RESOLUTION OIV/OENO 390/2010

LIGNES DIRECTRICES SUR LES ANALYSEURS INFRA-ROUGE EN ŒNOLOGIE

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 des méthodes d'analyse,

CONSIDERANT la résolution oeno 10/2005 « Guide pratique pour la validation, le contrôle qualité, et l'estimation de l'incertitude d'une méthode d'analyse oenologique alternative » qui permet aux laboratoires d'assurer le travail de raccordement de la méthode interne automatisée par rapport à la méthode de référence OIV.

CONSIDERANT que ce guide comprend aussi des procédures de contrôle de la qualité des résultats obtenus par ces méthodes automatisées permettant d'en sécuriser l'utilisation.

CONSIDERANT que seules les méthodes publiées dans le Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts de l'OIV ou dans le recueil des méthodes internationales d'analyse des boissons spiritueuses d'origine vitivinicole de l'OIV ont un caractère officiel de référence et sont applicables pour le contrôle et le règlement de différends.

DÉCIDE d'adopter et de publier indépendamment les lignes directrices sur les analyseurs infra rouge en œnologie ci-jointes

LIGNES DIRECTRICES SUR LES ANALYSEURS INFRA-ROUGE EN ŒNOLOGIE

Avertissement : Ce guide ne constitue pas un document de référence mais seulement d'information. Les méthodes figurant dans ces lignes directrices ne peuvent pas être considérées comme des méthodes de référence au même titre que celles figurant au Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts de l'OIV ou au recueil des méthodes internationales d'analyse des boissons spiritueuses d'origine vitivinicole de l'OIV. Seules les méthodes publiées dans le Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts de l'OIV ou dans le recueil des méthodes internationales d'analyse des boissons spiritueuses d'origine vitivinicole de l'OIV ont un caractère officiel et sont applicables pour le contrôle et le règlement de

Exemplaire certifié conforme Tbilisi, 25 juin 2010
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Fredercio CASTELLUCCI

© OIV 2010

différends.

Ces analyseurs exploitent les absorptions caractéristiques des composés organiques des vins et des moûts dans l'infra-rouge, pour en assurer la quantification. Il existe deux grandes familles utilisées en œnologie :

- Les analyseurs proche infra-rouge (NIR) ;
- Les analyseurs Infra-rouge à Transformée de Fourrier (IRTF).

1. Les analyseurs proche infra-rouge

1.1. Principe

Les composés dont le dosage est recherché sont soumis à un rayonnement proche infra-rouge dans lequel ils présentent des bandes d'absorption caractéristiques. Les données spectrales de l'échantillon analysé sont comparées à celle obtenues pour des vins étalons de référence qui ont servi au calibrage initial de l'appareil et la concentration du composé recherché est calculée à partir d'une régression linéaire multiple. L'appareil est informatisé et peut être couplé à un préleveur d'échantillon. Le niveau d'absorption doit être important pour que les résultats soient exploitables et la méthode n'est applicable que pour les macro-composés du vin ou du moût soit essentiellement l'éthanol et les sucres. Les qualités majeures de cette méthode sont : sa simplicité de mise en œuvre, sa cadence analytique élevée et le fait qu'il n'existe pas de préparation de l'échantillon si ce n'est une décarbonication des moûts en fermentation.

1.2. Matériel

Les appareils utilisés en œnologie travaillent par réflexion. Le fond de la cellule à circulation contenant le vin ou le moût à analyser est pourvu d'un réflecteur qui réfléchit le rayon infra-rouge incident qui traverse ainsi une deuxième fois l'échantillon avant d'être analysé par le détecteur. Les appareils comprennent les éléments suivants.

1.2.1. Un système de pompage de l'échantillon

Il s'agit en général d'une pompe péristaltique qui permet le remplissage de la cellule de mesure. Le système de pompage est en général complété par un bain thermostatique permettant de régler la température de l'échantillon à la valeur souhaitée pour la

Exemplaire certifié conforme Tbilisi, 25 juin 2010
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Fredercio CASTELLUCCI

© OIV 2010

mesure.

1.2.2. Une source lumineuse

Il s'agit d'une lampe au tungstène produisant une lumière polychromatique possédant un spectre allant de 320 à 2500 nm. L'alimentation doit être parfaitement stabilisée afin d'obtenir une intensité constante.

1.2.3. Un sélecteur de longueur d'onde

Les appareils utilisés en œnologie utilisent des filtres interférentiels de longueurs d'onde connue ou des monochromateurs à réseau pour permettre la sélection des longueurs d'onde caractéristiques des composés recherchés.

1.2.4. Une cellule de mesure

La partie traversée par les rayonnements incident et réfléchi est en quartz. Le fond de la cellule peut être en céramique recouverte d'une couche d'or qui permet la réflexion. Cette cellule est maintenue à une température de mesure constante, en général par un système à effet Peltier.

1.2.5. Des détecteurs

Deux cellules photo-électriques en sulfure de plomb recueillent le rayonnement réfléchi.

1.2.6. Un calculateur informatique

Il permet le traitement mathématique et statistique assurant les comparaisons avec le calibrage de l'appareil et la détermination de la concentration recherchée.

1.3. Mode opératoire

La mise en œuvre d'un analyseur proche infra-rouge suppose plusieurs étapes.

1.3.1. Un calibrage initial

Cette étape permet de réaliser un calibrage permanent de l'appareil qui servira de référence. Il consiste à utiliser un nombre aussi élevé que possible (au minimum 50) de vins ou moûts de concentrations connues en analyte recherché. Les valeurs de ces concentrations doivent être réparties uniformément sur toute l'échelle de mesure souhaitée. Les matrices devront être aussi proches que possible de celles des vins ou des moûts qui seront ensuite analysés. Pour chaque échantillon de calibrage, une mesure est effectuée pour un maximum de longueurs d'onde couvrant le spectre proche infra-rouge. Une régression multilinéaire est faite à partir des résultats

Exemplaire certifié conforme Tbilisi, 25 juin 2010
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Fredercio CASTELLUCCI

© OIV 2010

enregistrés permettant d'établir la relation suivante :

$$C = K_0 + K_1R_1 + K_2R_2 + K_3R_3 + ... + K_iR_i$$

Où :

- C est la valeur de concentration recherchée
- K_0 est une constante caractéristique de l'appareil pour un composé recherché, indépendant de la longueur d'onde.
- $K_i$est une constante pour un appareil, un composé recherché et une longueur d'onde donnée.
- $R_i$est l'expression de la mesure spectrale pour la longueur d'onde L_i

Pour chaque analyte recherché, 2 à 10 longueurs d'onde caractéristiques sont sélectionnées.
La qualité du calibrage est alors testée par présentation d'une nouvelle gamme d'échantillons de vins ou de moûts de référence de concentrations connues.

