

RÉSOLUTION OIV-OENO 618-2020

QUANTIFICATION DU GLUCOSE, DE L'ACIDE MALIQUE, DE L'ACIDE ACÉTIQUE, DE L'ACIDE FUMARIQUE, DE L'ACIDE SHIKIMIQUE ET DE L'ACIDE SORBIQUE DANS LE VIN PAR SPECTROSCOPIE DE RÉSONNANCE MAGNÉTIQUE NUCLÉAIRE (RMN ¹H) QUANTITATIVE

L'ASSEMBLÉE GÉNÉRALE,

VU L'ARTICLE 2, paragraphe 2 b) 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 »,

DÉCIDE de compléter l'annexe A du *Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts* avec la méthode suivante :

Quantification du glucose, de l'acide malique, de l'acide acétique, de l'acide fumarique, de l'acide shikimique et de l'acide sorbique dans le vin par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN ¹H) quantitative

(Méthode de type IV)

1. Introduction

La spectroscopie RMN constitue une technique analytique quantitative primaire, à large gamme linéaire (5 à 6 ordres de grandeur). La suppression multiple des signaux de l'eau et de l'éthanol est susceptible d'augmenter significativement la sensibilité pour les matrices contenant de l'eau et de l'éthanol (comme le vin) lors de mesures automatisées. Plusieurs composés du vin peuvent être identifiés et quantifiés à partir de signaux spécifiques en une seule analyse.

2. Domaine d'application

La méthode décrite convient au dosage du glucose, de l'acide malique, de l'acide acétique, de l'acide fumarique et de l'acide shikimique à leurs concentrations naturelles dans le vin, ainsi que de l'agent de conservation acide sorbique.

Domaine de travail (mg/L) :

Glucose : 600-50 000

Acide malique : 300-5000

Acide acétique : 30-2000

Acide fumarique : 20-300

Acide shikimique : 20-500

Acide sorbique : 20-800

3. Abréviations

RMN : Résonance magnétique nucléaire

RMN ¹H : Résonance magnétique nucléaire du proton

TSP : Sel sodique de l'acide triméthylsilylpropanoïque

PULCON: PULse lengthbased CONcentration measurement

4. Principe

L'échantillon de vin est dilué avec une solution tampon à 10 % dans D₂O. Le TSP est utilisé comme étalon interne pour fixer à 0 le déplacement chimique (δ) (0 ppm).

L'échantillon est ensuite mesuré par RMN ¹H. Il convient de réaliser au minimum une suppression du signal de l'eau. Pour augmenter la sensibilité, le signal de l'éthanol est également supprimé. Les analytes du vin sélectionnés sont évalués et quantifiés à partir des signaux pertinents (voir point 11.1 de l'annexe, tableau 1.).

5. Réactifs et matériel

Les réactifs et l'eau (5.8) utilisés doivent être exempts des analytes à déterminer. Sauf indication contraire, on entend par « solution » une solution aqueuse.

5.1. D₂O (99,9 % en atomes de D), n° CAS : 7789-20-0

5.2. 2,2,3,3-tétradeutério-3-triméthylsilylpropanoate de sodium (TSP) (98 % en atomes de D) n° CAS : 24493-21-8

5.3. Solution tampon pH 2,9-3,3 pour ajuster le pH du vin

Par exemple : KH₂PO₄ (dihydrogénophosphate de potassium, n° CAS : 7778-77-0) 1 M, TSP (2,2,3,3-tétradeutério-3-triméthylsilylpropanoate de sodium) (5.2) à 0,1 % et NaN₃ (azoture de sodium, n° CAS : 26628-22-8) 3 mM dans D₂O (5.1), à pH 3,10

- 5.4. Acide chlorhydrique 1 M, n° CAS : 7647-01-0
- 5.5. Hydroxyde de sodium 1 M n° CAS : 1310-73-2
- 5.6. Solutions tampons pour l'étalonnage des électrodes
pH 4,00 et pH 2,00
(matériau de référence certifié, par ex. : Certipur®)
- 5.7. Acide citrique monohydraté, n° CAS : 5949-29-1
- 5.8. Eau ultra-pure, ISO 3696

6. Appareillage

Les filtres à membrane (6.8) doivent être exempts des analytes à déterminer.

