RÉSOLUTION OENO 22/2003

DETERMINATION PAR CLHP DE NEUF ANTHOCYANES PRINCIPALES DANS LE VIN ROUGE ET ROSE

L'ASSEMBLEE GENERALE,

VU l'article 5, alinéa 4 de la Convention internationale d'unification des méthodes d'analyse et d'appréciation des vins du 13 octobre 1954,

SUR PROPOSITION de la Sous-Commission des méthodes d'analyse et d'appréciation des vins,

DECIDE: d'introduire dans l'Annexe A du Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts comme méthodes de Type II la méthode suivante :

1. CHAMPS D'APPLICATION

La méthode analytique concerne la détermination de la composition relative des anthocyanes des vins rouges et rosés. La séparation est réalisée par CLHP à l'aide d'une colonne en phase inverse et une détection UV-VIS.

De nombreux auteurs (3, 6-17) ont publié des données concernant la composition en anthocyanes des vins rouges utilisant des méthodes analytiques voisines. Par exemple, Wulf et al. [18] ont détecté et identifié 21 anthocyanes et Heier et al [13] près de 40 par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse. La composition en anthocyanes peut être très complexe or il est nécessaire de disposer d'une procédure simple, en conséquence, cette méthode se limite à déterminer les composés principaux de la fraction totale des anthocyanes.

Les Etats-membres sont encouragés à poursuivre les recherches dans ce domaine afin d'éviter toute évaluation non scientifique des résultats.

2. PRINCIPE

Séparation des cinq anthocyanes non acylées les plus importantes (voir Figure 1, pics 1-5) et des quatre anthocyanes acylées principales (voir Figure 1 pics 6-9).

Analyse du vin rouge et rosé par séparation directe en CLHP en utilisant une colonne de phase inverse et une élution avec un gradient eau/acide formique/acetonitrile avec une détection à 518 nm [1.2]

Exemplaire certifié conforme Paris, 19 juin 2003
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Georges DUTRUC-ROSSET

© OIV 2003

3. REACTIFS ET MATERIEL

Acide formique (p.a. 98%) (CAS 64-18-6)

Eau, pureté CLHP

Acétonitrile, pureté CLHP (CAS 75-08-8)

Solvants CLHP

Solvant A : Eau/acide formique/acétonitrile 87 : 10 : 3 (v/v/v)

Solvant B : Eau/acide formique/acetonitrile 40 : 10 : 50 (v/v/v)

Filtre à membrane pour dégazer les solvants CLHP et pour la préparation des échantillons à analyser

Produits de référence pour l'identification des pics.

Le dosage CLHP des anthocyanes du vin est difficilement réalisable en raison de l'absence de produits purs disponibles dans le commerce. De plus, les anthocyanes sont extrêmement instables en solution.

Les pigments anthocyaniques suivants sont disponibles à la vente :

Cyanidol-3-glucoside (également Couromanin chloride) ; M=484,84 g/mol

Peonidol-3-glucoside ; M=498,84 g/mol

Malvidol-3-glucoside (également Oeninchloride); M = 528,84 g/mol

Malvidol-3,5-diglucoside (également malvinchloride) ; M = 691,04 g/mol.

4. Appareils

Un système de CLHP avec :

- Une pompe binaire à gradient, un système d'injection pour des volumes d'échantillon de 10 à 200 □l
- Un détecteur à barrettes de diodes ou un détecteur UV avec une gamme visible,
- Un intégrateur ou un ordinateur avec logiciel d'acquisition de données
- Un four permettant le chauffage des colonnes à 40 °C
- Un système de dégazage de solvant
- Une colonne analytique, par exemple :

LiChrospher 100 RP 18 (5 □m) en LiChroCart 250-4

Exemplaire certifié conforme Paris, 19 juin 2003
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Georges DUTRUC-ROSSET

© OIV 2003

Une colonne de garde: par exemple RP18 (30-40 mm) en cartouche de 2 mm de diamètre x 20 mm de long

5. PROCEDURE

5.1. Préparation des échantillons

Les vins limpides sont placés directement sans préparation dans les flacons du passeur automatique d'échantillons. Les échantillons troubles sont filtrés à l'aide d'un filtre à membrane de 0,45 □m pour la préparation d'échantillon CLHP. La première partie du filtrat doit être rejetée.