1.3.2. Des calibrages périodiques

Ceux-ci sont rendus nécessaires lorsque les contrôles de routine montrent une dérive des résultats liée à l'appareil (vieillissement des composants électroniques, réparation, changement de pièces etc...). Cette procédure ne remet pas en cause la sélection des longueurs d'onde, mais assure un nouveau calcul des constantes K0 et Ki.

1.3.3. Des corrections en routine du biais

Avant chaque utilisation du matériel, un (ou des) échantillon(s) de contrôle de concentration connue en analyte recherché est (sont) analysé(s). Si un biais apparaît par rapport à la valeur attendue, une correction peut être effectuée.

2. Les analyseurs Infra-Rouge à Transformée de Fourrier (IRTF)

2.1. Matériel et principe de la méthode

Le matériel mis en œuvre est un interféromètre utilisant la spectrophotométrie infrarouge à Transformée de Fourrier permettant de scanner la totalité du spectre

Exemplaire certifié conforme Tbilisi, 25 juin 2010
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Fredercio CASTELLUCCI

© OIV 2010

infrarouge dans une bande spectrale de 2000 à 10000 nm recouvrant une partie du proche et du moyen infrarouge. Après calibrage de l'appareil pour différents composés organiques, l'analyse d'un spectre permet le dosage simultané de ces derniers dans le vin ou le moût analysé.

2.2. Interférométrie et Transformée de Fourrier

L'interférométrie est une méthode alternative aux techniques classiques d'acquisition d'un spectre dans une échelle de longueur d'onde donnée. Ces techniques sont lourdes et demandent beaucoup de temps dès lors que l'on souhaite une résolution fine. L'interférométrie permet de traiter toutes les longueurs d'onde émises par une unique source infrarouge en même temps, sans sélection préalable, permettant l'acquisition d'un spectre complet en moins d'une seconde.

La première étape consiste à réaliser un interférogramme sur l'échantillon à analyser. L'interféromètre se base sur la séparation sur une lame d'une lumière infrarouge polychromatique (issue dans ce cas d'un filament incandescent). Avant d'aboutir sur le détecteur, les deux parties du signal suivront un chemin différent : une première partie traverse directement l'échantillon, une seconde partie est réfléchie sur un miroir mobile avant de revenir vers l'échantillon.

Pour chaque longueur d'onde élémentaire de cette émission infrarouge, il y aura, à l'arrivée au détecteur, une différence de phase p. Grâce au miroir mobile, cette différence de phase p va varier en continu pendant la mesure.

Le signal final obtenu est ainsi une interférence de deux signaux lumineux de même longueur d'onde et de différence de phase p.

En fonction de la différence de phase, la recombinaison sera constructive ou destructive. C'est à dire qu'en fonction de p, l'intensité du signal d'interférence sera variable. La variation de l'intensité en fonction du déphasage s'appelle un interférogramme. Son modèle mathématique est une intégrale.

La Transformée de Fourrier est une procédure mathématique qui va permettre, à partir de l'interférogramme de retrouver l'intensité du signal en fonction de la longueur d'onde puis de reconstituer le spectre infrarouge.

Exemplaire certifié conforme Tbilisi, 25 juin 2010
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Fredercio CASTELLUCCI

© OIV 2010

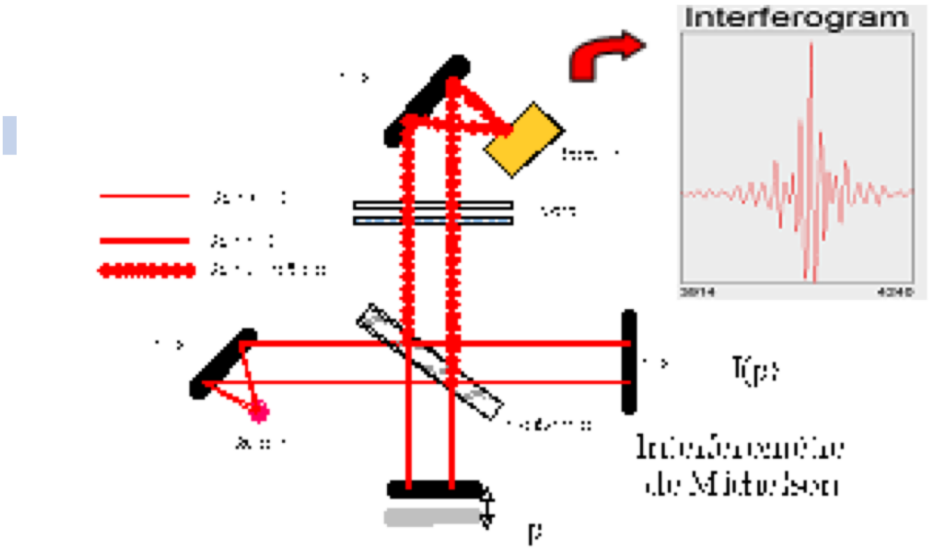


Figure 1 : Schéma simplifié d'un interféromètre de Michelson

Le spectre calculé étant ainsi acquis, nous retrouvons les applications classiques de la spectrophotométrie qui va permettre d'utiliser les longueurs d'onde spécifiques d'absorption des différents composés organiques dont on recherche la concentration.

