

RÉSOLUTION OENO 10/2006

DETERMINATION CONJOINTE DU GLUCOSE ET DU FRUCTOSE DES VINS PAR pH-METRIE DIFFERENTIELLE

L'ASSEMBLEE GENERALE,

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 et d'appréciation des vins,

DECIDE de compléter l'Annexe A du Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts par la méthode suivante et de l'adopter en méthode de type III:

DETERMINATION CONJOINTE DU GLUCOSE ET DU FRUCTOSE DES VINS PAR pH-METRIE DIFFERENTIELLE	Méthode Type III
--	---------------------

1. PORTEE ET CHAMP D'APPLICATION

Cette méthode est applicable à l'analyse du glucose et du fructose des vins entre 0 et 60 g/L (niveau moyen) ou 50 et 270 g/L (niveau haut).

2. PRINCIPE

La détermination conjointe du glucose et du fructose par pH-métrie différentielle consiste en une phosphorylation du glucose et du fructose par de l'hexokinase. Les ions H^+ générés de manière stœchiométrique par rapport aux quantités de glucose et de fructose sont ensuite quantifiés.

3. REACTIONS

Le glucose et le fructose présents sont phosphorylés par l'adénosine triphosphate (ATP) cours d'une réaction enzymatique catalysée par l'hexokinase (HK) (EC 2.7.1.1)

- glucose + ATP $\rightarrow$ glucose-6-phosphate + ADP + H^+
- fructose + ATP $\rightarrow$ fructose-6-phosphate + ADP + H^+

4. REACTIFS

- 4.1. Eau déminéralisée (18 M Ω) ou bidistillée
- 4.2. 2-Amino-2-(hydroxyméthyl)propane-1,3-diol (TRIS) pureté $\geq$ 99%
- 4.3. Adénosine triphosphate disodique (ATP, 2Na) pureté $\geq$ 99%
- 4.4. Phosphate trisodique à douze molécules d'eau ($\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) pureté $\geq$ 99%
- 4.5. Hydroxyde de sodium (NaOH) pureté $\geq$ 98%
- 4.6. Chlorure de magnésium à six molécules d'eau ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) pureté $\geq$ 99%
- 4.7. Triton X 100
- 4.8. Chlorure de potassium (KCl) pureté $\geq$ 99%
- 4.9. 2-Bromo-2-nitropropane-1,3-diol (Bronopol) ($\text{C}_3\text{H}_6\text{BrNO}_4$)
- 4.10. Hexokinase (EC 2.7.1.1) 1 mg $\geq$ 145 U (ex Hofmann La Roche, Mannheim, Allemagne ref. HEXO-70-1351)
- 4.11. Glycérol pureté $\geq$ 98%
- 4.12. Glucose pureté $\geq$ 99%
- 4.13. Tampon de réaction pH 8,0 commercial ou préparé selon la méthode suivante :
dans une fiole jaugée de 100 mL (5.2) verser approximativement 70 mL (5.3) d'eau (4.1), mettre en agitation continue (5.5). Ajouter 0,242 g $\pm$ 0,001 g (5.4) de TRIS (4.2), 0,787 g $\pm$ 0,001 g (5.4) d'ATP (4.3), 0,494 g $\pm$ 0,001 g (5.4) de phosphate de sodium (4.4), 0,009 mg $\pm$ 0,001 g (5.4) d'hydroxyde de sodium (4.5), 0,203 g $\pm$ 0,001 g (5.4) de chlorure de magnésium (4.6), 2,000 $\pm$ 0,001 g (5.4) de Triton X 100 (4.7), 0,820 g $\pm$ 0,001 g (5.4) de chlorure de potassium (4.8) et 0,010 $\pm$ 0,001 g (4.9) de bronopol. Ajuster au trait de jauge avec de l'eau (4.1). Le pH final doit être de 8,0 $\pm$ 0,1 (5.6), sinon l'ajuster avec de l'hydroxyde de sodium ou de l'acide chlorhydrique. Le tampon ainsi préparé est stable pendant deux mois à 4°C.
- 4.14. Solution enzymatique commerciale ou préparée selon la méthode suivante : à l'aide d'une pipette jaugée (5.7) disposer 5 mL de glycérol (4.11) dans une fiole jaugée de 10 mL, ajuster au trait de jauge avec de l'eau (4.1) et homogénéiser. Dissoudre 20 mg $\pm$ 1 mg (5.4) d'hexokinase (4.10) et 5 mg de Bronopol (4.9) dans 10 mL de la solution de glycérol. L'activité de la solution enzymatique doit être de 300 U $\pm$ 50 U par mL pour l'hexokinase. La solution enzymatique est stable pendant 6 mois à 4°C.
- 4.15. Préparation de la solution d'étalonnage (niveau moyen) si la teneur supposée est inférieure à 50 g/L de glucose + fructose)

