Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts

VOLUME 1

Avant-propos · Annexe A : sections 1, 2 et 3.1.1 à 3.1.4

ORGANISATION INTERNATIONALE
DE LA VIGNE ET DU VIN

www.oiv.int

Recueil

des méthodes internationales d'analyse
des vins et des moûts

VOLUME 1

Avant-propos · Annexe A : sections 1, 2 et 3.1.1 à 3.1.4

ÉDITION 2026

INCLUS

Résolutions adoptées à Chişinău (Moldavie)

23e Assemblée générale · 20 juin 2025

OIV
1, rue Monge · 21000 Dijon · France
Tél. +33 (0)1 44 94 80 80
contact@oiv.int · www.oiv.int

Imprimé à Dijon (France)
Dépôt légal Novembre 2026
ISBN 978-2-85038-137-9

Table des matières

Édition 2026

Les références indiquées entre parenthèses après chaque titre précisent les résolutions concernées et, le cas échéant, les méthodes de référence de l'édition 1990 du Recueil (Recueil OIV éd. 1990) ou du « Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins » de 1978 (A 1, A 2…). Type : type de critères de la méthode (I à IV).

VOLUME 1
Avant-propos · Annexe A : sections 1, 2 et 3.1.1 à 3.1.4

Avant-propos OIV-MA-INT-01

Mode rédactionnel d'une méthode d'analyse OIV OIV-MA-INT-04

ANNEXE A

Méthodes d'analyse des vins et des moûts

Section 1 – Définitions et principes généraux

N°	Méthode	Fiche	Type
1	Remarques générales (ECO 3/2003)	OIV-MA-AS1-02	
2	Classification des méthodes d'analyse (OENO 9/2000)	OIV-MA-AS1-03	
3	Effet matrice pour le dosage des métaux par absorption atomique (OENO 5/2000)	OIV-MA-AS1-04	
4	Dispositions concernant l'emploi des méthodes brevetées qui doivent être adoptées par l'OIV (OIV-OENO 526-2016)	OIV-MA-AS1-05A	

Section 2 – Analyses physiques

N°	Méthode	Fiche	Type
5	Masse volumique et densité relative à 20 °C (A 1 révisée par OIV-OENO 601A-2021)	OIV-MA-AS2-01	I, IV
6	Évaluation de la teneur en sucres des moûts, des moûts concentrés et du sucre de raisin par réfractométrie (Recueil OIV éd. 1990 révisée par OIV/OENO 377/2009)	OIV-MA-AS2-02	I
7	Extrait sec total (gravimétrie) (A 3 révisée par OIV/OENO 377/2009, OIV/OENO 387/2009, OIV-OENO 465-2012)	OIV-MA-AS2-03A	I

N°	Méthode	Fiche	Type
8	Extrait sec total (densimétrie) (OIV/OENO 377/2009, OIV/OENO 387/2009, OIV-OENO 465-2012)	OIV-MA-AS2-03B	IV
9	Cendres (A 6 révisée par OIV/OENO 377/2009)	OIV-MA-AS2-04	I
10	Alcalinité des cendres (A 7 révisée par OIV/OENO 377/2009)	OIV-MA-AS2-05	IV
11	Mesure du potentiel d'oxydoréduction dans les vins (OENO 3/2000)	OIV-MA-AS2-06	IV
12	*Caractéristiques chromatiques (A0 mod.)*	OIV-MA-AS2-07A	*Supprimée*
13	Caractéristiques chromatiques (A0 révisée par OIV/OENO 377/2009, OIV-OENO 667-2022)	OIV-MA-AS2-07B	IV
14	Turbidité des vins (OENO 4/2000 révisée par OIV/OENO 377/2009)	OIV-MA-AS2-08	IV
15	*Détermination du rapport isotopique $^{18}O/^{16}O$ de l'eau des vins (OENO 2/96)*	OIV-MA-AS2-09	*Supprimée*
16	Indice de Folin-Ciocalteu (Recueil OIV éd. 1990 révisée par OIV/OENO 377/2009)	OIV-MA-AS2-10	IV
17	Détermination des caractéristiques chromatiques selon CIELab (OENO 1/2006 ; OIV/OENO 377/2009)	OIV-MA-AS2-11	I
18	Détermination du rapport isotopique $^{18}O/^{16}O$ de l'eau dans le vin et le moût (OIV/OENO 353/2009)	OIV-MA-AS2-12	II

Section 3 – Analyses chimiques

3.1 – COMPOSÉS ORGANIQUES

N°	Méthode	Fiche	Type
3.1.1 – SUCRES			
19	Substances réductrices (A 4 révisée par OIV/OENO 377/2009)	OIV-MA-AS311-01A	IV
20	*Sucres réducteurs (défécation)*	OIV-MA-AS311-01B	*Supprimée*
21	*Sucres réducteurs (titrimétrie)*	OIV-MA-AS311-01C	*Supprimée*
22	Glucose et fructose (méthode enzymatique) (révisée par OIV/OENO 377/2009)	OIV-MA-AS311-02	II
23	Dosage des sucres dans les moûts et les vins par CLHP (OENO 23/2003 ; OIV/OENO 377/2009 ; OIV-OENO 552-2016)	OIV-MA-AS311-03	II

N°	Méthode	Fiche	Type
24	Stabilisation des moûts en vue de la recherche de l'addition de saccharose (A 5)	OIV-MA-AS311-04	
25	Détermination de la répartition du deutérium dans l'éthanol issu de moûts de raisins fermentés, moûts de raisins concentrés et sucre de raisin (moûts de raisins concentrés rectifiés) et vins par résonance magnétique nucléaire (RMN-FINS) (OIV-OENO 426-2011)	OIV-MA-AS311-05	II
26	Dosage des polyols dérivant des sucres et des sucres résiduels dans les vins secs par chromatographie en phase gazeuse (OENO 9/2006 ; OIV/OENO 377/2009)	OIV-MA-AS311-06	IV
27	Détermination conjointe du glucose et du fructose des vins par pH-métrie différentielle (OENO 10/2006 révisée par OIV/OENO 377/2009)	OIV-MA-AS311-07	III
28	Détermination globale du glucose, du fructose et du saccharose des moûts et des vins par pH-métrie différentielle (OENO 11/2006 révisée par OIV/OENO 377/2009)	OIV-MA-AS311-08	IV
29	Détermination des rapports isotopiques $^{13}C/^{12}C$ du glucose, du fructose, du glycérol et de l'éthanol dans les produits d'origine vitivinicole par chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse isotopique (OIV-OENO 479-2017)	OIV-MA-AS311-09	II, III
30	Dosage du D-glucose et du D-fructose dans les vins par méthode enzymatique automatisée (OIV-OENO 600-2018)	OIV-MA-AS311-10	III
3.1.2 – ALCOOLS			
31	Titre alcoométrique volumique (A 2 ; OENO 8/2000 ; OENO 24/2003 ; révisée par OIV/OENO 377/2009 ; révisée par OIV-OENO 601B-2021)	OIV-MA-AS312-01	I, IV
32	Tables de correction (A 2)	OIV-MA-AS312-02	
33	Méthanol (chromatographie en phase gazeuse) (A 41 révisée par OIV/OENO 377/2009, OIV-OENO 480-2014)	OIV-MA-AS312-03A	IV
34	Méthanol (colorimétrie) (A 41 révisée par OIV/OENO 377/2009)	OIV-MA-AS312-03B	IV
35	Glycérol et 2,3-butanediol (A 21 révisée par OIV/OENO 377/2009)	OIV-MA-AS312-04	IV

N°	Méthode	Fiche	Type
36	Glycérol (méthode enzymatique) (Recueil OIV éd. 1990 révisée par OIV/OENO 377/2009)	OIV-MA-AS312-05	IV
37	Détermination par spectrométrie de masse isotopique du rapport $^{13}C/^{12}C$ de l'éthanol du vin (OENO 17/2001)	OIV-MA-AS312-06	II
38	Rapport isotopique $^{13}C/^{12}C$ du glycérol (CG-C-SMRI ou CLHP-SMRI) (OIV/OENO 343/2010)	OIV-MA-AS312-07	IV
3.1.3 – ACIDES			
39	Acidité totale (révisée par OIV-OENO 551-2015)	OIV-MA-AS313-01	I
40	Acidité volatile (révisée par OIV-OENO 549-2015)	OIV-MA-AS313-02	I
41	Acidité fixe (A 11 révisée par OIV/OENO 377/2009)	OIV-MA-AS313-03	I
42	Acides organiques : CLHP (Recueil OIV éd. 1990 révisée par OIV/OENO 377/2009)	OIV-MA-AS313-04	IV
43	Acide tartrique (gravimétrie) (A 12 révisée par OIV/OENO 377/2009)	OIV-MA-AS313-05A	IV
44	*Acide tartrique (colorimétrie) (A 12)*	OIV-MA-AS313-05B	*Supprimée*
45	*Acide lactique – méthode chimique (A 27)*	OIV-MA-AS313-06	*Supprimée*
46	Acide lactique – méthode enzymatique (Recueil OIV éd. 1990 révisée par OIV/OENO 377/2009)	OIV-MA-AS313-07	II
47	Acide citrique – méthode chimique (A 29)	OIV-MA-AS313-08	IV
48	Acide citrique – méthode enzymatique (Recueil OIV éd. 1990 révisée par OIV/OENO 377/2009)	OIV-MA-AS313-09	II
49	Acide malique total : méthode usuelle (A 33 révisée par OIV/OENO 377/2009)	OIV-MA-AS313-10	IV
50	Acide L-malique : méthode enzymatique (Recueil OIV éd. 1990 révisée par OIV/OENO 377/2009)	OIV-MA-AS313-11	II
51	Acide D-malique : méthode enzymatique (OENO 6/98 révisée par OIV/OENO 377/2009)	OIV-MA-AS313-12A	II
52	Acide D-malique : méthode enzymatique pour de faibles teneurs (OENO 16/2002 révisée par OIV/OENO 377/2009)	OIV-MA-AS313-12B	IV
53	Acide L-ascorbique (spectrofluorimétrie) (A 28 révisée par OIV/OENO 377/2009)	OIV-MA-AS313-13A	IV

N°	Méthode	Fiche	Type
54	*Acide L-ascorbique (spectrophotométrie) (A 28 ; OIV/OENO 377/2009)*	OIV-MA-AS313-13B	*Supprimée*
55	Acide sorbique (spectrophotométrie) (A 30 révisée par OIV/OENO 377/2009)	OIV-MA-AS313-14A	IV
56	Acide sorbique (chromatographie en phase gazeuse) (A 30 révisée par OIV/OENO 377/2009)	OIV-MA-AS313-14B	IV
57	Acide sorbique (chromatographie sur couche mince) (A 30 révisée par OIV/OENO 377/2009)	OIV-MA-AS313-14C	IV
58	pH (A 31 révisée par OIV-OENO 438-2011)	OIV-MA-AS313-15	I
59	Acides organiques et anions minéraux : chromatographie ionique (OENO 23/2004 ; OIV/OENO 377/2009)	OIV-MA-AS313-16	IV
60	Acide shikimique (OENO 33/2004 ; OIV/OENO 377/2009)	OIV-MA-AS313-17	II
61	Acide sorbique (électrophorèse capillaire) (OENO 4/2006 ; OIV/OENO 377/2009)	OIV-MA-AS313-18	IV
62	Acides organiques et sulfates (électrophorèse capillaire) (OENO 5/2006, étendue par OIV-OENO 407-2011)	OIV-MA-AS313-19	II, III
63	Acides sorbique, benzoïque, salicylique (OENO 6/2006 ; OIV/OENO 377/2009 ; OIV-OENO 687-2023)	OIV-MA-AS313-20	IV
64	Acide métatartrique (OENO 10/2007 ; OIV/OENO 377/2009)	OIV-MA-AS313-21	IV
65	Dosage de l'acide L-ascorbique et de l'acide D-isoascorbique par CLHP (OENO 11/2008)	OIV-MA-AS313-22	II
66	Détermination de l'origine de l'acide L-tartrique (OENO 12/2008)	OIV-MA-AS313-23	IV
67	Dosage de l'éthanal total dans les vins par chromatographie liquide à haute performance (OIV-OENO 595-2018)	OIV-MA-AS313-24	IV
68	Dosage de l'acide L-lactique dans les vins par méthode enzymatique automatisée (OIV-OENO 598-2018)	OIV-MA-AS313-25	IV
69	Dosage de l'acide L-malique dans les vins par méthode enzymatique automatisée (OIV-OENO 599-2018)	OIV-MA-AS313-26	III
70	Dosage de l'acide acétique dans les vins par méthode enzymatique automatisée (OIV-OENO 621-2019)	OIV-MA-AS313-27	II

N°	Méthode	Fiche	Type
71	Dosage de l'acide D-gluconique dans les vins et les moûts par méthode enzymatique automatisée (OIV-OENO 622-2019)	OIV-MA-AS313-28	II
3.1.4 – GAZ			
72	Dioxyde de carbone (A 39 modifiée par OENO 21/2003 et complétée par OENO 3/2006 révisée par OIV/OENO 377/2009)	OIV-MA-AS314-01	II
73	Mesure de la surpression des vins mousseux (OENO 21/2003 ; OIV/OENO 377/2009)	OIV-MA-AS314-02	I
74	Détermination du rapport isotopique $^{13}C/^{12}C$ du CO_2 des vins mousseux (OENO 7/2005 ; OIV/OENO 377/2009 ; OIV-OENO 512-2014)	OIV-MA-AS314-03	II
75	Dioxyde de carbone (méthode manométrique) (OENO 2/2006)	OIV-MA-AS314-04	II

VOLUME 2
Annexe A : sections 3.1.5 à 5 · Annexes B à G

ANNEXE A (suite)

Méthodes d'analyse des vins et des moûts

Section 3 – Analyses chimiques (suite)

3.1 – COMPOSÉS ORGANIQUES (SUITE)

N°	Méthode	Fiche	Type
3.1.5 – AUTRES COMPOSÉS ORGANIQUES			
76	Éthanal (A 37 révisée par OIV/OENO 377/2009)	OIV-MA-AS315-01	IV
77	Acétate d'éthyle (chromatographie en phase gazeuse) (Recueil OIV éd. 1990 révisée par OIV/OENO 377/2009)	OIV-MA-AS315-02A	IV
78	Acétate d'éthyle (titrimétrie) (révisée par OIV/OENO 377/2009)	OIV-MA-AS315-02B	IV
79	Diglucoside du malvidol (A 18 révisée par OIV/OENO 377/2009)	OIV-MA-AS315-03	IV
80	Carbamate d'éthyle (OENO 8/98 révisée par OIV/OENO 377/2009)	OIV-MA-AS315-04	II
81	Hydroxyméthylfurfural (colorimétrie) (A 19 révisée par OIV/OENO 377/2009)	OIV-MA-AS315-05A	IV
82	Hydroxyméthylfurfural (CLHP) (A 19 révisée par OIV/OENO 377/2009)	OIV-MA-AS315-05B	IV
83	Dérivés cyanés (OENO 4/94 révisée par OIV/OENO 377/2009)	OIV-MA-AS315-06	II
84	Édulcorants de synthèse (CCM : saccharine, cyclamate, dulcine et P-4000) (A 36 révisée par OIV/OENO 377/2009)	OIV-MA-AS315-07A	IV
85	Édulcorants de synthèse (CCM : saccharine, cyclamate et dulcine) (A 36 révisée par OIV/OENO 377/2009)	OIV-MA-AS315-07B	IV
86	Colorants artificiels (A 43 révisée par OIV/OENO 377/2009)	OIV-MA-AS315-08	IV
87	Diéthylène glycol (Recueil OIV éd. 1990 révisée par OIV/OENO 377/2009)	OIV-MA-AS315-09	IV
88	Ochratoxine A (OENO 16/2001 révisée par OIV-OENO 349-2011)	OIV-MA-AS315-10	II
89	Dosage par CLHP de neuf anthocyanes principales dans les vins rouges et rosés (OENO 22/2003 ; OENO 12/2007 ; OIV/OENO 377/2009)	OIV-MA-AS315-11	II

N°	Méthode	Fiche	Type
90	Protéines végétales (OENO 24/2004 ; OIV/OENO 377/2009)	OIV-MA-AS315-12	IV
91	*Polychlorophénols et polychloroanisoles (OENO 8/2006)*	OIV-MA-AS315-13	*Supprimée*
92	Dosage du lysozyme par CLHP (OENO 8/2007 ; OIV/OENO 377/2009)	OIV-MA-AS315-14	IV
93	Dosage du 3-méthoxypropane-1,2-diol et des diglycérols cycliques (OENO 11/2007 ; OIV/OENO 377/2009)	OIV-MA-AS315-15	II
94	Dosage du 2,4,6-trichloroanisole relargable dans le vin (OIV/OENO 296/2009, OIV-OENO 623-2018)	OIV-MA-AS315-16	IV
95	Recherche et dosage des polychlorophénols et polychloroanisoles dans les vins, les bouchons, le bois et les bentonites utilisés comme pièges atmosphériques (OIV/OENO 374/2009)	OIV-MA-AS315-17	IV
96	Analyse des amines biogènes des moûts et des vins par CLHP (OIV/OENO 346/2009)	OIV-MA-AS315-18	II
97	Dosage du glutathion (OIV/OENO 345/2009)	OIV-MA-AS315-19	IV
98	Dosage des composés α-dicarbonylés du vin par CLHP après dérivation (OIV/OENO 386A/2010)	OIV-MA-AS315-20	IV
99	Dosage des composés α-dicarbonylés du vin par CPG après dérivation (OIV/OENO 386B/2010)	OIV-MA-AS315-21	IV
100	Dosage de la carboxyméthylcellulose dans les vins blancs (OIV/OENO 404/2010)	OIV-MA-AS315-22	IV
101	Quantification des résidus potentiellement allergènes de protéines de collage dans le vin (OIV/OENO 427/2010 ; OIV-COMEX 502-2012)	OIV-MA-AS315-23	IV
102	Dosage du lysozyme dans le vin par électrophorèse capillaire haute performance (OIV-OENO 385-2012)	OIV-MA-AS315-24	IV
103	Dosage du lysozyme dans le vin par chromatographie liquide à haute performance (OIV-OENO 458-2014)	OIV-MA-AS315-25	IV
104	Méthode de dosage des amines biogènes dans le vin par CLHP avec détection à barrette de diodes (OIV-OENO 457-2014)	OIV-MA-AS315-26	IV

N°	Méthode	Fiche	Type
105	Analyse des composés volatils des vins par chromatographie en phase gazeuse (OIV-OENO 553-2016, OIV-OENO 606-2018)	OIV-MA-AS315-27	IV
106	Méthode de dosage du 1,2-propanediol et du 2,3-butanediol (OIV-OENO 598-2017)	OIV-MA-AS315-28	IV
107	Détection des chitinases et des protéines de type thaumatine dans les vins blancs (OIV-OENO 529-2017)	OIV-MA-AS315-29	IV
108	Dosage des alkylphénols dans les vins par CPG-SM ou CPG-SM/SM (OIV-OENO 620-2020)	OIV-MA-AS315-30	IV
109	Détermination qualitative des édulcorants dans le vin par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (CL-SM) (OIV-OENO 636-2021)	OIV-MA-AS315-31	IV
110	Dosage des édulcorants dans le vin blanc et les boissons à base de vin blanc par CLHP couplée à un détecteur à barrette de diodes et à un détecteur d'aérosols chargés (OIV-OENO 665-2022)	OIV-MA-AS315-32	
3.1.6 – COMPOSÉS ORGANIQUES MULTIPLES			
111	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 spectrométrie de résonance magnétique nucléaire quantitative (RMN ^{1}H) (OIV-OENO 618-2020)	OIV-MA-AS316-01	IV

3.2 – COMPOSÉS NON ORGANIQUES

N°	Méthode	Fiche	Type
3.2.1 – ANIONS			
112	Bromure total (A 23 révisée par OIV/OENO 377/2009)	OIV-MA-AS321-01	IV
113	Chlorures (A 15 révisée par OIV/OENO 377/2009)	OIV-MA-AS321-02	II
114	Fluorures (A 22 ; OENO 22/2004 ; OIV/OENO 377/2009)	OIV-MA-AS321-03	II
115	Phosphore total (A 16 révisée par OIV/OENO 377/2009)	OIV-MA-AS321-04	IV
116	Sulfates (gravimétrie) (A 14 révisée par OIV/OENO 377/2009)	OIV-MA-AS321-05A	II
117	*Sulfates (titrimétrie) (A 14)*	OIV-MA-AS321-05B	*Supprimée*

N°	Méthode	Fiche	Type
3.2.2 – CATIONS			
118	Ammonium (A 20 révisée par OIV/OENO 377/2009)	OIV-MA-AS322-01	IV
119	Potassium (SAA) (A 8 révisée par OIV/OENO 377/2009)	OIV-MA-AS322-02A	II
120	Potassium (photométrie de flamme) (A 8 révisée par OIV/OENO 377/2009)	OIV-MA-AS322-02B	III
121	*Potassium (gravimétrie) (A 8 révisée par OIV/OENO 377/2009)*	OIV-MA-AS322-02C	*Supprimée*
122	Sodium (SAA) (A 25 révisée par OIV/OENO 377/2009)	OIV-MA-AS322-03A	II
123	Sodium (photométrie de flamme) (A 25 révisée par OIV/OENO 377/2009)	OIV-MA-AS322-03B	III
124	Calcium (A 26 révisée par OIV/OENO 377/2009)	OIV-MA-AS322-04	II
125	Fer (SAA) (A 9 révisée par OIV/OENO 377/2009)	OIV-MA-AS322-05A	IV
126	Fer (colorimétrie) (A 9 révisée par OIV/OENO 377/2009)	OIV-MA-AS322-05B	IV
127	Cuivre (Recueil OIV éd. 1990 révisée par OIV/OENO 377/2009)	OIV-MA-AS322-06	IV
128	Magnésium (A 26)	OIV-MA-AS322-07	II
129	Zinc (A 45)	OIV-MA-AS322-08	IV
130	Argent (Recueil OIV éd. 1990 révisée par OIV/OENO 377/2009)	OIV-MA-AS322-09	IV
131	Cadmium (Recueil OIV éd. 1990 révisée par OIV/OENO 377/2009)	OIV-MA-AS322-10	IV
132	*Plomb (OENO 3/94)*	OIV-MA-AS322-11	*Supprimée*
133	Plomb (critères pour les méthodes) (OENO 7/2006 ; OIV/OENO 377/2009)	OIV-MA-AS322-12	II
134	Dosage des éléments minéraux des vins par ICP-AES (spectrométrie d'émission atomique à plasma à couplage inductif) (OIV-OENO 478-2013)	OIV-MA-AS322-13	III
3.2.3 – AUTRES COMPOSÉS NON ORGANIQUES			
135	Arsenic (SAA) (OENO 14/2002 révisée par OIV/OENO 377/2009)	OIV-MA-AS323-01A	IV
136	Arsenic (SAA) (A 34 révisée par OIV/OENO 377/2009)	OIV-MA-AS323-01B	IV
137	*Arsenic (colorimétrie) (A 34 ; OIV/OENO 377/2009)*	OIV-MA-AS323-01C	*Supprimée*

N°	Méthode	Fiche	Type
138	Azote total – méthode Dumas (OENO 13/2002 révisée par OIV/OENO 377/2009)	OIV-MA-AS323-02A	II
139	Azote total (A 40 révisée par OIV/OENO 377/2009, OIV-OENO 683-2022)	OIV-MA-AS323-02B	IV
140	Bore (A 44 révisée par OIV/OENO 377/2009)	OIV-MA-AS323-03	IV
141	Dioxyde de soufre libre (titrimétrie) (A 17 révisée par OIV/OENO 377/2009, OIV-OENO 591A-2018 et OIV-OENO 661-2021)	OIV-MA-AS323-04A1	IV
142	Dioxyde de soufre total (titrimétrie) (A 17 révisée par OIV/OENO 377/2009, OIV-OENO 591A-2018 et OIV-OENO 661-2021)	OIV-MA-AS323-04A2	II
143	Dioxyde de soufre (iodométrie) (A 17 révisée par OIV/OENO 377/2009)	OIV-MA-AS323-04B	IV
144	Dioxyde de soufre (méthode moléculaire) (A 17 révisée par OIV/OENO 377/2009)	OIV-MA-AS323-04C	IV
145	Mercure – fluorescence atomique (OENO 15/2002 révisée par OIV/OENO 377/2009)	OIV-MA-AS323-06	IV
146	Analyse multi-éléments dans le vin par SM-PCI (OIV-OENO 666-2023)	OIV-MA-AS323-07	II
147	Dosage des résidus de pesticides dans le vin après extraction par la méthode QuE-ChERS (OIV-OENO 436-2012)	OIV-MA-AS323-08	II
148	Dosage de la natamycine dans les vins (OIV-OENO 461-2012)	OIV-MA-AS323-09	IV
149	Méthode de dosage des phtalates par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse dans les vins (OIV-OENO 477-2013 révisée par OIV-OENO 596-2019)	OIV-MA-AS323-10	II, IV
150	Méthode de dosage du polyaspartate de potassium dans le vin par CLHP couplée à un détecteur à fluorescence (OIV-OENO 619-2019)	OIV-MA-AS323-11	IV
151	Analyse simultanée du fer, du cuivre, du potassium, du calcium et du manganèse dans les vins par MP-AES (spectrométrie d'émission atomique à plasma induit par micro-ondes) (OIV-OENO 637-2021)	OIV-MA-AS323-12	IV

Section 4 – Analyses microbiologiques

N°	Méthode	Fiche	Type

N°	Méthode	Fiche	Type
152	Analyse microbiologique (OIV-OENO 206-2010)	OIV-MA-AS4-01	IV
153	Recherche des conservateurs et des inhibiteurs de fermentation (test de fermentescibilité) (A 35 ; OENO 6/2006 révisée par OIV/OENO 377/2009)	OIV-MA-AS4-02A	IV
154	Recherche des conservateurs et des inhibiteurs de fermentation (recherche des acides sorbique, benzoïque, p-chlorobenzoïque, salicylique et p-hydroxybenzoïque et ses esters) (A 35 ; OENO 6/2006 révisée par OIV/OENO 377/2009)	OIV-MA-AS4-02B	IV
155	Recherche des conservateurs et des inhibiteurs de fermentation (recherche des dérivés monohalogénés de l'acide acétique) (A 35 ; OENO 6/2006 révisée par OIV/OENO 377/2009)	OIV-MA-AS4-02C	IV
156	Recherche des conservateurs et des inhibiteurs de fermentation (recherche du pyrocarbonate d'éthyle) (A 35 ; OENO 6/2006 révisée par OIV/OENO 377/2009)	OIV-MA-AS4-02D	IV
157	Recherche des conservateurs et des inhibiteurs de fermentation (recherche de l'acide déhydracétique) (A 35 ; OENO 6/2006 révisée par OIV/OENO 377/2009)	OIV-MA-AS4-02E	IV
158	Recherche des conservateurs et des inhibiteurs de fermentation (azide de sodium par CLHP) (A 35 ; OENO 6/2006 révisée par OIV/OENO 377/2009)	OIV-MA-AS4-02F	IV
159	Dénombrement des levures de l'espèce Brettanomyces bruxellensis par qPCR (OIV-OENO 414-2011)	OIV-MA-AS4-03	IV
160	Comptage des cellules de levures par cytométrie en flux dans les moûts de raisin et les vins (OIV-OENO 713A-2025)	OIV-MA-AS4-04	IV

Section 5 – Autres analyses

N°	Méthode	Fiche	Type
161	Différenciation des moûts mutés à l'alcool et des vins de liqueur (révisée par OIV/OENO 377/2009)	OIV-MA-AS5-01	

ANNEXE B

Certificats d'analyse

N°	Méthode	Fiche	Type
162	Paramètres analytiques communément utilisés pour les vins et les vins mousseux (AG 2/88-OEN ; OIV-OENO 712A-2024)	OIV-MA-B1-01	

ANNEXE C

Limites maximales acceptables de différentes substances

N°	Méthode	Fiche	Type
163	Limites maximales acceptables de différentes substances contenues dans le vin	OIV-MA-C1-01	

ANNEXE D

Avis

N°	Méthode	Fiche	Type
164	Acide gluconique (OENO 4/91)	OIV-MA-D1-01	
165	Caractérisation des vins issus de surpressurage (OENO 5/91)	OIV-MA-D1-02	
166	Teneur en ions sodium et chlorures des vins (OENO 6/91)	OIV-MA-D1-03	
167	Extrait sec total (extrait sec total, extrait sec total sans sucres, extraits résiduels) (OIV-CST 668-2022)	OIV-MA-D1-04	

ANNEXE E

Assurance qualité des laboratoires

N°	Méthode	Fiche	Type
168	Principe de validation des méthodes usuelles par rapport aux méthodes de référence (OENO 7/98)	OIV-MA-AS1-05	
169	Étude collaborative	OIV-MA-AS1-07	
170	Fiabilité des méthodes (OENO 5/99)	OIV-MA-AS1-08	
171	Protocole de conception, de conduite et d'interprétation des études collaboratives (OENO 6/2000)	OIV-MA-AS1-09	

N°	Méthode	Fiche	Type
172	Estimation des limites de détection et de quantification d'une méthode d'analyse (OENO 7/2000)	OIV-MA-AS1-10	
173	Lignes directrices harmonisées pour le contrôle interne de la qualité dans les laboratoires d'analyse chimique (OENO 19/2002)	OIV-MA-AS1-11	
174	Guide pratique pour la validation (OENO 10/2005)	OIV-MA-AS1-12	
175	Lignes directrices harmonisées pour la validation intralaboratoire (OENO 8/2005)	OIV-MA-AS1-13	
176	Recommandations sur l'incertitude de mesure (OENO 9/2005)	OIV-MA-AS1-14	
177	Recommandations relatives à la correction du taux de récupération (OIV/OENO 392/2009)	OIV-MA-AS1-15	

ANNEXE F

Méthodes spécifiques d'analyse du sucre de raisin (moûts concentrés rectifiés)

N°	Méthode	Fiche	Type
178	Conductivité (OIV-OENO 419A-2011)	OIV-MA-F1-01	IV
179	Hydroxyméthylfurfural (HMF) par chromatographie liquide à haute performance (OIV-OENO 419A-2011)	OIV-MA-F1-02	IV
180	Détermination du titre alcoométrique volumique acquis des moûts concentrés et du sucre de raisin (moûts concentrés rectifiés) (OIV-OENO 419A-2011)	OIV-MA-F1-03	IV
181	Saccharose par chromatographie liquide à haute performance (OIV-OENO 419A-2011)	OIV-MA-F1-04	IV
182	Acidité totale (OIV-OENO 419A-2011)	OIV-MA-F1-05	IV
183	pH (OIV-OENO 419A-2011)	OIV-MA-F1-06	IV
184	Dioxyde de soufre (OIV-OENO 419A-2011)	OIV-MA-F1-07	IV
185	Caractéristiques chromatiques (OIV-OENO 419A-2011)	OIV-MA-F1-08	IV
186	Cations totaux (OIV-OENO 419B-2012)	OIV-MA-F1-09	I
187	Métaux lourds par SAAET (OIV-OENO 419B-2012)	OIV-MA-F1-10	IV
188	Métaux lourds par ICP-MS (OIV-OENO 419B-2012)	OIV-MA-F1-11	IV

N°	Méthode	Fiche	Type
189	Dosage du méso-inositol, du scyllo-inositol et du saccharose (OIV-OENO 419C-2012)	OIV-MA-F1-12	II
190	Indice de Folin-Ciocalteu (OIV-OENO 419D-2012)	OIV-MA-F1-13	IV

ANNEXE G

Jus de raisin, jus de raisin reconstitué, jus de raisin concentré et nectar de raisin

N°	Méthode	Fiche	Type
191	Dosage de l'ochratoxine A dans le jus de raisin, le jus de raisin reconstitué, le jus de raisin concentré et le nectar de raisin après passage sur colonne d'immunoaffinité et CLHP avec détection par fluorescence (OIV-OENO 662A-2022)	OIV-MA-G1-01	IV
192	Détermination de l'acidité volatile dans le jus de raisin, le jus de raisin reconstitué, le jus de raisin concentré et le nectar de raisin (OIV-OENO 662C-2022)	OIV-MA-G1-02	IV
193	Détermination du rapport isotopique $^{18}O/^{16}O$ de l'eau dans le jus de raisin (OIV-OENO 662H-2022)	OIV-MA-G1-03	IV
194	Matières solides solubles dans le jus de raisin, le jus de raisin reconstitué, le jus de raisin concentré et le nectar de raisin (OIV-OENO 662F-2023)	OIV-MA-G1-04	I
195	Méthode horizontale pour le dénombrement des coliformes – Méthode par comptage des colonies (OIV-OENO 662M-2023)	OIV-MA-G1-05	
196	Méthode horizontale pour le dénombrement des Escherichia coli bêta-glucuronidase positive (OIV-OENO 662N-2023)	OIV-MA-G1-06	
197	Méthode horizontale pour le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive (OIV-OENO 662O-2023)	OIV-MA-G1-07	
198	Méthode horizontale pour le dénombrement des microorganismes (OIV-OENO 662P-2023)	OIV-MA-G1-08	
199	Dosage des éléments minéraux des jus de raisin, jus de raisin reconstitués, jus de raisin concentrés et nectars de raisin par ICP-AES (OIV-OENO 662K-2024)	OIV-MA-G1-09	IV

N°	Méthode	Fiche	Type
200	Détermination de l'acidité totale dans le jus de raisin, le jus de raisin reconstitué, le jus de raisin concentré et le nectar de raisin par titrage (OIV-OENO 662G-2025)	OIV-MA-G1-10	IV

Avant-propos

Le *Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins* a été publié pour la première fois en 1962. Il a été réédité en 1965, en 1972, en 1978, en 1990 et à nouveau en 2000, intégrant chaque fois les textes complémentaires approuvés par l'Assemblée générale et établis annuellement par la Sous-commission des méthodes d'analyse.

La présente édition du *Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts* comprend tous les textes approuvés par l'Assemblée générale des représentants des gouvernements membres de l'OIV, révisés et mis à jour depuis 2000.

Le Recueil joue un grand rôle pour l'harmonisation des méthodes d'analyse. Beaucoup de pays viticoles ont introduit dans leur propre réglementation ses définitions et ses méthodes.

Par ailleurs, certains accords bilatéraux relatifs au commerce du vin reconnaissent que les méthodes d'analyse publiées par l'OIV, prévalent comme méthodes de référence pour la détermination de la composition analytique du vin dans le cadre des operations de contrôle.

Le règlement CE no 479/2008 prévoit *que les méthodes d'analyse permettant d'établir la composition des produits relevant dudit règlement et les règles permettant d'établir si ces produits ont fait l'objet de traitements en violation des pratiques œnologiques autorisées sont celles qui sont recommandées et publiées par l'OIV dans le Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts de l'OIV.* Dans le règlement CE no 606/2009 pour assurer une meilleure transparence, il a été établi de publier au niveau communautaire (Journal officiel de l'Union européenne, série C) la liste et la description des méthodes d'analyses décrites dans le Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts de l'OIV qui sont applicables pour le contrôle des produits vitivinicoles. De cette façon l'UE reconnaît les méthodes qui font l'objet de ce Recueil, leur confère, un caractère obligatoire dans tous les États-membres et consacre la collaboration étroite qui s'est établie entre l'UE et l'OIV.

Ainsi, le Recueil, par son rôle éminent dans l'harmonisation des méthodes d'analyse contribue à faciliter les échanges internationaux. Avec le *Code International des Pratiques Oenologiques* et le *Codex Oenologique International*, il constitue un ensemble dont l'intérêt scientifique, juridique et pratique est évident.

MODE REDACTIONNEL D'UNE METHODE D'ANALYSE OIV

extrait de la norme ISO 78-2:1999

1. Titre

2. Introduction

facultatif

3. Domaine d'application

Cet article doit indiquer succinctement la méthode d'analyse chimique et notamment les produits auxquels elle s'applique.

4. Définition

5. Principe

Cet article facultatif indique les phases essentielles de la méthode utilisée ainsi que les principes de base.

6. Réactifs et produits

Cet article doit donner la liste ainsi que les caractéristiques essentielles de tous les réactifs et produits utilisés au cours de l'essai et, au besoin, préciser leur degré de pureté.
Doivent être indiqués :
les produits utilisés tels qu 'ils sont commercialisés
Les solutions à concentration définie
solution titrée
solution étalon de référence
solution étalon
solution témoin
note chaque réactif acheté ou préparé doit faire l'objet d'un alinéa numéroté

7. Appareillage

Cet article doit énumérer les noms et les caractéristiques utiles de tous les appareils et équipements qui doivent être utilisés au cours de l 'analyse ou de l'essai.

8. Echantillonnage (Préparation de l'échantillon)

Doivent être indiquées :

les procédures d'échantillonnage
La préparation de l'échantillon pour l'essai

9. Mode opératoire

Chacune des opérations doit être décrite sans ambiguïté et de façon concise.
Cet article doit normalement comporter les paragraphes suivants :
Prise d'essai (ce paragraphe doit donner tous les renseignements nécessaire à la préparation de la prise d'essai à partir de l'échantillon pour essai.
Dosage(s), détermination(s) ou essai(s) (ce paragraphe doit être décrit avec précision pour faciliter la description, la compréhension et l'application du mode opératoire
Etalonnage (si nécessaire).

10. Calculs (Résultats)

Cet article doit indiquer le mode de calcul des résultats. Doivent être précisés les unités, l'équation utilisée, la signification des symboles, le nombre de décimales à donner dans les résultats.

11. Fidélité (si validation interlaboratoire)

Les valeurs de fidélité doivent indiquer notamment :
Le nombre de laboratoire
Les valeurs moyenne de la concentration
L'écart type de répétabilité
L'écart type de reproductibilité
La référence du document contenant les résultats publiés des essais interlaboratoires.

12. Annexes

Annexe relatifs à la fidélité
Annexe relatives aux données statistiques et autres données obtenues à partir des résultats des essais interlaboratoires.

13. Bibliographie

Annexe relative à la fidélité

Cette annexe doit indiquer notamment
- les indications de la répétabilité
- les indications de la reproductibilité

Annexe relative aux données statistiques et autres données obtenues à partir des résultats des essais interlaboratoires.

Les données statistiques et autres données dérivées des résultats des essais interlaboratoires peuvent figurer dans une annexe informative

Exemple de tableau donnant des résultats statistiques

Identification de l'échantillon	A	B	C
Nombre de laboratoires participant			
Nombre de résultats d'essai acceptés			
Valeur moyenne (g/100 g d'échantillon)			
Valeur vraie ou acceptée (g/100 g)			
Écart-type de répétabilité (s_r)			
Coefficient de variation de répétabilité			
Limite de répétabilité (r) ($2{,}8 \times s_r$)			
Écart-type de reproductibilité (s_R)			
Coefficient de variation de reproductibilité			
Limite de reproductibilité (R) ($2{,}8 \times s_R$)			

Il peut ne pas être jugé nécessaire de faire figurer toutes les données présentées dans le tableau, il est toutefois recommandé de donner au moins les données suivantes :

- Le nombre de laboratoire
- Les valeurs moyenne de la concentration en élément à analyser
- L'écart type de répétabilité
- L'écart type de reproductibilité
- La référence du document contenant les résultats publiés des essais interlaboratoires

Annexe A

Méthodes d'Analyse des vins et des moûts

Remarques générales

(ECO 3/2003)

1/ L'analyse physique et chimique doit être faite sur du vin ou du moût limpide. Si le vin ou le moût est trouble, il sera préalablement filtré sur papier en entonnoir couvert ou centrifugé en récipient fermé. Mention de cette opération devra figurer sur le certificat d'analyse.

2/ La référence de la méthode employée pour chaque détermination doit figurer sur le certificat d'analyse.

3/ Les unités de mesure des différentes grandeurs (volume, masse, concentration, température, pression, etc.) sont conformes aux recommandations de l'Union internationale de chimie pure et appliquée (I.U.P.A.C.).

4/ En ce qui concerne les réactifs et solutions titrées utilisées, sauf prescription contraire dans le texte, les produits chimiques employés sont de qualité "pour analyse" et l'eau est de l'eau distillée ou de pureté équivalente.

5/ Les méthodes enzymatiques ainsi que la détermination de plusieurs paramètres reposent sur des mesures absolues d'absorbance, ce qui implique l'étalonnage des spectrophotomètres en longueurs d'onde et en absorbances au moyen de solutions de référence commercialisées.

6/ Les références bibliographiques essentielles sont données. Les références relatives aux documents de travail de la Sous-Commission sont notées *F.V. O.I.V.* (feuillets verts) suivies de l'année de publication et du numéro du document.

7/ Conformément à la Résolution ECO 3/2003, l'Assemblée Générale a décidé :

- de remplacer dans les codes, normes et textes apparentés de l'O.I.V. les références aux teneurs en « sucres réducteurs », « sucres résiduels » ou « sucres invertis » par la référence à la teneur « glucose plus fructose » et de faire référence à la méthode d'analyse décrite au Recueil International des Méthodes d'Analyse » ;

- de compléter dans la Partie I « Définition » du Code International des Pratiques Œnologiques (édition 2001), le texte du point 3.2 « Définitions relatives à la teneur en sucre » par la note de bas de page suivante : « la

teneur en sucre est déterminée par la méthode d'analyse « glucose + fructose » décrite au Recueil International des Méthodes d'Analyse » ;

- de compléter dans la Partie 3 « Indications facultatives » de la Norme Internationale pour l'étiquetage des vins , le texte du point 3.1.6. « Type de vin » par la note suivante : « la teneur en sucre est déterminée par la méthode d'analyse « glucose + fructose » décrite au Recueil International des Méthodes d'Analyse » ;

et a recoomandé aux Etats membres de l'OIV d'adapter leurs références dans le même sens et que la détermination « glucose + fructose » remplace la détermination des « sucres réducteurs » pour éviter des distorsions dans la classification des types de vins en fonction de leur teneur en sucre.

Classification des méthodes d'analyse

(Résolution OENO 9/2000)

TYPE I* (METHODE DE REFERENCE CRITERE) : Méthode qui définit une valeur qu'il n'est possible d'établir qu'aux termes de la méthode *per se* et qui est, par définition, la seule utilisée pour établir la valeur acceptée du paramètre mesuré (Titre alcoométrique volumique, acidité totale, acidité volatile).

TYPE II* (METHODE DE REFERENCE) : une méthode de type II est celle que l'on désigne comme Méthode de Référence, lorsque les méthodes du type I ne sont pas applicables. On devrait la choisir parmi les méthodes de type III (définies ci-après). On devrait recommander son emploi dans les cas de litige et aux fins d'étalonnage (Potassium, acide citrique).

TYPE III* (METHODES DE REMPLACEMENT APPROUVEES) : les méthodes de type III répondent à tous les critères définis par la Sous-Commission des Méthodes d'Analyse aux fins de contrôle, d'inspection ou de réglementation (Glucose et fructose par voie enzymatique).

TYPE IV (METHODE PROVISOIRE) : une méthode de type IV est une méthode traditionnelle ou encore une méthode d'application récente, mais pour laquelle on n'a pas encore déterminé les critères exigés par la Sous-Commission des Méthodes d'Analyse (Recherche des colorants de synthèse, mesure du potentiel d'oxydoréduction).

* Méthodes qui nécessitent la validation formelle selon les procédures en vigueur à la Sous-Commission des Méthodes d'Analyse

Effet matrice pour le dosage des métaux par absorption atomique

(Résolution OENO 5/2000)

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 internationales d'analyse et d'appréciation des vins,

CONSIDERANT que les méthodes décrites au Recueil international des méthodes d'analyse des vins et des moûts avec utilisation des solutions de référence concernent les vins secs,

ATTIRE l'attention des utilisateurs sur le fait que des déviations peuvent être observées dans d'autres cas : présence de sucres ou de dérivés des sucres,

DECIDE qu'il sera alors nécessaire de procéder à la mesure en utilisant la méthode des ajouts dosés. Au minimum, trois aliquotes de l'échantillon contenant des ajouts différents devront être mis en oeuvre.

DECIDE de compléter les méthodes d'analyse des métaux (fer, plomb, zinc, argent, cadmium) et de l'arsenic par la description de la technique des ajouts dosés, lorsque l'effet matrice la rend nécessaire.

DISPOSITIONS CONCERNANT L'EMPLOI DES MÉTHODES BREVETÉES QUI DOIVENT ETRE ADOPTEES PAR L'OIV

(Résolution OIV-OENO 526-2016).

Définition d'une méthode d'analyse brevetée

Dans le contexte des activités de l'OIV, l'expression « méthode d'analyse brevetée » s'applique aux méthodes protégées au titre de la propriété intellectuelle, et sur lesquelles la divulgation d'informations est ainsi restreinte, et/ou dont le propriétaire des droits limite l'utilisation ou la diffusion de la méthode ou du matériel nécessaire pour sa mise en œuvre de sorte qu'ils ne sont pas disponibles par d'autres sources. Elle ne s'applique pas aux méthodes protégées uniquement par le droit d'auteur.

Exigences

L'OIV demande à ce que les promoteurs de ces méthodes fournissent toutes les données pertinentes en vue de leur évaluation par la SCMA (Sous-commission « Méthodes d'analyse ») ou un autre groupe d'experts. Suite à cette évaluation, la SCMA ou un autre groupe d'experts peuvent décider de soumettre une méthode d'analyse brevetée, ou basée sur des éléments brevetés, à l'Assemblée générale de l'OIV en vue de son approbation, conformément aux procédures suivantes

a) une méthode brevetée ne doit pas être approuvée lorsqu'une méthode d'analyse non brevetée satisfaisante ayant des caractéristiques de performance semblables ou supérieures a été ou pourrait être adoptée. Ceci devrait assurer qu'aucune mesure prise ne pourrait donner à penser que la méthode brevetée est approuvée par l'OIV au détriment d'autres méthodes potentielles ; la préférence doit être donnée, autant que possible, à l'adoption de critères de méthode appropriés plutôt qu'à l'approbation d'une méthode d'analyse brevetée spécifique ;
b) tout en respectant la nécessité de préserver une protection raisonnable de la propriété intellectuelle, des informations suffisantes doivent être disponibles afin de permettre aux analystes de s'appuyer sur une méthode fiable, et à la SCMA ou autre groupe d'experts d'évaluer la performance de la méthode. Dans certains cas particuliers, il peut s'agir de données plus approfondies, par exemple des détails sur le principe de fonctionnement, selon l'appréciation de la SCMA ou autre groupe d'experts ;
c) préférence doit être donnée à l'approbation de méthodes d'analyse où les réactifs et/ou les appareils sont décrits de manière suffisamment complète dans la méthode pour que les laboratoires ou autres fabricants puissent les produire eux-mêmes ; en plus, comme alternative, des détails permettant de

se les procurer eux-mêmes

d) les critères de performance requis pour les méthodes brevetées doivent être les mêmes que pour les méthodes non brevetées. Les critères de performance doivent être ceux qui sont stipulés plus haut. Le cas échéant, des informations sur l'effet de la variabilité des réactifs utilisés devraient être fournies ;

e) après approbation, tout changement susceptible d'influer sur les caractéristiques de performance doit être signalé à la SCMA ou autre groupe d'experts pour examen ;

f) une méthode, dont des parties sont couvertes par un brevet, doit être entièrement validée par un travail en collaboration selon les normes OIV figurant à l'annexe A du Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts. Les résultats de ces études doivent être mis à la disposition de la SCMA ou autre groupe d'experts ;

g) le fabricant ou la personne qui soumet pour évaluation une méthode brevetée doit prouver de manière satisfaisante à la SCMA ou autre groupe d'experts que les principes et les caractéristiques fondamentaux pour l'exécution de la méthode seront accessibles à toutes les parties prenantes ;

h) la SCMA ou autre groupe d'experts peut refuser d'évaluer une méthode brevetée si les restrictions imposées au titre de la propriété intellectuelle limitent de manière injustifiée les recherches visant à déterminer les propriétés, la portée et la validité de la méthode ou à en améliorer la technologie ;

i) lorsque de nouvelles méthodes non brevetées appropriées sont disponibles et approuvées, la situation des normes brevetées approuvées antérieurement doit être réexaminée et révisée s'il le faut.

Méthode OIV-MA-AS2-01 Méthodes Type II et IV

Masse volumique et densité relative à 20°C

(A1, révision parr OIV/OENO 377/2009
révision par OIV-OENO 637/2021)

1. Domaine d'application

Cette résolution est applicable pour déterminer la masse volumique et la densité relative à 20 °C des vins et des moûts soit par :

A. pycnométrie	méthode de type I,
B. densimétrie électronique utilisant un résonateur de flexion	méthode de type I,
C. densimétrie utilisant la balance hydrostatique	méthode de type I,
D. Aréométrie	méthode de type IV.

2. Définition

La masse volumique est le quotient de la masse d'un certain volume de vin ou de moût à 20 °C par ce volume. Elle s'exprime en grammes par centimètre cube (g/cm^3) et son symbole est $\rho_{20\ °C}$.

La densité relative est le ratio de la masse volumique d'une substance sur la masse volumique d'un matériau donné en référence. Pour l'analyse d'un vin ou d'un moût, elle est typiquement exprimée comme le ratio de la masse volumique du vin ou du moût à 20°C sur la masse volumique de l'eau à 20°C. Son symbole est : $d_{20°C}^{20°C}$

Remarque : il est possible d'obtenir la densité relative à partir de la masse volumique ρ_{20} à 20 °C:

ρ_{20} = 0,998203 x $d_{20°C}^{20°C}$ ou $d_{20°C}^{20°C}$ = ρ_{20} /0,998203 (où 0,998203 est la masse volumique de l'eau à 20 °C en g/ cm^3)

3. Principe des méthodes

Le principe de chaque méthode est détaillé dans les parties suivantes :

Méthode A : pycnométrie

Méthode B : densimétrie électronique utilisant un résonateur de flexion

Méthode C : densimétrie utilisant la balance hydrostatique

Méthode D : aréométrie

Remarque : Pour les déterminations très précises, la masse volumique doit être corrigée de l'action du dioxyde de soufre.

ρ_{20} (g/ cm^3) = ρ'_{20} - 0.0006 x S
ρ_{20} (g/ cm^3) = masse volumique corrigée
ρ'_{20} (g/ cm^3) = masse volumique observée
S (g/L) = dioxyde de soufre total

4. Traitement préalable de l'échantillon

Si le vin ou le moût contient des quantités notables de dioxyde de carbone, en chasser la plus grande quantité par exemple en agitant de 250 ml d'échantillon dans un flacon de 1000 ml, ou en filtrant sous pression réduite sur 2 g de coton placé dans une allonge, ou par toute autre méthode.

Méthode A Masse volumique à 20 °C et densité relative à 20 °C par pycnométrie (Méthode de type I)

A.1 *Principe*

Pour une température déterminée, la masse volumique du vin ou du moût est mesurée à l'aide d'un pycnomètre en verre. Celui-ci comporte une fiole de capacité connue sur laquelle vient s'adapter un bouchon rôdé creux muni d'un tube capillaire. Lorsque l'on ferme la fiole le trop-plein monte dans le capillaire. Les volumes de la fiole et du capillaire étant connus, on détermine la masse volumique par pesées à l'aide de balances de précision avant et après remplissage du pycnomètre.

A.2 *Réactifs et produits*

A.2.1 Eau pour usage analytique (norme ISO 3696) qualité II ou pureté équivalente.

A.2.2 Solution de chlorure de sodium (2 % m/v).

Pour préparer 1 litre, peser 20 g de chlorure de sodium et dissoudre au volume avec de l'eau.

A.3 *Appareillage et matériel*

Matériel courant de laboratoire, et notamment :

A.3.1 Pycnomètre, en verre pyrex de 100 ml de capacité environ, avec un thermomètre mobile à rodage émeri gradué par dixième de degré de 10 à 30 °C. Ce thermomètre doit être étalonné (fig. 1).

Tout pycnomètre de caractéristiques équivalentes peut être employé.

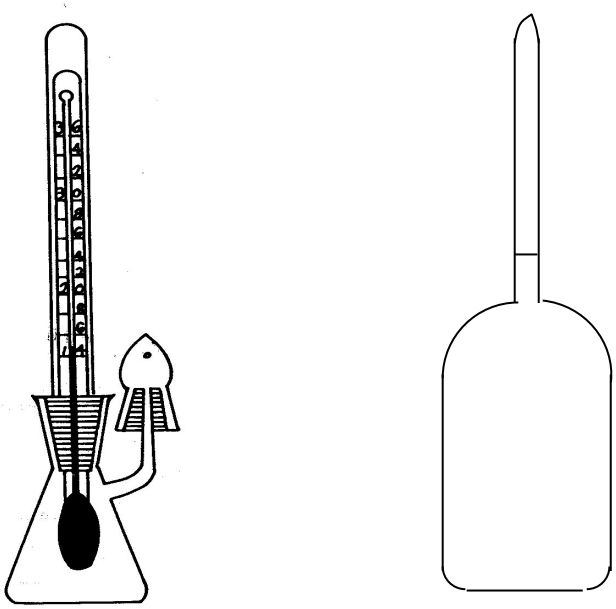


FIGURE 1: Pycnomètre et son flacon tare

Ce pycnomètre comporte un tube latéral de 25 mm de longueur, de 1 mm au plus de diamètre intérieur, terminé par une partie conique rodée. Ce tube latéral peut être coiffé par un «bouchon récepteur» constitué par un tube conique rodé, terminé par une partie effilée. Ce bouchon sert de chambre de dilatation.

Les deux rodages de l'appareil doivent être faits avec un très grand soin.

A.3.2 Flacon tare de même volume extérieur (à moins de 1 ml près) que le pycnomètre et de masse égale à la masse du pycnomètre plein d'un liquide de densité de 1,01 (solution de chlorure de sodium à 2 %, m/v).

A.3.3 Enceinte calorifugée s'adaptant exactement au corps du pycnomètre.

A.3.4 Balance à deux plateaux, sensible au dixième de milligramme

ou

Balance monoplateau, sensible au dixième de milligramme.

A.3.5 Masses étalonnées par un organisme accrédité.

A.4 ***Mode opératoire***

A.4.1 Étalonnage du pycnomètre

L'étalonnage du pycnomètre comporte la détermination des caractéristiques suivantes :

- tare à vide,
- volume à 20 °C,
- masse en eau à 20 °C.

A.4.1.1 Utilisation d'une balance à deux plateaux

Le flacon tare étant placé sur le plateau de gauche de la balance et le pycnomètre propre et sec muni de son « bouchon récepteur » sur le plateau droit, réaliser l'équilibre en plaçant à côté du pycnomètre des masses marquées : soit *p* grammes.

Remplir avec soin le pycnomètre avec de l'eau (A2.1) à la température ambiante, mettre en place le thermomètre ;

Essuyer soigneusement le pycnomètre et le placer dans l'enceinte calorifugée ;

Agiter par retournement jusqu'à ce que la température lue sur le thermomètre soit constante. Affleurer exactement au bord supérieur du tube latéral. Essuyer ce tube latéral, placer le bouchon récepteur ;

Lire la température *t* °C avec soin et la corriger éventuellement de l'inexactitude de l'échelle du thermomètre.

Peser le pycnomètre plein d'eau, soit *p'* la masse en grammes qui réalise l'équilibre.

Calculs :

- Tare du pycnomètre vide :

Tare à vide = $p + m$ où $m\ (g)$ = masse d'air contenue dans le pycnomètre

$$m\ (g) = 0{,}0012\ (p - p')$$

- Volume à 20 °C en ml:

$V_{20\ °C}$ (ml) = $(p + m - p') \times F_t$

F_t = facteur relevé dans la table I pour la température *t* °C

$V_{20\ °C}$ doit être connu à ± 0.001 ml près

- Masse en eau à 20 °C :

$M_{20\ °C}$ (g) = $V_{20\ °C} \times 0{,}998203$

0,998203 (g/cm^3) = masse volumique de l'eau à 20 °C

A.4.1.2 *Utilisation d'une balance monoplateau*

Déterminer :

- la masse du pycnomètre propre et sec : P
- la masse du pycnomètre plein d'eau à *t* °C : P_1 en suivant les indications décrites en A.4.1.1
- la masse du flacon tare T_0

▪ Calculs

Tare du pycnomètre vide :

Tare à vide : P – *m* *m* (g) = masse d'air contenue dans le pycnomètre

m (g) = 0,0012 (P_1 - P)

▪ Volume à 20 °C en ml :

$V_{20\,°C}$ (ml) = [P_1 - (P - *m*)] x F_t

F_t = facteur relevé dans la table I pour la température *t* °C

$V_{20\,°C}$ doit être connu à ± 0.001 ml près.

▪ Masse en eau à 20 °C :

$M_{20\,°C}$ (g) = $V_{20\,°C}$ x 0,998203

0,998203 = masse volumique de l'eau à 20 °C en g/cm^3.

A.4.2 Détermination de la masse volumique :

A.4.2.1 . Utilisation d'une balance à deux plateaux

Peser le pycnomètre plein de l'échantillon préparé pour essais en suivant les indications décrites en A.4.1.1.

Soit *p*" la masse en grammes qui réalise l'équilibre à *t* °C.

En tenant compte du fait que la masse du liquide contenu dans le pycnomètre = *p* + *m* - *p*", la masse volumique apparente à t °C en g/cm^3 est donnée par:

$$\rho_{t°C} = \frac{p + m - p''}{V_{20°C}}$$

Calculer la masse volumique à 20 °C à l'aide d'une des tables de correction dans l'annexe I ci-après, suivant la nature du liquide étudié et du type de pycnomètre utilisé : vin sec et vin désalcoolisé (table II ou V), moût naturel ou concentré (table III ou VI), vin de liqueur (table IV ou VII).

A.4.2.2 Utilisation d'une balance monoplateau

Peser le flacon tare, soit T_1 sa masse en g

Calculer *d*T = T_1 -T_o

Masse du pycnomètre vide au moment de la mesure = P - *m* + *d*T en g

Peser le pycnomètre plein de l'échantillon préparé pour essais en suivant les indications décrites en A.4.1.1.

Soit P_2 sa masse à *t* °C.

Masse du liquide contenu dans le pycnomètre à *t* °C = P_2 - (P - *m* + *d*T) en g

Masse volumique apparente à t °C en g/cm^3

$$\rho_{t°C} = \frac{P_2 - (P - m + dT)}{V_{20°C}}$$

Calculer la masse volumique à 20 °C du liquide étudié : vin sec, moût naturel et concentré, vin de liqueur, comme il est indiqué en A.4.2.1.

A.5 *Expression des résultats*

La masse volumique est exprimée en g/ cm^3 avec 5 décimales.

A.6 *Fidélité*

A.6.1 Répétabilité sur la masse volumique :

- pour les vins secs et sucrés, exceptés les vins de liqueur : r = 0,00010 g/cm^3
- pour les vins de liqueur : r = 0,00018 g/cm^3

A.6.2 Reproductibilité sur la masse volumique :

- pour les vins secs et sucrés, excepté les vins de liqueur : R = 0,00037 g/cm^3
- pour les vins de liqueur : R = 0,00045 g/cm^3

A.7 *Exemple numérique*

A.7.1 Pycnométrie sur balance à deux plateaux

A/ Etalonnage du pycnomètre

1. Pesée du pycnomètre propre et sec :
   Tare = pycnomètre + p
   p = 104,9454 g
2. Pesée du pycnomètre plein d'eau à la température t °C :
   Tare = pycnomètre + eau + p'
   p' = 1,2396 g pour t = 20,5 °C
3. Calcul de la masse d'air contenue dans le pycnomètre :
   m = 0,0012 (p - p')
   m = 0,0012 (104,9454 – 1,2396)
   m = 0,1244
4. Caractéristiques à retenir :
   Tare du pycnomètre vide : $p + m$
   $p + m$ = 104,9454 + 0,1244
   $p + m$ = 105,0698 g

Volume à 20 °C = ($p + m - p'$) x $F_{t\ °C}$

$F_{20,50\ °C}$ = 1,001900

$V_{20\ °C}$ = (105,0698 – 1,2396) x 1,001900

$V_{20\ °C}$ = 104,0275 ml

Masse en eau à 20 °C = $V_{20\,°C}$ x 0,998203

$M_{20\,°C}$ = 103,8405 g

B/ Détermination de la masse volumique à 20 °C et de la densité 20 °C/20 °C d'un vin sec :

p'' = 1,2622 g à 17,80 °C

$$\rho_{17,80\,°C} = \frac{105,0698 - 1,2622}{104,0275}$$

$$\rho_{17,80\,°C} = 0,99788 \text{ g/cm}^3$$

La table II permet de calculer $\rho_{20\,°C}$ à partir de $\rho_{t\,°C}$ à l'aide de la relation :

$$\rho_{20\,°C} = \rho_{t\,°C} \pm \frac{c}{1000}$$

Pour t = 17,80 °C et pour un titre alcoométrique de 11% vol., on trouve c = 0,54 :

$$\rho_{20\,°C} = 0,99788 - \frac{0,54}{1000}$$

$$\rho_{20\,°C} = 0,99734 \text{ g/cm}^3$$

$$d_{20\,°C}^{20\,°C} = \frac{0,99734}{0,998203} = 0,99913$$

A.7.2 Pycnomètre sur balance monoplateau

A/ Établissement des constantes du pycnomètre

1. Pesée du pycnomètre propre et sec :
   P = 67,7913 g
2. Pesée du pycnomètre plein d'eau à la température t °C :
   P_1 = 169,2715 g at 21,65 °C
3. Calcul de la masse d'air contenue dans le pycnomètre :
   m = 0,0012 (P_1 - P)
   m = 0,0012 x 101,4802
   m = 0,1218 g
4. Caractéristique à retenir :
   Tare du pycnomètre vide : P - m
   P - m = 67,7913 – 0,1218
   P - m = 67,6695 g
   Volume à 20 °C = [P_1 - (P - m)] x $F_{t\,°C}$
   $F_{21,65\,°C}$ = 1,002140
   $V_{20\,°C}$ = (169,2715 – 67,6695) x 1,002140
   $V_{20\,°C}$ = 101,8194 ml
   Masse en eau à 20 °C = $V_{20\,°C}$ x 0,998203
   $M_{20\,°C}$ = 101,6364 g
   Masse du flacon tare : T_0

$T_0 = 171{,}9160$ g

B/ Détermination de la masse volumique à 20 °C et de la densité 20 °C/20 °C d'un vin sec :

$$T_1 = 171{,}9178$$
$$dT = 171{,}9178 - 171{,}9160 = +0{,}0018 \text{ g}$$
$$P - m + dT = 67{,}6695 + 0{,}0018 = 67{,}6713 \text{ g}$$
$$P_2 = 169{,}2799 \text{ à } 18\ ^\circ\text{C}$$
$$\rho_{18°C} = \frac{169{,}2799 - 67{,}6713}{101{,}8194}$$
$$\rho_{18\,°C} = 0{,}99793 \text{ g/cm}^3$$

La Table II permet de calculer $\rho_{20\,°C}$ à partir de $\rho_{t\,°C}$ à l'aide de la relation :

$$\rho_{20°C} = \rho_{t\,°C} \pm \frac{c}{1000}$$

Pour t = 18 °C et pour un titre alcoométrique de 11% vol., on trouve c = 0,49 :

$$\rho_{20°C} = 0{,}99793 - \frac{0.49}{1000}$$
$$\rho_{20\,°C} = 0{,}99744 \text{ g/cm}^3$$

$$d_{20\,°C}^{20\,°C} = \frac{0{,}99744}{0{,}998203} = 0{,}99923$$

Méthode B Masse volumique à 20 °C et densité relative à 20 °C mesurées par densimétrie électronique utilisant un résonateur de flexion (Méthode de type I)

B.1 *Principe*

La masse volumique du vin ou du moût est mesurée par densimétrie électronique utilisant un résonateur de flexion. Le principe consiste à mesurer la période d'oscillation d'un tube contenant l'échantillon soumis à une excitation électromagnétique. La masse volumique est liée à la période d'oscillation par la formule suivante :

$$\rho = T^2 \times \left(\frac{C}{4\pi^2 V} \right) - \left(\frac{M}{V} \right) \qquad (1)$$

ρ = masse volumique de l'échantillon
T = période de vibration induite
M = masse du tube vide
C = constante de rappel
V = volume de l'échantillon en vibration

Cette relation est de la forme, $\rho = A\ T^2 - B$ (2), il existe donc une relation linéaire entre la masse volumique et la période élevée au carré. Les constantes A et B sont spécifiques pour chaque oscillateur et sont estimées en mesurant la période de fluides de masse volumique connue.

B.2 *Réactifs et produits*

B.2.1 Fluides de référence

Deux fluides de référence servent à ajuster le densimètre. Les masses volumiques des fluides de référence doivent inclure celles des vins ou des moûts à mesurer. Un écart de masse volumique entre les fluides de référence supérieur à 0,01000 g/cm^3 est recommandé.

Les fluides de référence pour la mesure de la masse volumique des vins ou des moûts par densimètre électronique, sont :

- l'air sec (non pollué),
- Eau pour usage analytique (norme ISO 3696) qualité II ou pureté équivalente,
- des solutions hydroalcooliques, des vins ou des moûts de masse volumique déterminée par une méthode différente de type I dont l'incertitude ne dépasse pas 0,00005 g/cm^3 à la température de 20,00 ± 0,05 °C,

- des solutions raccordées au système international de viscosité inférieure à 2 mm^2/s dont l'incertitude ne dépasse pas 0,00005 g/cm^3 à la température de 20,00 ± 0,05 °C.

B.2.2 Produits de nettoyage et de séchage

Utiliser des produits qui assurent un parfait état de nettoyage et séchage de la cellule de mesure, selon les résidus et indications du fabricant. A titre d'exemple :

- détergents, acides, etc.
- solvants organiques : éthanol 96 % vol., acétone pure, etc.

B.3 ***Appareillage et matériel***

B.3.1 Densimètre électronique à résonateur de flexion

Le densimètre électronique comporte les éléments suivants :

- une cellule de mesure comportant le tube de mesure et un contrôleur de température,
- un système de mise en oscillation du tube et de mesure de la période d'oscillation,
- un afficheur numérique et éventuellement un calculateur.
- seringue d'injection d'échantillons, échantillonneur automatique ou autre système équivalent

Le densimètre est placé sur un support parfaitement stable et isolé de toutes vibrations.

B.3.2 Contrôle de la température de la cellule de mesure

Le tube de mesure est situé dans un dispositif thermostaté. La variation de la température doit être inférieure à +/- 0,02 °C.

Lorsque le densimètre le permet, il est nécessaire de contrôler la température de la cellule de mesure car celle-ci influence fortement les résultats des déterminations. La masse volumique d'une solution hydroalcoolique de titre alcoométrique volumique (TAV) 10 % vol. est de 0,98471 g/cm^3 à 20 °C et de 0,98447 g/cm^3 à 21°C, soit un écart de 0,00024 g/cm^3.

La température d'essai est de 20 °C. La mesure de la température dans la cellule est réalisée avec un thermomètre d'une résolution de moins de 0,01°C et raccordé aux étalons nationaux. Il convient de garantir une mesure de température d'incertitude inférieure à +/- 0,07 °C.

B.3.3 Etalonnage de l'appareil

L'appareil doit être étalonné avant sa première utilisation, puis périodiquement ou si la vérification ne donne pas satisfaction. L'objectif est d'utiliser deux fluides de référence pour calculer les constantes A et B (cf. formule (2) B.1). Pour la réalisation pratique de l'étalonnage, se référer au mode d'emploi de l'appareil. En principe cette étalonnage est effectuée avec de l'air sec (tenir compte de la pression atmosphérique) et de l'eau très pure (B.2.1).

B.3.4 Vérification de l'étalonnage

Pour vérifier l'étalonnage, on mesure la masse volumique des fluides de référence.

- Chaque jour d'utilisation, une vérification de la masse volumique de l'air est réalisée. Un écart entre la masse volumique théorique et celle observée supérieur à 0,00008 g/cm^3 peut indiquer que le tube est encrassé. Il faut alors le nettoyer. Après nettoyage, on vérifie à nouveau la masse volumique de l'air, si cette vérification n'est pas concluante, il faut ajuster l'appareil.
- On vérifie également la masse volumique de l'eau ; si l'écart entre la masse volumique théorique et celle observée est supérieur à 0,00008 g/cm^3, on ajuste l'appareil.
- Si la vérification de la température de la cellule est difficile, il est possible de vérifier directement la masse volumique d'une solution hydroalcoolique dont la masse volumique est comparable à celle des échantillons analysés.

B.3.5 Contrôle

Lorsque la différence entre la masse volumique théorique d'une solution de référence (connue avec une incertitude de +/- 0,00005 g/cm^3) et la mesure est supérieure à 0,00008 g/cm^3 il est nécessaire de vérifier l'étalonnage de l'appareil.

B.4 ***Mode opératoire***

Avant de procéder à la mesure, si nécessaire, nettoyer et sécher la cellule à l'acétone ou à l'alcool absolu et à l'air sec. Rincer la cellule avec l'échantillon.

Injecter l'échantillon dans la cellule (à l'aide d'une seringue, d'un échantillonneur automatique ou autre système équivalent) de sorte que celle-ci soit remplie entièrement. Lors du remplissage, veiller à l'élimination complète des bulles d'air. L'échantillon doit être homogène et ne contenir aucune particule solide. Le cas échéant, éliminer toute matière en suspension par filtration avant l'analyse.

Si l'on dispose d'un système d'éclairage qui permet de vérifier l'absence de bulles, l'éteindre rapidement après la vérification car la chaleur générée par la lampe influe sur la température de mesure (pour les appareils qui possèdent un éclairage permanent, cette remarque est sans objet).

L'opérateur s'assure de la stabilité de la température de la cellule de mesure.

Une fois la lecture stabilisée, enregistrer la masse volumique $\rho_{20°C}$.

Si l'appareil ne donne que la période, on calcule la masse volumique grâce aux constantes A et B (voir la notice de l'appareil ou Annexe I de la méthode OIV-MA-AS312-01A).

B.5 ***Expression des résultats***

La masse volumique est exprimée en g/ cm^3 avec 5 décimales

B.6 ***Paramètres de fidélité***

Les paramètres de fidélité sont détaillés au tableau 4 de l'annexe II.

Répétabilité : r = 0.00011 g/cm^3
Reproductibilité : R = 0,00025 g/cm^3

Méthode C Masse volumique à 20 °C et densité relative à 20 °C mesurées par la balance hydrostatique (Méthode de type I)

C.1 *Principe*

La masse volumique des vins ou des moûts peut être mesurée par densimétrie avec une balance hydrostatique suivant le principe d'Archimède selon lequel tout corps plongé dans un fluide subit une poussée verticale, dirigée de bas en haut, égale au poids du fluide déplacé.

C.2 *Réactifs et produits*

C.2.1 Eau pour usage analytique (norme ISO 3696) qualité II ou pureté équivalente,

C.2.2 Solution de lavage du flotteur (hydroxyde de sodium, 30 % m/v).
Pour préparer une solution de 100 ml, peser 30 g d'hydroxyde de sodium et porter au volume à l'aide d'éthanol à 96 % vol.

C.3 *Appareillage et matériel*

Appareillage de laboratoire courant, et notamment :

C.3.1 Balance hydrostatique monoplateau d'une sensibilité de 1 mg.

C.3.2 Flotteur d'un volume d'au moins 20 ml, spécialement adapté à la balance, suspendu par un fil d'un diamètre inférieur ou égal à 0,1 mm.

C.3.3 Éprouvette cylindrique comportant un repère de niveau. Le flotteur doit pouvoir rentrer entièrement dans le volume de l'éprouvette situé au-dessous du repère ; la surface du liquide n'étant traversée que par le fil de suspension. L'éprouvette cylindrique doit avoir un diamètre intérieur supérieur d'au moins 6 mm à celui du flotteur.

C.3.4 Thermomètre (ou sonde de mesure de la température) gradué en degrés et dixièmes de degré, de 10 à 40 °C, étalonné à ± 0,06 °C près.

C.3.5 Masses étalonnées par un organisme accrédité.

C.4 *Mode opératoire*

Entre chaque mesure, le flotteur et l'éprouvette doivent être nettoyés à l'eau distillée, essuyés avec un papier de laboratoire doux ne perdant pas ses fibres et rincés avec la solution dont la masse volumique est à déterminer. Les mesures doivent être effectuées lorsque l'appareil est stabilisé afin de minimiser les pertes d'alcool par évaporation.

C.4.1 Etalonnage des appareils

C.4.1.1 *Étalonnage de la balance*

Bien que les balances soient généralement pourvues d'un système d'étalonnage interne, la balance hydrostatique doit pouvoir être étalonnée avec des poids raccordés au Système international.

C.4.1.2 *Étalonnage du flotteur*

Remplir l'éprouvette cylindrique jusqu'au repère avec de l'eau (C.2.1) dont la température sera comprise entre 15 et 25 °C, mais se situera de préférence à 20 °C.
Plonger le flotteur et le thermomètre dans le liquide, agiter, lire la masse volumique du liquide sur l'appareil et, si nécessaire, corriger cette lecture pour qu'elle soit égale à celle de l'eau à la température de la mesure.

C.4.1.3 *Contrôle à l'aide d'une solution de masse volumique connue*

Remplir l'éprouvette cylindrique jusqu'au repère avec une solution de masse volumique connue, dont la température sera comprise entre 15 et 25 °C, mais se situera de préférence à 20 °C.

Plonger le flotteur et le thermomètre dans le liquide, agiter, lire la masse volumique du liquide sur l'appareil ; noter la masse volumique et la température si la masse volumique est mesurée à t °C (ρ_t)

Si nécessaire, corriger ρ à l'aide de la table des masses volumiques ρ_t des mélanges hydroalcooliques (table II de l'annexe I).
La masse volumique ainsi établie doit être identique à celle qui est connue.

Remarque : cette solution de masse volumique connue peut également remplacer l'eau pour l'étalonnage du flotteur.

C.4.2 Détermination de la masse volumique :

Verser l'échantillon pour essai dans l'éprouvette cylindrique jusqu'au repère de niveau.

Plonger le flotteur et le thermomètre dans le liquide, agiter et lire la masse volumique du liquide sur l'appareil. Noter la température si la masse volumique est mesurée à t °C (ρ_t).

Corriger ρ_t à l'aide de la table des masses volumique ρ_t des mélanges hydroalcooliques (table II de l'annexe I).

C.4.3 Nettoyage du flotteur et de l'éprouvette cylindrique.

Plonger le flotteur dans la solution de lavage versée dans l'éprouvette.
Laisser tremper une heure en tournant le flotteur régulièrement.
Rincer abondamment à l'eau du robinet, puis à l'eau distillée.
Essuyer avec un papier de laboratoire doux ne perdant pas ses fibres.

Réaliser ces opérations lors de la première utilisation du flotteur, puis régulièrement dès que nécessaire.

C.5 ***Expression des résultats***

La masse volumique est exprimée en g/ cm^3 avec 5 décimales

C.6 ***Paramètres de fidélité***

Les paramètres de fidélité sont détaillés au tableau 4 de l'annexe II.
r = 0.00025 g/cm^3
R = 0,00067 g/cm^3

Méthode D Masse volumique par aréométrie (méthode de type IV)

D.1 *Principe*

La masse volumique et la densité relative à 20 °C sont déterminées sur l'échantillon pour essai par aréométrie en utilisant le principe de la poussée d'Archimède. Un cylindre lesté muni d'une tige graduée s'enfonce plus ou moins dans l'échantillon liquide dont la masse volumique doit être déterminée. La masse volumique du liquide est lue directement sur la graduation de la tige au niveau du ménisque.

D.2 *Appareillage*

D.2.1 Aréomètre

Les aréomètres doivent répondre aux prescriptions de l'ISO en ce qui concerne leurs dimensions et leurs graduations.

Ils doivent avoir une carène cylindrique, une tige de section circulaire de 3 mm de diamètre au moins. Pour les vins secs, ils doivent être gradués en g/cm^3 de 0,983 à 1,003 par millième et cinquième de millième. Chaque millième doit être séparé par 5 mm au moins du millième suivant. Pour la mesure de la densité des vins désalcoolisés, des vins de liqueur et des moûts, il sera fait usage d'un jeu de cinq aréomètres gradués en g/cm^3 de 1,000 1,030 ; 1,030 1,060 ; 1,060 1,090 ; 1,090 1,120 ; 1,120 1,150. Ces appareils seront gradués en masses volumiques à 20 °C par millième et demi-millième au moins, chaque millième étant séparé par 3 mm au moins du millième suivant.

Ces aréomètres doivent être gradués de manière à être lus au « sommet du ménisque ». L'indication de la graduation en masse volumique à 20 °C ou en densité relative à 20 °C et de la lecture au niveau du sommet du ménisque sera portée soit sur l'échelle graduée, soit sur une bande de papier incluse dans la carène.

Ces appareils doivent être raccordés au Système International d'Unités.

D.2.2 Thermomètre raccordé au Système International d'Unités gradué par demi-degré Celsius au moins.

D.2.3 Éprouvette cylindrique dont les dimensions permettent l'immersion du thermomètre et de l'aréomètre sans contact avec les parois, tenue verticalement.

D.3 *Technique d'une mesure*

Dans l'éprouvette D.2.3, placer 250 ml d'échantillon préparé pour essais (4), introduire l'aréomètre et le thermomètre. Lire le thermomètre une minute après

avoir agité pour réaliser l'équilibre de température. Retirer le thermomètre et lire la masse volumique apparente à *t* °C sur la tige de l'aréomètre après une minute de repos.

