RESOLUTION OENO 6/98

ACIDE D-MALIQUE: DOSAGE PAR METHODE ENZYMATIQUE

L'ASSEMBLEE GENERALE,

SUR PROPOSITION de la Commission II « Oenologie », après étude des travaux de la Sous-Commission des méthodes d'analyse,

DECLARE caduque la méthode décrite au Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts,

PROPOSE de la remplacer par le processus de mesure ci-après, prenant en compte le fait que la réaction enzymatique est « glissante » et que le seuil de quantification de cette méthode devra être déterminé,

PROPOSE que les méthodes chromatographiques, utilisant une phase stationnaire « chirale », de l'ester méthylique de l'acide D-malique puissent être considérées comme des méthodes usuelles après validation.

ACIDE D-MALIQUE - Dosage par méthode enzymatique.

1. Principe

En présence de D-malate-deshydrogénase (D-MDH), l'acide D-malique (D-malate) est oxydé en oxalo-acétate par le nicotinamide-adénine-dinucléotide (NAD). L'oxalo-acétate formé est transformé en pyruvate et dioxyde de carbone.

$$(1)\ D-malate + NAD \overset{D-MDH}{\Longleftrightarrow} pyruvate + CO_2 + NADH + H^+$$

La formation de NADH, mesurée par l'augmentation de l'absorbance à la longueur d'onde de 334, 340 ou 365 nm, est proportionnelle à la quantité de D-malate présente.

2. Réactifs

Les réactifs permettant environ 30 déterminations sont présentés dans le commerce en coffret comprenant :

1. Flacon 1 contenant environ 30 ml de solution de tampon Hepes acide [N-(2-

Exemplaire certifié conforme Lisbonne, 26 juin 1998
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Georges DUTRUC-ROSSET

© OIV 1998

hydroxyéthyl)pipérazine-N'-2-éthane sulfonique] pH = 9,0 et stabilisateurs ;

2. Flacon 2 contenant environ 210 mg de lyophilisât de NAD ;
3. Flacon 3 (au nombre de trois), contenant le lyophilisât de D-MDH, titrant environ 8 unités.

Préparation des solutions

1. Utiliser le contenu du flacon 1 sans dilution. Amener la solution à 20-25 °C avant l'emploi.
2. Dissoudre le contenu du flacon 2 dans 4 ml d'eau bidistillée.
3. Dissoudre le contenu d'un des flacons 3 dans 0,6 ml d'eau bidistillée. Amener la solution à 20-25 °C avant l'emploi.

Stabilité des solutions

Le contenu du flacon 1 se conserve au moins un an à + 4 °C ; la solution 2 se conserve environ 3 semaines à + 4 °C et 2 mois à - 20 °C ; la solution 3 se conserve 5 jours à + 4 °C.

3. Appareillage

3.1. Spectrophotomètre permettant d'effectuer les mesures à 340 nm maximum d'absorption du NADH.

A défaut, photomètre à spectre discontinu permettant d'effectuer les mesures à 334 nm et 365 nm. S'agissant de mesures absolues d'absorbance (pas de gamme d'étalonnage, mais référence au coefficient d'extinction du NADH), les échelles des longueurs d'onde et des absorbances de l'appareil doivent être contrôlées.

3.2. Cuves de 1 cm de trajet optique en verre ou cuves à usage unique.

3.3. Micropipettes permettant de prélever des volumes compris entre 0,01 et 2 ml.

4. Préparation de l'échantillon

Le dosage du D-malate s'effectue généralement directement sur le vin sans décoloration préalable.

La quantité de D-malate dans la cuve devant être comprise entre 2 µg et 50 µg, il convient de diluer le vin de telle manière que la concentration en malate soit comprise

Exemplaire certifié conforme Lisbonne, 26 juin 1998
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Georges DUTRUC-ROSSET

© OIV 1998

entre 0,02 et 0,5 g/l ou 0,02 et 0,3 g/l (selon l'appareillage utilisé).