Placer 3,60 g $\pm$ 0,01 g (5.4) de glucose (4.12) (préalablement desséché 12 heures à 40 °C jusqu'à poids constant), 0,745 g $\pm$ 0,001 g (5.4) de chlorure de potassium (4.8) et 0,010 g $\pm$ 0,001 g de bronopol (4.9) dans une fiole jaugée de 100 mL (5.2). Ajouter de l'eau (4.1). Bien homogénéiser (5.5). Ajuster au trait de jauge avec de l'eau (4.1) après avoir enlever le barreau magnétique. La concentration finale est de 36 g/L de glucose La solution est stable 6 mois à 4°C.

4.16. Préparation de la solution d'étalonnage (niveau haut) si la teneur supposée est supérieure à 50 g/L de glucose + fructose)

Placer 18,0 g $\pm$ 0,01 g (5.4) de glucose (4.12) (préalablement desséché 12 heures à 40 °C jusqu'à poids constant), 0,745 g $\pm$ 0,001 g (5.4) de chlorure de potassium (4.8) et 0,010 g $\pm$ 0,001 g de bronopol (4.9) dans une fiole jaugée de 100 mL (5.2). Ajouter de l'eau (4.1). Bien homogénéiser (5.5). Ajuster au trait de jauge avec de l'eau (4.1) après avoir enlever le barreau magnétique. La concentration finale est de 180 g/L de glucose La solution est stable 6 mois à 4°C.

5. APPAREILLAGE

5.1. Appareil de pH-métrie différentielle (EUROCHEM CL 10 plus, Microlab EFA ou équivalent) voir annexe A

5.2. Fiole jaugée de 100 mL classe A

5.3. Eprouvette graduée à pied de 100 mL

5.4. Balance de précision permettant de peser au mg près

5.5. Agitateur magnétique et barreau magnétique en téflon

5.6. pH-mètre

5.7. Pipettes jaugées de 3mL, 5 mL classe A

5.8. Fiole jaugée de 10 mL classe A

5.9. Pipettes automatiques à piston de 25 et 50 μ L

6. PREPARATION DES ECHANTILLONS

Les échantillons ne doivent pas être trop chargés de matières en suspension, dans le cas contraire, les centrifuger ou les filtrer. Les vins mousseux doivent être dégazés.

7. MODE OPERATOIRE

L'opérateur doit respecter les instructions d'utilisation de l'appareillage (5.1). Avant toute utilisation, l'instrument doit être stabilisé en température. Les circuits doivent

être rincés avec la solution de tampon (4.13) après nettoyage éventuel.