Corriger la masse volumique apparente lue à t °C de l'action de la température à l'aide de tables de l'annexe I qui s'appliquent aux cas des vins secs (table V), des moûts naturels et concentrés (table VI) et des vins de liqueur (table VII).

D.4 ***Expression des résultats***

La masse volumique est exprimée en g/ cm^3 avec 4 décimales.

5. Annexes

ANNEXE I

Tables

TABLE I

Facteurs F
par lesquels il faut multiplier la masse de l'eau contenue dans le *pycnomètre en pyrex* à *t*° C pour calculer le volume du pycnomètre à 20 °C.

t °C	F	*t* °C	F	*t* °C	F	*t* °C	F	*t* °C	F	*t* °C	F	*t* °C	F
10,0	1,000398	13,0	1,000691	16,0	1,001097	19,0	1,001608	22,0	1,002215	25,0	1,002916	28,0	1,003704
,1	1,000406	,1	1,000703	,1	1,001113	,1	1,001627	,1	1,002238	,1	1,002941	,1	1,003731
,2	1,000414	,2	1,000714	,2	1,001128	,2	1,001646	,2	1,002260	,2	1,002966	,2	1,003759
,3	1,000422	,3	1,000726	,3	1,001144	,3	1,001665	,3	1,002282	,3	1,002990	,3	1,003797
,4	1,000430	,4	1,000738	,4	1,001159	,4	1,001684	,4	1,002304	,4	1,003015	,4	1,003815
10,5	1,000439	13,5	1,000752	16,5	1,001175	19,5	1,001703	22,5	1,002326	25,5	1,003041	28,5	1,003843
,6	1,000447	,6	1,000764	,6	1,001191	,6	1,001722	,6	1,002349	,6	1,003066	,6	1,003871
,7	1,000456	,7	1,000777	,7	1,001207	,7	1,001741	,7	1,002372	3	1,003092	,7	1,003899
,8	1,000465	,8	1,000789	,8	1,001223	,8	1,001761	,8	1,002394	,8	1,003117	,8	1,003928
,9	1,000474	,9	1,000803	,9	1,001239	9	1,001780	,9	1,002417	,9	1,003143	,9	1,003956
11,0	1,000483	14,0	1,000816	17,0	1,001257	20,0	1,001800	23,0	1,002439	26,0	1,003168	29,0	1,003984
,1	1,000492	,1	1,000829	,1	1,001273	,1	1,001819	,1	1,002462	,1	1,003194	,1	1,004013
,2	1,000501	,2	1,000842	,2	1,001286	,2	1,001839	,2	1,002485	1	1,003222	2	1,004042
3	1,000511	3	1,000855	3	1,001306	,3	1,001959	,3	1,002508	,3	1,003247	,3	1,004071
,4	1,000520	,4	1,000868	,4	1,001323	,4	1,001880	,4	1,002531	,4	1,003273	,4	1,004099
11,5	1,000530	14,5	1,000882	17,5	1,001340	20,5	1,001900	23,5	1,002555	26,5	1,003299	29,5	1,004128
,6	1,000540	,6	1,000895	,6	1,001357	,6	1,001920	,6	1,002578	,6	1,003326	,6	1,004158
,7	1,000550	,7	1,000909	,7	1,001374	,7	1,001941	3	1,002602	,7	1,003352	,7	1,004187
,8	1,000560	,8	1,000923	,8	1,001391	,8	1,001961	,8	1,002625	,8	1,003379	, 8	1,004216
,9	1,000570	,9	1,000937	,9	1,001409	,9	1,001982	,9	1,002649	,9	1,003405	,9	1,004245
12,0	1,000580	15,0	1,000951	18,0	1,001427	21,0	1,002002	24,0	1,002672	27,0	1,003432	30,0	1,004275
,1	1,000591	,1	1,000965	,1	1,001445	,1	1,002023	,1	1,002696	,1	1,003459		
,2	1,000601	,2	1,000979	,2	1,001462	,2	1,002044	,2	1,002720	,2	1,003485		
,3	1,000612	,3	1,000993	,3	1,001480	,3	1,002065	,3	1,002745	,3	1,003513		
,4	1,000623	,4	1,001008	,4	1,001498	,4	1,002086	,4	1,002769	,4	1,003540		
12,5	1,000634	15,5	1,001022	18,5	1,001516	21,5	1,002107	24,5	1,002793	27,5	1,003567		
,6	1,000645	,6	1,001037	,6	1,001534	,6	1,002129	,6	1,002817	,6	1,003594		
,7	1,000656	,7	1,0010 52	,7	1,001552	,7	1,002151	,7	1,002842	,7	1,003621		
,8	1,000668	,8	1,001067	,8	1,001570	,8	1,002172	,8	1,002866	,8	1,003649		
,9	1,000679	,9	1,001082	,9	1,001589	,9	1,002194	,9	1,002891	,9	1,003676		

TABLE II

Corrections c de température sur la masse volumique des vins secs et des vins désalcoolisés, mesurée dans un pycnomètre en *verre pyrex,* à *t* °C, pour la ramener à 20 °C,

$\rho_{20} = \rho_t \pm \frac{c}{1000}$ – si *t* °C est inférieure à 20 °C
+ si *t* °C est supérieure à 20 °C

Températures en °C	Titres alcoométriques																								
	0	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
10	1,59	1,64	1,67	1,71	1,77	1,84	1,91	2,01	2,11	2,22	2,34	2,46	2,60	2,73	2,88	3,03	3,19	3,35	3,52	3,70	3,87	4,06	4,25	4,44
11	1,48	1,53	1,56	1,60	1,64	1,70	1,77	1,86	1,95	2,05	2,16	2,27	2,38	2,51	2,63	2,77	2,91	3,06	3,21	3,36	3,53	3,69	3,86	4,03
12	1,36	1,40	1,43	1,46	1,50	1,56	1,62	1,69	1,78	1,86	1,96	2,05	2,16	2,27	2,38	2,50	2,62	2,75	2,88	3,02	3,16	3,31	3,46	3,61
13	1,22	1,26	1,28	1,32	1,35	1,40	1,45	1,52	1,59	1,67	1,75	1,83	1,92	2,01	2,11	2,22	2,32	2,44	2,55	2,67	2,79	2,92	3,05	3,18
14	1,08	1,11	1,13	1,16	1,19	1,23	1,27	1,33	1,39	1,46	1,52	1,60	1,67	1,75	1,94	1,93	2,03	2,11	2,21	2,31	2,42	2,52	2,63	2,74,
15	0,92	0,96	0,97	0,99	1,02	1,05	1,09	1,13	1,19	1,24	1,30	1,36	1,42	1,48	1,55	1,63	1,70	1,78	1,86	1,95	2,03	2,12	2,21	2,30
16	0,76	0,79	0,80	0,81	0,94	0,86	0,89	0,93	0,97	1,01	1,06	1,10	1,16	1,21	1,26	1,32	1,38	1,44	1,51	1,57	1,64	1,71	1,78	1,85
17	0,59	0,61	0,62	0,63	0,65	0,67	0,69	0,72	0,75	0,78	0,81	0,85	0,88	0,95	0,96	1,01	1,05	1,11	1,15	1,20	1,25	1,30	1,35	1,40
18	0,40	0,42	0,42	0,43	0,44	0,46	0,47	0,49	0,51	0,53	0,55	0,57	0,60	0,63	0,65	0,68	0,71	0,74	0,77	0,81	0,84	0,87	0,91	0,94
19	0,21	0,21	0,22	0,22	0,23	0,23	0,24	0,25	0,26	0,27	0,28	0,29	0,30	0,32	0,33	0,34	0,36	0,37	0,39	0,41	0,42	0,44	0,46	0,47
20																								
21	0,21	0,22	0,22	0,23	0,23	0,24	0,25	0,26	0,27	0,28	0,29	0,30	0,31	0,32	0,34	0,36	0,37	0,38	0,40	0,41	0,43	0,44	0,46	0,48
22	0,44	0,45	0,46	0,47	0,48	0,49	0,51	0,52	0,54	0,56	0,59	0,61	0,63	0,66	0,69	0,71	0,74	0,77	0,80	0,83	0,87	0,90	0,93	0,97
23	0,68	0,70	0,71	0,72	0,74	0,76	0,78	0,80	0,83	0,86	0,90	0,93	0,96	1,00	1,03	1,08	1,13	1,17	1,22	1,26	1,31	1,37	1,41	1,46
24	0,93	0,96	0,97	0,99	1,01	1,03	1,06	1,10	1,13	1,18	1,22	1,26	1,31	1,36	1,41	1,47	1,52	1,58	1,64	1,71	1,77	1,84	1,90	1,97
25	1,19	1,23	1,25	1,27	1,29	1,32	1,36	1,40	1,45	1,50	1,55	1,61	1,67	1,73	1,80	1,86	1,93	2,00	2,08	2,16	2,24	2,32	2,40	2,48
26	1,47	1,51	1,53	1,56	1,59	1,62	1,67	1,72	1,77	1,83	1,90	1,96	2,03	2,11	2,19	2,27	2,35	2,44	2,53	2,62	2,72	2,81	2,91	3,01
27	1,75	1,80	1,82	1,85	1,89	1,93	1,98	2,04	2,11	2,18	2,25	2,33	2,41	2,50	2,59	2,68	2,78	2,88	2,98	3,09	3,20	3,31	3,42	3,33
28	2,04	2,10	2,13	2,16	2,20	2,25	2,31	2,38	2,45	2,53	2,62	2,70	2,80	2,89	3,00	3,10	3,21	3,32	3,45	3,57	3,69	3,82	3,94	4,07
29	2,34	2,41	2,44	2,48	2,53	2,58	2,65	2,72	2,81	2,89	2,99	3,09	3,19	3,30	3,42	3,53	3,65	3,78	3,92	4,05	4,19	4,33	4,47	4,61
30	2,66	2,73	2,77	2,81	2,86	2,92	3,00	3,08	3,17	3,27	3,37	3,48	3,59	3,72	3,84	3,97	4,11	4,25	4,40	4,55	4,70	4,85	4,92	5,17

Note : cette table peut être utilisée pour transformer la densité d^{t}_{20} en d^{20}_{20}

TABLE III

Corrections *c* de température sur la masse volumique des moûts naturels et des moûts concentrés mesurée à l'aide d'un pycnomètre en *verre pyrex*, à *t* °C, pour la ramener à 20 °C,

$$\rho_{20} = \rho_t \pm \frac{c}{1000}$$

– si *t* °C est inférieure à 20 °C
+ si *t* °C est supérieure à 20 °C

Températures en °C	Masses volumiques																						
	1,05	1,06	1,07	1,08	1,09	1,10	1,11	1,12	1,13	1,14	1,15	1,16	1,18	1,20	1,22	1,24	1,26	1,28	1,30	1,32	1,34	1,36
10	2,31	2,48	2,66	2,82	2,99	3,13	3,30	3,44	3,59	3,73	3,88	4,01	4,28	4,52	4,76	4,98	5,18	5,42	5,56	5,73	5,90	6,05
11	2,12	2,28	2,42	2,57	2,72	2,86	2,99	3,12	3,25	3,37	3,50	3,62	3,85	4,08	4,29	4148	4,67	4,84	5,00	5,16	5,31	5,45
12	1,92	2,06	2,19	2,32	2,45	2,58	2,70	2,92	2,94	3,04	3,15	3,26	3,47	3,67	3,85	4,03	4,20	4,36	4,51	4,65	478	4,91
13	1,72	1,84	1,95	2,06	2,17	2,27	2,38	2,48	2,58	2,69	2,78	2,89	3,05	3,22	3,39	3,55	3,65	3,84	3,98	4,11	4,24	4,36
14	1,52	1,62	1,72	1,81	1,90	2,00	2,09	2,17	2,26	2,34	2,43	2,51	2,66	2,82	2,96	3,09	3,22	3,34	3,45	3,56	3,67	3,76
15	1,28	1,36	1,44	1,52	1,60	1,67	1,75	1,82	1,89	1,96	2,04	2,11	2,24	2,36	2,48	2,59	2,69	2,79	2,88	2,97	3,03	3,10
16	1,05	1,12	1,18	1,25	1,31	1,37	1,43	1,49	1,55	1,60	1,66	1,71	1,81	1,90	2,00	2,08	2,16	2,24	2,30	2,37	2,43	2,49
17	0,80	0,86	0,90	0,95	1,00	1,04	1,09	1,13	1,18	1,22	1,26	1,30	1,37	1,44	1,51	1,57	1,62	1,68	1,72	1,76	1,80	1,84
18	0,56	0,59	0,62	0,66	0,68	0,72	0,75	0,77	0,80	0,83	0,85	0,88	0,93	0,98	1,02	1,05	1,09	1,12	1,16	1,19	1,21	1,24
19	0,29	0,31	0,32	0,34	0,36	0,37	0,39	0,40	0,42	0,43	0,44	0,45	0,48	0,50	0,52	0,54	0,56	0,57	0,59	0,60	0,61	0,62
20																						
21	0,29	0,30	0,32	0,34	0,35	0,37	0,38	0,40	0,41	0,42	0,44	0,46	0,48	0,50	0,53	0,56	0,58	0,59	0,60	0,61	0,62	0,62
22	0,58	0,61	0,64	0,67	0,70	0,73	0,76	0,79	0,81	0,84	0,87	0,90	0,96	1,03	1,05	1,09	1,12	1,15	1,18	1,20	1,22	1,23
23	0,89	0,94	0,99	1,03	1,08	1,12	1,16	1,20	1,25	1,29	1,33	1,37	1,44	1,51	1,57	1,63	1,67	1,73	1,77	1,80	1,82	1,94
24	1,20	1,25	1,31	1,37	1,43	1,49	1,54	1,60	1,66	1,71	1,77	1,82	1,92	2,01	2,10	2,17	2,24	2,30	2,36	2,40	2,42	2,44
25	1,51	1,59	1,66	1,74	1,81	1,88	1,95	2,02	2,09	2,16	2,23	2,30	2,42	2,53	2,63	2,72	2,82	2,89	2,95	2,99	3,01	3,05
26	1,84	1,92	2,01	2,10	2,18	2,26	2,34	2,42	2,50	2,58	2,65	2,73	2,87	3,00	3,13	3,25	3,36	3,47	3,57	3,65	372	3,79
27	2,17	2,26	2,36	2,46	2,56	2,66	2,75	2,84	2,93	3,01	3,10	3,18	3,35	3,50	3,66	3,80	3,93	4,06	4,16	4,26	4,35	4,42
28	2,50	2,62	2,74	2,85	2,96	3,07	3,18	3,28	3,40	3,50	3,60	3,69	3,87	4,04	4,21	4,36	4,50	4,64	4,75	4,86	4,94	5,00
29	2,86	2,98	3,10	3,22	3,35	3,47	3,59	3,70	3,82	3,93	4,03	4,14	4,34	4,53	4,72	4,89	5,05	5,20	5,34	5,46	5,56	5,64
30	3,20	3,35	3,49	3,64	3,77	3,91	4,05	4,17	4,30	4,43	4,55	4,67	4,90	5,12	5,39	5,51	5,68	5,94	5,96	6,09	6,16	6,22

Note : cette table peut être utilisée pour transformer la densité d_{20}^{t} en d_{20}^{20}

TABLE IV

Corrections c de température sur la masse volumique des vins de liqueur mesurée à l'aide d'un pycnomètre en *verre pyrex,* à *t* °C, pour la ramener à 20 °C,

$$\rho_{20} = \rho_t \pm \frac{c}{1000}$$

si *t* °C est inférieure à 20 °C

\+ si t °C est supérieure à 20 °C

Températures en °C	Vins de 13% vol, Masses volumiques							Vins de 15% vol, Masses volumiques							Vins de 17% vol, Masses volumiques						
	1,000	1,020	1,040	1,060	1,080	1,100	1,120	1,000	1,020	1,040	1,060	1,080	1,100	1,120	1,000	1,020	1,040	1,060	1,080	1,100	1,120
10	2,36	2,71	3,06	3,42	3,72	3,96	4,32	2,64	2,99	3,36	3,68	3,99	4,30	4,59	2,94	3,29	3,64	3,98	4,29	4,60	4,89
11	2,17	2,49	2,80	2,99	3,39	3,65	3,90	2,42	2,73	3,05	3,34	3,63	3,89	4,15	2,69	3,00	3,32	3,61	3,90	4,16	4,41
12	1,97	2,25	2,53	2,79	3,05	3,29	3,52	2,19	2,47	2,75	3,01	3,27	3,51	3,73	2,42	2,70	2,98	3,24	3,50	3,74	3,96
13	1,78	2,02	2,25	2,47	2,69	2,89	3,09	1,97	2,21	2,44	2,66	2,87	3,08	3,29	2,18	2,42	2,64	2,87	3,08	3,29	3,49
14	1,57	1,78	1,98	2,16	2,35	2,53	2,70	1,74	1,94	2,14	2,32	2,52	2,69	2,86	1,91	2,11	2,31	2,50	2,69	2,86	3,03
15	1,32	1,49	1,66	1,82	1,97	2,12	2,26	1,46	1,63	1,79	1,95	2,10	2,25	2,39	1,60	1,77	1,93	2,09	2,24	2,39	2,53
16	1,08	1,22	1,36	1,48	1,61	1,73	1,84	1,18	1,32	1,46	1,59	1,71	1,83	1,94	1,30	1,44	1,58	1,71	1,83	1,95	2,06
17	0,83	0,94	1,04	1,13	1,22	1,31	1,40	0,91	1,02	1,12	1,21	1,30	1,39	1,48	1,00	1,10	1,20	1,30	1,39	1,48	1,56
18	0,58	0,64	0,71	0,78	0,84	0,89	0,95	0,63	0,69	0,76	0,83	0,89	0,94	1,00	0,69	0,75	0,82	0,89	0,95	1,00	1,06
19	0,30	0,34	0,37	0,40	0,43	0,46	0,49	0,33	0,37	0,40	0,43	0,46	0,49	0,52	0,36	0,39	0,42	0,46	0,49	0,52	0,54
20																					
21	0,30	0,33	0,36	0,40	0,43	0,46	0,49	0,33	0,36	0,39	0,43	0,46	0,49	0,51	0,35	0,39	0,42	0,45	0,48	0,51	0,54
22	0,60	0,67	0,73	0,80	0,85	0,91	0,98	0,65	0,72	0,78	0,84	0,90	0,96	1,01	0,71	0,78	0,84	0,90	0,96	1,01	1,07
23	0,93	1,02	1,12	1,22	1,30	1,39	1,49	1,01	1,10	1,20	1,29	1,38	1,46	1,55	1,10	1,19	1,29	1,38	1,46	1,55	1,63
24	1,27	1,39	1,50	1,61	1,74	1,84	1,95	1,37	1,49	1,59	1,72	1,84	1,95	2,06	1,48	1,60	1,71	1,83	1,95	2,06	2,17
25	1,61	1,75	1,90	2,05	2,19	2,33	2,47	1,73	1,87	2,02	2,17	2,31	2,45	2,59	1,87	2,01	2,16	2,31	2,45	2,59	2,73
26	1,94	2,12	2,29	2,47	2,63	2,79	2,95	2,09	2,27	2,44	2,62	2,78	2,94	3,10	2,26	2,44	2,61	2,79	2,95	3,11	3,26
27	2,30	2,51	2,70	2,90	3,09	3,27	3,44	2,48	2,68	2,87	3,07	3,27	3,45	3,62	2,67	2,88	3,07	3,27	3,46	3,64	3,81
28	2,66	2,90	3,13	3,35	3,57	3,86	4,00	2,86	3,10	3,23	3,55	3,77	3,99	4,20	3,08	3,31	3,55	3,76	3,99	4,21	4,41
29	3,05	3,31	3,56	3,79	4,04	4,27	4,49	3,28	3,53	3,77	4,02	4,26	4,49	4,71	3,52	3,77	4,01	4,26	4,50	4,73	4,95
30	3,44	3,70	3,99	4,28	4,54	4,80	5,06	3,68	3,94	4,23	4,52	4,79	5,05	5,30	3,95	4,22	4,51	4,79	5,07	5,32	5,57

TABLE IV (suite)

Corrections *c* de température sur la masse volumique des vins de liqueur mesurée à l'aide d'un pycnomètre en *verre pyrex*, à *t* °C, pour la ramener à 20 °C,

$$\rho_{20} = \rho_t \pm \frac{t\,^{\circ}\mathrm{C}}{1000}$$

– si $t\,^{\circ}$C est inférieure à 20 °C

+ si $t\,^{\circ}$C est supérieure à 20 °C

		Vins de 19% vol,							Vins de 21% vol,						
		Masses volumiques							Masses volumiques						
		1,000	1,020	1,040	1,060	1,000	1,100	1,120	1,000	1,020	1,040	1,060	1,080	1,100	1,120
Températures en °C	10	3,27	3,62	3,97	4,30	4,62	4,92	5,21	3,62	3,97	4,32	4,66	4,97	5,27	5,56
	11	2,99	3,30	3,61	3,90	4,19	4,45	4,70	3,28	3,61	3,92	4,22	4,50	4,76	5,01
	12	2,68	2,96	3,24	3,50	3,76	4,00	4,21	2,96	3,24	3,52	3,78	4,03	4,27	4,49
	13	2,68	2,96	3,24	3,50	3,76	4,00	4,21	2,96	3,24	3,52	3,78	4,03	4,27	4,49
	14	2,11	2,31	2,51	2,69	2,88	3,05	3,22	2,31	2,51	2,71	2,89	3,08	3,25	3,43
	15	1,76	1,93	2,09	2,25	2,40	2,55	2,69	1,93	2,10	2,26	2,42	2,57	2,72	2,86
	16	1,43	1,57	1,70	1,83	1,95	2,08	2,18	1,56	1,70	1,84	1,97	2,09	2,21	2,32
	17	1,09	1,20	1,30	1,39	1,48	1,57	1,65	1,20	1,31	1,41	1,50	1,59	1,68	1,77
	18	0,76	0,82	0,88	0,95	1,01	1,06	1,12	0,82	0,88	0,95	1,01	1,08	1,13	1,18
	19	0,39	0,42	0,45	0,49	0,52	0,55	0,57	0,42	0,46	0,49	0,52	0,55	0,58	0,61
	20														
	21	0,38	0,42	0,45	0,48	0,51	0,54	0,57	0,41	0,45	0,48	0,51	0,54	0,57	0,60
	22	0,78	0,84	0,90	0,96	1,02	1,07	1,13	0,84	0,90	0,96	1,02	1,08	1,14	1,19
	23	1,19	1,28	1,38	1,47	1,55	1,64	1,72	1,29	1,39	1,48	1,57	1,65	1,74	1,82
	24	1,60	1,72	1,83	1,95	2,06	2,18	2,29	1,73	1,85	1,96	2,08	2,19	2,31	2,42
	25	2,02	2,16	2,31	2,46	2,60	2,74	2,88	2,18	2,32	2,47	2,62	2,76	2,90	3,04
	26	2,44	2,62	2,79	2,96	3,12	3,28	3,43	2,53	2,81	2,97	3,15	3,31	3,47	3,62
	27	2,88	3,08	3,27	3,42	3,66	3,84	4,01	3,10	3,30	3,47	3,69	3,88	4,06	4,23
	28	3,31	3,54	3,78	4,00	4,22	4,44	4,64	3,56	3,79	4,03	4,25	4,47	4,69	4,89
	29	3,78	4,03	4,27	4,52	4,76	4,99	5,21	4,06	4,31	4,55	4,80	5,04	5,27	5,48
	30	4,24	4,51	4,80	5,08	5,36	5,61	5,86	4,54	4,82	5,11	5,39	5,66	5,91	6,16

TABLE V

Corrections *c* de température sur la masse volumique des vins secs et des vins secs désalcoolisés mesurée à l'aide d'un pycnomètre ou d'un aréomètre en verre ordinaire, à *t* °C, pour la ramener à 20°C,

$$\rho_{20} = \rho_t \pm \frac{c}{1000}$$

– si t°C est inférieure à 20 °C
+ si t°C est supérieure à 20 °C

		Titres alcoométriques																								
		0	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
Températures en °C	10	1,45	1,51	1,55	1,58	1,64	1,76	1,78	1,89	1,98	2,09	2,21	2,34	2,47	2,60	2,75	2,93	3,06	3,22	3,39	3,57	3,75	3,93	4,12	4,31
	11	1,35	1,40	1,43	1,47	1,52	1,58	1,65	1,73	1,83	1,93	2,03	2,15	2,26	2,38	2,51	2,65	2,78	2,93	3,08	3,24	3,40	3,57	3,73	3,90
	12	1,24	1,28	1,31	1,34	1,39	1,44	1,50	1,58	1,66	1,75	1,84	1,94	2,04	2,15	2,26	2,38	2,51	2,63	2,77	2,91	3,05	3,19	3,34	3,49
	13	1,12	1,16	1,18	1,21	1,25	1,30	1,35	1,42	1,49	1,56	1,64	1,73	1,82	1,91	2,01	2,11	2,22	2,33	2,45	2,57	2,69	2,81	2,95	3,07
	14	0,99	1,03	1,05	1,07	1,11	1,14	1,19	1,24	1,31	1,37	1,44	1,52	1,59	1,67	1,75	1,84	1,93	2,03	2,13	2,23	2,33	2,44	2,55	2,66
	15	0,86	0,89	0,90	0,92	0,95	0,98	1,02	1,07	1,12	1,17	1,23	1,29	1,35	1,42	1,49	1,56	1,63	1,71	1,80	1,88	1,96	2,05	2,14	2,23
	16	0,71	0,73	0,74	0,76	0,78	0,81	0,84	0,87	0,91	0,95	0,99	1,05	1,10	1,15	1,21	1,27	1,33	1,39	1,45	1,52	1,59	1,66	1,73	1,80
	17	0,55	0,57	0,57	0,59	0,60	0,62	0,65	0,67	0,70	0,74	0,77	0,81	0,84	0,88	0,92	0,96	1,01	1,05	1,10	1,15	1,20	1,26	1,31	1,36
	18	0,38	0,39	0,39	0,40	0,41	0,43	0,44	0,46	0,48	0,50	0,52	0,55	0,57	0,60	0,62	0,65	0,68	0,71	0,74	0,78	0,81	0,85	0,88	0,91
	19	0,19	0,20	0,20	0,21	0,21	0,22	0,23	0,24	0,25	0,26	0,27	0,28	0,29	0,30	0,32	0,33	0,34	0,36	0,38	0,39	0,41	0,43	0,44	0,46
	20																								
	21	0,21	0,22	0,22	0,23	0,23	0,24	0,25	0,25	0,26	0,27	0,28	0,29	0,31	0,32	0,34	0,35	0,36	0,38	0,39	0,41	0,43	0,44	0,46	0,48
	22	0,43	0,45	0,45	0,46	0,47	0,49	0,50	0,52	0,54	0,56	0,58	0,60	0,62	0,65	0,68	0,71	0,73	0,77	0,80	0,83	0,86	0,89	0,93	0,96
	23	0,67	0,69	0,70	0,71	0,72	0,74	0,77	0,79	0,82	0,85	0,88	0,91	0,95	0,99	1,03	1,07	1,12	1,16	1,21	1,25	1,30	1,35	1,40	1,45
	24	0,91	0,93	0,95	0,97	0,99	1,01	1,04	1,07	1,11	1,15	1,20	1,24	1,29	1,34	1,39	1,45	1,50	1,56	1,62	1,69	1,76	1,82	1,88	1,95
	25	1,16	1,19	1,21	1,23	1,26	1,29	1,33	1,37	1,42	1,47	1,52	1,57	1,63	1,70	1,76	1,83	1,90	1,97	2,05	2,13	2,21	2,29	2,37	2,45
	26	1,42	1,46	1,49	1,51	1,54	1,58	1,62	1,67	1,73	1,79	1,85	1,92	1,99	2,07	2,14	2,22	2,31	2,40	2,49	2,58	2,67	2,77	2,86	2,96
	27	1,69	1,74	1,77	1,80	1,83	1,88	1,93	1,98	2,05	2,12	2,20	2,27	2,35	2,44	2,53	2,63	2 72	2,82	2,93	3,04	3,14	3,25	3,37	3,48
	28	1,97	2,03	2,06	2,09	2,14	2,19	2,24	2,31	2,38	2,46	2,55	2,63	2,73	2,83	2,93	3,03	3,14	3,26	3,38	3,50	3,62	3,75	3,85	4,00
	29	2,26	2,33	2,37	2,41	2,45	2,50	2,57	2,64	2,73	2,82	2,91	2,99	3,11	3,22	3,34	3,46	3,58	3,70	3,84	3,97	4,11	4,25	4,39	4,54
	30	2,56	2,64	2,67	2,72	2,77	2,83	2,90	2,98	3,08	3,18	3,28	3,38	3,50	3,62	3,75	3,88	4,02	4,16	4,30	4,46	4,61	4,76	4,92	5,07

Note : cette table peut être utilisée pour transformer la densité d^t_{20} en d^{20}_{20}

TABLE VI

Corrections c de température sur la masse volumique des moûts concentrés
mesurée à l'aide d'un pycnomètre ou d'un aréomètre en *verre ordinaire*, à *t* °C, pour la ramener à 20 °C,

$$\rho_{20} = \rho_t \pm \frac{c}{1000}$$ – si *t* °C est inférieure à 20 °C
+ si *t* °C est supérieure à 20 °C

		Masses volumiques																					
		1,05	1 ,06	1,07	1,08	1,09	1,10	1,11	1,12	1,13	1,14	1,15	1,16	1,18	1,20	1,22	1,24	1,26	1,28	1,30	1,32	1,34	1,36
Température en °C	10	2,17	2,34	2,52	2,68	2,85	2,99	3,16	3,29	3,44	3,58	3,73	3,86	4,13	4,36	4,60	4,82	5,02	5,25	5,39	5,56	-5,73	5,87
	11	2,00	2,16	2,29	2,44	2,59	2,73	2,86	2,99	3,12	3,24	3,37	3,48	3,71	3,94	4,15	4,33	4,52	4,69	4,85	5,01	5,15	5,29
	12	1,81	1,95	2,08	2,21	2,34	2,47	2,58	2,70	2,82	2,92	3,03	3,14	3,35	3,55	3,72	3,90	4,07	4,23	4,37	4,52	4,64	4,77
	13	1,62	1,74	1,85	1,96	2,07	2,17	2,28	2,38	2,48	2,59	2,68	2,77	2,94	3,11	3,28	3,44	3,54	3,72	3,86	3,99	4,12	4,24
	14	1,44	1,54	1,64	1,73	1,82	1,92	2,00	2,08	2,17	2,25	2,34	2,42	2,57	2,73	2,86	2,99	3,12	3,24	3,35	3,46	3,57	3,65
	15	1,21	1,29	1,37	1,45	1,53	1,60	1,68	1,75	1,82	1,89	1,97	2,03	2,16	2,28	2,40	2,51	2,61	2,71	2,80	2,89	2,94	3,01
	16	1,00	1,06	1,12	1,19	1,25	1,31	1,37	1,43	1,49	1,54	1,60	1,65	1,75	1,84	1,94	2,02	2,09	2,17	2,23	2,30	2,36	2,42
	17	0,76	0,82	0,86	0,91	0,96	1,00	1,05	1,09	1,14	1,18	1,22	1,25	1,32	1,39	1,46	1,52	1,57	1,63	1,67	1,71	1,75	1,79
	18	0,53	0,56	0,59	0,63	0,65	0,69	0,72	0,74	0,77	0,80	0,82	0,85	0,90	0,95	0,99	1,02	1,05	1,09	1,13	1,16	1,18	1,20
	19	0,28	0,30	0,31	0,33	0,35	0,36	0,38	0,39	0,41	0,42	0,43	0,43	0,46	0,48	0,50	0,52	0,54	0,55	0,57	0,58	0,59	0,60
	20																						
	21	0,28	0,29	0,31	0,33	0,34	0,36	0,37	0,39	0,40	0,41	0,43	0,44	0,46	0,48	0,51	0,54	0,56	0,57	0,58	0,59	0,60	0,60
	22	0,55	0,58	0,61	0,64	0,67	0,70	0,73	0,76	0,78	0,81	0,84	0,87	0,93	0,97	1,02	1,06	1,09	1,12	1,15	1,17	1,19	1,19
	23	0,85	0,90	0,95	0,99	1,04	1,08	1,12	1,16	1,21	1,25	1,29	1,32	1,39	1,46	1,52	1,58	1,62	1,68	1,72	1,75	1,77	1,79
	24	1,15	1,19	1,25	1,31	1,37	1,43	1,48	1,54	1,60	1,65	1,71	1,76	1,86	1,95	2,04	2,11	2,17	2,23	2,29	2,33	2,35	2,37
	25	1,44	1,52	1,59	1,67	1,74	1,81	1,88	1,95	2,02	2,09	2,16	2,22	2,34	2,45	2,55	2,64	2,74	2,81	7,87	2,90	2,92	2,96
	26	1,76	1,84	1,93	2,02	2,10	2,18	2,25	2,33	2,41	2,49	2,56	2,64	2,78	2,91	3,03	3,15	3,26	3,37	3,47	3,55	3,62	3,60
	27	2,07	2,16	2,26	2,36	2,46	2,56	2,65	2,74	2,83	2,91	3,00	3,07	3,24	3,39	3,55	3,69	3,82	3,94	4,04	4,14	4,23	4,30
	28	2,39	2,51	2,63	2,74	2,85	2,96	3,06	3,16	3,28	3,38	3,48	3,57	3,75	3,92	4,08	4,23	4,37	4,51	4,62	4,73	4,80	4,86
	29	2,74	2,86	2,97	3,09	3,22	3,34	3,46	3,57	3,69	3,90	3,90	4,00	4,20	4,39	4,58	4,74	4,90	5,05	5,19	5,31	5,40	5,48
	30	3,06	3,21	3,35	3,50	3,63	3,77	3,91	4,02	4,15	4,28	4,40	4,52	4,75	4,96	5,16	5,35	5,52	5,67	5,79	5,91	5,99	6,04

Note : cette table peut être utilisée pour transformer la densité d^{t}_{20} en d^{20}_{20}

TABLE VII

Corrections c de température sur la masse volumique des vins de liqueur
mesurée à l'aide d'un aréomètre ou d'un pycnomètre en *verre ordinaire*, à *t* °C, pour la ramener à 20 °C,

$$\rho_{20} = \rho_t \pm \frac{c}{1000} \quad \begin{matrix} - \text{ si } t\,^{o}\text{C est inférieure à 20 °C} \\ + \text{ si } t\,^{o}\text{C est supérieure à 20 °C} \end{matrix}$$

		Vins de 13% volume							Vins de 15% volume							Vins de 17% volume						
		Masses volumiques							Masses volumiques							Masses volumiques						
		1,000	1,020	1,040	1,060	1,080	1,100	1,120	1,000	1,020	1,040	1,060	1,080	1,100	1,120	1,000	1,020	1,040	1,060	1,080	1,100	1,120
Température en °C	10	2,24	2,58	2,93	3,27	3,59	3,89	4,18	2,51	2,85	3,20	3,54	3,85	4,02	4,46	2,81	3,15	3,50	3,84	4,15	4,45	4,74
	11	2,06	2,37	2,69	2,97	3,26	3,53	3,78	2,31	2,61	2,93	3,21	3,51	3,64	4,02	2,57	2,89	3,20	3,49	3,77	4,03	4,28
	12	1,87	2,14	2,42	2,67	2,94	3,17	3,40	2,09	2,36	2,64	2,90	3,16	3,27	3,61	2,32	2,60	2,87	3,13	3,39	3,63	3,84
	13	1,69	1,93	2,14	2,37	2,59	2,80	3,00	1,88	2,12	2,34	2,56	2,78	2,88	3,19	2,09	2,33	2,55	2,77	2,98	3,19	3,39
	14	1,49	1,70	1,90	2,09	2,27	2,44	2,61	1,67	1,86	2,06	2,25	2,45	2,51	2,77	1,83	2,03	2,23	2,42	2,61	2,77	2,94
	15	1,25	1,42	1,59	1,75	1,90	2,05	2,19	1,39	1,56	1,72	1,88	2,03	2,11	2,32	1,54	1,71	1,87	2,03	2,18	2,32	2,47
	16	1,03	1,17	1,30	1,43	1,55	1,67	1,78	1,06	1,27	1,40	1,53	1,65	1,77	1,88	1,25	1,39	1,52	1,65	1,77	1,89	2,00
	17	0,80	0,90	1,00	1,09	1,17	1,27	1,36	0,87	0,98	1,08	1,17	1,26	1,35	1,44	0,96	1,06	1,16	1,26	1,35	1,44	1,52
	18	0,54	0,61	0,68	0,75	0,81	0,86	0,92	0,60	0,66	0,73	0,80	0,85	0,91	0,97	0,66	0,72	0,79	0,86	0,92	0,97	1,03
	19	0,29	0,33	0,36	0,39	0,42	0,45	0,48	0,32	0,36	0,39	0,42	0,45	0,48	0,51	0,35	0,38	0,41	0,45	0,48	0,51	0,53
	20																					
	21	0,29	0,32	0,35	0,39	0,42	0,45	0,47	0,32	0,35	0,38	0,42	0,45	0,48	0,50	0,34	0,38	0,41	0,44	0,47	0,50	0,53
	22	0,57	0,64	0,70	0,76	0,82	0,88	0,93	0,63	0,69	0,75	0,81	0,87	0,93	0,99	0,68	0,75	0,81	0,87	0,93	0,99	1,04
	23	0,89	0,98	1,08	1,17	1,26	1,34	1,43	0,97	1,06	1,16	1,25	1,34	1,42	1,51	1,06	1,15	1,25	1,34	1,42	1,51	1,59
	24	1,22	1,34	1,44	1,56	1,68	1,79	1,90	1,32	1,44	1,54	1,66	1,78	1,89	2,00	1,43	1,56	1,65	1,77	1,89	2,00	2,11
	25	1,61	1,68	1,83	1,98	2,12	2,26	2,40	1,66	1,81	1,96	2,11	2,25	2,39	2,52	1,80	1,94	2,09	2,24	2,39	2,52	2,66
	26	1,87	2,05	2,22	2,40	2,56	2,71	2,87	2,02	2,20	2,37	2,54	2,70	2,85	3,01	2,18	2,36	2,53	2,71	2,86	3,02	3,17
	27	2,21	2,42	2,60	2,80	3,00	3,18	3,35	2,39	2,59	2,78	2,98	3,17	3,35	3,52	2,58	2,78	2,97	3,17	3,36	3,54	3,71
	28	2,56	2,80	3,02	3,25	3,47	3,67	3,89	2,75	2,89	3,22	3,44	3,66	3,96	4,07	2,97	3,21	3,44	3,66	3,88	4,09	4,30
	29	2,93	3,19	3,43	3,66	3,91	4,14	4,37	3,16	3,41	3,65	3,89	4,13	4,36	4,59	3,40	3,66	3,89	4,13	4,38	4,61	4,82
	30	3,31	3,57	3,86	4,15	4,41	4,66	4,92	3,55	3,81	4,10	4,38	4,66	4,90	5,16	3,82	4,08	4,37	4,65	4,93	5,17	5,42

TABLE VII (suite)

Corrections c de température sur la masse volumique des vins de liqueur
mesurée à l'aide d'un aréomètre ou d'un pycnomètre en *verre ordinaire*, à *t* °C, pour la ramener à 20 °C,

$$\rho_{20} = \rho_t \pm \frac{c}{1000}$$

− si *t* °C est inférieure à 20 °C
+ si *t* °C est supérieure à 20 °C

		Vins de 19% volume							Vins de 21% volume						
		Masses volumiques							Masses volumiques						
		1,000	1,020	1,040	1,060	1,080	1,100	1,120	1,000	1,020	1,040	1,060	1,080	1,100	1,120
Températures en °C	10	3,14	3,48	3,83	4,17	4,48	4,78	5,07	3,50	3,84	4,19	4,52	4,83	5,12	5,41
	11	2,87	3,18	3,49	3,78	4,06	4,32	4,57	3,18	3,49	3,80	4,09	4,34	4,63	4,88
	12	2,58	2,96	3,13	3,39	3,65	3,88	4,10	2,86	3,13	3,41	3,67	3,92	4,15	4,37
	13	2,31	2,55	2,77	2,99	3,20	3,41	3,61	2,56	2,79	3,01	3,23	3,44	3,65	3,85
	14	2,03	2,23	2,43	2,61	2,80	2,96	3,13	2,23	2,43	2,63	2,81	3,00	3,16	3,33
	15	1,69	1,86	2,02	2,18	2,33	2,48	2,62	1,86	2,03	2,19	2,35	2,50	2,65	2,80
	16	1,38	1,52	1,65	1,78	1,90	2,02	2,13	1,51	1,65	1,78	1,91	2,03	2,15	2,26
	17	1,06	1,16	1,26	1 ,35	1,44	1,53	1,62	1,15	1,25	1,35	1,45	1,54	1,63	1,71
	18	0,73	0,79	0,85	0,92	0,98	1,03	1,09	0,79	0,85	0,92	0,98	1,05	1,10	1,15
	19	0,38	0,41	0,44	0,48	0,51	0,52	0,56	0,41	0,44	0,47	0,51	0,54	0,57	0,59
	20														
	21	0,37	0,41	0,44	0,47	0,50	0,53	0,56	0,41	0,44	0,47	0,51	0,54	0,57	0,59
	22	0,75	0,81	0,87	0,93	0,99	1,04	1,10	0,81	0,88	0,94	1,00	1,06	1,10	1,17
	23	1,15	1,30	1,34	1,43	1,51	1,60	1,68	1,25	1,34	1,44	1,63	1,61	1,70	1,78
	24	1,55	1,67	1,77	1,89	2,00	2,11	2,23	1,68	1,80	1,90	2,02	2,13	2,25	2,36
	25	1,95	2,09	2,24	2,39	2,53	2,67	2,71	2,11	2,25	2,40	2,55	2,69	2,83	2,97
	26	2,36	2,54	2,71	2,89	3,04	3,20	3,35	2,55	2,73	2,90	3,07	3,22	3,38	3,54
	27	2,79	2,99	3,18	3,38	3,57	3,75	3,92	3,01	3,20	3,40	3,59	3,78	3,96	4,13
	28	3,20	3,44	3,66	3,89	4,11	4,32	4,53	3,46	3,69	3,93	4,15	4,36	4,58	4,77
	29	3,66	3,92	4,15	4,40	4,64	4,87	5,08	3,95	4,20	4,43	4,68	4,92	5,15	5,36
	30	4,11	4,37	4,66	4,94	5,22	5,46	5,71	4,42	4,68	4,97	5,25	5,53	5,77	6,02

ANNEXE II

Comparaison des résultats pour les méthodes de mesure de la masse volumique par le résonateur de flexion (Méthode B) et la balance hydrostatique (Méthode C)

À partir d'échantillons dont la masse volumique est comprise entre 0,992 et 1,012 g/cm3, il a été procédé à la mesure de la répétabilité et de la reproductibilité lors d'un essai inter laboratoire. Une comparaison a été effectuée entre la masse volumique de différents échantillons mesurés par la balance hydrostatique et par le densimètre électronique, incluant les valeurs de répétabilité et de reproductibilité dérivées des essais d'intercomparaison pluriannuels effectués sur une grande échelle.

1. Échantillons
Des vins de différentes masses volumiques et titres alcoométriques préparés mensuellement à une échelle industrielle, tirés d'un stock de bouteilles conservées dans des conditions normales, et fournis de manière anonyme aux laboratoires.

2. Laboratoires
Laboratoires participant aux essais mensuels organisés par Unione Italiana Vini (Vérone, Italie) d'après la réglementation ISO 5725 (UNI 9225) et le « International Protocol of Proficiency test for chemical analysis laboratories » établi par l'AOAC, l'ISO et l'IUPAC, et d'après les lignes directrices ISO 43 et ILAC G13. Un rapport annuel est fourni par l'organisation citée à tous les participants.

3. Appareils

3.1 Une balance hydrostatique électronique (dont la précision permet de donner la 5ème décimale), si possible équipée d'un appareil de traitement de données.

3.2 Un densimètre électronique, équipé si possible d'un échantillonneur automatique.

4. Analyses
Dans les essais de validation des méthodes d'analyse, chaque échantillon est analysé deux fois consécutives pour déterminer le titre alcoométrique.

5. Résultats

Le tableau 1 montre les résultats des mesures obtenues par les laboratoires utilisant une balance hydrostatique.

Le tableau 2 montre les résultats obtenus par les laboratoires utilisant un densimètre électronique.

6. Evaluations des résultats

6.1 Les résultats des essais ont été examinés pour mettre en évidence l'erreur systématique individuelle ($p < 0,025$) en utilisant successivement les tests de Cochran et de Grubbs, selon les procédures internationalement acceptées décrites dans le « Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method-Performance Studies » (protocole pour la conception, la conduite et l'interprétation des études de performance des méthodes).

6.2 *Répétabilité (r) et reproductibilité (R)*

Les calculs de répétabilité (r) et reproductibilité (R) définies par le protocole ont été effectués sur les résultats restant après élimination des valeurs aberrantes. Lors de l'évaluation d'une nouvelle méthode, il est fréquent qu'il n'existe pas de méthode de référence validée ou de méthode statutaire pour comparer les critères de précision ; pour comparer les données de précision obtenues lors des essais collaboratifs on se réfère donc à des niveaux de précision « estimés ». Ces niveaux « estimés » sont calculés d'après la formule d'Horwitz. La comparaison des résultats d'essais et les niveaux prévus indiquent si la méthode est suffisamment précise pour le niveau d'analyte mesuré. La valeur prédite d'Horwitz est calculée par la formule d'Horwitz.

$RSDR = 2^{(1-0,5 \log C)}$

où C est la concentration mesurée d'analyte exprimée en décimales (par ex. 1 g/100 g = 0,01).

La valeur Horrat donne une comparaison de la précision actuelle déterminée avec la précision prédite par la formule d'Horwitz pour la méthode et au niveau particulier de concentration de l'analyte ; elle est calculée comme suit :

HoR = RSDR(mesurée)/RSDR(Horwitz)

6.3 *Reproductibilité inter laboratoires*

Une valeur Horrat de 1 indique normalement une reproductibilité inter laboratoires satisfaisante, alors qu'une valeur supérieure à 2 indique normalement une reproductibilité non satisfaisante, i.e. une reproductibilité trop variable pour des raisons analytiques ou quand la variation obtenue est plus élevée que celle estimée pour la méthode employée. Hor est aussi calculé et utilisé pour déterminer la reproductibilité intra laboratoire en utilisant l'approximation suivante :

RSDr(Horwitz) = 0,66 RSDR(Horwitz) (ce qui suppose l'approximation suivante: r = 0,66 R)

CrD95 est la différence critique avec une probabilité de 95%. Le calcul est réalisé selon la résolution OIV-MA-AS1-08

Le tableau 3 montre les différences entre les mesures obtenues par les laboratoires utilisant le densimètre électronique et ceux utilisant la balance hydrostatique.

6.4 *Paramètres de fidélité*
Le tableau 4 montre la moyenne générale des paramètres de fidélité calculée à partir de tous les essais mensuels qui se sont déroulés entre janvier 2008 et décembre 2010.

Tableau 1: résultats obtenus par les laboratoires ayant réalisé les essais sur une balance hydrostatique (BH)

Échantillon	Moyenne	Nombre de valeurs totales	Nombre de Valeur retenues	répétabilité	s_r	RSDr	Hor	Reproductibilité	s_R	RSDRcalc	HoR	nº répét.	CrD95
01/08	0,995491	130	120	0,0001701	0,0000607	0,0061016	0,0046193	0,0005979	0,0002135	0,0214502	0,0107178	2	0,0004141
02/08	1,011475	146	125	0,0004714	0,0001684	0,0166457	0,0126320	0,0008705	0,0003109	0,0307366	0,0153947	2	0,0005686
03/08	0,992473	174	161	0,0001470	0,0000525	0,0052898	0,0040029	0,0004311	0,0001540	0,0155140	0,0077482	2	0,0002959
04/08	0,993147	172	155	0,0002761	0,0000986	0,0099274	0,0075130	0,0005446	0,0001945	0,0195839	0,0097818	2	0,0003595
05/08	1,004836	150	138	0,0001882	0,0000672	0,0066905	0,0050723	0,0007495	0,0002677	0,0266373	0,0133283	2	0,0005215
06/08	0,993992	152	136	0,0001486	0,0000531	0,0053391	0,0040411	0,0005302	0,0001894	0,0190506	0,0095167	2	0,0003675
07/08	0,992447	162	150	0,0002660	0,0000950	0,0095709	0,0072424	0,0006046	0,0002159	0,0217575	0,0108664	2	0,0004063
08/08	0,992210	162	151	0,0002619	0,0000935	0,0094281	0,0071341	0,0006309	0,0002253	0,0227108	0,0113420	2	0,0004265
09/08	1,002600	148	131	0,0001093	0,0000390	0,0038920	0,0029496	0,0007000	0,0002500	0,0249341	0,0124719	2	0,0004919
10/08	0,994482	174	152	0,0001228	0,0000439	0,0044105	0,0033385	0,0004250	0,0001518	0,0152645	0,0076259	2	0,0002942
11/08	0,992010	136	125	0,0000909	0,0000325	0,0032742	0,0024775	0,0004256	0,0001520	0,0153217	0,0076516	2	0,0002975
01/09	0,994184	174	152	0,0001655	0,0000591	0,0059435	0,0044987	0,0005439	0,0001942	0,0195384	0,0097606	2	0,0003756
02/09	0,992266	118	101	0,0001742	0,0000622	0,0062682	0,0047431	0,0005210	0,0001861	0,0187534	0,0093658	2	0,0003580
03/09	0,991886	164	135	0,0001850	0,0000661	0,0066603	0,0050395	0,0004781	0,0001707	0,0172136	0,0085963	2	0,0003251
04/09	0,993632	180	150	0,0001523	0,0000544	0,0054754	0,0041440	0,0004270	0,0001525	0,0153476	0,0076664	2	0,0002922
05/09	1,011061	116	100	0,0003659	0,0001307	0,0129234	0,0098067	0,0008338	0,0002978	0,0294527	0,0147508	2	0,0005605
06/09	0,992063	114	105	0,0002923	0,0001044	0,0105238	0,0079631	0,0005257	0,0001877	0,0189240	0,0094507	2	0,0003418
07/09	0,992708	172	155	0,0002892	0,0001033	0,0104040	0,0078732	0,0006156	0,0002199	0,0221478	0,0110617	2	0,0004106
08/09	0,993064	136	127	0,0002926	0,0001045	0,0105224	0,0079632	0,0007520	0,0002686	0,0270446	0,0135081	2	0,0005112
09/09	1,005285	118	110	0,0002946	0,0001052	0,0104661	0,0079352	0,0007226	0,0002581	0,0256704	0,0128454	2	0,0004892
10/09	0,992905	150	132	0,0002234	0,0000798	0,0080358	0,0060812	0,0004498	0,0001607	0,0161803	0,0080815	2	0,0002978
11/09	0,994016	142	127	0,0001896	0,0000677	0,0068114	0,0051555	0,0004739	0,0001693	0,0170278	0,0085062	2	0,0003214
01/10	0,994734	170	152	0,0002125	0,0000759	0,0076288	0,0057748	0,0005406	0,0001931	0,0194104	0,0096975	2	0,0003672
02/10	0,993177	120	110	0,0002210	0,0000789	0,0079467	0,0060140	0,0005800	0,0002071	0,0208565	0,0104175	2	0,0003950
03/10	0,992799	148	136	0,0002277	0,0000813	0,0081923	0,0061995	0,0015157	0,0005413	0,0545262	0,0272335	2	0,0010657
04/10	0,995420	172	157	0,0002644	0,0000944	0,0094866	0,0071819	0,0006286	0,0002245	0,0225542	0,0112693	2	0,0004244
05/10	1,002963	120	108	0,0007086	0,0002531	0,0252330	0,0191244	0,0013667	0,0004881	0,0486677	0,0243447	2	0,0008991
06/10	0,992546	120	113	0,0001737	0,0000620	0,0062506	0,0047300	0,0005435	0,0001941	0,0195567	0,0097673	2	0,0003744
07/10	0,992831	174	152	0,0003003	0,0001073	0,0108031	0,0081753	0,0006976	0,0002492	0,0250959	0,0125344	2	0,0004699
08/10	0,993184	144	130	0,0001799	0,0000642	0,0064674	0,0048945	0,0005951	0,0002125	0,0213984	0,0106882	2	0,0004111
09/10	1,012293	114	103	0,0002265	0,0000809	0,0079907	0,0060647	0,0014586	0,0005209	0,0514596	0,0257772	2	0,0010251
10/10	0,992289	154	136	0,0006386	0,0002281	0,0229860	0,0173933	0,0007033	0,0002512	0,0253124	0,0126415	2	0,0003812
11/10	0,994649	130	112	0,0002902	0,0001036	0,0104200	0,0078876	0,0005287	0,0001888	0,0189830	0,0094838	2	0,0003445

Tableau 2 : résultats obtenus par les laboratoires ayant réalisé les essais avec un densimètre électronique (DE)

Échantillon	Moyenne	Nombre de valeurs totales	Nombre de valeurs retenues	répétabilité	s_r	RSDr	Hor	Reproductibilité	s_R	RSDRcalc	HoR	nº répét.	CrD95
01/08	0,995504	114	108	0,0000755	0,0000270	0,0027085	0,0020505	0,0001571	0,0000561	0,0056361	0,0028162	2	0,0001045
02/08	1,011493	132	125	0,0001921	0,0000686	0,0067837	0,0051480	0,0004435	0,0001584	0,0156582	0,0078426	2	0,0002985
03/08	0,992491	138	118	0,0000746	0,0000266	0,0026830	0,0020303	0,0002745	0,0000980	0,0098776	0,0049332	2	0,0001905
04/08	0,993129	132	120	0,0001230	0,0000439	0,0044247	0,0033486	0,0002863	0,0001023	0,0102965	0,0051429	2	0,0001929
05/08	1,004892	136	116	0,0000926	0,0000331	0,0032893	0,0024937	0,0004777	0,0001706	0,0169785	0,0084955	2	0,0003346
06/08	0,994063	142	123	0,0000558	0,0000199	0,0020051	0,0015177	0,0001776	0,0000634	0,0063791	0,0031867	2	0,0001224
07/08	0,992498	136	125	0,0000822	0,0000294	0,0029576	0,0022381	0,0002094	0,0000748	0,0075368	0,0037641	2	0,0001423
08/08	0,992270	130	115	0,0000515	0,0000184	0,0018537	0,0014027	0,0001665	0,0000595	0,0059940	0,0029935	2	0,0001149
09/08	1,002603	136	121	0,0000821	0,0000293	0,0029236	0,0022157	0,0003328	0,0001189	0,0118565	0,0059306	2	0,0002318
10/08	**0,994493**	**128**	**117**	**0,0000667**	**0,0000238**	**0,0023954**	**0,0018132**	**0,0001429**	**0,0000510**	**0,0051309**	**0,0025633**	**2**	**0,0000954**
11/08	0,992017	118	104	0,0000842	0,0000301	0,0030309	0,0022933	0,0001962	0,0000701	0,0070644	0,0035279	2	0,0001322
01/09	0,994216	148	131	0,0000830	0,0000297	0,0029832	0,0022580	0,0001551	0,0000554	0,0055712	0,0027832	2	0,0001015
02/09	0,992251	104	88	0,0000947	0,0000338	0,0034097	0,0025801	0,0002846	0,0001017	0,0102451	0,0051165	2	0,0001956
03/09	0,991875	126	108	0,0001271	0,0000454	0,0045777	0,0034637	0,0002067	0,0000738	0,0074421	0,0037165	2	0,0001316
04/09	0,993654	134	114	0,0001166	0,0000416	0,0041899	0,0031711	0,0002043	0,0000730	0,0073417	0,0036673	2	0,0001322
05/09	1,011035	128	104	0,0002388	0,0000853	0,0084361	0,0064016	0,0003554	0,0001269	0,0125542	0,0062875	2	0,0002211
06/09	0,992104	116	106	0,0001005	0,0000359	0,0036178	0,0027375	0,0003169	0,0001132	0,0114088	0,0056976	2	0,0002184
07/09	0,992720	144	140	0,0001579	0,0000564	0,0056815	0,0042995	0,0002916	0,0001042	0,0104923	0,0052404	2	0,0001905
08/09	0,993139	110	102	0,0001175	0,0000420	0,0042242	0,0031969	0,0003603	0,0001287	0,0129577	0,0064721	2	0,0002479
09/09	1,005276	112	108	0,0001100	0,0000393	0,0039070	0,0029622	0,0003522	0,0001258	0,0125134	0,0062617	2	0,0002429
10/09	0,992912	122	111	0,0000705	0,0000252	0,0025365	0,0019195	0,0002122	0,0000758	0,0076315	0,0038117	2	0,0001458
11/09	0,994031	128	118	0,0000718	0,0000256	0,0025784	0,0019516	0,0001639	0,0000585	0,0058883	0,0029415	2	0,0001102
01/10	0,994752	144	136	0,0000773	0,0000276	0,0027765	0,0021017	0,0001787	0,0000638	0,0064144	0,0032046	2	0,0001203
02/10	0,993181	108	98	0,0001471	0,0000525	0,0052893	0,0040029	0,0001693	0,0000605	0,0060884	0,0030410	2	0,0000945
03/10	0,992665	140	127	0,0001714	0,0000612	0,0061683	0,0046678	0,0002378	0,0000849	0,0085559	0,0042732	2	0,0001447
04/10	0,995502	142	128	0,0001175	0,0000419	0,0042138	0,0031901	0,0002320	0,0000829	0,0083248	0,0041596	2	0,0001532
05/10	1,002851	130	119	0,0001195	0,0000427	0,0042555	0,0032253	0,0002971	0,0001061	0,0105815	0,0052930	2	0,0002014
06/10	0,992607	106	99	0,0001228	0,0000438	0,0044172	0,0033427	0,0002226	0,0000795	0,0080092	0,0040001	2	0,0001449
07/10	0,992871	160	150	0,0001438	0,0000513	0,0051712	0,0039134	0,0003732	0,0001333	0,0134258	0,0067057	2	0,0002539
08/10	0,993235	104	93	0,0000895	0,0000320	0,0032182	0,0024356	0,0002458	0,0000878	0,0088399	0,0044154	2	0,0001680
09/10	1,012328	112	105	0,0000870	0,0000311	0,0030692	0,0023295	0,0003395	0,0001213	0,0119781	0,0060001	2	0,0002361
10/10	0,992308	128	115	0,0000606	0,0000216	0,0021811	0,0016504	0,0001635	0,0000584	0,0058845	0,0029388	2	0,0001116
11/10	0,994683	120	108	0,0001127	0,0000402	0,0040450	0,0030620	0,0001597	0,0000570	0,0057339	0,0028647	2	0,0000979

Tableau 3 : Comparaison des résultats entre la balance hydrostatique (BH) et la densimétrie électronique (DE)

Masse volumique - Balance hydrostatique				**Masse volumique - Résonateur de flexion**				**Comparaison**
Échantillon	Valeur moyenne	Valeurs totales	Valeurs retenues	Échantillon	Valeur moyenne	Valeurs totales	Valeurs retenues	Δ(BH-DE)
01/08	0,995491	130	120	01/08	0,995504	114	108	-0,000013
02/08	1,011475	146	125	02/08	1,011493	132	125	-0,000018
03/08	0,992473	174	161	03/08	0,992491	138	118	-0,000018
04/08	0,993147	172	155	04/08	0,993129	132	120	0,000018
05/08	1,004836	150	138	05/08	1,004892	136	116	-0,000056
06/08	0,993992	152	136	06/08	0,994063	142	123	-0,000071
07/08	0,992447	162	150	07/08	0,992498	136	125	-0,000051
08/08	0,992210	162	151	08/08	0,992270	130	115	-0,000060
09/08	1,002600	148	131	09/08	1,002603	136	121	-0,000003
10/08	0,994482	174	152	10/08	0,994493	128	117	-0,000011
11/08	0,992010	136	125	11/08	0,992017	118	104	-0,000007
01/09	0,994184	174	152	01/09	0,994216	148	131	-0,000031
02/09	0,992266	118	101	02/09	0,992251	104	88	0,000015
03/09	0,991886	164	135	03/09	0,991875	126	108	0,000011
04/09	0,993632	180	150	04/09	0,993654	134	114	-0,000022
05/09	1,011061	116	100	05/09	1,011035	128	104	0,000026
06/09	0,992063	114	105	06/09	0,992104	116	106	-0,000041
07/09	0,992708	172	155	07/09	0,992720	144	140	-0,000012
08/09	0,993064	136	127	08/09	0,993139	110	102	-0,000075
09/09	1,005285	118	110	09/09	1,005276	112	108	0,000009
10/09	0,992905	150	132	10/09	0,992912	122	111	-0,000008
11/09	0,994016	142	127	11/09	0,994031	128	118	-0,000015
01/10	0,994734	170	152	01/10	0,994752	144	136	-0,000018
02/10	0,993177	120	110	02/10	0,993181	108	98	-0,000005
03/10	0,992799	148	136	03/10	0,992665	140	127	0,000134
04/10	0,995420	172	157	04/10	0,995502	142	128	-0,000082
05/10	1,002963	120	108	05/10	1,002851	130	119	0,000112
06/10	0,992546	120	113	06/10	0,992607	106	99	-0,000061
07/10	0,992831	174	152	07/10	0,992871	160	150	-0,000040
08/10	0,993184	144	130	08/10	0,993235	104	93	-0,000052
09/10	1,012293	114	103	09/10	1,012328	112	105	-0,000035
10/10	0,992289	154	136	10/10	0,992308	128	115	-0,000019
11/10	0,994649	130	112	11/10	0,994683	120	108	-0,000035
						moyenne	Δ(BH-DE)	-0,0000162
						écart-type.	Δ(BH-DE)	0,0000447

Tableau 4 : Paramètres de fidélité

	balance hydrostatique (BH)	*densimétrie électronique (DE)*
n° valeurs retenues	4347	3800
min	0,99189 g/cm3	0,99187 g/cm3
max	1,01229 g/cm3	1,01233 g/cm3
R	0,00067 g/cm3	0,00025 g/cm3
s_R	0,00024 g/cm3	0,000091 g/cm3
R%	0,067 %	0,025 %
r	0,00025 g/cm3	0,00011 g/cm3
s_r	0,000090 g/cm3	0,000038 g/cm3
r%	0,025 %	0,011 %

Légende :
n : *nombre de valeurs retenues*
min : limite inférieure de la plage de mesure
max : limite supérieure de la plage de mesure
r : répétabilité
s_r *: écart-type de répétabilité*
r% : répétabilité relative (r x 100 / valeur moyenne)
R : reproductibilité
s_R *: écart-type de reproductibilité*
R% : reproductibilité relative (R x 100 / valeur moyenne)

6. BIBLIOGRAPHIE

JAULMES P., *Bull. O.I.V.,* 1953, **26,** No 274, 6.

JAULMES P., BRUN Mme S, *Trav. Soc. Pharm., Montpellier,* 1956, **16,** 115 ; 1960.
20, 137 ; *Ann. Fals. Exp. Chim.,* 1963, **46,** 129 et 143,

BRUN Mme S. et TEP Y., *Ann. Fals. Exp. Chim.,* 37-40 ; *F.V., O.I.V,* 1975, No 539,

Méthode OIV-MA-AS2-02 Méthode Type I

Évaluation de la teneur en sucres des moûts, des moûts concentrés et du sucre de raisin par réfractométrie

(OENO 21/2004 ;
OIV/OENO 377/2009)
(OIV-OENO 466-2012)

1. Principe de la méthode

L'indice de réfraction à 20 °C, exprimé en indice absolu ou en pourcentage en masse de saccharose, est reporté dans la table correspondante pour obtenir la teneur en sucres en grammes par litre et en grammes par kilogramme des moûts, des moûts concentrés et du sucre de raisin.

2. Appareillage

Réfractomètre du type Abbé.

Le réfractomètre utilisé doit être pourvu d'une échelle indiquant :

- soit les pourcentages en masse de saccharose à 0,1 % près,
- soit les indices de réfraction avec 4 décimales.

Le réfractomètre doit être pourvu d'un thermomètre dont l'échelle s'étendra au moins de + 15 °C à + 25 °C et d'un dispositif de circulation d'eau permettant de faire les mesures à une température de 20 °C ± 5 °C.

Les instructions opératoires de cet instrument doivent être strictement suivies, notamment en ce qui concerne l'étalonnage et la source lumineuse.

3. Préparation de l'échantillon

3.1. Moûts et moûts concentrés

Passer les moûts éventuellement à travers une gaze sèche pliée en quatre et, après avoir éliminé les premières gouttes de filtrat, faire la détermination sur le produit filtré.

3.2. Sucre de raisin

Utiliser, selon sa concentration, soit le sucre de raisin, soit la solution obtenue en portant à 500 g, avec de l'eau, 200 g du sucre de raisin exactement pesés.

4. Mode opératoire

Amener l'échantillon à une température voisine de 20 °C.

Déposer une petite prise d'essai sur le prisme inférieur du réfractomètre en veillant à ce que, les prismes étant pressés l'un contre l'autre, la prise d'essai couvre uniformément la surface du verre, et effectuer la mesure conformément aux instructions opératoires de l'appareil utilisé. Lire le pourcentage en masse de saccharose à 0,1 % près ou relever l'indice de réfraction avec quatre décimales.

Effectuer au moins deux déterminations sur le même échantillon préparé. Relever la température *t* °C.

5. **Calculs**

5.1. *Correction de température*

- Appareils gradués en % en masse de saccharose : utiliser la Table I pour la correction de température.
- Appareils gradués en indices de réfraction; reporter l'indice mesuré à *t* °C dans la Table II pour obtenir (colonne 1) la valeur correspondante du pourcentage en masse de saccharose à *t* °C. Cette valeur est corrigée de la température et exprimée à 20 °C au moyen de la Table I.

5.2. *Teneur en sucres des moûts et des moûts concentrés*

Reporter le pourcentage en masse de saccharose à 20 °C dans la Table II pour obtenir la teneur en sucres en grammes par litre et en grammes par kilogramme. La teneur en sucres est exprimée en sucre interverti avec une décimale.

5.3. *Teneur en sucres du sucre de raisin*

Reporter le pourcentage en masse de saccharose à 20 °C dans la table III pour obtenir la teneur en sucres en grammes par litre et en grammes par kilogramme. La teneur en sucre est exprimée en sucre interverti avec une décimale.

Si la mesure a été effectuée sur le sucre de raisin dilué, multiplier le résultat par le facteur de dilution.

5.4. *Indice de réfraction des moûts, des moûts concentrés et du sucre de raisin*

Reporter le pourcentage en masse de saccharose à 20 °C dans la Table II pour obtenir l'indice de réfraction à 20 °C. Cet indice est exprimé avec quatre décimales.

Table I

Correction à apporter dans le cas où le pourcentage en masse de saccharose a été déterminé à une température différente de 20 °C.

Température °C	Titre massique mesuré en %													
	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75
5	–0,82	–0,87	–0,92	–0,95	–0,99									
6	–0,80	–0,82	–0,87	–0,90	–0,94									
7	–0,74	–0,78	–0,82	–0,84	–0,88									
8	–0,69	–0,73	–0,76	–0,79	–0,82									
9	–0,64	–0,67	–0,71	–0,73	–0,75									
10	–0,59	–0,62	–0,65	–0,67	–0,69	–0,71	–0,72	–0,73	–0,74	–0,75	–0,75	–0,75	–0,75	–0,75
11	–0,54	–0,57	–0,59	–0,61	–0,63	–0,64	–0,65	–0,66	–0,67	–0,68	–0,68	–0,68	–0,68	–0,67
12	–0,49	–0,51	–0,53	–0,55	–0,56	–0,57	–0,58	–0,59	–0,60	–0,60	–0,61	–0,61	–0,60	–0,60
13	–0,43	–0,45	–0,47	–0,48	–0,50	–0,51	–0,52	–0,52	–0,53	–0,53	–0,53	–0,53	–0,53	–0,53
14	–0,38	–0,39	–0,40	–0,42	–0,43	–0,44	–0,44	–0,45	–0,45	–0,46	–0,46	–0,46	–0,46	–0,45
15	–0,32	–0,33	–0,34	–0,35	–0,36	–0,37	–0,37	–0,38	–0,38	–0,38	–0,38	–0,38	–0,38	–0,38
16	–0,26	–0,27	–0,28	–0,28	–0,29	–0,30	–0,30	–0,30	–0,31	–0,31	–0,31	–0,31	–0,31	–0,30
17	–0,20	–0,20	–0,21	–0,21	–0,22	–0,22	–0,23	–0,23	–0,23	–0,23	–0,23	–0,23	–0,23	–0,23
18	–0,13	–0,14	–0,14	–0,14	–0,15	–0,15	–0,15	–0,15	–0,15	–0,15	–0,15	–0,15	–0,15	–0,15
19	–0,07	–0,07	–0,07	–0,07	–0,07	–0,08	–0,08	–0,08	–0,08	–0,08	–0,08	–0,08	–0,08	–0,08
20	0				RÉFÉREN CE								0	
21	+0,07	+0,07	+0,07	+0,07	+0,08	+0,08	+0,08	+0,08	+0,08	+0,08	+0,08	+0,08	+0,08	+0,08
22	+0,14	+0,14	+0,15	+0,15	+0,15	+0,15	+0,16	+0,16	+0,16	+0,16	+0,16	+0,16	+0,15	+0,15
23	+0,21	+0,22	+0,22	+0,23	+0,23	+0,23	+0,23	+0,24	+0,24	+0,24	+0,24	+0,23	+0,23	+0,23
24	+0,29	+0,29	+0,30	+0,30	+0,31	+0,31	+0,31	+0,32	+0,32	+0,32	+0,32	+0,31	+0,31	+0,31
25	+0,36	+0,37	+0,38	+0,38	+0,39	+0,39	+0,40	+0,40	+0,40	+0,40	+0,40	+0,39	+0,39	+0,39
26	+0,44	+0,45	+0,46	+0,46	+0,47	+0,47	+0,48	+0,48	+0,48	+0,48	+0,48	+0,47	+0,47	+0,46
27	+0,52	+0,53	+0,54	+0,55	+0,55	+0,56	+0,56	+0,56	+0,56	+0,56	+0,56	+0,55	+0,55	+0,54
28	+0,60	+0,61	+0,62	+0,63	+0,64	+0,64	+0,64	+0,65	+0,65	+0,64	+0,64	+0,64	+0,63	+0,62
29	+0,68	+0,69	+0,70	+0,71	+0,72	+0,73	+0,73	+0,73	+0,73	+0,73	+0,72	+0,72	+0,71	+0,70
30	+0,77	+0,78	+0,79	+0,80	+0,81	+0,81	+0,81	+0,82	+0,81	+0,81	+0,81	+0,80	+0,79	+0,78
31	+0,85	+0,87	+0,88	+0,89	+0,89	+0,90	+0,90	+0,90	+0,90	+0,90	+0,89	+0,88	+0,87	+0,86
32	+0,94	+0,95	+0,96	+0,97	+0,98	+0,99	+0,99	+0,99	+0,99	+0,98	+0,97	+0,96	+0,95	+0,94
33	+1,03	+1,04	+1,05	+1,06	+1,07	+1,08	+1,08	+1,08	+1,07	+1,07	+1,06	+1,05	+1,03	+1,02
34	+1,12	+1,19	+1,15	+1,15	+1,16	+1,17	+1,17	+1,17	+1,16	+1,15	+1,14	+1,13	+1,12	+1,10
35	+1,22	+1,23	+1,24	+1,25	+1,25	+1,26	+1,26	+1,25	+1,25	+1,24	+1,23	+1,21	+1,20	+1,18
36	+1,31	+1,32	+1,33	+1,34	+1,35	+1,35	+1,35	+1,35	+1,34	+1,33	+1,32	+1,30	+1,28	+1,26
37	+1,41	+1,42	+1,43	+1,44	+1,44	+1,44	+1,44	+1,44	+1,43	+1,42	+1,40	+1,38	+1,36	+1,34
38	+1,51	+1,52	+1,53	+1,53	+1,54	+1,54	+1,53	+1,53	+1,52	+1,51	+1,49	+1,47	+1,45	+1,42
39	+1,61	+1,62	+1,62	+1,63	+1,63	+1,63	+1,63	+1,62	+1,61	+1,60	+1,58	+1,56	+1,53	+1,50
40	+1,71	+1,72	+1,72	+1,73	+1,73	+1,73	+1,72	+1,71	+1,70	+1,69	+1,67	+1,64	+1,62	+1,59

Il est préférable que les variations de température par rapport à 20 °C n'excèdent pas ± 5 °C.

TABLEAU II

Tableau donnant la teneur en sucres des moûts et des moûts concentrés en grammes par litre et en grammes par kilogramme, déterminée au moyen d'un réfractomètre gradué, soit en pourcentage en masse de saccharose à 20 °C, soit en indice de réfraction à 20 °C. La masse volumique et le titre alcoométrique volumique en puissance %vol à 20 °C sont également donnés.

