RÉSOLUTION OENO 33/2004

DOSAGE DE L'ACIDE SHIKIMIQUE DANS LE VIN PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE ET DETECTION UV

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 C du Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts par la méthode de type II suivante:

1. Introduction

L'acide shikimique (acide 3,4,5-Trihydroxycyclohex-1-ène-1-carboxylique) est biosynthétisé à partir d'acide quinique par déshydratation et joue un rôle majeur comme précurseur de phénylalanine, tyrosine, tryptophane et des alcaloïdes végétaux [1]. L'acide shikimique se trouve naturellement dans une grande variété de fruits [2].

Les Etats membres sont encouragés à poursuivre la recherche dans ce domaine pour éviter les évaluations non scientifiques de ces résultats.

Le dosage de l´acide shikimique par CLHP a été validé dans le cadre d'une étude collaborative internationale par des analyses d'échantillons de vins présentant des teneurs naturelles en acide shikimique allant de 10 à 150 mg/l. La validité a été prouvée par une comparaison inter-laboratoire utilisant respectivement la CLHP, la GC/FID et GC/MS .□3□

2. Domaine d'application

Ce document décrit une méthode usuelle en mode isocratique qui s'applique à la détermination quantitative d'acide shikimique dans les vins rouges, rosés et blancs (y compris vins mousseux et vins spéciaux) à des concentrations allant de 1 mg/l jusqu'à 300 mg/l en utilisant la chromatographie liquide haute performance (CLHP). La méthode peut s'appliquer aux vins mousseux à condition que les échantillons soient préalablement dégazés (par sonication par exemple).

Exemplaire certifié conforme Vienne, 30 juillet 2004
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2004

3. Principe

L'acide shikimique est dosé directement, sans préparation d'échantillon, par chromatographie liquide haute performance en utilisant un système de colonnes couplees. La première colonne est de type C_{18} t la deuxieme colonne est de type echangeuse de cations. Elle est chauffee à 65°C. En utilisant une eau légèrement acidifiée comme solvant d'élution, on obtient une bonne résolution de l'acide shikimique sans effets de matrice du vin. Grâce à la double liaison du cyclohexène, l'acide shikimique présente un maximum d'absorption situé à 210 nm et peut donc être facilement détecté par un détecteur UV.

4. Réactifs et matériaux

4.1. Acide shikimique (CAS 138-59-0), d'une pureté minimum de 98 %

4.2. Acide sulphurique 0,5 M

4.3. Eau bidistillée

4.4. Préparation du solvant d'élution (0,01 M H_2SO_4,)

Pipeter 20 ml d'acide sulfurique 0,5 M (4.2) dans une fiole jaugée de 1000 ml, remplir d'eau bidistillée (4.3) jusqu'à environ 900 ml, agiter et ajuster à 1000 ml. Filtrer le solvant d'élution au moyen d'un filtre dont les pores ont un diamètre inférieur ou égal à 0,45 µm et dégazer.

4.5. Préparation de la solution mère étalon (500 mg/l d'acide shikimique)

Peser exactement 50 mg d'acide shikimique (4.1), transférer quantitativement dans une fiole jaugée de 100 ml, remplir d'eau bidistillée (4.3) jusqu'à 90 ml environ, agiter et ajuster à 100 ml. La solution mère étalon peut être conservée pendant plusieurs mois a 18°C.

4.6. Préparation des solutions étalons de travail (5, 25, 50, 100, 150 mg/l d'acide shikimique) Diluer la solution mère à raison de 500 mg/l (4.5) avec de l'eau bidistillée (4.3) pour obtenir cinq solutions étalons de travail de 5, 25, 50, 100, 150 mg/l d'acide shikimique. Préparer les solutions étalons quotidiennement.

5. Appareillage et matériel

Equipement usuel de laboratoire et en particulier le matériel suivant:

5.1. Système CLHP capable d'effectuer l'analyse d'une solution d'acide shikimique

5.1.1. Chromatographe CLHP équipé d'une vanne d'injection 6 voies avec boucle

Exemplaire certifié conforme Vienne, 30 juillet 2004
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2004

d'échantillonnage de 5 µl ou tout autre dispositif, automatique ou manuel, assurant une injection fiable de micro volumes.

5.1.2. Système de pompes à régime isocratique pour maintenir un débit constant ou programmé avec une précision maximale

5.1.3. Système permettant de chauffer une colonne de 300 mm jusqu'à 65 °C

5.1.4. Détecteur UV-VIS avec cellule a circulation et fonctionnant à la longueur d'onde de 210 nm

5.1.5. Intégrateur ou tout autre système de collecte de données

5.2. Colonnes CLHP en acier inoxydable.

5.2.1. Pré-colonne

Il est recommandé de prévoir une pré-colonne en amont des colonnes analytiques.