2.3. Mise en œuvre de l'acquisition du spectre infra-rouge

L'échantillon à analyser ne doit pas faire l'objet d'une préparation particulière. Cependant, dans le cas des moûts ou de vins chargés, une clarification par centrifugation ou par filtration sera introduite afin d'éviter les colmatages. Pour des teneurs en gaz carbonique supérieures à 750 mg/l, une élimination partielle préalable est nécessaire pour éviter des problèmes de dégazage dans le circuit d'analyse.

Le circuit débute par une aiguille de prélèvement qui peut être manœuvrée manuellement ou bien pilotée par un passeur d'échantillon. Une pompe péristaltique permet le pompage de l'échantillon dans une chambre de chauffage qui l'amène à une température de 40 °C. Après passage dans un filtre, il traverse la cuvette de mesure. Cette dernière constitue une pièce essentielle de l'appareil. Elle est construite en fluorosilicates car le verre ou le quartz présentent une absorption importante dans le moyen infrarouge. L'échantillon sera alors rejeté à l'évier.

Exemplaire certifié conforme Tbilisi, 25 juin 2010
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Fredercio CASTELLUCCI

© OIV 2010

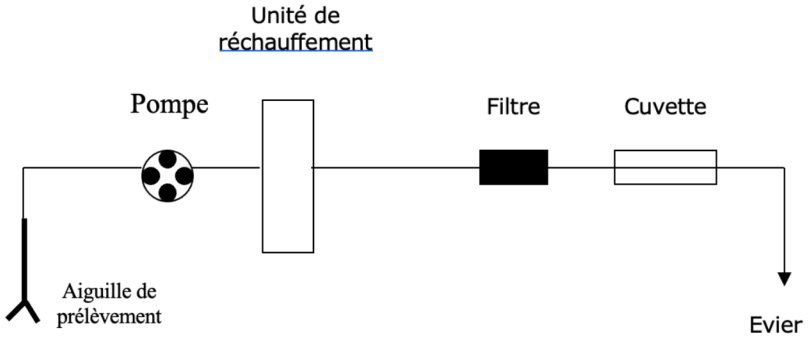


Figure 2 : Schéma simplifié du circuit analytique

Le cycle complet pour un échantillon dure 30 secondes. La version automatisée permet une cadence effective de l'ordre de 120 échantillons par heure.

2.4. La chimiométrie

D'une manière générale, le spectre moyen infrarouge d'un vin ou d'un moût contient des informations présentant un intérêt analytique dont l'extraction n'est pas immédiate. Celle-ci demande, dans la plupart des cas, un traitement mathématique qui peut être très complexe. L'ensemble des moyens qui peuvent être mis en œuvre pour rechercher ces informations analytiques fait partie d'une science récente : la chimiométrie. Celle-ci a été définie en 1996 par GELADI comme « la science de l'utilisation des méthodes mathématiques, statistiques et informatiques qui vise à extraire l'information utile présente dans des données de mesures chimiques ». La chimiométrie inclut ainsi les méthodes statistiques adaptées au traitement des données spectrales.

Deux objectifs principaux peuvent être recherchés par les analystes :

La description globale du produit analysé (méthode exploratoire). Il s'agit de classer les spectres par familles préalablement définies. Une application en œnologie peut être de définir la matrice d'un produit présenté à la mesure. Un tel outil peut ainsi permettre de déterminer si ce produit est un moût, un moût en fermentation, un vin sec, un vin liquoreux ou un vin doux naturel.

Une approche prédictive qui permet, à partir de données de référence préalablement acquises (calibrage), de trouver des valeurs analytiques de composés ou d'indices propres à la composition d'un vin ou d'un moût inconnu. C'est surtout cette deuxième approche qui est actuellement utilisée par les laboratoires dans la mesure où elle permet de substituer l'IRTF aux outils analytiques classiques.

Exemplaire certifié conforme Tbilisi, 25 juin 2010
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Fredercio CASTELLUCCI

© OIV 2010

Les méthodes chimiométriques applicables, pour arriver aux résultats ci-dessus décrits, sont extrêmement nombreuses et leur mise en œuvre reste une affaire de spécialiste. Elles peuvent être classées en deux grands groupes selon qu'elles reposent sur un modèle linéaire ou non linéaire. Elles vont d'outils statistiques simples tels que l'analyse en composantes principales (ACP) à des outils d'une grande complexité mathématique et d'utilisation tels que les réseaux neuronaux.

Si tous les constructeurs proposent des outils de mesure optique dont les performances sont satisfaisantes, les moyens de standardisation de cette mesure, les outils de traitement des données du spectre et la qualité des outils de chimiométrie offerts aux utilisateurs sont beaucoup plus soumis à variabilité. Les difficultés rencontrées par les laboratoires sont souvent liées à ce point. De même, une partie des polémiques qui sont nées autour de la méthode y trouve son origine. La qualité du traitement chimiométrique utilisé pour la lecture des données spectrales d'un vin ou d'un moût revêt une importance majeure pour la production de résultats analytiques fiables et précis.

2.5. Analyse du spectre moyen infrarouge

Il convient de prendre conscience de la très grande complexité des informations contenues dans le spectre moyen infrarouge d'un vin ou d'un moût. Celle-ci est due à plusieurs éléments :

1. La composition organique et minérale de ces produits est l'une des plus riches de celles qui peuvent être rencontrées dans le domaine de l'agroalimentaire.
2. Les zones d'absorption de chaque molécule organique dans le moyen infrarouge sont multiples en raison, en particulier, d'importants phénomènes de résonance.
3. Il existe entre les différents composés organiques des interactions qui sont à l'origine d'importants effets matrices qui sont impossibles à modéliser.