Saccharose % (m/m)	Indice de réfraction à 20 °C	Masse volumique à 20 °C	Sucres en g/l	Sucres en g/kg	TAV % vol à 20 °C
10.0	1.34782	1.0391	82.2	79.1	4.89
10.1	1.34798	1.0395	83.3	80.1	4.95
10.2	1.34813	1.0399	84.3	81.1	5.01
10.3	1.34829	1.0403	85.4	82.1	5.08
10.4	1.34844	1.0407	86.5	83.1	5.14
10.5	1.34860	1.0411	87.5	84.1	5.20
10.6	1.34875	1.0415	88.6	85.0	5.27
10.7	1.34891	1.0419	89.6	86.0	5.32
10.8	1.34906	1.0423	90.7	87.0	5.39
10.9	1.34922	1.0427	91.8	88.0	5.46
11.0	1.34937	1.0431	92.8	89.0	5.52
11.1	1.34953	1.0436	93.9	90.0	5.58
11.2	1.34968	1.0440	95.0	91.0	5.65
11.3	1.34984	1.0444	96.0	92.0	5.71
11.4	1.34999	1.0448	97.1	92.9	5.77
11.5	1.35015	1.0452	98.2	93.9	5.84
11.6	1.35031	1.0456	99.3	94.9	5.90
11.7	1.35046	1.0460	100.3	95.9	5.96
11.8	1.35062	1.0464	101.4	96.9	6.03
11.9	1.35077	1.0468	102.5	97.9	6.09
12.0	1.35093	1.0472	103.5	98.9	6.15
12.1	1.35109	1.0477	104.6	99.9	6.22
12.2	1.35124	1.0481	105.7	100.8	6.28
12.3	1.35140	1.0485	106.8	101.8	6.35
12.4	1.35156	1.0489	107.8	102.8	6.41
12.5	1.35171	1.0493	108.9	103.8	6.47
12.6	1.35187	1.0497	110.0	104.8	6.54
12.7	1.35203	1.0501	111.1	105.8	6.60
12.8	1.35219	1.0506	112.2	106.8	6.67
12.9	1.35234	1.0510	113.2	107.8	6.73
13.0	1.35250	1.0514	114.3	108.7	6.79
13.1	1.35266	1.0518	115.4	109.7	6.86
13.2	1.35282	1.0522	116.5	110.7	6.92
13.3	1.35298	1.0527	117.6	111.7	6.99
13.4	1.35313	1.0531	118.7	112.7	7.05
13.5	1.35329	1.0535	119.7	113.7	7.11
13.6	1.35345	1.0539	120.8	114.7	7.18
13.7	1.35361	1.0543	121.9	115.6	7.24
13.8	1.35377	1.0548	123.0	116.6	7.31
13.9	1.35393	1.0552	124.1	117.6	7.38
14.0	1.35408	1.0556	125.2	118.6	7.44
14.1	1.35424	1.0560	126.3	119.6	7.51
14.2	1.35440	1.0564	127.4	120.6	7.57
14.3	1.35456	1.0569	128.5	121.6	7.64
14.4	1.35472	1.0573	129.6	122.5	7.70
14.5	1.35488	1.0577	130.6	123.5	7.76
14.6	1.35504	1.0581	131.7	124.5	7.83
14.7	1.35520	1.0586	132.8	125.5	7.89
14.8	1.35536	1.0590	133.9	126.5	7.96

14.9	1.35552	1.0594	135.0	127.5	8.02

TABLEAU II - (suite)

Saccharose % (m/m)	Indice de réfraction à 20 °C	Masse volumique à 20 °C	Sucres en g/l	Sucres en g/kg	TAV % vol à 20 °C
15.0	1.35568	1.0598	136.1	128.4	8.09
15.1	1.35584	1.0603	137.2	129.4	8.15
15.2	1.35600	1.0607	138.3	130.4	8.22
15.3	1.35616	1.0611	139.4	131.4	8.28
15.4	1.35632	1.0616	140.5	132.4	8.35
15.5	1.35648	1.0620	141.6	133.4	8.42
15.6	1.35664	1.0624	142.7	134.3	8.48
15.7	1.35680	1.0628	143.8	135.3	8.55
15.8	1.35696	1.0633	144.9	136.3	8.61
15.9	1.35713	1.0637	146.0	137.3	8.68
16.0	1.35729	1.0641	147.1	138.3	8.74
16.1	1.35745	1.0646	148.2	139.3	8.81
16.2	1.35761	1.0650	149.3	140.2	8.87
16.3	1.35777	1.0654	150.5	141.2	8.94
16.4	1.35793	1.0659	151.6	142.2	9.01
16.5	1.35810	1.0663	152.7	143.2	9.07
16.6	1.35826	1.0667	153.8	144.2	9.14
16.7	1.35842	1.0672	154.9	145.1	9.21
16.8	1.35858	1.0676	156.0	146.1	9.27
16.9	1.35874	1.0680	157.1	147.1	9.34
17.0	1.35891	1.0685	158.2	148.1	9.40
17.1	1.35907	1.0689	159.3	149.1	9.47
17.2	1.35923	1.0693	160.4	150.0	9.53
17.3	1.35940	1.0698	161.6	151.0	9.60
17.4	1.35956	1.0702	162.7	152.0	9.67
17.5	1.35972	1.0707	163.8	153.0	9.73
17.6	1.35989	1.0711	164.9	154.0	9.80
17.7	1.36005	1.0715	166.0	154.9	9.87
17.8	1.36021	1.0720	167.1	155.9	9.93
17.9	1.36038	1.0724	168.3	156.9	10.00
18.0	1.36054	1.0729	169.4	157.9	10.07
18.1	1.36070	1.0733	170.5	158.9	10.13
18.2	1.36087	1.0737	171.6	159.8	10.20
18.3	1.36103	1.0742	172.7	160.8	10.26
18.4	1.36120	1.0746	173.9	161.8	10.33
18.5	1.36136	1.0751	175.0	162.8	10.40
18.6	1.36153	1.0755	176.1	163.7	10.47
18.7	1.36169	1.0760	177.2	164.7	10.53
18.8	1.36185	1.0764	178.4	165.7	10.60
18.9	1.36202	1.0768	179.5	166.7	10.67
19.0	1.36219	1.0773	180.6	167.6	10.73
19.1	1.36235	1.0777	181.7	168.6	10.80
19.2	1.36252	1.0782	182.9	169.6	10.87
19.3	1.36268	1.0786	184.0	170.6	10.94
19.4	1.36285	1.0791	185.1	171.5	11.00
19.5	1.36301	1.0795	186.2	172.5	11.07
19.6	1.36318	1.0800	187.4	173.5	11.14
19.7	1.36334	1.0804	188.5	174.5	11.20
19.8	1.36351	1.0809	189.6	175.4	11.27
19.9	1.36368	1.0813	190.8	176.4	11.34

TABLEAU II - (suite)

Saccharose % (m/m)	Indice de réfraction à 20 °C	Masse volumique à 20 °C	Sucres en g/l	Sucres en g/kg	TAV % vol à 20 °C
20.0	1.36384	1.0818	191.9	177.4	11.40
20.1	1.36401	1.0822	193.0	178.4	11.47
20.2	1.36418	1.0827	194.2	179.3	11.54
20.3	1.36434	1.0831	195.3	180.3	11.61
20.4	1.36451	1.0836	196.4	181.3	11.67
20.5	1.36468	1.0840	197.6	182.3	11.74
20.6	1.36484	1.0845	198.7	183.2	11.81
20.7	1.36501	1.0849	199.8	184.2	11.87
20.8	1.36518	1.0854	201.0	185.2	11.95
20.9	1.36535	1.0858	202.1	186.1	12.01
21.0	1.36551	1.0863	203.3	187.1	12.08
21.1	1.36568	1.0867	204.4	188.1	12.15
21.2	1.36585	1.0872	205.5	189.1	12.21
21.3	1.36602	1.0876	206.7	190.0	12.28
21.4	1.36619	1.0881	207.8	191.0	12.35
21.5	1.36635	1.0885	209.0	192.0	12.42
21.6	1.36652	1.0890	210.1	192.9	12.49
21.7	1.36669	1.0895	211.3	193.9	12.56
21.8	1.36686	1.0899	212.4	194.9	12.62
21.9	1.36703	1.0904	213.6	195.9	12.69
22.0	1.36720	1.0908	214.7	196.8	12.76
22.1	1.36737	1.0913	215.9	197.8	12.83
22.2	1.36754	1.0917	217.0	198.8	12.90
22.3	1.36771	1.0922	218.2	199.7	12.97
22.4	1.36787	1.0927	219.3	200.7	13.03
22.5	1.36804	1.0931	220.5	201.7	13.10
22.6	1.36821	1.0936	221.6	202.6	13.17
22.7	1.36838	1.0940	222.8	203.6	13.24
22.8	1.36855	1.0945	223.9	204.6	13.31
22.9	1.36872	1.0950	225.1	205.5	13.38
23.0	1.36889	1.0954	226.2	206.5	13.44
23.1	1.36906	1.0959	227.4	207.5	13.51
23.2	1.36924	1.0964	228.5	208.4	13.58
23.3	1.36941	1.0968	229.7	209.4	13.65
23.4	1.36958	1.0973	230.8	210.4	13.72
23.5	1.36975	1.0977	232.0	211.3	13.79
23.6	1.36992	1.0982	233.2	212.3	13.86
23.7	1.37009	1.0987	234.3	213.3	13.92
23.8	1.37026	1.0991	235.5	214.2	14.00
23.9	1.37043	1.0996	236.6	215.2	14.06
24.0	1.37060	1.1001	237.8	216.2	14.13
24.1	1.37078	1.1005	239.0	217.1	14.20
24.2	1.37095	1.1010	240.1	218.1	14.27
24.3	1.37112	1.1015	241.3	219.1	14.34
24.4	1.37129	1.1019	242.5	220.0	14.41
24.5	1.37146	1.1024	243.6	221.0	14.48
24.6	1.37164	1.1029	244.8	222.0	14.55
24.7	1.37181	1.1033	246.0	222.9	14.62
24.8	1.37198	1.1038	247.1	223.9	14.69
24.9	1.37216	1.1043	248.3	224.8	14.76

TABLEAU II - (suite)

Saccharose % (m/m)	Refractive Index at 20°C	Mass Density at 20°C	Sugars In g/l	Sugars In g/Kg	ABV % vol At 20°C
25.0	1.37233	1.1047	249.5	225.8	14.83
25.1	1.37250	1.1052	250.6	226.8	14.89
25.2	1.37267	1.1057	251.8	227.7	14.96
25.3	1.37285	1.1062	253.0	228.7	15.04
25.4	1.37302	1.1066	254.1	229.7	15.10
25.5	1.37319	1.1071	255.3	230.6	15.17
25.6	1.37337	1.1076	256.5	231.6	15.24
25.7	1.37354	1.1080	257.7	232.5	15.32
25.8	1.37372	1.1085	258.8	233.5	15.38
25.9	1.37389	1.1090	260.0	234.5	15.45
26.0	1.37407	1.1095	261.2	235.4	15.52
26.1	1.37424	1.1099	262.4	236.4	15.59
26.2	1.37441	1.1104	263.6	237.3	15.67
26.3	1.37459	1.1109	264.7	238.3	15.73
26.4	1.37476	1.1114	265.9	239.3	15.80
26.5	1.37494	1.1118	267.1	240.2	15.87
26.6	1.37511	1.1123	268.3	241.2	15.95
26.7	1.37529	1.1128	269.5	242.1	16.02
26.8	1.37546	1.1133	270.6	243.1	16.08
26.9	1.37564	1.1138	271.8	244.1	16.15
27.0	1.37582	1.1142	273.0	245.0	16.22
27.1	1.37599	1.1147	274.2	246.0	16.30
27.2	1.37617	1.1152	275.4	246.9	16.37
27.3	1.37634	1.1157	276.6	247.9	16.44
27.4	1.37652	1.1161	277.8	248.9	16.51
27.5	1.37670	1.1166	278.9	249.8	16.58
27.6	1.37687	1.1171	280.1	250.8	16.65
27.7	1.37705	1.1176	281.3	251.7	16.72
27.8	1.37723	1.1181	282.5	252.7	16.79
27.9	1.37740	1.1185	283.7	253.6	16.86
28.0	1.37758	1.1190	284.9	254.6	16.93
28.1	1.37776	1.1195	286.1	255.5	17.00
28.2	1.37793	1.1200	287.3	256.5	17.07
28.3	1.37811	1.1205	288.5	257.5	17.15
28.4	1.37829	1.1210	289.7	258.4	17.22
28.5	1.37847	1.1214	290.9	259.4	17.29
28.6	1.37864	1.1219	292.1	260.3	17.36
28.7	1.37882	1.1224	293.3	261.3	17.43
28.8	1.37900	1.1229	294.5	262.2	17.50
28.9	1.37918	1.1234	295.7	263.2	17.57
29.0	1.37936	1.1239	296.9	264.2	17.64
29.1	1.37954	1.1244	298.1	265.1	17.72
29.2	1.37972	1.1248	299.3	266.1	17.79
29.3	1.37989	1.1253	300.5	267.0	17.86
29.4	1.38007	1.1258	301.7	268.0	17.93
29.5	1.38025	1.1263	302.9	268.9	18.00
29.6	1.38043	1.1268	304.1	269.9	18.07
29.7	1.38061	1.1273	305.3	270.8	18.14
29.8	1.38079	1.1278	306.5	271.8	18.22
29.9	1.38097	1.1283	307.7	272.7	18.29

TABLEAU II - (suite)

Saccharose % (m/m)	Indice de réfraction à 20 °C	Masse volumique à 20 °C	Sucres en g/l	Sucres en g/kg	TAV % vol à 20 °C
30.0	1.38115	1.1287	308.9	273.7	18.36
30.1	1.38133	1.1292	310.1	274.6	18.43
30.2	1.38151	1.1297	311.3	275.6	18.50
30.3	1.38169	1.1302	312.6	276.5	18.58
30.4	1.38187	1.1307	313.8	277.5	18.65
30.5	1.38205	1.1312	315.0	278.5	18.72
30.6	1.38223	1.1317	316.2	279.4	18.79
30.7	1.38241	1.1322	317.4	280.4	18.86
30.8	1.38259	1.1327	318.6	281.3	18.93
30.9	1.38277	1.1332	319.8	282.3	19.01
31.0	1.38296	1.1337	321.1	283.2	19.08
31.1	1.38314	1.1342	322.3	284.2	19.15
31.2	1.38332	1.1346	323.5	285.1	19.23
31.3	1.38350	1.1351	324.7	286.1	19.30
31.4	1.38368	1.1356	325.9	287.0	19.37
31.5	1.38386	1.1361	327.2	288.0	19.45
31.6	1.38405	1.1366	328.4	288.9	19.52
31.7	1.38423	1.1371	329.6	289.9	19.59
31.8	1.38441	1.1376	330.8	290.8	19.66
31.9	1.38459	1.1381	332.1	291.8	19.74
32.0	1.38478	1.1386	333.3	292.7	19.81
32.1	1.38496	1.1391	334.5	293.7	19.88
32.2	1.38514	1.1396	335.7	294.6	19.95
32.3	1.38532	1.1401	337.0	295.6	20.03
32.4	1.38551	1.1406	338.2	296.5	20.10
32.5	1.38569	1.1411	339.4	297.5	20.17
32.6	1.38587	1.1416	340.7	298.4	20.25
32.7	1.38606	1.1421	341.9	299.4	20.32
32.8	1.38624	1.1426	343.1	300.3	20.39
32.9	1.38643	1.1431	344.4	301.3	20.47
33.0	1.38661	1.1436	345.6	302.2	20.54
33.1	1.38679	1.1441	346.8	303.2	20.61
33.2	1.38698	1.1446	348.1	304.1	20.69
33.3	1.38716	1.1451	349.3	305.0	20.76
33.4	1.38735	1.1456	350.6	306.0	20.84
33.5	1.38753	1.1461	351.8	306.9	20.91
33.6	1.38772	1.1466	353.0	307.9	20.98
33.7	1.38790	1.1471	354.3	308.8	21.06
33.8	1.38809	1.1476	355.5	309.8	21.13
33.9	1.38827	1.1481	356.8	310.7	21.20
34.0	1.38846	1.1486	358.0	311.7	21.28
34.1	1.38864	1.1491	359.2	312.6	21.35
34.2	1.38883	1.1496	360.5	313.6	21.42
34.3	1.38902	1.1501	361.7	314.5	21.50
34.4	1.38920	1.1507	363.0	315.5	21.57
34.5	1.38939	1.1512	364.2	316.4	21.64
34.6	1.38958	1.1517	365.5	317.4	21.72
34.7	1.38976	1.1522	366.7	318.3	21.79
34.8	1.38995	1.1527	368.0	319.2	21.87
34.9	1.39014	1.1532	369.2	320.2	21.94

TABLEAU II - (suite)

Saccharose % (m/m)	Indice de réfraction à 20 °C	Masse volumique à 20 °C	Sucres en g/l	Sucres en g/kg	TAV % vol à 20 °C
40.0	1.39986	1.1796	434.4	368.3	25.82
40.1	1.40006	1.1801	435.7	369.2	25.89
40.2	1.40025	1.1807	437.0	370.1	25.97
40.3	1.40044	1.1812	438.3	371.1	26.05
40.4	1.40064	1.1817	439.6	372.0	26.13
40.5	1.40083	1.1823	440.9	373.0	26.20
40.6	1.40103	1.1828	442.2	373.9	26.28
40.7	1.40123	1.1833	443.6	374.8	26.36
40.8	1.40142	1.1839	444.9	375.8	26.44
40.9	1.40162	1.1844	446.2	376.7	26.52
41.0	1.40181	1.1849	447.5	377.7	26.59
41.1	1.40201	1.1855	448.8	378.6	26.67
41.2	1.40221	1.1860	450.1	379.5	26.75
41.3	1.40240	1.1865	451.4	380.5	26.83
41.4	1.40260	1.1871	452.8	381.4	26.91
41.5	1.40280	1.1876	454.1	382.3	26.99
41.6	1.40299	1.1881	455.4	383.3	27.06
41.7	1.40319	1.1887	456.7	384.2	27.14
41.8	1.40339	1.1892	458.0	385.2	27.22
41.9	1.40358	1.1897	459.4	386.1	27.30
42.0	1.40378	1.1903	460.7	387.0	27.38
42.1	1.40398	1.1908	462.0	388.0	27.46
42.2	1.40418	1.1913	463.3	388.9	27.53
42.3	1.40437	1.1919	464.7	389.9	27.62
42.4	1.40457	1.1924	466.0	390.8	27.69
42.5	1.40477	1.1929	467.3	391.7	27.77
42.6	1.40497	1.1935	468.6	392.7	27.85
42.7	1.40517	1.1940	470.0	393.6	27.93
42.8	1.40537	1.1946	471.3	394.5	28.01
42.9	1.40557	1.1951	472.6	395.5	28.09
43.0	1.40576	1.1956	474.0	396.4	28.17
43.1	1.40596	1.1962	475.3	397.3	28.25
43.2	1.40616	1.1967	476.6	398.3	28.32
43.3	1.40636	1.1973	478.0	399.2	28.41
43.4	1.40656	1.1978	479.3	400.2	28.48
43.5	1.40676	1.1983	480.7	401.1	28.57
43.6	1.40696	1.1989	482.0	402.0	28.65
43.7	1.40716	1.1994	483.3	403.0	28.72
43.8	1.40736	1.2000	484.7	403.9	28.81
43.9	1.40756	1.2005	486.0	404.8	28.88
44.0	1.40776	1.2011	487.4	405.8	28.97
44.1	1.40796	1.2016	488.7	406.7	29.04
44.2	1.40817	1.2022	490.1	407.6	29.13
44.3	1.40837	1.2027	491.4	408.6	29.20
44.4	1.40857	1.2032	492.8	409.5	29.29
44.5	1.40877	1.2038	494.1	410.4	29.36
44.6	1.40897	1.2043	495.5	411.4	29.45
44.7	1.40917	1.2049	496.8	412.3	29.52
44.8	1.40937	1.2054	498.2	413.3	29.61
44.9	1.40958	1.2060	499.5	414.2	29.69

TABLEAU II - (suite)

TABLEAU II - (suite)

Saccharose % (m/m)	Indice de réfraction à 20 °C	Masse volumique à 20 °C	Sucres en g/l	Sucres en g/kg	TAV % vol à 20 °C	°C
50.0	1.42009	1.2345	570.0	461.7	33.88	
50.1	1.42030	1.2350	571.4	462.7	33.96	
50.2	1.42051	1.2356	572.8	463.6	34.04	
50.3	1.42072	1.2362	574.2	464.5	34.12	
50.4	1.42093	1.2368	575.6	465.4	34.21	
50.5	1.42114	1.2373	577.1	466.4	34.30	
50.6	1.42135	1.2379	578.5	467.3	34.38	
50.7	1.42156	1.2385	579.9	468.2	34.46	
50.8	1.42177	1.2390	581.3	469.2	34.55	
50.9	1.42199	1.2396	582.7	470.1	34.63	
51.0	1.42220	1.2402	584.2	471.0	34.72	
51.1	1.42241	1.2408	585.6	471.9	34.80	
51.2	1.42262	1.2413	587.0	472.9	34.89	
51.3	1.42283	1.2419	588.4	473.8	34.97	
51.4	1.42305	1.2425	589.9	474.7	35.06	
51.5	1.42326	1.2431	591.3	475.7	35.14	
51.6	1.42347	1.2436	592.7	476.6	35.22	
51.7	1.42368	1.2442	594.1	477.5	35.31	
51.8	1.42390	1.2448	595.6	478.4	35.40	
51.9	1.42411	1.2454	597.0	479.4	35.48	
52.0	1.42432	1.2460	598.4	480.3	35.56	
52.1	1.42454	1.2465	599.9	481.2	35.65	
52.2	1.42475	1.2471	601.3	482.1	35.74	
52.3	1.42496	1.2477	602.7	483.1	35.82	
52.4	1.42518	1.2483	604.2	484.0	35.91	
52.5	1.42539	1.2488	605.6	484.9	35.99	
52.6	1.42561	1.2494	607.0	485.8	36.07	
52.7	1.42582	1.2500	608.5	486.8	36.16	
52.8	1.42604	1.2506	609.9	487.7	36.25	
52.9	1.42625	1.2512	611.4	488.6	36.34	
53.0	1.42647	1.2518	612.8	489.5	36.42	
53.1	1.42668	1.2523	614.2	490.5	36.50	
53.2	1.42690	1.2529	615.7	491.4	36.59	
53.3	1.42711	1.2535	617.1	492.3	36.67	
53.4	1.42733	1.2541	618.6	493.2	36.76	
53.5	1.42754	1.2547	620.0	494.2	36.85	
53.6	1.42776	1.2553	621.5	495.1	36.94	
53.7	1.42798	1.2558	622.9	496.0	37.02	
53.8	1.42819	1.2564	624.4	496.9	37.11	
53.9	1.42841	1.2570	625.8	497.9	37.19	
54.0	1.42863	1.2576	627.3	498.8	37.28	
54.1	1.42884	1.2582	628.7	499.7	37.36	
54.2	1.42906	1.2588	630.2	500.6	37.45	
54.3	1.42928	1.2594	631.7	501.6	37.54	
54.4	1.42949	1.2600	633.1	502.5	37.63	
54.5	1.42971	1.2606	634.6	503.4	37.71	
54.6	1.42993	1.2611	636.0	504.3	37.80	
54.7	1.43015	1.2617	637.5	505.2	37.89	
54.8	1.43036	1.2623	639.0	506.2	37.98	
54.9	1.43058	1.2629	640.4	507.1	38.06	

TABLEAU II - (suite)

TABLEAU II - (suite)

Saccharose % (m/m)	Indice de réfraction à 20 °C	Masse volumique à 20 °C	Sucres en g/l	Sucres en g/kg	TAV % vol à 20 °C
55.0	1.43080	1.2635	641.9	508.0	38.15
55.1	1.43102	1.2641	643.4	508.9	38.24
55.2	1.43124	1.2647	644.8	509.9	38.32
55.3	1.43146	1.2653	646.3	510.8	38.41
55.4	1.43168	1.2659	647.8	511.7	38.50
55.5	1.43189	1.2665	649.2	512.6	38.58
55.6	1.43211	1.2671	650.7	513.5	38.67
55.7	1.43233	1.2677	652.2	514.5	38.76
55.8	1.43255	1.2683	653.7	515.4	38.85
55.9	1.43277	1.2689	655.1	516.3	38.93
56.0	1.43299	1.2695	656.6	517.2	39.02
56.1	1.43321	1.2701	658.1	518.1	39.11
56.2	1.43343	1.2706	659.6	519.1	39.20
56.3	1.43365	1.2712	661.0	520.0	39.28
56.4	1.43387	1.2718	662.5	520.9	39.37
56.5	1.43410	1.2724	664.0	521.8	39.46
56.6	1.43432	1.2730	665.5	522.7	39.55
56.7	1.43454	1.2736	667.0	523.7	39.64
56.8	1.43476	1.2742	668.5	524.6	39.73
56.9	1.43498	1.2748	669.9	525.5	39.81
57.0	1.43520	1.2754	671.4	526.4	39.90
57.1	1.43542	1.2760	672.9	527.3	39.99
57.2	1.43565	1.2766	674.4	528.3	40.08
57.3	1.43587	1.2773	675.9	529.2	40.17
57.4	1.43609	1.2779	677.4	530.1	40.26
57.5	1.43631	1.2785	678.9	531.0	40.35
57.6	1.43653	1.2791	680.4	531.9	40.44
57.7	1.43676	1.2797	681.9	532.8	40.53
57.8	1.43698	1.2803	683.4	533.8	40.61
57.9	1.43720	1.2809	684.9	534.7	40.70
58.0	1.43743	1.2815	686.4	535.6	40.79
58.1	1.43765	1.2821	687.9	536.5	40.88
58.2	1.43787	1.2827	689.4	537.4	40.97
58.3	1.43810	1.2833	690.9	538.3	41.06
58.4	1.43832	1.2839	692.4	539.3	41.15
58.5	1.43855	1.2845	693.9	540.2	41.24
58.6	1.43877	1.2851	695.4	541.1	41.33
58.7	1.43899	1.2857	696.9	542.0	41.42
58.8	1.43922	1.2863	698.4	542.9	41.51
58.9	1.43944	1.2870	699.9	543.8	41.60
59.0	1.43967	1.2876	701.4	544.8	41.68
59.1	1.43989	1.2882	702.9	545.7	41.77
59.2	1.44012	1.2888	704.4	546.6	41.86
59.3	1.44035	1.2894	706.0	547.5	41.96
59.4	1.44057	1.2900	707.5	548.4	42.05
59.5	1.44080	1.2906	709.0	549.3	42.14
59.6	1.44102	1.2912	710.5	550.2	42.23
59.7	1.44125	1.2919	712.0	551.1	42.31
59.8	1.44148	1.2925	713.5	552.1	42.40
59.9	1.44170	1.2931	715.1	553.0	42.50
64.9	1.45324	1.3244	792.5	598.3	47.10

TABLEAU II - (suite)

TABLEAU II - (suite)

Saccharose % (m/m)	Indice de réfraction à 20 °C	Masse volumique à 20 °C	Sucres en g/l	Sucres en g/kg	TAV % vol à 20 °C
55.0	1.43080	1.2635	641.9	508.0	38.15
55.1	1.43102	1.2641	643.4	508.9	38.24
55.2	1.43124	1.2647	644.8	509.9	38.32
55.3	1.43146	1.2653	646.3	510.8	38.41
55.4	1.43168	1.2659	647.8	511.7	38.50
55.5	1.43189	1.2665	649.2	512.6	38.58
55.6	1.43211	1.2671	650.7	513.5	38.67
55.7	1.43233	1.2677	652.2	514.5	38.76
55.8	1.43255	1.2683	653.7	515.4	38.85
55.9	1.43277	1.2689	655.1	516.3	38.93
56.0	1.43299	1.2695	656.6	517.2	39.02
56.1	1.43321	1.2701	658.1	518.1	39.11
56.2	1.43343	1.2706	659.6	519.1	39.20
56.3	1.43365	1.2712	661.0	520.0	39.28
56.4	1.43387	1.2718	662.5	520.9	39.37
56.5	1.43410	1.2724	664.0	521.8	39.46
56.6	1.43432	1.2730	665.5	522.7	39.55
56.7	1.43454	1.2736	667.0	523.7	39.64
56.8	1.43476	1.2742	668.5	524.6	39.73
56.9	1.43498	1.2748	669.9	525.5	39.81
57.0	1.43520	1.2754	671.4	526.4	39.90
57.1	1.43542	1.2760	672.9	527.3	39.99
57.2	1.43565	1.2766	674.4	528.3	40.08
57.3	1.43587	1.2773	675.9	529.2	40.17
57.4	1.43609	1.2779	677.4	530.1	40.26
57.5	1.43631	1.2785	678.9	531.0	40.35
57.6	1.43653	1.2791	680.4	531.9	40.44
57.7	1.43676	1.2797	681.9	532.8	40.53
57.8	1.43698	1.2803	683.4	533.8	40.61
57.9	1.43720	1.2809	684.9	534.7	40.70
58.0	1.43743	1.2815	686.4	535.6	40.79
58.1	1.43765	1.2821	687.9	536.5	40.88
58.2	1.43787	1.2827	689.4	537.4	40.97
58.3	1.43810	1.2833	690.9	538.3	41.06
58.4	1.43832	1.2839	692.4	539.3	41.15
58.5	1.43855	1.2845	693.9	540.2	41.24
58.6	1.43877	1.2851	695.4	541.1	41.33
58.7	1.43899	1.2857	696.9	542.0	41.42
58.8	1.43922	1.2863	698.4	542.9	41.51
58.9	1.43944	1.2870	699.9	543.8	41.60
59.0	1.43967	1.2876	701.4	544.8	41.68
59.1	1.43989	1.2882	702.9	545.7	41.77
59.2	1.44012	1.2888	704.4	546.6	41.86
59.3	1.44035	1.2894	706.0	547.5	41.96
59.4	1.44057	1.2900	707.5	548.4	42.05
59.5	1.44080	1.2906	709.0	549.3	42.14
59.6	1.44102	1.2912	710.5	550.2	42.23
59.7	1.44125	1.2919	712.0	551.1	42.31
59.8	1.44148	1.2925	713.5	552.1	42.40
59.9	1.44170	1.2931	715.1	553.0	42.50
74.9	1.47761	1.3906	956.3	687.7	56.83

TABLEAU III

Tableau donnant la teneur en sucres, exprimée en sucre interverti, du sucre de raisin en grammes par litre et en grammes par kilogramme, déterminée au moyen d'un réfractomètre gradué, soit en pourcentage en masse de saccharose à 20 °C, soit en indice de réfraction à 20 °C. La masse volumique et le titre alcoométrique volumique en puissance (%vol à 20 °C) sont également donnés.

TABLEAU III

Saccharose % (m/m)	Indice de réfraction à 20 °C	Masse volumique à 20 °C	Sucre en g/l	Sucre en g/kg	TAV % vol. à 20 °C
50,0	1,42008	1,2342	627,6	508,5	37,30
50,1	1,42029	1,2348	629,3	509,6	37,40
50,2	1,42050	1,2355	630,9	510,6	37,49
50,3	1,42071	1,2362	632,4	511,6	37,58
50,4	1,42092	1,2367	634,1	512,7	37,68
50,5	1,42113	1,2374	635,7	513,7	37,78
50,6	1,42135	1,2381	637,3	514,7	37,87
50,7	1,42156	1,2386	638,7	515,7	37,96
50,8	1,42177	1,2391	640,4	516,8	38,06
50,9	1,42198	1,2396	641,9	517,8	38,15
51,0	1,42219	1,2401	643,4	518,8	38,24
51,1	1,42240	1,2406	645,0	519,9	38,33
51,2	1,42261	1,2411	646,5	520,9	38,42
51,3	1,42282	1,2416	648,1	522,0	38,52
51,4	1,42304	1,2421	649,6	523,0	38,61
51,5	1,42325	1,2427	651,2	524,0	38,70
51,6	1,42347	1,2434	652,9	525,1	38,80
51,7	1,42368	1,2441	654,5	526,1	38,90
51,8	1,42389	1,2447	656,1	527,1	38,99
51,9	1,42410	1,2454	657,8	528,2	39,09
52,0	1,42432	1,2461	659,4	529,2	39,19
52,1	1,42453	1,2466	661,0	530,2	39,28
52,2	1,42475	1,2470	662,5	531,3	39,37
52,3	1,42496	1,2475	664,1	532,3	39,47
52,4	1,42517	1,2480	665,6	533,3	39,56
52,5	1,42538	1,2486	667,2	534,4	39,65
52,6	1,42560	1,2493	668,9	535,4	39,75
52,7	1,42581	1,2500	670,5	536,4	39,85
52,8	1,42603	1,2506	672,2	537,5	39,95
52,9	1,42624	1,2513	673,8	538,5	40,04
53,0	1,42645	1,2520	675,5	539,5	40,14
53,1	1,42667	1,2525	677,1	540,6	40,24
53,2	1,42689	1,2530	678,5	541,5	40,32
53,3	1,42711	1,2535	680,2	542,6	40,42
53,4	1,42733	1,2540	681,8	543,7	40,52
53,5	1,42754	1,2546	683,4	544,7	40,61
53,6	1,42776	1,2553	685,1	545,8	40.72
53,7	1,42797	1,2560	686,7	546,7	40,81
53,8	1,42819	1,2566	688,4	547,8	40,91
53,9	1,42840	1,2573	690,1	548,9	41,01
54,0	1,42861	1,2580	691,7	549,8	41,11
54,1	1,42884	1,2585	693,3	550,9	41,20
54,2	1,42906	1,2590	694,9	551,9	41,30
54,3	1,42927	1,2595	696,5	553,0	41,39
54,4	1,42949	1,2600	698,1	554,0	41,49
54,5	1,42971	1,2606	699,7	555,1	41,58
54,6	1,42993	1,2613	701,4	556,1	41,68
54,7	1,43014	1,2620	703,1	557,1	41,79
54,8	1,43036	1,2625	704,7	558,2	41,88
54,9	1,43058	1,2630	706,2	559,1	41,97

TABLEAU III – (suite)

TABLEAU III - (suite)

Saccharose % (m/m)	Indice de réfraction à 20 °C	Masse volumique à 20 °C	Sucres en g/l	Sucres en g/kg	TAV % vol. à 20 °C
55,0	1,43079	1,2635	707,8	560,2	42,06
55,1	1,43102	1,2639	709,4	561,3	42,16
55,2	1,43124	1,2645	711,0	562,3	42,25
55,3	1,43146	1,2652	712,7	563,3	42,36
55,4	1,43168	1,2659	714,4	564,3	42,46
55,5	1,43189	1,2665	716,1	565,4	42,56
55,6	1,43211	1,2672	717,8	566,4	42,66
55,7	1,43233	1,2679	719,5	567,5	42,76
55,8	1,43255	1,2685	721,1	568,5	42,85
55,9	1,43277	1,2692	722,8	569,5	42,96
56,0	1,43298	1,2699	724,5	570,5	43,06
56,1	1,43321	1,2703	726,1	571,6	43,15
56,2	1,43343	1,2708	727,7	572,6	43,25
56,3	1,43365	1,2713	729,3	573,7	43,34
56,4	1,43387	1,2718	730,9	574,7	43,44
56,5	1,43409	1,2724	732,6	575,8	43,54
56,6	1,43431	1,2731	734,3	576,8	43,64
56,7	1,43454	1,2738	736,0	577,8	43,74
56,8	1,43476	1,2744	737,6	578,8	43,84
56,9	1,43498	1,2751	739,4	579,9	43,94
57,0	1,43519	1,2758	741,1	580,9	44,04
57,1	1,43542	1,2763	742,8	582,0	44,14
57,2	1,43564	1,2768	744,4	583,0	44,24
57,3	1,43586	1,2773	745,9	584,0	44,33
57,4	1,43609	1,2778	747,6	585,1	44,43
57,5	1,43631	1,2784	749,3	586,1	44,53
57,6	1,43653	1,2791	751,0	587,1	44,63
57,7	1,43675	1,2798	752,7	588,1	44,73
57,8	1,43698	1,2804	754,4	589,2	44,83
57,9	1,43720	1,2810	756,1	590,2	44,94
58,0	1,43741	1,2818	757,8	591,2	45,04
58,1	1,43764	1,2822	759,5	592,3	45,14
58,2	1,43784	1,2827	761,1	593,4	45,23
58,3	1,43909	1,2832	762,6	594,3	45,32
58,4	1,43832	1,2837	764,3	595,4	45,42
58,5	1,43854	1,2843	766,0	596,4	45,52
58,6	1,43877	1,2850	767,8	597,5	45,63
58,7	1,43899	1,2857	769,5	598,5	45,73
58,8	1,43922	1,2863	771,1	599,5	45,83
58,9	1,43944	1,2869	772,9	600,6	45,93
59,0	1,43966	1,2876	774,6	601,6	46,03
59,1	1,43988	1,2882	776,3	602,6	46,14
59,2	1,44011	1,2889	778,1	603,7	46,24
59,3	1,44034	1,2896	779,8	604,7	46,34
59,4	1,44057	1,2902	781,6	605,8	46,45
59,5	1,44079	1,2909	783,3	606,8	46,55
59,6	1,44102	1,2916	785,2	607,9	46,66
59,7	1,44124	1,2921	786,8	608,9	46,76
59,8	1,44147	1,2926	788,4	609,9	46,85
59,9	1,44169	1,2931	790,0	610,9	46,95

Saccharose % (m/m)	Indice de réfraction à 20 °C	Masse volumique à 20 °C	Sucres en g/l	Sucres en g/kg	TAV % vol. à 20 °C
60,0	1,44192	1,2936	791,7	612,0	47,05
60,1	1,44215	1,2942	793,3	613,0	47,15
60,2	1,44238	1,2949	795,2	614,1	47,26
60,3	1,44260	1,2956	796,9	615,1	47,36
60,4	1,44283	1,2962	798,6	616,1	47,46
60,5	1,44305	1,2969	800,5	617,2	47,57
60,6	1,44328	1,2976	802,2	618,2	47,67
60,7	1,44351	1,2981	803,9	619,3	47,78
60,8	1,44374	1,2986	805,5	620,3	47,87
60,9	1,44397	1,2991	807,1	621,3	47,97
61,0	1,44419	1,2996	808,7	622,3	48,06
61,1	1,44442	1,3002	810,5	623,4	48,17
61,2	1,44465	1,3009	812,3	624,4	48,27
61,3	1,44488	1,3016	814,2	625,5	48,39
61,4	1,44511	1,3022	815,8	626,5	48,48
61,5	1,44534	1,3029	817,7	627,6	48,60
61,6	1,44557	1,3036	819,4	628,6	48,70
61,7	1,44580	1,3042	821,3	629,7	48,81
61,8	1,44603	1,3049	823,0	630,7	48,91
61,9	1,44626	1,3056	824,8	631,7	49,02
62,0	1,44648	1,3062	826,6	632,8	49,12
62,1	1,44672	1,3068	828,3	633,8	49,23
62,2	1,44695	1,3075	830,0	634,8	49,33
62,3	1,44718	1,3080	831,8	635,9	49,43
62,4	1,44741	1,3085	833,4	636,9	49,53
62,5	1,44764	1,3090	835,1	638,0	49,63
62,6	1,44787	1,3095	836,8	639,0	49,73
62,7	1,44810	1,3101	838,5	640,0	49,83
62,8	1,44833	1,3108	840,2	641,0	49,93
62,9	1,44856	1,3115	842,1	642,1	50,05
63,0	1,44879	1,3121	843,8	643,1	50,15
63,1	1,44902	1,3128	845,7	644,2	50,26
63,2	1,44926	1,3135	847,5	645,2	50,37
63,3	1,44949	1,3141	849,3	646,3	50,47
63,4	1,44972	1,3148	851,1	647,3	50,58
63,5	1,44995	1,3155	853,0	648,4	50,69
63,6	1,45019	1,3161	854,7	649,4	50,79
63,7	1,45042	1,3168	856,5	650,4	50,90
63,8	1,45065	1,3175	858,4	651,5	51,01
63,9	1,45088	1,3180	860,0	652,5	51,11
64,0	1,45112	1,3185	861,6	653,5	51,20
64,1	1,45135	1,3190	863,4	654,6	51,31
64,2	1,45158	1,3195	865,1	655,6	51,41
64,3	1,45181	1,3201	866,9	656,7	51,52
64,4	1,45205	1,3208	868,7	657,7	51,63
64,5	1,45228	1,3215	870,6	658,8	51,74
64,6	1,45252	1,3221	872,3	659,8	51,84
64,7	1,45275	1,3228	874,1	660,8	51,95
64,8	1,45299	1,3235	876,0	661,9	52,06
64,9	1,45322	1,3241	877,8	662,9	52,17

TABLEAU III - (suite)

Saccharose % (m/m)	Indice de réfraction à 20 °C	Masse volumique à 20 °C	Sucres en g/l	Sucres en g/kg	TAV % vol. à 20 °C
65,0	1,45347	1,3248	879,7	664,0	52,28
65,1	1,45369	1,3255	881,5	665,0	52,39
65,2	1,45393	1,3261	883,2	666,0	52,49
65,3	1,45416	1,3268	885,0	667,0	52,60
65,4	1,45440	1,3275	886,9	668,1	52,71
65,5	1,45463	1,3281	888,8	669,2	52,82
65,6	1,45487	1,3288	890,6	670,2	52,93
65,7	1,45510	1,3295	892,4	671,2	53,04
65,8	1,45534	1,3301	894,2	672,3	53,14
65,9	1,45557	1,3308	896,0	673,3	53,25
66,0	1,45583	1,3315	898,0	674,4	53,37
66,1	1,45605	1,3320	899,6	675,4	53,46
66,2	1,45629	1,3325	901,3	676,4	53,56
66,3	1,45652	1,3330	903,1	677,5	53,67
66,4	1,45676	1,3335	904,8	678,5	53,77
66,5	1,45700	1,3341	906,7	679,6	53,89
66,6	1,45724	1,3348	908,5	680,6	53,99
66,7	1,45747	1,3355	910,4	681,7	54,11
66,8	1,45771	1,3361	912,2	682,7	54,21
66,9	1,45795	1,3367	913,9	683,7	54,31
67,0	1,45820	1,3374	915,9	684,8	54,43
67,1	1,45843	1,3380	917,6	685,8	54,53
67,2	1,45867	1,3387	919,6	686,9	54,65
67,3	1,45890	1,3395	921,4	687,9	54,76
67,4	1,45914	1,3400	923,1	688,9	54,86
67,5	1,45938	1,3407	925,1	690,0	54,98
67,6	1,45962	1,3415	927,0	691,0	55,09
67,7	1,45986	1,3420	928,8	692,1	55,20
67,8	1,46010	1,3427	930,6	693,1	55,31
67,9	1,46034	1,3434	932,6	694,2	55,42
68,0	1,46060	1,3440	934,4	695,2	55,53
68,1	1,46082	1,3447	936,2	696,2	55,64
68,2	1,46106	1,3454	938,0	697,2	55,75
68,3	1,46130	1,3460	939,9	698,3	55,86
68,4	1,46154	1,3466	941,8	699,4	55,97
68,5	1,46178	1,3473	943,7	700,4	56,08
68,6	1,46202	1,3479	945,4	701,4	56,19
68,7	1,46226	1,3486	947,4	702,5	56,30
68,8	1,46251	1,3493	949,2	703,5	56,41
68,9	1,46275	1,3499	951,1	704,6	56,52
69,0	1,46301	1,3506	953,0	705,6	56,64
69,1	1,46323	1,3513	954,8	706,6	56,74
69,2	1,46347	1,3519	956,7	707,7	56,86
69,3	1,46371	1,3526	958,6	708,7	56,97
69,4	1,46396	1,3533	960,6	709,8	57,09
69,5	1,46420	1,3539	962,4	710,8	57,20
69,6	1,46444	1,3546	964,3	711,9	57,31
69,7	1,46468	1,3553	966,2	712,9	57,42
69,8	1,46493	1,3560	968,2	714,0	57,54
69,9	1,46517	1,3566	970,0	715,0	57,65

TABLEAU III - (suite)

Saccharose % (m/m)	Indice de réfraction à 20 °C	Masse volumique à 20 °C	Sucres en g/l	Sucres en g/kg	TAV % vol. à 20 °C
70,0	1,46544	1,3573	971,8	716,0	57,75
70,1	1,46565	1,3579	973,8	717,1	57,87
70,2	1,46590	1,3586	975,6	718,1	57,98
70,3	1,46614	1,3593	977,6	719,2	58,10
70,4	1,46639	1,3599	979,4	720,2	58,21
70,5	1,46663	1,3606	981,3	721,2	58,32
70,6	1,46688	1,3613	983,3	722,3	58,44
70,7	1,46712	1,3619	985,2	723,4	58,55
70,8	1,46737	1,3626	987,1	724,4	58,66
70,9	1,46761	1,3633	988,9	725,4	58,77
71,0	1,46789	1,3639	990,9	726,5	58,89
71,1	1,46810	1,3646	992,8	727,5	59,00
71,2	1,46835	1,3653	994,8	728,6	59,12
71,3	1,46859	1,3659	996,6	729,6	59,23
71,4	1,46884	1,3665	998,5	730,7	59,34
71,5	1,46908	1,3672	1000,4	731,7	59,45
71,6	1,46933	1,3678	1002,2	732,7	59,56
71,7	1,46957	1,3685	1004,2	733,8	59,68
71,8	1,46982	1,3692	1006,1	734,8	59,79
71,9	1,47007	1,3698	1008,0	735,9	59,91
72,0	1,47036	1,3705	1009,9	736,9	60,02
72,1	1,47056	1,3712	1012,0	738,0	60,14
72,2	1,47081	1,3718	1013,8	739,0	60,25
72,3	1,47106	1,3725	1015,7	740,0	60,36
72,4	1,47131	1,3732	1017,7	741,1	60,48
72,5	1,47155	1,3738	1019,5	742,1	60,59
72,6	1,47180	1,3745	1021,5	743,2	60,71
72,7	1,47205	1,3752	1023,4	744,2	60,82
72,8	1,47230	1,3758	1025,4	745,3	60,94
72,9	1,47254	1,3765	1027,3	746,3	61,05
73,0	1,47284	1,3772	1029,3	747,4	61,17
73,1	1,47304	1,3778	1031,2	748,4	61,28
73,2	1,47329	1,3785	1033,2	749,5	61,40
73,3	1,47354	1,3792	1035,1	750,5	61,52
73,4	1,47379	1,3798	1037,1	751,6	61,63
73,5	1,47404	1,3805	1039,0	752,6	61,75
73,6	1,47429	1,3812	1040,9	753,6	61,86
73,7	1,47454	1,3818	1042,8	754,7	61,97
73,8	1,47479	1,3825	1044,8	755,7	62,09
73,9	1,47504	1,3832	1046,8	756,8	62,21
74,0	1,47534	1,3838	1048,6	757,8	62,32
74,1	1,47554	1,3845	1050,7	758,9	62,44
74,2	1,47579	1,3852	1052,6	759,9	62,56
74,3	1,47604	1,3858	1054,6	761,0	62,67
74,4	1,47629	1,3865	1056,5	762,0	62,79
74,5	1,47654	1,3871	1058,5	763,1	62,91
74,6	1,47679	1,3878	1060,4	764,1	63,02
74,7	1,47704	1,3885	1062,3	765,1	63,13
74,8	1,47730	1,3892	1064,4	766,2	63,26
74,9	1,47755	1,3898	1066,3	767,2	63,37
75,0	1,47785	1,3905	1068,3	768,3	63,49

Méthode OIV-MA-AS2-03A Méthode Type IV

Extrait sec total

Matières sèches totales
(OIV-Oeno 387/2009
OIV/OENO 377/2009)
OIV-OENO 465-2012

1. Définition

L'extrait sec total ou matières sèches totales est l'ensemble de toutes les substances qui, dans des conditions physiques déterminées, ne se volatilisent pas. Ces conditions physiques doivent être fixées de telle manière que les substances composant cet extrait subissent le minimum d'altération.

L'extrait non réducteur est l'extrait sec total diminué des sucres totaux.

L'extrait réduit est l'extrait sec total diminué des sucres totaux excédant 1 g/l, du sulfate de potassium excédant 1 g/l, du mannitol s'il y en a, et de toutes les substances chimiques éventuellement ajoutées au vin.

Le reste d'extrait est l'extrait non réducteur diminué de l'acidité fixe, exprimée en acide tartrique.

2. Principe des Méthodes

Pesée du résidu laissé par l'évaporation du vin, préalablement réparti sur une spirale de papier buvard, dans un courant d'air sec sous la pression de 20 à 25 mm de mercure, à 70 °C, dans des conditions codifiées.

3. Méthode

3.1. *Appareillage*

3.1.1. *Étuve :*

Cuve cylindrique en aluminium (diamètre intérieur : 27 cm, hauteur : 6 cm) munie d'un couvercle en aluminium ; la cuve et son couvercle sont chauffés par des résistances électriques à une température de 70°C régulée à 1°C près.

Une tubulure (diamètre intérieur : 25 mm) relie l'étuve à une pompe à vide assurant un débit d'au moins 50 l/h.

De l'air préalablement déshydraté par barbotage dans de l'acide sulfurique à 98 p. 100 pénètre dans l'étuve au moyen d'un dispositif de circulation dans le couvercle assurant son réchauffement et sa répartition homogène sur toute la surface interne de l'étuve. Le débit d'air, réglé par un robinet à pointeau, est de 30-40 l par heure et la pression résiduelle dans l'étuve de 25 mm de mercure.

Toute étuve est utilisable à condition qu'elle satisfasse aux essais de contrôle donnés en 3.1.3.

3.1.2. *Capsules :*

Capsules en acier inoxydable (60 mm de diamètre intérieur, 25 mm de hauteur), obturées par un couvercle d'aluminium exactement ajusté.

Chaque capsule est garnie de 4 à 4,5 g de papier buvard, découpé en bandes de 22 mm de hauteur, pliées en accordéon.

Ce papier buvard doit être lavé à l'acide chlorhydrique dilué à 2 g/l pendant 8 h, rincé cinq fois à l'eau et séché à l'air.

3.1.3. *Contrôle de l'appareillage et de la technique*

a) Vérification de l'obturation des capsules. Une capsule contenant du papier buvard desséché, fermée par son couvercle, abandonnée à l'air du laboratoire après son refroidissement dans un dessiccateur à acide sulfurique, ne doit pas augmenter de poids de plus de 1 mg/h.
b) Vérification du degré de dessiccation. Une solution de saccharose pur à 100g/l doit laisser un extrait de 100 g ± 1 g/l.
c) Une solution d'acide lactique pur à 10 g/l doit laisser un extrait sec d'au moins 9,5 g/l.

   Augmenter ou diminuer la durée du séjour dans l'étuve, le débit du courant d'air sec, ou la pression intérieure pour que ces deux conditions soient remplies.

   NOTA – La solution d'acide lactique doit être préparée ainsi : 10 ml d'acide lactique sont dilués dans 100 ml d'eau environ. Cette solution, placée dans une capsule, est chauffée sur un bain-marie bouillant pendant 4 h en ajoutant de l'eau distillée si le volume diminue en dessous de 50 ml environ. Porter au litre le résidu et titrer l'acide lactique sur 10 ml de cette solution par une solution alcaline 0,1 M. Ajuster la liqueur à 10 g/l.

3.1. *Mode opératoire*

3.2.1. *Tarage de la capsule*

Placer la capsule garnie de papier dans l'étuve pendant 1 h. Arrêter la machine à vide et obturer la capsule avec son couvercle, immédiatement à l'ouverture de l'étuve. La tarer à 0,1 mg près, après refroidissement au dessiccateur : soit p_O g.

la masse de la capsule vide.

3.2.2. *Mesure proprement dite*

Introduire 10 ml de moût ou de vin dans la capsule tarée. Ils doivent être entièrement absorbés par le papier buvard. Placer la capsule à l'étuve pendant 2 h (ou le temps indiqué par l'essai de contrôle décrit en 3.1.3.). Procéder ensuite à la pesée de la capsule comme indiqué en 3.2.1, soit *p g* sa masse.

Remarque : Dans le cas des moûts et des vins très sucrés, il est recommandé de procéder par pesée de la prise d'essai.

3.3. *Calculs*

L'extrait sec total en gramme par litre est donné par :

$$(p - p_o) \times 100$$

Si, dans le cas des moûts et des vins très sucrés, la prise d'essai a été pesée, l'extrait sec total en grammes par litre est donné par :

$$(p - p_o) \times \frac{\rho_{20}}{\mathbf{P}} \times 1000$$

P = masse de la prise d'essai en grammes

ρ_{20} = masse volumique du moût ou du vin en g/ml.

3.4. *Expression des résultats*

L'extrait sec total est exprimé en grammes par litre avec 1 décimale.

Remarque:

Calculer l'extrait sec total en prenant séparément en compte les quantités de glucose et fructose (sucres réducteurs) et la quantité de saccharose, à savoir:

Extrait non réducteur = Extrait sec total – sucres réducteurs (glucose + fructose) – saccharose

Si la méthode d'analyse prévoit une inversion des sucres, utiliser la formule suivante pour le calcul:

Extrait non réducteur = Extrait sec total – Sucres réducteurs (glucose + fructose) - [(Sucres après inversion – Sucres avant inversion) x 0,95]

Par *inversion* il faut entendre le processus qui entraîne la conversion d'un stéréo-isomère en composés de stéréo-isomérie inverse. En particulier, le procédé basé sur la scission du saccharose en fructose et en glucose, qui consiste à maintenir des solutions sucrées acidifiées (100 ml de solution sucrée + 5 ml d'acide chlorhydrique concentré) pendant au moins 15 min à 50°C ou plus dans un bain d'eau (le bain d'eau est maintenu à 60°C jusqu'à ce que la température de la solution atteigne 50°C) est appelé *inversion du sucre*. La solution d'arrivée est lévogyre du fait de la présence de fructose, tandis que la solution de départ est dextrogyre du fait de la présence de saccharose.

TABLE I

Pour le calcul de la teneur en extrait (g/l)

Densité avec 2 décimales	3e décimale de la densité									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	Grammes d'extrait par litre									
1,00	0	2,6	5,1	7,7	10,3	12,9	15,4	18,0	20,6	23,2
1,01	25,8	28,4	31,0	33,6	36,2	38,8	41,3	43,9	46,5	49,1
1,02	51,7	54,3	56,9	59,5	62,1	64,7	67,3	69,9	72,5	75,1
1,03	77,7	80,3	82,9	85,5	88,1	90,7	93,3	95,9	98,5	101,1
1,04	103,7	106,3	109,0	111,6	114,2	116,8	119,4	122,0	124,6	127,2
1,05	129,8	132,4	135,0	137,6	140,3	142,9	145,5	148,1	150,7	153,3
1,06	155,9	158,6	161,2	163,8	166,4	169,0	171,6	174,3	176,9	179,5
1,07	182,1	184,8	,187,4	190,0	192,6	195,2	197,8	200,5	203,1	205,8
1,08	208,4	211,0	213,6	216,2	218,9	221,5	224,1	226,8	229,4	232,0
1,09	234,7	237,3	239,9	242,5	245,2	247,8	250,4	253,1	255,7	258,4
1,10	261,0	263,6	266,3	268,9	271,5	274,2	276,8	279,5	282,1	284,8
1,11	287,4	290,0	292,7	295,3	298,0	300,6	303,3	305,9	308,6	311,2
1,12	313,9	316,5	319,2	321,8	324,5	327,1	329,8	332,4	335,1	337,8
1,13	340,4	343,0	345,7	348,3	351,0	353,7	356,3	359,0	361,6	364,3
1,14	366,9	369,6	372,3	375,0	377,6	380,3	382,9	385,6	388,3	390,9
1,15	393,6	396,2	398,9	401,6	404,3	406,9	409,6	412,3	415,0	417,6
1,16	420,3	423,0	425,7	428,3	431,0	433,7	436,4	439,0	441,7	444,4
1,17	447,1	449,8	452,4	455,2	457,8	460,5	463,2	465,9	468,6	471,3
1,18	473,9	476,6	479,3	482,0	484,7	487,4	490,1	492,8	495,5	498,2
1,19	500,9	503,5	506,2	508,9	511,6	514,3	517,0	519,7	522,4	525,1
1,20	527,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-

TABLE INTERCALAIRE

4e décimale de la densité	Grammes d'extrait par litre	4e décimale de la densité	Grammes d'extrait par litre	4th decimal de la densité	Grammes d'extrait par litre
1	0,3	4	1,0	7	1,8
2	0,5	5	1,3	8	2,1
3	0,8	6	1,6	9	2,3

BIBLIOGRAPHIE

PIEN J., MEINRATH H., *Ann. Fals. Fraudes,* 1938, **30,** 282.
DUPAIGNE P., *Bull. Inst. Jus Fruits,* 1947, No 4.
TAVERNIER J., JACQUIN P., *Ind. Agric. Alim.,* 1947, **64,** 379.
JAULMES P., HAMELLE Mlle G., *Bull. O.I.V.,* 1954, **27,** 276.
JAULMES P., HAMELLE Mlle G., *Mise au point de chimie analytique pure et appliquée, et d'analyse bromatologique,* 1956, par J.A. GAUTIER, Paris, 4e série.
JAULMES P., HAMELLE Mlle G., *Trav. Soc. Pharm. Montpellier,* 1963, 243.
HAMELLE Mlle G., *Extrait sec des vins et des moûts de raisin,* 1965, Thèse Doct. Pharm. Montpellier.

Méthode OIV-MA-AS2-03B Méthode Type IV

Extrait sec total

Matières sèches totales
(Modifiée par résolution OIV/OENO 387/2009)
(Révisé par OIV-OENO 465-2012)

1. Définition

L'extrait sec total ou matières sèches totales est l'ensemble de toutes les substances qui, dans des conditions physiques déterminées, ne se volatilisent pas. Ces conditions physiques doivent être fixées de telle manière que les substances composant cet extrait subissent le minimum d'altération.

L'extrait non réducteur est l'extrait sec total diminué des sucres totaux.

L'extrait réduit est l'extrait sec total diminué des sucres totaux excédant 1 g/l, du sulfate de potassium excédant 1 g/l, du mannitol s'il y en a, et de toutes les substances chimiques éventuellement ajoutées au vin.

Le reste d'extrait est l'extrait non réducteur diminué de l'acidité fixe, exprimée en acide tartrique.

2. Principe des Méthodes

Méthode densimétrique

L'extrait sec total est calculé indirectement d'après la valeur de la densité du moût et, dans le cas du vin, d'après la densité du vin désalcoolisé.

Cet extrait est exprimé par la quantité de saccharose qui, dissoute dans une quantité d'eau suffisante pour avoir un litre, donne une solution de même densité que le moût ou que le vin désalcoolisé.

3. Méthode

3.1. *Mode opératoire*

Déterminer la densité 20/20 du moût ou du vin.

Dans le cas du vin, calculer la densité, d_r, du "vin désalcoolisé" par la relation

$$d_r = d_v - d_a + 1{,}000$$

où

d_v = densité 20/20 du vin (corrigé par l'acidité volatil*)

* Avant de faire ce calcul, la densité (ou la masse volumique) du vin mesuré comme il est indiqué plus haut doit être corrigée de l'action de l'acidité volatile suivant la formule :

$$d_v = d\,{}^{20}_{20} - 0{,}0000086\ a \qquad \text{ou} \qquad \rho_v = \rho_{20} - 0{,}0000086\ a$$

a étant la quantité d'acidité volatile en milliéquivalents par litre.

d_a = densité 20/20 du mélange hydroalcoolique de même titre que le vin ou encore par la relation :

$$d_r = 1{,}00180^{**} (\rho_v - \rho_a) + 1{,}000$$

où

ρ_v = masse volumique du vin à 20°C (corrigée de l'acidité volatile*)

ρ_a = masse volumique à 20°C du mélange hydroalcoolique de même titre alcoométrique que le vin, obtenu sur la Table I du chapitre *Titre alcoométrique* pour la température 20°C.

3.2. *Calculs*

Reporter la densité 20/20 du moût ou du vin désalcoolisé dans la Table I pour obtenir l'extrait sec total en grammes par litre.

3.3. *Expression des résultats*

L'extrait sec total est exprimé en grammes par litre avec 1 décimale.

Remarque:

Calculer l'extrait sec total en prenant séparément en compte les quantités de glucose et fructose (sucres réducteurs) et la quantité de saccharose, à savoir:

Extrait non réducteur = Extrait sec total – sucres réducteurs (glucose + fructose) – saccharose

Si la méthode d'analyse prévoit une inversion des sucres, utiliser la formule suivante pour le calcul:

Extrait non réducteur = Extrait sec total – Sucres réducteurs (glucose + fructose) - [(Sucres après inversion – Sucres avant inversion) x 0,95]

Par *inversion* il faut entendre le processus qui entraîne la conversion d'un stéréo-isomère en composés de stéréo-isomérie inverse. En particulier, le procédé basé sur la scission du saccharose en fructose et en glucose, qui consiste à maintenir des solutions sucrées acidifiées (100 ml de solution sucrée + 5 ml d'acide chlorhydrique concentré) pendant au moins 15 min à 50°C ou plus dans un bain d'eau (le bain d'eau est maintenu à 60°C jusqu'à ce que la température de la solution atteigne 50°C) est appelé *inversion du sucre*. La solution d'arrivée est

* * Le coefficient 1,00180 peut pratiquement être assimilé à 1 lorsque ρ_v est inférieure à 1.05, ce qui est le cas le plus fréquent.

lévogyre du fait de la présence de fructose, tandis que la solution de départ est dextrogyre du fait de la présence de saccharose.

TABLE I

Pour le calcul de la teneur en extrait (g/l)

Densité avec 2 décimales	3e décimale de la densité									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	Grammes d'extrait par litre									
1,00	0	2,6	5,1	7,7	10,3	12,9	15,4	18,0	20,6	23,2
1,01	25,8	28,4	31,0	33,6	36,2	38,8	41,3	43,9	46,5	49,1
1,02	51,7	54,3	56,9	59,5	62,1	64,7	67,3	69,9	72,5	75,1
1,03	77,7	80,3	82,9	85,5	88,1	90,7	93,3	95,9	98,5	101,1
1,04	103,7	106,3	109,0	111,6	114,2	116,8	119,4	122,0	124,6	127,2
1,05	129,8	132,4	135,0	137,6	140,3	142,9	145,5	148,1	150,7	153,3
1,06	155,9	158,6	161,2	163,8	166,4	169,0	171,6	174,3	176,9	179,5
1,07	182,1	184,8	,187,4	190,0	192,6	195,2	197,8	200,5	203,1	205,8
1,08	208,4	211,0	213,6	216,2	218,9	221,5	224,1	226,8	229,4	232,0
1,09	234,7	237,3	239,9	242,5	245,2	247,8	250,4	253,1	255,7	258,4
1,10	261,0	263,6	266,3	268,9	271,5	274,2	276,8	279,5	282,1	284,8
1,11	287,4	290,0	292,7	295,3	298,0	300,6	303,3	305,9	308,6	311,2
1,12	313,9	316,5	319,2	321,8	324,5	327,1	329,8	332,4	335,1	337,8
1,13	340,4	343,0	345,7	348,3	351,0	353,7	356,3	359,0	361,6	364,3
1,14	366,9	369,6	372,3	375,0	377,6	380,3	382,9	385,6	388,3	390,9
1,15	393,6	396,2	398,9	401,6	404,3	406,9	409,6	412,3	415,0	417,6
1,16	420,3	423,0	425,7	428,3	431,0	433,7	436,4	439,0	441,7	444,4
1,17	447,1	449,8	452,4	455,2	457,8	460,5	463,2	465,9	468,6	471,3
1,18	473,9	476,6	479,3	482,0	484,7	487,4	490,1	492,8	495,5	498,2
1,19	500,9	503,5	506,2	508,9	511,6	514,3	517,0	519,7	522,4	525,1
1,20	527,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-

TABLE INTERCALAIRE

4e décimale de la densité	Grammes d'extrait par litre	4e décimale de la densité	Grammes d'extrait par litre	4th decimal de la densité	Grammes d'extrait par litre
1	0,3	4	1,0	7	1,8
2	0,5	5	1,3	8	2,1
3	0,8	6	1,6	9	2,3

BIBLIOGRAPHIE

TABLE DE PLATO, d'après *Allgemeine Verwaltungsvorschrift für die Untersuchung von Wein und ähnlichen alkoholischen Erzeugnissen sowie von Fruchtsäften,* vom April 1960, Bundesanzeiger Nr. 86 vom 5. Mai 1960. - Une table très voisine se trouve dans *Official and Tentative Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists,* Ed. A.O.A.C., Washington 1945, 815.

Méthode OIV-MA-AS2-04 Méthode Type I

Cendres
(A6, révision par OIV/OENO 377/2009)

1 Définition

On appelle cendres l'ensemble des produits de l'incinération du résidu d'évaporation du vin, conduite de façon à obtenir la totalité des cations (ammonium exclu) sous forme de carbonates et autres sels minéraux anhydres.

2. Principe de la méthode

Incinération de l'extrait du vin conduite entre 500 °C et 550 °C jusqu'à combustion complète du carbone.

3. Appareillage

3.1. Bain d'eau à 100 °C.
3.2. Balance sensible au 1/10e de milligramme.
3.3. Plaque chauffante ou évaporateur à infrarouge.
3.4. Four électrique à régulation de température.
3.5. Dessiccateur.
3.6. Capsule de platine de 70 mm de diamètre et de 25 mm de hauteur à fond plat.

4. Mode opératoire

Placer 20 ml de vin dans la capsule de platine préalablement tarée (p_0). Évaporer sur bain d'eau à 100 °C, chauffer le résidu sur la plaque chauffante à 200 °C ou sous l'évaporateur à infrarouge jusqu'à carbonisation. Lorsque le résidu n'émet plus de vapeur, placer la capsule dans le four électrique porté à 525 °C ± 25 °C. Après 15 min. de carbonisation, retirer la capsule du four, ajouter 5 ml d'eau distillée que l'on évapore ensuite sur le bain d'eau ou sous l'évaporateur à infrarouge et chauffer à nouveau à 525 °C pendant une dizaine de minutes.

Si la combustion des particules carbonées n'est pas totale, recommencer les opérations de lavage des particules carbonées, d'évaporation de l'eau et d'incinération.

Pour les vins riches en sucres, il est commode d'ajouter à l'extrait quelques gouttes d'huile végétale pure avant la première incinération, pour empêcher le débordement du contenu.

Après refroidissement dans le dessiccateur, la capsule est pesée, soit p_1.

Le poids de cendres correspondant à la prise d'essai est : $p = (p_1 - p_0)$.

5. Expression des résultats

Le poids P des cendres exprimé en grammes par litre avec 2 décimales est :

$$P = 50\ p$$

Méthode OIV-MA-AS2-05 Méthode Type IV

Alcalinité des cendres (A7, révision par OIV/OENO 377/2009)

1. Définition

On appelle alcalinité des cendres la somme des cations, autres que l'ammonium, combinés aux acides organiques du vin.

2. Principe de la méthode

Titrimétrie en présence de méthylorange sur les cendres solubilisées à chaud par un excès connu d'acide titré.

3. Appareillage et réactifs

3.1. *Solution 0,05 M d'acide sulfurique*

3.2. *Solution 0,1 M d'hydroxyde de sodium*

3.3. *Solution de méthylorange à 0,1 g p. 100 ml dans l'eau distillée*

3.4. *Bain d'eau à 100 °C.*

4. Mode opératoire

Dans la capsule de platine contenant les cendres de 20 ml de vin ajouter 10 ml de solution 0,05 M d'acide sulfurique ; la placer sur un bain d'eau à 100 °C pendant 15 min. environ, en écrasant le résidu avec une baguette de verre pour activer la dissolution. Ajouter ensuite 2 gouttes de solution de méthylorange et titrer l'excès d'acide sulfurique par la solution 0,1 M d'hydroxyde de sodium jusqu'à virage au jaune de l'indicateur.

5. Expression des résultats

5.1. *Mode de calcul*

L'alcalinité des cendres exprimée en milliéquivalents par litre, avec 1 décimale sera :

$$A = 5\ (10 - n)$$

n = nombre de millilitres d'hydroxyde de sodium 0,1 M.

5.2. *Autre expression :*

L'alcalinité des cendres exprimée en grammes de carbonate de potassium par litre, avec deux décimales sera :

$$A = 0{,}345\ (10 - n)$$

BIBLIOGRAPHIE

JAULMES P., *Analyse des vins*, Librairie Poulain, Montpellier, éd., 1951, 107.

Méthode OIV-MA-AS2-06 Méthode Type IV

Mesure du potentiel d'oxydoréduction dans les vins

(Résolution OENO 3/2000)

1. Objet, Domaine d'application

Le potentiel d'oxydoréduction (EH) est une mesure de l'état d'oxydation ou de réduction d'un milieu. En œnologie, l'oxygène et le potentiel d'oxydoréduction sont deux éléments importants pour conduire à la fois le traitement préfermentaire de la vendange, la vinification, l'élevage et la conservation des vins.

Il est proposé un matériel de mesure du Potentiel d'oxydoréduction dans les vins et un mode opératoire permettant de réaliser des mesures dans des conditions standards.

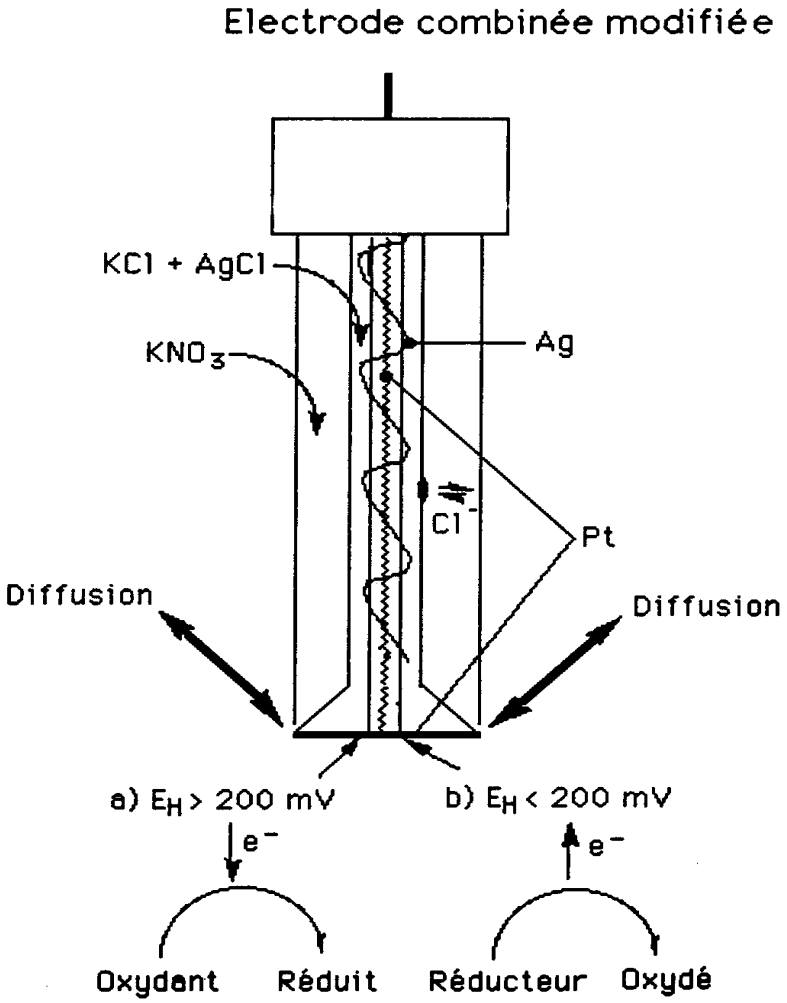
La méthode n'a pas fait l'objet d'une analyse collaborative en raison du caractère très variable de l'état d'oxydoréduction d'un vin, ce qui rend difficile cette étape de la validation. En conséquence il s'agit d'une méthode de type 4 destinée essentiellement à la production.

2. Principe

Le potentiel d'oxydoréduction d'un milieu est défini comme la différence de potentiel entre une électrode inattaquable plongeant dans ce milieu et l'électrode à hydrogène de référence, couplée avec le milieu. En fait, on ne peut connaître que la différence entre les potentiels d'oxydoréduction de deux systèmes couplés. Pour cette raison, le potentiel d'oxydoréduction de l'électrode à hydrogène est considéré comme égal à zéro ; tous les potentiels d'oxydoréduction sont évalués par rapport à celui-ci. Le potentiel d'oxydoréduction est une mesure relative à l'expression d'état physicochimique instantané d'une solution. Seul un titrage potentiométrique des couples oxydoréducteurs totaux ainsi que l'estimation du rapport [Oxydants /Réducteurs] pourrait conduire à une mesure réellement quantitative. La mesure du potentiel d'oxydoréduction, soit dans le vin, soit dans d'autres milieux, est réalisée avec des électrodes combinées. Habituellement le système comprend une électrode de platine (l'électrode de mesure) et une électrode de référence (électrode d'argent ou au calomel).

3. Matériel

Plusieurs types d'électrodes existent, il est cependant conseillé d'employer des électrodes adaptées à la mesure du EH dans les vins. Il est recommandé d'utiliser une électrode combinée, à double jaquette, couplée à une électrode de référence (Figure). Il s'agit d'une électrode de mesure et d'une électrode de référence à double jaquette ; elles sont couplées à un ionomètre. Pour la jaquette interne de l'électrode de référence, la Composition de la solution de remplissage est la suivante : KNO_3, 17,1% ; AgCl, traces ; Triton X-100, traces ; KCl, 5% ; eau désionisée, 77,9% et pour l'électrode de mesure la Composition est la suivante : AgCl, <1% ; KCl, 29,8% ; eau désionisée, 70%.



4. Nettoyage et étalonnage des électrodes

4.1. *Etalonnage*

L'étalonnage est réalisé à partir de solutions présentant un potentiel d'oxydoréduction connu et constant. Le mélange équimolaire (10 mM/l) de ferrocyanure et de hexacyanoferrate (II) de potassium a été retenu. Il a pour composition : 0,329g de $K_3Fe(CN)_6$; 0,422g de $K_4Fe(CN)_6$; 0,149g de KCl et H_2O qsp 1000 ml. A 20 °C le potentiel de cette solution est de 406 mV (± 5mV), mais il évolue dans le temps et la durée de conservation de la solution ne doit pas excéder 15 jours à l'obscurité.

4.2. *Nettoyage du platine de l'électrode*

Le nettoyage du platine de l'électrode est assuré par trempage dans du peroxyde d'hydrogène à 30% vol. pendant 1 heure, suivi d'un rinçage à l'eau. Le système nécessite un nettoyage complet à l'eau après chaque série de mesure, le système est en général nettoyé après une semaine d'utilisation.

5. Mode opératoire

5.1. *Remplissage de la jaquette interne.*

En fonction du milieu de mesure du EH, la composition de la double jaquette est variable (Tableau ci-dessous).

Tableau

Composition de la solution de remplissage de la double jaquette de l'électrode en fonction du milieu de mesure.

Milieu de mesure	Composition de la solution de la jaquette
Solution 1 pour Vins secs	Ethanol 12% vol., 5 g ac. tartrique, NaOH N qsp pH 3,5, Eau distillée qsp 1000 ml.
Solution 2 pour Vins doux	Solution 1 à laquelle on ajoute 20 g/l de saccharose.
Solution 3 pour Vins doux spéciaux	solution 2 à laquelle on ajoute 100 mg/l de SO_2 ($KHSO_3$).
Solution 4 pour Eaux-de-vie	Ethanol 50 % vol., ac. acétique qsp pH 5, eau distillée qsp 1000 ml.

5.2- *Equilibrage de l'électrode avec le milieu de mesure.*

Avant les mesures, les électrodes doivent être étalonnées dans la solution de Michaelis, puis stabilisées 15 min. dans un vin, si les mesures sont à faire dans des vins. Ensuite, la lecture peut être réalisée, pour des mesures sur le terrain, 5 min. après que les électrodes aient été plongées dans le milieu. On utilise comme indice de stabilité, pour des mesures au laboratoire, le rapport ΔEH (mV) / T (min.), lorsque ce dernier est $\leq 0,2$ la lecture du potentiel peut alors se pratiquer.

5.3. *Mesures dans les conditions de la pratique.*

Les mesures sont systématiquement réalisées *in situ* sans manipulation pouvant entraîner de modification des valeurs du potentiel d'oxydoréduction. Lors des mesures dans les chais, en barriques ou en cuves, on prendra soin de noter la température, le pH et l'oxygène dissous (méthode en préparation) en même temps que le EH ; ces valeurs pouvant servir ultérieurement à l'interprétation des résultats. Pour des bouteilles de vins, la mesure est pratiquée sur le vin après 2 heures

d'attente dans une pièce à 20 °C, immédiatement après l'ouverture, sous un flux constant d'azote et en plongeant l'ensemble de l'électrode dans la bouteille.

5.4. *Expression des résultats.*
Les résultats sont donnés en mV par rapport à l'électrode à hydrogène.

Méthode OIV-MA-AS2-07A

Caractéristiques Chromatiques

(Méthode A0 modifiée par OENO 1/2006)

Principe de la méthode

Méthode spectrophotométrique qui permet le calcul des valeurs tristimulaires et des coefficients trichromatiques nécessaires à la spécification de la couleur dans les termes de la Commission internationale de l'éclairage (C.I.E.).

SUPPRIMÉE
(remplacée par OIV-MA-AS2-11)

Méthode OIV-MA-AS2-07B Méthode Type IV

Caractéristiques Chromatiques

(Méthode A0 modifiée par OENO 1/2006
Modifiée par OIV-OENO 667-2022)

1. Définitions

On appelle caractéristiques chromatiques d'un vin sa luminosité et sa chromaticité. La luminosité correspond à la transmittance. Elle varie en raison inverse de l'intensité colorante du vin. La chromaticité correspond à la longueur d'onde dominante (qui caractérise la nuance) et à la pureté.
Conventionnellement et pour des raisons de commodité, les caractéristiques chromatiques des vins rouges et rosés sont énoncées par l'intensité colorante et la nuance, suivant un procédé adopté comme méthode usuelle.

2. Principe de la méthode

2.1. Méthode applicable aux vins rouges et rosés

Méthode spectrophotométrique selon laquelle les caractéristiques chromatiques sont exprimées conventionnellement comme ci-dessous :

- L'intensité est donnée par la somme des absorbances sous 1 cm de trajet optique pour les radiations de longueurs d'onde égales à 420, 520 et 620 nm.
- La nuance est exprimée par le rapport de l'absorbance à 420 nm à l'absorbance à 520 nm.

3. Méthode

3.1.Appareils

3.1.1. Spectrophotomètre permettant des mesures entre 300 et 700 nm.

3.1.2. Cuves de verre disponibles par paires, de trajet optique, *b*, égal à 0,1 - 0,2 - 0,5 et 1 cm.

3.2. Traitement préalable de l'échantillon

Si le vin est trouble, le clarifier par centrifugation. Les vins jeunes ou mousseux doivent être débarrassés de la plus grande quantité de leur dioxyde de carbone par agitation sous vide.

3.3. Mode opératoire

Le trajet optique, *b*, de la cuve de mesure doit être choisi de manière que l'absorbance A soit comprise entre 0,3 et 0,7.

Effectuer les mesures spectrophotométriques en utilisant comme liquide de référence l'eau distillée placée dans une cuve de même trajet optique, *b*, pour régler le zéro de l'échelle d'absorbances de l'appareil aux longueurs d'onde 420, 520 et 620 nm.

3.4. Calculs

Calculer les absorbances pour 1 cm de trajet optique pour les 3 longueurs d'onde en divisant par *b*, exprimé en cm, les absorbances relevées, soit A_{420}, A_{520}, A_{620}.
A_{625} A_{420}, A_{520} et A_{620}. L'intensité est conventionnellement donnée par : $I = A_{420} + A_{520} + A_{620}$

3.5. Expression des résultats

L'intensité est conventionnellement donné par :

$$I = A_{420} + A_{520} + A_{620}$$

Elle est exprimée avec 3 décimales.

La nuance est conventionnellement donnée par :

$$N = \frac{A_{420}}{A_{520}}$$

Elle est donnée avec 3 décimales.

BIBLIOGRAPHIE

- BOUTARIC A., FERRE L., ROY M., *Ann. Fals. Fraudes,* 1937, **30,** 196.
- SUDRAUD P., *Ann. Technol. Agric.,* 1958, no 2, 203.
- MARECA CORTES J., *Atti Acc. Vite Vino,* 1964, 16.
- GLORIES Y., *Conn. vigne et Vin,* 1984, **18,** no 3, 195.

TABLEAU I
Transformation des absorbances en transmittances (T %)

Mode d'utilisation : Lire le premier chiffre décimal de la valeur de l'absorbance dans la colonne verticale 1 et le deuxième chiffre décimal sur la ligne horizontale 2.

Relever le chiffre situé à l'intersection. Pour obtenir la transmittance, ce chiffre devra être divisé par 10 si l'absorbance a une valeur inférieure à 1, par 100 si elle est comprise entre 1 et 2, par 1 000 si elle est comprise entre 2 et 3.

Remarque : Le chiffre porté en haut et à droite de chaque case permet de tenir compte par interpolation du troisième chiffre décimal de la valeur de l'absorbance.

