

RÉSOLUTION OIV-OENO 621-2019

DOSAGE DE L'ACIDE ACETIQUE DANS LES VINS PAR METHODE ENZYMATIQUE AUTOMATISEE

*AVERTISSEMENT : cette résolution amende la résolution suivante :
OIV-OENO 391-2010*

(Méthode de type II)

L'ASSEMBLÉE GÉNÉRALE,

CONFORMEMENT à 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 « Méthodes d'analyse »,

CONSIDÉRANT l'intérêt exprimé par certains experts de la SCMA d'inclure les méthodes automatiques dans le *Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts*,

DECIDE de supprimer l'exemple pratique concernant l'analyte dans la résolution OIV-OENO 391/2010 au fur et à mesure qu'une méthode automatique est adoptée,

DECIDE de compléter le *Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts* avec la méthode suivante :

DOSAGE DE L'ACIDE ACETIQUE DANS LES VINS PAR METHODE ENZYMATIQUE AUTOMATISEE

(méthode de type II)

1. Domaine d'application

Cette méthode permet le dosage de l'acide acétique dans les vins par analyseur automatique séquentiel et par analyse enzymatique spécifique. L'échelle de mesure ayant fait l'objet de la présente validation interlaboratoire est de 0,2 à 1,14 g/L d'acide acétique.

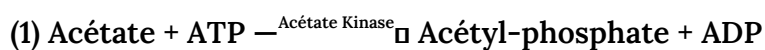
NOTE : Une gamme de valeurs plus élevées peut être analysée en diluant l'échantillon.

2. Références normatives

- ISO 78-2 : Chimie - Plans de normes

3. Principes réactionnels

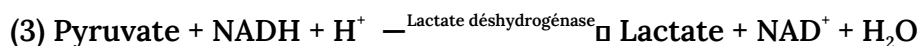
En présence d'ATP, l'acide acétique est transformé en acétyl-phosphate dans une réaction catalysée par l'acétate kinase.



L'ADP formé par cette réaction est retransformé en ATP par réaction avec du phosphoénolpyruvate en présence de pyruvate kinase.



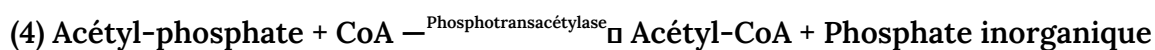
Le pyruvate est réduit en L-lactate par le nicotinamide-adénine-dinucléotide réduit (NADH) en présence de lactate-déshydrogénase.



La quantité de NADH oxydé en réaction (3) est déterminée par la mesure de l'absorbance à 340 nm, et est proportionnelle à la concentration du vin en acide acétique.

Remarque 1 :

Lorsque cette analyse enzymatique est conduite de façon manuelle, la lecture se fait en plateau final stabilisé. Pour cela, une quatrième réaction permet de pousser complètement l'équilibre de la réaction 1 dans le sens de formation d'acétylphosphate par élimination de ce dernier.



Dans le cas d'une analyse par méthode automatisée, qui s'opère dans un temps d'analyse plus court, il n'est pas nécessaire d'atteindre un plateau final stabilisé, et cette réaction s'avère inutile. L'emploi de la phosphotransacétylase n'est donc pas nécessaire, et n'est pas décrit ici.

Remarque 2 :

La chaîne réactionnelle enzymatique fait intervenir le pyruvate. Les quantités faibles de pyruvate (quelques dizaines de mg/L) normalement présentes dans les vins n'ont pas d'impact significatif sur le résultat. Dans des cas rares, la présence dans le vin

d'une quantité supérieure atypique de pyruvate est susceptible de produire un biais sur la méthode.

4. Réactifs et solutions de travail

Au cours de l'analyse, sauf indications contraires, utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue et de l'eau distillée ou déminéralisée, ou de l'eau de pureté équivalente.