Ainsi, contrairement à d'autres analyses spectrophotométriques, il est pratiquement toujours impossible d'appliquer, pour l'analyse IRTF des moûts et des vins, des connaissances théoriques sur l'absorption de tel ou tel composé. Seul le recours à une approche expérimentale peut être envisagé. Ce point devient une caractéristique fondamentale de la méthode qui repose ainsi sur une approche strictement mathématique dont la performance sera déterminante pour la qualité finale du résultat. La procédure de cette approche expérimentale de calibrage consiste à multiplier l'acquisition de spectres d'un maximum de variétés d'échantillons de valeurs

Exemplaire certifié conforme Tbilisi, 25 juin 2010
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Fredercio CASTELLUCCI

© OIV 2010

précisément connues pour le composé ou l'indice à analyser, avant d'appliquer les méthodes statistiques mathématiques. Il est indispensable de comprendre que cette étape est fondamentale pour obtenir un bon outil d'analyse. Non seulement, l'opérateur doit disposer d'un nombre d'échantillons représentatifs aussi élevé que possible, mais, il doit mettre en œuvre les méthodes chimiométriques les plus adaptées et, si possible, faire une analyse comparative critique des résultats obtenus avec plusieurs d'entre elles. Une telle approche doit toujours être complétée par une comparaison statistique très large des résultats donnés par le modèle retenu avec ceux de méthodes analytiques de référence. Plusieurs milliers de déterminations peuvent être indispensables pour cette dernière étape. Un calibrage est donc une démarche lourde et délicate qui demande du temps et des moyens importants.

Pour mieux comprendre la difficulté de l'approche, il convient de préciser les points critiques suivants :

2.5.1. Comportement de l'analyte

Tous les composés organiques du vin ne vont pas avoir le même comportement analytique pour plusieurs raisons :

En premier lieu, il est évident que les composés à concentration élevée (au dessus de 1 g/L par exemple) ont de forte chance d'être plus faciles à doser car ils entraînent des phénomènes d'absorptions plus conséquents.

En deuxième lieu, les capacités d'absorption caractéristiques d'un composé vont dépendre de sa constitution moléculaire. Certaines molécules, comme le dioxyde de carbone par exemple, vont avoir une forte capacité d'absorption dans le moyen infrarouge alors que d'autres molécules, bien que plus complexes, auront des absorptions beaucoup plus modestes.

Enfin, l'influence des autres composés du vin (effet matrice) est une donnée essentielle. On comprend facilement que si les longueurs d'onde d'absorption caractéristiques d'un composé se superposent, dans le spectre, à celles de l'eau ou de l'éthanol qui sont présents en très forte proportion, la sensibilité de mesure pour ce composé va se trouver très affaiblie. De même, il existe des phénomènes d'interactions entre les constituants qui peuvent déplacer les bandes d'absorption.

On admettra facilement que, là encore, les connaissances théoriques ne sont pas de grande utilité et que seule, l'approche expérimentale peut permettre de déterminer si un composé donné peut être facilement dosé par IRTF ou non. À titre d'exemple, le dosage des sucres se montre délicat pour des valeurs inférieures à 1 g.L-1, alors que celui de l'azote ammoniacal (NH3) est accessible à partir de 10 mg.L-1.

Ces données sur le comportement des analytes permettent de comprendre qu'il est

Exemplaire certifié conforme Tbilisi, 25 juin 2010
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Fredercio CASTELLUCCI

© OIV 2010

plus facile d'analyser un composé à forte concentration, présentant dans le moyen infrarouge des absorptions bien caractéristiques, en dehors des zones d'absorption de l'eau et de l'éthanol et peu sensibles aux effets matrice qu'un composé présentant des caractéristiques opposées. Ainsi l'éthanol sera beaucoup plus facile à analyser que l'éthanal. De même il devient évident que, plus un composé est difficile d'accès, plus le travail de calibrage sera compliqué et devra être soigné. En particulier, l'échantillonnage initial devra être suffisamment important et parfaitement sélectionné, les outils chimiométriques seront plus puissants et plus pertinents et le travail de comparaison avec les méthodes de référence devra être mené sur un nombre plus élevé d'échantillons.

2.5.2. Extrapolation

Il s'agit là d'un point essentiel. Dans le travail de calibrage, il n'est pas possible de compter sur une capacité d'extrapolation du système. Ainsi, si l'échantillonnage initial ne couvre pas la totalité du domaine d'analyse revendiqué de façon égale, les résultats obtenus dans les zones les moins riches en informations initiales montreront des déficiences. De même s'il existe un effet matrice significatif tel que celui souvent apporté par les composés phénoliques, il est indispensable que des vins de toutes concentrations en composés phénoliques soient présents à tous les niveaux de la gamme. Dans le cas contraire, la partie de gamme non couverte par toutes les valeurs possibles de composés phénoliques sera plus sensible aux effets matrice et ne sera pas fiable.

2.5.3. Les effets matrice

Nous avons vu plus haut que l'effet matrice était dû aux autres composés présents dans le milieu à analyser et absorbant dans le moyen infrarouge. Un effet matrice n'est cependant pas un problème incontournable. Tout calibrage peut prendre en compte de nombreux effets matrices. Pour cela, comme dans les systèmes experts, il convient d'avoir apporté l'information nécessaire afin que l'outil puisse, par apprentissage, mesurer l'impact de l'effet matrice sur le dosage du composé recherché. L'effet matrice pourra ainsi être éliminé par référence à la valeur de calibrage lorsqu'il sera retrouvé dans un échantillon inconnu. À ce stade, il est facile de comprendre que plus on aura présenté de matrices différentes lors d'un calibrage, plus celui-ci sera robuste et saura s'affranchir des effets matrice. C'est l'un des points les plus forts de la méthode IRTF. Il existe cependant une limite à son utilisation. En effet, plus on introduit de capacité de gestion de l'effet matrice dans un calibrage, plus celui-ci perd en sensibilité et en précision. Un choix devra donc être fait par l'opérateur développant un calibrage pour trouver le bon équilibre entre robustesse, sensibilité et

Exemplaire certifié conforme Tbilisi, 25 juin 2010
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Fredercio CASTELLUCCI

© OIV 2010

précision. Là encore, l'approche devient vite très complexe et ne peut être envisagée sans la mise en œuvre de moyens importants.

Dans la pratique, en œnologie, il n'apparaît pas possible de travailler avec des calibrages couvrant toutes les matrices pouvant être rencontrées. L'état des connaissances permet cependant, pour les déterminations les plus courantes, de regrouper les vins et les moûts en cinq matrices fondamentales :

- les moûts non fermentés,
- les moûts en fermentation,
- les vins secs ou faiblement sucrés,
- les vins liquoreux,
- les vins doux naturels.