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	1000 [23]	977 [22]	955 [22]	933 [21]	912 [21]	891 [20]	871 [20]	851 [19]	932 [19]	813 [19]
1	794 [18]	776 [18]	759 [17]	741 [17]	724 [16]	708 [16]	692 [16]	676 [15]	661 [15]	646 [15]
2	631 [14]	617 [14]	603 [14]	589 [14]	575 [13]	562 [13]	549 [13]	537 [12]	525 [12]	513 [12]
3	501 [11]	490 [11]	479 [11]	468 [11]	457 [10]	447 [9]	436 [9]	427 [10]	417 [10]	407 [9]
4	398 [9]	389 [9]	380 [9]	371 [8]	363 [8]	355 [8]	347 [8]	339	331 [7]	324 [8]
5	316 [7]	309 71	302 [7]	295 [7]	288 [6]	282 [7]	275 [6]	269 [6]	263 [6]	257 [6]
6	251 [6]	245 [5]	240 [6]	234 [5]	229 [5]	224 [5]	219 [5]	214 [5]	209 [5]	204 [5]
7	199 [4]	195 [5]	190 [4]	186 [4]	182 [4]	178	174 [4]	170 [4]	166 [4]	162 [4]
8	158 [3]	155 [4]	151 [3]	148 [4]	144 [4]	141 [3]	138 [3]	135 [3]	132 [3]	129 [3]
9	126 [3]	123 [3]	120 [3]	117 [2]	115 [3]	112 [2]	110 [3]	107 [2]	105 [3]	102 [2]

Exemple :

Absorbance	0,47	1,47	2,47	3,47
T %	33,9 %	3,4 %	0,3%	0 %

Les transmittances T % seront exprimées à 0,1 % près.

Annexe : Instructions opératoires pour la détermination des caractéristiques chromatiques des vins et/ ou des moûts issus de variétés de raisin caractérisées par une concentration élevée de pigments colorants et/ ou un niveau élevé de dioxyde de soufre

1. Principe de la méthode

1.1. Domaine d'application

Applicable au vin rouge à concentration élevée de pigments colorants, au moût et au moût contenant un niveau élevé de dioxyde de soufre.
Une méthode spectrophotométrique par laquelle les caractéristiques chromatiques sont, par convention, exprimées comme suit :

- l'intensité de la couleur est donnée par la somme des absorbances (ou densités optiques DO) en utilisant un trajet optique de 1 cm et des rayonnements de longueur d'onde 420, 520 et 620 nm,
- la nuance est exprimée comme le rapport entre l'absorbance à 420 nm et l'absorbance à 520 nm.

Pour les variétés de raisin caractérisées par une concentration élevée de pigments colorants, étant donné la nature de la structure chimique de ces substances, la détermination des caractéristiques chromatiques exige la dilution de l'échantillon dans un solvant tampon de pH 3,2. L'utilisation d'un solvant tamponné par rapport à la dilution avec de l'eau réduit l'effet de la matrice et normalise la DO lorsque la dilution augmente.

2. Méthode

2.1. Appareil

2.1.1. Spectrophotomètre permettant de faire des mesures entre 300 et 700 nm

2.1.2. Cuvettes en verre ou cuvettes en plastique jetables avec un trajet optique égal à 1 cm

2.1.3. Verrerie jaugée de volume variable selon les besoins

2.1.4. Filtre à seringue 0,45 μm

2.2. Réactifs

2.2.1. Eau de type II pour usage analytique, norme ISO 3696, ou de pureté équivalente

2.2.2. Acide tartrique 99,5 % (CAS 87-69-4)

2.2.3. Hydroxyde de sodium (NaOH) 1 N (CAS 1310-73-2)

2.2.4. Peroxyde d'hydrogène 30 % p/p (CAS 7722-84-1)

2.3. Solutions de travail

2.3.1. Solution tampon de pH 3,20

Préparation journalière : peser 7 0,1 g d'acide tartrique (2.2.2) dans une fiole jaugée de 1000 mL, ajouter 35 mL de NaOH 1 N (2.2.3) et compléter à 1 000 mL avec de l'eau (2.2.1). Contrôler le pH avec un pH-mètre en vérifiant que le pH est de 3,2 ±0,05. La solution doit être contrôlée et filtrée (2.1.4) au moment de l'utilisation.

2.3.2. Peroxyde d'hydrogène à 3 % (v/v)

Diluer 1,0 mL de peroxyde d'hydrogène (2.2.4) jusqu'à un volume de 10 mL. La solution doit être préparée au moment de l'utilisation.

2.4. Préparation de l'échantillon

Si l'échantillon est trouble, le clarifier par centrifugation (10 min., 1146 rcf). Si l'échantillon contient du dioxyde de carbone, l'éliminer par agitation sous vide (ou un système similaire).
Dans le cas d'un moût de raisin dont la fermentation alcoolique est inhibée par ajout de dioxyde de soufre, ajouter 0,1 mL d'une solution de peroxyde d'hydrogène à 3 % (2.3.2) par mL d'échantillon utilisé et compléter le volume, selon la dilution choisie, avec la solution tampon de pH 3,2 (2.3.1). Attendre 20 minutes avant de passer par la suite à la lecture spectrophotométrique.

2.5. Lecture spectrophotométrique pour le vin et le moût qui ont une intensité de couleur élevée ou une teneur élevée de dioxyde de soufre

Effectuer les mesures spectrophotométriques des échantillons : l'absorbance *(A)* sera comprise entre 0,3 et 1,0 (la fourchette d'acceptabilité d'absorbance peut être étendue si un appareil technologique le permet). Si la valeur de A dépasse la limite maximale, procéder au nombre approprié de dilutions *(d)* de l'échantillon à l'aide de la solution tampon (2.3.1) pour répondre aux critères d'acceptabilité.
Effectuer les mesures spectrophotométriques des échantillons en utilisant la solution tampon comme liquide de référence pour faire le zéro de l'échelle d'absorbance de l'appareil aux longueurs d'onde 420, 520 et 620 nm.

2.6. Calculs

Calculer les densités optiques (DO) pour chacune des trois longueurs d'ondes en multipliant les absorbances relevées ( ) par le nombre de dilutions effectuées *(d)* :

-

-

2.7. Expression des résultats

L'intensité de la couleur est donnée par convention par :

et est exprimée avec trois chiffres après la virgule.

La nuance *(N)* est donnée par convention par :

et est exprimée avec trois chiffres après la virgule.

Méthode OIV-MA-AS2-08 Méthode Type IV

Turbidité des vins

(Résolution OENO 4/2000, OIV/OENO 377/2009)

Méthode de détermination par néphélométrie.

1. Avertissement

La mesure de la turbidité est très largement dépendante de la conception de l'appareillage utilisé. Ainsi, les mesures comparatives d'instrument à instrument ne sont possibles que si le même principe de mesurage est appliqué.

Les principales sources d'erreur connues, liées au type de turbidimètre sont les suivantes :

- l'influence de la lumière parasite,
- l'influence de la coloration du produit, notamment dans le cas de faibles valeurs de turbidité,
- la dérive électronique intervenant avec le vieillissement des composants électroniques,
- le type de source lumineuse, de photodétecteur, les dimensions et le type de la cellule de mesure.

La présente méthode est basée sur l'utilisation d'un néphélomètre dont la conception technologique est du type : **double faisceau à compensation optique**.

Cette classe d'instrument permet de compenser : la dérive électronique, les variations de tension de l'alimentation électrique et partiellement la coloration du vin. Elle présente, en outre, une grande stabilité d'étalonnage.

Il convient de noter le caractère non contradictoire de la méthode, en raison de l'impossibilité de réaliser une analyse collaborative.

2. Objet

Le présent document a pour objet de décrire une méthode optique permettant de déterminer l'indice de turbidité (ou indice de diffusion) des vins.

3. Domaine d'application

La méthode est applicable en l'absence d'une instrumentation permettant une parfaite reproductibilité des mesures d'un appareil à l'autre ainsi que la compensation totale de la coloration des vins. En conséquence les résultats sont donnés à titre indicatif, ils sont à prendre avec réserve.

La méthode est surtout destinée à la production pour laquelle elle est le critère le plus objectif de la mesure de la limpidité.

Cette méthode, non susceptible d'être validée selon les critères internationalement reconnus est de **type 4**.

4. Principe général

La turbidité est un effet optique.

L'indice de diffusion est une propriété intrinsèque des liquides permettant de caractériser leur aspect optique.

Cet effet optique est provoqué par la présence de particules très fines réparties dans un milieu de dispersion liquide ; l'indice de réfraction de ces particules diffère de celui du milieu de dispersion.

Si l'on éclaire de l'eau optiquement propre renfermée dans un volume connu et si l'on mesure le flux lumineux diffusé par rapport au faisceau incident, la valeur notée de ce flux diffusé caractérise la diffusion moléculaire de l'eau.

Si la valeur obtenue avec l'eau étudiée est supérieure à celle correspondant à la diffusion moléculaire qui est constante pour une même longueur d'onde, un même flux incident sous un même angle de mesure, une même géométrie de cuve et une température donnée, la différence est imputable à la lumière diffusée par les particules solides, liquides ou gazeuses en suspension dans l'eau.

La mesure du flux lumineux diffusé, effectuée comme indiqué, constitue une mesure néphélométrique.

5. Définitions

5.1. *Turbidité :*

Réduction de la transparence d'un liquide due à la présence de matières non dissoutes.

5.2. *Unité d'expression de l'indice de turbidité :*

L'unité de turbidité utilisée est le :

N T U - NEPHELOMETRIC TURBIDITY UNIT
(unité de turbidité néphélométrique)

qui correspond à la mesure de la lumière diffusée par une suspension étalon de formazine, préparée comme indiqué au point 6.2.2., sous un angle de 90 ° par rapport à la direction du faisceau incident.

6. Préparation de la suspension étalon de formazine*[1]

6.1. *Réactifs :*

Tous les réactifs doivent être de qualité analytique reconnue.
Ils doivent être conservés dans des flacons en verre.

6.1.1. *Eau, pour la préparation de solutions témoins.*

[1] *? Attention aux précautions d'usage car la Formazine présente une certaine toxicité.

Tremper une membrane filtrante de grosseur de pore 0,1 µm (du type de celles utilisées en bactériologie) pendant 1 h dans 100 ml d'eau distillée. Filtrer à travers celle-ci 250 ml d'eau distillée deux fois sur la membrane et conserver cette eau pour la préparation des solutions étalons.

6.1.2. *Formazine ($C_2H_4N_2$), solutions.*

La combinaison appelée formazine, de formule $C_2H_4N_2$ ne se trouve pas dans le commerce. Elle est obtenue à l'aide des solutions suivantes :

Solution A : Dissoudre 10,0 g d'hexaméthylènetétramine de formule $(CH_2)_6N_4$ dans de l'eau distillée préparée selon 6.1.1. Puis compléter la solution à 100 ml à l'aide d'eau distillée préparée selon 6.1.1.

Solution B : Dissoudre 1,0 g de sulfate d'hydrazinium $N_2H_6SO_4$ dans de l'eau distillée préparée selon 6.1.1. Puis compléter la solution à 100 ml à l'aide d'eau distillée préparée selon 6.1.1.

AVERTISSEMENT **: Le sulfate d'hydrazinium est un poison et peut être cancérogène.**

6.2. *Mode opératoire*

Mélanger 5 ml de solution A et 5 ml de solution B. Après 24 h à 25 °C $\pm$ 3 °C, diluer la solution à 100 ml avec de l'eau. (6.1.1.).

La turbidité de cette solution standard est de : 400 NTU

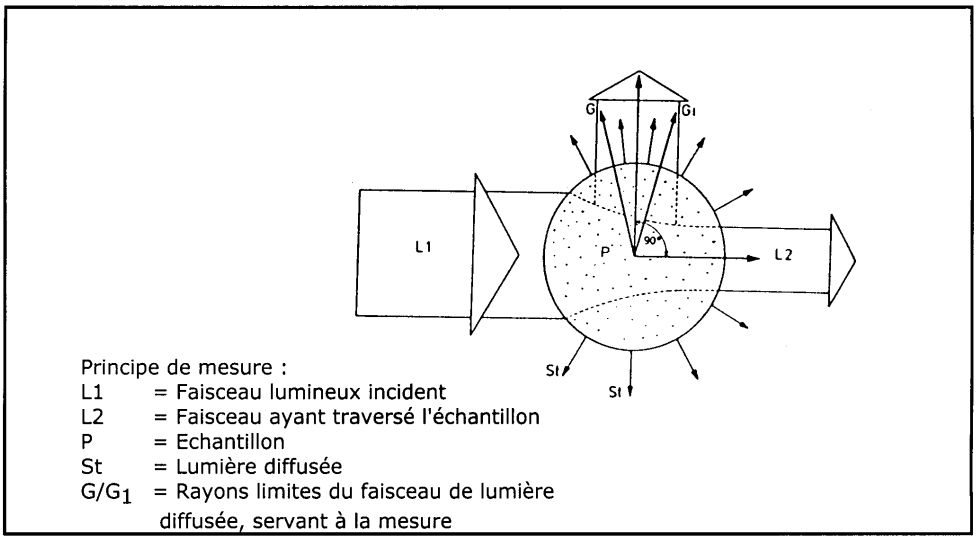
Dans l'obscurité, cette suspension standard se conserve à la température ambiante pendant 4 semaines environ.

Par dilution à 1/400 avec de l'eau distillée de préparation récente, on obtient une turbidité de : 1 NTU.

Cette solution n'est stable qu'une semaine.

REMARQUE : Des standards de formazine ont été comparés à des standards élaborés à base de polymères. Les écarts observés peuvent être considérés comme négligeables. Les étalons à base de polymères présentent néanmoins les inconvénients suivants : leur coût est très élevé et leur durée d'utilisation limitée. Ils doivent être manipulés avec précaution pour ne pas briser les particules de polymères, ce qui modifierait la valeur de la turbidité. Cette possibilité est proposée en tant que solution alternative à la formazine.

7. Principe optique de mesure

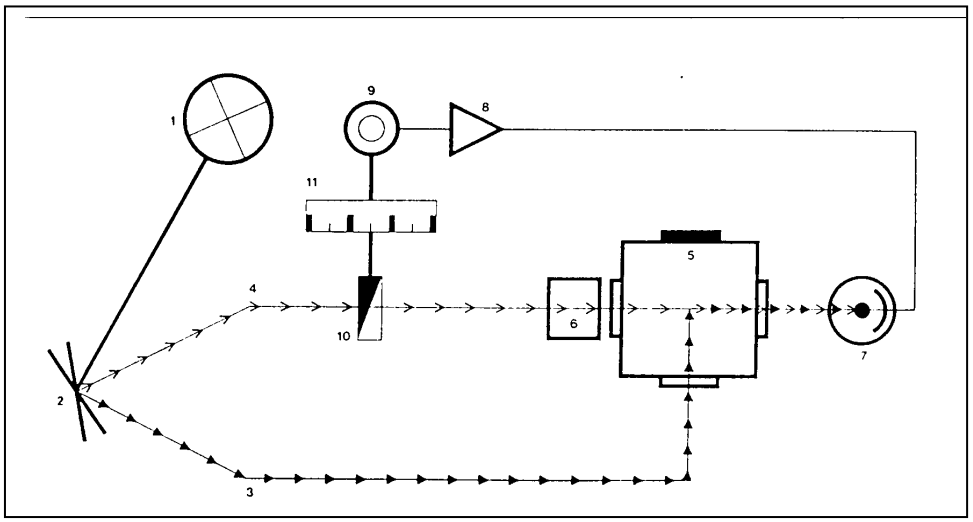


Principe de mesure :
L1 = Faisceau lumineux incident
L2 = Faisceau ayant traversé l'échantillon
P = Echantillon
St = Lumière diffusée
G/G_1 = Rayons limites du faisceau de lumière diffusée, servant à la mesure

L'observation de la lumière diffusée doit se faire à 90 ° par rapport à la direction du faisceau incident.

8. Appareillage

8.1. *Principe optique du turbidimètre à double faisceau et compensation optique :*



Une source lumineuse (1), alimentée par le secteur, envoie un faisceau lumineux sur le miroir oscillant (2) qui réfléchit, alternativement, un rayon de

mesure (3) et un rayon de comparaison (4) à raison d'environ 600 fois par seconde.

Le rayon de mesure (3) se propage dans le fluide à mesurer (5), tandis que le rayon de comparaison (4) se propage dans un standard de comparaison de turbidité (6) optiquement stable.

La lumière diffusée produite dans le fluide (5) par les particules qui engendrent la turbidité et la lumière diffusée par le standard de comparaison (6) sont reçues, alternativement, par une cellule photo-électrique (7).

Cette cellule reçoit donc, à la même fréquence, d'une part un rayon de mesure (3), d'autre part, un rayon de comparaison (4) dont les intensités lumineuses sont différentes.

La cellule photo-électrique (7) transforme alors ces intensités lumineuses inégales en courants photoélectriques qui sont ensuite amplifiés (8) et alimentent un moteur synchrone (9) jouant le rôle de servomoteur.

Ce dernier fait varier, au moyen d'un diaphragme de mesure mécanique (10) l'intensité du rayon de comparaison jusqu'à ce que les deux rayons parviennent à la cellule photo-électrique avec la même intensité lumineuse.

Cet état d'équilibre permet de mesurer la teneur en particules solides du fluide mesuré.

La valeur absolue de la mesure dépend des dimensions du standard de comparaison et de la position du diaphragme.

8.2. *Caractéristiques :*

NOTE : Afin de pouvoir réaliser les mesures, quelle que soit la couleur du vin, le turbidimètre doit être équipé d'un filtre interférentiel supplémentaire permettant le mesurage à la longueur d'onde de : 620 nm. Toutefois, ce filtre interférentiel n'est pas nécessaire si la source lumineuse est infrarouge.

8.2.1. La largeur de bande spectrale de la radiation incidente doit être inférieure ou égale à 60 nm,

8.2.2. il ne doit pas y avoir de divergence au niveau du parallélisme de la radiation incidente et la convergence ne doit pas dépasser 1,5 °,

8.2.3. l'angle de mesure entre l'axe optique de la radiation incidente et celui de la radiation diffusée doit être 90 ° $\pm$ 2,5 °,

8.2.4. l'appareil ne doit pas induire d'erreur due à la lumière parasite supérieure à :

0,01 NTU
sur une plage de mesure de :
0 à 0,1 NTU

9. Mode opératoire de la mesure

9.1. *Vérification de l'appareil*

Avant toute mesure ou série de mesures, vérifier le fonctionnement électrique et mécanique de l'appareil conformément aux préconisations de son constructeur.

9.2. *Vérification du calage de l'échelle de mesure*

Avant toute mesure ou série de mesure, à l'aide d'un appareil préalablement étalonné, vérifier le calage de son échelle de mesure conformément à son principe de construction.

9.3 *Nettoyage de la cellule de mesure*

Nettoyer avec le plus grand soin la cuve de mesure avant toute détermination. Prendre toutes les précautions utiles pour éviter l'introduction de poussières dans l'appareil et à plus forte raison dans la cellule de mesure avant et pendant la détermination de l'indice de turbidité.

9.4 *Réalisation de la mesure*

- opérer à une température comprise entre : 15 et 25 °C (La température du vin à mesurer doit être prise en considération pour obtenir une comparaison correcte). Préalablement à la mesure, homogénéiser avec soin, et sans mouvement brusque pour ne pas créer d'émulsion, le flacon contenant le produit à mesurer.
- rincer consciencieusement, à deux reprises, la cellule de mesure à l'aide d'un petit volume de produit à mesurer,
- introduire, avec précautions, le produit à mesurer dans la cellule de mesure en évitant un écoulement turbulent qui conduirait à la formation de bulles d'air et effectuer la mesure de l'essai,
- attendre une minute si la valeur de l'indice est stable,
- noter l'indice de turbidité obtenu.

10. Expression des résultats

L'indice de turbidité du vin examiné est relevé et exprimé en :

*** NTU**

- si la turbidité est inférieure à 1 NTU arrondir à 0,01 NTU
- si la turbidité est entre 1 NTU et 10 NTU arrondir à 0,1 NTU
- si la turbidité est entre 10 NTU et 100 NTU arrondir à 1 NTU

11. Rapport d'essai

Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes :

a) la référence à la présente méthode,

b) le résultat exprimé comme indiqué en 10,

c) tout détail ou événement susceptible d'avoir agi sur les résultats.

BIBLIOGRAPHIE

- AFNOR
Norme NF EN 27027 (ISO 7027) - Avril 1994
"Qualité de l'eau = Détermination de la turbidité"

- OIV
Recueil des méthodes internationales des boissons spiritueuses, des alcools, de la fraction aromatique des boissons - 1994
"Turbidité - Méthode de détermination par néphélométrie"

- SIGRIST PHOTOMETER S.A. CH. 6373 ENNETBURGEN
"Extraits de notices techniques de turbidimètres

Méthode OIV-MA-AS2-09 Méthode Type IV

Détermination du rapport isotopique $^{18}O/^{16}O$ de l'eau des vins Mouillage

(Résolution OENO 2/96)

SUPPRIMÉE
(Remplacée par méthode OIV-MA-AS2-12)

Méthode OIV-MA-AS2-10 Méthode Type IV

Indice de Folin-Ciocalteu
(Recueil OIV ed. 1990, révision par OIV/OENO 377/2009

1. Définition

L'indice de Folin-Ciocalteu est le résultat obtenu par l'application de la méthode décrite ci-après.

2. Principe

L'ensemble des composés phénoliques du vin est oxydé par le réactif de Folin-Ciocalteu. Ce dernier est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$) qui est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en mélange d'oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}).

La coloration bleue produite possède une absorption maximum aux environs de 750 nm. Elle est proportionnelle au taux de composés phénoliques.

3. Appareillage

Matériel courant de laboratoire, et notamment :

3.1. Fioles jaugées de 100 ml.

3.2. Spectrophotomètre permettant de travailler à 750 nm.

4. Réactifs

4.1. *Réactif de Folin-Ciocalteu*

Ce réactif est disponible dans le commerce prêt à l'emploi. Il peut être préparé de la façon suivante: 100 g de tungstate de sodium et 25 g de molybdate de sodium sont dissous dans 700 ml d'eau distillée; ajouter 50 ml d'acide phosphorique à 85% (ρ_{20} = 1,71 g/ml), 100 ml d'acide chlorhydrique concentré (ρ_{20} = 1,19 g/ml). Porter à l'ébullition sous reflux durant 10 heures, ajouter ensuite 150 g de sulfate de lithium, quelques gouttes de brome et porter à nouveau à l'ébullition durant 15 min. Refroidir et compléter à 1 litre avec de l'eau distillée.

4.2. *Carbonate de sodium (Na_2CO_3) anhydre en solution à 20 % (m/v).*

5. Mode opératoire

5.1. *Cas des vins rouges*

Dans une fiole jaugée de 100 ml, introduire en respectant l'ordre suivant :

1 ml de vin dilué au $^1/_5$,
50 ml d'eau distillée,

5 ml de réactif de Folin-Ciocalteu,
20 ml de solution de carbonate de sodium.

Porter à 100 ml avec de l'eau distillée.
Agiter pour homogénéiser. Attendre 30 minutes pour avoir une stabilisation de la réaction. Déterminer l'absorbance à 750 nm sous 1 cm par rapport à un témoin préparé avec de l'eau distillée à la place du vin.

Si l'absorbance lue n'est pas voisine de 0,3, il convient de reprendre le mode opératoire en modifiant la dilution du vin pour obtenir une telle absorbance.

5.2. *Cas des vins blancs*

Opérer dans les mêmes conditions, sur 1 ml de vin non dilué.

6. Expression des résultats

6.1. *Mode de calcul*

Le résultat est exprimé sous forme d'un indice obtenu en multipliant l'absorbance par 100 dans le cas des vins rouges dilués au 1/5e (ou par le facteur correspondant à la dilution employée) et par 20 dans le cas des vins blancs.

6.2.*Précision*

La différence entre les résultats de 2 déterminations effectuées simultanément ou rapidement l'une après l'autre par le même analyste, ne doit pas être supérieure à 1.

Une bonne répétabilité des résultats est liée à l'utilisation d'un appareillage (fioles jaugées et cuves du spectrophotomètre) rigoureusement propre.

Méthode OIV-MA-AS2-11 Méthode Type I

Détermination des caractéristiques chromatiques selon Cielab

(Résolution OENO 1/2006; OIV/OENO 377/2009)

1. Introduction

La couleur du vin est l'un des éléments visuels les plus importants dont nous disposons, en ce qu'elle nous apporte une multitude d'informations de grande pertinence.

La couleur est une sensation que nous percevons visuellement par l'effet de la réfraction ou de la réflexion de la lumière sur la surface d'un objet. La couleur est lumière, elle est liée étroitement à la lumière et c'est du type de lumière (illumination ou stimulus lumineux) que dépend la perception de couleurs différentes. La lumière est très variable, tout comme la couleur lorsqu'elle est mesurée.

Le vin absorbe une partie seulement des radiations lumineuses qu'il reçoit et en réfléchit une autre partie, laquelle parvient jusqu'à l'œil de l'*observateur*, lui procurant une sensation de couleur. Par exemple, la sensation induite par un vin de teinte rouge à luminosité très foncée est due à l'absorption quasi complète par ce vin de la radiation incidente.

1.1. Objet et champ d'application

Cette méthode spectrophotométrique a pour objet de déterminer le mode de mesure et de calcul des *caractéristiques chromatiques* des vins et autres boissons dérivées, avec reproduction des sensations de couleur ressenties par un observateur réel à partir des *composants trichromatiques* X, Y, Z définis par la Commission internationale de l'Éclairage (CIE, 1976).

1.2. Principe et définitions

La couleur d'un vin peut être définie par trois attributs ou qualités spécifiques de la sensation visuelle : sa teinte, sa luminosité (ou luminance) et son chromatisme.

La *teinte,* la plus caractéristique, désigne la couleur en soi : rouge, jaune, vert ou bleu. La *luminosité* est l'attribut de la sensation visuelle selon laquelle un vin paraît plus ou moins lumineux. Le *chromatisme* ou *niveau de coloration*, pour sa part, est lié à l'intensité plus ou moins forte de sa couleur. La conjugaison de ces trois concepts permet d'identifier les multiples nuances de couleur des vins.

Les *caractéristiques chromatiques* d'un vin sont définies par les *coordonnées colorimétriques* ou *de chromacité* (Fig. 1) correspondant à la *clarté* (L^*), *composante de couleur rouge/vert* (a^*), *composante de couleur jaune/bleu* (b^*), et par les *grandeurs dérivées*, à savoir la *chroma* (C^*), le *ton* (H^*) et la *chromacité* [(a^*,b^*) ou (C^*,H^*)]. En d'autres termes, ce système de couleur ou espace CIELab se fonde sur une représentation cartésienne séquentielle ou continue sur 3 axes orthogonaux L^*, a^* et b^* (Fig. 2 et 3). La coordonnée L^* désigne la clarté ($L^* = 0$ noir et $L^* = 100$ incolore), a^* désigne la composante de couleur rouge/vert ($a^*>0$ rouge, $a^*<0$ vert) et b^* la composante de couleur jaune/bleu ($b^*>0$ jaune, $b^*<0$ bleu).

1.2.1. Clarté

Son symbole est L^* et elle se définit par la fonction mathématique suivante :

$$L^*=116(Y/Y_n)^{1/3}-16 \qquad \textbf{(I)}$$

Elle est directement liée à la sensation visuelle de luminosité.

1.2.2.Composante de couleur rouge/vert

Son symbole est a^* et elle se définit par la fonction mathématique suivante :

$$a^*=500[(X/X_n)-(Y/Y_n)] \quad \textbf{(I)}$$

1.2.3. Composante de couleur jaune/bleu

Son symbole est b^* et elle se définit par la fonction mathématique suivante :

$$b^*=200-[(Y/Y_n)^{1/3}-(Z/Z_n)^{1/3} \quad \textbf{(I)}$$

1.2.4. Chroma

Le symbole de la Chroma est C^*, défini par la fonction mathématique suivante :

$$C^* = \sqrt{\left(a^{*2} + b^{*2}\right)}$$

1.2.5. Ton

Le symbole du ton est H^*, son unité est le degré sexagésimal (º) et il est défini par la fonction mathématique suivante :

$$H^* = tg^{-1}\,(b^*/a^*)$$

1.2.6 Différence de ton entre deux vins

Le symbole est ΔH^*, défini par la fonction mathématique suivante :

$$\Delta H^* = \sqrt{(\Delta E^*)^2 - (\Delta L^*)^2 - (\Delta C^*)^2}$$

(I) Voir explication annexe I.

1.2.7. Différence colorimétrique globale entre deux vins

Le symbole est ΔE^*, défini par les formules mathématiques suivantes :

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta C^*)^2 + (\Delta H^*)^2}$$

1.3. Réactifs et produits

Eau distillée.

1.4. Appareillage et matériel

Équipement et appareillage courants de laboratoire, notamment :

1.4.1. Spectrophotomètre permettant d'effectuer des mesures avec une longueur d'onde de transmittance comprise entre 300 et 800 nm, avec illuminant D65 et observateur à 10º. Utiliser des appareils à résolution égale ou supérieure à 5 nm et, si possible, à balayage.

1.4.2. Matériel informatique et programme approprié permettant, en conjonction avec le spectrophotomètre, de calculer les coordonnées colorimétriques (L^*, a^* et b^*) et leurs grandeurs dérivées (C^* et H^*).

1.4.3. Récipients de verre, disponibles par paires, de trajet optique de 1, 2 et 10 mm.

1.4.4. Micropipettes permettant de prélever des volumes compris entre 0,020 et 2 ml.

1.5. Échantillonnage et préparation de l'échantillon

La prise d'essai doit respecter particulièrement tous les concepts d'homogénéité et de représentativité.

Si le vin est trouble, il doit être clarifié par centrifugation. Concernant les vins jeunes ou mousseux, la plus grande quantité possible de dioxyde de carbone doit être éliminée par agitation sous vide ou par le biais d'un bain à ultrasons.

1.6. Mode opératoire

— Sélectionner une paire de récipients pour réaliser la lecture spectrophotométrique en veillant à ne pas dépasser le plafond de mesure dans les limites de linéarité du spectrophotomètre. À titre indicatif, il est conseillé d'utiliser pour les vins blancs et rosés des récipients de 10 mm de trajet optique et d'1 mm pour les vins rouges.

- Une fois l'échantillon prélevé et préparé, mesurer sa transmittance entre 380 et 780 nm tous les 5 nm, en utilisant comme liquide de référence de l'eau distillée placée dans un récipient de même trajet optique de manière à régler la ligne de base ou le blanc. Sélectionner l'illuminant D65 et un observateur à 10º.

- Si le trajet optique du récipient de lecture est inférieur à 10 mm, il convient alors de transformer la transmittance à 10 mm avant de procéder au calcul de : L^*, a^*, b^*, C^* et H^*.

Résumé :

Mesures spectrales à des transmittances entre 780 et 380 nm
Intervalle : 5 nm
Récipients : en fonction de l'intensité du vin. 1 cm (vins blancs et rosés), 0,1 cm (vins rouges)
Illuminant D65
Observateur standard à 10º

1.7. Calculs

Le spectrophotomètre doit être utilisé en conjonction avec un programme informatique permettant de calculer facilement, au moyen des algorithmes mathématiques appropriés, les coordonnées colorimétriques (L^*, a^* et b^*) et leurs grandeurs dérivées (C^* et H^*).
En l'absence de programme informatique, les calculs seront effectués conformément à l'Annexe 1.

1.8. Expression des résultats

Les coordonnées colorimétriques du vin seront exprimées selon les recommandations énoncées au tableau suivant.

Coordonnées colorimétriques	**Symbole**	**Unité**	**Intervalle**	**Décimales**
Clarté	L^*		0-100 0 noir 100 incolore	1
Composante rouge/vert	a^*		>0 rouge <0 verte	2
Composante jaune/bleu	b^*		>0 jaune <0 bleu	2
Chroma	C^*			2
Ton	H^*	º	0-360º	2

1.9. Exemple numérique

La figure 4 recense les valeurs des coordonnées colorimétriques et présente le diagramme de chromaticité d'un vin rouge jeune pour les valeurs suivantes :
X = 12,31 ; Y = 60,03 et Z = 10,24
L* = 29,2
a* = 55,08
b* = 36,10
C* = 66,00
H* = 33,26º

2. Fidélité

Les données ci-dessus ont été obtenues dans le cadre de deux essais interlaboratoires exécutés en double aveugle sur 8 échantillons de vin ayant des caractéristiques chromatiques progressives. Ces essais ont été conduits conformément aux recommandations du Protocole harmonisé pour les études collectives en vue de la validation de la méthode d'analyse.

2.1. Coordonnée colorimétrique L* (clarté, 0-100)

Identification de l'échantillon	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**	**G**	**H**
Année de l'essai interlaboratoires	2004	2002	2004	2004	2004	2004	2002	2004
Nombre de laboratoires participants	18	21	18	18	17	18	23	18
Nombre de laboratoires admis après élimination des valeurs aberrantes	14	16	16	16	14	17	21	16
Valeur moyenne ($\overline{x}$)	96,8	98,0	91,6	86,0	77,4	67,0	34,6	17,6
Écart-type de répétabilité (s_r)	0,2	0,1	0,2	0,8	0,2	0,9	0,1	0,2
Écart-type relatif de répétabilité (RSD_r) (%)	0,2	0,1	0,3	1,0	0,3	1,3	0,2	1,2
Limite de répétabilité (r) (2,8 x s_r)	0,5	0,2	0,7	2,2	0,7	2,5	0,2	0,6
Écart-type de reproductibilité (s_R)	0,6	0,1	1,2	2,0	0,8	4,1	1,0	1,0
Écart-type relatif de reproductibilité (RSD_R) (%)	0,6	0,1	1,3	2,3	1,0	6,1	2,9	5,6

Limite de reproductibilité (R) (2,8 x s_R)	1,7	0,4	3,3	5,5	2,2	11,5	2,8	2,8

2.2. Coordonnée colorimétrique a* (vert/rouge)

Identification de l'échantillon	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**	**G**	**H**
Année de l'essai interlaboratoires	2004	2002	2004	2004	2004	2004	2002	2004
Nombre de laboratoires participants	18	21	18	18	17	18	23	18
Nombre de laboratoires admis après élimination des valeurs aberrantes	15	15	14	15	13	16	23	17
Valeur moyenne ($\overline{x}$)	-0,26	-0,86	2,99	11,11	20,51	29,29	52,13	47,55
Écart-type de répétabilité (s_r)	0,17	0,01	0,04	0,22	0,25	0,26	0,10	0,53
Écart-type relatif de répétabilité (RSD_r) (%)	66,3	1,4	1,3	2.0	1,2	0,9	0,2	1,1
Limite de répétabilité (r) (2,8 x s_r)	0,49	0,03	0,11	0,61	0,71	0,72	0,29	1,49
Écart-type de reproductibilité (s_R)	0,30	0,06	0,28	0,52	0,45	0,98	0,88	1,20
Écart-type relatif de reproductibilité (RSD_R) (%)	116,0	7,5	9,4	4,7	2,2	3,4	1,7	2,5
Limite de reproductibilité (R) (2,8 x s_R)	0,85	0,18	0,79	1,45	1,27	2,75	2,47	3,37

2.3. Coordonnée colorimétrique b* (bleu/jaune)

Identification de l'échantillon	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**	**G**	**H**
Année de l'essai interlaboratoires	2004	2002	2004	2004	2004	2004	2002	2004
Nombre de laboratoires participants	17	21	17	17	17	18	23	18
Nombre de laboratoires admis après élimination des valeurs aberrantes	15	16	13	14	16	18	23	15
Valeur moyenne ($\overline{x}$)	10,95	9,04	17,75	17,10	19,68	26,51	45,82	30,07
Écart-type de répétabilité (s_r)	0,25	0,03	0,08	1,08	0,76	0,65	0,15	0,36
Écart-type relatif de répétabilité (RSD_r) (%)	2,3	0,4	0,4	6,3	3,8	2,5	0,3	1,2
Limite de répétabilité (r) (2,8 x s_r)	0,71	0,09	0,21	3,02	2,12	1,83	0,42	1,01
Écart-type de reproductibilité (s_R)	0,79	0,19	0,53	1,18	3,34	2,40	1,44	1,56
Écart-type relatif de reproductibilité (RSD_R) (%)	7,2	2,1	3,0	6,9	16,9	9,1	3,1	5,2
Limite de reproductibilité (R) (2,8 x s_R)	2,22	0,53	1,47	3,31	9,34	6,72	4,03	4,38

BIBLIOGRAPHIE

- Vocabulaire International de l'Éclairage. Publication CIE 17.4.- Publication I.E.C. 50(845). CEI(1987). Genève. Suisse.
- Colorimetry, 2nd. Ed.- Publication CIE 15.2 (1986) Vienna.
- Colorimetry, 2nd. Ed.- Publication CIE 15.2 (1986) Vienna.
- Kowaliski P. – Vision et mesure de la couleur. Masson ed. Paris 1990
- Wiszecki G. And W.S.Stiles, Color Science, Concepts and Methods,Quantitative Data and Formulae, 2end Ed.Wiley, New York 1982
- Sève R. .- Physique de la couleur. Masson. Paris (1996)
- Echávarri J.F., Ayala F. et Negueruela A.I. .-Influence du pas de mesure dans le calcul des coordonnées de couleur du vin. Bulletin de l'OIV 831-832, 370-378 (2000)
- I.R.A.N.O.R . Magnitudes Colorimetricas. Norma UNE 72-031-83
- Bertrand A.- Mesure de la coleur. F.V. 1014 2311/190196
- Fernández, J.I.; Carcelén, J.C.; Martínez, A. III Congreso Nacional De Enologos, 1.997. Caracteristicas cromaticas de vinos rosados y tintos de la cosecha de 1996 en la region de murcia
- Cagnaso E..- Metodi Oggettivi per la definizione del colore del vino. Quaderni della Scuoladi Specializzazione in Scienze Viticole ed Enologiche. Universidad di Torino. 1997
- Ortega A.P., Garcia M.E., Hidalgo J., Tienda P., Serrano J. – 1995- Identificacion y Normalizacion de los colores del vino. Carta de colores. Atti XXI Congreso Mundial de la Viña y el Vino, Punta del Este. ROU 378-391
- Iñiguez M., Rosales A., Ayala R., Puras P., Ortega A.P.- 1995-La cata de color y los parametros CIELab, caso de los vinos tintos de Rioja. Atti XXI Congreso Mundial de la Viña y el Vino, Punta del Este.ROU 392-411
- Billmeyer, F.W. jr. And M. Saltzman: Principies of Color. Technology, 2. Auflage, New York; J. Wiley and Sons, 1981.

ANNEXE 1

Formellement, les composantes trichromatiques X, Y, Z d'un stimulus de couleur résultent de l'intégration, sur tout le spectre, des fonctions obtenues en multipliant la courbe spectrale relative du stimulus de couleur par les fonctions colorimétriques de l'observateur de référence. Il s'agit toujours des fonctions obtenues expérimentalement. Il n'est donc pas possible de calculer les composants trichromatiques directement par intégration. En conséquence, on doit déterminer les valeurs approchées en remplaçant ces intégrales par des sommations des intervalles des longueurs d'onde.

=

=

=

=

$T_{(\lambda)}$ est la mesure de la transmitance du vin mesure a la longueur d'onde λ exprime a 1 cm de trajet optique.

$\Delta_{(\lambda)}$ est l'intervalle entre le valeur de λ auxquelles on mesure $T_{(\lambda)}$

$S_{(\lambda)}$: coefficients fonction de λ et de l'illuminant. (Tableau 1).

: coefficients fonction de λ et de l'observateur. (Tableau 1)

Les formules pour les calculs font référence aux valeurs Xn, Yn, y Zn, qui correspondent au diffuseur parfait pour les conditions d'illumination et de l'observateur de référence donnés. Ici, l'illuminant est D65 et l'observateur 10°.

$$X_n = 94{,}825; \quad Y_n = 100; \quad Z_n = 107{,}381$$

Cet espace approximativement uniforme est dérivé de l'espace CIEYxy, où sont définies les composantes trichromatiques X, Y, Z.

Les calculs des coordonnées L^*, a^* y b^* son effectués a partir des valeurs des composants Trichromatiques X, Y, Z, en utilisant les formules suivantes.

$L^* = 116\ (Y / Y_n)^{1/3} - 16$ para $Y / Y_n > 0{,}008856$

$L^* = 903{,}3\ (Y / Y_n)$ para $Y / Y_n <$ ó $= 0{,}008856$

$a^* = 500\ [\ f(X / X_n) - f(Y / Y_n)\ ]$

$b^* = 200\ [f(Y / Y_n) - f(Z / Z_n)\ ]$

$f(X / X_n) = (X / X_n)^{1/3}$ para $(X / X_n) > 0{,}008856$

$f(X / X_n) = 7{,}787\ (X / X_n) + 16 / 166$ para $(X / X_n) <$ ó $= 0{,}008856$

$f(Y / Y_n) = (Y / Y_n)^{1/3}$ para $(Y / Y_n) > 0{,}008856$

$f(Y / Y_n) = 7{,}787\ (Y / Y_n) + 16 / 116$ para $(Y / Y_n) <$ ó $= 0{,}008856$

$f(Z / Z_n) = (Z / Z_n)^{1/3}$ para $(Z / Z_n) > 0{,}008856$

$f(Z / Z_n) = 7{,}787\ (Z / Z_n) + 16 / 116$ para $(Z / Z_n) <$ ó $= 0{,}008856$

L'écart colorimétrique global entre deux couleurs est donné par la différence de couleur CIELAB

$$\Delta E^* = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$$

Dans l'espace CIELAB il est possible d'exprimer des écarts de couleur non seulement globaux, mais aussi suivant un ou plusieurs des paramètres L*, a* et b*. Cela permet de définir de nouveaux paramètres et les relier avec les attributs de la sensation visuelle.

La clarté, reliée à la luminosité, est directement représenté par la valeur de L*.

La chroma:$C^* = (a^{*\,2} + b^{*\,2})^{1/2}$ définit la chromie.

L'angle de teinte: $H^* = tg^{-1}\ (b^*/a^*)$ (exprimée en degrés). Est relié à la teinte.

La différence de teinte **:** $\Delta H^* = [(\Delta E^*)^2 - (\Delta L^*)^2 - (\Delta C^*)^2]^{1/2}$

Pour deux couleurs quelconques, ΔC^* représente leur différence de chromaticité; ΔL^*, leur différence de clarté, et ΔE^*, leur écart de couleur global. Nous avons donc:

$$\Delta E^* = [(\Delta L^*)2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2} = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta C^*)^2 + (\Delta H^*)^2]^{1/2}$$

Tableau 1. Coefficients à appliquer dans les formules

Long. d' (λ) nm.	**$S_{(\lambda)}$**	—	—	—
380	50,0	0,0002	0,0000	0,0007
385	52,3	0,0007	0,0001	0,0029
390	54,6	0,0024	0,0003	0,0105
395	68,7	0,0072	0,0008	0,0323
400	82,8	0,0191	0,0020	0,0860
405	87,1	0,0434	0,0045	0,1971
410	91,5	0,0847	0,0088	0,3894
415	92,5	0,1406	0,0145	0,6568
420	93,4	0,2045	0,0214	0,9725
425	90,1	0,2647	0,0295	1,2825
430	86,7	0,3147	0,0387	1,5535
435	95,8	0,3577	0,0496	1,7985
440	104,9	0,3837	0,0621	1,9673
445	110,9	0,3867	0,0747	2,0273
450	117,0	0,3707	0,0895	1,9948
455	117,4	0,3430	0,1063	1,9007
460	117,8	0,3023	0,1282	1,7454
465	116,3	0,2541	0,1528	1,5549
470	114,9	0,1956	0,1852	1,3176
475	115,4	0,1323	0,2199	1,0302
480	115,9	0,0805	0,2536	0,7721
485	112,4	0,0411	0,2977	0,5701
490	108,8	0,0162	0,3391	0,4153
495	109,1	0,0051	0,3954	0,3024
500	109,4	0,0038	0,4608	0,2185
505	108,6	0,0154	0,5314	0,1592
510	107,8	0,0375	0,6067	0,1120
515	106,3	0,0714	0,6857	0,0822
520	104,8	0,1177	0,7618	0,0607
525	106,2	0,1730	0,8233	0,0431
530	107,7	0,2365	0,8752	0,0305
535	106,0	0,3042	0,9238	0,0206
540	104,4	0,3768	0,9620	0,0137
545	104,2	0,4516	0,9822	0,0079
550	104,0	0,5298	0,9918	0,0040
555	102,0	0,6161	0,9991	0,0011
560	100,0	0,7052	0,9973	0,0000

565	98,2	0,7938	0,9824	0,0000
570	96,3	0,8787	0,9556	0,0000
575	96,1	0,9512	0,9152	0,0000
580	95,8	1,0142	0,8689	0,0000
585	92,2	1,0743	0,8256	0,0000
590	88,7	1,1185	0,7774	0,0000
595	89,3	1,1343	0,7204	0,0000
600	90,0	1,1240	0,6583	0,0000
605	89,8	1,0891	0,5939	0,0000
610	89,6	1,0305	0,5280	0,0000
615	88,6	0,9507	0,4618	0,0000
620	87,7	0,8563	0,3981	0,0000
625	85,5	0,7549	0,3396	0,0000
630	83,3	0,6475	0,2835	0,0000
635	83,5	0,5351	0,2283	0,0000
640	83,7	0,4316	0,1798	0,0000
645	81,9	0,3437	0,1402	0,0000
650	80,0	0,2683	0,1076	0,0000
655	80,1	0,2043	0,0812	0,0000
660	80,2	0,1526	0,0603	0,0000
665	81,2	0,1122	0,0441	0,0000
670	82,3	0,0813	0,0318	0,0000
675	80,3	0,0579	0,0226	0,0000
680	78,3	0,0409	0,0159	0,0000
685	74,0	0,0286	0,0111	0,0000
690	69,7	0,0199	0,0077	0,0000
695	70,7	0,0138	0,0054	0,0000
700	71,6	0,0096	0,0037	0,0000
705	73,0	0,0066	0,0026	0,0000
710	74,3	0,0046	0,0018	0,0000
715	68,0	0,0031	0,0012	0,0000
720	61,6	0,0022	0,0008	0,0000
725	65,7	0,0015	0,0006	0,0000
730	69,9	0,0010	0,0004	0,0000
735	72,5	0,0007	0,0003	0,0000
740	75,1	0,0005	0,0002	0,0000
745	69,3	0,0004	0,0001	0,0000
750	63,6	0,0003	0,0001	0,0000
755	55,0	0,0002	0,0001	0,0000
760	46,4	0,0001	0,0000	0,0000
765	56,6	0,0001	0,0000	0,0000
770	66,8	0,0001	0,0000	0,0000
775	65,1	0,0000	0,0000	0,0000

780	63,4	0,0000	0,0000	0,0000

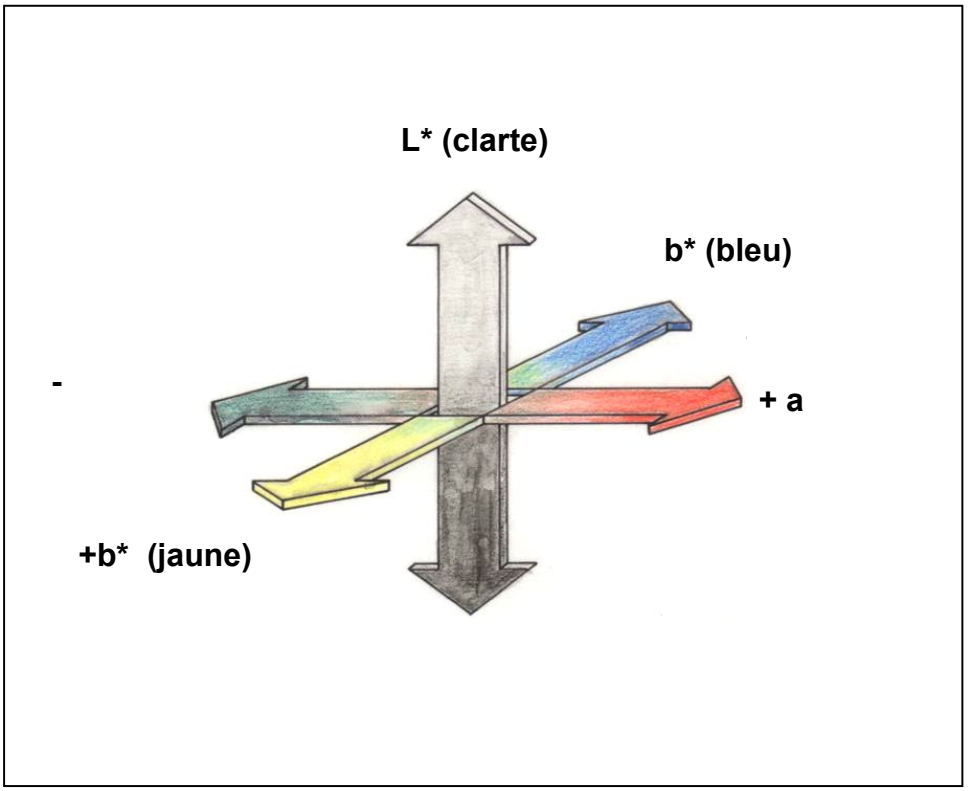


Figure 1 : Diagramme des coordonnées colorimétriques selon la Commission Internationale de l'Eclairage (CIE, 1976)

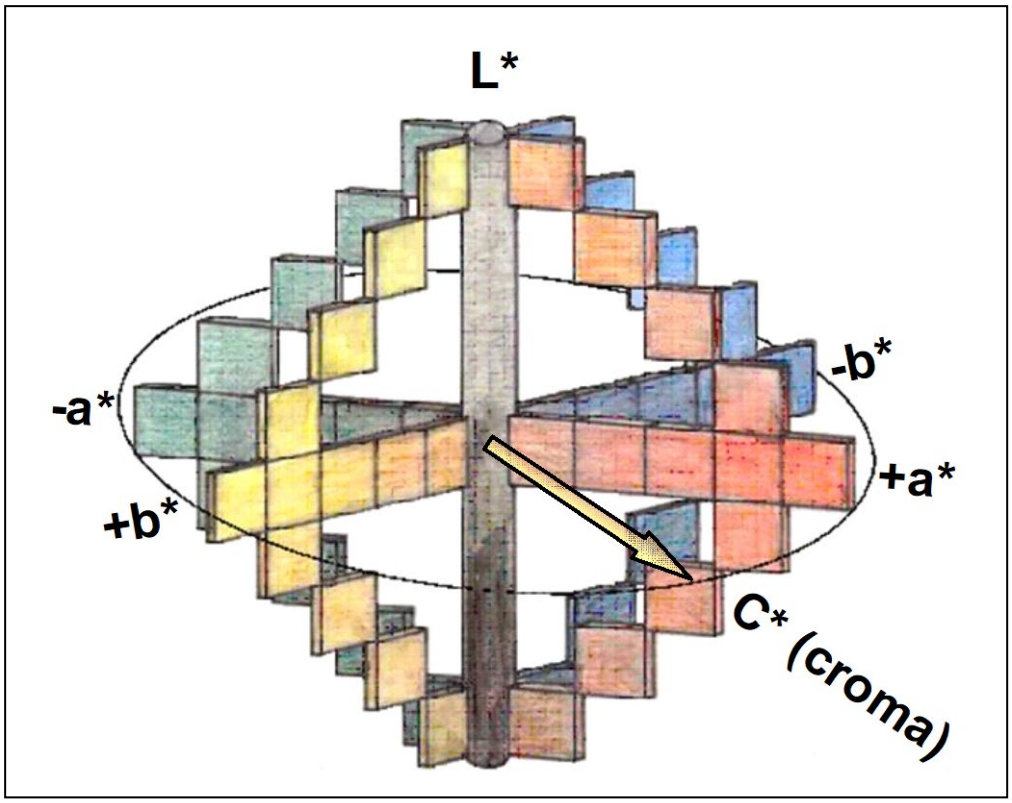


Figure 2. Espace CIELab de couleur à partir d'une représentation cartésienne séquentielle ou continue des 3 axes orthogonaux L, a et b.

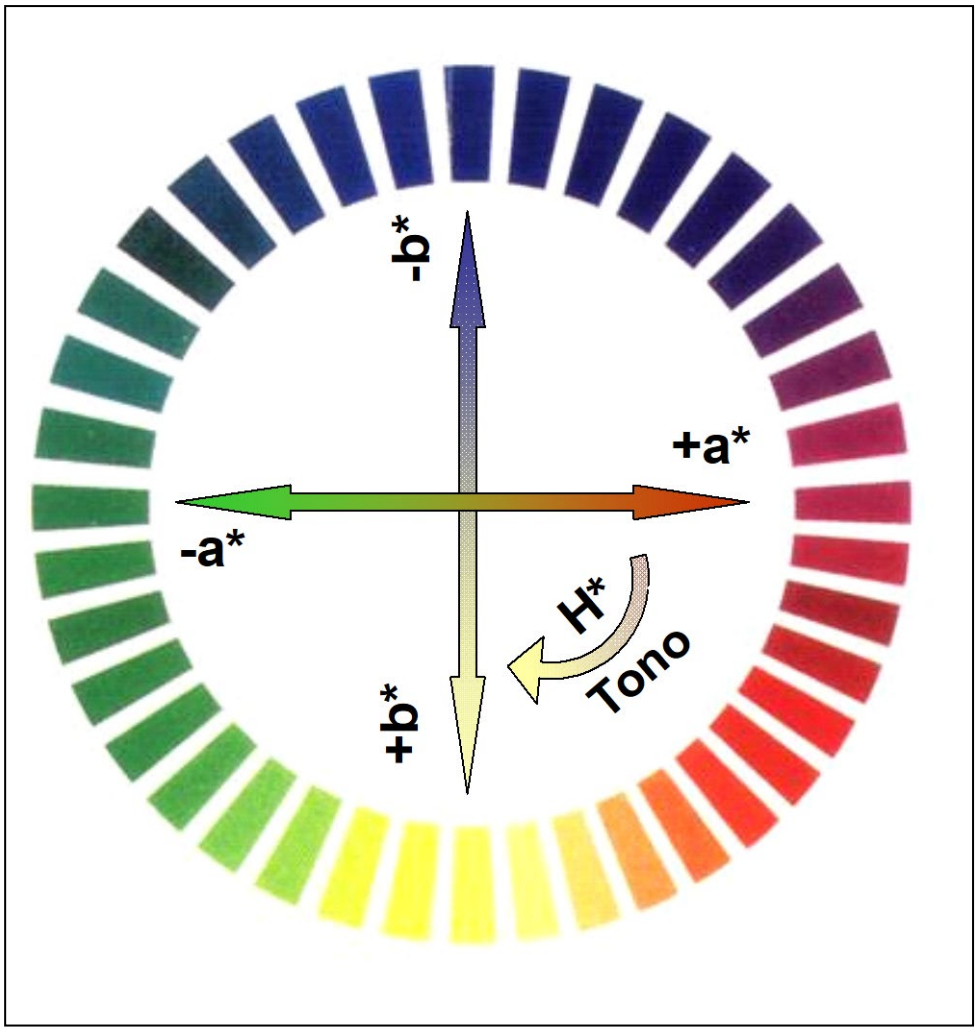


Figure 3. Diagramme séquentiel et/ou continu des coordonnées colorimétriques a et b et de magnitude dérivée comme le ton (H).

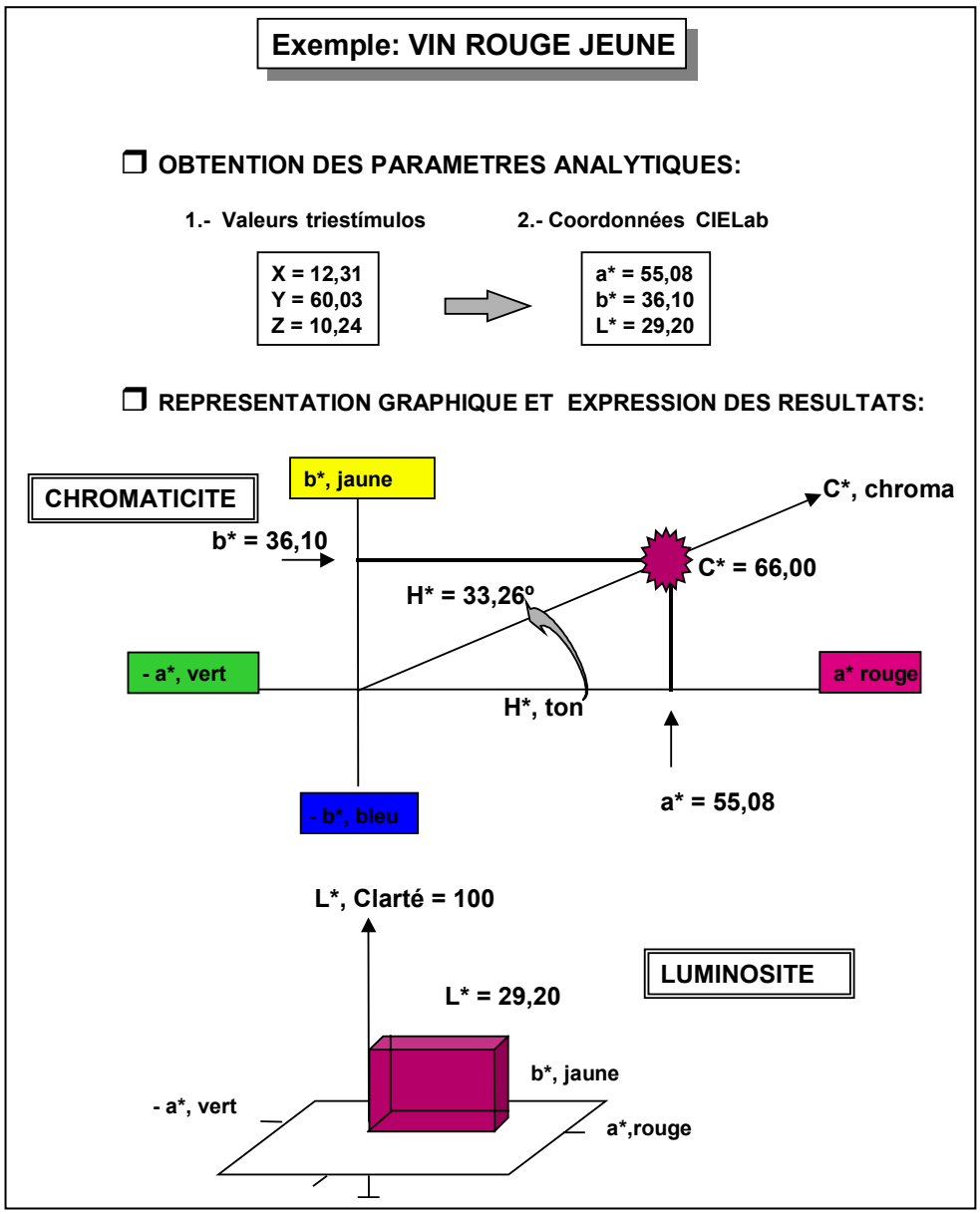


Figure 4. Représentation de la couleur d'un vin rouge jeune, utilisé comme exemple dans le chapitre 1.8, par un diagramme tridimensionnel de l'espace CIELab.

Méthode OIV-MA-AS2-12 Méthode Type II

Méthode de détermination du rapport isotopique $^{18}O/^{16}O$ de l'eau dans le vin et le moût

(Résolution OIV/OENO 353/2009)

1. CHAMP D'APPLICATION

La méthode permet la détermination du rapport isotopique $^{18}O/^{16}O$ de l'eau dans le vin et le moût après équilibrage avec du CO_2, par spectrométrie de masse isotopique (SMRI).

2. NORMES DE RÉFÉRENCE

ISO 5725:1994 : Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure : méthode de base pour la détermination de la répétabilité et de la reproductibilité d'une méthode de mesure normalisée.

V-SMOW : *Vienna-Standard Mean Ocean Water* ($^{18}O/^{16}O = R_{V\text{-}SMOW} = 0{,}0020052$).

GISP *Greenland Ice Sheet Precipitation*

SLAP *Standard Light Antarctic Precipitation*

3. DÉFINITIONS

$^{18}O/^{16}O$ Rapport isotopique entre l'oxygène 18 et l'oxygène 16 pour un échantillon donné

$\delta^{18}O_{V\text{-}SMOW}$ Échelle relative pour l'expression du rapport isotopique entre l'oxygène 18 et l'oxygène 16 pour un échantillon donné. $\delta^{18}O_{V\text{-}SMOW}$ se calcule par l'équation suivante :

$$\delta^{18}O_{V-SMOW} = \left[\frac{\left(\frac{^{18}O}{^{16}O}\right)_{sample} - \left(\frac{^{18}O}{^{16}O}\right)_{s\,tan\,dard}}{\left(\frac{^{18}O}{^{16}O}\right)_{s\,tan\,dard}} \right] \times 1000 \ [‰]$$

avec V-SMOW comme étalon et point de référence pour l'échelle relative δ.

BCR	Bureau communautaire de référence
AIEA	Agence internationale de l'Énergie atomique (Vienne, Autriche)
IRMM	Institut des matériaux et mesures de référence
SMRI	Spectrométrie de masse isotopique
m/z	Rapport masse sur charge
NIST	*National Institute of Standards & Technology*
MR	matériau de référence

4. PRINCIPE

La technique décrite ci-après est fondée sur l'équilibrage isotopique de l'eau dans des échantillons de vin ou de moût avec un gaz-type CO_2 selon la réaction d'échange isotopique suivante :

$$C^{16}O_2 + H_2{}^{18}O \leftrightarrow C^{16}O^{18}O + H_2{}^{16}O$$

Après équilibrage, le dioxyde de carbone dans la phase gazeuse est utilisé pour analyse par spectrométrie de masse isotopique (SMRI), où le rapport isotopique $^{18}O/^{16}O$ est déterminé sur le CO_2 résultant de l'équilibrage.

5. RÉACTIFS ET MATÉRIAUX

Les matériaux et consommables sont fonction de la méthode employée (voir la section 6). Les systèmes généralement utilisés sont fondés sur l'équilibrage de l'eau dans du vin ou du moût avec du CO_2.
Les matériaux de référence, étalons de travail et consommables suivants peuvent être utilisés :

5.1 Matériaux de référence

Nom	Éditeur/Auteur	$\delta^{18}O$ versus V-SMOW
V-SMOW, MR 8535	AIEA / NIST	0 ‰
BCR-659	IRMM	- 7,18 ‰
GISP, MR 8536	AIEA / NIST	- 24,78 ‰
SLAP, MR 8537	AIEA / NIST	- 55,5 ‰

5.2 Étalons de travail
5.2.1 Dioxyde de carbone employé pour l'équilibrage et comme gaz de référence secondaire pour la mesure (CAS 00124-38-9).

5.2.2 Le dioxyde de carbone utilisé pour l'équilibrage (selon l'instrumentation, le le gaz pourrait être identique à celui en 5.2.1 ou dans le cas d'un système de cylindres à flux continu, ,un mélange gazeux d'hélium- et de dioxyde carbone peut aussi être utilisé.

5.2.3 Étalons de travail avec des valeurs $\delta^{18}O_{V\text{-}SMOW}$ calibrés par rapport à des matériaux de référence internationaux.

5.3 Consommables
Hélium pour analyse (CAS 07440-59-7).

6. APPAREILLAGE

6.1 Spectrométrie de masse isotopique (SMRI)
Le spectromètre de masse isotopique (SMRI) permet la détermination des teneurs relatives en ^{18}O de gaz CO_2 en abondance naturelle avec une précision interne de 0,05 ‰. La précision interne se définit ici comme la différence entre deux mesures du même échantillon de CO_2.
Le spectromètre de masse utilisé pour déterminer la composition isotopique du gaz CO_2 est généralement équipé d'un collecteur triple afin de mesurer simultanément les courants ioniques suivants :

- m/z = 44 ($^{12}C^{16}O^{16}O$)
- m/z = 45 ($^{13}C^{16}O^{16}O$ et $^{12}C^{17}O^{16}O$)
- m/z = 46 ($^{12}C^{16}O^{18}O$, $^{12}C^{17}O^{17}O$ et $^{13}C^{17}O^{16}O$)

En mesurant les intensités correspondantes, le rapport isotopique $^{18}O/^{16}O$ est déterminé à partir du rapport des intensités de m/z = 46 et m/z = 44 après corrections pour les espèces isobariques ($^{12}C^{17}O^{17}O$ et $^{13}C^{17}O^{16}O$) dont les contributions peuvent être calculées à partir de l'intensité effective observée pour m/z = 45 et des abondances isotopiques habituelles de ^{13}C et ^{17}O dans la nature.

Le spectromètre de masse isotopique doit être équipé d'un des systèmes suivants :
- système à double introduction (double entrée) pour mesurer en alternance l'échantillon inconnu et l'étalon de référence.
- ou système à flux continu qui transfère quantitativement dans le spectromètre de masse le CO_2 depuis les fioles d'échantillon après équilibrage, mais aussi le CO_2, gaz de référence,

6.2 Equipement et matériel
Tout le matériel doit satisfaire aux exigences de la méthode ou de l'appareillage utilisé (spécifiées par le fabricant). Cependant, les matériels pourront être remplacés par des éléments aux performances analogues.

6.2.1 Fioles avec des septums adaptés au système employé.
6.2.2 Pipettes volumétriques avec des cônes adaptés.
6.2.3 Système thermiquement régulé pour effectuer l'équilibrage à température constante, généralement à ±1 °C.
6.2.4 Pompe à vide (si le système employé l'exige).
6.2.5 Passeur d'échantillons (si le système employé l'exige).
6.2.6 Seringues pour l'échantillonnage (si le système employé l'exige).
6.2.7 Colonne CG pour séparer le CO_2 d'autres gaz élémentaires (si le système employé l'exige).
6.2.8 Dispositif d'élimination d'eau (ex. : cryopiège, membranes perméables sélectives).

7. ÉCHANTILLONNAGE

Les échantillons de vin et de moût, ainsi que les matériaux de référence, sont utilisés pour l'analyse sans prétraitement. En cas d'une possible fermentation de l'échantillon, il faudrait ajouter de l'acide benzoïque (ou un autre antiferment) ou filtrer avec un filtre de diamètre de pore de 0,22 µm.
Les matériaux de référence utilisés pour le calibrage et la correction des dérives doivent, de préférence, être placés au début et à la fin de la séquence et être insérés à des intervalles de dix échantillons.

8. PROCÉDURE

Les descriptions ci-après renvoient aux procédures généralement appliquées pour la détermination des rapports isotopiques $^{18}O/^{16}O$ par équilibrage de l'eau avec un étalon de travail de CO_2 et mesure par SMRI. Ces procédures peuvent être adaptées en fonction des modifications apportées aux matériels et instruments par les fabricants ainsi différents appareils d'équilibre sont disponibles, exigeant différentes conditions de fonctionnement. Deux principales procédures techniques peuvent être utilisées pour introduire le CO_2 dans l' IRMS soit par un système de double orifice soit par l'utilisation du système en flux continu. La description de ces systèmes techniques ainsi que les conditions de l'opération correspondantes n'est pas possible.
Remarque : toutes les valeurs mentionnées pour les volumes, les températures, les pressions et les délais sont fournies à titre purement indicatif. Les valeurs exactes doivent être spécifiées sur la base des caractéristiques techniques des fabricants et/ou déterminées de manière expérimentale.

8.1 Équilibrage manuel

Un volume défini de l'échantillon/étalon est transféré dans un flacon au moyen d'une pipette. Le flacon est ensuite solidement fixé au collecteur.

Chaque collecteur est refroidi à une température inférieure à - 80 °C de manière à congeler les échantillons. (un collecteur muni d'une tube capillaire ne nécessite pas cette étape de congélation) Par la suite, le vide est fait dans tout le système.

Une fois qu'un vide stable est établi, le CO_2 gazeux servant d'étalon de travail est introduit dans les différents flacons. Pour le processus d'équilibrage, chaque collecteur est placé dans un bain d'eau thermiquement régulé à 25 °C (±1 °C) pendant 12 heures (jusqu'au lendemain). Il est crucial que la température du bain d'eau soit maintenue constante et homogène.

Une fois le processus d'équilibrage achevé, le CO_2 obtenu est transféré depuis les flacons vers le côté échantillon sous le système d'introduction double,. Les mesures sont prises en comparant plusieurs fois les rapports du CO_2 contenus côté échantillon et côté étalon (gaz étalon de référence : CO_2) du système d'introduction double. Cette approche est répétée jusqu'à ce que le dernier échantillon de la séquence soit mesuré.

8.2 Utilisation d'un appareil d'équilibrage automatique

Un volume défini de l'échantillon/étalon est transféré dans une fiole au moyen d'une pipette. Les fioles d'échantillon sont fixées au système d'équilibrage et refroidies à une température inférieure à - 80 °C de manière à congeler les échantillons. (un collecteur muni d'une tube capillaire ne nécessite pas cette étape de congélation) Par la suite, le vide est fait dans tout le système.

Une fois qu'un vide stable est établi, le CO_2 gazeux servant d'étalon de travail est introduit dans les fioles. L'équilibre est généralement atteint à une température de 22 ± 0,5 °C à l'issue d'un délai minimal de 5 heures, avec une agitation modérée (le cas échéant). Comme la durée de l'équilibrage est fonction de divers paramètres (ex. : la géométrie de la fiole, la température, l'agitation, etc.), la durée minimale d'équilibre doit être déterminée de manière expérimentale.

Une fois le processus d'équilibrage achevé, le CO_2 obtenu est transféré depuis les fioles vers le côté échantillon du système d'introduction double,. Les mesures sont prises en comparant plusieurs fois les rapports du CO_2 contenus côté échantillon et côté étalon (gaz étalon de référence : CO_2) du système d'introduction double. Cette approche est répétée jusqu'à ce que le dernier échantillon de la séquence soit mesuré.

8.3 Préparation manuelle et d'équilibrage automatique et analyse d'une système de double orifice couplé à un système à flux continu IRMS

Un volume défini de l'échantillon/étalon (200 ul par exemple) est transféré dans une fiole au moyen d'une pipette. Les fioles ouvertes sont placées dans une chambre fermée remplie de CO_2 utilisée pour l'équilibrage (5.2.2). Après plusieurs purges pour éliminer toute trace d'air, les fioles sont fermées et placées sur un plateau thermiquement régulé du passeur d'échantillons. L'équilibrage est atteint après au moins 8 heures à 40°C. Une fois le processus d'équilibrage terminé, le CO_2 obtenu est séché et transféré du côté échantillon du système de double orifice. Les déterminations sont effectuées à plusieurs reprises par la comparaison des pourcentages de CO_2 contenus du côté échantillon et du côté étalon (le CO_2 référence du gaz étalon) du double orifice. Cette approche est répété jusqu'à la détermination du dernier échantillon de la séquence.

8.3 Utilisation d'un appareil d'équilibrage automatique couplé à un système à flux continu

Un volume défini de l'échantillon/étalon est transféré dans une fiole au moyen d'une pipette. Les fioles d'échantillon sont placées sur un plateau thermiquement régulé.

À l'aide d'une seringue à gaz, les fioles sont rincées avec un mélange de He et de CO_2. Le CO_2 demeure dans l'espace de tête des fioles pour l'équilibrage.

L'équilibre est généralement atteint à une température de 30 ± 1 °C à l'issue d'un délai minimal de 18 heures.

Une fois le processus d'équilibrage achevé, le CO_2 obtenu est transféré par le système à flux continu vers la source ionique du spectromètre de masse. Du gaz de référence CO_2 est également introduit dans le SMRI par le système à flux continu. La mesure est prise en fonction du protocole spécifique du matériel employé.

9. CALCULS

Les intensités pour m/z = 44, 45, 46 sont consignées pour chaque échantillon et pour les matériaux de référence analysés dans un lot de mesures. Les rapports isotopiques $^{18}O/^{16}O$ sont ensuite calculés par l'ordinateur et le logiciel du SMRI suivant les principes énoncés au paragraphe 6.1. Dans la pratique, les rapports isotopiques $^{18}O/^{16}O$ sont mesurés par rapport à un étalon de travail préalablement calibré par rapport au V-SMOW. De légères variations peuvent se produire pendant la mesure en ligne du fait des modifications dues aux conditions instrumentales. Dans ce cas, le $\delta\ ^{18}O$ des échantillons doit être corrigé en fonction de la différence entre la valeur $\delta\ ^{18}O$ de l'étalon de travail et sa valeur assignée, préalablement calibrée par rapport au V-SMOW. Entre deux mesures de l'étalon de travail, la variation est la correction appliquée aux résultats de l'échantillon, qui sont supposées linéaires. En effet, l'étalon de travail doit être mesuré au début et à la fin de toutes les séries d'échantillons. De ce fait, une correction peut être calculée pour chaque échantillon au moyen d'une interpolation linéaire entre deux valeurs (la

différence entre la valeur assignée de l'étalon de travail et les mesures des valeurs obtenues).
Les résultats finaux sont présentés comme des valeurs relatives $\delta^{18}O_{V\text{-}SMOW}$ exprimées en ‰.
Les valeurs $\delta^{18}O_{V\text{-}SMOW}$ se calculent par l'équation suivante :

$$\delta^{18}O_{V-SMOW} = \left[\frac{\left(\frac{^{18}O}{^{16}O}\right)_{sample} - \left(\frac{^{18}O}{^{16}O}\right)_{V-SMOW}}{\left(\frac{^{18}O}{^{16}O}\right)_{V-SMOW}} \right] \times 1000 \ [‰]$$

La valeur $\delta^{18}O$ normalisée versus l'échelle V-SMOW/SLAP se calcule par l'équation suivante :

$$\delta^{18}O_{V-SMOW/SLAP} = \left[\frac{\delta^{18}O_{sample} - \delta^{18}O_{V-SMOW}}{\delta^{18}O_{V-SMOW} - \delta^{18}O_{SLAP}} \right] \times 55.5 \ [‰]$$

La valeur $\delta^{18}O_{V\text{-}SMOW}$ admise pour SLAP est de -55,5 ‰ (voir aussi 5.2).

10. PRÉCISION

La répétabilité (r) est égale à 0,24 ‰.
La reproductibilité (R) est égale à 0,50 ‰.

Résumé des résultats statistiques

	Moy générale (‰)		Ecart type de répétabilité (‰) s_r		Repetabilité (‰) r		Ecart type de reproductibilité (‰) s_R		Reproducibilité (‰) R
Eau									
Echantillon 1	-8,20		0,068		0,19		0,171		0,48
Echantillon 2	-8,22		0,096		0,27		0,136		0,38
Vin N° 1									
Echantillon 5	6,87		0,098		0,27		0,220		0,62
Echantillon 8	6,02		0,074		0,21		0,167		0,47
Echantillon 9	5,19		0,094		0,26		0,194		0,54
Echantillon 4	3,59		0,106		0,30		0,205		0,57
Vin N° 2									
Echantillon 3	-1,54		0,065		0,18		0,165		0,46
Echantillon 6	-1,79		0,078		0,22		0,141		0,40
Echantillon 7	-2,04		0,089		0,25		0,173		0,49
Echantillon 10	-2,61		0,103		0,29		0,200		0,56

11. ÉTUDES INTERLABORATOIRES

Bulletin de l'O.I.V. janvier-février 1997, 791-792, pp.53 à 65.

12. BIBLIOGRAPHIE

[1] Allison, C.E., Francey, R.J. et Meijer., H.A., « Recommendations for the Reporting of Stable Isotopes Measurements of carbon and oxygen », Comptes rendus d'une réunion de consultants tenue à Vienne, 1-3 décembre 1993, IAEA-TECDOC-825, 1995, pp. 155-162, Vienne, Autriche.

[2] Baertschi, P., « Absolute 18O Content of Standard Mean Ocean Water », Earth and Planetary Science Letters, 31, 1976, pp. 341-344.

[3] Breas, O., Reniero, F. et Serrini, G., « Isotope Ratio Mass Spectrometry: Analysis of wines from different European Countries », Rap. comm. Mass Spectrom., 8, 1994, pp. 967-987.

[4] Craig, H., « Isotopic standards for carbon and oxygen and correction factors for mass spectrometric analysis of carbon dioxide », Geochim. Cosmochim. Acta, 12, 1957, pp. 133-149.

[5] Craig, H., « Isotopic Variations in Meteoric Waters », Science, 133, 1961, pp. 1702-1703.

[6] Craig, H., « Standard for reporting concentrations of deuterium and oxygen-18 in natural waters », Science, 133, 1961, pp. 1833-1834.

[7] Coplen, T., « Normalization of oxygen and hydrogen data », Chemical Geology (Isotope Geoscience Section), 72, 1961, 1988, pp. 293-297.

[8] Coplen, T. et Hopple, J., « Audit of V-SMOW distributed by the US National Institute of Standards and Technology », Comptes rendus d'une réunion de consultants tenue à Vienne, 1-3 décembre 1993, Vienne, Autriche, AIEA, IAEA-TECDOC-825, 1995, pp. 35-38.

[9] Dunbar, J., « Detection of added water and sugar in New Zealand commercial wines », Amsterdam, Elsevier Scientific Publishing Corp. Edts., 1982, pp. 1495-501.