- 6.1. Tubes RMN de 5 mm, avec déviation maximale du diamètre interne de ± 1 %
- 6.2. Spinner avec jauge pour l'ajustement des tubes RMN
- 6.3. Dispositif de mesure du pH ($\pm 0,01$ unité de pH)
- 6.4. Système de titrage automatique (ajustement du pH à $\pm 0,01$ unité de pH) ;
ajustement manuel alternatif
- 6.5. Spectromètre de RMN, par exemple de 400 MHz avec sonde de 5 mm (gradient Z)
et stabilisation de la température à $\pm 0,2$ K
- 6.6. Pipettes de 100-1000 μL
- 6.7. Flacons de réaction de 1,5 mL
- 6.8. Filtre à membrane en [polyfluorure de vinylidène \(PVDF\), taille des pores 0,2 \$\mu\text{m}\$,
diamètre de 15 mm](#)

7. Préparation des échantillons

Les échantillons de vin doivent être limpides ou, dans le cas contraire, filtrés (6.8). Pour la préparation des échantillons, les vins sont dilués avec une solution tampon à 10 % dans D_2O . Le TSP est utilisé comme étalon interne pour fixer le déplacement chimique à $\delta 0$ ppm. Le pH final des solutions des échantillons doit être égal à $3,10 \pm 0,02$.

Par exemple, 900 μL de vin sont mélangés avec 100 μL de solution tampon (5.3) et le pH est ajusté à exactement $3,10 \pm 0,02$ avec de l'acide chlorhydrique (5.4) ou de l'hydroxyde de sodium (5.5) afin d'utiliser les paramètres de quantification présentés dans le tableau 1 du point 11.1 de l'annexe. À cet effet, il convient d'utiliser un système de titrage automatique ou de réaliser un ajustement manuel à l'aide d'un pH-mètre sensible. 600 μL de ce mélange sont transférés dans un tube de RMN de 5 mm et

directement soumis à analyse.

8. Mode opératoire

8.1. Spectromètre de RMN et mesure

Les mesures doivent être réalisées avec des séquences de suppression des signaux de l'eau et de l'éthanol par multi-présaturation. Diverses techniques sont disponibles pour supprimer les signaux indésirables, telles que la multi-présaturation sélective et la méthode WATERGATE. Pour une suppression correcte du signal de l'eau, les spectromètres sont dotés de séquences d'impulsion appropriées.

Le rapport signal-bruit des signaux sélectionnés pour la quantification des analytes doit être supérieur à 10:1.

En principe, les paramètres critiques sont les suivants :

- Le temps de recyclage doit être d'au moins 6 s,
- Les mesures doivent être réalisées à 300 K (27 °C) avec une stabilité thermique de $\pm 0,2$ K sans rotation,
- La résolution doit être d'au moins 16 points/Hz,
- La largeur spectrale (SW) doit être supérieure à 18 ppm,
- L'étalonnage et les mesures des échantillons de vin doivent être réalisés avec le même angle d'impulsion.

8.2. Quantification des composés

La quantification est effectuée dans les régions/intensités du signal recommandées pour les analytes (voir point 11.1 de l'annexe, tableau 1). Elle peut être réalisée au travers d'une normalisation et d'un étalonnage interne ou externe (PULCON) [3]. Les signaux correspondants aux analytes doivent être assignés (voir point 11.1 de l'annexe, tableau 1). Les étalons purs à des concentrations comparables doivent être mesurés sous les mêmes conditions que les échantillons afin d'obtenir le facteur de correction de réponse additionnel pour l'analyte en question (par ex., par essais d'enrichissement).

Les signaux correspondants aux substances ciblées sont indiqués au point 11.1 de l'annexe, tableau 1.

9. Calculs

9.1. Calculs avec étalon interne

Pour la quantification, les signaux correspondants des analytes peuvent être évalués en appliquant la formule suivante (étalon interne) :

$$m_x = \frac{MM_x}{MM_{std}} \cdot \frac{nH_{std}}{nH_x} \cdot \frac{A_x}{A_{std}} \cdot m_{std} \cdot FC$$

m_x et m_{std}	Masses de l'analyte et de l'étalon [g]
MM_x et MW_{std}	Masses moléculaires de l'analyte et de l'étalon [g/mol]
et nH_x et nH_{std}	Nombre de protons de l'analyte et de l'étalon
A_x et A_{std}	Aires des pics sélectionnés de l'analyte et de l'étalon
x	Analyte
std	Étalon de référence, étalon interne (par ex., TSP 5.2)
FC	Facteur de correction : voir point 11.1 de l'annexe, tableau1 (si nécessaire, obtenu à partir d'essais d'enrichissement de l'analyte en question)

9.2. Calculs avec étalon externe (méthode PULCON)

Pour la quantification, les signaux correspondants des analytes peuvent être évalués selon la méthode PULCON en appliquant la formule F1 ci-après. Un échantillon externe de concentration connue d'une substance appropriée pour l'étalonnage est utilisé à chaque passage, par exemple de l'acide citrique à 20 g/L (échantillon

Quant_{ref}). Le facteur de quantification résultant fait partie intégrante des données de chaque échantillon. L'échantillon Quant_{ref} est utilisé pour calculer fq suivant la formule F2 ci-après.