Tableau de dilution

Quantité estimée de D-malate/litre	Dilution avec de l'eau	Facteur de dilution F
Mesure à : 340 ou 334 nm 365 nm		
< 0,3 g < 0,5 g	-	1
0,3-3,0 g 0,5-5,0 g	1 + 9	10

5. Mode opératoire

Le spectrophotomètre étant réglé sur la longueur d'onde 340 nm, les mesures d'absorbance se font dans les cuves de 1 cm de trajet optique, l'absorbance zéro étant réglée par rapport à l'air (pas de cuve sur le trajet optique) ou par rapport à l'eau.

Dans les cuves de 1 cm de trajet optique, introduire:

	Témoin	Essai
Solution 1	1,00 ml	1,00 ml
Solution 2	0,10 ml	0,10 ml
Eau bidistillée	1,80 ml	1,70 ml
Échantillon	-	0,10 ml

Mélanger. Après environ 6 minutes, mesurer les absorbances des solutions témoin et essai (A_1).

Ajouter	Témoin	Essai

Exemplaire certifié conforme Lisbonne, 26 juin 1998
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Georges DUTRUC-ROSSET

© OIV 1998

Solution 3	0,05 ml	0,05 ml

Mélanger ; attendre la fin de la réaction (environ 20 min.) et mesurer les absorbances des solutions témoin et d'essai (A_2).

Déterminer les différences d'absorbances (A_2 - A_1) du témoin ($\square\square_T$) et de l'essai ($\square\square_D$).

Déduire la différence d'absorbance du témoin de la différence d'absorbance de l'essai :

- $\square\square = \square\square_D - \square\square_T$

Remarque : Le temps nécessaire à l'action des enzymes peut varier d'un lot à l'autre. Il n'est donné ci-dessus qu'à titre indicatif. Il est recommandé de le déterminer pour chaque lot.

L'acide D-malique réagit vite. Une activité supplémentaire de l'enzyme transforme aussi l'acide L-tartrique même si la vitesse est beaucoup moins rapide. C'est la raison pour laquelle il y a une faible réaction parasite qu'il est possible de corriger par extrapolation (v. annexe 1).

6. Expression des résultats

La concentrations en milligrammes par litre est calculée par la formule générale:

$$C = \frac{V \times PM}{\varepsilon \times d \times v} \times \Delta A$$

V = volume du test en ml (ici 2,95 ml)

□ = volume de l'échantillon en ml (ici 0,1 ml)

PM = masse moléculaire de la substance à doser (ici acide D-malique = 134.09)

d = trajet optique de la cuve en cm (ici 1 cm)

□ = coefficient d'absorption du NADH:

- à 340 nm = 6,3 (l $mmol^{-1}$ cm^{-1})
- à 365 nm = 3,4 (l $mmol^{-1}$ cm^{-1})
- à 334 nm = 6,18(l $mmol^{-1}$ cm^{-1}).

Exemplaire certifié conforme Lisbonne, 26 juin 1998
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Georges DUTRUC-ROSSET

© OIV 1998

Si une dilution a été effectuée lors de la préparation de l'échantillon, multiplier le résultat par le facteur de dilution.

La concentration en acide D-malique est donnée en milligrammes par litre (mg/l) sans décimale.

7. Fidélité

Les détails de l'essai interlaboratoire portant sur la fidélité de la méthode sont résumés dans l'annexe 2. Les valeurs dérivées de l'essai interlaboratoire peuvent ne pas être applicables aux gammes de concentration en analyte et aux matrices autres que celles données en annexe 2.

7.1. Répétabilité

La différence absolue entre deux résultats individuels obtenus sur une matière identique soumise à essai, par un opérateur utilisant la même appareillage, dans l'intervalle de temps le plus court, ne dépassera pas la valeur de répétabilité r dans plus 5 % des cas.

La valeur est : r = 11 mg/l

7.2. 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 plus de 5 % des cas.

