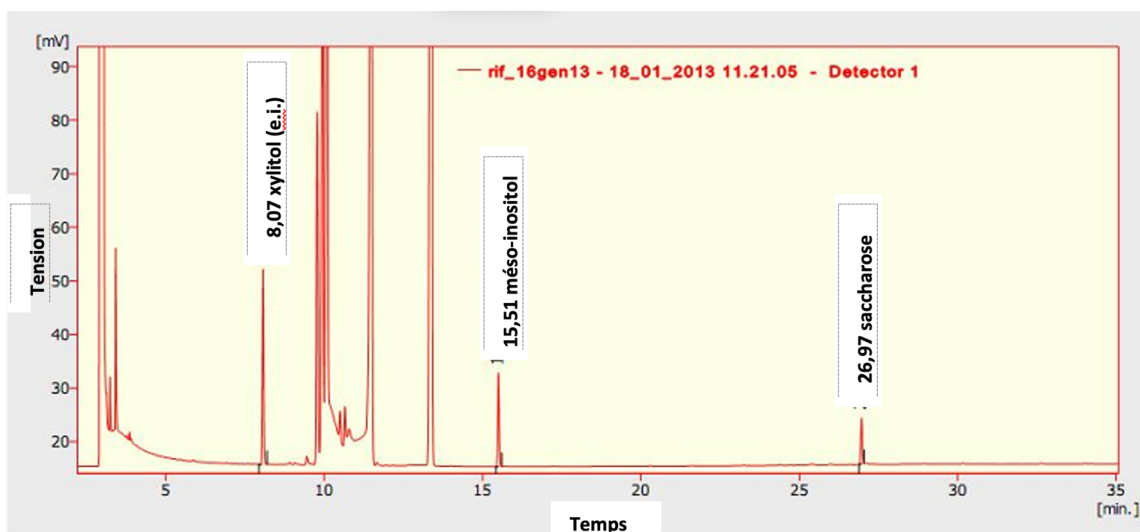


Fig.9 Chromatogramme de la solution de référence pour le calcul des facteurs de réponse

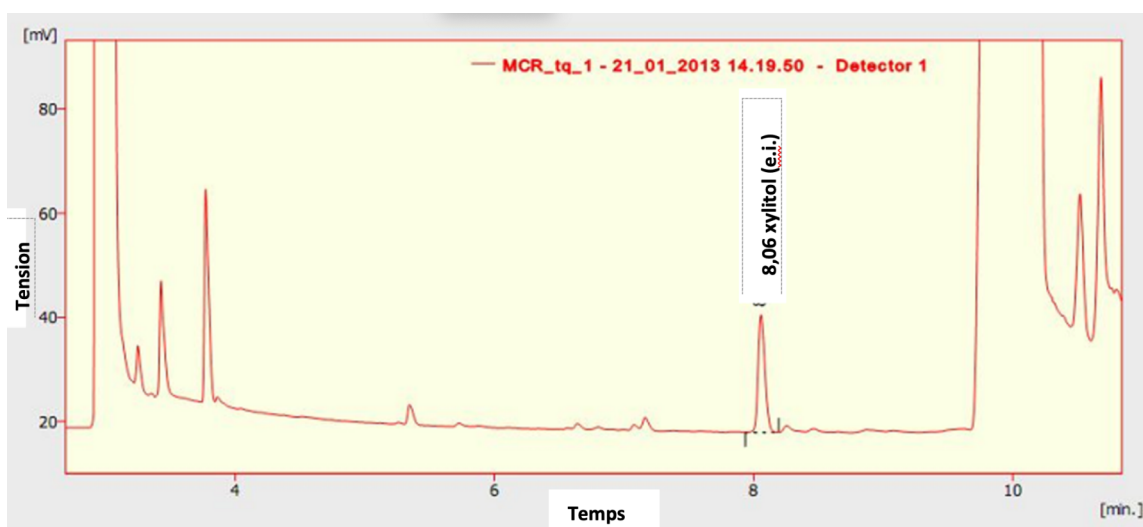


Fig. 10 Chromatogramme d'un échantillon de MCR - Zone « étalon interne »