La méthode PULCON est basée sur la formule suivante :

$$\text{F1} \quad \gamma_{An} = \frac{I_{An} \cdot SW_{An} \cdot M_{An} \cdot P_{An} \cdot k_{An}}{SI_{An} \cdot fq \cdot P_{Ref} \cdot N_{H, An} \cdot d_{An}^2 \cdot NS_{An}}$$

où :

- γ_{An} = concentration massique de l'analyte recherché (mg/L)
- I_{An} = intégrale absolue de l'analyte dans l'échantillon
- SW_{An} = largeur spectrale (par ex., 20,55 ppm)
- M_{An} = masse molaire de l'analyte (g/mol)
- P_{An} = durée de l'impulsion d'excitation utilisée pour l'échantillon (μ s)
- k_{An} = facteur de correction (si nécessaire, obtenu à partir d'essais d'enrichissement de l'analyte en question)
- SI_{An} = taille (par ex. 131072)
- Fq = valeur moyenne du facteur de quantification obtenu pour QuantRef
- P_{Ref} = durée de l'impulsion d'excitation utilisée pour QuantRef (μ s)
- NH, An = nombre de protons correspondant au signal de l'analyte
- d_{An} = diamètre interne du tube de l'analyte
- NS_{An} = nombre de FID obtenues pour le tube de l'analyte

$$\text{F2} \quad fq = \frac{I_{Ref} \cdot SW_{Ref} \cdot M_{Ref}}{SI_{Ref} \cdot \gamma_{Ref} \cdot N_{H, Ref} \cdot d_{Ref}^2 \cdot NS_{Ref}} \left(\text{en } \frac{\text{a.u.} \cdot \text{ppm} \cdot \text{l}}{\text{mol}} \right)$$

où :

- I_{Ref} = intégrale absolue du signal de référence
- SW_{Ref} = largeur spectrale (par ex., 20,55 ppm)
- M_{Ref} = masse molaire de la substance de référence (g/mol)
- SI_{Ref} = taille (par ex., 131072 = 128k = 217)
- γ_{Ref} = concentration massique de la substance de référence
- NH_{Ref} = nombre de protons correspondant au signal de la substance de référence
- d_{Ref} = diamètre interne du tube de la substance de référence
- NS_{Ref} = nombre de FID obtenues pour le tube de la substance de référence

Il est en outre indispensable que les spectres correspondant aussi bien à l'étalon qu'à l'analyte soient obtenus avec un réglage de la sensibilité du récepteur identique (gain du récepteur). De même, il est recommandé de maintenir identiques tous les paramètres de mesure (température, type de tube d'échantillonnage, SI, SW et NS) lors de la détermination de f_q et ou y_{An} .

9.3. Expression des résultats

Les résultats doivent être exprimés en mg/L, avec une décimale pour les composés mineurs (< 1 g/L), et sans décimale pour les composés majeurs (> 1 g/L).

10. Fidélité

Un essai circulaire a été conduit afin de fournir des indications réalistes sur la performance de la méthode. Les détails sont fournis dans Godelmann *et al.*, 2016.

10.1. Répétabilité et reproductibilité

Le tableau 1 résume les écarts types relatifs de répétabilité et de reproductibilité pour les différents analytes (Godelmann *et al.*, 2016).