La valeur est : R = 20 mg/l

8. Remarques

Compte tenu de la précision de la méthode, les valeurs d'acide D-malique inférieures à 50 mg/L doivent être confirmées par une autre méthode d'analyse utilisant un autre principe de mesure par exemple celle de PRZYBORSKI et al, (1993) et les valeurs d'acide D-malique inférieures à 100 mg/L ne doivent pas être interprétées comme une addition d'acide D,L-malique au vin.

La prise d'essai de vin dans la cuvette ne doit pas être supérieure à 0,1ml pour éviter d'éventuelles inhibitions de l'activité enzymatique par les polyphénols".

Exemplaire certifié conforme Lisbonne, 26 juin 1998
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Georges DUTRUC-ROSSET

© OIV 1998

ANNEXE 1

Comment traiter les réactions parasites

Les réactions parasites sont généralement dues à des réactions secondaires de l'enzyme, à la présence d'autres enzymes dans la matrice de l'échantillon, ou à l'interaction d'un ou plusieurs éléments de la matrice avec un co-facteur de la réaction enzymatique.

Dans la réaction normale, l'absorbance atteint une valeur constante au bout d'un certain temps, généralement entre 10 min et 20 min, selon la vitesse de la réaction enzymatique spécifique. Cependant, lorsqu'il se produit des réactions secondaires, l'absorbance n'atteint pas une valeur constante, mais augmente régulièrement dans le temps; ce type de processus est couramment appelé « réaction parasite ».

Lorsque ce problème se pose, il convient de mesurer l'absorbance de la solution à intervalles réguliers (2 min à 5 min), après le temps requis pour que la solution étalon atteigne son absorbance finale. Lorsque l'absorbance augmente régulièrement, procéder à 5 ou 6 mesures, puis faire une extrapolation graphique ou par calcul, pour obtenir l'absorbance qui aurait été celle de la solution au moment ou l'enzyme final a été ajouté (T0). La différence d'absorbance extrapolée à ce moment (Af - Ai) est utilisée dans le calcul de la concentration du substrat.

Bibliographie:

1. PRZYBORSKI et al. Mitteilungen Klosterneuburg 43, 1993; 215-218.

Exemplaire certifié conforme Lisbonne, 26 juin 1998
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Georges DUTRUC-ROSSET