4.1. Réactifs

- 4.1.1. Eau pour usage analytique de qualité I ou II (norme ISO 3696).
- 4.1.2. Acide N-morpholino-3-propanesulfonique (MOPS) ; (n° CAS 1132-61-2)
- 4.1.3. Chlorure de magnésium, 6 H₂O ; (n° CAS 7791-18-6)
- 4.1.4. Chlorure de potassium ; (n° CAS 7447-40-7)
- 4.1.5. β nicotinamide-adénine dinucléotide (NADH) ; (n° CAS 53-84-9), pureté ≥ 98%
- 4.1.6. Adenosine-5'-triphosphate, sel disodique (ATP) ; (n° CAS 56-65-5)
- 4.1.7. Hydroxyde de potassium ; (n° CAS 1310-58-3)
- 4.1.8. Phosphoénolpyruvate de tricyclohexylammonium, (n° CAS 35556-70-8) ou Phosphoénolpyruvate monosodique, (n° CAS 138-08-9) ; (PEP)
- 4.1.9. Acétate kinase (AK) ; (n° CAS 9027-42-3)
- 4.1.10. Pyruvate kinase (PK) ; (n° CAS 9001-59-6)
- 4.1.11. Lactate deshydrogénase (LDH) ; (n° CAS 9001-60-9)
- 4.1.12. Polyvinylpyrrolidone (PVP) ; (n° CAS 9003-39-8)
- 4.1.13. Acide acétique : Pureté ≥ 99.5% ; (n° CAS 64-19-7)
- 4.1.14. Chlorure de sodium ; (n° CAS 7647-14-15)
- 4.1.15. Albumine de sérum bovin (BSA) ; (n° CAS 9048-46-8)

Remarque 3 : Il existe des kits commerciaux pour la détermination de l'acide acétique. L'utilisateur se doit d'en vérifier la composition pour s'assurer que celle-ci comprend bien les réactifs ci-dessus indiqués. Ces kits sont parfois fournis avec la phosphotransacétylase (inutile en méthode automatisée).

Remarque 4 : L'utilisation de PVP est recommandée pour éliminer une éventuelle action négative des tanins du vin sur les molécules protéiques des enzymes. Dans le cas où l'utilisation de PVP n'est pas retenue, le laboratoire doit s'assurer de l'absence d'interférence des tanins du vin sur les enzymes.

Remarque 5 : la BSA est un agent permettant de stabiliser les enzymes en solution.

4.2. Solutions de travail

4.2.1. Tampon MOPS

La préparation peut être la suivante :

- 13 g de MOPS (Acide N-morpholino-3-propane sulfonique) (4.1.2)
- 0,5 g de Chlorure de magnésium, 6H₂O (4.1.3)
- 1,5 g de Chlorure de potassium (KCl) (4.1.4)
- 1,3 g de PVP (4.1.12)
- 250 mL d'eau pour usage analytique (4.1.1)

Ajuster le pH à 4,75 avec une solution 1,5 M d'hydroxyde de potassium (KOH) (4.1.7)

Attendre 5 minutes et réajuster à nouveau le pH à 7,45, avec une solution 1,5 M d'hydroxyde de potassium (KOH) (4.1.7)

Compléter à 300 mL avec de l'eau pour usage analytique (4.1.1).

Le tampon peut être conservé au moins 60 jours à 2 - 8 °C (environ).

4.2.2. Solution de travail 1 (R1) :

La préparation peut être la suivante:

- 100 mL de tampon MOPS (4.2.1)
- 300 à 350 mg d'adénosine-5-triphosphate, sel disodique (ATP) - (4.1.6)
- 50 mg de phosphoénolpyruvate (PEP) de tricyclohexylammonium - (4.1.8)
- 40 mg de β nicotinamide adénine dinucléotide (forme réduite) (NADH) (4.1.5)

La solution de travail R1 peut être conservée au moins 30 jours à 2-8 °C (environ).