La gamme de linéarité de l'absorption en fonction de la concentration des anthocyanes étant étendue, il est possible de moduler les volumes d'injection entre 10 et 200 µl en fonction de l'intensité de la couleur du vin.

Aucune différence significative entre les résultats obtenus pour des volumes d'injection différents n'a été observée.

5.2. Analyse

Conditions CLHP

L'analyse CLHP se déroule dans les conditions suivantes:

Volume d'injection : 50 □l (vin rouge) jusqu'à 200 □l (vin rosé)

Débit: 0,8 ml/minute

Température : 40°C

Temps de passage : 45 minutes

Temps de retour aux conditions initiales : 5 minutes

Détection : 518 nm

Gradient d'élution:

Temps (min)	Solvant A %(v/v)	Solvant B %(v/v)
0	94	6
15	70	30
30	50	50

Exemplaire certifié conforme Paris, 19 juin 2003
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Georges DUTRUC-ROSSET

© OIV 2003

35	40	60
41	94	6

Pour vérifier l'efficacité de la colonne, le nombre de plateaux théoriques (N) calculé par rapport à la malvidol-3-glucoside ne devrait pas être inférieur à 20000, la résolution (R) entre la peonidol-3-coumaryl glucoside et la malvidol-3-coumaryl glucoside ne devrait pas être inférieure à 1,5. En-dessous de ces valeurs, il est recommandé d'utiliser une nouvelle colonne.

La figure 1 montre un chromatogramme typique où les anthocyananes sont séparés :

		Pic-N°
Groupe 1: "anthocyanes-3-glucosides non acylées":	Delphinidol-3-glucoside Cyanidol-3-glucoside Petunidol-3-glucoside Peonidol-3-glucoside Malvidol-3-glucoside	1 2 3 4 5
Groupe 2: "anthocyanes-3-glucosides acétylées":	Peonidol-3-acetylglucoside malvidol-3-acetylglucoside	6 7
Groupe 3: "anthocyanes-3-glucosides coumarylées":	Peonidol-3-coumarylglucoside malvidol-3-coumarylglucoside	8 9

6. EXPRESSION DES RESULTATS

Noter que les valeurs sont exprimées en quantités relatives par rapport à la totalité des neuf anthocyanes définies dans cette méthode.

7. PARAMETRES DE LA FIDELITE

Les valeurs de la répétabilité (r) et la reproductivité (R) pour les neuf anthocyanes sont indiquées dans le Tableau 2 et dépendent de la surface relative du pic. La mesure de l'incertitude d'une surface d'un pic spécifique est déterminée par la valeur de r et R qui

Exemplaire certifié conforme Paris, 19 juin 2003
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Georges DUTRUC-ROSSET

© OIV 2003

correspond à la valeur la plus proche indiquée dans le Tableau 2.

Les valeurs des données de validations peuvent être calculées en suivant les règles statistiques appropriées. Pour calculer l'erreur totale (s_r) d'une somme, par exemple des anthocyanes acétylées, il faut totaliser les variances (S_r^2) des surfaces spécifiques de chaque pic correspondant aux anthocyanes acétylées. L'erreur totale des rapports, par exemple, le rapport des anthocyanes acétylées/coumarylées, est le résultat de la somme des carrés des erreurs relatives (s_r/a_i , a_i = surface de pic). En utilisant ces règles, toutes les valeurs de fidélité peuvent être calculées en utilisant les données présentées dans le Tableau 2.

Annexe A

Bibliographie

[1]	Marx, R., B. Holbach, H. Otteneder; Determination of nine characteristic Anthocyanins in Wine by HPLC; OIV, F.V.N° 1104 2713/100200
[2]	Holbach, B., R. Marx, M. Ackermann; Bestimmung der Anthocyanzusammensetzung von Rotwein mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC). Lebensmittelchemie (**1997**) 51: 78 - 80
[3]	Eder, R., S. Wendelin, J. Barna; Auftrennung der monomeren Rotweinanthocyane mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC).Methodenvergleich und Vorstellung einer neuen Methode. Mitt. Klosterneuburg (**1990**) 40: 68-75
[4]	ISO-5725-2: **1994** "Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility"
[5]	Otteneder, H., Marx, R., Olschimke, D.; Method-performance study on the determination of nine characteristic anthocyanins in wine by HPLC. O.I.V. F.V.N° 1130 (**2001**)
[6]	Mattivi F.; Scienza, A.; Failla, O.; Vika, P.; Anzani, R.; Redesco, G.; Gianazza, E.; Righetti; P. Vitis vinifera - a chemotaxonomic approach: Anthocyanins in the skin. *Vitis (special issue)* **1990**, 119-133