En revanche, il convient de signaler que les effets matrices engendrés par des cépages différents, la couleur du vin ou l'origine géographique sont, en général, levés par des calibrages bien menés.

La complexité des effets matrices entraîne une autre conséquence importante. Il est en effet impossible d'utiliser pour le calibrage, de même que pour le contrôle, des échantillons synthétiques ou des échantillons rechargés. Seuls des vins naturels sont pertinents.

2.5.4. Valeurs de référence

La qualité d'un travail de calibrage dépend aussi de celle des valeurs de référence des échantillons qui sont utilisées. L'exemple de l'acide gluconique est révélateur. La méthode enzymatique classiquement mise en œuvre de dosage de l'acide gluconique n'est pas fiable. Elle présente un manque de robustesse qui n'avait pas été signalé dans la littérature afférente et qui est probablement dû à des effets matrice non identifiés. Les premières calibrations IRTF ont été faites avec des résultats obtenus par cette méthode et, bien que l'acide gluconique présente des caractéristiques d'absorption très qualitatives, les résultats obtenus par IRTF se sont avérés mauvais. De nouvelles calibrations ont été réalisées par la suite en utilisant, pour les valeurs de référence, des techniques plus fiables comme l'électrophorèse capillaire et les résultats donnés par IRTF sont aujourd'hui d'une grande qualité.

Exemplaire certifié conforme Tbilisi, 25 juin 2010
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Fredercio CASTELLUCCI

© OIV 2010

2.6. Principales étapes de l'analyse spectrale

La figure 3 donne l'illustration d'un spectre infra-rouge du vin.

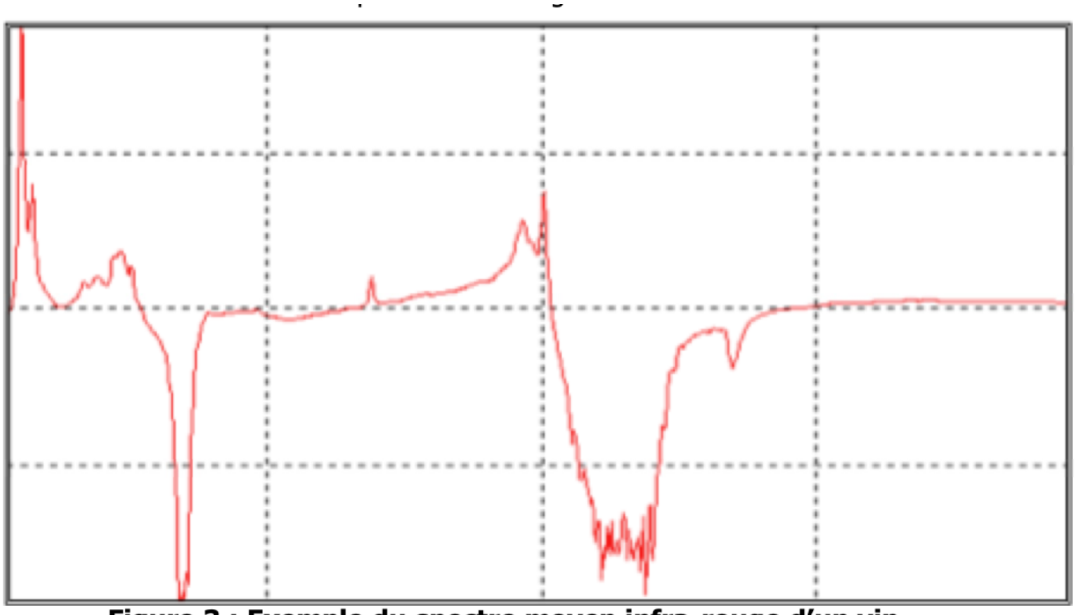


Figure 3 : Exemple du spectre moyen infra-rouge d'un vin

A partir de la banque de données réalisée avec les échantillons de référence de valeur connue pour l'analyte recherché, les outils de chimiométrie mis en œuvre permettent de sélectionner les zones spectrales les plus pertinentes pour celui-ci (en général au nombre d'une dizaine), puis de calculer un modèle de régression qui sera utilisé pour assurer la prédiction pour tout échantillon inconnu.

2.7. L'importance du contrôle de la qualité des résultats

Les points précédents étant acquis, il faut être conscient que l'utilisation de l'IRTF entraîne, pour le laboratoire, une obligation de mise en place d'un outil de contrôle de la qualité des résultats qui doit faire appel à une stratégie spécifique, originale et adaptée. La très puissante automatisation du système, alliée à la mise en œuvre simple de la machine, constituent en effet des pièges redoutables en terme de risque de dérive des résultats ou d'existence de résultats aberrants non repérés. Seul, un système très complet et strict d'identification des matrices, d'élimination des résultats concernant des échantillons non conformes à des définitions précises, d'introduction dans les séries d'échantillons de contrôles suffisamment nombreux et la parfaite

Exemplaire certifié conforme Tbilisi, 25 juin 2010
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Fredercio CASTELLUCCI

© OIV 2010

gestion des données recueillies peut permettre d'assurer la qualité des résultats. Tout laboratoire doit savoir que le temps passé au contrôle de la qualité des résultats prend, avec l'IRTF, une part beaucoup plus importante du temps total passé à l'analyse que celle qui doit être accordée aux autres méthodes habituellement mises en œuvre dans les laboratoires d'œnologie.

Une stratégie de contrôle de la qualité des résultats peut comprendre les éléments suivants :

2.7.1. Gamme de travail

Des gammes de travail validées doivent être établies pour chaque paramètre analytique. Tous les résultats en dehors de la gamme de travail, doivent être confirmés par les méthodes validées qui servent de soutien à la performance IRTF.

2.7.2. Ecart maximum admis pour les deux répétitions

Cette procédure doit être introduite lors de la mise en œuvre d'un nouvel outil IRTF. Le laboratoire peut ensuite en suspendre l'application si les résultats obtenus sont satisfaisants.