[10] Epstein, S. et Mayeda, T. »Variations of the 18O/16O ratio in natural waters », Geochim. Cosmochim. Acta, 4, 1953, pp. 213.

[11] Förstel, H., « Projet de description d'une méthode : variation naturelle du rapport des isotopes 16O et 18O dans l'eau comme méthode d'analyse physique du vin en vue du contrôle de l'origine et de l'addition d'eau », OIV, FV n° 919, 1992, pp. 1955/220792.

[12] Gonfiantini, R., « Standards for stable isotope measurements in natural compounds », Nature, 271, 1978, pp. 534-536.

[13] Gonfiantini, R., « Report on an advisory group meeting on stable isotope reference samples for geochemical and hydrochemical investigations », Vienne, Autriche, AIEA, 1987.

[14] Gonfiantini, R., Stichler, W. et Rozanski, K., « Standards and Intercomparison Materials distributed by the IAEA for Stable Isotopes Measurements », Comptes rendus d'une réunion de consultants tenue à Vienne, 1-3 décembre 1993, Vienne, Autriche, AIEA, IAEA-TECDOC-825, 1995, pp. 13-29.

[15] « Guidelines for Collaborative Study Procedures », J. Assoc. Off. Anal. Chem., 72, 1989, pp. 694-704.

[16] Martin, G.J., Zhang, B.L., Day, M. et Lees, M., « Authentification des vins et des produits de la vigne par utilisation conjointe des analyses élémentaire et isotopique », OIV, F.V., n° 917, 1993, pp. 1953/220792.

[17] Martin, G.J., Förstel, H. et Moussa, I., « La recherche du mouillage des vins par analyse isotopique 2H et 18O », OIV, FV n° 1006, 1995, pp. 2268/240595.

[18] Martin, G.J., « Recherche du mouillage des vins par la mesure de la teneur en 18O de l'eau des vins », OIV, FV n° 1018, 1996, pp. 2325/300196.

[19] Martin, G.J. et Lees, M., « Détection de l'enrichissement des vins par concentration des moûts au moyen de l'analyse isotopique 2H et 18O de l'eau des vins », OIV, FV n° 1019, 1997, pp. 2326/300196.

[20] Moussa, I., « Recherche du mouillage dans les vins par spectrométrie de masse des rapports isotopiques (SMRI) », OIV, FV n° 915, 1992, pp. 1937/130592.

[21] Werner, R.A. et Brand, W., « Reference strategies and techniques in stable isotope ratio analysis », Rap. Comm. Mass Spectrom., 15, 2001, pp. 501-519.

[22] Zhang, B.L., Fourel, F., Naulet, N. et Martin, G.J., « Influence de l'expérimentation et du traitement de l'échantillon sur la précision et la justesse des mesures des rapports isotopiques (D/H) et (18O/16O) », OIV, F.V. n° 918, 1992, pp. 1954/220792.

[23] Breas, O., Schultheis G., Reniero F., and GuillouC. Method for 18O/16O isotope ratio determination of water in wine and must OIV FV 1261

Méthode OIV-MA-AS311-01A Méthode Type IV

Substances réductrices

(Résolution OIV/OENO 377/2009)

1. **Définition**

Les substances réductrices sont constitués par l'ensemble des sucres à fonction cétonique ou aldéhydique dosés par leur action réductrice sur la solution cupro-alcaline.

2. **Principe des méthodes**

Défécation

Méthodes usuelles : le vin est traité par l'un des réactifs suivants:

- Acétate neutre de plomb
- Hexacyanoferrate (II) de zinc

3. **Défécation**

Le liquide dans lequel les sucres seront dosés doit présenter une teneur en sucres comprise entre 0,5 et 5 g/l.

Si le vin est sec, il faut éviter de le diluer pendant la défécation; s'il est doux, il faut le diluer tout en le déféquant, de manière à amener la teneur en sucres entre ces limites, suivant le tableau ci-dessous.

Dénomination	Teneur en sucres comprise entre (g/l)	Masse volumique comprise entre	Dilution à prévoir (%)
Moûts et mistelles	> 125	> 1,038	1
Vins doux spiritueux ou non	25 à 125	1,005 à 1,038	4
Vins moelleux	5 à 25	0,997 à 1,005	20
Vins secs	< 5	< 0,997	pas de dilution

3.1. *Méthodes*

3.1.1. *Défécation à l'acétate neutre de plomb*

3.1.1.1. *Réactifs*

- Solution d'acétate neutre de plomb (approximativement saturée):

  Acétate neutre de plomb, $Pb(CH_3COO)_2.3H_2O$ ..... 250 g
  Eau très chaude q.s.p. ..... 500 mL

Agiter jusqu'à dissolution.
- Solution d'hydroxyde de sodium, 1M
- Carbonate de calcium.

3.1.1.2. *Mode opératoire*

- Vins secs

  50 ml de vin sont placés dans une fiole jaugée de 100 ml ; ajouter 0,5 (*n*-0,5) ml de solution M d'hydroxyde de sodium, *n* étant le volume de solution d'hydroxyde de sodium 0,1 M utilisé pour doser l'acidité totale de 10 ml de vin. Ajouter en agitant 2,5 ml de solution saturée d'acétate de plomb et 0,5 g de carbonate de calcium, agiter à plusieurs reprises et abandonner au moins 15 min ; porter au trait de jauge avec de l'eau. Filtrer.

  1 ml de filtrat correspond à 0,5 ml de vin.

- Moûts, mistelles, vins doux et vins moelleux

  Dans une fiole jaugée de 100 ml, placer un volume de vin (ou de moûts ou de mistelles) ainsi défini, les dilutions ci-dessous étant données à titre indicatif:

  1er cas - Moûts et mistelles : diluer à 10 p. 100 le liquide à analyser, prélever 10 ml de cette dilution.

  2ème cas - Vins doux, vinés ou non, dont la masse volumique est comprise entre 1,005 et 1,038. Diluer à 20 p. 1000 de liquide à analyser, prélever 20 ml de cette solution.

  3ème cas - Vins moelleux, dont la masse volumique est comprise entre 0,997 et 1,005. Prélever 20 ml de vin non dilué.

  Ajouter 60 ml d'eau environ, 0,5, 1 ou 2 ml d'acétate de plomb en solution saturée et 0,5 g de carbonate de calcium ; agiter et laisser au repos pendant 15 min . au moins en agitant de temps en temps. Porter au trait de jauge avec de l'eau. Filtrer.

  1er cas - 1 ml de filtrat correspond à 0,01 ml de moût ou de mistelle;

  2ème cas - 1 ml de filtrat correspond à 0,04 ml de vin doux;

  3ème cas - 1 ml de filtrat correspond à 0,20 ml de vin moelleux.

3.2.2. *Défécation par l'hexacyanoferrate (II) de zinc*

Ce procédé de défécation ne devra être utilisé que pour les vins blancs, les vins doux peu colorés et les moûts

3.2.2.1. *Réactifs*

Solution I d'hexacyanoferrate (II) de potassium

Hexacyanoferrate (II) de potassium (II), $K_4Fe(CN)_6.3H_2O$ ..... 150 g
Eau q.s.p. ..... 1000 ml

Solution II de sulfate de zinc :

Sulfate de zinc $ZnSO_4.7H_2O$ ..... 300 g
Eau q.s.p. .....1000 ml

3.2.2.2. *Mode opératoire*

Dans une fiole jaugée de 100 ml, placer un volume de vin (ou de moût ou de mistelle) ainsi défini, les dilutions ci-dessous étant données à titre indicatif:

1er cas - Moûts et mistelles : diluer à 10 p. 100 le liquide à analyser, prélever 10 ml de cette dilution.

2e cas - Vins doux, vinés ou non, dont la masse volumique est comprise entre 1,005 et 1,038. Diluer à 20 p. 1000 de liquide à analyser, prélever 20 ml de cette solution.

3ème cas - Vins moelleux, dont la masse volumique est comprise entre 0,997 et 1,005. Prélever 20 ml de vin non dilué.

4ème cas : Vins secs, prélever 50 ml de vin non dilué.

Ajouter 5 ml de solution I d'hexacyanoferrate (II) de potassium et 5 ml de solution II de sulfate de zinc. Mélanger. Porter au trait de jauge avec de l'eau. Attendre 10 min. filtrer.

1er cas - 1 ml de filtrat correspond à 0,01 ml de moût ou de mistelle;
2ème cas - 1 ml de filtrat correspond à 0,04 ml de vin doux;
3ème cas - 1 ml de filtrat correspond à 0,20 ml de vin moelleux.
4ème cas - 1 ml de filtrat correspond à 0,50 ml de vin sec.

4. Dosage

4.1. *Réactifs*

- Solution cupro-alcaline :

  Sulfate de cuivre pur ($CuSO_4$,5 H_2O) ..... 25 g
  Acide citrique (C_6 H_8 O_7, H_2O) ..... 50 g
  Carbonate de sodium cristallisé (Na_2 CO_3,10 H_2O) ..... 388 g
  Eau q.s.p. .....1000 ml

  Dissoudre le sulfate de cuivre dans 100 ml d'eau, l'acide citrique dans 300 ml d'eau et le carbonate de sodium dans 300 à 400 ml d'eau chaude. Mélanger la solution d'acide citrique et la solution de carbonate de sodium. Ajouter ensuite la solution de sulfate de cuivre et porter au litre.

- Solution d'iodure de potassium à 30 p. 100

  Iodure de potassium (KI) ..... 30 g

  Eau q.s.p. ..... 100 ml

  Conserver en flacon de verre teinté.

- Acide sulfurique à 25 p. 100

  Acide sulfurique pur ρ_{20} = 1,84 g/ml ..... 25 g

  Eau q.s.p. ..... 100 ml

  Verser l'acide dans l'eau, laisser refroidir et porter à 100 ml.

- Empois d'amidon à 5 g/l

  Délayer 5 g d'amidon dans 500 ml d'eau environ. Porter à ébullition en agitant et maintenir l'ébullition pendant 10 min. Ajouter 200 g de chlorure de sodium. Porter au litre après refroidissement.

- Thiosulfate de sodium solution 0,1 M

- Solution de sucre interverti à 5 g/l, solution à utiliser pour vérifier la technique du dosage.

  Dans une fiole jaugée de 200 ml, placer :

  Saccharose pur et sec ..... 4,75 g
  Eau environ ..... 100 mL
  Acide chlorhydrique pur (ρ_{20} = 1,16 – 1,19 g/mL) ..... 5 mL

  Plonger la fiole dans un bain d'eau à 60 °C pendant un temps suffisant pour que la température de la solution atteigne 50 °C, température que l'on maintient durant 15 min. Abandonner ensuite la fiole au refroidissement spontané durant 30 min. puis refroidir par immersion dans un bain d'eau froide. Transvaser dans une fiole jaugée de 1 l, porter au litre. Cette solution se conserve bien durant un mois. Au moment de l'emploi neutraliser la prise d'essai (cette solution est approximativement 0,06 M acide), avec une solution d'hydroxyde de sodium.

4.2. *Mode opératoire*

Dans une fiole conique de 300 ml, placer 25 ml de solution cupro-alcaline, 15 ml d'eau et 10 ml de solution de défécation. Ce volume de solution sucrée ne doit pas contenir plus de 60 mg de sucre inverti.

Ajouter quelques grains de pierre ponce. Adapter à la fiole un réfrigérant à reflux et porter à l'ébullition qui doit être atteinte en 2 minutes. Maintenir l'ébullition pendant 10 min. exactement.

Refroidir immédiatement sous un courant d'eau froide. Après refroidissement complet, ajouter 10 ml de solution d'iodure de potassium à 30 p. 100, 25 ml d'acide sulfurique à 25 p. 100 et 2 ml d'empois d'amidon.

Titrer par la solution 0,1 M de thiosulfate de sodium. Soit *n* le nombre de millilitres utilisés.

Par ailleurs, effectuer un dosage témoin dans lequel 25 ml d'eau distillée remplacent les 25 ml de solution sucrée. Soit *n'* le volume de thiosulfate employé.

4.3.*Expression des résultats*

4.3.1. *Calculs*

La quantité de sucre, exprimée en sucre inverti, contenue dans la prise d'essai, est donnée dans le tableau ci-après en fonction du nombre n' - n de millilitres de thiosulfate utilisés.

Exprimer la teneur du vin en grammes de sucre inverti par litre avec une décimale en tenant compte des dilutions effectuées au cours de la défécation et du volume de la prise d'essai.

Tableau de correspondance entre le volume de solution 0,1 M de thiosulfate de sodium: (*n*'-*n*) ml, et la quantité de sucres réducteurs en mg,

$Na_2S_2O_3$ (ml 0,1 M)	Sucres réducteurs (mg)	Diff,	$Na_2S_2O_3$ (ml 0,1 M)	Sucres réducteurs (mg)	Diff,
1	2,4	2,4	13	33,0	2,7
2	4,8	2,4	14	35,7	2,8
3	7,2	2,5	15	38,5	2,8
4	9,7	2,5	16	41,3	2,9
5	12,2	2,5	17	44,2	2,9
6	14,7	2,6	18	47,2	2,9
7	17,2	2,6	19	50,0	3,0
8	19,8	2,6	20	53,0	3,0
9	22,4	2,6	21	56,0	3,1
10	25,0	2,6	22	59,1	3,1
11	27,6	2,7	23	62,2	
12	30,3	2,7			

BIBLIOGRAPHIE

JAULMES P., *Analyses des vins,* 1951, 170, Montpellier.
JAULMES P., BRUN Mme S., ROQUES Mme J., *Trav. Soc. Pharm.,* 1963, **23,** 19.
SCHNEYDER J., VLECK G., *Mitt. Klosterneuburg, Rebe und Wein,* 1961, sér. A, 135.

LUFF, Z. *Ges. Braun.,* 1898, **21,** 319; *Chemiker Zentralblatt,* 1898, **II,** 393.
SCHOORL N., Z. *Lebensmit. Unters. Forsch.,* 1929, No. 566, 57.

Méthode OIV-MA-AS311-01B Méthode Type IV

Sucres réducteurs

(Résolution OIV/OENO 377/2009)

Principe de la méthode

Défécation

Méthode de référence : passage du vin neutralisé et désalcoolisé sur une colonne échangeuse d'anions sous forme acétate où ses anions sont échangés par les ions acétiques, suivi de la défécation par l'acétate neutre de plomb.

SUPPRIMÉE

Méthode OIV-MA-AS311-01C Méthode Type II

Sucres réducteurs

Principe de la méthode

Dosage

Méthode unique: après avoir fait réagir le vin ou le moût déféqué sur une quantité déterminée de solution cupro-alcaline, l'excès d'ions cuivriques est dosé par iodométrie.

SUPPRIMÉE

Méthode OIV-MA-AS311-02 Méthode Type II

Glucose et fructose (révision par OIV/OENO 377/2009)

1. Définition

Le glucose et le fructose peuvent être dosés individuellement par une méthode enzymatique, en vue seulement du calcul du rapport glucose/fructose.

2. Principe

Le glucose et le fructose sont phosphorylés par l'adénosine triphosphate (ATP) au cours d'une réaction enzymatique catalysée par l'hexokinase (HK), et donnent du glucose-6-phosphate (G6P) et du fructose-6-phosphate (F6P) :

$$\text{glucose} + \text{ATP} \xrightleftharpoons{\text{HK}} \text{G6P} + \text{ADP}$$

$$\text{fructose} + \text{ATP} \xrightleftharpoons{\text{HK}} \text{F6P} + \text{ADP}$$

dans un premier temps le glucose-6-phosphate est oxydé en gluconate-6-phosphate par le nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate (NADP) en présence de l'enzyme glucose-6-phosphate-déhydrogenase (G6PDH). La quantité de nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate réduite (NADPH) qui prend naissance correspond à la quantité de glucose-6-phosphate et donc à celle de glucose.

$$\text{G6P} + \text{NADP}^{+} \xrightleftharpoons{\text{G6PDH}} \text{gluconate-6-phosphate} + \text{NADPH} + \text{H}^{+}$$

C'est la nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate réduit qui est dosé d'après son absorption à 340 nm.

Lorsque cette réaction est terminée, le fructose-6-phosphate est transformé sous l'action de la phosphoglucose-isomérase (PGI) en glucose-6-phospate :

$$\text{F6P} \xrightleftharpoons{\text{PGI}} \text{G6P}$$

Le glucose-6-phosphate réagit à nouveau avec le nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate pour donner du gluconate-6-phosphate et du nicotinamide-adénine-dinucleotide-phosphate réduit ; celui-ci sera dosé.

3. Appareillage

- Spectrophotomètre permettant d'effectuer la mesure à 340 nm, maximum d'absorption du NADPH. S'agissant de mesures absolues (pas de gamme d'étalonnage, mais référence au coefficient d'extinction du NADPH), les échelles des longueurs d'onde et des absorbances de l'appareil doivent être contrôlées.
  A défaut, utiliser un photomètre à spectre discontinu permettant d'effectuer les mesures à 334 nm ou à 365 nm.
- Cuves de verre de 1 cm de trajet optique ou cuves à usage unique.
- Pipettes pour test enzymatique de 0,02, 0,05, 0.1, 0,2 ml

4. Réactifs

Solution 1 : tampon (triéthanolamine 0,3 M, pH 7,6, Mg^{2+} 4.10^{-3}M): 11,2 g de chlorhydrate de triéthanolamine (C_2H_5HCl et 0,2 g de $MgSO_4.7H_2O$ sont dissous dans 150 ml d'eau bidistillée; ajouter environ 4 ml de solution 5M d'hydroxyde de sodium pour obtenir un pH égal à 7,6 et porter à 200 ml.

Cette solution tampon se conserve 4 semaines à + 4°C.

Solution 2 : solution de nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate (environ 11,5 10^{-3} M) : 50 mg de nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate disodique sont dissous dans 5 ml d'eau bidistillée.

Cette solution se conserve 4 semaines à +4°C.

Solution 3 : solution d'adénosine-5'-triphosphate disodique et 250 mg d'hydrogénocarbonate de sodium sont dissous dans 5 ml d'eau bidistillée.

Cette solution se conserve 4 semaines à +4°C.

Solution 4 : hexokinase/glucose-6-phosphate-déshydrogénase: mélanger 0,5 ml d'hexokinase (2 mg de protéine/ml soit 280 U/ml) et 0,5 ml de glucose-6-phosphate-déshydrogénase (1 mg de protéine/ml).

Le mélange se conserve un an à +4°C.

Solution 5 : phosphoglucose-isomérase (2 mg de protéine/ml, soit 700 U/ml). La suspension est utilisée sans dilution.

Cette solution se conserve un an à +4°C.

Remarque: L'ensemble des réactifs nécessaires pour ce dosage est commercialisé.

5. Mode opératoire

5.1. *Préparation de l'échantillon*

En fonction de la quantité estimée de glucose + fructose par litre (g/l) effectuer les dilutions suivantes :

Mesure à 340 et 344 nm (g/l)	Mesure à 365 nm (g/l)	Dilution avec l'eau	Facteur F de dilution
Jusqu'à 0,4	0,8	-	-
4,0	8,0	1 + 9	10
10,0	20,0	1 + 24	25
20,0	40,0	1 + 49	50
40,0	80,0	1 + 99	100
au-dessus de 40,0	80,0	1 + 999	1000

5.2. *Dosage*

Le spectrophotomètre étant réglé sur la longueur d'onde 340 nm, effectuer les mesures par rapport à l'air (pas de cuve dans le trajet optique) ou par rapport à l'eau.

Température 20 à 25°C.

Dans 2 cuves de 1 cm de trajet optique, introduire :

	Témoin	Dosage
Solution 1 (ramenée à 20°C)	2,50 ml	2,50 ml
Solution 2	0,10 ml	0,10 ml
Solution 3	0,10 ml	0,10 ml
Echantillon à doser		0,20 ml
Eau bidistillée	0,20 ml	

Mélanger et après environ 3 minutes, lire l'absorbance des solutions (A_1). déclencher la réaction en ajoutant :

Solution 4	0,02 ml	0,02 ml

Mélanger; attendre 1(minutes; effectuer la mesure de l'absorbance et vérifier l'arrêt de la réaction après 2 min. (A_2).

Ajouter immédiatement :

Solution 5	0,02 ml	0,02 ml

Mélanger; effectuer la lecture au bout de 10 min ; vérifier l'arrête de la réaction après 2 min. (A_3).

Déterminer les différences d'absorbance :

$A_2 - A_1$ correspondant au glucose,

$A_3 - A_2$ correspondant au fructose,

Pour le témoin et pour le dosage.

Déduire la différence d'absorbance du témoin (ΔA_T) de celle du dosage (ΔA_D) et établir :

pour le glucose: $\Delta A_G = \Delta A_D - \Delta A_T$
pour le fructose: $\Delta A_F = \Delta A_D - \Delta A_T$

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.

5.3. *Expression des résultats*

5.3.1 Calcul

La formule générale pour le calcul des concentrations est la suivante :

$$C = \frac{V \times PM}{\varepsilon \times d \times v \times 1000} \Delta A \text{ (g/l)}$$

V = volume du test (ml)
v = volume de l'échantillon (ml)
PM = masse moléculaire de la substance à doser
d = trajet optique de la cuve (cm)
ε = coefficient d'absorption du NADPH à 340 nm = 6,3 ($mmole^{-1} \times l \times cm^{-1}$)
V = 2,92 ml pour le dosage du glucose
V = 2,94 ml pour le dosage du fructose
v = 0,20 ml
PM = 180
d = 1

On obtient :

Pour le glucose : $C(g/l) = 0{,}417 \times \Delta A_G$
Pour le fructose : $C(g/l) = 0{,}420 \times \Delta A_F$

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

Remarque: si les mesures ont été faites aux longueurs d'onde 334 ou 365 nm, on obtient :

- mesure à 334 nm : $\varepsilon = 6{,}2$ ($mmole^{-1} \times l \times cm^{-1}$)
  pour le glucose : $C(g/l) = 0{,}425 \times \Delta A_G$
  pour le fructose : $C(g/l) = 0{,}428 \times \Delta A_F$
- mesure à 365 nm : $\varepsilon = 3{,}4$ ($mmole^{-1} \times l \times cm^{-1}$)

pour le glucose : $C(g/l) = 0,773 \times \Delta A_G$
pour le fructose : $C(g/l) = 0,778 \times \Delta A_F$

5.3.2 *Répétabilité* (*r*):

$r = 0,056\, x_i$

x_i = concentration en g/l de l'échantillon.

5.3.3 Reproductibilité (R):

$R = 0,12 + 0,076\, x_i$

x_i = concentration en g/l de l'échantillon.

BIBLIOGRAPHIE

BERGMEYER H.U., BERNT E., SCHMIDT F. and STORK H., *Méthodes d'analyse enzymatique* by BERGMEYER H.U., 2e éd., p. 1163, Verlag-Chemie Weinheim/Bergstraße, 1970.
BOEHRINGER Mannheim, *Méthodes d'analyse enzymatique en chimie alimentaire,* documentation technique.
JUNGE Ch., *F.V., O.I.V.,* 1973, No 438.

Méthode OIV-MA-AS311-03 Méthode Type II[2]

Dosage des sucres dans les moûts et les vins par chromatographie liquide à haute performance

OENO 23/2003
OIV/OENO 377/2009
OIV-OENO 552/2016

1. DOMAINE D'APPLICATION

Cette méthode s'applique au dosage direct des sucres dans les moûts et les vins jusqu'à 20 g/L et après dilution au-delà.
Le glycérol (entre 0,5 et 15 g/L) et le saccharose (entre 1 et 40 g/L) peuvent également être dosés de la même manière.

2. PRINCIPE

Les sucres et le glycérol sont séparés par CLHP au moyen d'une colonne alkylamine et détectés par réfractométrie.

3. RÉACTIFS

3.1 - Eau déminéralisée de type I (ISO 3696) ou équivalent (qualité CLHP) ;
3.2 - Acétonitrile [75-05-8] (limite inférieure de transmission : 200 nm - pureté ≥ 99 %) ;
3.3 - Fructose [57-48-7] (pureté ≥ 99 %) ;
3.4 - Glucose [492-62-6] (pureté ≥ 99 %) ;
3.5 - Saccharose [57-50-1] (pureté ≥ 99 %) ;
3.6 - Glycérol [56-81-5] (pureté ≥ 99 %).

PRÉPARATION DES SOLUTIONS RÉACTIVES

3.9 - Eau déminéralisée (3.1) : filtrée sur une membrane en cellulose de 0,45 µm ;
3.10 - Éluant : acétonitrile (3.2)/eau (3.9) dans un rapport de 80/20.
Note 2: le rapport eau/acétonitrile peut être adapté en fonction des objectifs.

[2] Type II pour le glucose et le fructose. Type IV pour le saccharose et le glycérol.

4. APPAREILLAGE

4.1 - Membrane de filtration 0,45 µm en cellulose ;
4.2 - Cartouche de filtration en silice greffée par des groupes octadécyles (par ex., Sep-Pak C_{18}) ;
4.3 - Appareillage courant de chromatographie liquide à haute performance ;
4.4 - Colonne alkylamine (5 µm, 250 x 4,6 mm) ;
Note 3 : il est possible d'utiliser des colonnes de longueurs, de diamètres internes et de tailles des particules différentes, mais la méthode de type II se réfère aux valeurs fournies.
4.5 - Détecteur d'indice réfractométrique (RID) ;
4.6 - Matériel courant de laboratoire.

5. ÉCHANTILLONNAGE

Les échantillons sont préalablement dégazés si nécessaire (par exemple avec de l'azote ou de l'hélium ou dans un bain à ultrasons).

6. MODE OPÉRATOIRE

6.1 - Préparation de l'échantillon
6.1.1 - Dilution
Les vins contenant moins de 20 g/L de (glucose + fructose) sont analysés sans dilution. Les moûts et les vins contenant plus de 20 g/L doivent être dilués jusqu'à atteindre la plage d'étalonnage.
6.1.2 - Filtration
Filtrer les échantillons sur membrane de 0,45 µm (4.1) avant analyse.
6.1.3 - Élimination des composés phénoliques (si nécessaire)
Pour un moût ou un vin : passer sur une cartouche de filtration C_{18} (4.2).
6.2 - Analyses
6.2.1 - Conditions analytiques
Note 4 : Les instructions suivantes sont à caractère obligatoire pour la méthode de type II.
Note 5 : Les conditions peuvent être adaptées par le laboratoire avec perte de la référence à la méthode de type II.
Système CLHP (4.3) équipé d'une colonne (4.4) et d'un RID (4.5).
Phase mobile : éluant isocratique - acétonitrile/eau (3.10).
Débit : 1 mL/min.
Volume injecté : entre 10 et 50 µL à adapter selon le matériel utilisé.
Des exemples de chromatogrammes sont montrés en annexe B, figures 1 et 2.

Il est recommandé que la résolution fructose-glucose soit ≥ 2.

6.2.2 - Étalonnage externe

La solution d'étalonnage pour tous les composés décrits dans cette procédure peut contenir :
glycérol (3.6) 10 g/L ± 0,01 g/L,
fructose (3.3) 10 g/L ± 0,01 g/L,
glucose (3.4) 10 g/L ± 0,01 g/L,
saccharose (3.5) 10 g/L ± 0,01 g/L.

Note 6 : en cas de quantification d'un seul de ces composés, il est possible de préparer une solution ne contenant que celui requis.

6.3 - Calcul des facteurs de réponse pour l'étalonnage externe utilisé pour les analyses de routine

$RF_i = surface_i/C_i$

où :
$surface_i$ = surface du pic du produit dans la solution d'étalonnage,
et C_i = quantité du produit présent dans la solution d'étalonnage.

Il est également possible d'utiliser une courbe d'étalonnage.

7. EXPRESSION DES RÉSULTATS

7.1 - Calcul des concentrations

$C_e = surface_e/RF_i$

où :
$surface_e$ = surface du pic du produit présent dans l'échantillon.
Les résultats sont exprimés en g/L.

Note 7 : les résultats sont indiqués avec au maximum une décimale.

8. ASSURANCE QUALITÉ ET CONTRÔLE

Le raccordement aux étalons internationaux se fait par la masse, le volume et la température

Des mélanges synthétiques ou des echantillons provenant, par exemple, de circuit d'aptitude sont utilisés comme contrôle qualité interne. Des cartes de contrôle peuvent être tracées.

9. PERFORMANCES DE LA MÉTHODE

Aucun composé connu ne coélue avec le fructose, le glucose ou le saccharose.

Robustesse : l'analyse est sensible à de faibles variations de température. Les colonnes doivent être protégées des variations de température.

10. FIDÉLITÉ

(Voir annexe B.3)

10.1 - Glucose (teneurs ≥ 3 g/L)

Limite de répétabilité ≅ limite de reproductibilité = 13%

10.2 - Fructose (teneurs ≥ 2 g/L)

Limite de répétabilité = 7%

Limite de reproductibilité = 10%

10.3 - Glucose + fructose (teneurs ≥ 5 g/L)

Limite de répétabilité ≅ limite de reproductibilité = 10%

Annexe A
(informative)
Exemples de chromatogrammes CLHP

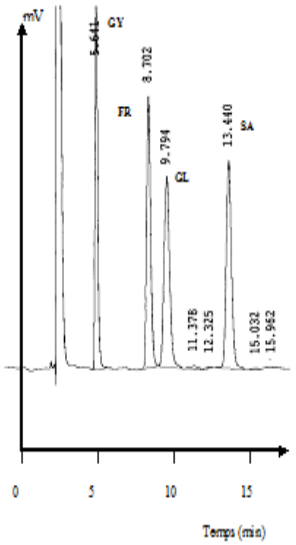


Figure 1 - Chromatogramme d'une solution étalon (sucres et glycérol à 10 g/L.)
Glycérol (GY), fructose (FR), glucose (GL), saccharose (SA)

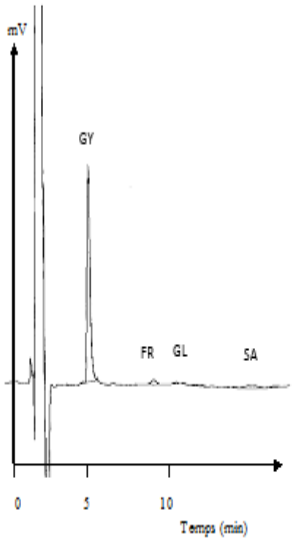


Figure 2 - Chromatogramme d'un vin rosé

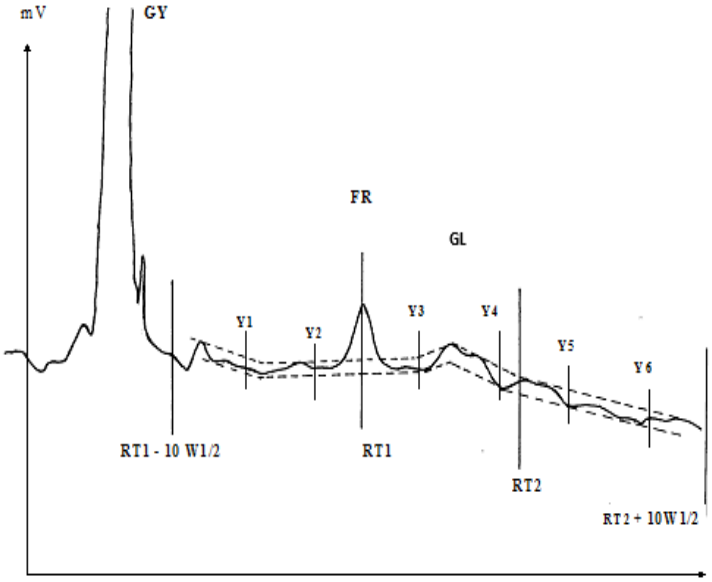


Figure 3 - Mesure des hauteurs du bruit de fond après agrandissement du chromatogramme
fructose (FR), glucose (GL), saccharose (SA) Glycérol (GY),
RT1 : temps de rétention du fructose ; RT2 : temps de rétention du glucose
W1/2 : largeur du pic à mi-hauteur ; Yi : hauteur du bruit de fond au point i

Annexe B

(informative)

DONNEES DE FIDELITE

B.1 - ECHANTILLONS DE L'ESSAI INTER LABORATOIRE

Cette étude a été conduite par le Laboratoire Interrégional de la Répression de Fraudes de Bordeaux. L'essai a porté sur 12 échantillons (6 échantillons différents répliqués en aveugle) identifiés de A à J (4 vins blancs et 4 vins rouges ; 2 vins de Porto blancs et 2 vins de Porto rouges) contenant du glucose et du fructose et dont les teneurs en chaque sucre étaient comprises entre 2 et 65 g/L. Les vins provenant de la région de Bordeaux ont été supplémentés en glucose et fructose et stabilisés par 100 mg/L de SO_2 (TRICARD et MEDINA 2003).

B.2 - CONDITIONS CHROMATOGRAPHIQUES

Compte tenu des facteurs de réponse de ces deux sucres et des échelles des chromatogrammes, le bruit de fond correspond à une concentration en fru ose de 0,04 g/L et en glucose de 0,06 g/L (voir figure A3).
On obtient alors les seuils de détection (3 fois le bruit de fond) et de quantification (10 fois le bruit de fond) :

$LD_{fructose} = 0{,}12$ g/L
$LD_{glucose} = 0{,}18$ g/L
$LQ_{fructose} = 0{,}4$ g/L
$LQ_{glucose} = 0{,}6$ g/L

Ces résultats sont conformes à ceux déterminés par TUSSEAU et BOUNIOL (1986) et répétables sur d'autres chromatogrammes.

B.3 - Fidélité

Neuf laboratoires ont participé à cette étude :
Neuf laboratoires ont participé à l'étude interlaboratoire:
Istituto Sperimentale Per L'Enologia, Asti, Italie ;
Laboratoire de la DGCCRF de Montpellier, France ;
Laboratoire LARA, Toulouse, France ;
Instituto do vinho do Porto, Porto, Portugal ;
Instituto de Vinha E Do Vinho, Unhos, Portugal ;
Estacion de Viticultura y Enologia, Vilafranca del Penedes, Espagne ;
Comité Interprofessionnel du vin de Champagne, Epèrnay, France ;
Station fédérale de Changins, Suisse ;
Laboratoire de la DGCCRF de Talence, France.

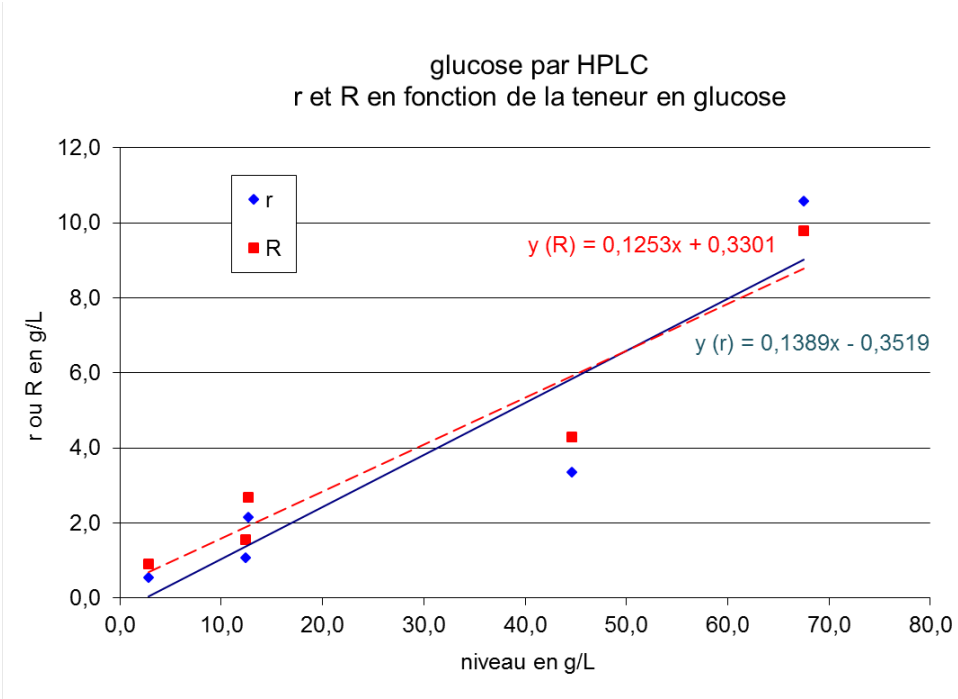
Les analyses des 3 points de gamme d'étalonnage et des 12 échantillons ont été réalisées à la suite en appliquant la méthode d'analyse transmise.

Les résultats ont été exploités selon le protocole OIV (Protocole de validation des méthodes d'analyse – Résolution OENO 6/1999).
Ce protocole demande que les analyses ne soient pas répétées ; or, 4 laboratoires ont transmis les résultats des analyses répétées 3 fois. Une seule série a été choisie (la première) pour l'exploitation des résultats conformément au protocole OIV.
Les calculs de répétabilité selon Youden, de reproductibilité et les tests de Cochran et de Grubbs ont été effectués.
Les données sur les répétitions ont permis de calculer d'une autre manière les écarts-type de répétabilité (selon ISO 5725).

B.3.1 – GLUCOSE

Glucose par HPLC (en g/L)						
Nombre de laboratoires	9	9	9	9	9	9
Nombres d'échantillons	2	2	2	2	2	2
Valeur moyenne	2,9	2,9	12,6	12,4	44,6	67,5
Ecart-type de répétabilité	0,44	0,17	0,67	0,34	1,05	3,31
Limite de répétabilité	1,42	0,55	2,15	1,07	3,35	10,58
Ecart-type de reproductibilité	0,78	0,30	0,90	0,52	1,43	3,28
Limite de reproductibilité	2,32	0,90	2,68	1,55	4,28	9,78
Valeur Horrat	5,7*	2,1	1,84	1,08	1,01	1,62

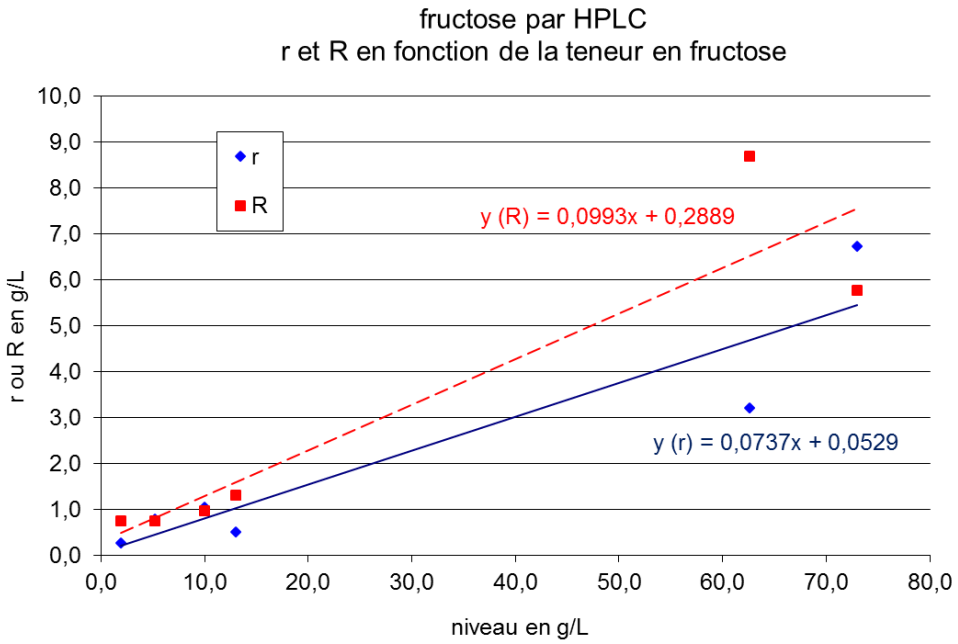
* non pris en compte pour l'expression de la fidélité



orrélation entre r et R et la concentration pour le glucose (ISO 5725)

B.3.2 – FRUCTOSE

Fructose par HPLC (en g/L)						
Nombre de laboratoires	9	9	9	9	9	9
Nombres d'échantillons	2	2	2	2	2	2
Valeur moyenne	1,9	5,2	10,0	13,0	62,6	73,0
Ecart-type de répétabilité	0,09	0,24	0,32	0,16	3,20	2,10
Limite de répétabilité	0,27	0,79	1,03	0,51	3,20	6,72
Ecart-type de reproductibilité	0,25	0,25	0,32	0,43	2,91	1,93
Limite de reproductibilité	0,75	0,75	0,96	1,30	8,68	5,77
Valeur Horrat	2,54	1,09	0,81	0,87	1,53	0,89

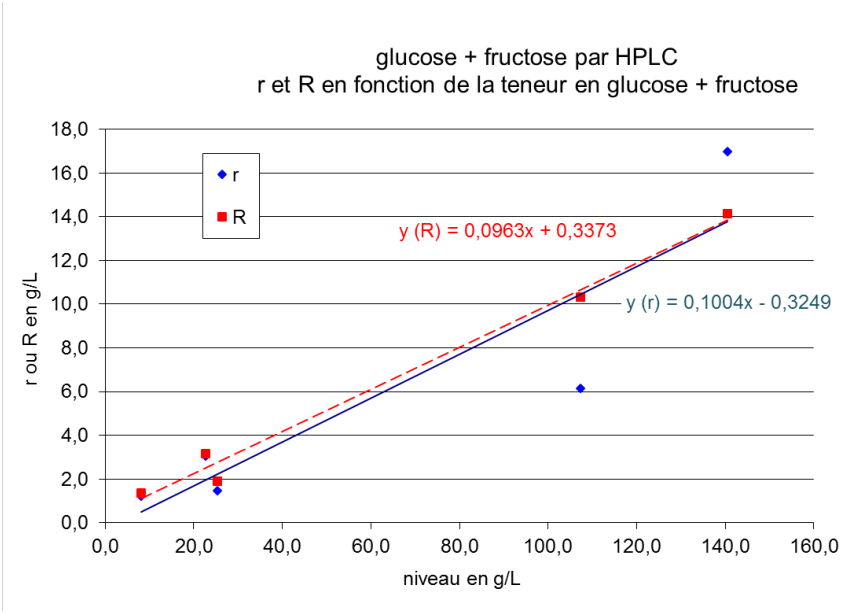


Corrélation entre r et R et la concentration pour le fructose (ISO 5725)

B.3.3 – GLUCOSE + FRUCTOSE

Glucose + fructose par HPLC (en g/L)						
Nombre de laboratoires	9	9	9	9	9	9
Nombres d'échantillons	2	2	2	2	2	2
Valeur moyenne	4,7	8,1	22,6	25,4	107,3	140,5
Ecart-type de répétabilité	0,48	0,38	1,06	0,46	1,92	5,30
Limite de répétabilité	1,52	1,21	3,07	1,48	6,13	17,0
Ecart-type de reproductibilité	0,89	0,46	1,06	0,64	3,47	4,74
Limite de reproductibilité	2,64	1,38	3,17	1,90	10,34	14,15
Valeur Horrat	4,17*	1,39	1,33	0,72	1,15	1,26

* non pris en compte pour l'expression de la fidélité



Corrélation entre r et R et la concentration pour le glucose + fructose (ISO 5725)

Bibliographie

TRICARD C. et MEDINA B. (2003) : Essai inter laboratoire OIV – Dosage des sucres dans les vins par HPLC. Feuillet Vert n°1143, 8 pages.
TUSSEAU D. et BOUNIOL C., 1986. Sc. Alim., 6, 559-577.
TUSSEAU D., 1996. *Limite de détection - limite de quantification*. Feuillet vert OIV 1000.
Protocole pour la planification, la conduite et l'interprétation des études de performance des méthodes d'analyse. Résolution OIV-OENO 6-2000.
Norme ISO 5725 (1994) : *Application de la statistique - Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure -...*

Méthode OIV-MA-AS311-04

Stabilisation des moûts en vue de la recherche de l'addition de saccharose

1. Principe de la méthode

L'échantillon prélevé est amené à pH 7, par une solution d'hydroxyde de sodium et additionné d'un volume égal de propanone.

La propanone est éliminée par distillation préalablement à la recherche du saccharose par chromatographie sur couche mine (CCM) et par chromatographie liquide haute performance (HPLC) (voir fiche *Saccharose).*

2. Appareillage

Appareil à distiller avec un ballon à distiller de 100 ml.

3. Réactifs

3.1. Hydroxyde de sodium en solution à 20 p. 100 (m/v).

3.2. Propanone (acétone).

4. Mode opératoire

4.1. Stabilisation des échantillons

20 ml de moût sont placés dans un flacon de 100 ml aux parois résistantes et amenés à pH 7 avec la solution d'hydroxyde de sodium à 20 p. 100 (VI à XII gouttes). Ajouter 20 ml de propanone. Boucher et conserver à basse température.

Remarque : Prendre garde à la tension de vapeur élevée de la propanone et à l'inflammabilité de ses vapeurs.

4.2. *Préparation de l'échantillon* pour la recherche du saccharose par CCM ou par HPLC.

Placer le contenu du flacon dans le ballon de 100 ml de l'appareil à distiller.

Distiller et recueillir 20 ml environ de distillat que l'on rejette. Ajouter au contenu du ballon à distiller 20 ml d'eau et distiller à nouveau en recueillant 25 ml environ de distillat que l'on rejette.

Transvaser le contenu du ballon à distiller dans une fiole jaugée de 20 ml et compléter au trait de jauge avec les eaux de rinçage du ballon. Filtrer. Utiliser le filtrat pour la recherche et éventuellement pour le dosage du saccharose par CCM ou par HPLC.

BIBLIOGRAPHIE

TERCERO C., *F.V. O.I.V.*, 1972, N^{os} 420 et 421

Méthode OIV-MA-AS311-05 Méthode Type II

Détermination de la répartition du deutérium dans l'éthanol issu de moûts de raisins fermentés, moûts de raisins concentrés, sucre de raisin (moûts de raisins concentrés rectifiés) et de vins par résonance magnétique nucléaire (SNIF-NMR / RMN-FINS [3])

Resolution OIV-OENO 426-2011

1. Introduction

Le deutérium contenu dans les sucres et l'eau du moût de raisins est réparti de nouveau après fermentation dans les molécules I, II, III et IV du vin :

$CH_2D\ CH_2\ OH$	$CH_3\ CHD\ OH$	$CH_3\ CH_2\ OD$	HOD
I	II	III	IV

2. Champ d'application

La méthode permet de mesurer les rapports isotopiques du deutérium (D/H) dans l'éthanol du vin et dans l'éthanol obtenu par fermentation de produits de la vigne (moûts, moûts concentrés, moûts concentrés rectifiés).

3. Définitions

$(D/H)_I$: Rapport isotopique associé à la molécule I
(D/H)I : Rapport isotopique associé à la molécule II

3 Fractionnement Isotopique Naturel Spécifique étudié par Résonance Magnétique Nucléaire (SiteSpecific Natural Isotope Fractionation studied by Nuclear Magnetic Resonance). Brevet : France, 8122710 ; Europe, 824022099 ; Etats-Unis, 854550082 ; Japon 57123249.

$(D/H)^{Q}_{W}$: Rapport isotopique de l'eau dans le vin (ou dans des produits fermentés)
$R = 2(D/H)_{II}/(D/H)_{I}$
R exprime la répartition relative du deutérium dans les molécules I et II ; R est mesuré directement à partir de l'intensité h (hauteur maximale) des signaux et donc $R = 3h_{II}/h_{I}$.

4. Principe

Les paramètres définis ci-dessus R, $(D/H)_{I}$ et $(D/H)_{II}$ sont déterminés par la résonance magnétique nucléaire du deutérium dans l'éthanol extrait à partir du vin ou de produits de fermentation du moût, de moût concentré ou de sucre de raisin (moût concentré rectifié) obtenu dans des conditions données.

5. Réactifs et matériaux

5.1 Réactifs :

5.1.1 Réactifs pour la détermination de l'eau par la méthode de Karl Fischer (lorsque cette méthode est utilisée pour la mesure de la teneur en alcool du distillat).

5.1.2 Hexafluorobenzène (C6F6) utilisé comme substance de blocage

5.1.3 Acide trifluoroacétique (TFA, CAS : 76-05-1) ou anhydride trifluoroacétique (TFAA, CAS : 407-25-0)

5.2 Matériaux de référence (disponibles auprès de l'Institut des matériaux et mesures de référence (IRMM) à Geel (B)) :

5.2.1 Tubes RMN scellés de CRM-123, utilisés pour vérifier l'étalonnage de l'instrumentation RMN

5.2.2 N,N-tétraméthylurée standard (TMU) ; TMU standard avec un rapport isotopique étalonné D/H.5.2.3 Autres matériaux de référence disponibles utilisés pour contrôler les étapes de distillation et de préparation :

CRM		Paramètre	Valeur certifiée	Incertitude
CRM-656	Éthanol du vin, 96% vol.		94,61	0,05
		t^D (éthanol) en % m/m	-26,91	0,07
		$\delta^{13}C$ (éthanol) en ‰ VPDB	102,84	0,20
		$(D/H)_I$ (éthanol) en ppm	132,07	0,30
		(D/H)I (éthanol) en ppm	2,570	0,005
		R (éthanol)		
CRM-660	Solution hydroalcoolique, 12% vol.		11,96	0,06
		t^Q (éthanol) en % vol.	-26,72	0,09
		$\delta^{13}C$ (éthanol) en ‰ VPDB	102,90	0,16
		$(D/H)_I$ (éthanol) en ppm	131,95	0,23
		(D/H)II (éthanol) en ppm	2,567	0,005
		R	148,68	0,14
		(D/H)w (eau) en ppm		

5.3 Appareillage

5.3.1 Spectromètre RMN équipé d'une sonde spécifique 'deutérium' réglé à la fréquence caractéristique νo du champ Bo (par exemple pour Bo = 7,05 T, νo = 46,05 MHz et pour Bo = 9,4 T, νo = 61,4 MHz), possédant un canal de découplage du proton (B2) et un canal de stabilisation champ-fréquence (lock) à la fréquence du fluor. L'instrument RMN peut éventuellement être équipé d'un passeur automatique d'échantillons et d'un programme supplémentaire de traitement de données pour l'évaluation des spectres et le calcul des résultats. Le fonctionnement du spectromètre RMN peut être contrôlé à l'aide de matériaux de référence certifiés (tubes scellés CRM 123).

5.3.2 Tubes échantillons RMN de 10 mm

5.3.3 Appareil de distillation

Remarque : Tout dispositif d'extraction de l'éthanol peut être utilisé à la condition qu'il permette de récupérer l'alcool du vin sans fractionnement isotopique.

La colonne Cadiot représentée en figure 1 est un exemple de dispositif de distillation manuel qui permet d'extraire 96 à 98,5% de l'éthanol du vin sans fractionnement isotopique, et d'obtenir un distillat contenant 92 à 93 d'éthanol en % m/m (95 % vol.).

Ce type de système comprend :

- Chauffe-ballon électrique avec régulateur de tension,
- Ballon à fond rond de 1 litre avec col en verre dépoli,
- Colonne Cadiot à bande tournante (partie mobile en Téflon),
- Fioles coniques avec col en verre dépoli, pour la collecte du distillat

Des systèmes automatiques de distillation sont également disponibles.

Les performances du système de distillation peuvent être contrôlées périodiquement, à la fois pour vérifier le taux d'extraction et l'exactitude de la

détermination isotopique. Ce contrôle peut être effectué par distillation et mesure de CRM -660.

5.3.4 Les équipements et consommables de laboratoire courants listés ci-dessous sont nécessaires :

-micropipette avec embouts appropriés,

-balance d'une précision de 0,1 mg ou supérieure,

-balance d'une précision de 0,1 g ou supérieure,

-seringue à usage unique pour le transfert des liquides,

-fioles jaugées de précision (50ml, 100 ml, 250ml, …)

-flacons équipés d'un système de fermeture étanche et de septa inertes (pour le stockage de parties aliquotes de vins, de distillats et de résidus jusqu'à la mesure)

-équipement et consommables spécifiés dans les autres méthodes citées ici.

Les matériels de laboratoire indiqués dans les listes ci-dessus constituent des exemples et sont susceptibles d'être remplacés par d'autres matériels de performances équivalentes.

6. Echantillonnage (Préparation de l'échantillon)

6.1 S'il n'est pas indiqué, déterminer le titre alcoométrique du vin ou du produit fermenté (tv) au moins à 0,05 % vol. le plus proche. (par exemple en utilisant la méthode de l'OIV MA-F-AS312-01-TALVOL).

6.2 Extraction de l'éthanol

Avec la fiole jaugée appropriée, introduire un échantillon homogène d'un volume approprié V ml de vin ou de produit fermenté dans le ballon à fond rond de l'appareil de distillation. Placer une fiole conique en verre dépoli pour recueillir le distillat. Chauffer le produit à distiller pour obtenir un taux de reflux constant au niveau du condensateur. Commencer le recueil du distillat quand on atteint une température stable des vapeurs caractéristique de l'azéotrope eau-éthanol (78°C) et arrêter le recueil quand la température augmente. Le recueil du distillat doit se poursuivre jusqu'à la récupération totale de l'azéotrope eau-éthanol.

En cas d'utilisation manuelle d'une colonne Cadiot (Figure 1), il est possible d'appliquer le mode opératoire suivant :

-Recueillir le liquide d'ébullition correspondant à l'azéotrope eau-éthanol ; quand la température augmente, interrompre le recueil pendant cinq minutes. Quand la température redescend à 78°C, recommencer le recueil du distillat jusqu'à ce que la température des vapeurs augmente à nouveau. Répéter cette opération jusqu'à ce que la température, après interruption du recueil, ne redescende plus à 78 °C.

Des systèmes de distillation disponibles dans le commerce peuvent également être utilisés.

Le poids m^D de distillat collecté est pesé avec une précision d'au moins 0,1g.

Afin d'éviter tout fractionnement isotopique, le distillat doit être conservé dans une fiole étanche empêchant toute évaporation jusqu'à ce qu'il soit de nouveau utilisé pour la détermination du titre alcoométrique (6.3) et la préparation du tube RMN (7.1).

Une partie aliquote de quelques ml de résidu est conservée. Son rapport isotopique $(D/H)^Q_W$ peut être déterminé si nécessaire.

6.3 Détermination du titre alcoométrique du distillat

Le titre alcoométrique (%m/m) du distillat doit être déterminé avec une précision supérieure à 0,1%.

La teneur en eau du distillat (ρ' g) peut être déterminée par la méthode Karl Fischer à l'aide d'un échantillon d'environ 0,5 ml d'alcool d'une masse connue exacte de ρ g. Le titre alcoométrique par masse du distillat est alors donné par la formule suivante :

t_m^D % m/m= 100 (1-ρ')/ ρ

Alternativement, le titre alcoométrique peut être déterminé par densimétrie, par exemple à l'aide d'un densimètre électronique.

6.4 Taux de distillation

Le taux de distillation est estimé à l'aide de la formule suivante :

Taux de dist.% = 100 t_m^D m^D /(V.tv)

Etant donné l'incertitude pesant sur chaque terme et en particulier sur le tv, le taux de distillation est estimé à ±0,5% (dans le cas d'un vin à 10% v/v).

En cas d'utilisation de la colonne Cadiot, aucun effet significatif de fractionnement isotopique n'est prévu pour un taux d'extraction supérieur à 96%. En tout état de cause, l'opérateur peut employer pour la distillation un volume Vml approprié de vin ou de produit fermenté afin d'assurer un taux d'extraction suffisant. En général des parties aliquotes de 750, 500, 400 et de 300 ml d'échantillon de vin devraient être suffisantes pour obtenir un taux de 96% en suivant la procédure de distillation énoncée ci-dessus avec la colonne de Cadiot sur des vins ou produits fermentés dont le tv est respectivement de 4, 6, 8 et 10% vol.

6.5 Fermentation de moûts, moûts concentrés et moûts concentrés rectifiés

Avant utilisation, la levure peut être réactivée dans un faible volume de moût. La cuve de fermentation est équipée d'un système d'étanchéité pour éviter les pertes d'éthanol.

6.5.1 Moûts

Verser environ un litre de moût, dont la concentration en sucres fermentescibles a été précédemment déterminée, dans la cuve de fermentation. Ajouter environ 1 g de levure sèche qui aura éventuellement été préalablement réactivée. Insérer le dispositif d'étanchéité. Laisser la fermentation s'effectuer jusqu'à épuisement du

sucre. Le produit fermenté peut ensuite être distillé suivant le procédé décrit précédemment pour le vin aux paragraphes 6.1 à 6.4.

Remarque : Les moûts conservés par ajout d'anhydride sulfureux doivent être désulfités par barbotage d'azote dans le moût dans un bain-marie à 70 à 80 °C sous reflux, afin d'empêcher le fractionnement isotopique par l'évaporation de l'eau. Une alternative pour retirer l'anhydride sulfureux consiste à ajouter en petite quantité une solution de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

6.5.2 Moûts concentrés

Placer V ml de moût concentré contenant une quantité connue de sucre (approximativement 170 g) dans la cuve de fermentation. Compléter jusqu'à 1 litre avec (1000 - V) ml d'eau. Ajouter les levures sèches (1 g) et 3 g de base azotée de bacto-levure DIFCO sans acides aminés. Homogénéiser et procéder comme décrit au paragraphe 6.5.1.

6.5.3 Sucre de raisin (Moûts concentrés rectifiés)

Procéder comme indiqué en 6.5.2, en complétant jusqu'à 1 litre avec (1000 - V) ml d'eau contenant également 3 g d'acide tartrique dissous.

Remarque : Les moûts concentrés et les moûts rectifiés sont dilués dans de l'eau ayant un rapport isotopique (D/H) différent de celui du moût d'origine. Par convention, les mesures des paramètres $(D/H)_I$ et $(D/H)_{II}$ sur l'éthanol doivent être normalisées comme si le moût avait fermenté dans de l'eau ayant une concentration en deutérium ajustée à celle de V-SMOW (155,76). On normalise cette donnée à l'aide des équations suivantes (Martin et al., 1996, J. AOAC, 79, 62-72) :

$$\left(\frac{D}{H}\right)_I^{Norm.V-SMOW} = \left(\frac{D}{H}\right)_I - 0.19 \times \left[\left(\frac{D}{H}\right)_W^S - 155.76\right]$$

$$\left(\frac{D}{H}\right)_{II}^{Norm.V-SMOW} = \left(\frac{D}{H}\right)_{II} - 0.78 \times \left[\left(\frac{D}{H}\right)_{W}^{S} - 155.76\right]$$

où $\left(\frac{D}{H}\right)_{W}^{S}$ est le rapport isotopique du moût dilué. Cette valeur peut être calculée à l'aide de l'équation de la Droite mondiale des eaux météoriques (Craig, 1961) :

$$\left(\frac{D}{H}\right)_{W}^{S} = 155.76 \times \left[\frac{\left(8 \times \delta^{18}O + 10\right)}{1000} + 1\right]$$

où on mesure $\delta^{18}O$ sur le moût dilué par la méthode de détermination du rapport isotopique $^{18}O/^{16}O$ de l'eau dans les vins et les moûts [OIV-MA-AS2-12].

Conserver 50 ml d'échantillon de moût ou de moût traité à l'anhydride sulfureux ou de moût concentré ou de moût concentré rectifié, en vue de l'extraction éventuelle de l'eau et de la détermination de son rapport isotopique $(D/H)_{W}^{Q}$.

7. Procédure

7.1 Préparation de l'échantillon d'alcool pour la mesure RMN

- sonde RMN de 10 mm de diamètre : dans une fiole précédemment pesée, recueillir 3,2 ml de distillat comme indiqué en section 6.2 et peser à 0,1 mg près (m_A) ; puis prendre un échantillon de 1,3 ml d'étalon interne TMU (5.2.2) et peser à 0,1 mg près (m_{ST}).

En fonction du type de spectromètre et de sonde utilisé, ajouter une quantité suffisante d'hexafluorobenzène (5.1.2) comme substance de stabilisation champ-fréquence (lock):

Spectromètre	sonde de 10 mm
7.05 T	150 µl
9.4 T	35 µl

Ces chiffres sont indicatifs et le volume réel à utiliser doit être ajusté en fonction de la sensibilité de l'instrument RMN. Pendant la préparation du tube et jusqu'à la mesure RMN, l'opérateur doit veiller à éviter toute évaporation d'éthanol et de TMU car ceci occasionnerait un fractionnement isotopique, des erreurs de poids (m_A et m_{ST}) des composants et des résultats RMN incorrects.

L'exactitude du mode opératoire de mesure y compris cette étape de préparation peut être vérifiée en utilisant le CRM 656.

Remarque : l'hexafluorobenzène peut être additionné de 10% (v/v) d'acide trifluoroacétique (5.1.3) afin de catalyser l'échange rapide d'hydrogène sur la liaison hydroxyle avec pour résultat un seul pic RMN pour les signaux hydroxyle et eau résiduelle.

7.2 Enregistrement des spectres RMN ^2H de l'alcool

L'homogénéité du champ magnétique B_0 de l'échantillon est optimisée par compensation (shimming), maximisant le signal RMN du lock ^{19}F observé avec l'hexafluorobenzène. Les spectromètres RMN modernes peuvent effectuer automatiquement et de manière très efficace cette procédure de compensation (shimming) à condition que les réglages initiaux soient suffisamment proches de l'homogénéité optimale du champ magnétique pour un échantillon donné, ce qui est

généralement le cas pour une série d'échantillons d'éthanol préparés comme indiqué en 7.1. L'efficacité de cette procédure peut être contrôlée au moyen de la résolution mesurée sur le spectre obtenu sans multiplication exponentielle (c.-à-d. LB = 0) (Figure 2b) et exprimée par la largeur à mi-hauteur des signaux méthyle et méthylène de l'éthanol et du signal méthyle du TMU, et doit être inférieure à 0,5 Hz dans les conditions optimales. La sensibilité mesurée avec un facteur de multiplication exponentielle LB égal à 2 (Figure 2a) doit être supérieure ou égale à 150 pour le signal méthyle de l'éthanol titrant 95 % vol. (93,5 % mas.).

7.2.2 Vérification des réglages des instruments

Procéder aux réglages habituels d'homogénéité et de sensibilité selon les indications du constructeur.

Utiliser les tubes scellés CRM123 (H : Haut, M : Moyen, B : Bas).

En suivant la procédure décrite au paragraphe 7.3 ci-dessous, déterminer les valeurs isotopiques de ces alcools, en les notant mesH, mesM, mesB.

Les comparer aux valeurs standard correspondantes signalées par stH, stM, stB en exposant.

En général, à titre d'indication, l'écart-type obtenu pour 10 répétitions de chaque spectre devrait être de l'ordre de 0,01 pour le rapport R, 0,5 ppm pour $(D/H)_I$ et 1 ppm pour $(D/H)_{II}$.

Les valeurs moyennes obtenues pour les divers paramètres isotopiques (R, $(D/H)_I$, (D/H)II) doivent se situer dans l'écart-type de répétabilité correspondant indiqué pour ces paramètres pour le CRM123. Dans le cas contraire, répéter les contrôles.

Une fois les réglages optimisés, d'autres matériaux CRM peuvent être utilisés pour contrôler la qualité des mesures dans des analyses de routine.

7.3 Conditions d'acquisition des spectres RMN

Placer un échantillon d'alcool préparé en 7.1 dans un tube de 10 mm et l'introduire dans la sonde.

On suggère les conditions d'acquisition des spectres RMN suivantes :

- température constante de la sonde, réglée idéalement avec une variation n'excédant pas ±0,5°K dans la plage de 302K à 306K en fonction de la puissance calorifique générée par le découplage ;

- temps d'acquisition d'au moins 6,8 s pour une largeur spectrale de 1200 hertz (mémoire de 16K) (c.-à-d. environ 20 ppm à 61,4 MHz ou 27 ppm à 46,1 MHz) ;

- Impulsion : 90° ;

- détection en quadrature : fixer l' «offset» 01 entre les signaux OD et CHD pour l'éthanol et entre les signaux HOD et TMU pour l'eau ;

- Déterminer la valeur de l'offset de découplage 02 à partir du spectre protonique mesuré par la bobine de découplage sur le même tube. Un bon découplage est obtenu quand 02 est situé au milieu de l'intervalle de fréquence existant entre les groupes CH3 et CH2. Utiliser le mode de découplage large bande ou des trains d'impulsions composites (ex : WALTZ16) pour assurer un découplage homogène sur l'ensemble du spectre.

Effectuer pour chaque spectre un nombre NS d'accumulations suffisant pour obtenir le rapport signal-bruit indiqué sous le terme de sensibilité au paragraphe 7.2 et répéter NE fois cette série de NS accumulations. Les valeurs de NS dépendent des types de spectromètre et de sonde utilisés. Exemples de choix possibles :

Spectromètre	sonde de 10 mm
7.05 T	NS = 304
9.4 T	NS = 200

Le nombre NE de répétitions doit être statistiquement significatif et suffisant pour obtenir les performances et la précision de la méthode comme indiqué en section (9) ci-dessous .

Dans le cas où deux tubes d'échantillons RMN ont été préparés selon la procédure décrite en 7.1, on peut enregistrer cinq répétitions de spectres RMN (NE=5) sur

chaque tube. Le résultat final pour chacun des paramètres isotopiques correspond à la valeur moyenne des mesures obtenues sur les deux tubes d'échantillons RMN. Dans ce cas, les critères d'acceptation pour la validation des résultats obtenus avec ces deux tubes sont les suivants :

$|Mes1(D/H)_I - Mes2(D/H)_I| < 0{,}5ppm$, $|Mes1(D/H)_{II} - Mes2(D/H)_{II}| < 0{,}8ppm$

8. Expression des résultats

Pour chacun des NE spectres (voir spectre RMN de l'éthanol, Figure 2a), déterminer :

$$R = 3 \cdot \frac{h_{II}}{h_I} = 3 \cdot \frac{\text{hauteur du signal II } (CH_3\ CH_D\ OH)}{\text{hauteur du signal I } (CH_2D\ CH_2\ OH)}$$

$$\left(D/H\right)_I = 1{,}5866 \cdot T_I \cdot \frac{m_{ST}}{m_A} \cdot \frac{\left(D/H\right)_{ST}}{t_m^D}$$

$$\left(D/H\right)_{II} = 2{,}3799 \cdot T_{II} \cdot \frac{m_{ST}}{m_A} \cdot \frac{\left(D/H\right)_{ST}}{t_m^D}$$

avec

- $$T_I = \frac{\text{hauteur du signal I } (CH_2D\ CH_2\ OH)}{\text{hauteur du signal de l'étalon interne (TMU)}}$$

- $$T_{II} = \frac{\text{hauteur du signal II } (CH_3\ CHD\ OH)}{\text{hauteur du signal de l'étalon interne (TMU)}}$$

- m_{ST} et m_A, voir 7.1

- t_m^D, voir 6.3

- $(D/H)_{ST}$ = rapport isotopique de l'étalon interne (TMU) indiqué sur le certificat fourni par IRMM.

L'utilisation des hauteurs de signaux au lieu des surfaces, mesurables avec moins de précision, suppose des largeurs de raies à mi-hauteur égales, ce qui est une approximation raisonnable (Figure 2b).

Pour chacun des paramètres isotopiques, calculer la moyenne et l'intervalle de confiance pour le nombre de spectres répétés acquis sur un échantillon donné.

Des logiciels optionnels permettent d'effectuer ces calculs en ligne.

9. Précision

La répétabilité et la reproductibilité de la méthode SNIF-NMR / RMN-FINS ont été l'objet d'études menées en collaboration sur les jus de fruit, ainsi qu'il est indiqué dans la bibliographie ci-dessous. Néanmoins ces études ne prenaient en considération que le paramètre $(D/H)_I$. Dans le cas du vin, des données provenant d'études internes menées dans différents laboratoires peuvent être prises en considération pour établir l'écart-type de répétablitié et la limite de répétabilité, comme présenté dans l'Annexe I. Les résultats des essais d'aptitude rapportés dans l'Annexe II fournissent des données qui peuvent être utilisées pour calculer l'écart-type de reproductibilité et la limite de reproductibilité pour les vins.

Ces chiffres peuvent être résumés comme suit :

	$(D/H)_I$	$(D/H)_{II}$	R
S_r	0,26	0,30	0,005
r	0,72	0,84	0,015
S_R	0,35	0,62	0,006
R	0,99	1,75	0,017

avec

- S : écart type de répétabilité
- r : limite de répétabilité
- S_R : écart type de reproductibilité
- R : limite de reproductibilité

REFERENCES

MARTIN G.J., MARTIN M.L., MABON F., *Anal. Chem.,* 1982, 54, 23802382.

MARTIN G.J., MARTIN M.L., *J. Chim. Phys.,* 1983, 80, 294297.

MARTIN G.J., GUILLOU C., NAULET N., BRUN S., Tep Y., Cabanis J.C.,

CABANIS M.T., SUDRAUD P., *Sci. Alim.,* 1986, 6, 385405.

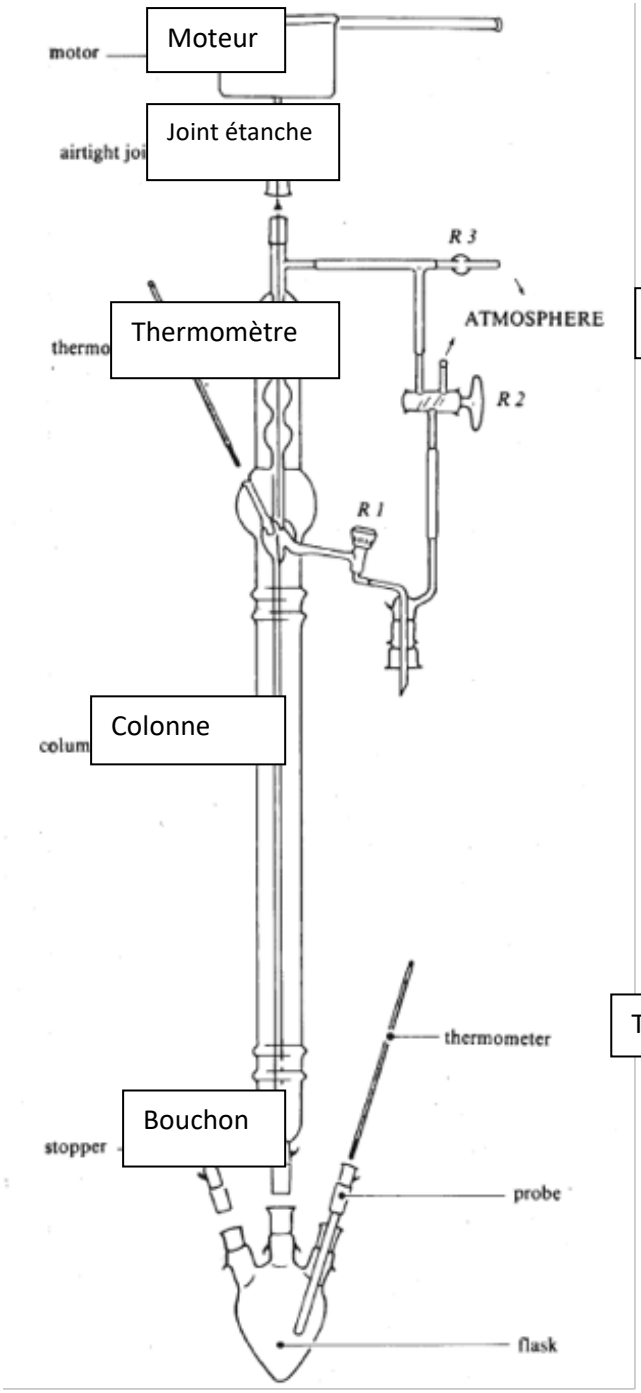
MARTIN G.J., ZHANG B.L., NAULET N. and MARTIN M.L., *J. Amer. Chem. Soc.,* 1986, 108, 51165122.

MARTIN G.J., GUILLOU C., MARTIN M.L., CABANIS M.T., TEP Y. et AERNY J., *J. Agric. Food Chem.,* 1988, 36, 316.

MARTIN G. G., WOOD R., MARTIN, G. J., *J. AOAC Int.*, 1996 , 79 (4), 917-928.

MARTIN G.G., HANOTE V., LEES M., MARTIN Y-L.,. *J. Assoc Off Anal Chem*, 1996, 79, 62-72

CRAIG H., *Science* , 1961, 133,. 1702 - 1703



Moteur

Joint étanche

Thermomètre

Atmosphère

Colonne

Thermomètre

Bouchon

Sonde

Ballon

Figure 1 – Dispositif d'extraction d'éthanol

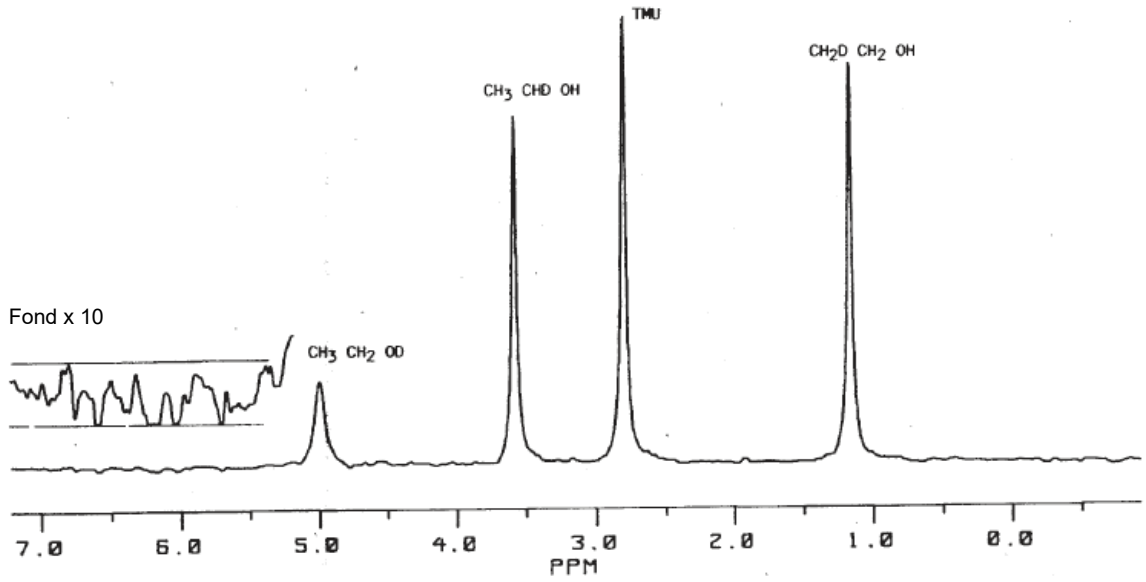


Figure 2a

Spectre RMN ^{2}H d'un éthanol de vin avec un étalon interne (TMU : N,N-tétraméthylurée)

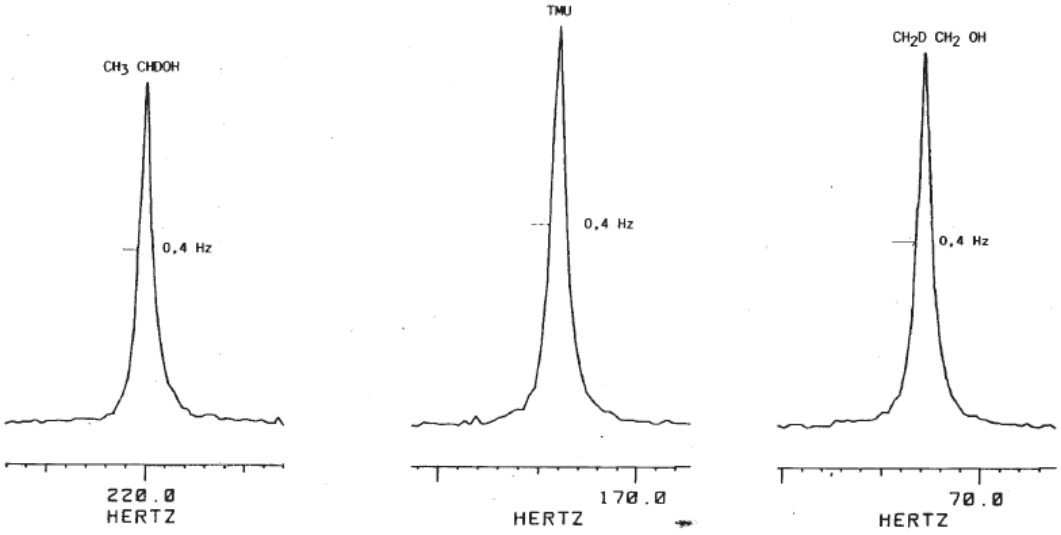


Figure 2b

Spectre ^{2}H de l'éthanol pris dans les mêmes conditions que celles de la Figure 2a, mais sans multiplication exponentielle (LB = 0)

Annexe I : Estimation de la répétabilité à partir d'études internes de répétabilité

Les études internes de répétabilité réalisées dans 4 laboratoires fournissent des données qui permettent l'estimation de la répétabilité de la méthode SNIF-NMR / RMN-FINS.

Ces études internes de répétabilité ont été réalisées par les distillations et les mesures en double de 10, 9 et 5 échantillons de vin différents, par les laboratoires 1, 2 et 3.

De son côté, le laboratoire 4 a réalisé 16 distillations et mesures sur le même vin dans des conditions de répétabilité sur une courte période de temps.