© OIV 2003

Exemplaire certifié conforme Paris, 19 juin 2003
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Georges DUTRUC-ROSSET

[7]	Roggero, I.P.; Larice, I.L.; Rocheville-Divorne, C.; Archier, P.; Coen, V. Composition Antocyanique des cepages. *Revue Francaise d'Oenologie* **1998**, *112,* 41-48
[8]	Eder, R.; Wendelin, S; Barna, J. Classification of red wine cultivars by means of anthocyanin analysis. *Mitt. Klosterneuburg* **1994**, *44,* 201-212
[9]	Arozarena, I.; Casp, A.; Marin, R.; Navarro, M. Differentiation of some Spanish wines according to variety and region based on their anthocyanin composition. *Eur. Food Res. Technol.* **2000**, *212,* 108-112
[10]	Garcia-Beneytez, E.; Revilla, E.; Cabello, F. Anthocyanin pattern of several red grape cultivars and wines made from them. *Eur. Food Res. Technol.* **2002**, *215*, 32-37
[11]	Arozarena, I.; Ayestarán, B.; Cantalejo, M.J.; Navarro, M.; Vera, M.; Abril, K.; Casp, A. *Eur. Food Res. Technol.* **2002**, *214*, 313-309
[12]	Revilla, E.; Garcia-Beneytez, E.; Cabello, F.; Martin-Ortega, G.; Ryan, J-M. Value of high-performance liquid chromatographic analysis of anthocyanins in the differentiation of red grape cultivars and red wines made from them. *J. Chromatogr A* **2001**, *915*, 53-60
[13]	Heier, A.; Blaas, W.; Droß, A.; Wittkowski, R.; Anthocyanin Analysis by HPLC/ESI-MS, Am.J.Enol.Vitic, **2002**, 53, 78-86
[14]	Arozarena, I.; Casp, A.; Marin, R.; Navarro, M. Multivariate differentiation of Spanish red wines according to region and variety. *J. Sci. Food Agric*, **2000**, *80*, 1909-1917
[15]	Anonymous. Bekanntmachung des Bundesinstituts für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin. *Bundesgesundheitsbl. Gesundheitsforsch. Gesundheitsschutz,* **2001**, *44*, 748
[16]	Burns, I.; Mullen, W.; Landrault, N.; Teissedre, P.-L.; Lean, M.E.I.; Crozier, A. Variations in the Profile and Content of Anthocyanins in Wines made from Cabernet Sauvignon and hybrid grapes. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 4096-4102
[17]	Otteneder, H.; Holbach, B.; Marx, R.; Zimmer, M. Rebsortenbestimmung in Rotwein mittels Anthocyanspektrum. *Mitt. Klosterneuburg*, **2002**, *52*, 187-194

Exemplaire certifié conforme Paris, 19 juin 2003
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Georges DUTRUC-ROSSET

© OIV 2003

[18]	L.W. Wulf and C.W. Nagel; High-Pressure liquid chromatographic separation of Anthocyanins of Vitis vinifera. Am.J.Enol.Vitic **1978**, 29, 42-49

Annexe B

Résultats statistiques

Etude ET EVALUATION de LA performance DE LA METHODE

17 laboratoires et 5 états européens ont participé à l'étude de validation de la méthode sous la coordination du laboratoire d'état officiel allemand pour la chimie alimentaire de Trier. Les participants figurent dans le Tableau 3. Un exemple de chromatogramme est présenté à la figure 1 et les résultats détaillés figurent dans le Tableau 2.

L'évaluation statistique a été effectuée selon la Résolution Oeno 6/99, et la Norme ISO 5725-1994 (4,5).