Pour chaque échantillon sont effectuées deux lectures. Les lectures sont acceptées si leur écart est inférieur à l'écart type maximum établi pour chaque paramètre analytique. La détermination pour chaque paramètre est répétée, si l'écart des lectures dépasse l'écart type maximum établi.

2.7.3. Matériaux de référence (MR)

Les matériaux de référence doivent présenter des matrices conformes à celles des vins analysés. Ils servent à vérifier la stabilité du système analytique au cours du temps. Les valeurs de référence des MR sont établies á partir du certificat d'analyse (matériaux issus de circuits interlaboratoires) ou a partir des résultats obtenus avec les méthodes utilisées pour la calibration de l'IRTF. Des tolérances sont associées aux valeurs de référence pour établir des « limites d'alerte » et des « limites d'action ». La série de travail doit intégrer plusieurs MR représentatifs des matrices analysées et de la gamme de travail. La séquence de travail est validée si tous les résultats de l'ensemble des MR sont compris dans les limites d'alerte. Si les résultats des MR se trouvent entre la limite d'alerte et la limite d'action, la séquence analytique est valable, toutefois, il faut vérifier:

1. si le MR a évolué (par exemple par mauvaise conservation)
2. l'éventuelle existence d'écarts systématiques qui nécessite alors un ajustement du

Exemplaire certifié conforme Tbilisi, 25 juin 2010
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Fredercio CASTELLUCCI

© OIV 2010

calibrage. Dans ce cas, il convient d'utiliser les résultats les plus récents (si possible du jour) obtenus par croisement de méthodes (2.2.7.4). La situation doit être pondérée en fonction de toutes les informations disponibles.

Si un ou plusieurs résultats des différents paramètres analytiques des MR sont au dessus de la limite d'action, la séquence analytique n'est pas validée. Il convient :

1. de confirmer le(s) résultat(s) anormal(aux) par les méthodes qui servent de soutien à la performance IRTF
2. d'effectuer une normalisation des conditions spectrales de l'appareil IRTF.
3. d'analyser d'autres MR disponibles pour vérifier si les lectures respectent les critères établis.
4. de confirmer si l'historique croisement de méthodes (2.2.7.4) démontre qu'un ajustement du calibrage doit être pratiqué (écarts systématiques) pour le paramètre anormal.

La situation doit être pondérée en fonction de toutes les informations disponibles. En particulier, une correction de biais ne doit jamais se faire à partir des seules informations apportées par les mesures de MR.

2.7.4. Croisement de méthodes

Il est très important de faire systématiquement le croisement des résultats obtenus par IRTF et par les méthodes de référence qui servent de soutien à la performance. Il est recommandé d'effectuer le croisement de méthodes quotidiennement pour les paramètres les plus sensibles.
Les différences doivent être inférieures ou égales aux limites d'action (2.2.7.3). Si la différence entre les résultats obtenus pour un paramètre analytique, dépasse la limite, il faut considérer les points suivants:

1. trouver une explication probable (par exemple matrice non couverte par la calibration) ;
2. effectuer un croisement de méthodes avec d'autres échantillons de la série de travail. ;
3. confirmer si l'historique du croisement de méthodes démontre qu'un ajustement de la calibration doit être pratiqué (écarts systématiques) pour le paramètre anormal.

Exemplaire certifié conforme Tbilisi, 25 juin 2010
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Fredercio CASTELLUCCI

© OIV 2010

2.7.5. Critères d'acceptabilité d'un nouveau calibrage

Il est aussi très important d'avoir des critères définis pour remplacer un calibrage validé et appliqué par un nouveau calibrage.
Une des stratégies possibles est de considérer les points suivants :

1. le nouveau calibrage doit inclure un nombre d'observations supérieurs à celui du calibrage utilisé ;
2. le "cross validation error" (CVR) du nouveau calibrage doit, idéalement, être inférieur ou égal à celui du calibrage précédent ; un CVR supérieur peut cependant être accepté si il y a un renforcement des zones de calibrage les moins performantes ;
3. pour un ensemble d'au moins 15 vins représentatifs de la gamme de travail, il convient de comparer les résultats obtenus avec le nouveau calibrage et ceux obtenus avec le calibrage précédent et avec les méthodes qui servent de soutien à la performance IRTF.
4. Il est recommandé d'effectuer la comparaison des résultats obtenus avec le calibrage précédent et ceux obtenus avec le nouveau calibrage en introduisant des matériaux de référence externe. Il convient cependant de s'assurer que ces derniers sont des vins ou des moûts naturels non dopés et non stabilisés avec des composés pouvant modifier la matrice.

ANNEXE 1: EXEMPLES DE METHODES DE DOSAGE USUELLES EN ŒNOLOGIE PAR ANALYSEURS PROCHE INFRA ROUGE (PIR)

Les méthodes décrites ci-dessous ne le sont qu'à titre d'exemple.

1. Dosage du titre alcoométrique des vins et des moûts en fermentation par proche infra rouge

1.1. Principe

Une plage de longueur d'onde allant de 1150 nm à 1200 nm présente une absorption spécifique permettant de déterminer le titre alcoométrique des boissons alcoolisées. Dans cet intervalle, aucun autre composé ne vient interférer dans le dosage. Deux

Exemplaire certifié conforme Tbilisi, 25 juin 2010
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Fredercio CASTELLUCCI

© OIV 2010

points aux extrémités de la plage permettent de déterminer la ligne de base. Le calcul de la concentration en alcool est réalisé à l'aide d'un algorithme simple. La mesure peut être effectuée pour une échelle allant de 0 à 20 %vol.

1.2. Réactifs et matériaux de référence

1. Eau distillée et décarboniquée.
2. Solutions hydroalcooliques dont le titre alcoométrique est déterminé après distillation par la mesure de la masse volumique.

1.3. Matériel

On utilise un spectromètre proche infra-rouge avec une calibration spécifique pour la mesure du titre alcoométrique dans les vins et les moûts en fermentation.

1.4. Echantillonnage

Les échantillons doivent préalablement être stabilisés à une température proche de 20°C. L'analyse doit intervenir rapidement après le débouchage des échantillons.