Tableau I-1 :

labo 1 : 10 vins analysés en double

				$(D/H)_I$		$(D/H)_{II}$		R	
				abs(□$(D/H)_I$)	**Carrés**	**abs(□$(D/H)_{II}$)**	**Carrés**	**abs(□(R))**	**Carrés**
Échantillon	**$(D/H)_I$**	**$(D/H)_{II}$**	**R**						
1	103,97	130,11	2,503	0,55	0,302	0,68	0,462	0,000	0,00000
	104,52	130,79	2,503						
2	103,53	130,89	2,529	0,41	0,168	0,32	0,102	0,016	0,00026
	103,94	130,57	2,513						
3	102,72	130,00	2,531	0,32	0,102	0,20	0,040	0,004	0,00002
	103,04	130,20	2,527						
4	105,38	132,39	2,51	0,14	0,020	0,20	0,040	0,000	0,00000

			3						
	105,52	132,59	2,513						
5	101,59	127,94	2,519	0,48	0,230	0,20	0,040	0,016	0,00026
	101,11	128,14	2,535						
6	103,23	132,14	2,560	0,30	0,090	0,36	0,130	0,001	0,00000
	102,93	131,78	2,561						
7	103,68	130,95	2,526	0,15	0,023	0,75	0,563	0,011	0,00012
	103,53	130,20	2,515						
8	101,76	128,86	2,533	0,24	0,058	0,42	0,176	0,003	0,00001
	101,52	128,44	2,530						
9	103,05	129,59	2,515	0,04	0,002	0,44	0,194	0,007	0,00005
	103,01	129,15	2,508						
10	101,47	132,63	2,614	0,50	0,250	0,18	0,032	0,010	0,00010
	100,97	132,45	2,624						
				Somme des carrés :	1,245		1,779		0,00081
				Sr	**0,25**		**0,30**		**0,006**
				r	**0,71**		**0,84**		**0,018**

Tableau I-2
:

labo 2 : 9 vins analysés en double

				(D/H)I		**(D/H)II**		**R**	
				abs(□(D/H)$_I$)	Carrés	abs(□(D/H)$_{II}$)	Carrés	abs(□(R))	Carrés
Échantillon	**(D/H)$_I$**	**(D/H)$_{II}$**	**R**						
1	105,02	133,78	2,548	0,26	0,068	0,10	0,010	0,008	0,00007
	104,76	133,88	2,556						
2	102,38	130,00	2,540	0,73	0,533	0,40	0,160	0,010	0,00011
	101,65	129,60	2,550						
3	100,26	126,08	2,515	0,84	0,706	0,64	0,410	0,008	0,00007
	99,42	125,44	2,523						
4	101,17	128,83	2,547	0,51	0,260	0,45	0,203	0,004	0,00002
	100,66	128,38	2,551						
5	101,47	128,78	2,538	0,00	0,000	0,26	0,068	0,005	0,00003
	101,47	128,52	2,533						
6	106,14	134,37	2,532	0,12	0,014	0,04	0,002	0,002	0,00000
	106,26	134,41	2,530						
7	103,62	130,55	2,520	0,05	0,003	0,11	0,012	0,003	0,00001
	103,57	130,66							
			2,52						

			3						
8	103,66	129,88	2,506	0,28	0,078	0,55	0,302	0,004	0,00001
	103,38	129,33	2,502						
9	103,50	129,66	2,506	0,43	0,185	0,22	0,048	0,015	0,00021
	103,93	129,44	2,491						
				Somme des carrés :	1,846		1,214		0,00053
				Sr	**0,32**		**0,26**		**0,005**
				r	**0,91**		**0,74**		**0,015**

Tableau I-3 :

labo 3 : 15 vins analysés en double

				(D/H)I		**(D/H)II**		**R**	
				abs(□$(D/H)_I$)	Carrés	abs(□$(D/H)_{II}$)	Carrés	abs(□(R))	Carrés
Échantillon	**$(D/H)_I$**	**$(D/H)_{II}$**	**R**						
1	101,63	125,87	2,477	0,06	0,004	0,46	0,212	0,007	0,00005
	101,57	125,41	2,470						
2	99,24	124,41	2,507	0,05	0,002	0,04	0,002	0,001	0,00000
	99,19	124,37	2,508						

3	101,23	125,07	2,471	0,06	0,004	0,16	0,026	0,005	0,00002
	101,17	125,23	2,476						
4	100,71	125,29	2,488	0,07	0,005	1,16	1,346	0,024	0,00058
	100,78	124,13	2,464						
5	99,89	124,02	2,483	0,18	0,032	0,56	0,314	0,007	0,00005
	99,71	123,46	2,476						
6	100,60	124,14	2,468	0,19	0,036	0,66	0,436	0,018	0,00032
	100,41	124,80	2,486						
7	101,47	125,60	2,476	0,23	0,053	0,14	0,020	0,003	0,00001
	101,70	125,74	2,473						
8	102,02	124,00	2,431	0,13	0,017	0,07	0,005	0,005	0,00002
	102,15	123,93	2,426						
9	99,69	124,60	2,500	0,40	0,160	0,53	0,281	0,000	0,00000
	100,09	125,13	2,500						
10	99,17	123,71	2,495	0,30	0,090	0,19	0,036	0,004	0,00002
	99,47	123,90	2,491						
11	100,60	123,89	2,463	0,40	0,160	0,54	0,292	0,001	0,00000
	101,00	124,43	2,464						
12	99,38	124,88	2,513	0,33	0,109	0,55	0,302	0,002	0,00000
	99,05	124,33	2,511						
13	99,51	125,24	2,517	0,44	0,194	0,01	0,000	0,011	0,00012
	99,95	125,25	2,506						
15	101,34	124,68		0,43	0,185	0,41	0,168	0,002	0,00000
			2,46						

101,77	125,09	2,458			
			Somme des carrés :	1,050	3,437	0,00120
			Sr	**0,19**	**0,34**	**0,006**
			r	**0,53**	**0,96**	**0,018**

Tableau I-4
:

labo 4 : un vin analysé 16 fois

Répétition	$(D/H)_I$	$(D/H)_{II}$	R		$(D/H)_I$	$(D/H)_{II}$	R
1	101,38	126,87	2,503	Écart :	0,0703	0,0840	0,000013
2	101,30	126,22	2,492				
3	100,98	125,86	2,493	**Sr**	**0,27**	**0,29**	**0,004**

4	100,94	126,00	2,497				
5	100,71	125,79	2,498	**r**	**0,75**	**0,82**	**0,010**
6	100,95	126,05	2,497				
7	101,17	126,30	2,497				
8	101,22	126,22	2,494				
9	100,99	125,91	2,494				
10	101,29	126,24	2,493				
11	100,78	126,07	2,502				
12	100,65	125,65	2,497				
13	101,01	126,17	2,498				
14	100,89	126,05	2,499				
15	101,66	126,52	2,489				
16	100,98	126,11	2,498				

Les données groupées pour l'écart-type de répétabilité et pour la limite de répétabilité peuvent donc être estimées comme suit :

	$(D/H)_I$	$(D/H)_{II}$	R

Sr	0,26	0,30	0,005
limite de répétabilité r	0,72	0,84	0,015

Les données des études internes de répétabilité ont été fournies par (par ordre alphabétique) :

- Bundesinstitut für Risikobewertung,

Thielallee 88-92 PF 330013 D-14195 BERLIN – ALLEMAGNE

- Fondazione E. Mach-Istituto Agrario di San Michele all'Adige,

Via E. Mach, 1 - 38010 San Michele all'Adige (TN), ITALIE

- Joint Research Centre - Institute for Health and Consumer Protection,

I-21020 ISPRA (VA) – ITALIE

-Laboratorio Arbitral Agroalimentario, Carretera de la Coruña, km 10,7

E-28023 MADRID – ESPAGNE

Annexe II : Évaluation de la Reproductibilité à partir de données d'essais d'aptitude

Depuis décembre 1994, des campagnes internationales d'essais d'aptitude sur la détermination de paramètres isotopiques sur le vin et sur plusieurs autres matrices

alimentaires ont été régulièrement organisées. Ces campagnes d'essais d'aptitude permettent aux laboratoires participants d'évaluer leurs résultats et la qualité de leurs analyses. L'exploitation statistique de ces résultats obtenus sur un grand nombre d'échantillons sur une longue période de temps permet d'apprécier la variabilité des mesures dans des conditions de reproductibilité. Ceci permet une bonne estimation des paramètres d'écart et de la limite de reproductibilité de la méthode. Les résultats de 40 séries d'essais d'aptitude entre 1994 et 2010 pour différents types de vin (rouge, blanc, rosé, sec, doux et mousseux) sont synthétisés dans le tableau II-1 ci-dessous.

Pour $(D/H)_I$ et $(D/H)_{II}$ le S_R groupé peut donc être calculé en utilisant l'équation suivante :

$$\sqrt{\frac{\sum_i^K (N_i - 1) S_{R,i}^2}{\sum_i^K (N_i - 1)}}$$

avec N_i, et $S_{R,i}$ étant le nombre des valeurs et l'écart-type de reproductibilité de la $i^{ème}$ série, et K le nombre de séries.

Considérant la définition du rapport intramoléculaire R, et en appliquant les règles type de propagation d'erreur supposant que $(D/H)_I$ et $(D/H)_{II}$ sont indépendantes (les termes de covariance valent donc zéro), on peut aussi estimer l'écart-type de reproductibilité pour ce paramètre.

On peut donc calculer les chiffres suivants :

	$(D/H)_I$	$(D/H)_{II}$	R
S_R :	0,35	0,62	0,006

Limite de reproductibilité R	0,99	1,75	0,017

Tableau II-1 : Essai d'aptitude FIT — Synthèse des valeurs statistiques observées sur des échantillons de vin :

			$(D/H)_I$			$(D/H)_{II}$		
Échantillon	Année	Série	N	Moyenne	S_R	N	Moyenne	S_R
Vin rouge	1994	R1	10	102,50	0,362	10	130,72	0,33
Vin rosé	1995	R1	10	102,27	0,333	10	128,61	0,35
Vin rouge	1995	R2	11	101,45	0,389	11	127,00	0,55
Vin rouge	1996	R1	11	101,57	0,289	11	132,23	0,34
Vin rosé	1996	R2	12	102,81	0,322	12	128,20	0,60
Vin blanc	1996	R3	15	103,42	0,362	15	127,97	0,51
Vin rouge	1996	R4	15	102,02	0,377	13	131,28	0,30
Vin rosé	1997	R1	16	103,36	0,247	16	126,33	0,44
Vin blanc	1997	R2	16	103,42	0,444	15	127,96	0,53
Vin blanc doux	1997	R2	14	99,16	0,419	15	130,02	0,88

			1		0,2	1		0,6
Vin	1997	R3	3	101,87	58	5	132,03	1
			1		0,2	1		0,4
Vin doux	1997	R3	2	102,66	14	2	128,48	8
			1		0,3	1		0,6
Vin rosé	1997	R4	6	102,29	24	6	129,29	3
			1		0,2	1		0,3
Vin doux	1997	R4	5	102,04	69	3	131,27	0
			1		0,3	1		0,5
Vin blanc	1998	R1	6	105,15	02	6	127,59	9
			1		0,3	1		0,5
Vin doux	1998	R3	6	102,17	26	6	129,60	6
			1		0,3	1		0,4
Vin rouge	1998	R4	7	102,44	06	7	131,60	7
			1		0,4	1		0,4
Vin blanc	1999	R1	4	102,93	04	3	129,64	6
			1		0,3	1		0,6
Vin doux	2000	R2	5	103,19	15	4	129,43	0
			1		0,2	1		0,6
Vin	2001	R1	2	105,28	64	6	131,32	8
			1		0,2	1		1,0
Vin doux	2001	R2	4	101,96	49	5	128,99	5
			1		0,3	1		0,7
Vin	2002	R1	7	101,01	65	6	129,02	4
			1		0,5	1		0,9
Vin	2002	R2	7	101,30	31	7	129,28	3
			1		0,3	1		0,7
Vin	2003	R1	8	100,08	35	8	128,98	7
Vin doux	2003	R2	1	100,51	0,3	1	128,31	0,8

			7		99	8		0
Vin	2004	R1	18	102,88	0,485	19	128,06	0,81
Vin doux	2004	R3	16	101,47	0,423	16	130,10	0,71
Vin	2005	R1	19	101,33	0,447	19	129,88	0,76
Vin doux	2005	R2	15	102,53	0,395	15	131,36	0,38
Vin sec	2006	R1	18	101,55	0,348	18	131,30	0,51
Vin doux	2006	R2	18	100,31	0,299	18	127,79	0,55
Vin	2007	R1	18	103,36	0,403	18	130,90	0,90
Vin doux	2007	R2	19	102,78	0,437	19	130,72	0,55
Vin	2008	R1	24	103,20	0,261	23	131,29	0,59
Vin doux	2008	R2	20	101,79	0,265	19	129,73	0,34
Vin sec	2009	R1	24	102,96	0,280	23	130,25	0,49
Vin doux	2009	R2	21	101,31	0,310	21	127,07	0,50
Vin sec	2010	R1	21	101,80	0,350	20	129,65	0,40
Vin mousseux	2010	R1	11	101,51	0,310	11	129,09	0,68

Vin sec	2010	R2	2 0	104,05	0,2 90	1 9	133,31	0,5 8

Méthode OIV-MA-AS311-06 Méthode Type IV

Dosage des polyols derivant des sucres et des sucres résiduels dans les vins secs par chromatographie en phase gazeuse

(Résolution OENO 9/2006 ; OIV/OENO 377/2009)

1. Domaine d'application

Dosage simultané de l'érythrytol, l'arabitol, le mannitol, le sorbitol et le mésoinositol dans les vins.
Le dosage des sucres par Chromatographie en phase gazeuse (CPG) étant long et compliqué, il est réservé à la détermination de traces de sucres et en particulier de sucres pour lesquels il n'existe pas de méthode enzymatique utilisée en routine : Arabinose, Rhamnose, Mannose, Galactose mais il est applicable aussi au glucose et fructose. L'avantage étant de pouvoir doser simultanément tous les monomères, dimères ou même trimères des sucres.

Remarque1. Il n'est pas possible de doser les sucres après leur réduction sous forme d'alditol en raison de la présence des polyols correspondants.

Remarque 2. Les sucres donnent sous forme de dérivés TMS 2 formes α et β et parfois 3 ou 4 (Gamma…) correspondant aux différents anomères présents dans le vins.

Remarque 3. Sans dilution préalable la méthode permet difficilement de doser le glucose et le fructose présents à plus de 5 g/l.

2. Principe

Les sucres résiduels des vins secs peuvent être dosés par chromatographie en phase gazeuse après formation de leurs dérivés triméthylsilylés.

L'étalon interne est le pentaérythritol.

3. Réactifs

Mélange silanisant donné à titre d'exemple :
3.1 Hexaméthyldisilazane (HMDS) pur
3.2 Anhydride trifluoroacétique (TFA) pur
3.3 Pyridine pure
3.4 Pentaérythritol pur
3.5. Eau distillée
3.6 Pentaérythritol à 10 g/l (solution d'étalon interne), dissoudre 0,15 g de pentaérythritol (3.4) dans 100 ml d'eau (3.5)
3.7 Produits purs pouvant être utilisés pour préparer les solutions d'étalonnage notamment glucose, fructose, arabinose, mannitol, sorbitol (liste non exhaustive)
3.8 Solutions de référence de produits purs à 200 mg/l dissoudre 20 mg de chacun des produits à doser (3.6) dans 100 ml d'eau.

Remarque Les solutions de sucre doivent être préparées juste avant l'emploi.

4. Matériel et appareillage

4.1 Pipettes de laboratoire de 1 ml graduées au 1/10e de ml
4.2 Poires propipettes
4.3 Seringue de 100 µl
4.4 Tubes à vis de 5 ml de capacité pouvant être fermés par un bouchon à vis muni d'une capsule d'étanchéité à face téflonée.
4.5 Evaporateur rotatif sous vide pouvant recevoir les tubes à vis (4.4) afin d'évaporer les échantillons à sec
4.6 Chromatographe en phase gazeuse équipé d'un détecteur à ionisation x g, de flamme et d'un injecteur fonctionnant en mode "split" : division de 1/30e à 1/50e de volume injecté (1 µl)
4.7 Colonne capillaire apolaire pow ex (Se 30, Cpsil 5, HP1 …) 50 m x 0,25 mm épaisseur du film de phase stationnaire 15 µm (à titre d'exemple).
4.8 Seringue d'injection de 10 µl.
4.9 Système d'acquisition des données
4.10 Bain à ultra-sons
4.11 Sorbonne de laboratoire

5. Préparation des échantillons

5.1 Ajout de l'étalon interne : 1 ml de vin (pipette, 4.1) ou de solution de référence à 200 mg/l (3.6) est placé dans le tube à vis (4.4).

Remarque : Il est également possible d'opérer avec des volumes de vin très inférieurs en particulier si le milieu est riche en sucre.

Il est ajouté 50 µl de la solution de pentaérythritol à 10 g/l (3.5) à l'aide de la seringue (4.3)

5.2 Obtention d'un résidu sec :
Le tube à vis est placé sur l'évaporateur rotatif dont le bain d'eau est maintenu à une température inférieure à 40 °C, poursuivre l'évaporation jusqu'à la disparition de toute trace de liquide.

5.3 Ajout des réactifs
5.3.1 Placer les tubes contenant l'extrait sec de même que les réactifs 3.1, 3.2 et 3.3 dans la sorbonne (4.11), brancher la ventilation
5.3.2 A l'aide des pipettes (4.1) et de poires propipettes (4.2) ajouter dans le tube successivement 0,20 ml de pyridine (3.3), 0,7 ml de HMDS (3.1), 0,1 ml de TFA (3.2)
5.3.3 Fermer hermétiquement le tube à l'aide de son bouchon
5.3.4 Placer le tube dans le bain à ultra-sons (4.10) durant 5 minutes afin d'obtenir une dispersion complète du résidu sec
5.3.5 Placer le tube dans un four à 60 °C durant 2 heures afin d'opérer la substitution totale des hydrogènes des hydroxyles ou des acides par des groupes triméthylsilyle (TMS).

Remarque : il ne doit subsister qu'une seule phase après chauffage sinon cela signifie qu'il restait de l'eau dans le tube ; de même il ne doit pas y avoir de dépôt brunâtre ce qui indiquerait un excès de sucre non dérivé.

6. Analyse chromatographique

6.1 Placer le tube refroidi dans la sorbonne (4.11) ventilée, prélever 1 µl à l'aide de la seringue (4.8). Injecter dans le chromatographe en mode "split" (division permanente)
Traiter de la même manière l'échantillon dérivé de vin et de référence

6.2 Programmer la température du four, par exemple de 60 °C à 240 °C à raison de 3 °C par minute de telle sorte que l'analyse complète dure par exemple 1 heure pour une séparation complète du mannitol et du sorbitol (résolution supérieure à 1,5)

7. Calculs

Exemple : calcul de la concentration en sorbitol
Soit

- s la surface du pic du sorbitol dans le vin
- S la surface du pic du sorbitol dans la solution de référence
- i la surface du pic de l'étalon interne dans le vin
- I la surface du pic de l'étalon interne dans la solution à référence

la teneur ts en sorbitol dans le vin sera

$$ts = 200 \times \frac{s}{S} \times \frac{I}{i} \quad \text{en mg par litre}$$

un même raisonnement permet de calculer la teneur tg en glucose

$$tg = 200 \times \frac{g}{G} \times \frac{I}{i} \quad \text{en mg par litre}$$

où g est la somme des surfaces des deux pics de glucose dans le vin et G est la somme des surfaces des deux pics de glucose dans la solution de référence.

8. Caractéristiques de la méthode

Seuil de détection environ 5 mg/l pour un polyol (un seul pic chromatographique). Répétabilité moyenne de l'ordre de 10 % pour une concentration en sucre ou polyol de l'ordre de 100 mg/l.

Tableau 1
Répétabilité du dosage de quelques substances de l'extrait sec du vin après dérivation TMS.

	Ac. Tartrique	Fructose	Glucose	Mannitol	Sorbitol	Dulcitol	Mésoinositol
moyenne (mg/l)	2013	1238	255	164	58	31	456
écart-type (mg/l)	184	118	27	8	2	2	28
CV (%)	9	10	11	5	3	8	6

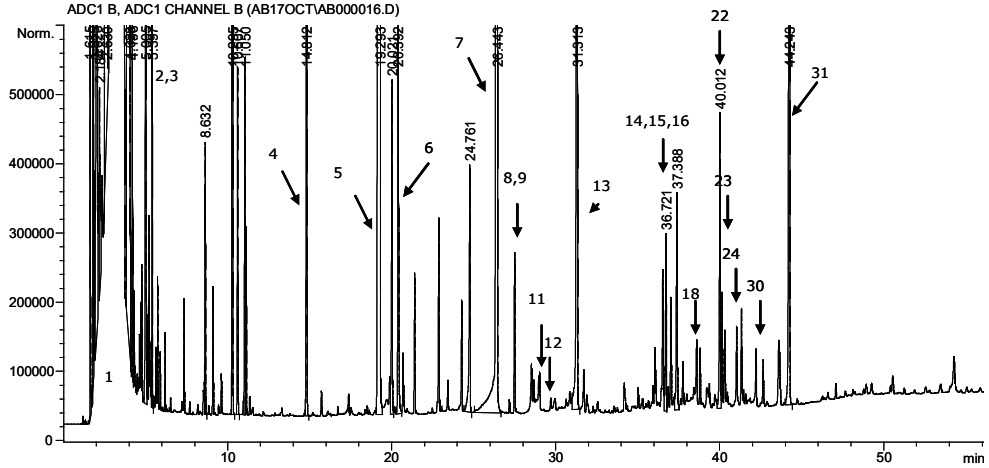
REFERENCES

RIBEREAU-GAYON P. et BERTRAND A. 1972, Nouvelles applications de la chromatographie en phase gazeuse à l'analyse des vins *et* au contrôle de leur qualité, Vitis, 10, 318-322.

BERTRAND A**.** (1974), Dosage des principaux acides du vin par chromatographie en phase gazeuse. FV OIV 717—718, 253—274.

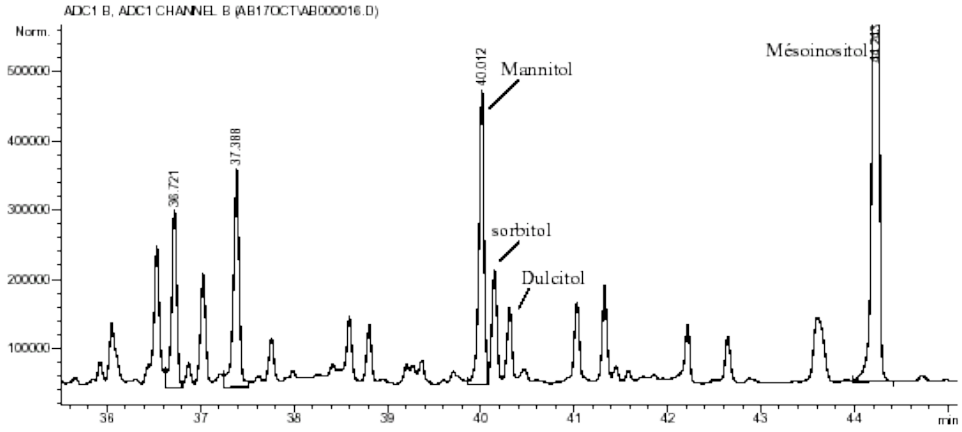
DUBERNET M.0. (1974), Application de la chromatographie en phase gazeuse à l'étude des sucres et polyols du vin: thèse 3° Cycle, Bordeaux.

Figure 1
Chromatogramme d'un vin blanc après silylation. Colonne Cpsil5CB 50 m x 0.25 mm x 0,15 µm. Injection split, 60 °C, 3 °C/min, 240 °C. Ci-dessous grossissement.



Identification des pics : 1 : mélange réactionnel; 2 et 3 : acides inconnus; 4 :pentaérythritol; 5 et 6 inconnus; 7 : acide tartrique + arabinose ; 8, 10 et 11 : rhamnose ; 9 : Arabinose ; 12 : xylitol ; 13 : arabitol ; 14, 15 et 16 : fructose ; 17 : galactose + inconnu ; 18 :glucose □ ; 19 : galactose + acide galacturonique ; 20 et 21 : inconnus ; 22 : mannitol; 23 sorbitol ; 24 : glucose □ ; 25 et 27 : inconnus ; 26 : acide galacturonique ; 28 et 30 : galactonolactone ; 29 : acide mucique ; 31 : méso-inositol.

Chromatogramme d'un vin blanc après silylation. Colonne Cpsil5CB 50 m x 0.25 mm x 0.15 µm. Injection split, 60 °C 3 °C/min, 240 °C. Ci-dessous grossissement.



Méthode OIV-MA-AS311-07 Méthode Type III

Determination conjointe du glucose et du fructose des vins par ph-metrie differentielle

(Résolution OENO 10/2006, OIV/OENO 377/2009)

1. PORTEE ET CHAMP D'APPLICATION

Cette méthode est applicable à l'analyse du glucose et du fructose des vins entre 0 et 60 g/L (niveau moyen) ou 50 et 270 g/L (niveau haut).

2. PRINCIPE

La détermination conjointe du glucose et du fructose par pH-métrie différentielle consiste en une phosphorylation du glucose et du fructose par de l'hexokinase. Les ions H^+ générés de manière stœchiométrique par rapport aux quantités de glucose et de fructose sont ensuite quantifiés.

3. REACTIONS

Le glucose et le fructose présents sont phosphorylés par l'adénosine triphosphate (ATP) cours d'une réaction enzymatique catalysée par l'hexokinase (HK) (EC 2.7.1.1)

$$\text{glucose} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{HK}} \text{glucose-6-phosphate} + \text{ADP} + H^+$$

$$\text{fructose} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{HK}} \text{fructose-6-phosphate} + \text{ADP} + H^+$$

4. REACTIFS

4.1 Eau déminéralisée (18 MΩ) ou bidistillée
4.2 2-Amino-2-(hydroxyméthyl)propane-1,3-diol (TRIS) pureté ≥ 99%
4.3 Adénosine triphosphate disodique (ATP, 2Na) pureté ≥ 99%
4.4 Phosphate trisodique à douze molécules d'eau (Na3PO4.12H2O) pureté ≥ 99%
4.5 **H**ydroxyde de sodium (NaOH) pureté ≥ 98%
4.6 Chlorure de magnésium à six molécules d'eau (MgCl2.6H2O) pureté ≥ 99%

4.7 Triton X 100
4.8 Chlorure de potassium (KCl) pureté ≥ 99%
4.9 2-Bromo-2-nitropropane-1,3-diol (Bronopol) (C3H6BrNO4)
4.10 Hexokinase (EC 2.7.1.1) 1 mg ≅ 145 U (ex Hofmann La Roche, Mannheim, Allemagne ref. HEXO-70-1351)
4.11 Glycérol pureté ≥ 98%
4.12 Glucose pureté ≥ 99%

4.13 Tampon de réaction pH 8,0 commercial ou préparé selon la méthode suivante : dans une fiole jaugée de 100 mL (5.2) verser approximativement 70 mL (5.3) d'eau (4.1), mettre en agitation continue (5.5). Ajouter 0,242 g ± 0,001 g (5.4) de TRIS (4.2), 0,787 g ± 0,001 g (5.4) d'ATP (4.3), 0,494 g ± 0,001 g (5.4) de phosphate de sodium (4.4), 0,009 mg ± 0,001 g (5.4) d'hydroxyde de sodium (4.5), 0,203 g ± 0,001 g (5.4) de chlorure de magnésium (4.6), 2,000 ± 0,001 g (5.4) de Triton X 100 (4.7), 0,820 g ± 0,001 g (5.4) de chlorure de potassium (4.8) et 0,010 ± 0,001 g (4.9) de bronopol. Ajuster au trait de jauge avec de l'eau (4.1). Le pH final doit être de 8,0 ± 0,1 (5.6),.sinon l'ajuster avec de l'hydroxyde de sodium ou de l'acide chlorhydrique. Le tampon ainsi préparé est stable pendant deux mois à 4°C.

4.14 Solution enzymatique commerciale ou préparée selon la méthode suivante : à l'aide d'une pipette jaugée (5.7) disposer 5 mL de glycérol (4.11) dans une fiole jaugée de 10 mL, ajuster au trait de jauge avec de l'eau (4.1) et homogénéiser. Dissoudre 20 mg ± 1 mg (5.4) d'hexokinase (4.10) et 5 mg de Bronopol (4.9) dans 10 mL de la solution de glycérol. L'activité de la solution enzymatique doit être de 300 U ± 50 U par mL pour l'hexokinase. La solution enzymatique est stable pendant 6 mois à 4°C.

4.15 Préparation de la solution d'étalonnage (niveau moyen) si la teneur supposée est inférieure à 50 g/L de glucose + fructose)
Placer 3,60 g ± 0,01 g (5.4) de glucose (4.12) (préalablement desséché 12 heures à 40 °C jusqu'à poids constant), 0,745 g ± 0,001 g (5.4) de chlorure de potassium (4.8) et 0,010 g ± 0,001 g de bronopol (4.9) dans une fiole jaugée de 100 mL (5.2). Ajouter de l'eau (4.1). Bien homogénéiser (5.5). Ajuster au trait de jauge avec de l'eau (4.1) après avoir enlever le barreau magnétique. La concentration finale est de 36 g/L de glucose La solution est stable 6 mois à 4°C.

4.16 Préparation de la solution d'étalonnage (niveau haut) si la teneur supposée est supérieure à 50 g/L de glucose + fructose)
Placer 18,0 g ± 0,01 g (5.4) de glucose (4.12) (préalablement desséché 12 heures à 40 °C jusqu'à poids constant), 0,745 g ± 0,001 g (5.4) de chlorure de potassium

(4.8) et 0,010 g ± 0,001 g de bronopol (4.9) dans une fiole jaugée de 100 mL (5.2). Ajouter de l'eau (4.1). Bien homogénéiser (5.5). Ajuster au trait de jauge avec de l'eau (4.1) après avoir enlever le barreau magnétique. La concentration finale est de 180 g/L de glucose La solution est stable 6 mois à 4°C.

5. APPAREILLAGE

5.1 Appareil de pH-métrie différentielle
(EUROCHEM CL 10 plus, Microlab EFA ou équivalent) voir annexe A
5.2 Fiole jaugée de 100 mL classe A
5.3 Eprouvette graduée à pied de 100 mL
5.4 Balance de précision permettant de peser au mg près
5.5 Agitateur magnétique et barreau magnétique en téflon
5.6 pH-mètre
5.7 Pipettes jaugées de 3mL, 5 mL classe A
5.8 Fiole jaugée de 10 mL classe A
5.9 Pipettes automatiques à piston de 25 et 50 µL

6. PREPARATION DES ECHANTILLONS

Les échantillons ne doivent pas être trop chargés de matières en suspension, dans le cas contraire, les centrifuger ou les filtrer. Les vins mousseux doivent être dégazés.

7. MODE OPERATOIRE

L'opérateur doit respecter les instructions d'utilisation de l'appareillage (5.1). Avant toute utilisation, l'instrument doit être stabilisé en température. Les circuits doivent être rincés avec la solution de tampon (4.13) après nettoyage éventuel.

7.1 Détermination du blanc

(détermination du signal de l'enzyme) ;
remplir les compartiments électrodes (EL_1 et EL_2) du pH-mètre différentiel (5.1) avec le tampon (4.13), la différence de potentiel entre les deux électrodes (D_1) doit être comprise entre ± 150 mpH ;
ajouter 24 µL de solution enzymatique (4.14) dans la chambre de réaction (à la micropipette 5.9 ou par le préparateur) et remplir l'électrode EL_2 ;
mesurer la différence de potentiel (D_2) entre les deux électrodes ;
calculer la différence de pH, ΔpH_o pour le blanc selon le calcul suivant :

$$\Delta pH_o = D_2 - D_1$$

où

ΔpH_o = la différence de pH entre les deux mesures pour le blanc ;
D1 = valeur de la différence de pH entre les deux électrodes remplies avec le tampon ;
D2 = valeur de la différence de pH entre les deux électrodes dont l'une est remplie de tampon et l'autre de tampon et d'enzyme.

La valeur de ΔpH_o permet de vérifier l'état des électrodes en cours de dosage ainsi que leur dérive éventuelle avec le temps; elle doit être comprise entre –30 et 0 mpH et ≤ 1,5 mpH entre deux mesures consécutives. Dans le cas contraire, vérifier la qualité du tampon pH et la propreté du circuit hydraulique et des électrodes, nettoyer si nécessaire puis refaire le blanc.

7.2 Etalonnage

7.2.1 Niveau moyen

remplir les compartiments électrodes (EL_1 et EL_2) avec le tampon (4.13);
ajouter 25 µL (à la micropipette 5.9 ou par le préparateur) de solution étalon de glucose (4.15) dans la chambre de réaction ;
remplir les électrodes EL_1 et EL_2 avec le mélange tampon + solution étalon ;
mesurer la différence (D_3) de potentiel entre les deux électrodes ;
ajouter 24 µL de solution enzymatique (4.14) et remplir l'électrode EL_2 avec le mélange tampon + solution étalon + enzyme ;
après le temps nécessaire à la réaction enzymatique, mesurer la différence de potentiel (D_4) entre les deux électrodes ;
calculer la différence de pH, ΔpH_c pour l'échantillon de calibration selon le calcul suivant :

$$\Delta pH_c = (D_4 – D_3) - \Delta pH_o$$

où
ΔpH_c = la différence entre les deux mesures D_3 et D_4 pour l'échantillon de calibration moins la différence obtenue pour le blanc ;
D_3 = valeur de la différence de pH entre les deux électrodes remplies avec le mélange tampon/solution de référence ;

D_4 = valeur de la différence de pH entre les deux électrodes dont l'une est remplie de tampon/solution de référence et l'autre de tampon/solution de référence/enzyme.

calculer la pente de la droite d'étalonnage :

$$s = C_u/\Delta pH_c$$

où
Cu est la concentration de glucose dans la solution étalon exprimée en g/L.

Vérifier la validité de l'étalonnage en analysant 25 µL de solution étalon (ML) de glucose (4.15) en suivant la procédure (7.3). Le résultat doit être compris entre ± 2% de la valeur de référence. Dans le cas contraire recommencer la procédure de calibration.

7.2.2 Niveau haut

remplir les compartiments électrodes (EL_1 et EL_2) avec le tampon (4.13);
ajouter 10 µL (à la micropipette 5.9 ou par le préparateur) de solution étalon (HL) de glucose (4.16) dans la chambre de réaction ;
remplir les électrodes EL_1 et EL_2 avec le mélange tampon + solution étalon ;
mesurer la différence (D_3) de potentiel entre les deux électrodes ;
ajouter 24 µL de solution enzymatique (4.14) et remplir l'électrode EL_2 avec le mélange tampon + solution étalon + enzyme ;
après le temps nécessaire à la réaction enzymatique, mesurer la différence de potentiel (D_4) entre les deux électrodes ;
calculer la différence de pH, ΔpH_c pour l'échantillon de calibration selon le calcul suivant :

$$\Delta pH_c = (D_4 - D_3) - \Delta pH_o$$

où
ΔpH_c = la différence de pH entre les deux mesures D_3 et D_4 pour l'échantillon de calibration moins la différence obtenue pour le blanc ;
D_3 = valeur de la différence de pH entre les deux électrodes remplies avec le mélange tampon/solution de référence ;
D_4 = valeur de la différence de pH entre les deux électrodes dont l'une est remplie de tampon/solution de référence et l'autre de tampon/solution de référence/enzyme.
calculer la pente de la droite d'étalonnage :

$$s = C_u/\Delta pH_c$$

où
Cu est la concentration de glucose dans la solution étalon exprimée en g/L.

Vérifier la validité de l'étalonnage en analysant 10 µL de solution étalon de glucose (4.16) en suivant la procédure (7.3). Le résultat doit être compris entre ± 2% de la valeur de référence. Dans le cas contraire recommencer la procédure de calibration.

7.3 Quantification

remplir les compartiments électrodes (EL_1 et EL_2) avec le tampon (4.13)
ajouter 10 µL (niveau haut) ou 25 µL (niveau moyen) (à la micropipette 5.9 ou par le préparateur) d'échantillon dans la chambre de réaction ;
remplir les électrodes EL_1 et EL_2 avec le mélange tampon + échantillon ;
mesurer la différence (D_5) de potentiel entre les deux électrodes ;

ajouter 24 µL de solution enzymatique (4.14) et remplir l'électrode EL_2 avec le mélange tampon + échantillon + enzyme ;
mesurer la différence de potentiel (D_6) entre les deux électrodes ;
calculer la quantité de soluté dans l'échantillon selon le calcul suivant :

$$w = s \times [(D_6 – D_5) - \Delta pH_o]$$

où
w =la quantité de soluté dans l'échantillon (en g/L) ;
S est la pente déterminée par la droite de calibration ;
ΔpH_o = la différence de pH entre les deux mesures pour le blanc ;
D_5 = valeur de la différence de pH entre les deux électrodes remplies avec l'échantillon/solution de référence ;
D_6 = valeur de la différence de pH entre les deux électrodes dont l'une est remplie de tampon/échantillon et l'autre de tampon/échantillon/enzyme.

8 EXPRESSION DES RESULTATS

Les résultats sont exprimés en g/L de glucose + fructose avec un chiffre significatif après la virgule.

9 FIDELITE

Les détails de l'essai interlaboratoire portant sur la fidélité de la méthode sont résumés dans l'annexe B.

9.1 Répétabilité

La différence absolue entre deux résultats individuels obtenus sur une matière identique soumise à essai par un opérateur utilisant le même appareillage, dans l'intervalle de temps le plus court possible, ne dépassera pas la valeur de répétabilité *r* dans 95% des cas.
La valeur est : $r = 0{,}021x + 0{,}289$ où x est la teneur en g/L de glucose + fructose

9.2 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 95% des cas.
La valeur est : $R = 0{,}033x + 0{,}507$ où x est la teneur en g/L de glucose + fructose

10 AUTRES CARACTERISTIQUES DE L'ANALYSE

10.1 Limites de détection et de quantification

10.1.1 limite de détection
Elle est déterminée à partir de 10 séries de trois répétitions d'un blanc analytique et de la régression linéaire réalisée avec les vins de l'essai de fidélité, elle est égale à trois écarts types. Dans ce cas la méthode a donné comme résultat une limite de détection de
0,03 g/L. Des essais par dilutions successives ont confirmé cette valeur.

10.1.2 limite de quantification
Elle est déterminée à partir de 10 séries de trois répétitions d'un blanc analytique et de la régression linéaire réalisée avec les vins de l'essai de fidélité, elle est égale à dix écarts types. Dans ce cas la méthode a donné comme résultat une limite de détection de
0,10 g/L. Des essais par dilutions successives ont confirmé cette valeur. Les quantifications de vins blancs et rouges réalisées par les laboratoires qui ont participé à l'analyse interlaboratoire confirment également ces chiffres.

10.2 Justesse

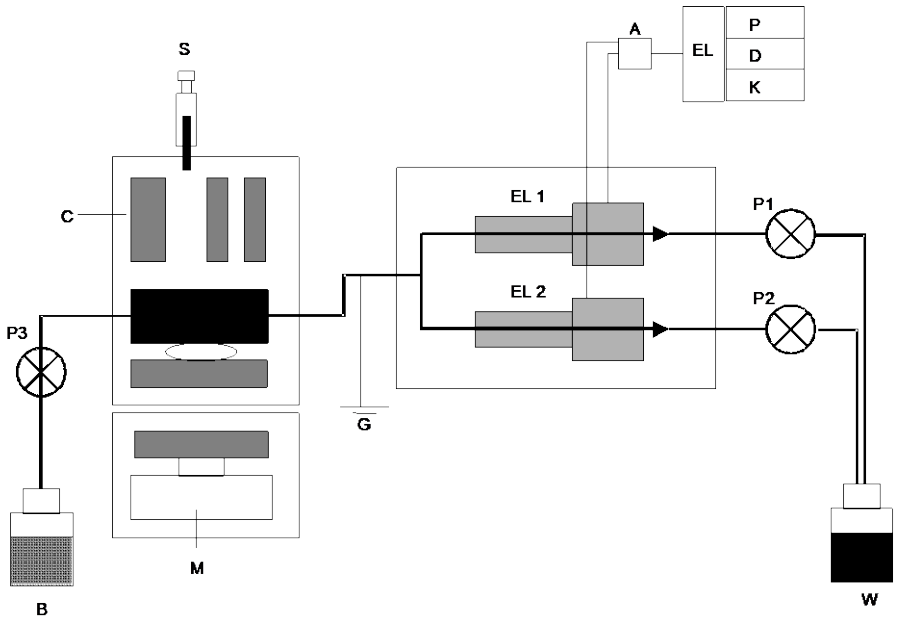
La justesse est évaluée à partir du taux de recouvrement moyen calculé des vins surchargés analysés en double aveugle lors de l'essai interlaboratoire (vins A, B, C, D, F et J). Elle est de 98.9% avec un intervalle de confiance de 0.22%.

11 CONTROLE QUALITE

Des contrôles qualité peuvent être réalisés avec des matériaux de référence certifiés, des vins dont les caractéristiques sont issues d'un consensus ou de vins surchargés insérés régulièrement dans les séries analytiques et en suivant les cartes de contrôle afférentes.

Annexe A

Schéma de l'appareillage de pH-métrie différentielle



A : amplificateur différentiel ; B : solution de tampon ; C : chambre de mélange ; D : indicateur ; EL1 et EL 2 électrodes capillaires ; EL : partie électronique ; G : mise à la terre ; K : clavier ; M : agitateur magnétique ; P : imprimante ; P1 à P3 : pompes péristaltiques ; S : seringue d'injection de l'échantillon et de l'enzyme ; W : mise à l'égout.

Annexe B

Données statistiques obtenues à partir des résultats des essais interlaboratoire

Conformément à l'ISO 5725-2:1994, les paramètres suivants ont été définis au cours d'un essai interlaboratoire. Cet essai a été conduit par le laboratoire du Comité Interprofessionnel du Vin de Champagne à Epernay (France).
Année de l'essai interlaboratoire : 2005
Nombre de laboratoires : 13 en double aveugle
Nombre d'échantillons : 10

	Vin A	Vin B	Vin C	Vin D	Vin E	Vin F	Vin G	Vin H	Vin I	Vin J
Moyenne en g/L	8,44	13,33	18,43	23,41	28,03	44,88	86,40	93,34	133,38	226,63
Nombre de laboratoire	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13
nombre de laboratoire après élimination des plus grandes dispersions	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13
écart type de répétabilité	0,09	0,13	0,21	0,21	0,29	0,39	0,81	0,85	1,19	1,51
limite de répétabilité	0,27	0,38	0,61	0,62	0,86	1,14	2,38	2,51	3,52	4,45
RSDr, 100%	1,08	0,97	1,13	0,91	1,04	0,86	0,94	0,91	0,89	0,67
HORRAT r	0,26	0,25	0,31	0,26	0,30	0,27	0,32	0,32	0,33	0,47
écart type de reproductibilité	0,17	0,27	0,37	0,59	0,55	0,45	1,27	1,43	1,74	2,69
limite de reproductibilité	0,50	0,79	1,06	1,71	1,60	1,29	3,67	4,13	5,04	7,78
RSDR, 100%	2,05	2,05	1,99	2,54	1,97	1,00	1,47	1,53	1,31	1,19
HORRAT R	0,50	0,54	0,55	0,72	0,58	0,31	0,51	0,53	0,48	0,47

Types d'échantillons :

Vin A : vin blanc contenant naturellement du sucre, surchargé de 2,50 g/L glucose et de 2,50 g/L de fructose ;

Vin B : vin blanc contenant naturellement du sucre (vin A), surchargé de 5,00 g/L glucose et de 50 g/L de fructose ;

Vin C : vin blanc contenant naturellement du sucre (vin A), surchargé de 7,50 g/L glucose et de 7,50 g/L de fructose ;

Vin D : vin blanc contenant naturellement du sucre (vin A), surchargé de 10,0 g/L glucose et de 10,0 g/L de fructose ;

Vin E : vin aromatisé;

Vin F : vin blanc contenant naturellement moins de 0,4 g/L de sucre, surchargé de 22,50 g/L glucose et de 22,50 g/L de fructose ;

Vin G : vin rouge naturellement doux;

Vin H : vin blanc doux ;

Vin I : mistelle ;

Vin J : vin blanc contenant naturellement moins de 0,4 g/L de sucre, surchargé de 115,00 g/L glucose et de 115,00 g/L de fructose ;

BIBLIOGRAPHIE

LUZZANA M., PERELLA M. et ROSSI-BERNARDI L (1971) : Anal. Biochem, 43, 556-563.

LUZZANA M., AGNELLINI D., CREMONESI P. et CARAMENTI G. (2001) : Enzymatic reactions for the determination of sugars in food samples using the differential pH technique. Analyst, 126, 2149 –2152.

LUZZANA M., LARCHER R., MARCHITTI C. V. et BERTOLDI D. (2003) : Quantificazione mediante pH-metria differenziale dell'urea negli spumanti metodo classico.in "Spumante tradizionale e classico nel terzo millennio" 27-28 giugno 2003, Istituti Agrario di San Mechele.

MOSCA A., DOSSI G., LUZZANA M., ROSSI-BERNARDI L., FRIAUF W. S., BERGER R.L., HOPKINS H. P. et CAREY V (1981) : Improved apparatus for the differential measurment of pH : application to the measurment of glucose. Anal. Biochem., 112, 287 – 294.

MOIO L., GAMBUTI A., Di MARZIO L. et PIOMBINO P. (2001) : Differential pHmeter determination of residual sugars in wine. Am. J. Enol. Vitic, 52(3), 271 – 274.

TUSSEAU D., FENEUIL A., ROUCHAUSSE J.-M. et VAN LAER S. (2004) : Mesure de différents paramètres d'interêt oenologique par pHmétrie différentielle. F.V. O.I.V. n° 1199, 5 pages.

Méthode OIV-MA-AS311-08 Méthode Type IV

Détermination globale du glucose, du fructose et du saccharose des mouts et des vins par pH-métrie différentielle

(Résolution OENO 11/2006 ; OIV/OENO 377/2009)

1. PORTEE ET CHAMP D'APPLICATION

Cette méthode est applicable à l'analyse globale du glucose, du fructose et du saccharose dans les moûts et les vins entre 0 et 270 g/L.
Cette quantification se différencie de celle du glucose et du fructose par pHmétrie différentielle et ne peux pas lui être substituée.

2. PRINCIPE

La détermination par pH-métrie différentielle du glucose, du fructose et du saccharose consiste en une hydrolyse préalable du saccharose par de l'invertase, suivie d'une phosphorylation du glucose et du fructose par de l'hexokinase. Les ions H^+ générés de manière stœchiométrique par rapport aux quantités de glucose et de fructose sont ensuite quantifiés.

3. REACTIONS

Le saccharose éventuellement présent est hydrolysé par de l'invertase (EC 3.2.1.26)

$$\text{saccharose} \xrightarrow{\text{invertase}} \text{glucose} + \text{fructose}$$

Le glucose et le fructose initialement présents ou consécutifs à l'action de l'invertase sont phosphorylés par l'adénosine triphosphate (ATP) cours d'une réaction enzymatique catalysée par l'hexokinase (HK) (EC 2.7.1.1)

$$\text{glucose} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{HK}} \text{glucose-6-phosphate} + \text{ADP} + H^+$$

$$\text{fructose} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{HK}} \text{fructose-6-phosphate} + \text{ADP} + H^+$$

4. REACTIFS

4.1 Eau déminéralisée (18 MΩ) ou bidistillée
4.2 2-Amino-2-(hydroxyméthyl)propane-1,3-diol (TRIS) pureté ≥ 99%
4.3 Adénosine triphosphate disodique (ATP, 2Na) pureté ≥ 99%
4.4 Phosphate trisodique à douze molécules d'eau ($Na3PO4.12H_2O$) pureté ≥ 99%
4.5 Hydroxyde de sodium (NaOH) pureté ≥ 98%
4.6 Chlorure de magnésium à six molécules d'eau ($MgCl2.6H_2O$) pureté ≥ 99%
4.7 Triton X 100
4.8 Chlorure de potassium (KCl) pureté ≥ 99%
4.9 2-Bromo-2-nitropropane-1,3-diol (Bronopol) ($C3H6BrNO4$)
4.10 Invertase (EC 3.2.1.26) 1 mg ≅ 500 U (ex Sigma ref I-4504)
4.11 Hexokinase (EC 2.7.1.1) 1 mg ≅ 145 U (ex Hofmann La Roche, Mannheim, Allemagne ref HEXO-70-1351)
4.12 Glycérol pureté ≥ 98%
4.13 Saccharose pureté ≥ 99%

4.14 **Tampon de réaction pH 8,0** commercial (ex : DIFFCHAMB GEN 644) ou préparé selon la méthode suivante :
dans une fiole jaugée de 100 mL (5.2) verser approximativement 70 mL (5.3) d'eau (4.1), mettre en agitation continue (5.5). Ajouter 0,242 g ± 0,001 g (5.4) de TRIS (4.2), 0,787 g ± 0,001 g (5.4) d'ATP (4.3), 0,494 g ± 0,001 g (5.4) de phosphate de sodium (4.4), 0,009 mg ± 0,001 g (5.4) d'hydroxyde de sodium (4.5), 0,203 g ± 0,001 g (5.4) de chlorure de magnésium (4.6), 2,000 ± 0,001 g (5.4) de Triton X 100 (4.7), 0,820 g ± 0,001 g (5.4) de chlorure de potassium (4.8) et 0,010 ± 0,001 g (5.4) de bronopol. Ajuster au trait de jauge avec de l'eau (4.1). Le pH final doit être de 8,0 ± 0,1 (5.6),.sinon l'ajuster avec de l'hydroxyde de sodium ou de l'acide chlorhydrique. Le tampon ainsi préparé est stable pendant deux mois à 4°C.

4.15 **Solution enzymatique** commerciale ou préparée selon la méthode suivante : à l'aide d'une pipette jaugée (5.7) disposer 5 mL de glycérol (4.12) dans une fiole jaugée de 10 mL, ajuster au trait de jauge avec de l'eau (4.1) et homogénéiser. Dissoudre 300 mg ± 1 mg (5.4) d'invertase (4.10) 10 mg ± 1 mg (5.4) d'hexokinase (4.11) dans 3 mL de la solution de glycérol. L'activité de la solution enzymatique doit être de 50 000 U ± 100 U par mL pour l'invertase et de 480 U ± 50 U par mL pour l'hexokinase. La solution enzymatique est stable pendant 6 mois à 4°C.

4.16. PREPARATION DE LA SOLUTION D'ETALONNAGE

Placer 17,100 g ± 0,01 g (5.4) de saccharose (4.13) (préalablement desséché 12 heures à 40 °C jusqu'à poids constant), 0,745 g ± 0,001 g (5.4) de chlorure de potassium (4.8) et 0,010 g ± 0,001 g (5.4) de Bronopol dans une fiole jaugée de 100 mL (5.2). Ajouter de l'eau (4.1). Bien homogénéiser (5.5). Ajuster au trait de

jauge avec de l'eau (4.1) après avoir enlever le barreau magnétique. La concentration finale est de 171 g/L de saccharose. La solution est stable 6 mois à 4°C.

5. APPAREILLAGE

5.1 Appareil de pH-métrie différentielle
(EUROCHEM CL 10 plus, Microlab EFA ou équivalent) voir annexe A
5.2 Fiole jaugée de 100 mL classe A
5.3 Eprouvette graduée à pied de 100 mL
5.4 Balance de précision permettant de peser au mg près
5.5 Agitateur magnétique et barreau magnétique en téflon
5.6 pH-mètre
5.7 Pipettes jaugées de 3mL, 5 mL classe A
5.8 Fiole jaugée de 10 mL classe A
5.9 Pipettes automatiques à piston de 25 et 50 µL

6. PREPARATION DES ECHANTILLONS

Les échantillons ne doivent pas être trop chargés de matières en suspension, Dans le cas contraire, les centrifuger ou les filtrer. Les vins mousseux doivent être dégazés.

7. MODE OPERATOIRE

L'opérateur doit respecter les instructions d'utilisation de l'appareillage (5.1). Avant toute utilisation, l'instrument doit être stabilisé en température. Les circuits doivent être rincés avec la solution de tampon (4.14) après nettoyage éventuel.

7.1 - Détermination du blanc (détermination du signal de l'enzyme)
remplir les compartiments électrodes (EL_1 et EL_2) du pH-mètre différentiel (5.1) avec le tampon (4.14), la différence de potentiel entre les deux électrodes (D_1) doit être comprise entre ± 150 mpH
ajouter 32 µL de solution enzymatique (4.15) dans la chambre de réaction (à la micropipette 5.9 ou par le préparateur) et remplir l'électrode EL_2 ;
mesurer la différence de potentiel (D_2) entre les deux électrodes ;
calculer la différence de pH, ΔpH_o pour le blanc selon le calcul suivant :

$$\Delta pH_o = D_2 - D_1$$

où
ΔpH_o = la différence de pH entre les deux mesures pour le blanc ;

D1 = valeur de la différence de pH entre les deux électrodes remplies avec le tampon ;
D2 = valeur de la différence de pH entre les deux électrodes dont l'une est remplie de tampon et l'autre de tampon et d'enzyme.

La valeur de ΔpH_o permet de vérifier l'état des électrodes en cours de dosage ainsi que leur dérive éventuelle avec le temps; elle doit être comprise entre –30 et 0 mpH et ≤ 1,5 mpH entre deux mesures consécutives. Dans le cas contraire, vérifier la qualité du tampon pH et la propreté du circuit hydraulique et des électrodes, nettoyer si nécessaire puis refaire le blanc.

7.2 – Etalonnage
remplir les compartiments électrodes (EL_1 et EL_2) avec le tampon (4.14);
ajouter 10 µL (à la micropipette 5.9 ou par le préparateur) de solution étalon de saccharose (5) dans la chambre de réaction ;
remplir les électrodes EL_1 et EL_2 avec le mélange tampon + solution étalon ;
mesurer la différence (D_3) de potentiel entre les deux électrodes ;
ajouter 32 µL de solution enzymatique (4.15) et remplir l'électrode EL_2 avec le mélange tampon + solution étalon + enzyme ;
après le temps nécessaire à la réaction enzymatique, mesurer la différence de potentiel (D_4) entre les deux électrodes ;
calculer la différence de pH, ΔpH_c pour l'échantillon de calibration selon le calcul suivant :

$$\Delta pH_c = (D_4 – D_3) - \Delta pH_o$$

où
ΔpH_c = la différence de pH entre les deux mesures D_3 et D_4 pour l'échantillon de calibration moins la différence obtenue pour le blanc ;
D_3 = valeur de la différence de pH entre les deux électrodes remplies avec le mélange tampon/solution de référence ;
D_4 = valeur de la différence de pH entre les deux électrodes dont l'une est remplie de tampon/solution de référence et l'autre de tampon/solution de référence/enzyme.
calculer la pente de la droite d'étalonnage :

$$s = C_u/\Delta pH_c$$

où
Cu est la concentration de saccharose dans la solution étalon exprimée en g/L.

Vérifier la validité de l'étalonnage en analysant 10 µL de solution étalon de saccharose (5) en suivant la procédure (7.3). Le résultat doit être compris entre ± 2% de la valeur de référence. Dans le cas contraire recommencer la procédure de calibration.

7.3 – Quantification

remplir les compartiments électrodes (EL_1 et EL_2) avec le tampon (4.14)
ajouter 10 µL (à la micropipette 5.9 ou par le préparateur) d'échantillon dans la chambre de réaction ;
remplir les électrodes EL_1 et EL_2 avec le mélange tampon + échantillon ;
mesurer la différence (D_5) de potentiel entre les deux électrodes ;
ajouter 32 µL de solution enzymatique (4.15) et remplir l'électrode EL_2 avec le mélange tampon + échantillon + enzyme ;
mesurer la différence de potentiel (D_6) entre les deux électrodes ;
calculer la quantité de soluté dans l'échantillon selon le calcul suivant :

$$w = s \times [(D_6 – D_5) - \Delta pH_o]$$

où
w =la quantité de soluté dans l'échantillon (en g/L) ;
S est la pente déterminée par la droite de calibration ;
ΔpH_o = la différence de pH entre les deux mesures pour le blanc ;
D_5 = valeur de la différence de pH entre les deux électrodes remplies avec l'échantillon/solution de référence ;
D_6 = valeur de la différence de pH entre les deux électrodes dont l'une est remplie de tampon/échantillon et l'autre de tampon/échantillon/enzyme.

8 EXPRESSION DES RESULTATS

Les résultats sont exprimés en g/L de glucose inverti avec un chiffre significatif après la virgule.

9. CARACTERISTIQUES DE L'ANALYSE

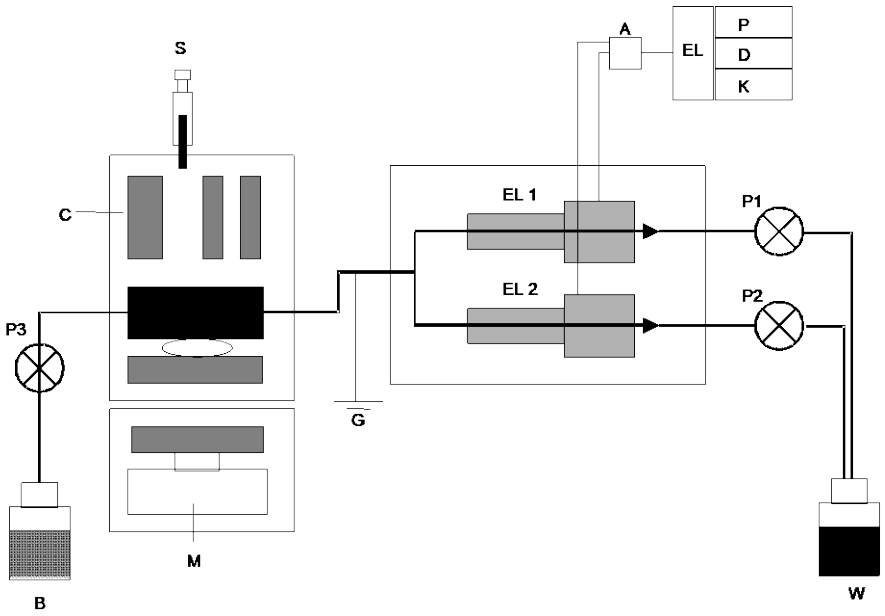
A cause de l'hydrolyse du saccharose dans les moûts et les vins il n'a pas été possible d'organiser une analyse interlaboratoire selon le protocole de l'OIV.
L'étude intra-laboratoire de cette méthode montre pour le saccharose une linéarité entre 0 et 250 g/L, une limite de détection de 0,2 g/L, une limite de quantification de 0,6 g/L, une répétabilité de 0,0837x – 0,0249 g/L et une reproductibilité de 0,0935x – 0,073 g/L (où x est la teneur en saccharose).

10 CONTROLE QUALITE

Des contrôles qualité peuvent être réalisés avec des matériaux de référence certifiés, des vins dont les caractéristiques sont issues d'un consensus ou de vins surchargés insérés régulièrement dans les séries analytiques et en suivant les cartes de contrôle afférentes.

Annexe A

Schéma de l'appareillage de pH-métrie différentielle



A : amplificateur différentiel ; B : solution de tampon ; C : chambre de mélange; D : indicateur ; EL1 et EL 2 électrodes capillaires ; EL : partie électronique ; G : mise à la terre ; K : clavier ; M : agitateur magnétique ; P : imprimante ; P1 à P3 : pompes péristaltiques ; S : seringue d'injection de l'échantillon et de l'enzyme ; W : mise à l'égout.

Annexe B

BIBLIOGRAPHIE

LUZZANA M., PERELLA M. et ROSSI-BERNARDI L (1971) : Electrometric method for measurement of small pH changes in biological systems. Anal. Biochem, 43, 556-563.

LUZZANA M., AGNELLINI D., CREMONESI P. et CARAMENTI G. (2001) : Enzymatic reactions for the determination of sugars in food samples using the differential pH technique. Analyst, 126, 2149 –2152.

LUZZANA M., LARCHER R., MARCHITTI C. V. et BERTOLDI D. (2003) : Quantificazione mediante pH-metria differenziale dell'urea negli spumanti metodo classico.in "Spumante tradizionale e classico nel terzo millennio" 27-28 giugno 2003, Instituti Agrario di San Mechele.

MOIO L., GAMBUTI A., Di MARZIO L. et PIOMBINO P. (2001) : Differential pHmeter determination of residual sugars in wine. Am. J. Enol. Vitic, 52(3), 271 – 274.

MOSCA A., DOSSI G., LUZZANA M., ROSSI-BERNARDI L., FRIAUF W. S., BERGER R.L., HOPKINS H. P. et CAREY V (1981) : Improved apparatus for the differential measurment of pH : application to the measurment of glucose. Anal. Biochem., 112, 287 – 294.

TUSSEAU D., FENEUIL A., ROUCHAUSSE J.-M. et VAN LAER S. (2004) : Mesure de différents paramètres d'interêt oenologique par pHmétrie différentielle. F.V. O.I.V. n° 1199, 5 pages.

Méthode OIV-MA-AS311-09 Méthode Type II et III

Détermination des rapports isotopiques $^{13}C/^{12}C$ du glucose, fructose, glycérol et éthanol dans les produits d'origine vitivinicole par chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse des rapports isotopiques

(Résolution OIV-OENO 479-2017)

1. Domaine d'application

Cette méthode s'applique aux produits d'origine vitivinicole.
Cette méthode est :

- de type II pour le glucose, fructose et le glycérol
- de type III pour l'éthanol

2. Principe

Les échantillons sont injectés après dilution et filtration si nécessaire dans l'appareil de CLHP. Le rapport isotopique $^{13}C/^{12}C$ des composés est déterminé, après leur oxydation dans une interface liquide, par spectrométrie de masse des rapports isotopiques. Cette interface liquide, symbolisée par l'acronyme ''*co*'', permet une oxydation chimique de la matière organique en CO_2. Le couplage CLHP-*co*-SMRI permet donc de déterminer simultanément le rapport isotopique des composés suivants : glucose, fructose, glycérol et éthanol.

3. Réactifs

3.1 Eau pure de résistivité ≥ 18 MΩ cm de qualité CLHP
3.2 Persulfate d'ammonium – de pureté analytique – [CAS No : 7727-54-0]
3.3 Acide orthophosphorique (concentration 85 %) –de pureté analytique– [CAS No : 7664-38-2]
3.4 Hélium pour analyse, utilisé comme gaz vecteur (CAS 07440-59-7)
3.5 Gaz de référence : CO_2, dioxyde de carbone pour analyse, utilisé comme gaz de référence secondaire (CAS 00124-38-9).
3.6 Standards internationaux

4. Matériel

4.1 Matériel courant de laboratoire
4.2 Appareil de chromatographie liquide haute performance
4.4 Interface liquide pour l'oxydation des composés élués
4.5 Spectromètre de masse des rapports isotopiques

5. Analyse des échantillons

5.1 Préparation des échantillons

Selon les teneurs en sucre, glycérol et éthanol, les échantillons doivent être préalablement dilués avec de l'eau (3.1), afin d'obtenir une concentration observable dans des conditions expérimentales. Selon les concentrations des composés, deux mesures sont nécessaires avec des dilutions différentes.

5.2 Exemple de conditions analytiques

Durée totale de l'analyse : 20 minutes

A titre indicatif, la dilution des jus de raisin et des vins est de l'ordre de 1/200 tandis que celle des moûts concentrés est de l'ordre de 1/500.

CLHP :

Colonne : colonne de type carbohydrate (Ex : Carbohydrate column 700 CH, HyperRez XP Carbohydrate H^+)
Volume injecté : 25 µL
Phase mobile : eau (3.1)
Débit : 0.4 mL/min
T° Colonne : 80 °C

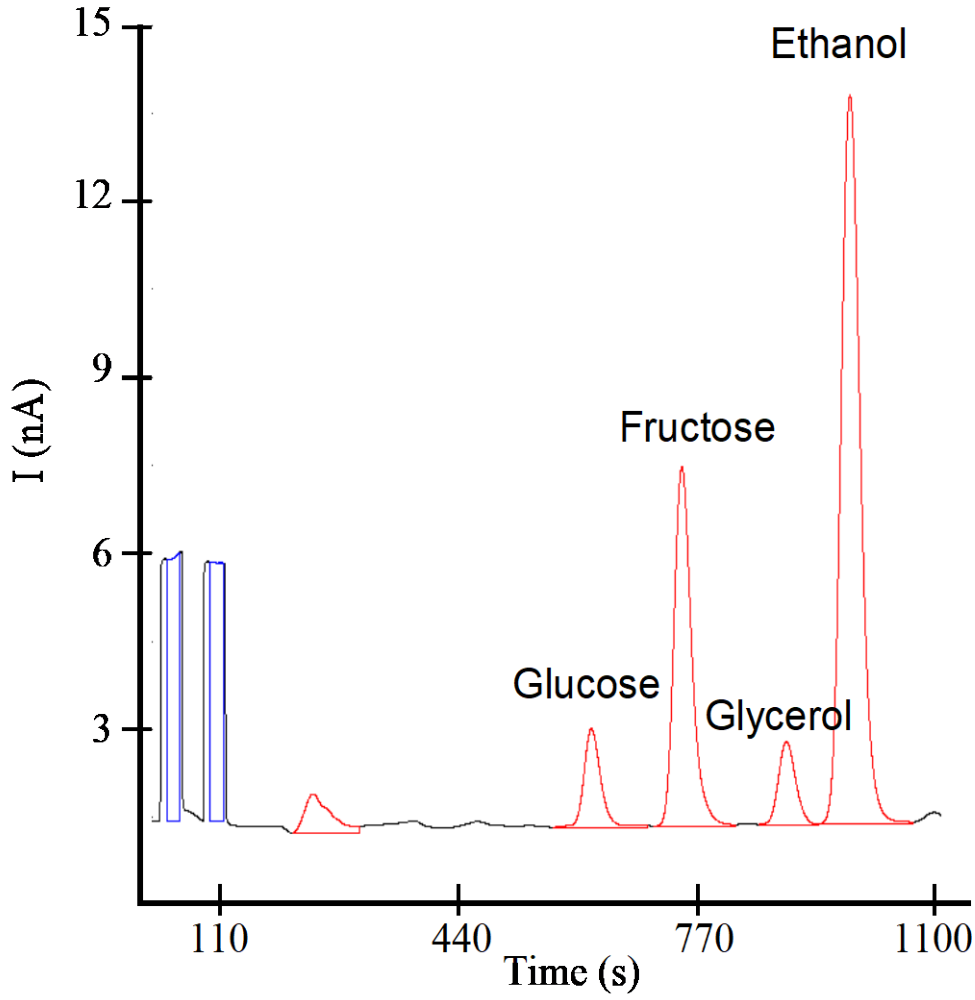
Interface Liquide :

Solution de persulfate d'ammonium (3.2) (15% en masse) et d'acide orthophosphorique (2,5% en volume)
Débit de la pompe péristatique : 0,6 mL/min
Température de chauffage : 93 °C
Flux de l'hélium vecteur : 15 mL/min
Flux de l'hélium de séchage : 50 mL/min

SMRI :
Courant de trappe : 300 µA

5.3 Exemple de chromatogramme

Chromatogramme d'un vin sucré analysé par CLHP-co-SMRI



6. Détermination des rapports isotopiques

Le gaz de référence, le CO_2, est étalonné à partir des standards internationaux commerciaux. Les rapports isotopiques sont exprimés en δ ‰ par rapport au Pee Dee Belemnite (PDB) et sont définis comme :

$\delta^{13}C_{Ech}$ (‰) = $[(R_{Ech} / R_{St}) – 1] * 10^3$

avec : Ech : échantillon ; St : standard ; R : rapport isotopique $^{13}C/^{12}C$

7. Caractéristiques de la méthode

Les caractéristiques de la méthode de mesure des rapports isotopiques du ^{13}C du glucose, fructose, glycérol et éthanol par CLHP-*co*-SMRI ont été déterminées à partir des résultats d'une chaine d'analyse inter-laboratoires sur quatre échantillons (vin sec, vin sucré, jus de raisin et moût concentré rectifié). Les résultats obtenus pour chaque composé analysé et chaque type de matrice sont présentés en annexe.

8. Bibliographie

1. Cabanero, AI.; Recio, JL.; Rupérez, M. (2008) Isotope ratio mass spectrometry coupled to liquid and gas chromatography for wine ethanol characterization. Rapid Commun. Mass Spectrom. 22 : 3111-3118.

2. Cabanero, AI. ; Recio, JL. ; Rupérez, M. (2010) Simultaneous stable carbon isotopic analysis of wine glycerol and ethanol by by liquid chromatography coupled to isotope ratio mass spectrometry. J. Agric. Food Chem. 58: 722-728.

3. Guyon, F. ; Gaillard, L. ; Salagoïty, MH. ; Médina, B. Intrinsic Ratios of Glucose, Fructose, Glycerol and Ethanol $^{13}C/^{12}C$ Isotopic Ratio Determined by HPLC-*co*-IRMS : Toward Determining Constants for Wine Authentication. Anal. Bioanal. Chem. (2011) 401 : 1551-1558.

Glycérol

Temps (s)

Annexe

Traitement statistique de la chaine d'analyse CLHP-*co*-SMRI Pour la détermination de la fidélité de la méthode (répétabilité et reproductibilité)

Liste des laboratoires classes par ordre alphabétique des pays d'origine.

Pays	Laboratoire
Allemagne	INTERTEK
Allemagne	UNI DUE
Allemagne	ELEMENTAR
Allemagne	QSI
Allemagne	LVI
Belgique	IRMM
Chine	CNRIFFI
Espagne	MAGRAMA
France	SCL-33
Italie	FLORAMO
Japon	AKITA Univ.
Rép. Tchèque	SZPI

Réponses :

12 laboratoires / 14 réponses

Traitement des résultats de la chaine inter-laboratoires selon ISO 5725-2

Echantillons:

1 vin sec (Vin A)
1 vin sucré (Vin B)
1 moût concentré rectifié (MCR)
1 Jus de raisin

Conditions d'analyse :

Chaque échantillon analysé en double (répétabilité) et double aveugle (reproductibilité)

Expression des résultats en ‰ vs PDB

Fidélité sur la mesure du Glucose

Répétabilité et Reproductibilité

	Vin B	MCR	Jus de Raisin
Nombre de Laboratoires	12	12	12
Nombre de réponses	14	13	14
Nombre de réponses retenues (élimination des aberrants)	13	13	12
Valeur Minimale	-26.33	-25.04	-25.78
Valeur Maximale	-23.72	-23.74	-24.62
Valeur Moyenne	-25.10	-24.24	-25.19
Variance de répétition	0.02	0.01	0.01
Ecart type de répétabilité (S_r)	0.14	0.10	0.09
Limite de répétabilité (r ‰)	0.40	0.29	0.24
Variance de reproductibilité	0.39	0.14	0.11
Ecart type de reproductibilité (S_R)	0.62	0.38	0.33
Limite de reproductibilité (R ‰)	1.77	1.06	0.94

Fidélité sur la mesure du Fructose

Répétabilité et Reproductibilité

	Vin B	MCR	Jus de Raisin
Nombre de Laboratoires	12	11	12
Nombre de réponses	14	13	14
Nombre de réponses retenues (élimination des aberrants)	13	13	13
Valeur Minimale	-25.56	-24.19	-25.33
Valeur Maximale	-24.12	-23.19	-23.98
Valeur Moyenne	-24.87	-23.65	-24.56
Variance de répétition	0.02	0.03	0.02
Ecart type de répétabilité (S_r)	0.14	0.16	0.14
Limite de répétabilité (r ‰)	0.40	0.46	0.39
Variance de reproductibilité	0.15	0.10	0.18
Ecart type de reproductibilité (S_R)	0.39	0.32	0.42
Limite de reproductibilité (R ‰)	1.10	0.90	1.19

Fidélité sur la mesure du Glycérol

Répétabilité et Reproductibilité

	Vin A	Vin B
Nombre de Laboratoires	12	12
Nombre de réponses	12	12
Nombre de réponses retenues (élimination des aberrants)	11	11
Valeur Minimale	-32.91	-30.74
Valeur Maximale	-30.17	-28.27
Valeur Moyenne	-31.75	-29.54
Variance de répétition	0.13	0.04
Ecart type de répétabilité (S_r)	0.36	0.19
Limite de répétabilité (r ‰)	1.03	0.55
Variance de reproductibilité	0.57	0.37
Ecart type de reproductibilité (S_R)	0.76	0.61
Limite de reproductibilité (R ‰)	2.14	1.72

Fidélité sur la mesure de l'Ethanol

Répétabilité et Reproductibilité

	Vin A	Vin B
Nombre de Laboratoires	12	12
Nombre de réponses	11	12
Nombre de réponses retenues (élimination des aberrants)	10	12
Valeur Minimale	-27.85	-27.60
Valeur Maximale	-26.50	-26.06
Valeur Moyenne	-27.21	-26.82
Variance de répétition	0.03	0.03
Ecart type de répétabilité (S_r)	0.16	0.17
Limite de répétabilité (r ‰)	0.47	0.47
Variance de reproductibilité	0.16	0.23
Ecart type de reproductibilité (S_R)	0.40	0.47
Limite de reproductibilité (R ‰)	1.14	1.34

Méthode OIV-MA-AS311-10 **Méthode Type III**

Dosage des D-glucose et D-fructose dans les vins par méthode enzymatique automatisée

(Résolution OIV-OENO 600-2018)

1. Domaine d'application

Cette méthode permet le dosage de la somme D-glucose + D-fructose dans les vins par analyse enzymatique spécifique en utilisant un analyseur automatique séquentiel.
Dans le présent document l'étude collaborative a permis de caractériser la méthode sur une échelle de mesure de 0,1 à 96,31 g/L, en prenant en compte l'introduction d'une dilution de l'échantillon au-delà de 5 g/L.

Note : Le cas échéant, il appartient à chaque laboratoire utilisant cette méthode de redéfinir, éventuellement en l'élargissant, ce domaine par un travail de validation.

2. Références normatives

- Recueil des méthodes internationales d'analyses – OIV: Glucose et Fructose (méthode enzymatique) OIV-MA-AS311-02
- ISO 78-2 : Chimie – Plans de normes

3. Principes réactionnels

Le D-glucose et le D-fructose sont phosphorylés par l'adénosine triphosphate (ATP) lors d'une réaction enzymatique catalysée par l'hexokinase (HK) pour produire du glucose-6-phosphate (G6P) et du fructose-6-phosphate (F6P)

$$D-glucose + ATP \overset{HK}{\leftrightarrow} G6P + ADP$$

$$D-fructose + ATP \overset{HK}{\leftrightarrow} F6P + ADP$$

Le glucose-6-phosphate est d'abord oxydé en gluconate-6-phosphate par la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP) en présence de l'enzyme glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH). La quantité produite de

nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduite (NADPH) est directement corrélée avec celle de glucose-6-phosphate et donc avec celle de D-glucose.

$$G6P + NADP^+ \overset{G6PDH}{\longleftrightarrow} gluconate-6-phosphate + NADPH + H^+$$

Le fructose-6-phosphate (F6P) est transformé en glucose-6-phosphate (G6P) en présence de phosphoglucose isomerase (PGI) :

$$F6P \overset{PGI}{\leftrightarrow} G6P$$

Le glucose-6-phosphate ainsi formé réagit selon le schéma précédent.
La nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduite produite (NADPH) est mesurée grâce à son absorption à 340 nm.

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 (norme ISO 3696) qualité I ou II.

4.1.2. Triéthanolamine hydrochloride ; (CAS 637-39-8)

4.1.3. NADP (nicotinamide–adenine dinucleotide phosphate) ; (CAS 24292-60-2)

4.1.4. ATP (adenosine-5'-triphosphate) ; (CAS 34369-07-8)

4.1.5. MgSO4 (sulfate de magnesium anhydre) ; (CAS 7487-88-9)

4.1.6. Hydroxyde de sodium ; (CAS 1310-73-2)

4.1.7. Hexokinase (HK) ; (CAS 9001-51-8)

4.1.8. Glucose-6–phosphate déhydrogénase (G6P-DH) ; (CAS 9001-40-5)

4.1.9. Phosphoglucose isomerase (PGI): lyophilized powder, 400-600 unités/mg protein ; (CAS 9001-41-6)

Note : Une unité assure la conversion de 1.0 µmole de D-fructose 6-phosphate en D-glucose 6-phosphate par minute à pH 7.4 et 25 °C.

4.1.10. Polyvinylpyrrolidone (PVP) ; (CAS 9003-39-8)

4.1.11. D-glucose : Pureté ≥ 99.5% ; (CAS 50-99-7)

4.1.12. D-fructose : Pureté ≥ 99% ; (CAS 57-48-7)

Remarque 1 : Il existe des kits commerciaux pour la détermination du D-glucose et du D-fructose. L'utilisateur se doit d'en vérifier la composition pour s'assurer que ceux-ci comprennent bien les réactifs indiqués ci-dessus.

Remarque 2 : L'utilisation de PVP est recommandée pour éliminer une éventuelle action négative des tanins du vin sur les molécules protéiques des enzymes. C'est

le cas notamment dans des vins rouges. Dans le cas où l'utilisation de PVP n'est pas effective, le laboratoire doit s'assurer de l'absence d'interférence des tanins du vin sur les enzymes.