Les chromatogrammes renvoyés avec les feuilles de résultats ont satisfait toutes les exigences par rapport à la performance de la colonne analytique. Aucun laboratoire n'a dû être complètement éliminé, par exemple, à cause d'une fausse identification de pic.

Les valeurs aberrantes ont été recherchées à l'aide des tests de Dixon et de Grubbs selon la procédure du « Protocole harmonisé – IUPAC 1994 » et de la Résolution OIV OENO 19/2002. Les valeurs des s_r, s_R, r et R ont été calculées pour 9 anthocyanes principales et à 5 niveaux de teneurs. Pour les résultats analytiques il faut utiliser les valeurs des niveaux les plus proches.

Afin d'avoir une vision globale de la performance de la méthode, toutes les valeurs RSD_r et RSD_R rassemblées sont regroupées par gammes de surface dans le tableau suivant :

Tableau 1 : Résumé des résultats des performances de la méthode

gamme de la surface du pic relative* [%]	Gamme de RSDr [%]	Gamme de RSDR [%]

Exemplaire certifié conforme Paris, 19 juin 2003
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Georges DUTRUC-ROSSET

© OIV 2003

>0,4 – 1,0	6,8 - 22,4	20,6 - 50,9
>1,1 – 1,5	4,2 - 18,1	11,8 - 28,1
>1,5 – 3,5	2,1 - 7,7	10,6 - 15,6
>3,5 – 5,5	2,7 - 5,7	18,7 – 7,5
>5,5 – 7,5	2,4 - 3,9	6,5 - 10,0
>10 – 14	1,1 - 2,9	3,7 - 9,2
>14 – 17	1,0 - 3,9	3,2 - 5,4
>50 – 76	0,3 - 1,0	2,1 - 3,1
* indépendant de l'anthocyane		

Cela conduit à conclure que les répétabilités et les reproductibilités dépendent des sommes des surfaces relatives des pics. Plus ces sommes sont élevées, meilleurs sont les RSD_r et RSD_R. Pour les teneurs en anthocyanes proches de la limite de détection (ex. Cyanidine-3-glucoside) avec des surfaces relatives petites (inférieure à 1%) les valeurs des RSD_r et RSD_R peuvent augmenter d'une façon assez significative. Pour les anthocyanes dont les surfaces relatives dépassent 1 %, les valeurs RSD_r et RSD_R sont raisonnables.

Figure 1

Séparation de 9 anthocyanes dans un vin rouge

Exemplaire certifié conforme Paris, 19 juin 2003
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Georges DUTRUC-ROSSET