© OIV 1998

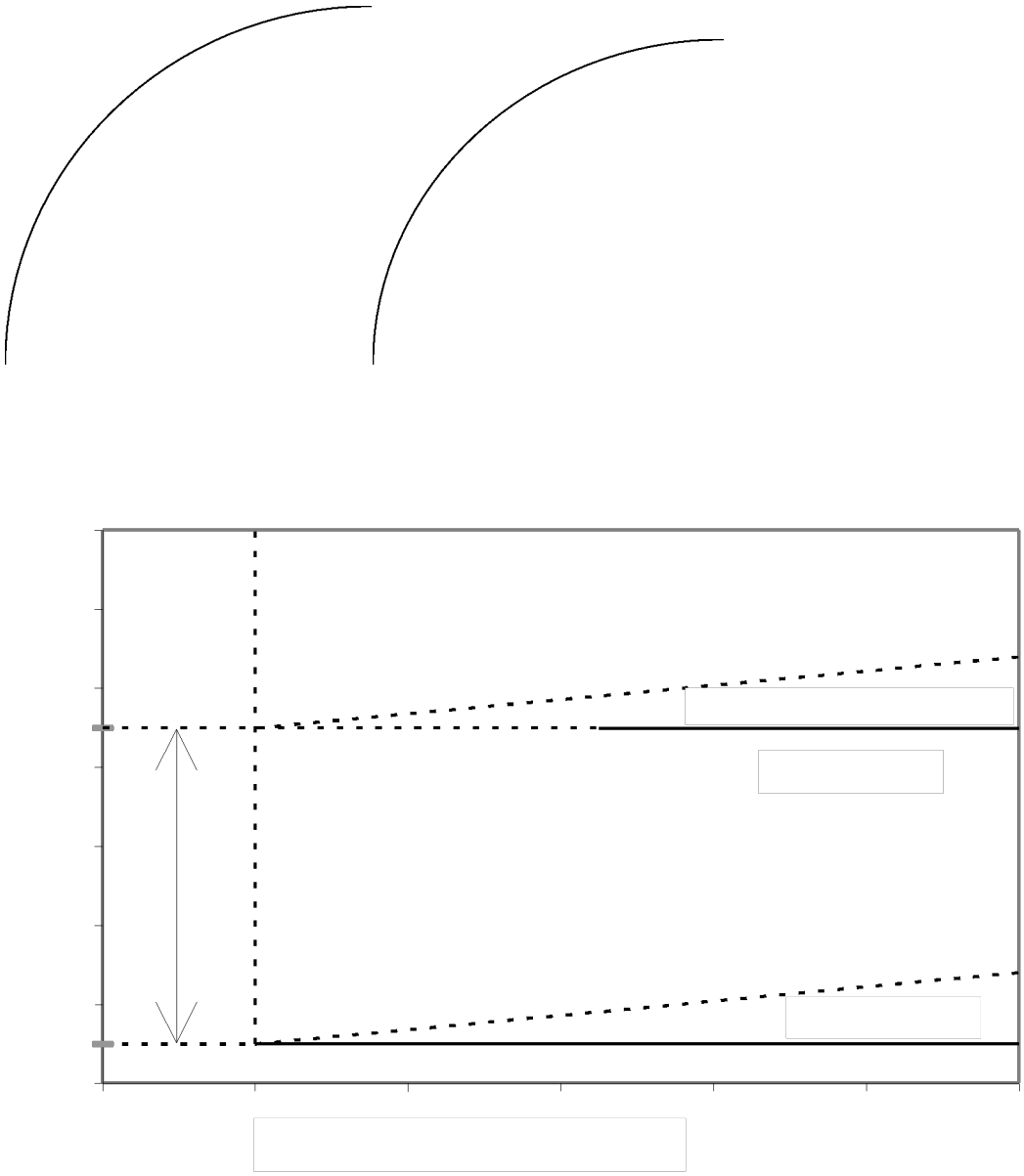


Figure 1: *réaction parasite*

ANNEXE 2

Exemplaire certifié conforme Lisbonne, 26 juin 1998
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Georges DUTRUC-ROSSET

© OIV 1998

Résultats statistiques de l'essai interlaboratoires

Année de l'essai interlaboratoires : 1995

Nombre de laboratoires : 8

Nombre d'échantillons : 5 avec addition d'acide D-malique

Echantillon	A	B	C	D	E
Nombre de laboratoires retenus après élimination des laboratoires présentant des résultats aberrants Nombre de laboratoires ayant des résultats aberrants Nombre de résultats acceptés	7 1 35	8 - 41	7 1 35	8 - 41	7 1 36
Valeur moyenne (□) (mg/l)	161,7	65,9	33,1	106,9	111,0
Ecart-type de répétabilité (s_r) (mg/l) Ecart-type relatif à la répétabilité (RSD_r) (%)	4,53 2,8	4,24 6,4	1,93 5,8	4,36 4,1	4,47 4,00
Limite de répétabilité (r) (mg/l)	12,7	11,9	5,4	12,2	12,5
Ecart-type de reproductibilité (s_R) (mg/l) Ecart-type relatif à la reproductibilité (RSD_R) (%)	9,26 5,7	7,24 11	5,89 17,8	6,36 5,9	6,08 5,5
Limite de reproductibilité (R) (mg/l)	25,9	20,3	16,5	17,8	17,0

Types d'échantillons :

A : vin rouge

B : vin rouge

C : vin blanc

D : vin blanc

E : vin blanc

Exemplaire certifié conforme Lisbonne, 26 juin 1998
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Georges DUTRUC-ROSSET

© OIV 1998