Tableau 1. Écarts types relatifs de répétabilité et de reproductibilité, issus de l'essai interlaboratoires (Godelmann et al., 2016) pour les différents analytes

Glucose	Acide malique	Acide acétique	Acide fumarique	Acide shikimique	Acide sorbique
---------	---------------	----------------	-----------------	------------------	----------------

NMRP01 (vin modèle)						
Nombre de laboratoires	15	14	15	14	13	14
Moyenne (mg/L)	9903	2628	1056	82,1	103,6	126,1*
RSD _r %	1,5	1,7	1,4	1,5	1,8	7,5
RSD _R %	5,5	4,3	7,5	12,5	5	11,9
NMRP02 (vin blanc)						
Nombre de laboratoires	15	14	15	14	13	15
Moyenne (mg/L)	28 304	3528	868	12,1 (<LQ)	45,8	164,6
RSD _r %	1,3	1,7	1,6		4	2,1
RSD _R %	4,6	14,3	9		18,3	5,1
NMRP03 (vin rouge)						
Nombre de laboratoires	14	9	14	13	13	14
Moyenne (mg/L)	11 505	240 (<LQ)	544	29,1	34,6	149,7
RSD _r %	2,2		3,6	3,1	14,7	2,7
RSD _R %	4,3		7,6	9,1	20	5,4
NMRP04 (vin rouge)						

Nombre de laboratoires	14	11	14		13	5
Moyenne (mg/L)	12 538	251	627	n/a	61,8	10,9 (<LQ)
RSD _r %	1,7	6,6	2,7		9,4	
RSD _R %	3,9	11,4	5,8		15,3	
NMRP05 (vin blanc)						
Nombre de laboratoires	14	13	14	13	13	15
Moyenne (mg/L)	30 303	2615	1011	27,1	29,3	191,8
RSD _r %	3,2	4,6	2,7	3	8,8	3,9
RSD _R %	5	13,7	7	5,3	15,6	7
NMRP06 (vin rouge)						
Nombre de laboratoires	14	11	14	4	12	14
Moyenne (mg/L)	6090	267	630	n/a	30	158,5
RSD _r %	3	6,1	2,1		9,6	4,3
RSD _R %	5,3	10,2	4,9		12,6	6,3
NMRP07 (vin blanc)						
Nombre de laboratoires	13	10	14	14	13	4

Moyenne (mg/L)	5297	8036	794	n/a	36,2	3,2 (<LQ)
RSD _r %	1,5	3,7	2,6		11,5	
RSD _R %	6,3	5,9	7,4		14,7	
NMRP08 (vin blanc)						
Nombre de laboratoires	14	14	14	13	13	6
Moyenne (mg/L)	16 518	5254	301	n/a	68,4	5,4 (<LQ)
RSD _r %	1	2,2	3		4,2	
RSD _R %	4,5	8,6	7,1		6,4	
NMRP09 (vin blanc)						
Nombre de laboratoires	14	12	14	14	13	15
Moyenne (mg/L)	2091	2390	176	45,9	44,1	98
RSD _r %	3,1	2,6	4,6	2,2	4,3	1,8
RSD _R %	6,6	5,7	12	4,6	8,4	5,1
NMRP10 (vin rouge)						
Nombre de laboratoires	9	7	14	15	13	15
Moyenne (mg/L)	442 (<LQ)	178 (<LQ)	502	90,6	58	200,3

RSD _r %	2,4	2,5	5,2	2,9
RSD _R %	11,7	7,7	16,4	6,8

10.2. Limites de détection et de quantification

Les limites de détection (LD) et de quantification (LQ) doivent être estimées individuellement par les laboratoires et dépendent du système de RMN employé (en particulier de la force du champ). Toutefois le tableau 2 présente, à titre indicatif, les valeurs de LD et LQ calculées en conformité avec les indications de la résolution OENO 7-2000 (E-AS1-10-LIMDET) en fonction de la préparation de l'échantillon et des paramètres de mesure par RMN indiqués précédemment (400 MHz, avec suppression de l'éthanol).

Tableau 2. Limites de détection et de quantification

Analyte	LD (mg/L)	LQ (mg/L)
Glucose	150	600
Acide malique	90	300
Acide acétique	10	30
Acide fumarique	5	20
Acide shikimique	5	20
Acide sorbique	5	20