4.2.3. Solution de travail 2 (R2)

La préparation peut être la suivante:

- 100 mL de tampon MOPS - (4.2.1)
- 40 unités environ de pyruvate kinase (PK) - (4.1.10)

- 40 unités environ de lactate déshydrogénase (LDH) - (4.1.11)
- 50 unités d'acétate kinase (AK) - (4.1.9)
- 300 mg de BSA- (4.1.15)

La solution de travail R2 se conserve environ 48 heures à 2-8 °C (environ).

Remarque : Lors de la préparation de ces solutions, le mélange doit être réalisé en douceur pour éviter la formation de mousse. La durée de vie des solutions de travail est limitée et doit être évaluée et respectée par le laboratoire.

4.3. Solutions d'étalonnage

Afin d'assurer le raccordement au plus près du système international d'unité (S.I.) la gamme de étalonnage doit être réalisée avec des solutions pures d'acide acétique (4.1.13). Il est recommandé de préparer une solution mère (par exemple à 1,5 g.L⁻¹ d'acide acétique) par pesée, le reste des étalons étant obtenus à partir de la solution mère de façon à couvrir la gamme de mesure.

Une valeur « zéro » peut être obtenue en utilisant une solution à 9‰ de chlorure de sodium (4.1.14), ou une solution saline équivalente.

5. Appareillage

5.1. Analyseur

5.1.1. Type de matériel

Analyseur automatique séquentiel équipé d'un spectrophotomètre avec détecteur UV. La température de réaction doit être stable (environ 37°C). Les cuvettes de réaction sont en verre, en méthacrylate ou en quartz. Le matériel est piloté par un logiciel assurant son fonctionnement, l'acquisition des données et les calculs utiles.

5.1.2. Lecture des absorbances

La concentration des analytes est une fonction directe de la différence d'absorbance lue par le spectrophotomètre. La précision de la lecture d'absorbance doit être au minimum de 0,1 unité d'absorbance (AU). Les valeurs d'absorbance obtenues ne doivent pas être saturantes pour le spectrophotomètre utilisé.

5.1.3. Fidélité des volumes prélevés

Les volumes de réactifs et d'échantillons prélevés par les pipettes de l'analyseur doivent présenter une fidélité suffisante pour ne pas avoir d'impact significatif sur le résultat de mesure.

5.1.4. Durée et température de réaction

En général, le temps de réaction est de 10 minutes et la température de 37°C. Certains appareils peuvent utiliser des valeurs un peu différentes.

5.1.5. Utilisation d'un blanc de réaction

La lecture des résultats se fait par comparaison de l'intensité lumineuse absorbée à la longueur d'onde choisie entre une cuvette dans laquelle la réaction est réalisée et une cuvette dans laquelle la réaction n'a pas lieu (blanc de réaction).

5.1.6. Longueur d'onde

La longueur d'onde d'absorption maximale du NADH formé par la réaction est de 340 nm. Pour les spectrophotomètres généralement utilisés, cette longueur d'onde sera retenue.

Une longueur d'onde secondaire est paramétrée afin de corriger un éventuel effet matrice, cette longueur d'onde est de 410 nm.

La mesure est constituée par la différence d'absorbance DO340 – DO410.

5.2. Balance

Celle-ci doit être raccordée au SI et avoir une résolution de 1 mg.

5.3. pH-mètre

5.4. Verrerie de mesure

Les verreries de mesure pour la préparation des réactifs et des solutions de étalonnage sont de classe A.

6. Echantillonnage

6.1. Echantillons pour essais

6.1.1. Préparation des échantillons pour les vins tranquilles

La majorité des échantillons de vins peuvent être analysés sans préparation. Dans certains cas une préparation peut être introduite :

- Une filtration doit être réalisée pour les échantillons fortement turbides.
- Une dilution de l'échantillon (manuelle ou automatique) avec de l'eau pour usage analytique (4.1.1) doit être réalisée pour les valeurs supérieures à la gamme de mesure.

6.1.2. Préparation des échantillons pour les vins effervescents

Les échantillons de vins effervescents doivent être préalablement dégazés par agitation sous vide, passage aux ultrasons ou tout moyen permettant le dégazage requis.