Il convient d'éliminer le gaz carbonique excédentaire par filtration sur papier filtre à large porosité ou par tout autre moyen.

1.5. Procédure

Avant toute mesure, le spectromètre doit être ajusté par utilisation d'eau distillée et d'une solution hydroalcoolique de titre connu.

1.6. Calculs

Les appareils sont équipés d'un logiciel de calcul qui donne directement le résultat en %vol. avec 2 décimales.

1.7. Validation de la méthode

1.7.1. Comparaison interlaboratoire entre le dosage par proche infra-rouge et après distillation dans les vins

Le but principal de cette étude a été de comparer les résultats obtenus par la méthode proche infra-rouge et la méthode de référence OIV par distillation. 14 laboratoires ont participé à cette comparaison. 10 vins différents provenant de 5 pays européens ont été soumis à l'examen des laboratoires. Leur titre alcoométrique couvrait une échelle

Exemplaire certifié conforme Tbilisi, 25 juin 2010
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Fredercio CASTELLUCCI

© OIV 2010

allant de 9 à 14 %vol. Chaque analyse, par méthode de référence ou par proche infra-rouge a été réalisée 3 fois par chaque laboratoire. Le tableau N°1 donne le détail des différents vins comprenant des vins blancs secs ou doux et des vins rouges secs.

Tableau 1: Liste des échantillons

	Pays	Couleur du vin	Titre alcoométrique figurant sur l'étiquette	Sec/doux	Numéro d'échantillonnage
	Portugal	blanc	9%vol	sec	**1**
	France	blanc	11,5%vol	sec	**2**
	Italie	blanc	12,5%vol	sec	**3**
	Autriche	blanc	13,0%vol	sec	**4**
	Autriche	blanc	10,0%vol	doux	**5**
	Hongrie	blanc	13,0%vol	doux	**6**
	Italie	rouge	11,5%vol	sec	**7**
	Autriche	rouge	12,0%vol	sec	**8**
	France	rouge	13,0%vol	sec	**9**
	Autriche	rouge	14,0%vol	sec	**10**

1.7.2. Résultats de la validation et conclusions

La recherche des valeurs aberrantes par le test de GRUBBS est négatif pour les aberrants de type 1.

Les résultats de la mesure du titre alcoométrique volumique sur un large échantillonnage de vins montrent que les valeurs obtenues par le spectromètre proche infra-rouge sont identiques à celles obtenues par la méthode de référence par distillation. Les répétabilités et reproductibilités des deux méthodes sont comparables. Les valeurs obtenues sont données par le tableau N°2.

Exemplaire certifié conforme Tbilisi, 25 juin 2010
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Fredercio CASTELLUCCI

© OIV 2010

Tableau 2 : Résumé des paramètres de fidélité

	Toutes valeurs		Après élimination des aberrants	
paramètre	NIR:	Distillation:	NIR	Distillation:
r	0,0396	0,0638	0,0328	0,0639
$\mathbf{s}_r$	0,0142	0,0228	0,0117	0,0228
R	0,1705	0,1865	0,1136	0,1500
$\mathbf{s}_R$	0,0609	0,0666	0,0406	0,0536

1.8. Bibiographie

1. Amtsblatt der Europäischen Union; Bestimmung des Alkoholgehaltes von Wein mittels hydrostatischer Waage; VO (EG) Nr. 128/2004;
2. OIV; ANNEX A – Methods of Analyses of wines and musts; Alcoholic strength by volume; Seite 1 – 52; Section 3.1.2; compendium of international methods of wine and must analysis; Volume 1; Edition 2010
3. Murer; G.; Benes,R.; Germann, K.; Imre, M.; Kotnik, P.; Sauseng,G.; Trinkel, M; Alcolyzer – Ein Alkoholmessgerät für Wein; Schweizerische Zeitschrift für Obst-und Weinbau, Wädenswill; Switzerland, 2000, 136(23)597-598
4. American Society of Brewing Chemists; Anton Paar Alcolyzer for Measurement of Alcohol and Original Extract Content in Flavored Alcohol Beverages; Journal - American Society of Brewing Chemists; USA, 2006, VOL 64; Part 4, pages 242-243
5. W. Horwitz; Protocol fort he design, conduct and interpretation of collaborative studies; Pure & Appl. Chem.; Vol. 60; No 6; pp. 855-864; 1988;
6. W. Horwitz; Protocol fort he design, Conduct and interpretation of method-performance studies; Pure & Appl. Chem.; Vol. 67; No 2; pp. 331-343; 1995;
7. OIV; Praktischer Leitfaden für die Validierung, Qualitätskontrolle und Bestimmung der Unsicherheit einer üblichen önologischen Analysenmethode; Resolution Oeno

Exemplaire certifié conforme Tbilisi, 25 juin 2010
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Fredercio CASTELLUCCI

© OIV 2010

10/2005;

8. CABANIS M.T., CABANIS J.C., RAFFY J., PEYRONNENCHE M., VIOTTE O., LEBOEUF J.P. 1983 L'Infralyseur 400 : une détermination automatique du titre alcoométrique des vins. Rev. Fr. Oenol., 89, 75-79.
9. BOUVIER J.C., 1986 Influence du glycérol sur la mesure du degré alcoolique par infra-rouge. Rev. Fr. Oenol., 102, 21-22.
10. OIV, Recueil des méthodes d'analyse des boissons spiritueuses d'origine vitivinicole Edition 2010.

ANNEXE 2: EXEMPLES DE METHODES DE DOSAGE USUELLES EN ŒNOLOGIE PAR ANALYSEURS MOYEN INFRA ROUGE (IRTF)

Les méthodes décrites ci-dessous ne le sont qu'à titre d'exemple. Leur nombre est en constante évolution en raison de la réalisation permanente de nouvelles calibrations. Les plus importantes actuellement développées peuvent se classer en plusieurs catégories distinctes.

1. Les méthodes « directes »

Il s'agit du dosage des composés organiques pour lesquels la corrélation entre l'absorption moléculaire et la concentration peut être considérée comme directe. Le tableau suivant résume les méthodes couramment rencontrées.