11. Annexe

11.1. Tableau 1. Paramètres de quantification (400 MHz ; pH 3,10)

Analyte	Molarité (g/mol)	Signal utilisé pour la quantification	Nbre de protons	Description	Exemple de région typique (ppm)	Facteur de correction	Motif de la correction
Acide malique	134	H3B,4 signaux à environ 2,88 ppm	1	Région: signal gauche + 4,5 Hz, signal droit -4,5 Hz Ligne de base locale-corrrection (typiquement d'ordre zéro)	2,8465-2,9216	1,05	Région tronquée
Acide sorbique	112	Moitié de H2,signal doublet à environ 5,85 ppm	0,5	Région: signal gauche doublet ± 7 Hz Ligne de base locale-corrrection (typiquement d'ordre zéro)	5,8250-5,8600	0,95	Effet de toit du doublet
Acide fumarique	116	H2+H3, singulet à environ 6,75 ppm	2	Région: signal ± 3 Hz Ligne de base locale-corrrection (ordre zéro/premier ordre)	6,7350-6,7600	1,00	
Acide acétique	60	H2A+H2B+H2C, singulet à environ 2,07 ppm	3	Région: signal ± 3 Hz Ligne de base locale-corrrection (ordre zéro)	2,0720-2,0830	1,28 (facteur combiné)	T1 (facteur 1,16) et région tronquée (facteur 1,1)
Glucose	180	H1-alpha, doublet à environ 5,21 ppm	1	Région: centre du doublet ± 5 Hz Ligne de base locale-corrrection (ordre zéro)	5,1900-5,2300	2,50 (facteur combiné)	alpha/beta-glucose (facteur 2,33), région tronquée (facteur 1,07)
Acide shikimique	174	H2,d'ordre le plus élevé (5), à environ 6,8 ppm	1	Région: centre du multiplet ± 6 Hz Ligne de base locale-corrrection (ordre zéro/premier ordre)	6,7850-6,820	1,00	-

11.2. Justesse/recouvrement

Le recouvrement a été déterminé pour les échantillons de l'essai circulaire en comparant les valeurs moyennes obtenues par la méthode avec l'analyse respective du paramètre pertinent par la méthode OIV (méthodes CLHP et enzymatique pour l'acide acétique, et méthode CLHP pour l'acide fumarique).

Les recouvrements calculés sont de 100,3 % (n=9, 95,2-106,4) pour le glucose, 108,9 % (n=10, 99,9-123) pour l'acide acétique, 104,1 % (n=7, 91,4-124,1) pour l'acide malique, 105,2 % (n=10, 91,2-122,3) pour l'acide shikimique, 100,2 % (n=8, 97,9-102,5) pour l'acide sorbique et 96,8 % (n=6, 80,5-104,1) pour l'acide fumarique. Seuls les résultats obtenus pour le paramètre acide acétique se sont avérés supérieurs à 100 %, avec une moyenne globale de 109 %. Ces résultats pourraient être expliqués par le facteur de correction de 1,28 employé (voir point 11.1 de l'annexe, tableau 1). Les recouvrements

ont été calculés en se basant sur les valeurs de référence issues de méthodes de l'OIV.

Tableau 2. Recouvrement des analytes

Analyte	Recouvrement moyen (%) n :nombre d'échantillons de l'essai circulaire inclus dans les calculs	Variation (%)
Glucose	100,0(n = 9)	95,2-106,4
Acide malique	104,1(n = 7)	91,4-124,1
Acide acétique	108,9(n = 10)	99,9-123
Acide fumarique	96,8(n = 6)	80,5-104,1
Acide shikimique	105,2(n = 10)	91,2-122,3
Acide sorbique	100,2(n = 8)	97,9-102,5

11.3. Valeurs HorRat de tous les composés

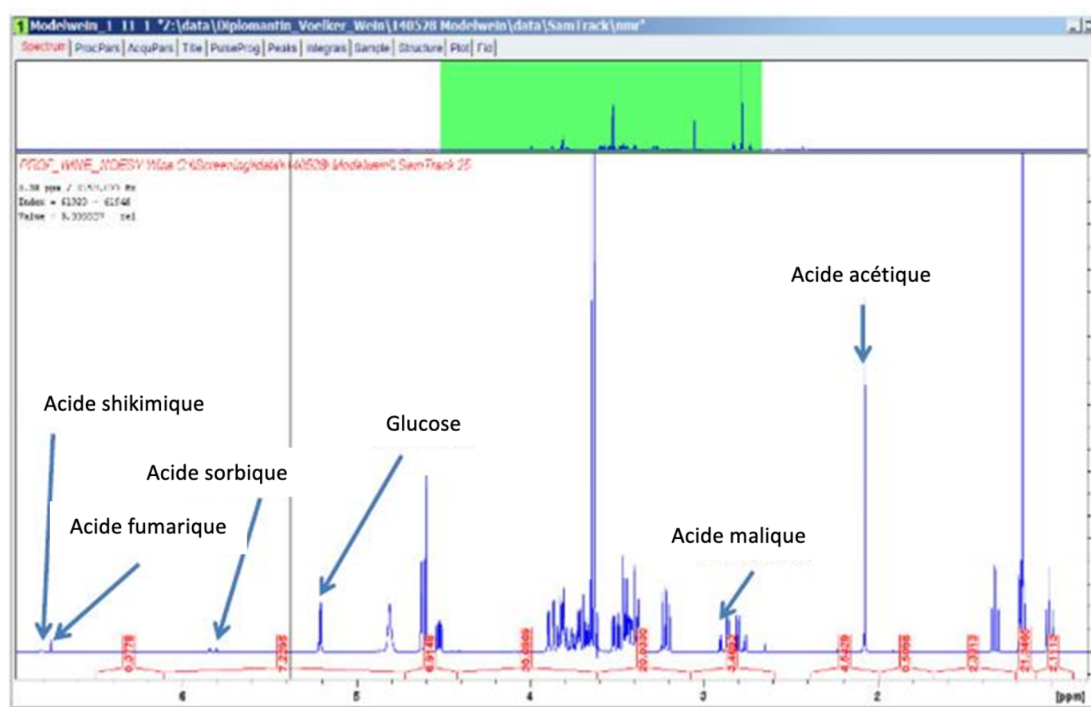
Tableau 4.