7. Mode opératoire

Etant donné que des analyseurs différents peuvent être utilisés, il est recommandé que les conditions d'utilisation données par le constructeur soient strictement respectées. Cela est aussi valable pour les différents kits enzymatiques existant sur le marché.

Le mode opératoire se déroule de la façon suivante

1. L'échantillon (E) est placé dans une cuvette de réaction
2. La solution de travail R1 (4.2.2) est ensuite introduite dans la cuvette
3. Une homogénéisation est réalisée. Un temps de latence est alors observé, afin de garantir la stabilité de l'absorbance. Ce temps de latence peut durer 1 à 5 min, il est défini par le laboratoire, en fonction des caractéristiques de l'équipement utilisé
4. La solution de travail R2 (4.2.3) est ajoutée et la réaction se déclenche.

A titre d'exemple, les quantités des différents éléments peuvent être :

- Echantillon : 3 µL
- R1 : 120 µL, à T (début de la séquence)
- R2 : 60 µL, à T + 3 min 40 sec

Le matériel effectue des mesures régulières qui permettent d'obtenir une courbe de réaction dont un exemple est donné en figure 1.

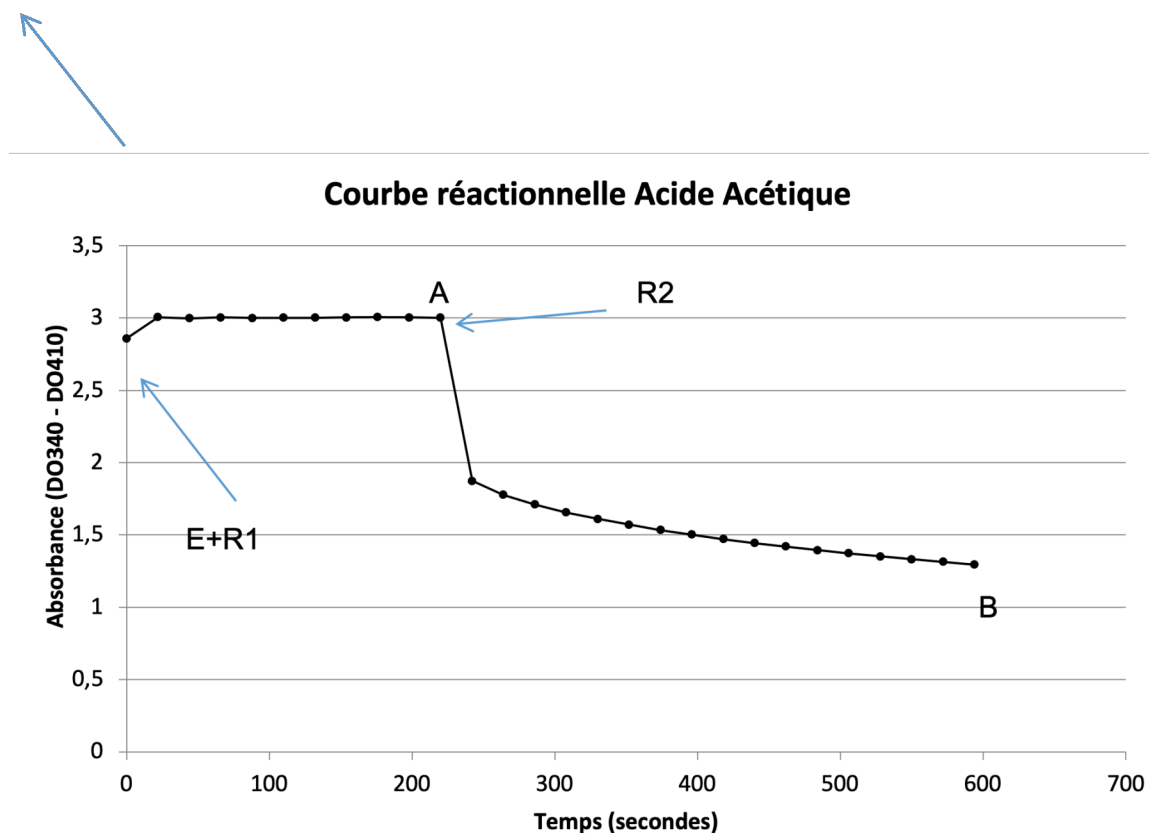


Figure 1 : Courbe de réaction

Le matériel permet de choisir les points de lecture de la différence d'absorbance recherchée, par exemple A et B dans la figure 1.