4.2. Solutions de travail

4.2.1. Tampon triéthanolamine hydrochloride et sulfate de magnésium ajusté à pH 7,6. La préparation peut être la suivante :

- Triéthanolamine hydrochloride (4.1.2) : 11,2 g
- Sulfate de magnésium (4.1.5) : 0,2 g
- PVP (4.1.10) : 2 g
- Eau pour usage analytique (4.1.1) : 150 mL

Le mélange est ajusté à pH 7,6 avec une solution d'hydroxyde de sodium 5M puis complété à 200 mL avec de l'eau pour usage analytique. Le tampon se conserve au moins 4 semaines à 2 - 8° C (environ).

4.2.2. Solution de travail R1 (exemple) :

- Tampon triéthanolamine (4.2.1) : 50 mL
- NADP (4.1.3) : 117 mg
- ATP : (4.1.4) 150 mg

4.2.3. Solution de travail R2 (exemple) :

- Tampon triéthanolamine (4.2.1) : 2 mL
- HK (4.1.7) : 270 U
- G6P-DH (45.1.8) : 340 U
- PGI (4.1.9) : 640 U

Note : Des préparations commerciales de mélange HK/6GPDH peuvent être utilisées.
Remarque : Lors de la préparation de ces solutions, le mélange doit être effectué 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 au Système International d'Unité (S.I.) la gamme d'étalonnage doit être réalisée avec des solutions pures de D-glucose et D-Fructose préparées par pesée et couvrant la gamme de mesure.

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. L'équipement 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 d'une 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). Il est préférable de ne pas utiliser les valeurs d'absorbance supérieures à 2.0.

5.1.3. Précision des volumes prélevés

La précision des volumes de réactifs et d'échantillons prélevés par les pipettes de l'analyseur a une influence sur le résultat de mesure. Un contrôle qualité des résultats par des stratégies adaptées (par exemple selon les guides publiés à l'OIV) est recommandé.

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. Longueur d'onde

La longueur d'onde d'absorption maximale du NADPH formé par la réaction est de 340 nm. Pour les spectrophotomètres généralement utilisés, cette longueur d'onde sera retenue. Certains analyseurs sont équipés de photomètres utilisant une lampe à la vapeur de mercure. Dans ce cas, il sera retenu une longueur d'onde de lecture de 365 ou 334 nm.

5.2. Balance

Celle-ci doit être raccordée au Système international d'unités et avoir une précision 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 calibrage sont de classe A.

6. Echantillonnage

6.1. Préparation des échantillons pour les moûts et les vins

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

- Une filtration doit être utilisée 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 utilisée pour les valeurs supérieures à la gamme de mesure. A titre d'exemple, des facteurs de 10x, 20x ou 40x sont mis en œuvre pour les moûts. Compte tenu de leur incidence sur le budget d'incertitude, ces dilutions doivent être réalisées avec le plus grand soin.

6.2. Préparation des échantillons de vins chargés en CO_2

Les échantillons de vins chargés en CO2, peuvent produire des effets de bullage. Ils 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 de 1 à 5 mn, 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 : 2,0 µL
- R1 : 40 µL
- R2 : 40 µL

L'appareil effectue des mesures régulières (par exemple toutes les 12 secondes) qui permettent d'obtenir une courbe de réaction dont un exemple est donné en figure 1.

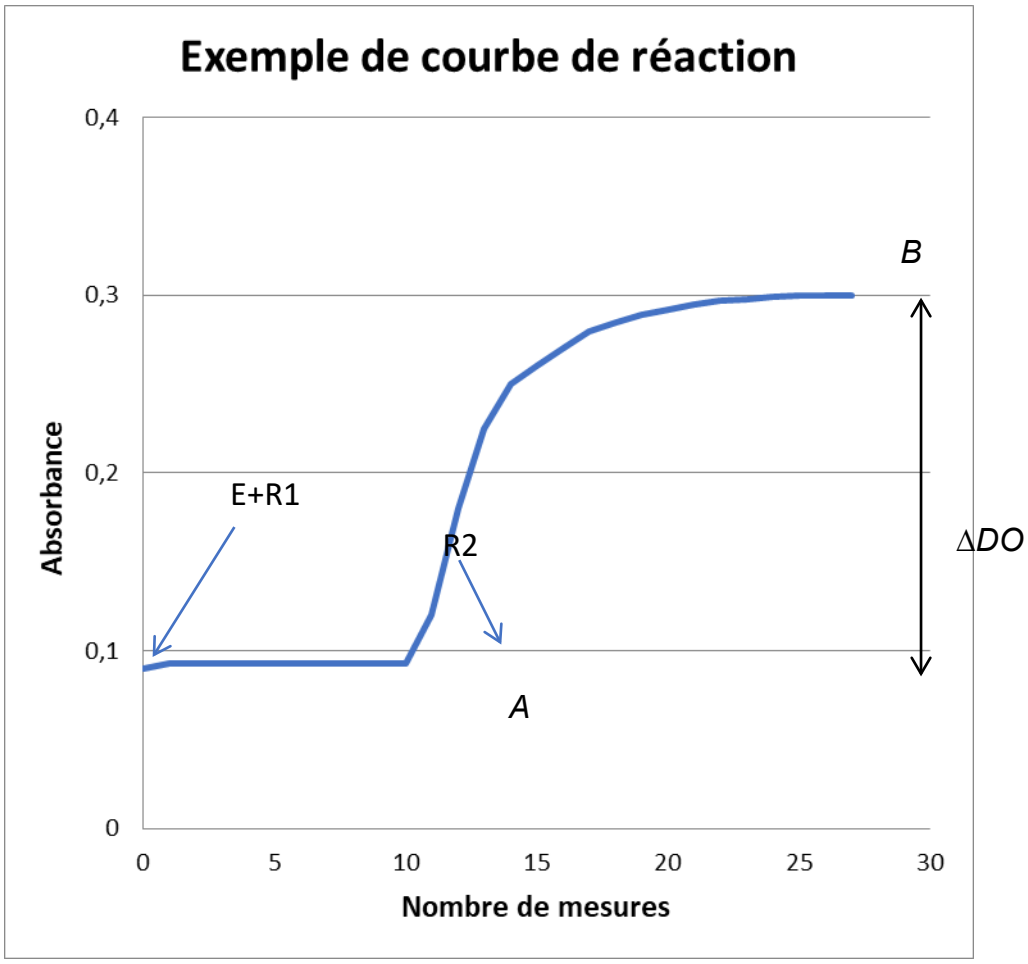


Figure 1 : Courbe de réaction

L'appareil doit permettre de choisir les points de lecture de la différence d'absorbance recherchée, par exemple A et B dans la figure 1.

8. Calculs des résultats

La mesure utilisée pour la détermination du résultat est :

$$\Delta DO = (\text{Absorbance } B - \text{Absorbance } A)$$

Afin de corréler cette valeur ΔDO à la concentration en D-glucose + D-fructose recherchée, un étalonnage de l'appareil est effectué en utilisant les solutions d'étalonnage (§ *4.3*) en 3 points minimum recouvrant la gamme de mesure. Par ailleurs, un blanc réactif est mis en œuvre comportant tous les réactifs, mais pas d'échantillon (point 0 de l'étalonnage).

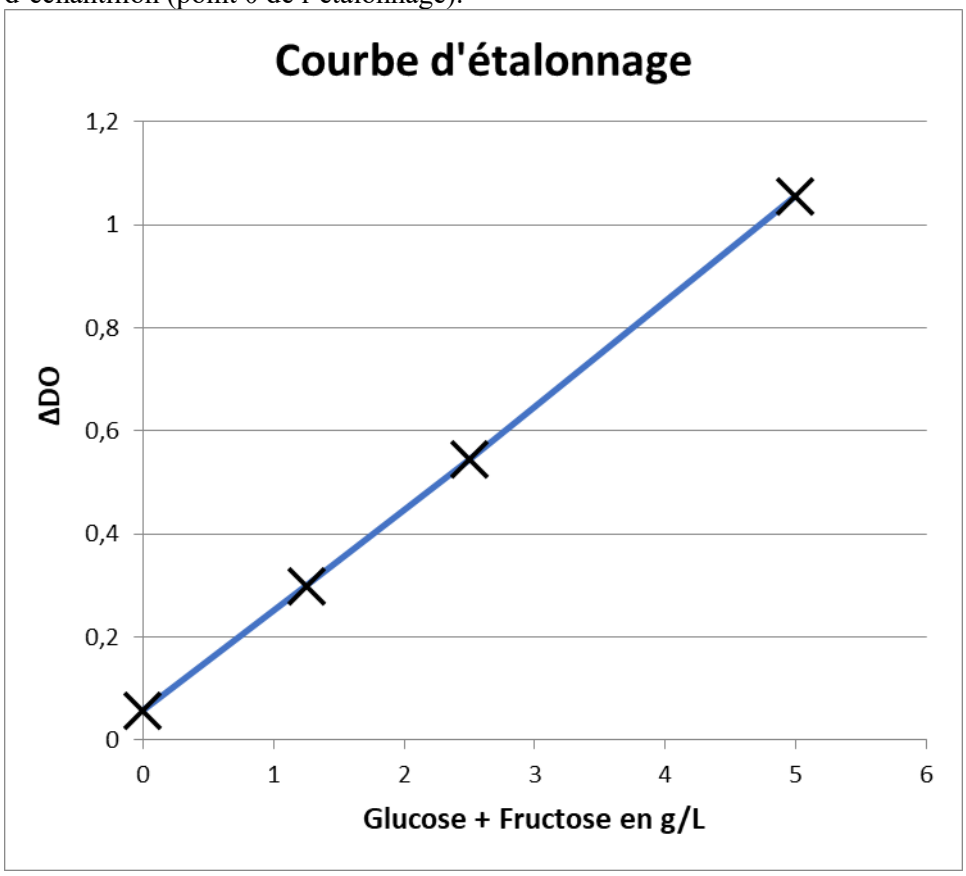


Figure 2 : Courbe d'étalonnage
La courbe d'étalonnage peut être d'ordre 1 (*Concentration* = $a.\Delta DO + b$) voire d'ordre 2 (*Concentration* = $a.\Delta DO^2 + b.\Delta DO + c$). Dans le cas d'utilisation d'une courbe d'étalonnage d'ordre 2, le laboratoire devra veiller à limiter le domaine d'étalonnage afin de maintenir une sensibilité suffisante de la méthode (risque d'écrasement de la courbe).

La valeur finale obtenue doit être multipliée par l'éventuel coefficient de la dilution utilisée.

9. Expression des résultats

Les résultats de D-glucose + D-fructose sont exprimés en g/L, avec deux décimales.

10. Précision

Reproductibilité interlaboratoire

RSD_R = 5% (à partir de 1,00 g/L)
CV_R% (k=2) = 2.RSD_R= 10%, (à partir de 1,00 g/L)

Répétabilité

RSD_r= 1,5% (à partir de 1,00 g/L)
CV_r% (k=2) = 2.RSD_r = 3 % (à partir de 1 g/L)

Limite de quantification
LQ validée = 0,10 g/L
(Concentration où CV_R% (k=2) = 60%)

ANNEXE
Résultats de l'étude interlaboratoire

Etude collaborative

17 Laboratoires de différents pays ont participé à l'étude collaborative, organisée en 2016.

Labo	Pays
Miguel Torres S.A.- Finca Mas La Plana	ESPAGNE
Estación Enológica de Castilla y León	ESPAGNE
INGACAL -Consellería do Medio Rural Estación de Viticultura e Enoloxía de Galicia	ESPAGNE
Estación Enológica de Haro	ESPAGNE
Instituto dos Vinhos do Douro e do Porto, IP	PORTUGAL
Comissão de Viticultura da Região dos Vinhos Verdes	PORTUGAL
Laboratoires Dubernet	FRANCE
Laboratoire Dicœnos Rhône	FRANCE
Laboratoire Natoli	FRANCE
SCL Montpellier	FRANCE
Agricultural institute of Slovenia	SLOVENIE
Fachbereich: Wein, Weinüberwachung - Chemisches und Veterinärunterchungsamt Karlsruhe	ALLEMAGNE
HBLAuBA Wein - und Obstbau	AUTRICHE
Landesuntersuchungsamt Mainz	ALLEMAGNE
Hochschule GEISENHEIM University Institut Weinanalytik und Getränkeforschung	ALLEMAGNE

Unità Chimica Vitienologica e Agroalimentare - Centro Trasferimento Tecnologicio - Fondazione Edmund Mach	ITALIE
Unione Italiana Vini soc. Coop.	ITALIE

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

Echantillon		A		B		C		D		E		F		G		H		I		J	
position		1	9	2	13	3	4	5	15	6	10	16	20	7	11	12	17	8	19	14	18
Labo3	rep#1	94,00	96,00	3,40	3,50	**0,40**	**0,40**	0,90	1,10	**2,10**	**2,50**	0,10	0,10	1,40	1,40	5,60	5,90	**4,70**	**4,20**	17,50	17,00
	rep#2	96,00	98,00	3,50	3,60	**0,40**	**0,30**	1,00	1,10	**2,20**	**2,40**	0,10	0,10	1,40	1,40	5,70	6,00	**4,30**	**4,50**	17,50	17,00
Labo 6	rep#1	97,50	95,00	3,42	3,25	**0,35**	**0,48**	1,05	0,98	**3,24**	**2,65**	0,08	0,05	1,42	1,40	5,49	5,57	4,04	4,11	13,63	19,00
	rep#2	97,00	94,50	3,39	3,29	**0,37**	**0,57**	1,08	1,01	**3,34**	**2,66**	0,08	0,08	1,52	1,45	5,42	5,52	3,95	4,13	13,70	20,50
Labo7	rep#1	99,22	99,53	3,46	3,56	0,31	0,34	1,00	0,98	2,50	2,58	0,04	0,04	1,49	1,39	5,77	5,75	4,26	4,35	17,66	17,35
	rep#2	100,30	98,90	3,53	3,53	0,31	0,32	1,02	1,02	2,48	2,50	0,04	0,02	1,48	1,34	5,89	5,79	4,23	4,40	17,21	17,94
Labo9	rep#1	92,00	94,20	3,05	3,03	0,29	0,30	0,93	0,97	2,30	2,16	0,04	0,04	1,25	1,25	5,02	5,01	3,98	3,76	15,60	15,76
	rep#2	95,00	97,25	3,03	3,23	0,32	0,31	0,94	0,90	2,20	2,29	0,03	0,04	1,27	1,25	5,14	5,39	3,80	4,06	16,64	16,40
Labo 10	rep#1	90,79	92,31	3,27	3,36	0,34	0,34	0,97	1,01	2,28	2,30	0,09	0,07	1,28	1,26	5,46	5,42	3,27	3,36	17,92	17,99
	rep#2	92,13	91,65	3,34	3,24	0,32	0,35	0,97	1,04	2,28	2,33	0,08	0,08	1,32	1,28	5,18	5,37	3,34	3,24	17,58	17,68
Labo 11	rep#1	91,40	91,28	3,06	3,12	0,57	0,30	0,95	0,93	2,15	2,18	0,07	0,05	1,16	1,22	5,19	5,34	3,70	3,86	16,22	16,47
	rep#2	90,13	89,94	3,10	3,14	0,56	0,30	0,93	0,93	2,14	2,18	0,07	0,06	1,16	1,20	5,28	5,18	3,76	3,86	16,13	16,33
Labo12	rep#1	100,00	100,00	3,25	3,27	0,34	0,33	1,03	1,10	**2,35**	**2,75**	0,08	0,10	1,30	1,39	5,66	5,64	4,07	4,13	17,30	17,44
	rep#2	101,00	97,00	3,22	3,25	0,34	0,33	1,03	1,11	**2,36**	**2,75**	0,08	0,10	1,30	1,39	5,62	5,68	4,07	4,15	17,50	17,80
Labo13	rep#1	96,60	96,00	3,04	3,07	0,34	0,31	0,97	0,94	2,26	2,50	0,05	0,04	1,25	1,25	5,21	5,29	3,84	3,99	16,08	16,03

	rep#2	96,00	95,10	3,07	3,12	0,32	0,32	0,97	1,04	2,25	2,25	0,04	0,04	1,25	1,28	5,24	5,31	3,90	3,97	15,95	16,18
Labo 14	rep#1	**104,00**	**98,00**	3,19	3,16	0,33	0,33	0,97	0,96	2,47	2,44	0,05	0,05	1,34	1,32	5,77	5,81	4,20	4,21	17,76	17,04
	rep#2	**103,00**	**96,00**	3,18	3,17	0,33	0,33	0,97	0,97	2,48	2,44	0,05	0,05	1,34	1,32	5,77	5,78	4,20	4,14	17,44	17,24
Labo 15	rep#1	**110,03**	**99,25**	3,63	3,60	0,20	0,19	0,94	0,97	2,54	2,36			1,30	1,20	**5,65**	**6,14**	4,56	4,43	**17,16**	**19,33**
	rep#2	**104,39**	**99,34**	3,59	3,72	0,20	0,20	0,94	0,95	2,52	2,32			1,32	1,20	**5,62**	**6,19**	4,39	4,54	**17,41**	**19,29**
Labo16	rep#1	95,20	94,08	3,20	3,22	0,32	0,32	0,96	0,96	2,24	2,26	0,06	0,06	1,23	1,23	5,19	5,19	3,89	3,84	17,82	17,38
	rep#2	96,00	94,41	3,17	3,18	0,31	0,33	0,95	0,94	2,25	2,22	0,06	0,06	1,24	1,22	5,13	5,15	3,85	3,86	17,84	17,24
Labo17	rep#1	96,68	97,10	3,28	3,38	0,47	0,43	1,03	1,03	2,41	2,46	**0,10**	**0,20**	1,36	1,36	5,52	5,53	4,09	4,00	16,42	17,30
	rep#2	97,08	99,40	3,24	3,33	0,39	0,38	0,95	0,96	2,30	2,36	**0,20**	**0,15**	1,32	1,24	5,38	5,40	3,95	4,10	16,50	16,60
Labo18	rep#1	90,23	91,39	3,14	3,26	0,46	0,47	1,12	1,10	2,30	2,44	**0,23**	**0,24**	1,38	1,30	5,19	5,49	3,91	4,10	14,83	14,89
	rep#2	90,02	91,74	3,18	3,31	0,47	0,47	1,07	1,07	2,31	2,40	**0,23**	**0,24**	1,38	1,32	5,23	5,45	3,94	4,04	14,82	14,85
Labo19	rep#1	99,63	103,55	3,34	3,41	0,32	0,32	0,98	0,97	2,38	2,41	0,04	0,05	1,29	1,30	5,68	5,56	4,10	4,11	17,61	17,49
	rep#2	100,57	103,28	3,36	3,42	0,32	0,32	0,98	0,97	2,36	2,42	0,05	0,05	1,29	1,31	5,61	5,59	4,10	4,11	17,53	17,51
Labo20	rep#1	96,41	96,18	3,20	3,23	0,32	0,32	0,96	0,95	2,26	2,32	0,07	0,08	1,24	1,24	5,35	5,40	3,92	4,03	16,36	16,51
	rep#2	96,32	95,89	3,18	3,23	0,32	0,32	0,96	0,95	2,26	2,32	0,07	0,08	1,24	1,24	5,35	5,38	3,92	4,03	16,38	16,49

Labo21	rep#1	103,60	102,02	3,37	3,60	0,23	0,25	0,95	0,98	2,41	2,49	0,05	0,05	1,27	1,33	5,95	6,12	**4,02**	**4,53**	**18,41**	**19,70**
	rep#2	102,50	103,02	3,34	3,51	0,23	0,26	0,92	0,98	2,45	2,45	0,03	0,05	1,26	1,27	6,02	5,99	**4,09**	**4,42**	**18,96**	**19,90**
Labo22	rep#1	96,73	96,59	3,25	3,28	0,28	0,28	0,92	0,93	2,25	2,31	0,06	0,05	1,23	1,28	5,51	5,47	4,02	3,98	17,09	17,10
	rep#2	97,06	96,34	3,24	3,21	0,30	0,30	0,93	0,93	2,26	2,30	0,04	0,05	1,21	1,24	5,40	5,39	4,03	4,04	17,05	17,01

Tableau des données obtenues. 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).
Note : Les valeurs absentes n'ont pas été renseignées par le laboratoire concerné.

Echantillon	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**	**G**	**H**	**I**	**J**
Nb de laboratoires retenus	15	17	14	17	14	14	17	16	15	14
Nb de répétitions	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Mini	90,69	3,08	0,20	0,93	2,16	0,04	1,19	5,14	3,80	14,85
Maxi	102,79	3,64	0,47	1,09	2,52	0,10	1,45	6,02	4,48	17,79
Moyenne globale	96,31	3,29	0,32	0,98	2,34	0,06	1,30	5,50	4,05	16,86
Variance de répétabilité	1,449	0,004	0,000	0,001	0,004	0,000	0,001	0,009	0,005	0,065
Ecartype interlaboratoire	3,60	0,16	0,06	0,05	0,10	0,02	0,07	0,26	0,17	0,83
Variance de reproductibilité	14,037	0,029	0,004	0,003	0,013	0,000	0,006	0,073	0,034	0,739
Ecartype de répétabilité	1,20	0,06	0,01	0,04	0,06	0,01	0,04	0,09	0,07	0,26
Limite r	3,40	0,17	0,04	0,10	0,17	0,02	0,11	0,26	0,21	0,72
RSD_r répétabilité	1,2%	1,8%	4,4%	3,6%	2,5%	13,2%	2,9%	1,7%	1,8%	1,5%
Ecartype de reproductibilité	3,75	0,17	0,07	0,06	0,11	0,02	0,08	0,27	0,19	0,86

Limite R	10,60	0,48	0,19	0,16	0,32	0,06	0,22	0,76	0,52	2,43
RSD_R reproductibilité	3,9%	5,1%	20,4%	5,7%	4,8%	35,3%	6,1%	4,9%	4,6%	5,1%
Horwitz RSD_r	1,877	3,120	4,425	3,742	3,284	5,694	3,588	2,889	3,025	2,440
Horrat r	0,666	0,587	1,001	0,952	0,773	2,315	0,804	0,585	0,593	0,621
Horwitz RSD_R	2,84	4,73	6,70	5,67	4,98	8,63	5,44	4,38	4,58	3,70
Horrat R	1,368	1,086	3,036	0,997	0,965	4,087	1,123	1,122	1,000	1,378

Tableau des résultats obtenus

Note : Les résultats de l'échantillon F sont à prendre avec réserve, en raison du niveau très faible de concentration, en dessous de la limite de quantification des laboratoires.

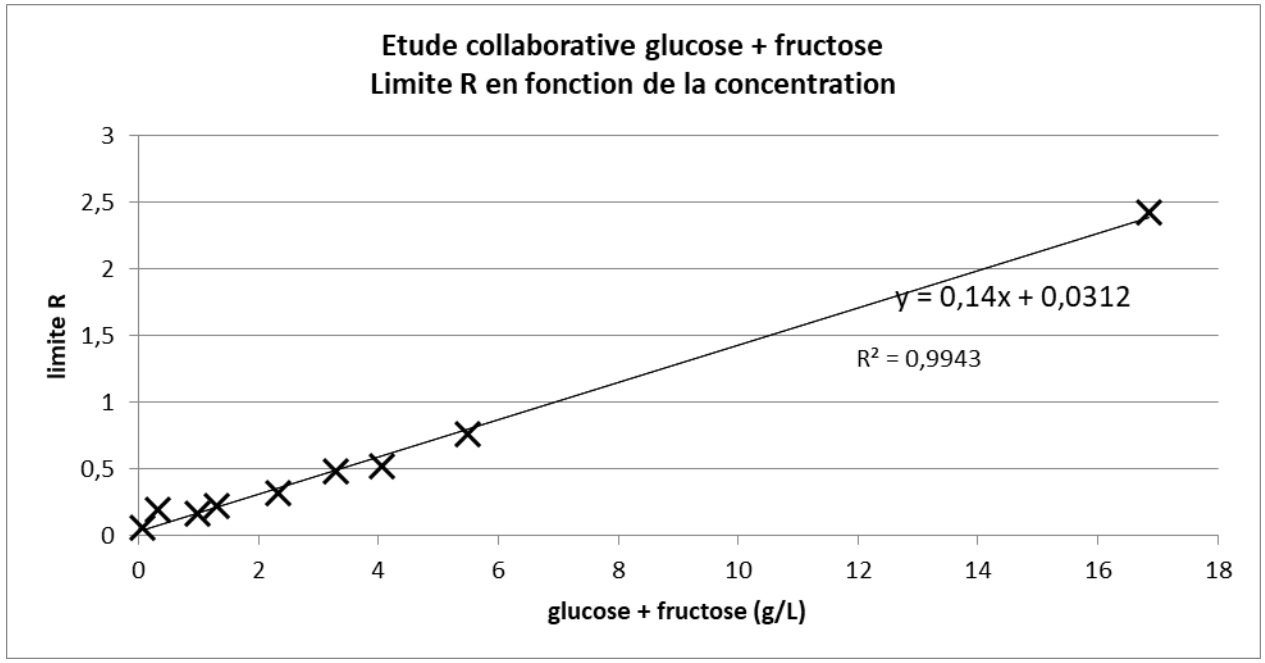


Figure 3 : Limite R en fonction de la concentration

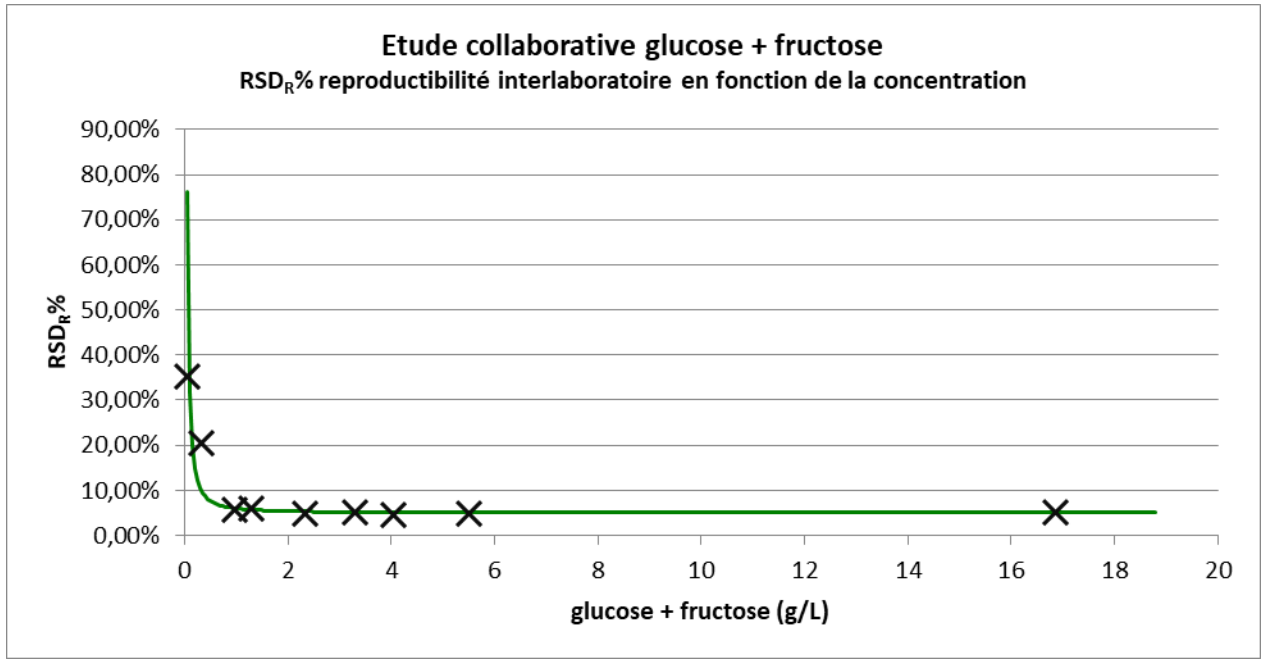


Figure 4 : RSD_R % interlaboratoire en fonction de la concentration.
Modélisation : $\mathbf{RSD_R\% = 1{,}000.C^{(-1{,}424)} + 5}$

Méthode OIV-MA-AS312-01 Méthodes Type I et IV

Titre alcoométrique volumique à 20 °C

(A2 ; OENO 8/2000 ;
OENO 24/2003
OIV/OENO 377/2009
OIV-OENO 566-2016
OIV-OENO 601B-2021)

1 Introduction

Cette résolution se compose d'une partie concernant la préparation du distillat et de 4 méthodes A, B, C et D pour déterminer le titre alcoométrique volumique de ce distillat.

2 Domaine d'application

Cette résolution est applicable pour déterminer le titre alcoométrique volumique (TAV) à 20 °C des boissons viti-vinicoles soit par :

- méthode A : pycnométrie — Méthode de type I
- méthode B : densimétrie électronique à résonateur de flexion — Méthode de type I
- méthode C : Balance hydrostatique — Méthode de type I
- méthode D : Aréométrie et réfractométrie — Méthode usuelle de type IV

3 Définition

Le titre alcoométrique volumique d'une boisson est égal au nombre de litres d'éthanol contenu dans 100 litres d'une solution hydroalcoolique ayant la même masse volumique que le distillat de cette boisson ; ces volumes étant tous deux mesurés à la température de 20 °C. Son symbole est « % vol ».

4 Principe et méthodes

4.1 Principe

Le principe de la méthode consiste dans un premier temps à distiller la boisson de volume à volume après alcalinisation par une suspension d'hydroxyde de calcium qui évite l'entraînement des acides volatils. Cette distillation permet d'éliminer les substances non volatiles. Les homologues de l'éthanol, ainsi que l'éthanol et les homologues de l'éthanol engagés dans les esters, sont compris dans le titre alcoométrique, car ils se retrouvent dans le distillat.

Dans un deuxième temps, la masse volumique du distillat obtenu est mesurée. La masse volumique d'un liquide à une température donnée est égale au quotient de sa masse sur son volume :

$\rho = m / V$, pour une boisson viti-vinicole, elle s'exprime g/cm^3

Pour une solution hydroalcoolique telle qu'un distillat, connaissant la température, des tables permettent de faire correspondre à une masse volumique un titre alcoométrique (OIV-MA-AS312-02 : R2009 Table 1). Ce titre alcoométrique correspond à celui de la boisson (distillation de volume à volume).

4.2 Méthodes de détermination du TAV :

Le principe de chaque méthode ainsi que leur mode opératoire sont détaillés dans les parties suivantes :

Partie A : Détermination du titre alcoométrique volumique d'une boisson en mesurant la masse volumique du distillat par pycnométrie.

Partie B : Détermination du titre alcoométrique volumique d'une boisson en mesurant la masse volumique du distillat par densimétrie électronique utilisant un résonateur de flexion.

Partie C : Détermination du titre alcoométrique volumique d'une boisson en mesurant la masse volumique du distillat par densimétrie utilisant la balance hydrostatique.

Partie D : Détermination du titre alcoométrique volumique d'une boisson en mesurant la masse volumique du distillat par aréométrie ou par réfractométrie

La température d'essai est arrêtée à 20 °C.

4.3 Précautions de sécurité

Respecter les consignes de sécurité relatives à l'utilisation des appareils de distillation, à la manipulation des solutions hydroalcooliques et des produits de nettoyage.

5 Obtention du distillat

5.1 Réactifs

5.1.1 Eau pour usage analytique (norme ISO 3696) qualité II ou pureté équivalente

5.1.2 Suspension d'hydroxyde de calcium 12 % m/v
Obtenue en versant avec précaution 1 L d'eau chaude (60-70 °C) sur 120 g de chaux vive (CaO).

5.1.3 Agent antimousse

5.2 Appareillage

Tout modèle d'appareil à distillation ou tout appareil à entraînement à la vapeur d'eau peut être utilisé à condition de répondre au test suivant :

Distiller 5 fois successives un mélange hydroalcoolique titrant 10 % vol. Le distillat doit présenter un titre alcoométrique d'au moins 9,9 % vol. après la cinquième distillation, c'est-à-dire qu'il ne doit pas se produire de perte d'alcool supérieure à 0,02 % vol. au cours d'une distillation.

A titre d'exemple, utiliser un des deux appareillages suivants :

5.2.1 Appareil de distillation comportant:

- un ballon d'un litre de capacité, à rodage normalisé,

- une colonne rectificatrice de 20 cm de hauteur environ ou tout dispositif destiné à empêcher le primage,
- une source de chaleur (toute pyrogénation des matières extractives doit être évitée par un dispositif approprié),
- un réfrigérant terminé par un tube effilé conduisant le distillat dans le fond de la fiole jaugée réceptrice contenant quelques millilitres d'eau.

5.2.2 Appareil à entraînement par la vapeur d'eau comportant :
- un générateur de vapeur d'eau ;
- un barboteur;
- une colonne rectificatrice ;
- un réfrigérant.

5.3 Préparation de l'échantillon

Les échantillons présentant du gaz sont préalablement débarrassés de la plus grande quantité de leur dioxyde de carbone, par exemple par agitation de 250 à 300 ml de vin dans un flacon de 500 ml.

5.4 Mode opératoire

5.4.1 Mode opératoire pour des boissons avec un TAV supérieur ou égal à 1,5 % vol.

Prélever à l'aide d'une fiole jaugée un volume de boisson de 200 ml. Noter la température de l'échantillon.

Le verser dans le ballon de l'appareil à distiller ou dans le barboteur de l'appareil à entraînement à la vapeur d'eau. Rincer la fiole jaugée à quatre reprises avec environ 5 ml d'eau que l'on ajoute dans le ballon ou dans le barboteur.

Ajouter environ 10 ml d'hydroxyde de calcium 2 M (5.1.2). Si nécessaire, on peut rajouter aussi quelques fragments d'une matière poreuse inerte (pierre ponce, etc…) et/ou quelques gouttes d'agent antimousse (5.1.3) pour faciliter la distillation.

Recueillir le distillat dans la fiole jaugée de 200 ml qui a servi à mesurer la boisson. Recueillir un volume égal aux trois quarts environ du volume initial dans le cas de la distillation et recueillir 198-199 ml de distillat dans le cas de l'entraînement à la vapeur d'eau.

Compléter à 200 ml avec de l'eau distillée, le distillat étant à une température identique à la température initiale à ± 2 °C près

Mélanger avec précaution, par un mouvement circulaire.

Remarque : Dans le cas de vins particulièrement chargés en ions ammoniacaux, redistiller éventuellement le distillat dans les conditions décrites ci-dessus en remplaçant la suspension d'hydroxyde de calcium par 1 ml d'acide sulfurique à 10 % (v/v).

5.4.2 Mode opératoire pour des boissons avec un TAV inférieur à 1,5 % vol.

Prélever à l'aide d'une fiole jaugée un volume de boisson de 200 ml. Noter la température de la boisson. Le verser dans le ballon de l'appareil à distiller ou dans le barboteur de l'appareil à entraînement à la vapeur d'eau. Rincer la fiole jaugée à quatre reprises avec environ 5 ml d'eau que l'on ajoute dans le ballon ou dans le barboteur. Ajouter environ 10 ml de suspension d'hydroxyde de calcium 2 M (5.1.2) et, dans le cas de la distillation, si cela est nécessaire, un régulateur d'ébullition (pierre ponce, etc…). Recueillir, dans une fiole jaugée de 100 ml, un volume de distillat égal environ à 75 ml dans le cas de la distillation ou de 98-99 ml dans le cas de l'entraînement à la vapeur d'eau.

Compléter à 100 ml avec de l'eau distillée, le distillat étant à une température identique à la température initiale à ± 2 °C près. Mélanger avec précaution, par un mouvement circulaire.

Partie A :
Détermination du titre alcoométrique volumique d'une boisson en mesurant la masse volumique du distillat par pycnométrie. (Méthode de type I)

(Method A2/1978 – Résolution 377/2009)

A.1 Principe

On détermine la masse volumique du distillat que l'on fait correspondre au TAV grâce à des Tables.

Pour une température déterminée, la masse volumique est mesurée à l'aide d'un pycnomètre en verre. Celui-ci comporte une fiole de capacité connue sur laquelle vient s'adapter un bouchon rodé creux muni d'un tube capillaire. Lorsque l'on ferme la fiole le trop-plein monte dans le capillaire. Les volumes de la fiole et du capillaire étant connus, on détermine la masse volumique par pesées à l'aide de balances de précision avant et après remplissage du pycnomètre.

A.2 Réactifs et produits

A.2.1 Eau pour usage analytique (norme ISO 3696) qualité II ou pureté équivalente

A.2.2 Solution de chlorure de sodium (2 % m/v)

Pour préparer 1 litre, peser 20 g de chlorure de sodium et dissoudre au volume avec de l'eau

A.3 Appareillage et matériel

Matériel courant de laboratoire, et notamment :

A.3.1 Pycnomètre, en verre pyrex de 100 ml de capacité environ, avec un thermomètre mobile à rodage émeri gradué par dixième de degré de 10 à 30 °C. Ce thermomètre doit être étalonné (fig. 1).

Tout pycnomètre de caractéristiques équivalentes peut être employé.

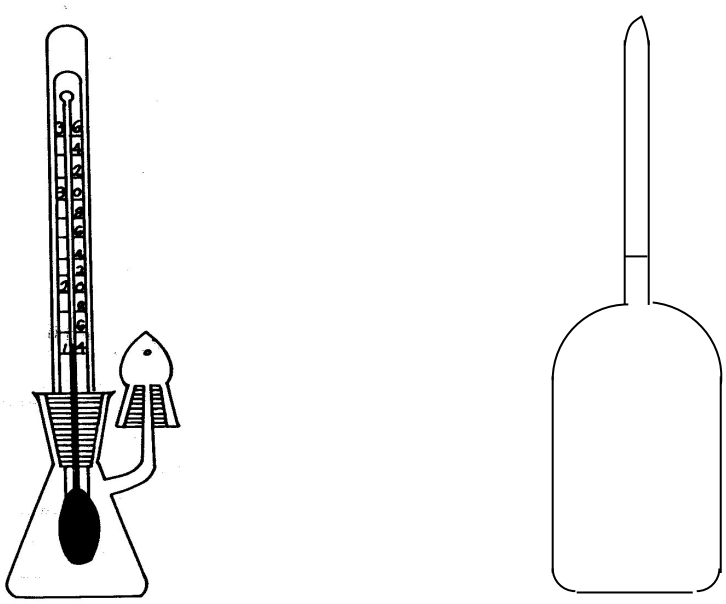


FIGURE 1 : Pycnomètre et son flacon tare

Ce pycnomètre comporte un tube latéral de 25 mm de longueur, de 1 mm au plus de diamètre intérieur, terminé par une partie conique rodée. Ce tube latéral peut être coiffé par un « bouchon récepteur » constitué par un tube conique rodé, terminé par une partie effilée. Ce bouchon sert de chambre de dilatation.

Les deux rodages de l'appareil doivent être faits avec un très grand soin.

A.3.2 Flacon tare de même volume extérieur (à moins de 1 ml près) que le pycnomètre et de masse égale à la masse du pycnomètre plein d'un liquide de densité 1,01 (solution de chlorure de sodium à 2 %, m/v).

A.3.3 Enceinte calorifugée s'adaptant exactement au corps du pycnomètre.

A.3.4 Balance à deux plateaux, sensible au dixième de milligramme
ou
balance monoplateau, sensible au dixième de milligramme.

A.3.5 Masses étalonnées par un organisme accrédité.

A.4 Mode opératoire

A.4.1 Étalonnage du pycnomètre

L'étalonnage du pycnomètre comporte la détermination des caractéristiques suivantes :

- tare à vide,
- volume à 20 °C,
- masse en eau à 20 °C.

A.4.1.1 Utilisation d'une balance à deux plateaux

Le flacon tare étant placé sur le plateau de gauche de la balance et le pycnomètre propre et sec muni de son « bouchon récepteur » sur le plateau droit, réaliser l'équilibre en plaçant à côté du pycnomètre des masses marquées : soit *p* grammes.

Remplir avec soin le pycnomètre avec de l'eau (A.2.1) à la température ambiante, mettre en place le thermomètre

Essuyer soigneusement le pycnomètre et le placer dans l'enceinte calorifugée

Agiter par retournement jusqu'à ce que la température lue sur le thermomètre soit constante. Affleurer exactement au bord supérieur du tube latéral. Essuyer ce tube latéral, placer le bouchon récepteur

Lire la température *t* °C avec soin et la corriger éventuellement de l'inexactitude de l'échelle du thermomètre.

Peser le pycnomètre plein d'eau, soit *p'* la masse en grammes qui réalise l'équilibre.

Calculs :

- Tare du pycnomètre vide :

Tare à vide = $p + m$ où m = masse d'air contenue dans le pycnomètre en g

$$m\ (g) = 0{,}0012\ (p - p'),$$

- Volume à 20 °C, en ml:

$V_{20\ °C}$ (ml) = $(p + m - p')$ x F_t

F_t = facteur relevé dans la table I pour la température *t* °C

$V_{20\ °C}$ doit être connu à ± 0,001 ml près

- Masse en eau à 20 °C :
  $M_{20\,°C} = V_{20\,°C}$ x 0,998203 g

0,998203 = masse volumique de l'eau à 20 °C, en g/cm^3

A.4.1.2 *Utilisation d'une balance monoplateau*

Déterminer :

- la masse du pycnomètre propre et sec : P
- la masse du pycnomètre plein d'eau à *t* °C : P_1 en suivant les indications décrites en A.4.1.1
- la masse du flacon tare T_0

- Calculs

Tare du pycnomètre vide :

Tare à vide : P – *m* où *m* (g) = masse d'air contenue dans le pycnomètre

$$m\ (g) = 0{,}0012\ (P_1 - P)$$

- Volume à 20 °C en ml :
  $V_{20\,°C}$ (ml) = [P_1 - (P - *m*)] x F_t

F_t = facteur relevé dans la table I pour la température *t* °C

$V_{20\,°C}$ doit être connu à ± 0,001 ml près.

- Masse en eau à 20 °C :
  $M_{20\,°C}$ (g) = $V_{20\,°C}$ x 0,998203

  0,998203 = masse volumique de l'eau à 20 °C, en g/cm^3.

A.4.2 Détermination de la masse volumique du distillat :

Procéder à la détermination de la masse volumique apparente à t °C du distillat avec une balance à deux plateaux ou une balance monoplateau :

A.4.2.1 Utilisation d'une balance à deux plateaux

Peser le pycnomètre plein de l'échantillon préparé pour essais en suivant les indications décrites en A.4.1.1.

Soit *p*" la masse en grammes qui réalise l'équilibre à *t* °C.

En tenant compte du fait que la masse du liquide contenu dans le pycnomètre = *p* + *m* - *p*", la masse volumique apparente à *t* °C en g/cm^3 est donnée par :

$$\rho_{t°C} = \frac{p + m - p''}{V_{20°C}}$$

A.4.2.2 Utilisation d'une balance monoplateau

Peser le flacon tare, soit T_1 sa masse en g

Calculer $dT = T_1 - T_o$

Masse du pycnomètre vide au moment de la mesure = P - m + dT, en g

Peser le pycnomètre plein de l'échantillon préparé pour essais en suivant les indications décrites en A.4.1.1.

Soit P_2 sa masse à t °C.

Masse du liquide contenu dans le pycnomètre à t °C = P_2 - (P - m + dT), en g

Masse volumique apparente à t °C, en g/ cm^3

$$\rho_{t°C} = \frac{P_2 - (P - m + dT)}{V_{20°C}}$$

A.5 Expression des résultats et paramètres de fidélité

A.5.1 Mode de calcul

A.5.1.1 Boissons avec un TAV supérieur ou égal à 1,5 % vol.

Exprimer le titre alcoométrique à 20 °C en « % vol.», avec 2 décimales au moyen de la table I de la méthode OIV-MA-AS312-02A. Attention, cette table utilise l'unité kg/m^3 et non g/cm^3.

On a la relation suivante : 1 g/cm^3 = 1000 kg/m^3

Sur la table, chercher sur la ligne horizontale correspondant à la température T (exprimée en nombre entier), immédiatement inférieure à t °C, la plus petite masse volumique supérieure à ρ_t. Utiliser la différence tabulaire lue au-dessous de cette masse volumique pour calculer la masse volumique ρ à cette température T.

Sur la ligne de cette température T chercher la masse volumique ρ' immédiatement supérieure à ρ et calculer la différence entre ces deux masses volumiques ρ et ρ'. Cette différence est divisée par la différence tabulaire lue à la droite de la masse volumique ρ'. Le quotient donne la partie décimale du

titre alcoométrique, tandis que la partie entière de ce titre est indiquée au sommet de la colonne dans laquelle se trouve la masse volumique ρ'.

Un exemple de calcul du titre alcoométrique est donné dans l'annexe 1 à ce chapitre.

Remarque : Cette correction de température a été mise sur programme et peut être éventuellement effectuée automatiquement.

A.5.1.2 Boissons avec un TAV inférieur à 1,5 % vol.

Identique au A.5.1.1 en divisant le titre alcoométrique volumique du distillat (TAVD) par 2 :

TAV= TAVD/2, « % vol.», avec 2 décimales

A.6 Fidélité

Répétabilité(r) : r = 0,10 % vol.

Reproductibilité (R) R = 0,19 % vol.

Les paramètres de validation des boissons avec une faible teneur en alcool sont donnés en annexe II

A.7 Exemple de calcul du titre alcoométrique d'un vin

A.7.1 Pycnométrie sur balance à deux plateaux

Les constantes du pycnomètre ont été déterminées et calculées comme il est indiqué dans la méthode **OIV-MA-AS2-01** *Masse volumique et densité relative* paragraphe A.7.

Titre alcoométrique volumique à 20 °C

Exemple numérique

1° Pesée du pycnomètre plein de distillat :

Tare = pycnomètre + distillat à t°C + p'' { t°C = 18,90°C ; t°C corrigé = 18,70°C ; p'' = 2,8074 g

$p + m - p''$ = masse du distillat à t°C { 105,0698 – 2,8074= 102,2624 g

Masse volumique apparente à t°C:

$$\rho_t = \frac{p + m - p''}{\text{volume du pycnomètre à } 20°C}$$

{ $\rho_{18.7°} = \frac{102.2624}{104.0299} = 0.983076$ g/cm^3

2. Calcul du titre alcoométrique :

Se reporter à la table des masses volumiques apparentes des mélanges hydroalcooliques à différentes températures, comme il est Indiqué plus haut

{ supérieure à la masse observée 0,983076 est 0,98398 dans la colonne 11 %.

La masse volumique à 18 °C est :
(98307.6, + 0,7 x 22) 10^{-5}=0,98323
0,98398 – 0,98323 = 0,00075

La partie décimale du titre alcoométrique est 75/114 = 0,65
Le titre alcoométrique est : 11,65 % vol.

Sur la ligne 18 °C de la table des masses volumiques apparente, la plus petite masse

A.7.2 Pycnométrie sur balance monoplateau

Les constantes du pycnomètre ont été déterminées et calculées comme il est indiqué dans la méthode **OIV-MA-AS2-01** *Masse volumique et densité relative* paragraphe A 7

Exemple numérique

1. Pesée du pycnomètre plein de distillat :

Pesée du flacon tare au moment de la détermination : T1 = 171,9178 g

Pycnomètre plein de distillat à 20,50°C : P2 = 167,8438 g

Variation de la poussée de l'air : $dT = 171,9178 – 171,9160 = + 0,0018$

Masse du distillat à 20,5°C : $Lt = 167,8438 – (67,6695 + 0,0018) = 100,1725$ g

Masse volumique apparente du distillat : $\rho_{20,5°C} = 100.1725/101.8194 = 0,983825$ g/cm3

2 Calcul du titre alcoométrique :

0,98471 – 0,983945 = 0,000765

La partie décimale du titre alcoométrique est : 76,5 / 119 = 0,64

Le titre alcoométrique est : 10,64 % vol.

Se reporter à la table des masses volumiques apparentes des mélanges hydroalcooliques à différentes températures, comme il est indiqué plus haut :

Sur la ligne 20 °C de la table des masses volumiques apparentes, la plus petite masse supérieure à la masse observée 0,983825 est 0,98471 dans la colonne 10 %.

La masse volumique à 20°C est :
$(98382,5 + 0,5 \times 24) \times 10^{-5} = 0,983945$

Partie B : **Méthode B**

Détermination du titre alcoométrique volumique d'une boisson en mesurant la masse volumique du distillat par densimétrie électronique utilisant un résonateur de flexion (Méthode de type I)

(Résolution Oeno 8/2000 – 377/2009)

B.1 Principe

Dans la présente méthode la masse volumique du distillat est mesurée par densimétrie électronique utilisant un résonateur de flexion. Le principe consiste à mesurer la période d'oscillation d'un tube contenant l'échantillon soumis à une excitation électromagnétique. La masse volumique est alors calculée, elle est liée à la période d'oscillation par la formule suivante :

$$\rho = T^2 \times \left(\frac{C}{4\pi^2 V}\right) - \left(\frac{M}{V}\right) \qquad (1)$$

ρ = masse volumique de l'échantillon
T = période de vibration induite
M = masse du tube vide
C = constante de rappel
V = volume de l'échantillon en vibration

Cette relation est de la forme, $\rho = A\ T^2 - B$ (2), il existe donc une relation linéaire entre la masse volumique et la période élevée au carré. Les constantes A et B sont spécifiques de chaque oscillateur et sont estimées en mesurant la période de fluides de masse volumique connue.

B.2 Réactifs et produits

B.2.1 Fluides de référence

Deux fluides de référence servent à ajuster le densimètre. Les masses volumiques des fluides de référence doivent encadrer celles des distillats à mesurer. Un écart de masse volumique entre les fluides de référence supérieur à 0,01000 g/cm^3 est recommandé.

Les fluides de référence pour la mesure du TAV des boissons viti-vinicoles par densimètre électronique sont :

- l'air sec (non pollué),
- de l'eau pour usage analytique (norme ISO 3696) qualité II ou pureté équivalente,
- des solutions hydroalcooliques de masse volumique déterminée par une autre méthode de référence dont l'incertitude ne dépasse pas 0,00005 g/cm^3 à la température de 20,00 ± 0,05 °C,
- des solutions, raccordées au Système international, de viscosité inférieure à 2 mm^2/s dont l'incertitude ne dépasse pas 0,00005 g/cm^3 à la température de 20,00 ± 0,05 °C.

B.2.2 Produits de nettoyage et de séchage

Utiliser des produits qui assurent un parfait état de nettoyage et de séchage de la cellule de mesure, selon les indications du fabricant. A titre d'exemple :

- détergents, acides …,
- solvants organiques : éthanol 96 % vol., acétone pure, etc.

B.3 Appareillage et matériel

B.3.1 Densimètre électronique à résonateur de flexion

Le densimètre électronique comporte les éléments suivants :

- une cellule de mesure comportant le tube de mesure et une enceinte thermostatée,
- un système de mise en oscillation du tube et de mesure de la période d'oscillation,
- un afficheur numérique et éventuellement un calculateur.

Le densimètre est placé sur un support parfaitement stable et est isolé de toutes vibrations.

B.3.2 Contrôle de la température de la cellule de mesure

Le tube de mesure est situé dans une enceinte thermostatée. La stabilité de la température doit être meilleure que +/- 0,02 °C.

Lorsque le densimètre le permet, il est nécessaire de contrôler la température de la cellule de mesure car celle-ci influence fortement les résultats des déterminations. La masse volumique d'une solution hydroalcoolique de TAV

10 % vol., est de 0,98471 g/cm3 à 20 °C et de 0,98447 g/cm3 à 21 °C soit un écart de 0,00024 g/cm3.

La température d'essai est arrêtée à 20 °C. La mesure de température au niveau de la cellule est réalisée avec un thermomètre de résolution de moins de 0,01°C et raccordé aux étalons nationaux. Il doit garantir une mesure de température d'incertitude inférieure à +/- 0,07 °C.

B.3.3 Etalonnage de l'appareil

L'appareil doit être étalonné avant sa première utilisation, puis périodiquement ou si la vérification ne donne pas satisfaction. L'objectif est d'utiliser deux fluides de référence pour calculer les constantes A et B (cf. formule (2) B.1). Pour la réalisation pratique de l'étalonnage, se référer au mode d'emploi de l'appareil. En principe cet étalonnage est effectué avec de l'air sec (tenir compte de la pression atmosphérique) et de l'eau très pure (B.2.1).

B.3.4 Vérification de l'étalonnage

Pour vérifier l'étalonnage, mesurer la masse volumique de fluides de référence.

- Chaque jour d'utilisation, une vérification de la masse volumique de l'air est réalisée. Un écart entre la masse volumique théorique et celle observée supérieur à 0,00008 g/cm^3 peut indiquer que le tube est encrassé. Il faut alors le nettoyer. Après nettoyage, on vérifie à nouveau la masse volumique de l'air, si cette vérification n'est pas concluante il faut ajuster l'appareil.
- On vérifie également la masse volumique de l'eau, si l'écart entre la masse volumique théorique et celle observée est supérieur à 0,00008 g/cm^3, on ajuste l'appareil.
- Si la vérification de la température de la cellule est difficile il est possible de vérifier directement la masse volumique d'une solution hydroalcoolique de TAV comparable à ceux des distillats analysés.

B.3.5 Contrôle

Lorsque la différence entre la masse volumique théorique d'une solution de référence (connue avec une incertitude de +/- 0,00005 g/cm^3) et la mesure est supérieure à 0,00008 g/cm^3, il est nécessaire de vérifier l'étalonnage de l'appareil.

B.4 Mode opératoire

Après obtention du distillat, mesurer par densimétrie sa masse volumique que l'on fait correspondre au TAV grâce à des Tables.

L'opérateur s'assure de la stabilité de la température de la cellule de mesure. Le distillat dans la cellule du densimètre ne doit pas contenir de bulles d'air et doit être homogène. Si l'on dispose d'un système d'éclairage qui permet de vérifier l'absence de bulles, l'éteindre rapidement après la vérification car la chaleur générée par la lampe influe sur la température de mesure.

Pour les appareils qui possèdent un éclairage permanent, cette remarque est sans objet.

Si l'appareil ne donne que la période, on calcule la masse volumique grâce aux constantes A et B (cf. Annexe I). Si l'appareil ne donne pas directement le TAV, connaissant la masse volumique, le TAV est obtenu à l'aide des tables (Table I OIV-MA-312-02)

B.5 Expression des résultats

B.5.1 Expression des résultats:

B.5.1.1 Boissons avec un TAV supérieur ou égal à 1,5 % vol.

Le titre alcoométrique volumique de la boisson est celui obtenu pour le distillat. Il est exprimé en « % vol.».

Si les conditions de température ne sont pas respectées, il est nécessaire de réaliser une correction pour l'exprimer à 20 °C. Le résultat est donné avec deux décimales.

B.5.1.2 Boissons avec un TAV inférieur à 1,5 % vol.

Identique au B.5.1.1 en divisant le Titre alcoométrique du distillat (TAVD) par 2 :

TAV= TAVD/2, en « % vol », avec 2 décimales.

Les paramètres de validation des boissons avec une faible teneur en alcool sont donnés en annexe II.

B.5.2 Remarques

Le volume introduit dans la cellule doit être suffisamment important afin d'éviter une éventuelle contamination provoquée par l'échantillon précédent. Il est donc nécessaire de réaliser au moins deux déterminations. Si celles-ci ne donnent pas des résultats inclus dans la limite de répétabilité, une troisième

détermination est nécessaire. Généralement les résultats des deux dernières déterminations sont homogènes et on élimine la première valeur.

B.6 Fidélité

Pour des échantillons de TAV supérieur à 4 % vol., les données de validation et les résultats de fidélité sont donnés en annexe III

Répétabilité (r) = 0,067 (% vol.),
Reproductibilité (R) = 0,0454 + 0,0105 x TAV (% vol.)

Pour les échantillons ayant un TAV inférieur à 4 % vol., les données de validation et les résultats de fidélité sont donnés en annexe II

Partie C :
Détermination du titre alcoométrique volumique d'une boisson en mesurant la masse volumique du distillat par densimétrie utilisant la balance hydrostatique
(Méthode de type I)

(Résolution Oeno 24/2003 – 377/2009)

C.1 Principe

Le titre alcoométrique volumique peut être mesuré par densimétrie sur balance hydrostatique suivant le principe d'Archimède selon lequel tout corps plongé dans un fluide subit une poussée verticale, dirigée de bas en haut, égale au poids du fluide déplacé.

C.2 Réactifs et produits

C.2.1 Eau pour usage analytique (norme ISO 3696) qualité II ou pureté équivalente,

C.2.2 Solution de lavage du flotteur (hydroxyde de sodium, 30 % m/v).

Pour préparer une solution de 100 ml, peser 30 g d'hydroxyde de sodium et porter au volume à l'aide d'éthanol à 96 % vol.

C.3 Appareillage et matériel

Appareillage courant de laboratoire et notamment :

C.3.1 Balance hydrostatique monoplateau d'une sensibilité de 1 mg.

C.3.2 Flotteur d'un volume d'au moins 20 ml, spécialement adapté à la balance, suspendu par un fil d'un diamètre inférieur ou égal à 0,1 mm.

C.3.3 Éprouvette cylindrique comportant un repère de niveau.

Le flotteur doit pouvoir rentrer entièrement dans le volume de l'éprouvette situé au-dessous du repère ; la surface du liquide n'étant traversée que par le fil de suspension. L'éprouvette cylindrique doit avoir un diamètre intérieur supérieur d'au moins 6 mm à celui du flotteur.

C.3.4 Thermomètre (ou sonde de mesure de la température) gradué en degrés et dixièmes de degré, de 10 à 40 °C, étalonné à ± 0,05 °C près.

C.3.5 Masse étalonnée par un organisme accrédité.

C.4 Mode opératoire

Entre chaque mesure, le flotteur et l'éprouvette doivent être nettoyés à l'eau distillée, essuyés avec un papier de laboratoire doux ne perdant pas ses fibres et rincés avec la solution dont la masse volumique est à déterminer. Les mesures doivent être effectuées dès que l'appareil a atteint sa stabilité afin de limiter les pertes d'alcool par évaporation.

C.4.1 Etalonnage des appareils

C.4.1.1 Étalonnage de la balance

Bien que les balances soient généralement pourvues d'un système d'étalonnage interne, la balance hydrostatique doit pouvoir être étalonnée avec des poids raccordés au Système International.

C.4.1.2 Étalonnage du flotteur

Remplir l'éprouvette cylindrique jusqu'au repère avec de l'eau (C.2.1) dont la température sera comprise entre 15 et 25 °C, mais se situera de préférence à 20 °C.

Plonger le flotteur et le thermomètre dans le liquide, agiter, lire la masse volumique du liquide sur l'appareil et, si nécessaire, corriger cette lecture pour qu'elle soit égale à celle de l'eau à la température de la mesure.

C.4.1.3 Contrôle à l'aide d'une solution hydroalcoolique

Remplir l'éprouvette cylindrique jusqu'au repère avec un mélange hydroalcoolique de titre connu, dont la température sera comprise entre 15 et 25 °C, mais se situera de préférence à 20 °C.

Plonger le flotteur et le thermomètre dans le liquide, agiter, lire la masse volumique du liquide sur l'appareil (ou le titre alcoométrique si ce dernier le permet). Le titre alcoométrique ainsi établi doit être égal au titre alcoométrique précédemment déterminé.

Remarque : Cette solution de titre alcoométrique connu peut également remplacer l'eau pour l'étalonnage du flotteur.

C.4.2 Mesure de la masse volumique d'un distillat (ou de son titre alcoométrique si l'appareillage le permet)

Verser l'échantillon pour essai dans l'éprouvette cylindrique jusqu'au repère de niveau.

Plonger le flotteur et le thermomètre dans le liquide, agiter et lire la masse volumique du liquide sur l'appareil (ou le titre alcoométrique si ce dernier le permet).

Noter la température si la masse volumique est mesurée à t °C (ρ_t).

Corriger ρ_t à l'aide de la table des masses ρ_t des mélanges hydroalcooliques [table II de l'annexe I de la méthode OIV-MA-AS02-01A du présent recueil des méthodes d'analyse de l'OIV].

C.4.3 Nettoyage du flotteur et de l'éprouvette cylindrique.

Plonger le flotteur dans la solution de lavage versée dans l'éprouvette.

Laisser tremper une heure en tournant le flotteur régulièrement.

Rincer abondamment à l'eau du robinet, puis à l'eau distillée.

Essuyer avec un papier de laboratoire doux ne perdant pas ses fibres.

Réaliser ces opérations lors de la première utilisation du flotteur, puis régulièrement dès que nécessaire.

C.5 Expressions des résultats

C.5.1 Boissons avec un TAV supérieur ou égal à 1,5 % vol

À l'aide de la masse volumique ρ_{20}, calculer le titre alcoométrique volumique réel en utilisant la table indiquant la valeur du titre alcoométrique volumique (% vol.) à 20 °C en fonction de la masse volumique à 20 °C des mélanges hydroalcooliques. Il s'agit de la table internationale adoptée par l'Organisation Internationale de Métrologie Légale dans sa recommandation R22 :1973

Les valeurs s'expriment en % vol. avec 2 décimales.

C.5.2 Boissons avec un TAV inférieur ou égal à 1,5 % vol

Identique au C.5.1 en divisant le titre alcoométrique volumique du distillat TAVD par 2 :

TAV= TAVD/2, en % vol., avec 2 décimales.

Les paramètres de validation des boissons avec une faible teneur en alcool sont donnés en annexe II.

C.6 Fidélité

Répétabilité (r)=	0,074 (% vol.)
Reproductibilité (R)=	0,229 (% vol.)

Partie D :

Détermination du titre alcoométrique du vin en utilisant l'aréométrie ou la réfractométrie pour la mesure de la masse volumique du distillat.

(Méthodes de type IV)

D.1 Principe

Le titre alcoométrique peut être déterminé par densimétrie à l'aide d'un alcoomètre en utilisant le principe de la poussée d'Archimède. Un cylindre lesté muni d'une tige graduée s'enfonce plus ou moins dans le distillat dont la masse volumique doit être déterminée. La masse volumique du liquide est lue directement sur la graduation de la tige au niveau du ménisque.

D.2 Aréométrie

D.2.1 Appareillage et matériel

D.2.1.1 Alcoomètre

L'alcoomètre doit répondre aux spécifications pour les appareils de la classe I ou de la classe II définies dans la Recommandation Internationale no 44 «Alcoomètres et aréomètres pour l'alcool» de l'O.I.M.L. (Organisation Internationale de Métrologie Légale).

Cet appareil doit être raccordé au Système International d'Unités (SI).

D.2.1.2 Thermomètre raccordé au Système International d'Unités (SI) gradué en degrés et au 1/10^{e} de degré de 0 à 40 °C, vérifié à 0,05°C près.

D.2.1.3 Éprouvette cylindrique dont les dimensions permettent l'immersion du thermomètre et de l'alcoomètre sans contact avec les parois, tenue verticalement.

D.2.2 Mode opératoire

Verser le distillat dans l'éprouvette cylindrique. Tenir cette éprouvette bien verticalement. Introduire le thermomètre et l'alcoomètre. La lecture du thermomètre est faite 1 min. après avoir agité pour réaliser l'égalité de température de l'éprouvette, du thermomètre, de l'alcoomètre et du distillat. Retirer le thermomètre et lire le titre alcoométrique apparent après 1 min. de repos. Faire au moins trois lectures en prenant le bas du ménisque en s'aidant d'une loupe. Le titre

apparent mesuré à t °C sera corrigé de l'action de la température à l'aide des tables. Il faut que la température du liquide soit peu différente de la température ambiante (5 °C de différence au plus).

D.3 Réfractométrie

D.3.1 Appareillage

Réfractomètre permettant la mesure des indices de réfraction compris entre 1,330 et 1,346.

Selon le type d'appareil, les mesures seront faites :

- soit à 20 °C, grâce à un dispositif approprié,
- soit à la température ambiante t °C, mesurée au moyen d'un thermomètre permettant de la déterminer à 0,05 °C près au moins. Une table de correction de température sera fournie avec l'appareil.

D.3.2 Mode opératoire

La mesure de l'indice de réfraction est effectuée sur le distillat de vin (5) en suivant le mode opératoire prescrit pour le type d'appareil utilisé.

D.3.3 Expression des résultats

L'indice de réfraction à 20 °C est reporté dans la table IV du chapitre OIV MA AS312 02 pour obtenir le titre alcoométrique.

Remarque : La table IV donne la correspondance entre les indices de réfraction des mélanges hydroalcooliques purs et des distillats de vin. Dans le cas des distillats de vin, elle tient compte des impuretés du distillat (alcools supérieurs principalement). La présence de méthanol se traduit par une diminution de l'indice de réfraction et donc du titre alcoométrique.

Nota : Pour exprimer le titre alcoométrique à partir de la masse volumique du distillat, utiliser les tables pratiques I, II, III données dans le chapitre OIV MA AS312 02. Elles ont été calculées à partir de la table alcoométrique internationale publiée en 1972 par l'Organisation internationale de métrologie légale dans sa Recommandation n° 22 et adoptée par l'OIV.

7 Annexes

ANNEXE I

Formule permettant de calculer les tables alcoométriques des mélanges d'alcool éthylique et d'eau.

La masse volumique "ρ", exprimée en kilogrammes par mètre cube (kg/m³) d'un mélange d'alcool éthylique et d'eau à la température t, exprimée en degrés Celsius, est donnée par la formule suivante en fonction :

- du titre massique *p* exprimé par un nombre décimal ; (*)
- de la température *t* exprimée en degrés Celsius (E. I. P. T. 68) ;
- des coefficients numériques ci-après :

La formule est valable pour les températures comprises entre –20 °C et +40 °C.

$$\rho = A_1 + \sum_{k=2}^{12} A_k \, \rho^{k-1} + \sum_{k=1}^{6} B_k (t - 20°C)^k$$

$$+ \sum_{i=1}^{n} \sum_{k=1}^{m} C_{i,k} \, \rho^k (t - 20°C)^i$$

$$n = 5$$
$$m_1 = 11$$
$$m_2 = 10$$
$$m_3 = 9$$
$$m_4 = 4$$
$$m_5 = 2$$

(*) Exemple : pour un titre massique de 12%, p = 0,12

Coefficients numériques de la formule

k	A_k kg/m^3	B_k
1	$9{,}982\,012\,300 \cdot 10^{2}$	$-2{,}061\,851\,3 \cdot 10^{-1}$ kg/(m^3 · °C)
2	$-1{,}929\,769\,495 \cdot 10^{2}$	$-5{,}268\,254\,2 \cdot 10^{-3}$ kg/(m^3 · °C^2)
3	$3{,}891\,238\,958 \cdot 10^{2}$	$3{,}613\,001\,3 \cdot 10^{-5}$ kg/(m^3 · °C^3)
4	$-1{,}668\,103\,923 \cdot 10^{3}$	$-3{,}895\,770\,2 \cdot 10^{-7}$ kg/(m^3 · °C^4)
5	$1{,}352\,215\,441 \cdot 10^{4}$	$7{,}169\,354\,0 \cdot 10^{-9}$ kg/(m^3 · °C^5)
6	$-8{,}829\,278\,388 \cdot 10^{4}$	$-9{,}973\,923\,1 \cdot 10^{-11}$ kg/(m^3 · °C^6)
7	$3{,}062\,874\,042 \cdot 10^{5}$	
8	$-6{,}138\,381\,234 \cdot 10^{5}$	
9	$7{,}470\,172\,998 \cdot 10^{5}$	
10	$-5{,}478\,461\,354 \cdot 10^{5}$	
11	$2{,}234\,460\,334 \cdot 10^{5}$	
12	$-3{,}903\,285\,426 \cdot 10^{4}$	

k	$C_{1,k}$ kg/(m^3· °C)	$C_{2,k}$ k g/(m^3· °C2)
1	$1{,}693\,443\,461530\,087 \cdot 10^{-1}$	$-1{,}193\,013\,005\,057\,010 \cdot 10^{-}$
2	$-1{,}046\,914\,743\,455\,169 \cdot 10^{1}$	$2{,}517\,399\,633\,803\,46\,1 \cdot 10^{-1}$
3	$7{,}196\,353\,469\,546\,523 \cdot 10^{1}$	$-2{,}170\,575\,700\,536\,993$
4	$-7{,}047\,478\,054\,272\,792 \cdot 10^{2}$	$1{,}353\,034\,988\,843\,029 \cdot 10^{1}$
5	$3{,}924\,090\,430\,035\,045 \cdot 10^{3}$	$-5{,}029\,988\,758\,547\,014 \cdot$
6	$-1{,}210\,164\,659\,068\,747 \cdot 10^{4}$	$1{,}096\,355\,666\,577\,570 \cdot 10^{2}$
7	$2{,}248\,646\,550\,400\,788 \cdot 10^{4}$	$-1{,}422\,753\,946\,421\,155 \cdot$
8	$-2{,}605\,562\,982\,188\,164 \cdot 10^{4}$	$1{,}080\,435\,942\,856\,230 \cdot 10^{2}$
9	$1{,}852\,373\,922\,069\,467 \cdot 10^{4}$	$-4{,}414\,153\,236\,817\,392 \cdot$
10	$-7{,}420\,201433\,430\,137 \cdot 10^{3}$	$7{,}442\,971\,530\,188\,783$
11	$1{,}285\,617\,841\,998\,974 \cdot 10^{3}$	

k	$C_{3,k}$ kg/(m^3· °C3)	$C_{4,k}$ kg/(m^3 · °C4)	$C_{5,k}$ kg/(m^3· °C5)
1	$-6{,}802\,995\,733\,503\,803 \cdot 10^{-4}$	$-4{,}075\,376\,675\,622\,027 \cdot 10^{-}$	$-2{,}788\,074\,354\,782\,409 \cdot 10^{-8}$
2	$-1{,}876\,837\,790\,289\,664 \cdot 10^{-2}$	$-8{,}763\,058\,573\,471\,110 \cdot 10^{-}$	$1{,}345\,612\,883493\,354 \cdot 10^{-}$
3	$-2{,}002\,561\,\,813734\,156 \cdot 10^{-1}$	$6{,}515\,031\,360\,099\,368 \cdot 10^{-8}$	
4	$-1{,}022\,992\,966\,719\,220$	$-1{,}515\,784\,836\,987\,210 \cdot 10^{-}$	
5	$-2{,}895\,696\,483\,903\,638$		
6	$-4{,}810\,060\,584\,300\,675$		
7	$-4{,}672\,147\,440\,794\,683$		
8	$-2{,}458\,043\,105\,903\,461$		
9	$-5{,}411\,227\,621\,436\,812 \cdot 10^{-1}$		

ANNEXE II

Paramètres de validation relatifs à la mesure du TAV des boissons ayant une faible teneur en alcool

Ce document présente les résultats de l'étude de validation de la méthode pour les boissons ayant une faible teneur en alcool (mise à jour).

L'étude a été réalisée en accord avec les documents OIV MA-F-AS1-08-FIDMET et MA-F-AS1-09-PROPER.

1. Echantillon

N° échantillon	1	2	3	4	5	6
Nature	Jus de raisin	Boisson obtenue par désalcoolisation du vin	Boisson obtenue par désalcoolisation partielle du vin	Jus de raisin partiellement fermenté	Cidre	Boisson à base de vin
Valeur de TAV approximative % par Vol.	< 0,5	0,5	1,5	2,5	4,5	6,5

Tableau 1 : échantillons analysés pour la validation

2. Analyses

Chacun des 12 échantillons reçus par les laboratoires a été analysé par distillation simple ou avec entrainement à la vapeur selon les deux procédures suivantes :

- Méthode de référence OIV avec mise en œuvre de 200 ml et récupération de 200 ml de distillat.
- Méthode alternative avec mise en œuvre de 200 ml et récupération de 100 ml de distillat.

3. Laboratoires participants

19 laboratoires de différents pays ont participé :

Laboratório CVRVV	4050-501 Porto	Portugal
Laboratório de Análises da CVRA	7006-806 Évora	Portugal
Testing Laboratory CAFIA	603 00 BRNO	République tchèque
Laboratório ASAE - LBPV	1649-038 Lisboa	Portugal
Agroscope - Site de Changins	1260 Nyon 1	Suisse
Labo SCL de Bordeaux	33608 Pessac	France
Labo SCL de Montpellier	34196 Montpelllier	France
Laboratorio Arbitral Agroalimentario	28023 Madrid	Espagne
Estación Enológica de Haro	26200 Haro La Rioja	Espagne
Instituto dos Vinho do Douro do Porto	Porto 4050-253	Portugal
IVICAM	13700 Tomelloso, Ciudad Real	Espagne
INCAVI	08720 Vilafranca del Penedès	Espagne
ICQRF Laboratorio di Conegliano/Susegana	31058 SUSEGANA (TV)	Italie
ICQRF Laboratorio di Catania	95122 CATANIA	Italie
ICQRF Laboratorio di Modena	41100 Modena	Italie
ICQRF laboratorio di Perugia	06128 Perugia	Italie
ICQRF laboratorio di Salerno	84098 Salerno	Italie
ICQRF Laboratorio centrale di Roma	00149 Roma	Italie
Laboratoires DUBERNET	11100 Narbonne	France

Tableau 2 : laboratoires ayant participé à la validation

4. Résultats

	Echantillon N° 1		Echantillon N° 2		Echantillon N° 3		Echantillon N° 4		Echantillon N° 5		Echantillon N° 6	
	POSITION :											
LAB	2	7	4	11	6	12	5	8	9	10	1	3
A	0,21	0,21	0,55	0,55	1,34	1,34	2,58	2,58	4,59	4,60	6,54	6,50
B	0,11	0,14	0,49	0,50	1,32	1,38	2,60	2,57	4,68	4,72	6,52	6,55
C	0,33	0,28	0,68	0,61	1,43	1,35	2,63	2,60	4,63	4,66	6,58	6,51
D			0,62	0,62	1,38	1,36	2,68	2,67	4,69	4,73	6,62	6,64
E	0,20	0,21	0,55	0,56	1,36	1,40	2,61	2,62	4,67	4,68	6,56	6,55
F	0,18	0,12	0,52	0,51	1,31	1,30	2,56	2,56	4,70	4,66	6,51	6,54
G	0,22	0,22	0,55	0,56	1,37	1,37	2,62	2,62	4,68	4,68	6,58	6,57
H			0,41	0,42	1,25	1,27	2,46	2,49	4,57	4,56	6,39	6,40
I	0,20	0,13	0,54	0,48	1,32	1,28	2,60	2,58	4,62	4,62	6,57	6,55
J	0,24	0,24	0,58	0,60	1,41	1,37	2,63	2,63	4,69	4,67	6,55	6,55
K	0,22	0,22	0,56	0,55	1,35	1,35	2,63	2,63	4,67	4,68	6,59	6,58
L	0,22	0,23	0,56	0,57	1,38	1,36	2,63	2,61	4,66	4,67	6,56	6,57
M	0,18	0,18	0,53	0,53	1,33	1,29			4,66	4,65	6,53	6,52
N	0,22	0,23	0,56	0,57	1,38	1,41	2,26	2,61	4,67	4,67	6,51	6,57
O	0,12	0,19	0,53	0,52	1,33	1,33	2,64	2,62	4,67	4,67	6,51	6,55
P	0,25	0,25	0,57	0,58	1,39	1,41	2,66	2,65	4,70	4,68	6,62	6,62
Q	0,22	0,20	0,55	0,59	1,34	1,33	2,61	2,63	4,65	4,63	6,52	6,54
R	0,21	0,21	0,55	0,52	1,29	1,28	2,52	2,55	4,62	4,56	6,50	6,53
S	0,18	0,17	0,41	0,42	1,38	1,37	2,61	2,58	4,63	4,58	6,51	6,48

Tableau 3 : résultats obtenus pour une distillation de 200 ml avec volume de récupération de 200 ml.

Les résultats qui ne sont pas présentés ont été rejetés conformément aux tests de Cochran (variance aberrante) au niveau de rejet de 2,5% (test unilatéral) et de Grubbs (moyennes aberrantes) au niveau de rejet de 2,5% (test bilatéral).

Note : Les valeurs absentes n'ont pas été renseignées par les laboratoires concernés

	Echantillon N° 1	Echantillon N° 2	Echantillon N° 3	Echantillon N° 4	Echantillon N° 5	Echantillon N° 6
LAB	POSITION :					

	2	7	4	11	6	12	5	8	9	10	1	3
A												
B	0,17	0,18	0,52	0,53	1,34	1,36	2,62	2,62	4,62	4,60	6,48	6,52
C	0,25	0,25	0,56	0,62	1,35	1,36	2,50	2,46	4,48	4,44	6,12	6,19
D	0,29	0,29	0,63	0,63	1,43	1,42	2,66	2,65	4,68	4,69	6,58	6,59
E	0,24	0,24	0,58	0,58	1,39	1,39	2,64	2,64	4,66	4,67	6,55	6,57
F	0,21	0,18	0,53	0,53	1,31	1,27	2,41	2,48	4,30	4,31	6,22	5,89
G	0,24	0,24	0,56	0,57	1,35	1,36	2,58	2,57	4,57	4,56	6,46	6,43
H	0,19	0,18	0,48	0,55	1,33	1,32	2,51	2,55	4,59	4,54	6,38	6,42
I	0,25	0,18	0,56	0,53	1,34	1,33	2,62	2,61	4,64	4,64	6,25	6,28
J	0,24	0,24	0,55	0,56	1,31	1,32	2,49	2,53	4,37	4,34	6,14	6,12
K	0,25	0,25	0,57	0,57	1,37	1,38	2,60	2,61	4,60	4,61	6,48	6,38
L	0,24	0,24	0,55	0,55	1,35	1,31	2,52	2,47	4,38	4,31	6,09	6,06
M	0,19	0,20	0,55	0,55	1,34	1,31			4,68	4,67	6,52	6,54
N	0,28	0,26	0,58	0,59	1,28	1,28	2,52	2,47	4,44	4,32	6,01	6,15
O	0,19	0,25	0,57	0,57	1,39	1,39	2,63	2,64	4,66	4,66	6,57	6,57
P	0,25	0,26	0,57	0,57	1,36	1,36	2,58	2,56	4,54	4,53	6,34	6,38
Q	0,24	0,24	0,57	0,57	1,38	1,38	2,63	2,62	4,66	4,67	6,56	6,56
R	0,23	0,23	0,54	0,55	1,32	1,30	2,54	2,56	4,56	4,52	6,40	6,35
S	0,27	0,26	0,55	0,57	1,34	1,34	2,46	2,43	4,53	4,51	6,36	6,36

Tableau 4 : résultats obtenus pour une distillation de 200 ml avec volume de récupération de 100 ml.

