

## RESOLUTION OENO 11/2006

### DETERMINATION GLOBALE DU GLUCOSE, DU FRUCTOSE ET DU SACCHAROSE DES MOÛTS ET 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 IV:

|                                                                                                                   |                 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| DETERMINATION GLOBALE DU GLUCOSE, DU FRUCTOSE ET DU SACCHAROSE DES MOÛTS ET DES VINS PAR pH-METRIE DIFFERENTIELLE | Methode Type IV |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|

## 1. PORTEE ET CHAMP D'APPLICATION

Cette méthode est applicable à l'analyse globale du glucose, du fructose et du saccharose dans les moûts et les vins entre 0 et 270 g/L.

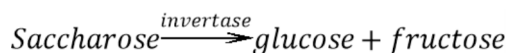
Cette quantification se différencie de celle du glucose et du fructose par pHmétrie différentielle et ne peut pas lui être substituée.

## 2. PRINCIPE

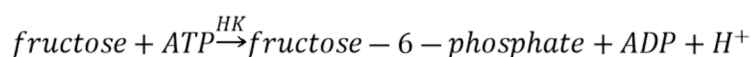
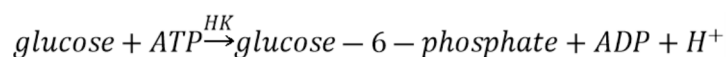
La détermination par pH-métrie différentielle du glucose, du fructose et du saccharose consiste en une hydrolyse préalable du saccharose par de l'invertase, suivie d'une phosphorylation du glucose et du fructose par de l'hexokinase. Les ions  $H^+$  générés de manière stœchiométrique par rapport aux quantités de glucose et de fructose sont ensuite quantifiés.

### 3. REACTIONS

Le saccharose éventuellement présent est hydrolysé par de l'invertase (EC 3.2.1.26)



Le glucose et le fructose initialement présents ou consécutifs à l'action de l'invertase sont phosphorylés par l'adénosine triphosphate (ATP) cours d'une réaction enzymatique catalysée par l'hexokinase (HK) (EC 2.7.1.1)



### 4. REACTIFS

- 4.1. Eau déminéralisée (18 M $\Omega$ ) 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 (Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O) pureté  $\geq$  99%
- 4.5. Hydroxyde de sodium (NaOH) pureté  $\geq$  98%
- 4.6. Chlorure de magnésium à six molécules d'eau (MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>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) (C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>BrNO<sub>4</sub>)
- 4.10. Invertase (EC 3.2.1.26) 1 mg  $\geq$  500 U (ex Sigma ref I-4504)
- 4.11. Hexokinase (EC 2.7.1.1) 1 mg  $\geq$  145 U (ex Hofmann La Roche, Mannheim, Allemagne ref HEXO-70-1351)
- 4.12. Glycérol pureté  $\geq$  98%
- 4.13. Saccharose pureté  $\geq$  99%
- 4.14. Tampon de réaction pH 8,0 commercial (ex : DIFFCHAMB GEN 644) 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 (5.4) 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.

4.15. Solution enzymatique commerciale ou préparée selon la méthode suivante : à l'aide d'une pipette jaugée (5.7) disposer 5 mL de glycérol (4.12) dans une fiole jaugée de 10 mL, ajuster au trait de jauge avec de l'eau (4.1) et homogénéiser. Dissoudre 300 mg  $\pm$  1 mg (5.4) d'invertase (4.10) 10 mg  $\pm$  1 mg (5.4) d'hexokinase (4.11) dans 3 mL de la solution de glycérol. L'activité de la solution enzymatique doit être de 50 000 U  $\pm$  100 U par mL pour l'invertase et de 480 U  $\pm$  50 U par mL pour l'hexokinase. La solution enzymatique est stable pendant 6 mois à 4°C.

#### 4.16. PREPARATION DE LA SOLUTION D'ETALONNAGE

Placer 17,100 g  $\pm$  0,01 g (5.4) de saccharose (4.13) (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 (5.4) de Bronopol 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 171 g/L de saccharose. 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  $\mu$ 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 (4.14) 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 (4.14), la différence de potentiel entre les deux électrodes ( $D_1$ ) doit être comprise entre  $\pm 150$  mV

ajouter 32  $\mu$ L de solution enzymatique (4.15) 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,  $\Delta pH_0$ , pour le blanc selon le calcul suivant :

$$\bullet \Delta pH_0 = D_2 - D_1$$

où

$\Delta pH_0$  = 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  $\Delta pH_0$  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

remplir les compartiments électrodes ( $EL_1$  et  $EL_2$ ) avec le tampon (4.14) ;

ajouter 10  $\mu$ L (à la micropipette 5.9 ou par le préparateur) de solution étalon de saccharose (5) 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 32  $\mu$ L de solution enzymatique (4.15) 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,  $\Delta pH_c$  pour l'échantillon de calibration selon le calcul suivant :

$$\bullet \Delta pH_c = (D_4 - D_3) - \Delta pH_o$$

où

$\Delta pH_c$  = 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 :