Afin de corréliser cette valeur à la concentration en acide acétique, un étalonnage régulier de l'appareil est effectué en utilisant les solutions d'étalonnage en 3 points minimum couvrant la gamme de mesure utilisée. La courbe d'étalonnage obtenue s'approche d'une droite. Néanmoins, une équation du second degré être utilisée. Un exemple est donné en figure 2.

Par ailleurs, un blanc de réaction est mis en œuvre comportant tous les réactifs, mais pas l'échantillon (point 0 de l'étalonnage).

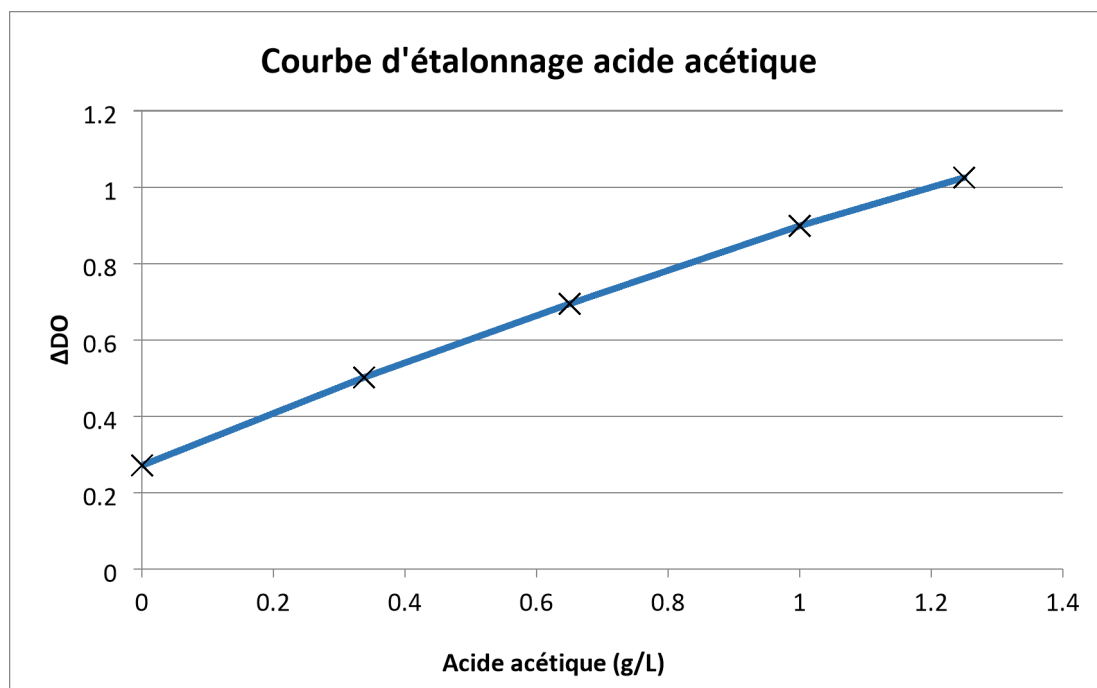


Figure 2 : Courbe d'étalonnage

8. Calculs des résultats

Pour chaque mesure, le résultat est donné selon la formule :

$$R = |Absorbance B - Absorbance A|$$

Les valeurs ainsi observées sont reportées sur la courbe d'étalonnage pour obtenir la concentration en acide acétique. La valeur finale obtenue doit être multipliée par l'éventuel coefficient de la dilution utilisée.