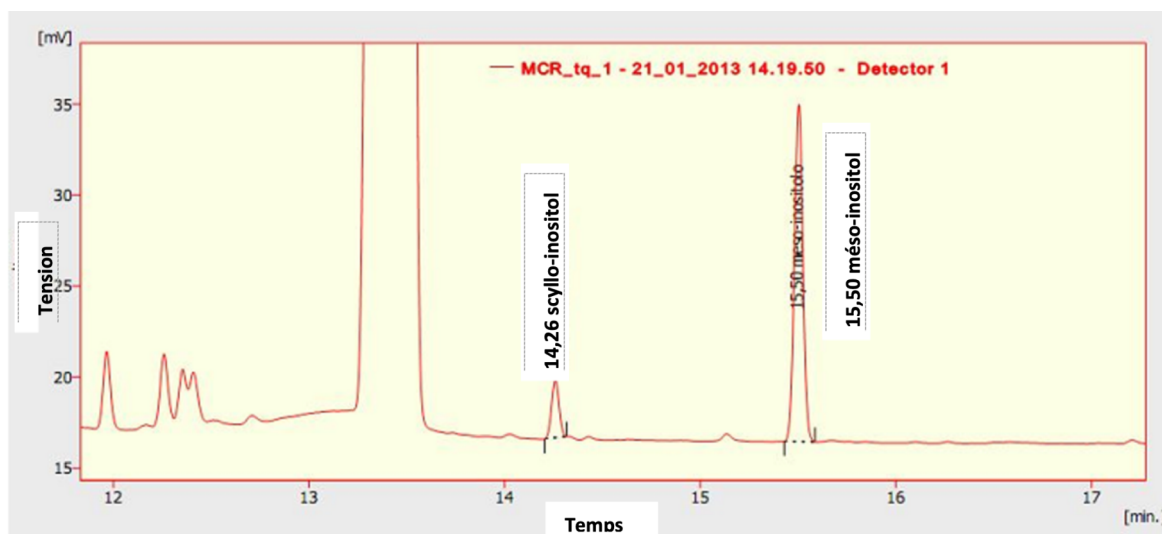


Fig. 11 Chromatogramme d'un échantillon de MCR - Zone « Inositol »

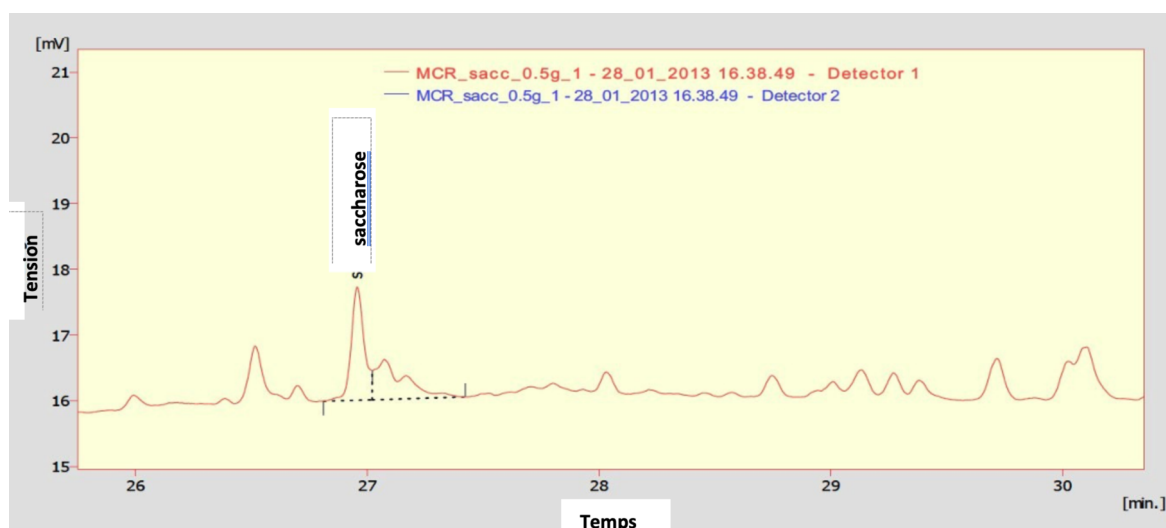


Fig. 12 Chromatogramme d'un échantillon de MCR - avec addition de 0,5 g/kg de saccharose