© OIV 2003

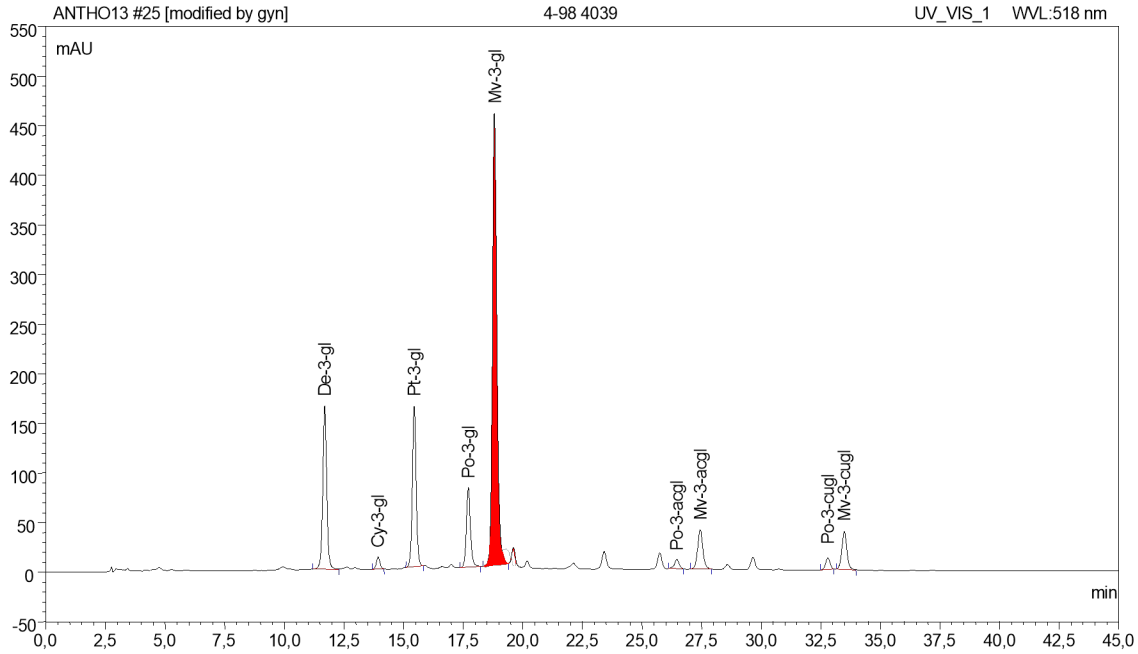


Tableau 2 : Résultats de l'étude de la performance de la méthode Feuille 1 sur 2

Anthocyanes	échantillon 1	échantillon 2	échantillon 3	échantillon 4	échantillon 5
Delphinidol-3-glucoside					
N	14	14	16	15	16
moyenne	6,75	14,14	3,45	16,68	3,54
s_r	0,163	0,145	0,142	0,142	0,108
RSD_r(%)	2,4	1,0	4,1	0,8	3,1
r	0,46	0,41	0,40	0,40	0,30
s_R	0,544	0,462	0,526	0,704	0,490
RSD_R(%)	8,1	3,3	15,2	4,2	13,8
R	1,52	1,29	1,47	1,97	1,37

Exemplaire certifié conforme Paris, 19 juin 2003
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Georges DUTRUC-ROSSET

© OIV 2003

Cyanidol-3-glucoside					
n	16	17	16	15	14
moyenne	2,18	1,23	0,61	1,46	0,34
s_r	0,086	0,053	0,043	0,110	0,031
RSD_r(%)	4,0	4,3	7,1	7,5	9,2
r	0,24	0,15	0,12	0,31	0,09
s_R	0,460	0,211	0,213	0,180	0,158
RSD_R(%)	21,2	17,2	34,9	12,3	46,7
R	1,29	0,59	0,60	0,50	0,44
Petunidol-3-glucoside					
n	15	17	16	14	15
moyenne	10,24	14,29	5,75	12,21	6,19
s_r	0,233	0,596	0,157	0,097	0,196
RSD_r(%)	2,3	4,2	2,7	0,8	3,2
r	0,65	1,67	0,44	0,27	0,55
s_R	0,431	0,996	0,495	0,469	0,404
RSD_R(%)	4,2	7,0	8,6	3,8	6,5
R	1,21	2,79	1,39	1,31	1,13
Peonidol-3-glucoside					
n	16	15	17	17	16
moyenne	11,88	6,23	13,75	7,44	4,12
s_r	0,241	0,166	0,144	0,232	0,174

Exemplaire certifié conforme Paris, 19 juin 2003
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Georges DUTRUC-ROSSET

© OIV 2003

RSD_r(%)	2,0	2,7	1,0	3,1	4,2
r	0,68	0,47	0,40	0,65	0,49
s_R	0,981	0,560	1,227	0,602	0,532
RSD_R(%)	8,3	9,0	8,9	8,1	12,9
R	2,75	1,57	3,44	1,69	1,49
Malvidol-3-glucoside					
n	16	15	17	16	16
moyenne	55,90	55,04	76,11	52,60	61,04
s_r	0,545	0,272	0,251	0,298	0,377
RSD_r(%)	1,0	0,5	0,3	0,6	0,6
r	1,53	0,76	0,70	0,83	1,06
s_R	2,026	2,649	2,291	1,606	1,986
RSD_R(%)	3,6	4,8	3,0	3,1	3,3
R	5,67	7,42	6,41	4,50	5,56

n	= Nombre de laboratoires retenu après l'élimination des valeurs aberrantes
s_r	= écart-type de répétabilité
RSD_r(%)	= écart-type de répétabilité relatif
r	= répétabilité
s_R	= écart-type de reproductibilité
RSD_R(%)	= écart-type de reproductibilité relatif
R	= reproductibilité

Tableau 2 : Résultats de l'étude de la performance de la méthode

Exemplaire certifié conforme Paris, 19 juin 2003
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Georges DUTRUC-ROSSET