9. Expression des résultats

Les résultats pour l'acide acétique sont exprimés en g/L d'acide acétique, avec deux décimales, ou selon les usages dans une autre unité (meq/L). L'expression du résultat doit être en accord avec l'incertitude de mesure.

10. Caractéristiques de la méthode enzymatique automatisée

Reproductibilité interlaboratoire

$$RSD_R = 10\%$$

$$CV_R\% (k=2) = 2 \times RSD_R = 20\%,$$

Répétabilité

$$RSD_r = 4\%$$

$$CV_r\% (k=2) = 2 \times RSD_r = 8\%$$

Limite de quantification

LQ validée < 0,2 g/L

Non déterminée dans l'étude collaborative

11. Bibliographie

1. An Improved enzymatic assay for acetate in juice and wine.1980. McCLOSKEY Leo P., *Am. J. Enol. Vitic., Vol. 31, No. 2*

ANNEXE

Etudes de performance de la méthode

Étude collaborative

11 Laboratoires de 5 différents pays ont participé à l'étude collaborative.

Laboratoire	Pays
Miguel Torres S.A.- Finca Mas La Plana	Espagne
INGACAL -Consellería do Medio Rural Estación de Viticultura e Enoloxía de Galicia	Espagne
Estación Enológica de Haro	Espagne

Laboratoires Dubernet	France
Laboratoire Dicoenos Rhône	France
Laboratoire Natoli	France
SCL Montpellier	France
Fachbereich: Wein, Weinüberwachung - Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Karlsruhe	Allemagne
HBLAuBA Wein - und Obstbau	Autriche
Hochschule GEISENHEIM University Institut Weinanalytik und Getränkeforschung	Allemagne
Unione Italiana Vini soc. Coop.	Italie

Tableau 1 : laboratoires participants

2 x 10 échantillons en double aveugle ont été analysés, avec une répétition. Les vins analysés sont des vins secs, vins édulcorés et vins de liqueur, originaires de France et du Portugal.

Echantillon		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
		Vin de Porto	Vin édulcoré	Vin sec	Vin sec	Vin édulcoré	Vin sec	Vin sec	Vin édulcoré	Vin édulcoré	Vin édulcoré
position		1 9	2 13	3 4	5 15	6 10	16 20	7 11	12 17	8 19	14 18
Labo3	rep#1	0,24 0,27	0,20 0,21	0,65 0,65	0,47 0,49	0,54 0,52	1,28 1,30	0,64 0,63	0,29 0,31	0,39 0,37	0,63 0,62
	rep#2	0,25 0,26	0,20 0,21	0,67 0,65	0,46 0,50	0,56 0,53	1,29 1,33	0,65 0,67	0,29 0,28	0,36 0,37	0,65 0,61
Labo7	rep#1	0,20 0,20	0,22 0,23	0,62 0,62	0,45 0,46	0,50 0,50	1,25 1,30	0,61 0,62	0,28 0,28	0,34 0,35	0,62 0,60
	rep#2	0,20 0,21	0,21 0,22	0,63 0,64	0,45 0,46	0,53 0,52	1,20 1,20	0,61 0,64	0,29 0,28	0,35 0,37	0,60 0,61
Labo9	rep#1	0,17 0,18	0,18 0,19	0,57 0,52	0,40 0,40	0,41 0,43	1,18 1,18	0,57 0,54	0,24 0,29	0,36 0,32	0,53 0,51
	rep#2	0,17 0,19	0,16 0,17	0,59 0,57	0,39 0,43	0,44 0,41	1,16 1,14	0,55 0,55	0,25 0,29	0,30 0,33	0,55 0,51
Labo12	rep#1	0,17 0,18	0,20 0,20	0,56 0,53	0,40 0,41	0,44 0,44	1,02 1,01	0,53 0,53	0,27 0,28	0,36 0,33	0,49 0,51
	rep#2	0,17 0,18	0,20 0,21	0,55 0,54	0,40 0,41	0,44 0,44	1,02 1,01	0,52 0,52	0,28 0,29	0,36 0,34	0,48 0,51
Labo13	rep#1	0,22 0,19	0,23 0,20	0,50 0,51	0,40 0,40	0,42 0,44	0,95 0,97	0,48 0,49	0,27 0,28	0,32 0,32	0,48 0,50
	rep#2	0,20 0,19	0,23 0,21	0,52 0,52	0,39 0,39	0,43 0,42	0,97 0,96	0,51 0,48	0,28 0,28	0,32 0,33	0,50 0,51