Analyte	Echelle de mesure	Reproductibilité intralaboratoire	Reproductibilité interlaboratoire
Glucose et fructose	0 à 400 $g.L^{-1}$	1,3 $g.L^{-1}$	
Acide malique	0,3 à 6 $g.L^{-1}$	0,15 $g.L^{-1}$	0,6 $g.L^{-1}$
Acide lactique	0,3 à 6 $g.L^{-1}$	0,15 $g.L^{-1}$	0,6 $g.L^{-1}$
Dioxyde de carbone	60 à 1300 $mg.L^{-1}$	95 $mg.L^{-1}$	230 $mg.L^{-1}$

Exemplaire certifié conforme Tbilisi, 25 juin 2010
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Fredercio CASTELLUCCI

© OIV 2010

Glycérol	0,2 à 10 $g.L^{-1}$	10 %	
Acide tartrique	1 à 15 $g.L^{-1}$	10 %	
Acide gluconique	0,1 à 15 $g.L^{-1}$	10 %	

2. Les méthodes « indirectes »

En œnologie deux cas différents peuvent être rencontrés.

1. La molécule recherchée n'a pas d'absorption significative dans le proche infra-rouge soit par nature, soit en raison de concentrations trop faibles.
2. La recherche ne concerne pas une molécule spécifique mais un indice traduisant un équilibre résultant d'un ensemble complexe de composés organiques.

Pour le premier cas, nous donnerons comme exemple le dosage du potassium. L'ion potassium n'absorbe pas dans l'infra-rouge. Les absorptions qui sont détectées par les approches chimiométriques et qui sont corrélées à sa concentration dans le vin ou dans le moût analysé sont en fait celles de composés organiques qui sont en équilibre avec cet ion.

Pour le second cas, nous citerons comme exemple, les mesures du pH ou de l'acidité totale, qui sont très fiables, et qui sont rendues possibles par la lecture, dans le spectre infra-rouge, des équilibres complexes des composés organiques responsables de ces valeurs indiciaires.

Le tableau suivant décrit les méthodes couramment pratiquées.

Méthode	**Echelle de mesure**	**Reproductibilité intralaboratoire**	**Reproductibilité interlaboratoire**
Masse volumique	0,0012 à 1,4000 $g.cm^{-3}$	0,00015 $g.cm^{-3}$	0,0010 $g.cm^{-3}$
Titre alcoométrique volumique	8 à 16 %.vol.	0,10 %.vol.	0,21 %.vol.

Exemplaire certifié conforme Tbilisi, 25 juin 2010
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Federcio CASTELLUCCI

© OIV 2010

Acidité totale	3 à 33 $g.L^{-1}$ en acide tartrique	0,11 $g.L^{-1}$ en acide tartrique	0,15 $g.L^{-1}$ en acide tartrique
Acidité volatile	0,30 à 0,96 $g.L^{-1}$ en acide acétique	0,036 $g.L^{-1}$ en acide acétique	0,12 $g.L^{-1}$ en acide acétique
pH	2,6 à 4,7	0,06	0,12
Potassium	600 à 8000 $mg.L^{-1}$	10 %	
Indice de composés phénoliques totaux	15 à 100	14	
Azote ammoniacal	5 à 250 $mg.L^{-1}$	16 %	
Azote α-aminé	5 à 250 $mg.L^{-1}$	10 %	

3. Bibliographie

1. DUBERNET Marc, DUBERNET Matthieu et GRASSET Françoise, 1999, Utilisation de l'analyse infrarouge multiparamétrique à transformée de Fourier en œnologie, Feuillet vert OIV N°1089.

2. DUBERNET Marc et DUBERNET Matthieu, 2000, Utilisation de l'analyse infrarouge à transformée de Fourier pour l'analyse œnologique de routine, Revue Française d'œnologie, N°181, 10-13.

3. Marc DUBERNET , Matthieu DUBERNET, Vincent DUBERNET, Sylvain COULOMB, Matthieu LERCH & Isabelle TRAINEAU, 2000, Analyse objective de la qualité des vendanges par spectrométrie infra-rouge à transformée de Fourrier (IRTF), Congrès OIV 2000, Paris.

4. DUBERNET Matthieu, DUBERNET Marc, GRASSET Françoise, GARCIA Augustin, 2001 Analyse de l'azote assimilable dans les moûts par Interférométrie Infrarouge à Transformée de Fourier, Revue Française d'Oenologie, N°187, 9-13.

5. DUBERNET Matthieu, DUBERNET Marc, SAGE Lucile, 2006, Modification de la

Exemplaire certifié conforme Tbilisi, 25 juin 2010
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Federcio CASTELLUCCI

© OIV 2010

composition des moûts et des vins issus de raisins parasités par Aspergillus carbonarius. Evaluation rapide de la contamination du raisin et de la teneur en Ochratoxine A dans les moûts et les vins par infrarouge à transformée de Fourier, Revue Française d'œnologie, N°216.

6. BERTRAND D., DUFOUR E. et al. 2000, La spectroscopie infrarouge et ses applications analytiques. Technique et documentation Ed.
7. PATZ C-D, DAVID A., THENTE K., KURBEL P., DIETRICH H ; 1999. Wine
8. analysis with FTIR spectrometry. Wein Wissenschaft, 54, 80-87.
9. J.C. BOULET, P.WILLIAMS, T.DOCO. A Fourier transform infrared spectroscopy study of wine polysaccharides, Carbohydrate Polymers, 69 (2007), 79-85.
10. J.C. BOULET, T.DOCO, J.M. ROGER, Improvement of calibration models using two successive orthogonal projection methods. Application to quantification of wine polysaccharides, Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 87 (2007), 295-302.
11. FERREIRA M.L., COSTA A. M., RIBEIRO N., SIMÕES T., BARROS P., 2009. Quality control in FTIR wine analysis. Acceptance of analytical results. Ciência Tec. Vitiv., 24(1), 47-53."

Exemplaire certifié conforme Tbilisi, 25 juin 2010
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Fredercio CASTELLUCCI

© OIV 2010