Paramètre		Valeur HorRat		Echantillons <LQ
	0,5-1,5	1,6-2,0	>2,0	
Acide acétique	7 (0,8-1,3)	3 (1,6 ; 1,6 ;1,9)	0	0
Acide malique	4 (0,9-1,5)	2 (1,6 ; 2,0)	2 (2,8 ; 3,1)	2
Glucose	9 (1,0-1,5)	0	0	1
Acide sorbique	7 (0,6-1,5)	0	0	3

Acide fumarique	6 (0,5-1,5)	0	0	4
Acide shikimique	4(0,6-1,3)	5 (1,6 ; 1,6 ; 1,8 ; 1,9 ; 2,0)	1 (2,1)	0

11.4. Exemple de spectre RMN

Figure 1. Spectre RMN d'un vin modèle avec signaux sélectionnés pour la quantification



12. Bibliographie

- Godelmann, R., Fang, F., Humpfer, E., Schütz, B., Bansbach, M., Schäfer, H., et Spraul, M., « Targeted and Non targeted Wine Analysis by 1H NMR Spectroscopy Combined with Multivariate Statistical Analysis. Differentiation of Important

- Parameters: Grape Variety, Geographical Origin, Year of Vintage », J. Agric. Food Chem., 2013, 61, p. 5610-5619.
2. Monakhova, Y.B., Schäfer, H., Humpfer, E., Spraul, M., Kuballa, T., et Lachenmeier, D., « Application of automated eightfold suppression of water and ethanol signals in ^1H NMR to provide sensitivity for analyzing alcoholic beverages », Magn. Reson. Chem., 2011, 49, p. 734-739.
 3. Wider, G., et Dreier, L., « Measuring Protein Concentrations by NMR Spectroscopy », J. Am. Chem. Soc., 2006, 128, p. 2571-2576.
 4. Godelmann, R., Kost, C., Patz, C., Ristow, R., et Wachter, H., « Quantitation of compounds in wine using ^1H NMR spectroscopy - Description of the method and collaborative study, Journal of AOAC International, 2016, vol. 99, n° 5, p. 1295-1304.
 5. Horwitz, W., « Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies », Pure and Applied Chemistry, 1995, 67, p. 331-343.
 6. Horwitz, W., Anal. Chem., 1982, 54, p. 67A-76A.
 7. Peeler, J.T., Horwitz, W., et Albert, R., J. Assoc. Off. Anal. Chem., 1989, 72, p. 784-806.
 8. Herbert-Pucheta, J. E., Mejía-Fonseca, I., Zepeda-Vallejo, L. G., Milmo-Brittingham, D., Maya, G. P., « The "Wine-T1" NMR experiment of novel wine-metabolome fingerprinting with nuclear-spin relaxation », DOI : 10.1051/bioconf/20191202029.
 9. Herbert-Pucheta, J. E., Pino-Villar, C., Rodríguez, González, F., Padilla-Mata, G., Milmo-Brittingham, D., Zepeda-Vallejo, L. G., « "One-shot" analysis of wine parameters in non-Saccharomyces large-scale alcohol reduction processes with one- and two-dimensional nuclear magnetic resonance », DOI : 10.1051/bioconf/20191502016.
 10. Résolution OENO 7-2000 (E-AS1-10-LIMDET), « Estimation de la limite de détection et de quantification d'une méthode d'analyse ».
 11. Norme ISO 3696.