7.1. Détermination du blanc (détermination du signal de l'enzyme)

remplir les compartiments électrodes (EL_1 et EL_2) du pH-mètre différentiel (5.1) avec le tampon (4.13), la différence de potentiel entre les deux électrodes (D_1) doit être comprise entre ± 150 mV ;

ajouter 24 μ L de solution enzymatique (4.14) dans la chambre de réaction (à la micropipette 5.9 ou par le préparateur) et remplir l'électrode EL_2 ;

mesurer la différence de potentiel (D_2) entre les deux électrodes ;

calculer la différence de pH, ΔpH_0 pour le blanc selon le calcul suivant :

$$\Delta pH_0 = D_2 - D_1$$

où

ΔpH_0 = la différence de pH entre les deux mesures pour le blanc ;

D_1 = valeur de la différence de pH entre les deux électrodes remplies avec le tampon ;

D_2 = valeur de la différence de pH entre les deux électrodes dont l'une est remplie de tampon et l'autre de tampon et d'enzyme.

La valeur de ΔpH_0 permet de vérifier l'état des électrodes en cours de dosage ainsi que leur dérive éventuelle avec le temps; elle doit être comprise entre -30 et 0 mV et $\pm 1,5$ mV entre deux mesures consécutives. Dans le cas contraire, vérifier la qualité du tampon pH et la propreté du circuit hydraulique et des électrodes, nettoyer si nécessaire puis refaire le blanc.

7.2. Etalonnage

7.2.1. Niveau moyen

remplir les compartiments électrodes (EL_1 et EL_2) avec le tampon (4.13) ;

ajouter 25 μ L (à la micropipette 5.9 ou par le préparateur) de solution étalon de glucose (4.15) dans la chambre de réaction ;

remplir les électrodes EL_1 et EL_2 avec le mélange tampon + solution étalon ;

mesurer la différence (D_3) de potentiel entre les deux électrodes ;

ajouter 24 μ L de solution enzymatique (4.14) et remplir l'électrode EL_2 avec le mélange

tampon + solution étalon + enzyme ;

après le temps nécessaire à la réaction enzymatique, mesurer la différence de potentiel (D_4) entre les deux électrodes ;

calculer la différence de pH, ΔpH_c pour l'échantillon de calibration selon le calcul suivant :

$$\Delta pH_c = (D_4 - D_3) - \Delta pH_0$$

où

ΔpH_c = la différence entre les deux mesures D_3 et D_4 pour l'échantillon de calibration moins la différence obtenue pour le blanc ;

D_3 = valeur de la différence de pH entre les deux électrodes remplies avec le mélange tampon/solution de référence ;

D_4 = valeur de la différence de pH entre les deux électrodes dont l'une est remplie de tampon/solution de référence et l'autre de tampon/solution de référence/enzyme.

calculer la pente de la droite d'étalonnage :

$$s = C_u / \Delta pH_c$$

où

C_u est la concentration de glucose dans la solution étalon exprimée en g/L.

Vérifier la validité de l'étalonnage en analysant 25 μ L de solution étalon (ML) de glucose (4.15) en suivant la procédure (7.3). Le résultat doit être compris entre $\pm 2\%$ de la valeur de référence. Dans le cas contraire recommencer la procédure de calibration.

7.2.2. Niveau haut

remplir les compartiments électrodes (EL_1 et EL_2) avec le tampon (4.13) ;

ajouter 10 μ L (à la micropipette 5.9 ou par le préparateur) de solution étalon (HL) de glucose (4.16) dans la chambre de réaction ;

remplir les électrodes EL_1 et EL_2 avec le mélange tampon + solution étalon ;

mesurer la différence (D_3) de potentiel entre les deux électrodes ;

ajouter 24 μ L de solution enzymatique (4.14) et remplir l'électrode EL_2 avec le mélange tampon + solution étalon + enzyme ;

après le temps nécessaire à la réaction enzymatique, mesurer la différence de potentiel (D_4) entre les deux électrodes ;

calculer la différence de pH, ΔpH_c pour l'échantillon de calibration selon le calcul suivant :

$$\Delta pH_c = (D_4 - D_3) - \Delta pH_0$$

où

ΔpH_c = la différence de pH entre les deux mesures D_3 et D_4 pour l'échantillon de calibration moins la différence obtenue pour le blanc ;

D_3 = valeur de la différence de pH entre les deux électrodes remplies avec le mélange tampon/solution de référence ;

D_4 = valeur de la différence de pH entre les deux électrodes dont l'une est remplie de tampon/solution de référence et l'autre de tampon/solution de référence/enzyme.

calculer la pente de la droite d'étalonnage :

$$s = C_u / \Delta pH_c$$

où

C_u est la concentration de glucose dans la solution étalon exprimée en g/L.