5.2.2. Colonnes analytiques

Colonne en phases inversées (à température ambiante)

Matériau: acier inoxydable

Diamètre interne: 4 - 4,6 mm

Longueur: 200 - 250 mm

Phase stationnaire: matériau sphérique, C_{18} en phases inversées, particules de 5µm de diamètre[*)]

Couplée

Colonne échangeuse de cations (chauffée à 65°C)

Matériau: acier inoxydable

Diamètre interne: 4 - 7.8 mm

Longueur: 300 mm

Phase stationnaire: résine de type polystyrène-divinylbenzène avec un taux de reticulation à 8 % et à groupements sulfoniques sous forme hydrogène (S-DVB)[**)]

6. Echantillonage

Les échantillons de vins limpides sont introduits directement dans des fioles pour échantillons et analysés par chromatographie sans préparation préalable. Les échantillons troubles sont filtrés à travers une membrane de diamètre de pores de 0,45 µm avant injection, après élimination des premières fractions de filtrats.

Exemplaire certifié conforme Vienne, 30 juillet 2004
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2004

7. Procédure

7.1. Mode opératoire de l'analyse CLHP

Injecter 5 µL de vin dans l'appareil chromatographique (système d'injection à boucle).

Débit: 0,4 ml/min

(si le diamètre interne de la colonne échangeuse de cations est de 4 mm)

0,6 ml/min

(si le diamètre interne de la colonne échangeuse de cations est de 7,8 mm)

Phase mobile: 0,01 M H_2SO_4

Chauffage de la colonne échangeuse de cations: 65 °C

Durée: 40 mn

Temps nécessaire à l'équilibration: 20 mn (afin que toutes les substances du vin aient bien été éliminées)

Longueur d'onde de détection: 210 nm

Volume d'injection: 5 µL

Note: *en raison des différences de propriétés de séparation entre les colonnes et des différences de volume mort entre les différents appareils CLHP, le temps de rétention absolu (mn) pour le pic d'acide shikimique peut varier de manière plus ou moins significative. Bien que l'acide shikimique puisse être identifié facilement en calculant facteur de séparation (□) par rapport à un pic de référence, l'acide tartrique, est le premier pic et le pic dominant dans le chromatogramme. En essayant différentes colonnes en phases inversées C_{18} et diverses colonnes échangeuses de cation, un facteur de séparation (□)de 1,33 (± 0.2) a été calculé.*

7.2. Limite de détection

La limite de détection de cette méthode calculée selon le protocole OIV, a été estimée à 1 mg/l

8. Calibration

Préparer une courbe de calibration à 5 points à partir des solutions étalons de travail (4.6).

La détermination quantitative de l'acide shikimique est effectuée en suivant la méthode de l'étalonnage externe en mesurant les surfaces des pics de temps de

Exemplaire certifié conforme Vienne, 30 juillet 2004
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2004

rétention de l'acide shikimique et en les comparant à la courbe de calibration pertinente. Les résultats, en acide shikimique, sont exprimés en mg/l à une décimale.

9. Etude collaborative

La méthode a été validée par une étude collaborative avec la participation de 19 laboratoires internationaux suivant la résolution de l'OIV oeno 6/2000 " Protocole pour la validation des méthodes d'analyse" et notamment les recommandations sur la planification, la conduite et l'interprétation des études de performance des méthodes d'analyse. L'étude a porté sur 5 échantillons différents de vins rouges et blancs avec des concentrations de 10 à 120 mg/l. (voir annexe 3)

Les écarts-type de répétabilité et de reproductibilité sont corrélés à la concentration d'acide shikimique (voir Annexe 2). Les paramètres de performance réels peuvent être calculés comme suit:

s_r = 0,0146 x + 0.2716

s_R = 0,0286 x + 1.4883

x: concentration d'acide shikimique (mg/l)

Exemple:

Acide shikimique: 50 mg/l

s_r =: ±1.0 mg/l

s_R = s_R: ±2.92 mg/l

10. Annexe

Un exemple de séparation de l'acide shikimique et des autres acides organiques est mentionné dans l'annexe 1.

La corrélation entre la concentration de l'acide shikimique et l'écart type de répétabilité et de reproductibilité figure dans l'annexe 2.

Les statistiques provenant des résultats d'une étude inter laboratoire sont fournis dans l'annexe 3.