Labo 14	rep#1	0,17	0,17	0,20	0,19	0,56	0,57	0,42	0,41	0,46	0,45	1,10	1,14	0,55	0,54	0,27	0,26	0,34	0,32	0,53	0,51
	rep#2	0,17	0,17	0,20	0,19	0,56	0,57	0,42	0,41	0,45	0,44	1,12	1,10	0,53	0,55	0,26	0,26	0,33	0,31	0,53	0,53
Labo 15	rep#1	0,22	0,23	0,28	0,27	0,68	0,68	0,52	0,52	0,56	0,56	1,20	1,23	0,69	0,73	0,35	0,34	0,47	0,42	0,60	0,62
	rep#2	0,22	0,22	0,26	0,26	0,68	0,63	0,53	0,50	0,52	0,54	1,18	1,13	0,65	0,67	0,34	0,34	0,42	0,41	0,59	0,64
Labo17	rep#1	0,20	0,19	0,26	0,25	0,54	0,52	0,41	0,42	0,39	0,39	1,01	1,00	0,49	0,45	0,32	0,29	0,34	0,35	0,44	0,43
	rep#2	0,20	0,20	0,27	0,27	0,53	0,55	0,43	0,43	0,43	0,43	1,03	1,05	0,49	0,49	0,31	0,32	0,37	0,38	0,44	0,46
Labo18	rep#1	0,27	0,25	0,35	0,33	0,69	0,68	0,53	0,56	0,59	0,59	1,24	1,21	0,66	0,68	0,43	0,41	0,50	0,51	0,65	0,63
	rep#2	0,28	0,27	0,36	0,36	0,68	0,69	0,55	0,57	0,60	0,60	1,26	1,23	0,68	0,71	0,44	0,43	0,50	0,52	0,63	0,65
Labo20	rep#1	0,23	0,20	0,29	0,29	0,58	0,57	0,49	0,47	0,47	0,47	1,15	1,13	0,55	0,58	0,34	0,35	0,39	0,40	0,55	0,52
	rep#2	0,23	0,20	0,29	0,29	0,58	0,57	0,49	0,47	0,47	0,47	1,15	1,13	0,55	0,58	0,34	0,36	0,39	0,40	0,55	0,52
Labo22	rep#1	0,17	0,16	0,20	0,18	0,60	0,60	0,43	0,44	0,47	0,47	1,20	1,20	0,58	0,58	0,26	0,26	0,32	0,32	0,55	0,58
	rep#2	0,17	0,17	0,19	0,19	0,61	0,61	0,43	0,43	0,48	0,47	1,21	1,22	0,59	0,58	0,26	0,27	0,31	0,33	0,54	0,59

Tableau 2 : Tableau des données obtenues. (en g.L⁻¹ d'acide acétique) Les valeurs en gras correspondent aux valeurs rejetées conformément au test de Cochran (variance aberrante) au niveau de rejet 2,5% (test unilatéral) et de Grubbs (moyennes aberrantes) au niveau de rejet de 2,5 % (test bilatéral).