Vérifier la validité de l'étalonnage en analysant 10 μ L de solution étalon de glucose (4.16) en suivant la procédure (7.3). Le résultat doit être compris entre $\pm 2\%$ de la valeur de référence. Dans le cas contraire recommencer la procédure de calibration.

7.3. Quantification

remplir les compartiments électrodes (EL_1 et EL_2) avec le tampon (4.13)

ajouter 10 μ L (niveau haut) ou 25 μ L (niveau moyen) (à la micropipette 5.9 ou par le préparateur) d'échantillon dans la chambre de réaction ;

remplir les électrodes EL_1 et EL_2 avec le mélange tampon + échantillon ;

mesurer la différence (D_5) de potentiel entre les deux électrodes ;

ajouter 24 μ L de solution enzymatique (4.14) et remplir l'électrode EL_2 avec le mélange tampon + échantillon + enzyme ;

mesurer la différence de potentiel (D_6) entre les deux électrodes ;
calculer la quantité de soluté dans l'échantillon selon le calcul suivant :

$$w = s \times [(D_6 - D_5) - \Delta pH_0]$$

où

w = la quantité de soluté dans l'échantillon (en g/L) ;

S est la pente déterminée par la droite de calibration ;

ΔpH_0 = la différence de pH entre les deux mesures pour le blanc ;

D_5 = valeur de la différence de pH entre les deux électrodes remplies avec l'échantillon/solution de référence ;

D_6 = valeur de la différence de pH entre les deux électrodes dont l'une est remplie de tampon/échantillon et l'autre de tampon/échantillon/enzyme.

8. EXPRESSION DES RESULTATS

Les résultats sont exprimés en g/L de glucose + fructose avec un chiffre significatif après la virgule.

9. FIDELITE

Les détails de l'essai interlaboratoire portant sur la fidélité de la méthode sont résumés dans l'annexe B.

9.1. Répétabilité

La différence absolue entre deux résultats individuels obtenus sur une matière identique soumise à essai par un opérateur utilisant le même appareillage, dans l'intervalle de temps le plus court possible, ne dépassera pas la valeur de répétabilité r dans 95% des cas.

La valeur est : $r = 0,021x + 0,289$ où x est la teneur en g/L de glucose + fructose

9.2. Reproductibilité

La différence absolue entre deux résultats individuels obtenus sur une matière identique soumise à essai dans deux laboratoires, ne dépassera pas la valeur de reproductibilité R dans 95% des cas.

La valeur est : $R = 0,033x + 0,507$ où x est la teneur en g/L de glucose + fructose

10. AUTRES CARACTERISTIQUES DE L'ANALYSE

10.1. Limites de détection et de quantification

10.1.1. Limite de détection

Elle est déterminée à partir de 10 séries de trois répétitions d'un blanc analytique et de la régression linéaire réalisée avec les vins de l'essai de fidélité, elle est égale à trois écarts types. Dans ce cas la méthode a donné comme résultat une limite de détection de

0,03 g/L. Des essais par dilutions successives ont confirmé cette valeur.

10.1.2. Limite de quantification

Elle est déterminée à partir de 10 séries de trois répétitions d'un blanc analytique et de la régression linéaire réalisée avec les vins de l'essai de fidélité, elle est égale à dix écarts types. Dans ce cas la méthode a donné comme résultat une limite de détection de

0,10 g/L. Des essais par dilutions successives ont confirmé cette valeur. Les quantifications de vins blancs et rouges réalisées par les laboratoires qui ont participé à l'analyse interlaboratoire confirment également ces chiffres.