11. Références

1. Römpp Lexikon Chemie-Version 2.0, Stuttgart/New York, Georg Thieme Verlag 1999

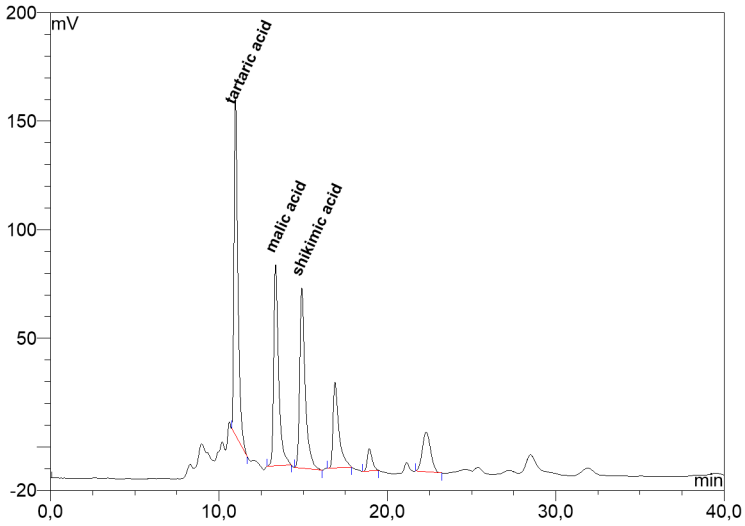
Exemplaire certifié conforme Vienne, 30 juillet 2004
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2004

2. Wallrauch S., Flüssiges Obst 3, 107 – 113 (1999)

3. 44th session SCMA, 23-26 march 2004, comparison of HPLC, GC,and GC-MS determination of Shikimic acid in wine, FV 1193

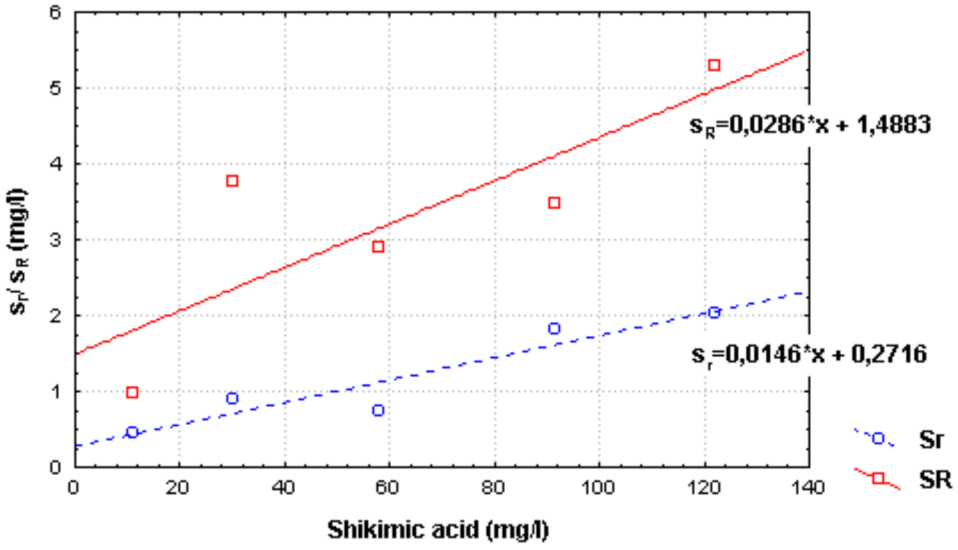
Annexe 1: Chromatogramme des acides organiques du vin



Annexe 2: Corrélation entre la concentration de l'acide shikimique et les écarts-type de répétabilité et de reproductibilité

Exemplaire certifié conforme Vienne, 30 juillet 2004
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2004



Annexe 3: Tableau de performance de la méthode

Identification des échantillons	A	B	C	D	E
Nombre de laboratoires participants	19	19	19	19	19
Nombre de laboratoires retenus	17	18	17	18	18
Moyenne mg/l	58.15	30.05	11.17	122.17	91.20
s_r^2	0.54588	0.84694	0.19353	4.32417	2.67306
s_r	0.73884	0.92030	0.43992	2.07946	1.63495

Exemplaire certifié conforme Vienne, 30 juillet 2004
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2004

RSD_r (%)	1.27	3.06	3.93	1.70	1.79
r	2.07	2.58	1.23	5.82	4.58
s_L^2	8.45221	13.27078	0.73013	24.62737	8.55508
s_R^2	8.99809	14.11773	0.92366	28.95154	11.22814
s_R	2.99968	3.75736	0.96107	5.38066	3.35084
RSD_R (%)	5.16	12.50	8.60	4.40	3.67
R	8.40	10.52	2.69	15.07	9.38

s_r^2 variance de répétabilité

s_r écart-type de répétabilité

RSD_r (%) écart-type relatif/ répétabilité

r répétabilité

s_L^2 variance “sure” interlaboratoires

s_R^2 variance de reproductibilité

s_R écart-type de reproductibilité

RSD_R (%) écart-type relatif/reproductibilité

R reproductibilité

[*)] Lichrospher™ 100 RP-18 , Hypersil™-ODS or Omnichrom™ YMC-ODS-A sont des exemples de colonnes adaptées disponibles dans le commerce.

[**)] Aminex™ HPX 87-H ou Rezex™ ROA-Organic Acid sont des exemple de colonnes adaptées et disponibles dans le commerce.

Exemplaire certifié conforme Vienne, 30 juillet 2004
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2004