Echantillon	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Nb de laboratoires retenus	11	10	11	10	10	11	10	9	9	9
Nb de répétitions	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Mini	0,17	0,18	0,51	0,40	0,41	0,96	0,49	0,26	0,32	0,50
Maxi	0,27	0,29	0,69	0,52	0,55	1,30	0,69	0,35	0,39	0,63
Moyenne globale	0,20	0,22	0,59	0,44	0,47	1,14	0,59	0,30	0,35	0,55
Variance de répétabilité	0,0001	0,0001	0,0002	0,0001	0,0002	0,0006	0,0003	0,0001	0,0003	0,0003
Ecartype interlaboratoire	0,03	0,04	0,06	0,04	0,05	0,11	0,07	0,03	0,03	0,05
Variance de reproductibilité	0,001	0,001	0,003	0,002	0,002	0,012	0,005	0,001	0,001	0,003
Ecartype de répétabilité	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02	0,01	0,02	0,02
Limite r	0,03	0,03	0,04	0,03	0,04	0,07	0,05	0,02	0,05	0,05

RSD _r répétabilité	4,5%	4,5%	2,4%	2,7%	2,9%	2,1%	3,1%	2,8%	4,8%	3,2%
Ecartype de reproductibilité	0,03	0,04	0,06	0,04	0,05	0,11	0,07	0,03	0,03	0,05
Limite R	0,10	0,11	0,17	0,12	0,14	0,31	0,19	0,09	0,08	0,15
RSD _R reproductibilité	16,8%	17,4%	9,9%	9,5%	10,6%	9,5%	11,7%	11,1%	8,5%	9,5%
Horwitz RSD _r	4,74	4,68	4,04	4,22	4,18	3,66	4,04	4,49	4,38	4,08
Horrat r	0,96	0,97	0,60	0,63	0,70	0,58	0,77	0,62	1,10	0,79
Horwitz RSD _R	7,18	7,09	6,12	6,40	6,34	5,54	6,13	6,80	6,63	6,18
Horrat R	2,34	2,45	1,63	1,49	1,67	1,71	1,91	1,63	1,29	1,53

Tableau 3 : Tableau des résultats obtenus

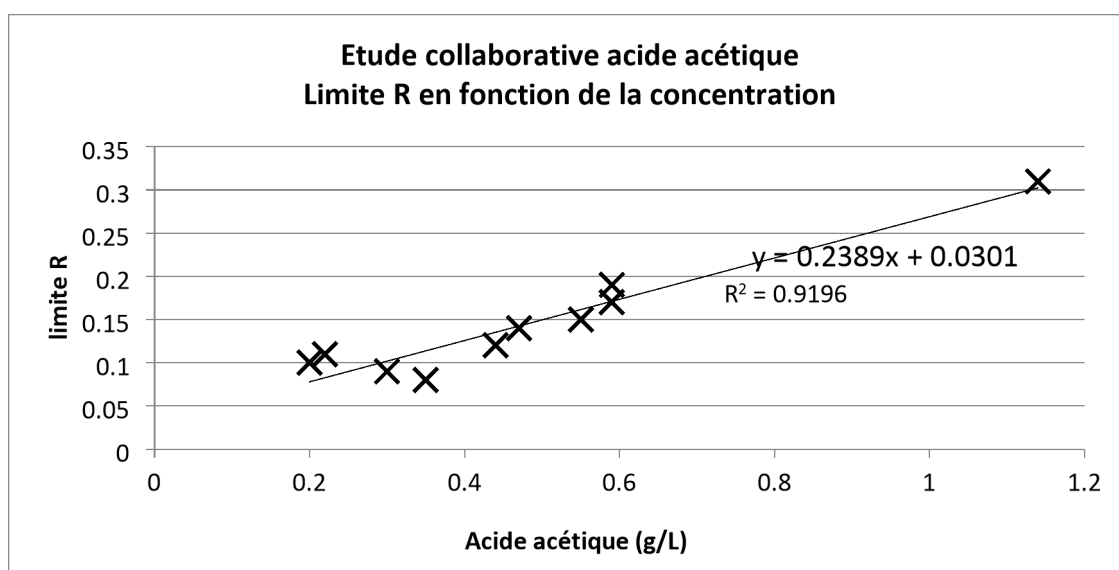


Figure 3 : Limite R en fonction de la concentration