© OIV 2003

Feuille 2 sur 2

Anthocyannes	échantillon 1	échantillon 2	échantillon 3	échantillon 4	échantillon 5
Peonidol-3-acetylglucoside					
n	14	16		14	16
Moyenne	1,16	1,44		0,59	3,74
s_r	0,064	0,062		0,059	0,215
RSD_r(%)	5,5	4,3		10,1	5,8
	0,18	0,17		0,17	0,60
s_R	0,511	0,392		0,272	0,374
RSD_R(%)	43,9	27,2		46,4	10,0
R	1,43	1,10		0,76	1,05
Malvidol-3-acetylglucoside					
n	16	17		17	16
Moyenne	5,51	4,84		3,11	15,07
s_r	0,176	0,167		0,088	0,213
RSD_r(%)	3,2	3,4		2,8	1,4
r	0,49	0,47		0,25	0,60
s_R	0,395	0,366		0,496	0,617
RSD_R(%)	7,2	7,6		16,0	4,1
R	1,11	1,02		1,39	1,73
Peonidol-3-coumarylglucoside					
n	16	14		17	16
Moyenne	1,26	0,90		0,89	1,32

Exemplaire certifié conforme Paris, 19 juin 2003
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Georges DUTRUC-ROSSET

© OIV 2003

s_r	0,130	0,046		0,060	0,058
RSD_r(%)	10,3	5,1		6,8	4,4
r	0,36	0,13		0,17	0,16
s_R	0,309	0,109		0,204	0,156
RSD_R(%)	24,5	12,2		23,0	11,8
R	0,86	0,31		0,57	0,44
Malvidol-3-coumarylglucoside					
n	17	17		17	16
moyenne	4,62	2,66		4,54	4,45
s_r	0,159	0,055		0,124	0,048
RSD_r(%)	3,4	2,1		2,7	1,1
r	0,45	0,15		0,35	0,13
s_R	0,865	0,392		0,574	0,364
RSD_R(%)	18,7	14,7		12,6	8,2
R	2,42	1,10		1,61	1,02

n	= Nombre de laboratoires retenus après l'élimination des valeurs aberrantes
s_r	= écart-type de répétabilité
RSD_r(%)	= écart-type de répétabilité relatif
r	= répétabilité
s_R	= écart-type de reproductibilité
RSD_R(%)	= écart-type de reproductibilité relatif
R	= reproductibilité

Tableau 3: Liste des participants

Exemplaire certifié conforme Paris, 19 juin 2003
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Georges DUTRUC-ROSSET

© OIV 2003

ABC Labor Dahmen, Mülheim/Mosel	**D**
Chemisches Landes- und Staatliches Veterinäruntersuchungsamt Münster	**D**
Institut für Lebensmittelchemie Koblenz	**D**
Institut für Lebensmittelchemie Speyer	**D**
Institut für Lebensmittelchemie Trier	**D**
Institut für Lebensmittelchemie und Arzneimittelprüfung Mainz	**D**
Labor Dr. Haase-Aschoff, Bad Kreuznach	**D**
Labor Dr. Klaus Millies, Hofheim-Wildsachsen	**D**
Labor Heidger, Kesten	**D**
Landesveterinär- und Lebensmitteluntersuchungsamt Halle	**D**
Staatliche Lehr- und Forschungsanstalt für Landwirtschaft, Weinbau und Gartenbau, Neustadt/Weinstraße	**D**
Staatliches Institut für Gesundheit und Umwelt, Saarbrücken	**D**
Staatliches Medizinal-, Lebensmittel- und Veterinäruntersuchungsamt Wiesbaden	**D**
Laboratoire Interrégional de la D.G.C.C.R.F de Bordeaux, Talence/France	**F**
Unidad de Nutricion y Bromotologia, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, Salamanca/Espana	**E**
University of Glasgow, Div. of Biochem. and Molek. Biology	**UK**
Höhere Bundeslehranstalt und Bundesamt für Wein- und Obstbau Klosterneuburg	**A**

17 Laboratoires D (13); A (1); F (1); E (1); UK (1)

Exemplaire certifié conforme Paris, 19 juin 2003
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Georges DUTRUC-ROSSET

© OIV 2003