10.2. Justesse

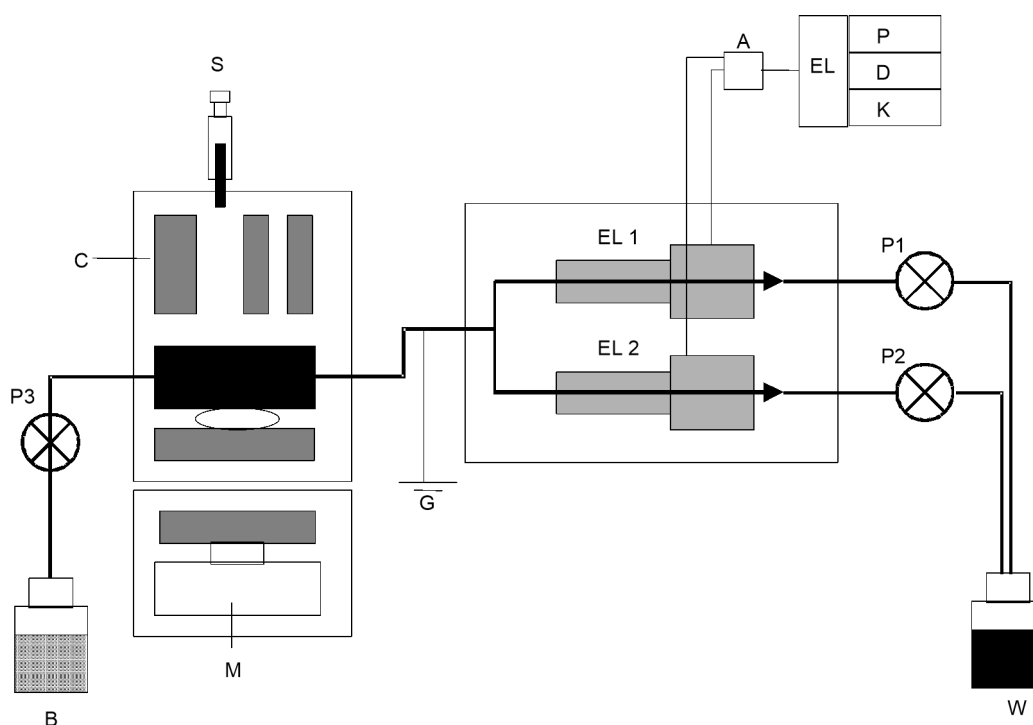
La justesse est évaluée à partir du taux de recouvrement moyen calculé des vins surchargés analysés en double aveugle lors de l'essai interlaboratoire (vins A, B, C, D, F et J). Elle est de 98.9% avec un intervalle de confiance de 0.22%.

11. CONTROLE QUALITE

Des contrôles qualité peuvent être réalisés avec des matériaux de référence certifiés, des vins dont les caractéristiques sont issues d'un consensus ou de vins surchargés insérés régulièrement dans les séries analytiques et en suivant les cartes de contrôle afférentes.

Annexe A

Schéma de l'appareillage de pH-métrie différentielle



A : amplificateur différentiel ; B : solution de tampon ; C : chambre de mélange ;
D : indicateur ; EL1 et EL 2 électrodes capillaires ; EL : partie électronique ; G : mise à la terre ; K : clavier ; M : agitateur magnétique ; P : imprimante ; P1 à P3 : pompes péristaltiques ; S : seringue d'injection de l'échantillon et de l'enzyme ; W : mise à l'égout.

Annexe B

Données statistiques obtenues à partir des résultats des essais interlaboratoire

Conformément à l'ISO 5725-2:1994, les paramètres suivants ont été définis au cours d'un essai interlaboratoire. Cet essai a été conduit par le laboratoire du Comité Interprofessionnel du Vin de Champagne à Epernay (France).