$$\bullet s = C_u / \Delta pH_c$$

où

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

Vérifier la validité de l'étalonnage en analysant 10  $\mu$ L de solution étalon de saccharose (5) 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<sub>1</sub> et EL<sub>2</sub>) avec le tampon (4.14)

ajouter 10 µL (à la micropipette 5.9 ou par le préparateur) d'échantillon dans la chambre de réaction ;

remplir les électrodes EL<sub>1</sub> et EL<sub>2</sub> avec le mélange tampon + échantillon ;

mesurer la différence (D<sub>5</sub>) de potentiel entre les deux électrodes ;

ajouter 32 µL de solution enzymatique (4.15) et remplir l'électrode EL<sub>2</sub> avec le mélange tampon + échantillon + enzyme ;

mesurer la différence de potentiel (D<sub>6</sub>) entre les deux électrodes ;

calculer la quantité de soluté dans l'échantillon selon le calcul suivant :

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

où

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

S est la pente déterminée par la droite de calibration ;

$\Delta pH_0$  = la différence de pH entre les deux mesures pour le blanc ;

D<sub>5</sub> = valeur de la différence de pH entre les deux électrodes remplies avec l'échantillon/solution de référence ;

D<sub>6</sub> = 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 inverti avec un chiffre significatif après la virgule.

## 9. CARACTERISTIQUES DE L'ANALYSE

A cause de l'hydrolyse du saccharose dans les moûts et les vins il n'a pas été possible d'organiser une analyse interlaboratoire selon le protocole de l'OIV.

L'étude intra-laboratoire de cette méthode montre pour le saccharose une linéarité entre 0 et 250 g/L, une limite de détection de 0,2 g/L, une limite de quantification de 0,6 g/L, une répétabilité de 0,0837x – 0,0249 g/L et une reproductibilité de 0,0935x –

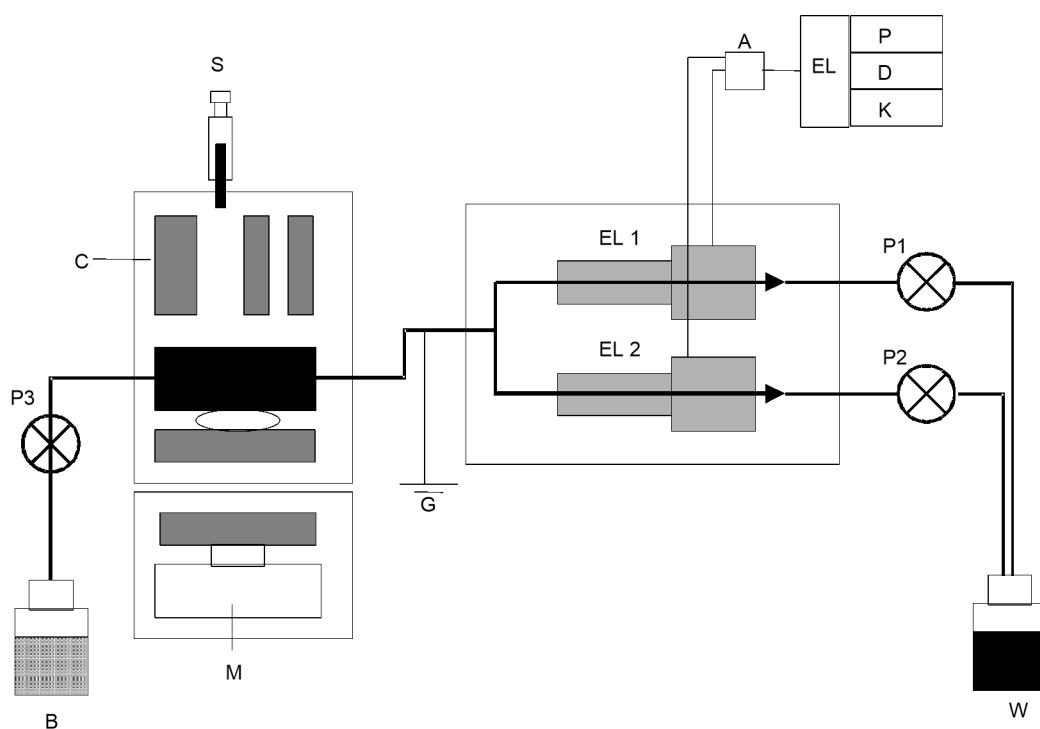
0,073 g/L (où x est la teneur en saccharose).

## 10. 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

### BIBLIOGRAPHIE

1. LUZZANA M., PERELLA M. et ROSSI-BERNARDI L (1971) : Electrometric method for measurement of small pH changes in biological systems. 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. 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.
5. 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 measurment of pH : application to the measurment of glucose. Anal. Biochem., 112, 287 - 294.
6. TUSSEAU D., FENEUIL A., ROUCHAUSSE J.-M. et VAN LAER S. (2004) : Mesure de différents paramètres d'interêt oenologique par pHmétrie différentielle. F.V. O.I.V. n° 1199, 5 pages.