Année de l'essai interlaboratoire : 2005

Nombre de laboratoires : 13 en double aveugle

Nombre d'échantillons : 10

	Vin A	Vin B	Vin C	Vin D	Vin E	Vin F	Vin G	Vin H	Vin I	Vin J
Moyenne en g/L	8,44	13,33	18,43	23,41	28,03	44,88	86,40	93,34	133,38	226,63
Nombre de laboratoire	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13
nombre de laboratoire après élimination des plus grandes dispersions	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13
écart type de répétabilité	0,09	0,13	0,21	0,21	0,29	0,39	0,81	0,85	1,19	1,51
limite de répétabilité	0,27	0,38	0,61	0,62	0,86	1,14	2,38	2,51	3,52	4,45
RSDr, 100%	1,08	0,97	1,13	0,91	1,04	0,86	0,94	0,91	0,89	0,67
HORRAT r	0,26	0,25	0,31	0,26	0,30	0,27	0,32	0,32	0,33	0,47
écart type de reproductibilité	0,17	0,27	0,37	0,59	0,55	0,45	1,27	1,43	1,74	2,69
limite de reproductibilité	0,50	0,79	1,06	1,71	1,60	1,29	3,67	4,13	5,04	7,78
RSDR, 100%	2,05	2,05	1,99	2,54	1,97	1,00	1,47	1,53	1,31	1,19
HORRAT R	0,50	0,54	0,55	0,72	0,58	0,31	0,51	0,53	0,48	0,47

Types d'échantillons :

Vin A : vin blanc contenant naturellement du sucre, surchargé de 2,50 g/L glucose et de 2,50 g/L de fructose ;

Vin B : vin blanc contenant naturellement du sucre (vin A), surchargé de 5,00 g/L glucose et de 50 g/L de fructose ;

Vin C : vin blanc contenant naturellement du sucre (vin A), surchargé de 7,50 g/L

glucose et de 7,50 g/L de fructose ;

Vin D : vin blanc contenant naturellement du sucre (vin A), surchargé de 10,0 g/L glucose et de 10,0 g/L de fructose ;

Vin E : vin aromatisé;

Vin F : vin blanc contenant naturellement moins de 0,4 g/L de sucre, surchargé de 22,50 g/L glucose et de 22,50 g/L de fructose ;

Vin G : vin rouge naturellement doux;

Vin H : vin blanc doux ;

Vin I : mistelle ;

Vin J : vin blanc contenant naturellement moins de 0,4 g/L de sucre, surchargé de 115,00 g/L glucose et de 115,00 g/L de fructose ;

12. BIBLIOGRAPHIE

1. LUZZANA M., PERELLA M. et ROSSI-BERNARDI L (1971) : Anal. Biochem, 43, 556-563.
2. LUZZANA M., AGNELLINI D., CREMONESI P. et CARAMENTI G. (2001) : Enzymatic reactions for the determination of sugars in food samples using the differential pH technique. Analyst, 126, 2149 -2152.
3. LUZZANA M., LARCHER R., MARCHITTI C. V. et BERTOLDI D. (2003) : Quantificazione mediante pH-metria differenziale dell'urea negli spumanti metodo classico.in "Spumante tradizionale e classico nel terzo millennio" 27-28 giugno 2003, Istituti Agrario di San Mechele.
4. MOSCA A., DOSSI G., LUZZANA M., ROSSI-BERNARDI L., FRIAUF W. S., BERGER R.L., HOPKINS H. P. et CAREY V (1981) : Improved apparatus for the differential measurement of pH : application to the measurement of glucose. Anal. Biochem., 112, 287 - 294.
5. MOIO L., GAMBUTI A., Di MARZIO L. et PIOMBINO P. (2001) : Differential pHmeter determination of residual sugars in wine. Am. J. Enol. Vitic, 52(3), 271 - 274.
6. TUSSEAU D., FENEUIL A., ROUCHAUSSE J.-M. et VAN LAER S. (2004) : Mesure de différents paramètres d'intérêt oenologique par pHmétrie différentielle. F.V. O.I.V. n° 1199, 5 pages.