Les résultats qui ne sont pas présentés ont été rejetés conformément aux tests de Cochran (variance aberrante) au niveau de rejet de 2,5% (test unilatéral) et de Grubbs (moyennes aberrantes) au niveau de rejet de 2,5% (test bilatéral).

Note : Les valeurs absentes n'ont pas été renseignées par le laboratoire concerné.

	Echantillon 1	Echantillon 2	Echantillon 3	Echantillon 4	Echantillon 5	Echantillon 6
Nb de laboratoires retenus	17	19	19	17	19	18
Nb de répétitions	2	2	2	2	2	2
Minimum	0,11	0,41	1,25	2,46	4,56	6,48
Maximum	0,33	0,68	1,43	2,68	4,73	6,64
Moyenne globale	0,20	0,54	1,35	2,60	4,65	6,55
Variance de répétabilité	0,00052	0,00033	0,00050	0,00019	0,00036	0,00047
Variance de reproductibilité	0,00211	0,00345	0,00190	0,00229	0,00181	0,00147
Ecartype interlaboratoire	0,043	0,057	0,041	0,047	0,040	0,035
Ecartype de répétabilité	0,02	0,02	0,02	0,01	0,02	0,02
Limite r	0,06	0,05	0,06	0,04	0,05	0,061
CV répétabilité	11,1	3,3	1,7	0,5	0,4	0,3
Ecartype de reproductibilité	0,046	0,059	0,044	0,048	0,043	0,038
Limite R	0,130	0,166	0,123	0,135	0,120	0,109
CV reproductibilité	22,5	10,9	3,2	1,8	0,9	0,6
Horwitz RSDr	3,36	2,90	2,52	2,29	2,09	1,99
Horrat r	3,3	1,1	0,7	0,2	0,2	0,2
Horwitz RSDR	5,10	4,39	3,82	3,46	3,17	3,01
Horrat R	4,4	2,5	0,8	0,5	0,3	0,2

Tableau 5: Données obtenues pour un distillat de 200 ml à partir de 200 ml d'échantillon

	Echantillon 1	Echantillon 2	Echantillon 3	Echantillon 4	Echantillon 5	Echantillon 6
Nb de laboratoires retenus	16	15	18	17	17	17
Nb de répétitions	2	2	2	2	2	2
Minimum	0,17	0,52	1,27	2,41	4,30	6,01
Maximum	0,29	0,63	1,43	2,66	4,69	6,59
Moyenne globale	0,24	0,56	1,35	2,56	4,55	6,38
Variance de répétabilité	0,00006	0,00003	0,00016	0,00050	0,00039	0,00135
Ecartype interlaboratoire	0,03209	0,02496	0,03752	0,07013	0,12167	0,17621
Variance de reproductibilité	0,001	0,001	0,001	0,005	0,015	0,031
Ecartype de répétabilité	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02	0,04
Limite r	0,02	0,02	0,04	0,06	0,06	0,104
CV répétabilité	3,2	1,0	0,9	0,9	0,4	0,6
Ecartype de reproductibilité	0,033	0,025	0,039	0,072	0,122	0,178
Limite R	0,092	0,071	0,109	0,203	0,347	0,504
CV reproductibilité	13,8	4,5	2,9	2,8	2,7	2,8
Horwitz RSDr	3,27	2,88	2,52	2,29	2,10	2,00

Horrat r	1,0	0,4	0,4	0,4	0,2	0,3
Horwitz RSDR	4,96	4,36	3,82	3,47	3,18	3,03
Horrat R	2,8	1,0	0,8	0,8	0,9	0,9

Tableau 6: Données obtenues pour un distillat de 100 ml à partir de 200 ml d'échantillon

Annexe III
Paramètres de validation relatifs à la mesure du TAV par densimétrie électronique (Partie B).

1. Essai interlaboratoires. Fidélité et exactitude sur ajout

1.1. Echantillons
Les échantillons utilisés lors de l'étude collaborative sont décrits dans le tableau 7.

Num	Nature	TAV approximatif (% vol.)
C0	Cidre (filtré sur membrane pour enlever le CO2)	~5
V0	Vin filtré	~10
V1	Vin filtré puis dopé	~11
V2	Vin filtré puis dopé	~12
V3	Vin filtré puis dopé	~13
P0	Vin de liqueur	~16

Tableau 7 : Echantillons de l'étude collaborative

Tous les échantillons sont homogénéisés avant de remplir les bouteilles envoyées aux participants. Pour le vin, 40 litres sont homogénéisés avant envoi et réalisation des ajouts.
Pour les ajouts, dans une fiole jaugée de 5 litres on verse l'éthanol absolu puis on complète au trait de jauge avec le vin filtré. Cette opération est répétée deux fois. Les volumes d'éthanol sont respectivement de 50, 100 et 150 ml pour les échantillons V1, V2 et V3.

1.2 Laboratoires participants

Les laboratoires participants à l'étude collaborative sont décrits dans le tableau 8.

Laboratoire	C.P.	Ville
ALKO Group LTD	FIN-00101	Helsinki
Bénédictine	76400	Fécamp
Casanis	18881	Gemenos
CIVC	51200	Epernay
Cointreau	49181	St Barthélémy d'Anjou
Courvoisier	16200	Jarnac
Hennessy	16100	Cognac
IDAC	44120	Vertou
Laboratoire Gendrot	33000	Bordeaux
Martell	16100	Cognac
Ricard	94320	Thiais
SOEC Martin Vialatte	51319	Epernay

Tableau 8 : liste des laboratoires participants à l'étude collaborative

Afin de ne pas introduire de biais méthodologique, les résultats de la Station Viticole du Bureau National Interprofessionnel du Cognac (organisatrice de l'étude collaborative) ne sont pas pris en compte.

1.1.1. Analyses

On a effectué deux distillations indépendantes pour les produits C0 et P0 et trois distillations indépendantes pour les produits V0, V1, V2 et V3. Pour chaque distillat trois déterminations du TAV, reportées dans le tableau de résultats, sont réalisées.

1.1.2. Résultats

La deuxième détermination des trois réalisées est retenue pour l'étude de la fidélité (tableau 9).

Laboratoire	C0	V0	V1	V2	V3	P0
1	6,020	9,500	10,390	11,290	12,100	17,080
	5,970	9,470	10,380	11,260	12,150	17,080
		9,450	10,340	11,260	12,150	
2	6,040	9,500	10,990	11,270	12,210	17,050
	6,040	9,500	10,390	11,280	12,210	17,050
		9,510	10,400	11,290	12,200	
3	5,960	9,460	10,350	11,280	12,170	17,190
	5,910	9,460	10,360	11,280	12,150	17,200
		9,450	10,340	11,260	12,170	
4	6,020	9,470	10,310	11,250	12,160	16,940
	6,020	9,450	10,350	11,250	12,120	17,070
		9,450	10,330	11,210	12,130	
	5,950	9,350	10,250	11,300	12,050	17,000

Laboratoire	C0	V0	V1	V2	V3	P0
5	5,950	9,430	10,250	11,300	12,050	17,000
		9,430	10,250	11,300	12,050	
	6,016	9,513	10,370	11,275	12,222	17,120
6	6,031	9,513	10,336	11,266	12,222	17,194
		9,505	10,386	11,275	12,220	
	5,730	9,350	10,230	11,440	12,080	17,010
7	5,730	9,430	10,220	11,090	12,030	16,920
		9,460	10,220	11,080	11,930	
	5,990	9,400	10,340	11,160	12,110	17,080
8	6,000	9,440	10,320	11,150	12,090	17,110
		9,440	10,360	11,210	12,090	
	6,031	9,508	10,428	11,289	12,180	17,089
9	6,019	9,478	10,406	11,293	12,215	17,084
		9,509	10,411	11,297	12,215	
	6,030	9,500	10,380	11,250	12,150	17,130
10	6,020	9,510	10,380	11,250	12,150	17,100
		9,510	10,380	11,250	12,160	
	6,020	9,480	10,400	11,260	12,150	17,040
11	6,000	9,470	10,390	11,260	12,140	17,000
		9,490	10,370	11,240	12,160	

Tableau 9 : Résultats (deuxième détermination par distillat) (% vol.)

1.1.3. Calcul de répétabilité et de reproductibilité

Les calculs de répétabilité et de reproductibilité sont réalisés conformément à la norme NF X 06-041, septembre 1983, ISO 5725.Le tableau 10 présente les écarts-types par cellule (laboratoire x échantillon).

Laboratoire	C0	V0	V1	V2	V3	P0
1	0,0354	0,0252	0,0265	0,0173	0,0289	0,0000
2	0,0000	0,0058	0,3436	0,0100	0,0058	0,0000
3	0,0354	0,0058	0,0100	0,0115	0,0115	0,0071

4	0,0000	0,0115	0,0200	0,0231	0,0208	0,0919
5	0,0000	0,0462	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
6	0,0106	0,0046	0,0255	0,0052	0,0012	0,0523
7	0,0000	0,0569	0,0058	0,2050	0,0764	0,0636
8	0,0071	0,0231	0,0200	0,0321	0,0115	0,0212
9	0,0085	0,0176	0,0115	0,0040	0,0202	0,0035
10	0,0071	0,0058	0,0000	0,0000	0,0058	0,0212
11	0,0141	0,0100	0,0153	0,0115	0,0100	0,0283

Tableau 10 : Table des dispersions (écart-types en % vol.)

Trois cellules présentent des dispersions fortes (Probabilité associée au test de Cochran inférieure à 1 %). Ces cellules sont représentées en grisé (tableau 10). Pour le laboratoire 7 et le produit V3, l'écart-type de 0,0764 est conservé malgré le résultat du test de Cochran car il est du même ordre de grandeur que celui observé pour le même laboratoire sur le produit V0.

L'examen des valeurs par distillat (tableau 9) conduit à éliminer :
- laboratoire 2, produit V1, la valeur 10,990, - laboratoire 7, produit V2, la valeur 11,440.

Après avoir éliminé ces deux valeurs les moyennes par cellule (laboratoire x échantillon) sont calculées (tableau 11).

Laboratoire	C0	V0	V1	V2	V3	P0
1	5,9950	9,4733	10,3700	11,2700	12,1333	17,0800
2	6,0400	9,5033	10,3950	11,2800	12,2067	17,0500
3	5,9350	9,4567	10,3500	11,2733	12,1633	17,1950
4	6,0200	9,4567	10,3300	11,2367	12,1367	17,0050
5	5,9500	9,4033	10,2500	11,3000	12,0500	17,0000
6	6,0235	9,5103	10,3640	11,2720	12,2213	17,1570
7	5,7300	9,4133	10,2233	11,0850	12,0133	16,9650
8	5,9950	9,4267	10,3400	11,1733	12,0967	17,0950
9	6,0250	9,4983	10,4150	11,2930	12,2033	17,0865
10	6,0250	9,5067	10,3800	11,2500	12,1533	17,1150
11	6,0100	9,4800	10,3867	11,2533	12,1500	17,0200

Tableau 11 : Table des moyennes (moyennes en % vol.)

Les valeurs données par le laboratoire 7 sont généralement basses (tableau 11). Dans le cas du cidre, la moyenne pour ce laboratoire est fortement éloignée de celles des autres laboratoires (Probabilité associée au test de Dixon inférieure à 1 %). Les résultats de ce laboratoire pour ce produit sont éliminés.

Le tableau 12 présente les répétabilités et reproductibilités calculées.

Echantillon	P	n	TAV	S^2r	S^2L	r	R
[1]C0	10	20	6,002	0,000298	0,001033	0,049	0,103
V0	11	33	9,466	0,000654	0,001255	0,072	0,124
V1	11	32	10,344	0,000255	0,003485	0,045	0,173
V2	11	32	11,249	0,000219	0,003113	0,042	0,163
V3	11	33	12,139	0,000722	0,003955	0,076	0,194
P0	11	22	17,070	0,001545	0,004154	0,111	0,214

Tableau 12 : Calcul des répétabilités et des reproductibilités

Légende :

p : nombre de laboratoires retenus
n : nombre de valeurs retenues
TAV : TAV moyen (% vol.)
S^2r : variance de répétabilité $(\%\ vol.)^2$
S^2L : variance interlaboratoire $(\%\ vol.)^2$
r : répétabilité (% vol.)
R : reproductibilité (% vol.)

La reproductibilité augmente avec le TAV des échantillons (figure 2). L'augmentation de la répétabilité en fonction du TAV est moins marquée, ainsi une répétabilité globale est calculée en fonction de la variance de répétabilité moyenne. Ainsi, pour des échantillons de TAV compris entre 4 et 18 % vol.,

Répétabilité (r) = 0,067 (% vol.),
Reproductibilité (R) = 0,0454 + 0,0105 x TAV.

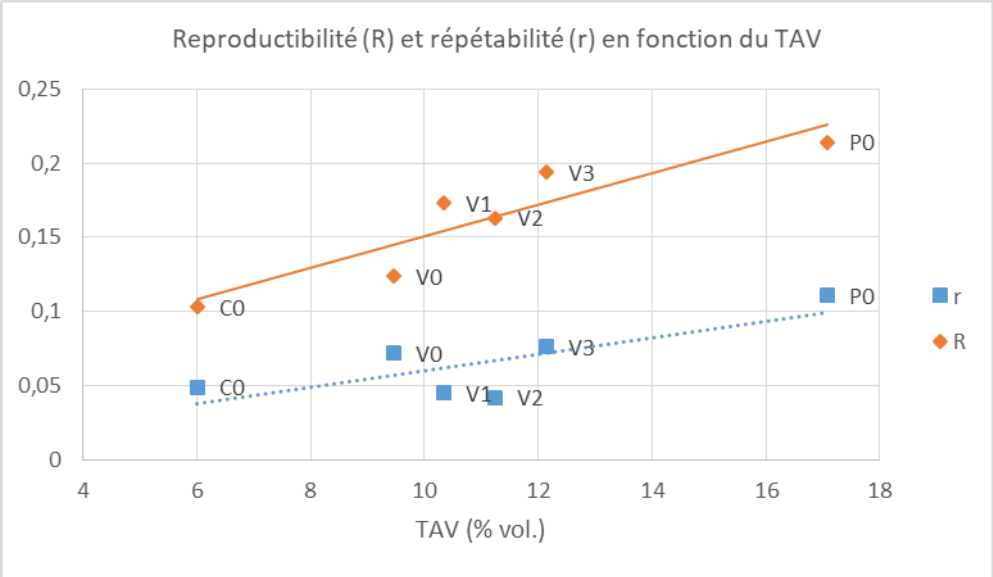


Figure 2 : Répétabilité et reproductibilité en fonction du titre alcoométrique volumique

1.1.4. Exactitude sur les ajouts réalisés sur le vin

La droite de régression du titre alcoométrique après ajout en fonction du volume d'éthanol ajouté fournit, pour un volume de 0 ml, une estimation du titre alcoométrique initial du produit (figure 3). Cette régression est réalisée avec les valeurs moyennes par laboratoire (tableau 11).

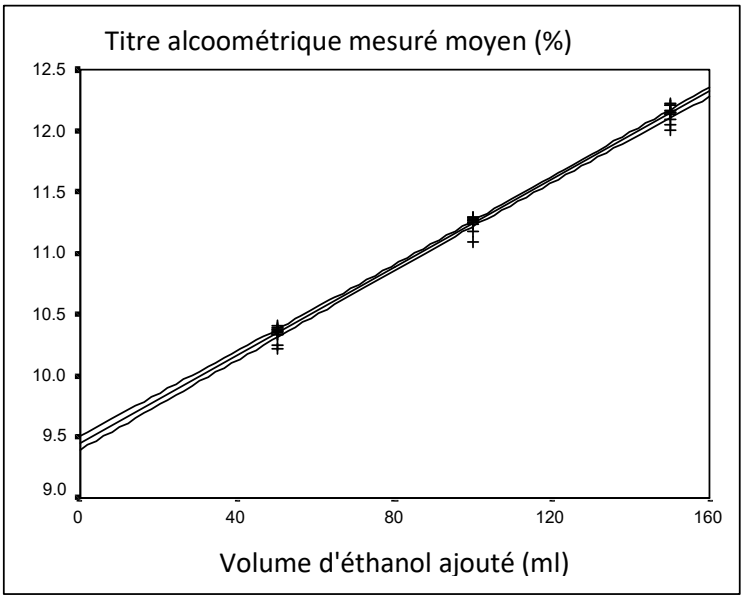


Figure 3 : Régression du TAV mesuré sur le volume d'éthanol ajouté

La mesure réalisée sur le produit initial n'intervient pas dans cette estimation. Cette estimation est comparée à la moyenne des mesures réalisées sur ce produit avant ajout, les intervalles de confiance relatifs à ces deux estimations sont calculés (tableau 13).

BI	moyenne des mesures	BS	BI	estimation avec mesures sur produits + ajouts	BS
9,440	9,466	9,492	9,392	9,450	9,508

Tableau 13 : Ajouts sur produits

Légende : BI : borne inférieure de l'intervalle de confiance à 95% BS : borne supérieure de l'intervalle de confiance à 95%

Les deux intervalles de confiance possèdent une zone de recouvrement importante. Grâce aux mesures sur les échantillons « dopés » on retrouve donc le titre alcoométrique volumique du produit initial.

1.1.5. Conclusion de l'essai interlaboratoires

Les déterminations de la répétabilité et de la reproductibilité par les essais interlaboratoires donnent les équations suivantes, pour des produits de TAV situé entre 4 et 18 % vol. :

Répétabilité (r) = 0,067 (% vol.),

Reproductibilité (R) = 0,0454 + 0,0105 x TAV (% vol.).

Les indicateurs de Horwitz, Hor et HoR sont faibles (tableau 14). Ils indiquent donc une bonne précision de la méthode par rapport au niveau d'analyte mesuré.

Echantillon	C0	V0	V1	V2	V3	P0
n	20	33	32	32	33	22
p	10	11	11	11	11	11
TAV	6,0019	9,4662	10,3443	11,2492	12,1389	17,0699
r	0,0489	0,0724	0,0452	0,0419	0,0760	0,1113
sr	0,0173	0,0256	0,0160	0,0148	0,0269	0,0393
RSDr	0,2878	0,2702	0,1543	0,1316	0,2214	0,2303
RSDrH	2,0159	1,8822	1,8573	1,8340	1,8131	1,7224
Hor	0,1428	0,1436	0,0831	0,0718	0,1221	0,1337
R	0,1033	0,1237	0,1731	0,1634	0,1935	0,2136
sR	0,0365	0,0437	0,0612	0,0577	0,0684	0,0755

RSDR	0,6080	0,4616	0,5912	0,5131	0,5634	0,4423
RSDRH	3,0543	2,8519	2,8141	2,7788	2,7471	2,6097
HoR	0,1991	0,1619	0,2101	0,1847	0,2051	0,1695

Tableau 14 : Tableau résumé sur la fidélité de la méthode

Légende :

n	: nombre de valeurs retenues
p	: nombre de laboratoires retenus
TAV	: TAV moyen (% vol.)
r	: répétabilité (% vol.)
sr	: Ecart-type de répétabilité (% vol.)
RSDr	: Coefficient de variation de répétabilité (sr x 100 / TAV) (%)
RSDrH	: Coefficient de variation de répétabilité d'Horwitz (0,66 x RSDRH) (%)
Hor	: Valeur de répétabilité d'Horrat (RSDr/RSDrH)
R	: reproductibilité (% vol.)
sR	: Ecart-type de reproductibilité (% vol.)
RSDR	: Coefficient de variation de reproductibilité (sR x 100 / TAV) (%)
RSDRH	: Coefficient de variation de reproductibilité d'Horwitz ($2^{(1-0,5\log(TAV))}$) (%)
HoR	: Valeur de reproductibilité d'Horrat (RSDR/RSDRH)

Lors des essais interlaboratoires, les mesures réalisées sur un vin avec ajouts permettent de retrouver la valeur obtenue avant ajout, on obtient respectivement les valeurs 9,45 et 9,47 % vol.

Annexe IV

Comparaison des mesures effectuées à l'aide de la balance hydrostatique (Méthode C) avec celles obtenues par densimétrie électronique (Méthode B)

A partir d'échantillons dont le titre alcoométrique est compris entre 4 % vol. et 18 % vol., il a été procédé à la mesure de la répétabilité et de la reproductibilité après un essai inter-laboratoire. Il s'agit d'une comparaison des mesures du titre alcoométrique de différents échantillons par la balance hydrostatique et par le densimètre électronique, incluant les valeurs de répétabilité et de reproductibilité dérivées des essais d'intercomparaison pluriannuels effectués sur une grande échelle.

1. *Echantillons :* Il s'agit de vins de différentes densités et titres alcoométriques préparés mensuellement à une échelle industrielle, tirés d'un stock de bouteilles conservées dans des conditions normales, et fournis de manière anonyme aux laboratoires.
2. *Laboratoires :* laboratoires participant aux essais mensuels organisés par Unione Italiana Vini Verona, Italy) d'après la réglementation ISO 5725 (UNI 9225) et le 'International Protocol of Proficiency test for chemical analysis laboratories' établi par l'AOAC, l'ISO et l'IUPAC (J. AOAC Intern., 1993, *74/4*) et d'après les lignes directrices ISO 43 and ILAC G13. Un rapport annuel est fourni par la société citée à tous les participants.
3. Appareils :
   - Une balance hydrostatique électronique (dont la précision permet de donner la 5ème décimale de la densité) et éventuellement équipée d'un appareil de traitement de données.
   - Un densimètre électronique éventuellement équipé d'un passeur automatique d'échantillon.

4. Analyses
   La mesure sur le distillat est répétée 2 fois.

5. Résultats
   Le Tableau 15 montre les résultats de mesure obtenus par les laboratoires utilisant une balance hydrostatique.
   Le Tableau 16 montre les résultats obtenus par les laboratoires utilisant un densimètre électronique.

6. Evaluation des résultats

Reproductibilité interlaboratoire

Une valeur Horrat de 1 indique normalement une reproductibilité interlaboratoire satisfaisante, alors qu'une valeur supérieure à 2 indique normalement une reproductibilité non satisfaisante, i.e. une reproductibilité trop variable pour des raisons analytiques ou quand la variation obtenue est plus élevée que celle estimée pour la méthode employée. Hor est aussi calculé et utilisé pour déterminer la reproductibilité intra-laboratoire en utilisant l'approximation suivante :
RSDr(Horwitz) = 0,66 RSDR(Horwitz) (ce qui suppose l'approximation suivante : r = 0,66 R).

Le Tableau 17 montre les différences entre les mesures obtenues par les laboratoires utilisant le densimètre électronique et ceux utilisant la balance hydrostatique. En dehors de l'échantillon 2000/3 qui a un titre alcoométrique très faible et pour lequel les deux techniques montrent une faible reproductibilité, une bonne concordance est observée pour les autres échantillons.

D.1 Paramètres de fidélité

Le Tableau 18 montre la moyenne générale des paramètres de fidélité calculée à partir de tous les essais mensuels qui se sont déroulés entre janvier 1999 et mai 2001.
En particulier :

Répétabilité (r)= 0,074 (% vol.) pour la balance hydrostatique et
0,061 (% vol.) pour la densimétrie électronique ;

Reproductibilité (R)= 0,229 (% vol.) pour la balance hydrostatique et
0,174 (% vol.) pour la densimétrie électronique,

Tableau 15 : Balance Hydrostatique (BH)

	moyenne	n	aberrants	n1	r	sr	RSDr	Hor	R	sR	RSDR	HoR	no. de	différence
1999/1	11,043	17	1	16	0,0571	0,0204	0,1846	0,1004	0,1579	0,0564	0,5107	0,18	2	0,108
1999/2	11,247	14	1	13	0,0584	0,0208	0,1854	0,1011	0,1803	0,0644	0,5727	0,21	2	0,1241
1999/3	11,946	16	0	16	0,0405	0,0145	0,1211	0,0666	0,1593	0,0569	0,4764	0,17	2	0,1108
1999/4	7,653	17	1	16	0,0502	0,0179	0,2344	0,1206	0,1537	0,0549	0,7172	0,24	2	0,1057
1999/5	11,188	17	0	17	0,0871	0,0311	0,278	0,1515	0,2701	0,0965	0,8622	0,31	2	0,186
1999/6	11,276	19	0	19	0,0846	0,0302	0,268	0,1462	0,2957	0,1056	0,9365	0,34	2	0,2047
1999/7	8,018	17	0	17	0,089	0,0318	0,3964	0,2054	0,2573	0,0919	1,1462	0,39	2	0,1764
1999/9	11,226	17	0	17	0,058	0,0207	0,1846	0,1423	0,2796	0,0999	0,8896	0,45	2	0,1956
1999/10	11,026	17	0	17	0,0606	0,0216	0,1961	0,1066	0,2651	0,0947	0,8588	0,31	2	0,185
1999/11	7,701	16	1	15	0,0643	0,0229	0,298	0,1535	0,233	0,0832	1,0805	0,37	2	0,1616
1999/12	10,987	17	2	15	0,0655	0,0234	0,2128	0,1156	0,1258	0,0449	0,4089	0,15	2	0,0827
2000/1	11,313	16	0	16	0,0986	0,0352	0,3113	0,1699	0,2577	0,092	0,8135	0,29	2	0,1754
2000/2	11,232	17	0	17	0,0859	0,0307	0,2731	0,1489	0,2535	0,0905	0,806	0,29	2	0,174
2000/3	0,679	10	0	10	0,068	0,0243	3,5773	1,2783	0,6529	0,2332	34,3395	8,1	2	0,4604
2000/4	11,223	18	0	18	0,0709	0,0253	0,2257	0,123	0,2184	0,078	0,6951	0,25	2	0,1503
2000/5	7,439	19	1	18	0,063	0,0225	0,3023	0,1549	0,1522	0,0544	0,7307	0,25	2	0,1029
2000/6	11,181	19	0	19	0,0536	0,0191	0,171	0,0932	0,2783	0,0994	0,889	0,32	2	0,195
2000/7	10,858	16	0	16	0,0526	0,0188	0,1731	0,0939	0,1827	0,0653	0,6011	0,22	2	0,1265
2000/9	12,031	17	1	16	0,0602	0,0215	0,1787	0,0985	0,2447	0,0874	0,7263	0,26	2	0,1704
2000/10	11,374	18	0	18	0,0814	0,0291	0,2555	0,1395	0,2701	0,0965	0,8482	0,31	2	0,1866
2000/11	7,644	18	0	18	0,0827	0,0295	0,3863	0,1988	0,2289	0,0817	1,0694	0,36	2	0,1565
2000/12	11,314	19	1	18	0,0775	0,0277	0,2447	0,1336	0,2421	0,0864	0,7641	0,28	2	0,1667
2001/1	11,415	19	0	19	0,095	0,0339	0,2971	0,1623	0,241	0,0861	0,7539	0,27	2	0,1636
2001/2	11,347	19	0	19	0,0792	0,0283	0,2493	0,1361	0,1944	0,0694	0,6119	0,22	2	0,1316
2001/3	11,818	16	0	16	0,0659	0,0235	0,199	0,1093	0,2636	0,0941	0,7965	0,29	2	0,1834
2001/4	11,331	17	0	17	0,1067	0,0381	0,3364	0,1836	0,1895	0,0677	0,5971	0,22	2	0,1229
2001/5	8,063	19	1	18	0,0782	0,0279	0,3465	0,1797	0,1906	0,0681	0,8442	0,29	2	0,129

Tableau 16: Densimétrie électronique (DE)

	AVG n1	n	aberrants	n1	r	sr	RSDr	Hor	R	sR	RSDR	HoR	no. de	différence
D1999/1	11,019	18	1	17	0,0677	0,0242	0,2196	0,1193	0,1996	0,0713	0,6470	0,23	2	0,1370
D1999/2	11,245	19	2	17	0,0448	0,0160	0,1423	0,0776	0,1311	0,0468	0,4165	0,15	2	0,0900
D1999/3	11,967	21	0	21	0,0701	0,0250	0,2091	0,1151	0,1552	0,0554	0,4631	0,17	2	0,1040
D1999/4	7,643	19	1	18	0,0610	0,0218	0,2852	0,1467	0,1340	0,0479	0,6262	0,21	2	0,0897
D1999/5	11,188	21	3	18	0,0260	0,0093	0,0829	0,0452	0,2047	0,0731	0,6536	0,24	2	0,1442
D1999/6	11,303	21	0	21	0,0652	0,0233	0,2061	0,1125	0,1466	0,0523	0,4631	0,17	2	0,0984
D1999/7	8,026	21	0	21	0,0884	0,0316	0,3935	0,2039	0,1708	0,0610	0,7600	0,26	2	0,1124
D1999/9	11,225	17	0	17	0,0372	0,0133	0,1183	0,0645	0,1686	0,0602	0,5366	0,19	2	0,1178
D1999/10	11,011	19	0	19	0,0915	0,0327	0,2969	0,1613	0,1723	0,0615	0,5588	0,20	2	0,1129
D1999/11	7,648	21	1	20	0,0615	0,0220	0,2872	0,1478	0,1538	0,0549	0,7183	0,24	2	0,1043
D1999/12	10,999	16	1	15	0,0428	0,0153	0,1389	0,0755	0,2015	0,0720	0,6541	0,23	2	0,1408
D2000/1	11,248	22	1	21	0,0697	0,0249	0,2212	0,1206	0,1422	0,0508	0,4516	0,16	2	0,0944
D2000/2	11,240	19	3	16	0,0448	0,0160	0,1424	0,0776	0,1619	0,0578	0,5145	0,19	2	0,1123
D2000/3	0,526	12	1	11	0,0327	0,0117	2,2185	0,7630	0,9344	0,3337	63,4009	14,39	2	0,6605
D2000/4	11,225	19	1	18	0,0476	0,0170	0,1514	0,0825	0,1350	0,0482	0,4295	0,15	2	0,0924
D2000/5	7,423	21	0	21	0,0628	0,0224	0,3019	0,1547	0,2635	0,0941	1,2677	0,43	2	0,1836
D2000/6	11,175	23	2	21	0,0606	0,0217	0,1938	0,1056	0,1697	0,0606	0,5424	0,20	2	0,1161
D2000/7	10,845	21	5	16	0,0440	0,0157	0,1449	0,0786	0,1447	0,0517	0,4766	0,17	2	0,0999
D2000/9	11,983	22	1	21	0,0841	0,0300	0,2507	0,1380	0,2410	0,0861	0,7183	0,26	2	0,1651
D2000/10	11,356	22	1	21	0,0635	0,0227	0,1997	0,1090	0,1865	0,0666	0,5866	0,21	2	0,1280
D2000/11	7,601	27	0	27	0,0521	0,0186	0,2448	0,1258	0,1685	0,0602	0,7916	0,27	2	0,1162
D2000/12	11,322	25	1	24	0,0476	0,0170	0,1503	0,0820	0,1594	0,0569	0,5028	0,18	2	0,1102
D2001/1	11,427	29	0	29	0,0706	0,0252	0,2207	0,1206	0,1526	0,0545	0,4771	0,17	2	0,1020
D2001/2	11,320	29	1	28	0,0675	0,0241	0,2128	0,1161	0,1570	0,0561	0,4952	0,18	2	0,1057
D2001/3	11,826	34	1	33	0,0489	0,0175	0,1476	0,0811	0,1762	0,0629	0,5322	0,19	2	0,1222
D2001/4	11,339	31	2	29	0,0639	0,0228	0,2012	0,1099	0,1520	0,0543	0,4788	0,17	2	0,1026
D2001/5	8,058	28	0	28	0,0473	0,0169	0,2098	0,1088	0,2025	0,0723	0,8976	0,31	2	0,1412

Tableau 17: Comparaison des résultats entre la balance hydrostatique (BH) et la densimétrie électronique (DE)

	Moyenne (BH)	n	Valeurs	n1		Moyenne (DE)	n	Valeurs	n1	%TAV(BH-DE)
1999/1	11,043	17	1	16	D1999/1	11,019	18	1	17	0,024

1999/2	11,247	14	1	13	D1999/2	11,245	19	2	17	0,002
1999/3	11,946	16	0	16	D1999/3	11,967	21	0	21	-0,021
1999/4	7,653	17	1	16	D1999/4	7,643	19	1	18	0,010
1999/5	11,188	17	0	17	D1999/5	11,188	21	3	18	0,000
1999/6	11,276	19	0	19	D1999/6	11,303	21	0	21	-0,028
1999/7	8,018	17	0	17	D1999/7	8,026	21	0	21	-0,008
1999/9	11,226	17	0	17	D1999/9	11,225	17	0	17	0,002
1999/10	11,026	17	0	17	D1999/10	11,011	19	0	19	0,015
1999/11	7,701	16	1	15	D1999/11	7,648	21	1	20	0,052
1999/12	10,987	17	2	15	D1999/12	10,999	16	1	15	-0,013
2000/1	11,313	16	0	16	D2000/1	11,248	22	1	21	0,065
2000/2	11,232	17	0	17	D2000/2	11,240	19	3	16	-0,008
2000/3	0,679	10	0	10	D2000/3	0,526	12	1	11	• 0,153
2000/4	11,223	18	0	18	D2000/4	11,225	19	1	18	-0,002
2000/5	7,439	19	1	18	D2000/5	7,423	21	0	21	0,016
2000/6	11,181	19	0	19	D2000/6	11,175	23	2	21	0,006
2000/7	10,858	16	0	16	D2000/7	10,845	21	5	16	0,013
2000/9	12,031	17	1	16	D2000/9	11,983	22	1	21	0,049
2000/10	11,374	18	0	18	D2000/10	11,356	22	1	21	0,018
2000/11	7,644	18	0	18	D2000/11	7,601	27	0	27	0,043
2000/12	11,314	19	1	18	D2000/12	11,322	25	1	24	-0,008
2001/1	11,415	19	0	19	D2001/1	11,427	29	0	29	-0,012
2001/2	11,347	19	0	19	D2001/2	11,320	29	1	28	0,027
2001/3	11,818	16	0	16	D2001/3	11,826	34	1	33	-0,008
2001/4	11,331	17	0	17	D2001/4	11,339	31	2	29	-0,008
2001/5	8,063	19	1	18	D2001/5	8,058	28	0	28	0,004
					Différence générale / % TAV (BH-DE)					0,014
					Ecart type/différence					0,036
				*	Essai 2000/3 n'est pas pris en compte					

Tableau 18: Paramètres de fidélité

MOYENNE	Balance hydrostatique	Densimétrie électronique
n1	441	557
variance relative de répétabilité	0,309	0,267
r	0,074	0,061
sr	0,026	0,022
variance relative de reproductibilité	2,948	2,150
R	0,229	0,174
sR	0,082	0,062

8 Bibliographie

- Distillation:

HANAK A., *Chem. Zgt.,* 1932. **56.** 984.
COLOMBIER L., CLAIR E., *Ann. Fals. Fraudes.* 1936. **29.** 411.
POZZI-ESCOT E., *Ind. Agr. Aliment.,* 1949. **66.** 119.
JAULMES P., *Analyse des vins.* 1951. 49.
SCHNEYDER J., Mitt. Klosterneuburg. Rebe und Wein. 1960. **10.** 228.
SCHNEYDER J., KASCHNITZ L., *Mitt. Klosterneuburg. Rebe und Wein.* 1965. **15.** 132.

- Pycnométrie:

JAULMES P., *Analyse des vins.* 1951. 67.
JAULMES P., Trav. Soc. Pharm. Montpellier. 1952. **12.** 154.
JAULMES P., *Ann. Fals. Fraudes.* 1953. **46.** 84; 1954. **47.** 191.
JAULMES P., CORDIER Mlle S., *Trav. Soc. Pharm. Montpellier.* 1956. **16.** 115; 1960. **20.** 137.
JAULMES P., BRUN Mme S., *Ann. Fals. Exp. Chim.,* 1963. **56.** 129.

Balance hydrostatique

F.V. n. 1096; Cabanis Marie-Thérèse., Cassanas Geneviève, Raffy Joëlle,

Cabanis J.C., 1999: Validation de la mesure du titre alcoométrique volumique;

Cabanis Marie-Thérèse., Cassanas Geneviève, Raffy Joëlle, Cabanis J.C., 1999: Intérêt de la balance hydrostatique "nouvelle génération" pour la détermination du titre alcoométrique des vins et des boissons spiritueuses. Rev. Franç. Œnol., 177/juillet-août, 28-31;

Versini G., Larcher R., 2002: Comparison of wine density and alcoholic strength measurement by hydrostatic balance and electronic density–meter. Communication at the OIV Sub-commission of analytical methods, Paris, 1315 March 2002

OIV, Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts, Tables ?? par ex.

Office International de la Vigne et du Vin; Paris;

'International Protocol of Proficiency test for chemical analysis laboratories'., J. AOAC Intern., 1993, 74/4

normes ISO 5725 et guides ISO 43;

OIV Resolution OENO 6/1999;

Horwitz W., 1995. Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies, Pure and Applied Chemistry, 67/2, 331-343.

- Réfractométrie:

NEWTON W., MURNO F.L., Can. Chem. Met., 1933. 17. 119.

SAMPIETRO C., INVERNIZZI I., Ann. Chem. Appl., 1940. 30. 381.

FISCHL P.F., Food Manufacture. 1942. 17. 198.

JAULMES P., LAVAL J.P., Trav. Soc. Pharm. Montpellier. 1961. 21. 21. JAULMES P., BRUN Mme S., LAVAL J.P., Ann. Fals. Exp. Chim., 1965. 58. 304; Bull. Union National. OEnologues. 1964. 13. 17.

- Tables alcoométriques:

TABLES ALCOOMETRIQUES FRANCAISES. *J.O. Républ. française.* 30 déc. 1884. 6895.

OIML, Organisation Internationale de Métrologie Légale, R22:1973, Tables alcoométriques internationales

WINDISCH K.d'après LUNGE G., BERL E., *Chem. techn. Untersuchungs Methoden.*

Berlin 1924. 7e éd., 1893. **4.** 274.

OSBORNE N.S., MCKELVY E.C., BEARCE H.W., *Bull. Bur. of Standards.* Washington. 1913. **9.** 328.

FROST A.V., Recherches dans le domaine du poids spécifique des mélanges d'alcool éthylique et d'eau. Institut des réactifs chimiques purs. U.R.S.S., 1930. No. 9. d'après

J. SPAEPEN.

HEIDE C. von der. MANDLEN H., *Z. Untersuch. Lebensm.,* 1933. **66.** 338.

KOYALOVICS B., 8e Conférence générale des Poids et Mesures. Moscou 1933.

FERTMANN G.I., Tables de renseignements pour le contrôle de la fabrication de l'alcool.

Pischerpoomizdat. Moscou 1940.

REICHARD O., *Neue Alkohol u. Extract., Tafel 20°/20°*. Verlag Hans Carl. Nürnberg 1951.

JAULMES P., MARIGNAN R., *Ann. Fals. Fraudes.* 1953. **46.** 208 et 336.

SPAEPEN J., Rev. de Métrologie. 1955. 411; Bull. belge de Métrologie. 1955. numéro d'avril.

JAULMES P., BRUN Mme S., *Ann. Fals. Exp. Chim.,* 1963. **46.** 143; 1965. **48.** 58; 1966. **49.** 35; 1967. **50.** 101-147; *Trav. Soc. Pharm. Montpellier.* 1966. **26.** 37 et 111.

JAULMES P., MARIGNAN R., *Bull. O.I.V.,* 1953. **274.** 28. 32.

JAULMES P., BRUN Mme S., TEP Y., *Trav. Soc. Pharm.,* 1968. **28.** 111.

KAWASAKI T., MINOVA Z., INAMATSU T., A new alcohometric specific gravity table.

National Research of Metrology. Tokio 1967.

TEP Y., Etude d'une table alcoométrique internationale. Thèse Doc. Pharm. Montpellier. 1968.

TABLE I

Titre alcoométrique international à 20°C

Table des masses volumiques apparentes des mélanges hydroalcooliques – <u>Pycnomètre en pyrex</u>

Masses volumiques à *t*°C, corrigés de la poussée de l'air

	Titre alcoométrique volumique en %																							
t°	**0**		**1**		**2**		**3**		**4**		**5**		**6**		**7**		**8**		**9**		**10**		**11**	
0°	999.64	1.50	998.14	1.44	996.70	1.40	995.30	1.35	993.95	1.30	992.65	1.24	991.41	1.19	990.22	1.14	989.08	1.10	987.98	1.05	986.93	1.00	985.93	0.95
	-0.07		-0.06		-0.06		-0.06		-0.06		-0.06		-0.06		-0.05		-0.04		-0.03		-0.02		-0.01	
1°	999.71	1.51	998.20	1.44	996.76	1.40	995.36	1.35	994.01	1.30	992.71	1.24	991.47	1.20	990.27	1.15	989:12	1.11	988.01	1.06	986.95	1.01	985.94	0.97
	-0.05		-0.05		-0.04		-0.04		-0.04		-0.04		-0.03		-0.03		-0.02		-0.02		-0.01		0.00	
2°	999.76	1.51	998.25	1.45	996.80	1.40	995.40	1.35	994.05	1.30	992.75	1.25	99150	1.20	990.30	1.16	989.14	1.11	988.03	1.07	986.96	1.02	985.94	0.98
	-0.03		-0.03		4.03		-0.02		-0.02		-0.02		-0.02		-0.01		-0.01		0.00		0.01		0.02	
3°	999.79	1.51	998.28	1.45	996.83	1.41	995.42	1.35	994.07	1.30	992.77	1.25	991.52	1.21	990.31	1.16	989.15	1.12	988.03	1.08	986.95	1.03	985.92	1.00
	-0.02		-0.02		-0.01		-0.02		-0.01		-0.01		0.00		0.00		0.01		0.02		0.03		0.04	
4°	999.81	1.51	998.30	1.46	996.84	1.40	995.44	1.36	994.08	1.30	992.78	1.26	991.52	1.21	990.31	1.17	989.14	1.13	988:01	1.09	986.92	1.04	985.88	1.00
	0.00		0.00		0.00		0.00		0.01		0.02		0.02		0.02		0.02		0.03		0.04		0.05	
5°	999.81	1.51	998.30	1.46	996.84	1.40	995.44	1.37	994.07	1.31	992.76	1.26	991.50	1.21	990.29	1.17	989.12	1.14	987.98	1.10	986.88	1.05	985.83	1.01
	0,01		0,01		0,01		0,02		0,01		0,02		0,03		0,04		0,05		0,05		0,05		0,06	
6°	999.80	1.51	998.29	1.46	996.83	1.41	995.42	1.36	994.06	1.32	992.74	1.27	991.47	1.22	990.25	1.18	989:07	1.14	987.93	1.10	986.83	1.06	985.77	1.03
	0.03		0.03		0.03		0.03		0.04		0.04		0.04		0.05		0.06		0.07		0.08		0.09	
7°	999.77	1.51	998.26	1.46	996.80	1.41	995.39	1.37	994.02	1.32	99270	1.27	99143	1.23	99020	1.19	989.01	1.15	987:86	1.11	986.75	1.07	985.68	1.03
	0.05		0.04		0.04		0.05		0.05		0.05		0.05		0.06		0.06		0.07		0.08		0.09	
8°	999.72	1.50	998.22	1.46	996.76	1.42	995.34	1.37	993.97	1.32	992.65	1.27	991.38	1.24	990.14	1.19	988.95	1.16	987.79	1.12	986.67	1.08	985.59	1.05
	0.05		0.06		0.06		0.06		0.06		0.06		0.07		0.07		0.08		0.09		0.10		0.11	
9°	999.67	1.51	998.16	1.46	996.70	1.42	995.28	1.37	993.91	1.32	992:59	1.28	99131	1.24	990.07	1.20	988.87	1.17	987.70	1.13	986.57	1.09	985.48	1.06
	0.07		0.07		0.07		0.07		0.07		0.08		0.08		0.09		0.09		0.10		0.11		0.12	
10°	999.60	1.51	998.09	1.46	996.63	1.42	995.21	1.37	993.84	1.33	992.51	1.28	991.23	1.25	989.98	1.20	988.78	1.17	987.60	1.14	986.46	1.10	985.36	1.06
	0.09		0.09		0.09		0.08		0.09		0.09		0.10		0.10		0.11		0.11		0.12		0.13	
11°	999.51	1.51	998.00	1.46	996.54	1.41	995.13	1.38	993.75	1.33	992.42	1.29	991.13	1.25	989.88	1.21	988.67	1.18	987.49	1.15	986.34	1.11	985.23	1.07
	0.10		0.09		0.09		0.10		0.10		0.11		0.11		0.11		0.12		0.13		0.13		0.14	
12°	999.41	1.50	997.91	1.46	996.45	1.42	995.03	1.38	993.65	1.34	992.31	1.29	991.02	1.25	989.77	1.22	988.55	1.19	987.36	1.15	986.21	1.12	98.509	1.09
	0.11		0.11		0.11		0.11		0.11		0.11		0.12		0.12		0.13		0.14		0.15		0.16	
13°	999.30	1.50	997.80	1.46	996.34	1.42	994.92	1.38	993.54	1.34	992.20	1.30	990.90	1.25	989.65	1.23	988.42	1.20	987.22	1.16	986.06	1.13	984.93	1.09
	0.12		0.12		0.13		0.13		0.13		0.13		0.14		0.14		0.15		0.16		0.16		0.16	
14°	999.18	1.50	997.68	1.46	996.22	1.43	994.79	1.38	993.41	1.34	992.07	1.30	990.77	1.26	989.51	1.23	988.28	1.21	987.07	1.17	985.90	1.13	984.77	1.11
	0.14		0.14		0.13		0.13		0.14		0.14		0.15		0.16		0.16		0.17		0.18		0.18	
15°	999.05	1.51	997.54	1.46	996.08	1.42	994.66	1.38	993.28	1.35	991.93	1.30	990.63	1.27	989.36	1.24	988.12	1.21	986.91	1.18	985.73	1.14	984.59	1.12
	0.14		0.14		0.15		0.15		0.15		0.16		0.16		0.17		0.17		0.18		0.19		0.19	
16°	998.90	1.50	997.40	1.46	995.94	1.43	994.51	1.38	993.13	1.35	991.78	1.31	990.47	1.27	989.20	1.25	987.95	1.21	986.74	1.19	985.55	1.15	984.40	1.13
	0.16		0.16		0.16		0.16		0.17		017		0.18		0.18		0.19		0.19		0.20		0.20	
17°	998.74	1.50	997.24	1.46	995.78	1.43	994.35	1.38	992.97	1.36	991.61	1.31	990.30	1.28	989.02	1.25	987.17	1.22	986.55	1.19	985.36	1.16	984.20	1.14
	0.17		0.17		0.16		0.17		0.17		0.18		0.18		0.19		0.20		0.21		0.22		0.22	
18°	998.57	1.50	997.07	1.46	995.61	1.42	994.19	1.39	992.80	1.36	991.44	1.32	990.12	1.28	988.84	1.26	987.58	1.23	986.35	1.20	985.15	1.17	983.98	1.14
	0.18		0.18		0.19		0.19		0.19		0.19		0.20		0.20		0.20		0.21		0.21		0.22	
19°	998.39	1.50	996.89	1.46	995.43	1.43	994.00	1.39	992.61	1.36	991.25	1.32	989.93	1.29	988.64	1.26	987.38	1.23	986.15	1.21	984.94	1.10	983.76	1.16
	0.19		0.19		0.19		0.19		0.19		0.20		0.20		0.21		0.22		0.23		0.24		0.24	
20°	998.20	1.50	996.70	1.46	995.24	1.43	993.81	1.39	992.42	1.36	991.06	1.33	989.73	1.29	988.44	1.27	987.17	1.24	985.93	1.22	984.71	1.19	983.52	1.16

TABLE I (suite)

Titre alcoométrique international à 20°C

Table des masses volumiques apparentes des mélanges hydroalcooliques – Pycnomètre en pyrex

Masses volumiques à *t*°C, corrigés de la poussée de l'air

	Titre alcoométrique volumique en %																							
t°	**0**		**1**		**2**		**3**		**4**		**5**		**6**		**7**		**8**		**9**		**10**		**11**	
20°	998,20	1,50	996,70	1,46	995,24	1,43	993,81	1,39	992,42	1,36	991,06	1,33	989,73	1,29	988,44	1,27	987,17	1,24	985,93	1,22	984,71	1,19	983,52	1,16
	0,20		0,20		0,20		0,20		0,21		0,21		0,21		0,22		0,22		0,23		0,24		0,24	
21°	998.00	1.50	996.50	1.46	995.04	1.43	993.61	1.40	992.21	1.36	990.85	1.33	989.52	1.30	988.22	1.27	986.95	1.25	985.70	1.23	984.47	1.19	983.28	1.18
	0.21		0.21		0.21		0.21		0.21		0.22		0.22		0.23		0.24		0.24		0.24		0.26	
22°	997.79	1.50	996.29	1.46	994.83	1.43	993.40	1.40	992.00	1.37	990.63	1.33	989.30	1.31	987.99	1.28	986.71	1.25	985.46	1.23	984.23	1.21	983.02	1.18
	0.22		0.22		023		0.23		0.23		0.23		0.24		0.24		0.24		0.25		0.26		0.25	
23°	997.57	1.50	996.07	1.47	994.60	1.43	993.17	1.40	991.77	1.37	990.40	1.34	989.06	1.31	987.75	1.28	986.47	1.26	985.21	1.24	983.97	1.20	982.77	1.20
	0.24		0.23		0.23		0.23		0.24		0.24		0.24		0.25		0.26		0.26		0.27		0.29	
24°	997.33	1.49	995.94	1.47	994.37	1.43	992.94	1.41	991.53	1.37	990.16	1.34	988.82	1.32.	987.50	1.29	986.21	1.26	984.95	1.25	983.70	1.22	982.48	1.20
	0.24		0.25		0.24		0.25		0.24		0.25		0.26		0.26		0.26		0.27		0.28		0.28	
25°	997.09	1.50	995.59	1.46	994.13	1.44	992.69	1.40	991.29	1.38	989.91	1.35	988.56	1.32	987.24	1.29	985.95	1.27	984.68	1.26	983.42	1.22	982.20	1.21
	0,25		0,25		0,26		0,25		0,26		0,26		0,26		0,26		0,28		0,28		0,28		0,30	
26°	996.84	1.50	995.34	1.47	993.87	1.43	992.44	1.41	991.03	1.38	989.65	1.35	988.30	1.32	986.98	1.31	985.67	1.27	984.40	1.26	983.14	1.24	981.90	1.22
	0.26		0.26		0.26		0.27		0.27		0.27		0.27		0.28		0.28		0.29		0.30		0.30	
27°	996.58	1.50	995.68	1.47	993.61	1.44	992.17	1.41	990.76	1.38	989.38	1. 35	988.03	1.33	986.70	1.31	985.39	1.28	984.11	1.27	982.84	1.24	981.60	1.23
	0.27		0.27		0.27		0.27		0.28		0.28		0.29		0.29		0.29		0.30		0.31		0.32	
28°	996.31	1.50	994.81	1.47	993.34	1.44	991.90	1.42	990.48	1.38	989.10	1.36	987.74	1.33	986.41	1.31	985.10	1.29	983.81	1.28	982.53	1.25	981.28	1.23
	0.28		0.28		0.28		0.29		0.28		0.29		0.29		0.30		0.31		0.31		0.31		0.32	
29°	996.03	1.50	994.53	1.47	993.06	1.45	991.61	1.41	990.20	1.39	988.81	1.36	987.45	1.34	986.11	1.32	984.79	1.29	983.50	1.28	982.22	1.26	980.96	1.24
	0.28		0.29		0.29		0.29		0.30		0.30		0.31		0.31		0.31		0.32		0.32		0.33	
30°	995.75	1,51	994,24	1,47	992,77	1,45	991,32	1,42	989,90	1,39	988,51	1,37	987,14	1,34	985,80	1,32	984,48	1,30	983,18	1,28	981,90	1,27	980,63	1,25
	0,30		0,30		0,30		0,30		0,31		0,31		0,31		0,31		0,32		0,33		0,34		0,34	
31°	995.45	1.51	993.94	1.47	992.47	1.45	991.02	1.43	989.59	1.39	988.20	1.37	986.83	1.34	985.49	1.33	984.16	1.31	982.85	1.29	981.56	1.27	980.29	1.26
	0.31		0.31		0.31		0.32		0.31		0.32		0.32		0.33		0.33		0.34		0.35		0.36	
30°	995.14	1.51	993.63	1.47	992.16	1.46	990.70	1.42	989.28	1.40	987.88	1.37	986.51	1.35	985.16	1.33	983.83	1.32	982.51	1.30	981.21	1.28	979.93	1.26
	0.31		0.31		0.32		0.32		0.32		0.33		0.33		0.34		0.35		0.35		0.35		0.35	
33°	994.93	1.51	993.32	1.48	991.84	1.46	990.38	1.42	988.96	1.41	987.55	1.37	986.18	1.36	984.82	1.34	983.48	1.32	982.16	1.30	980.86	1.28	979.58	1.28
	0.32		0.33		0.33		0.33		0.35		0.34		0.35		0.35		0.34		0.35		0.36		0.37	
34°	994.51	1.52	992.99	1.48	991.51	1.46	990.05	1.44	988.61	1.40	987.21	1.38	985.83	1.36	984.47	1.33	983.14	1.33	981.81	1.31	980.50	1.29	979.21	1.28
	0.33		0.33		0.34		0.35		0.34		0.35		0.35		0.35		0.36		0.36		0.36		0.37	
35°	994.18	1.52	992.66	1.49	991.17	1.47	989.70	1.43	988.27	1.41	986.86	1.38	985.48	1.36	984.12	1.34	982.78	1.33	981.45	1.31	980.14	1.30	978.84	1.29
	0.34		0.35		0.35		0.35		0.35		0.35		0.35		0.36		0.36		0.37		0.37		0.38	
36°	993.84	1.53	992.31	1.49	990.82	1.47	989.35	1.43	987.92	1.41	986.51	1.38	985.13	1.37	983.76	1.34	982.42	1.34	981.08	1.31	979.77	1.31	978.46	1.29
	0.35		0.35		0.36		0.35		0.36		0.36		0.37		0.37		0.38		0.37		0.39		0.39	
37°	993.49	1.53	991.96	1.50	990.46	1.46	989.00	1.44	987.56	1.41	986.15	1.39	984.76	1.37	983.39	1.35	982.04	1.33	980.71	1.33	97938	1.31	978.07	1.30
	0.36		0.36		0.36		0.37		0.37		0.37		0.37		0.37		0.38		0.39		0.38		0.39	
38°	993.13	1.53	991.60	1.50	990.10	1.47	988.63	1.44	987.19	1.41	985.78	1.39	984.39	1.37	983.02	1.36	981.66	1.34	980.32	1.32	979.00	1.32	977.68	1.31
	0.36		0.37		0.37		0.37		0.38		0.38		0.38		0.39		0.38		0.39		0.40		0.40	
39°	992.77	1.54	991.23	1.50	989.73	1.47	988.26	1.45	986.81	1.41	985.40	1.39	994.01	1.38	982.63	1.35	981.28	1. 35	979.93	1.33	978.60	1.32	977.28	1.32
	0.37		0.37		0.38		0.39		0.38		0.39		0.39		0.39		0.40		0.39		0.40		0.41	
40[0]	992,40	1,54	990,86	1,51	989,35	1,48	987,87	1,44	986,43	1,42	985,01	1,39	983,62	1,38	982,24	1,36	980,88	1,34	979,54	1,34	978,20	1,33	976,87	1,32

TABLE I (suite)

Titre alcoométrique international à 20°C

Table des masses volumiques apparentes des mélanges hydroalcooliques – Pycnomètre en pyrex

Masses volumiques à *t*°C, corrigés de la poussée de l'air

	Titre alcoométrique volumique en %																							
t°	10		11		12		13		14		15		16		17		18		19		20		21	
0	986,93	1,00	985,93	0,95	984,98	0,92	984,06	0,88	983,18	0,84	982,34	0,80	981,54	0,78	980,76	0,75	980,01	0,73	979,28	0,72	978,56	0,70	977,86	0,70
1	-0,02 986,95	1,01	-0,01 995,94	0,97	0,01 984,97	0,92	0,01 984,05	0,90	0,03 983,15	0,85	0,04 982,30	0,83	0,07 981,47	0,79	0,08 980,68	0,77	0,10 979,91	0,75	0,12 979,16	0,74	0,14 978,42	0,73	0,17 977,69	0,72
2	-0,01 986,96	1,02	0,00 985,94	0,98	0,01 984,96	0,94	0,03 984,02	0,91	0,04 983,11	0,98	0,07 982,23	0,84	0,08 981,39	0,81	0,10 980,58	0,79	0,12 979,79	0,77	0,14 979,02	0,76	0,16 978,26	0,75	0,18 977,51	0,74,
3	0,01 986 95	1,03	0,02 985,92	1,00	0,04 984,92	0,95	0,05 983,97	0,92	0,06 983,05	0,89	0,07 982,16	0,86	0,09 981,30	0,83	0,11 980,47	0,81	0,13 979,66	0,79	0,15 978,87	0,78	0,17 978,09	0,77	0,19 977,32	0,77
4	0,03 986 92	1,04	0,04 985,88	1,00	0,04 984,88	0,97	0,06 983,91	0,93	0,07 982,98	0,91	0,09 982,07	0,87	0,10 981,20	0,85	0,12 980,35	0,83	0,14 979,52	0,81	0,16 978,71	0,80	0,18 977,91	0,79	0,20 977,12	0,79
5	0,04 986,88	1,05	0,05 985,83,	1,01	0,06 984,82	0,98	0,06 983,84	0,95	0,09 982,89	0,92	0,10 981,97	0,89	0,12 981,08	0,87	0,14 980,21	0,84	0,15 979,37	0,83	0,17 978,54	0,82	0,19 977,72	0,82	0,22 976 90	0,80
6	0,05 986,93	1,06	0,06 985,77	1,03	0,08 984,74	0,99	0,09 983,75	0,96	0,10 982,79	0,94	0,12 981,85	0,90	0,13 980,95	0,88	0,14 980,07	0,87	0,17 979,20	0,85	0,19 978,35	0,84	0,21 977,51	0,83	0,22 976,68	0,83
7	0,08 986,75	1,07	0,09 995,68	1,03	0,09 984,65	1,00	0,10 983,65	0,98	0,12 982,67	0,95	0,13 981,72	0,92	0,15 980,80	0,89	0,16 979,91	0,89	0,18 979,02	0,86	0,19 978,16	0,86	0,21 977,30	0,85	0,23 976,45	0,85
8	0,08 986,67	1,08	0,09 985,59	1,05	0,11 984,54	1,02	0,13 983,52	0,98	0,13 982,54	0,96	0,14 981,58	0,93	0,15 980,65	0,92	0,18 979,73	0,90	0,19 978,83	0,88	0,21 977,95	0,88	0,23 977,07	0,87	0,25 976,20	0,87
9	0,10 986,57	1,09	0 11 985,48	1,06	0,12 984,42	1,02	0,12 983,40	1,00	0,14 982,40	0,98	0,16 981,42	0,95	0,18 980,47	0,93	0,19 979,54	0,92	0,21 978,62	0,89	0,22 977,73	0,90	0,24 976,83	0,89	0,26 975,94	0,89
10	0,11 986,46	1,10	0,12 985,36	1,06	0,12 984,30	1,04	0,14 983,26	1,02	0,16 982,24	0,99	0,17 981,25	0,96	0,18 980,29	0,95	0,20 979,34	0,92	0,20 978,42	0,92	0,23 977,50	0,91	0,24 976,59	0,91	0,26 975,68	0,91
11	0,12 986,34	1,11	0,13 985,23	1,07	0,14 984,16	1,06	0,16 983,10	1,02	0,16 982,08	1,00	0,17 981,08	0,98	0,19 980,10	0,96	0,20 979,14	0,95	0,23 978,19	0,94	0,25 977,25	0,93	0,27 976,32	0,93	0,29 975,39	0,92
12	0,13 986,21	1,12	0,14 985,09	1,09	0,16 984,00	1,06	0,16 982,94	1,04	1 981,90	1,01	0,18 980,89	1,00	0,19 979,89	0,97	0,22 978,92	0,97	0 24 977,95	0,95	0,25 977,00	0,95	0,27 976,05	0,94	0,28 975,11	0,95
13	0,15 986,06	1,13	0,16 984,93	1,09	0,16 983,84	1,08	0,18 982,76	1,05	0,19 981,71	1,02	0,20 980,69	1,01	0,21 979,68	0,99	0,23 978,69	0,98	0 24 977,71	0,97	0,26 976,74	0,97	0,28 975,77	0,96	0,30 974,81	096
14	0,16 985,90	1,13	0,16 994,77	1,11	0,18 983,66	1,08	0,18 982,58	1,07	0,20 981,51	1,04	0,22 980,47	1,02	0,23 979,45	1,00	0,24 978,45	1,00	0,26 977,45	0,98	0,27 976,47	0,98	0,28 975,49	0,98	0,30 975,51	0,98
15	0,17 985,73	1,14	0,18 994,59	1,12	0,19 983,47	1,09	0,20 982,38	1,08	0,21 981,30	1,05	0,22 960,25	1,04	0,24 979,21	1,01	0,25 978,20	1,01	0,26 977,19	1,00	0,28 976,19	1,00	0,29 975,19	1,00	0,32 974,19	1,00
16	0,18 985,55	1,15	0,19 984,40	1,13	0,20 983,27	1,11	0,22 982,16	1,08	0,22 981,08	1,07	0,24 980,01	1,04	0,24 978,97	1,04	0,27 977,93	1,02	0,28 976,91	1,02	0,30 975,89	1,01	0,31 974,88	1,01	0,32 973,87	1,02
17	0,19 985,36	1,16	0,20 984,20	1,14	0,21 983,06	1,12	0,22 981,94	1,09	0,23 980,85	1,08	0,24 979,77	1,06	0,26 978,71	1,05	0,27 977,66	1,04	0,29 976,62	1,03	0,30 975,59	1,03	0,32 974,56	1,02	0,33 973,54	1,04
18	0,21 985,15	1,17	0,22 983,76	1,14	0,22 982,84	1,13	0 23 981,71	1,11	0,25 980,60	1,09	0,26 979,51	1,07	0,27 978,44	1,06	0,28 977,38	1,05	0,29 976,33	1,05	0,31 975,28	1,04	0,32 974,24	1,05	0,35 973,19	1,05
19	0,21 984,94	1,18	0,22 983,76	1,16	0,24 982,60	1,13	0,24 981,47	1,12	0,25 980,35	1,10	0,26 979,25	1,09	0,28 978,16	1,07	0,29 977,09	1,07	0,31 976,02	1,06	0,32 974,96	1,06	0,34 973,90	1,06	0,35 972,84	1,06
20	0,23 984,71	1,19	0,24 983,52	1,16	0,24 982,36	1,15	0,26 981,21	1,13	0,27 980,08	1,11	0,28 978,97	1,10	0,29 977,87	1,08	0,30 976,79	1,08	0,31 975,71	1,08	0,33 974,63	1,07	0,34 973,56	1,08	0,36 972,48	1,08

TABLE I (suite)

Titre alcoométrique international à 20°C

Table des masses volumiques apparentes des mélanges hydroalcooliques – Pycnomètre en pyrex

Masses volumiques à *t*°C, corrigés de la poussée de l'air

	Titre alcoométrique volumique en %																							
t°	10		11		12		13		14		15		16		17		18		19		20		21	
20°	984,71	1,19	983,52	1,16	982,36	1,15	981,21	1,13	980,08	1,11	978,97	1,10	977,87	1,08	976,79	1,08	975,71	1,08	974,63	1,07	973,56	1,08	972,48	1,08
	0,24		0,24		0,26		0,26		0,27		0,28		0,29		0,31		0,33		0,34		0,36		0,37	
21°	994.47	1.19	983.28	1.18	982.10	1.15	980.95	1.14	978.81	1.12	978.69	1.11	977.58	1.10	976.48	1.10	975.38	1.09	974.29	1.09	973.20	1.09	972.11	1.09
	0.24		0.26		0.28		0.29		0.30		0.31		0.33		0.33		0.35		0.35		0.36		0.37	
22°	984.23	1.21	983.02	1.18	981.84	1.17	980.67	1.15	979.52	1.13	978.39	1.12	977.27	1.12	976.15	1.10	975.05	1.11	973.94	1.10	972.84	1.10	971.74	1.12
	0.26		0.26		0.27		0.28		0.29		0.31		0.32		0.33		0.35		0.35		0.37		0.39	
23°	983.97	1.20	982.77	1.20	981.57	1.18	980.39	1.16	979.23	1.15	978.08	1.13	976.95	1.13	975.82	1.12	974.70	1.11	973.59	1.12	972.47	1.12	971.47	1.12
	0.27		0.29		0.29		0.29		0.30		0.31		0.33		0.33		0.35		0.37		0.38		0.40	
24°	983.70	1.22	982.48	1.20	981.28	1.18	980.10	1.17	978.93	1.16	977.77	1.15	976.62	1.13	975.49	1.14	974.35	1.13	973.22	1.13	972.09	1.14	970.95	1.14
	0.28		0.28		0.29		0.31		0.32		0.33		0.33		0.35		0.36		0.37		0.39		0.40	
25°	983,42	1,22	982,20	1,21	980,99	1,20	979,79	1,18	978,61	1,17	977,44	1,15	976,29	1,15	975,14	1,15	973,99	1,14	972,85	1,15	971,70	1,15	970,55	1,16
	0,28		0,30		0,31		0,31		0,32		0,33		0,35		0,36		0,37		0,39		0,40		0,41	
26°	983.14	1.24	981.90	1.22	980.68	1.20	979.48	1.19	978.29	1.18	977.11	1.17	975.94	1.16	974.78	1.16	973.62	1.16	972.46	1.16	971.30	1.16	970.14	1.17
	0.30		0.30		0.31		0.32		0.33		0.34		0.35		0.36		0.38		0.39		0.40		0.42	
27°	982.84	1.24	981.60	1.23	980.37	1.21	979.16	1.20	977.96	1.19	976.77	1.18	975.59	1.17	974.42	1.18	973.24	1.17	972.07	1.17	970.90	1.18	969.72	1.18
	0.31		0.32		0.32		0.33		0.34		0.35		0.36		0.38		0.38		0.40		0.41		0.43	
28°	982.53	1.25	981.28	1.23	980.05	1.22	978.83	1.21	977.62	1.20	976.42	1.19	975.23	1.19	974.04	1.18	972.86	1.19	971.67	1.18	970.49	1.20	969.29	1.20
	0.31		0.32		0.33		0.34		0.35		0.36		0.37		0.38		0.40		0.40		0.42		0.43	
29°	982.22	1.26	980.96	1.24	979.72	1.23	978.49	1.22	977.27	1.21	976.06	1.20	974.86	1.20	973.66	1.20	972.46	1.19	971.27	1.20	970.07	1.21	968.86	1.22
	0.32		0.33		0.34		0.35		0.36		0.37		0.38		0.40		0.41		0.43		0.44		0.45	
30°	981,90	1,27	980,63	1,25	979,38	1,24	978,14	1,23	976,91	1,22	975,69	1,21	974,48	1,22	973,26	1,21	972,05	1,21	970,84	1,21	969,63	1,22	968,41	1,23
	0.34		0.34		0.35		0.36		0.37		0.38		0.40		0.40		0.41		0.42		0.44		0.45	
31°	981.56	1.27	980.29	1.26	979.03	1.25	977.78	1.24	976.54	1.23	975.31	1.23	974.08	1.22	972.86	1.22	971.64	1.22	970.42	1.23	969.19	1.23	967.96	1.24
	0.35		0.36		0.36		0.37		0.38		0.39		0.39		0.40		0.42		0.43		0.44		0.46	
32°	981.21	1.28	979.93	1.26	978.67	1.26	977.41	1.25	976.16	1.24	974.92	1.23	973.69	1.23	972.46	1.24	971.22	1.23	969.99	1.24	968.75	1.25	967.50	1.25
	0.35		0.35		0.37		0.37		0.38		0.39		0.40		0.42		0.42		0.44		0.45		0.46	
33°	980.86	1.28	979.58	1.28	978.30	1.26	977.04	1.26	975.78	1.25	974.53	1.24	973.29	1.25	972.04	1.24	970.80	1.25	969.55	1.25	968.30	1.26	967.04	1.27
	0.36		0.37		0.37		0.38		0.39		0.40		0.41		0.42		0.43		0.44		0.46		0.47	
34°	980.50	1.29	979.21	1.28	977.93	1.27	976.66	1.27	975.39	1.26	974.13	1.25	972.88	1.26	971.62	1.25	970.37	1.26	969.11	1.27	967.84	1.27	966.57	1.29
	0.36		0.37		0.38		0.39		0.39		0.40		0.42		- 0.42		0.44		0.46		0.46		0.48	
35°	980,14	1,30	978,94	1,29	977,55	1,28	976,27	1,27	975,00	1,27	973,73	1,27	972,46	1,26	971,20	1,27	969,93	1,28	968,65	127	967,38	1,29	966,09	1,30
	0,37		0,38		0,38		0,39		0,40		0,41		0,42		0,44		0,45		0,45		0,47		0,48	
36°	979.77	1.31	978.46	1.29	977.17	1.29	975.88	1.28	974.60	1.28	973.32	1.28	972.04	1.28	970.76	1.28	969.48	1.28	968.20	1.29	966.91	1.30	965.61	1.32
	0.39		0.39		0.40		0.40		0.41		0.42		0.43		0.44		0.45		0.47		0.48		0.49	
37°	978.38	1.31	978.07	1.30	976.77	1.29	975.48	1.29	974.19	1.29	972.90	1.29	971.61	1.29	970.32	1.29	969.03	1.30	967.73	1.30	966.43	1.31	965.12	1.33
	0.38		0.39		0.40		0.41		0.42		0.43		0.44		0.45		0.46		0.47		0.49		0.50	
38°	979.00	1.32	977.68	1.31	976.37	1.30	975.07	1.30	973.77	1.30	972.47	1.30	971.17	1.30	969.87	1.30	968.57	1.31	967.26	1.32	965.94	1.32	964.62	1.34
	0.40		0.40		0.41		0.42		0.42		0.43		0.44		0.45		0.47		0.48		0.49		0.50	
39°	978.60	1.32	977.28	1.32	975.96	1.31	974.65	1.30	973.35	1.31	972.04	1.31	970.73	1.31	969.42	1.32	968.10	1.32	966.78	1.33	965.45	1.33	964.12	1.36
	0.40		0.41		0.41		0.42		0.43		0.44		0.45		0.46		0.47		0.48		0.49		0.51	
40°	978,20	1,33	976,87	1,32	975,55	1,32	974,23	1,31	972,92	1,32	971,60	1,52	970,28	1,32	968,96	1,33	967,63	1,33	966,30	1,34	964,96	1,35	963,61	1,37

TABLE I (suite)

Titre alcoométrique international à 20°C

Table des masses volumiques apparentes des mélanges hydroalcooliques – <u>Pycnomètre en pyrex</u>

Masses volumiques à *t*°C, corrigés de la poussée de l'air

| | Titre alcoométrique volumique en % | | |

TABLE I (suite)

Titre alcoométrique international à 20°C

Table des masses volumiques apparentes des mélanges hydroalcooliques – Pycnomètre en pyrex

Masses volumiques à *t*°C, corrigés de la poussée de l'air

	Titre alcoométrique volumique en %																													
t °	20		21		22		23		24		25		26		27		28		29		30		31							
20	973,56	1,08	972,48	1,08	971,40	1,09	970,31	1,10	969,21	1,11	968,10	1,14	966,96	1,15	965,81	1,17	964,64	1,20	963,44	1,23	962,21	1,26	960,95	1,29						
	0.36		0.37		0.38		0.40		0.42		0.44		0.45		0.46		0.49		0.50		0.52		0.53							
21	973.20	1.09	972.11	1.09	971.02	1.11	969.91	1.12	968.79	1.13	967.66	1.15	966.51	1.16	965.35	1.20	964.15	1.21	962.94	1.25	961.69	1.27	960.42	1.31						
	0.36		0.37		0.40		0.41		0.42		0.44		0.45		0.48		0.49		0.51		0.52		0.54							
22	972.84	1.10	971.74	1.12	970.62	1.12	969.50	1.13	968.37	1.15	967.22	1.16	966.06	1.19	964.87	1.21	963.66	1.23	962.43	1.26	961.17	1.29	959.88	1.32						
	0.37		0.39		0.40		0.42		0.43		0.45		0.47		0.48		0.49		0.51		0.53		0.55							
23	972.47	1.12	971.35	1.13	970.22	1.14	969.08	1.14	967.94	1.17	966.77	1.18	965.59	1.20	964.39	1.22	963.17	1.25	961.92	1.28	960.64	1.31	959.33	1.33						
	0.38		0.40		0.41		0.42		0.44		0.45		0.47		0.49		0.51		0.52		0.54		0.55							
24	972.09	1.14	970.95	1.14	969.81	1.15	968.66	1.16	967.50	1.18	966.32	1.20	965.12	1.22	963.90	1.24	962.66	1.26	961.40	1.30	960.10	1.32	958.78	1.35						
	0.39		0.40		0.42		0.43		0.45		0.47		0.48		0.49		0.51		0.53		0.54		0.55							
25	971,70	1,15	970,55	1,16	969,39	1,16	968,23	1,18	967,05	1,20	965,85	1,21	964,64	1,23	963,41	1,26	962,15	1,28	960,87	1,31	959,56	1,33	958,23	1,37						
	0.40		0.41		0.42		0.44		0.46		0.47		0.49		0.50		0.51		0.53		0.54		0.57							
26	971.30	1.16	970.14	1.17	968.97	1.18	967.79	1.20	966.59	1.21	965.38	1.23	964.15	1.24	962.91	1.27	961.64	1.30	960.34	1.32	959.02	1.36	957.66	1.38						
	0.40		0.42		0.43		0.45		0.46		0.48		0.49		0.51		0.53		0.54		0.56		0.56							
27	970.90	1.18	969.72	1.18	968.54	1.20	967.34	1.21	966.13	1.23	964.90	1.24	963.66	1.26	962.40	1.29	961.11	1.31	959.80	1.34	958.46	1.36	957.10	1.40						
	0.41		0.43		0.45		0.46		0.47		0.48		0.50		0.52		0.54		0.56		0.57		0.59							
28	970.49	1.20	969.29	1.20	968.09	1.21	966.88	1.22	965.66	1.24	964.42	1.26	963.16	1.28	961.88	1.31	960.57	1.33	959.24	1.35	957.89	1.38	956.51	1.41						
	0.42		0.43		0.45		0.47		0.49		0.50		0.52		0.53		0.53		0.55		0.56		0.58							
29	970.07	1.21	968.86	1.22	967.64	1.23	966.41	1.24	965.17	1.25	963.92	1.28	962.64	1.29	961.35	1.31	960.04	1.35	958.69	1.36	957.33	1.40	955.93	1.42						
	0.44		0.45		0.46		0.47		0.49		0.50		0.51		0.53		0.55		0.55		0.58		0.58							
30	969,63	1,22	968,41	1,23	967,18	1,24	965,94	1,26	964,68	1,26	963,42	1,29	962,13	1,31	960,82	1,33	959,49	1,35	958,14	1,39	956,75	1,40	955,35	1,44						
	0.44		0.45		0.46		0.48		0.49		0.51		0.52		0.53		0.55		0.57		0.58		0.60							
31	969.19	1.23	967.96	1.24	966.72	1.26	965.46	1.27	964.19	1.28	962.91	1.30	961.61	1.32	960.29	1.35	958.94	1.37	957.57	1.40	956.17	1.42	954.75	1.44						
	0.44		0.46		0.47		0.48		0.50		0.51		0.53		0.54		0.55		0.57		0.58		0.59							
32	968.75	1.25	967.50	1.25	966.25	1.27	964.98	1.29	963.69	1.29	962.40	1.32	961.08	1.33	959.75	1.36	958.39	1.39	957.00	1.41	955.59	1.43	954.16	1.46						
	0.45		0.46		0.48		0.49		0.50		0.52		0.53		0.55		0.57		0.57		0.59		0.61							
33	968.30	1.26	967.04	1.27	965.77	1.28	964.49	1.30	963.19	1.31	961.88	1.33	960.55	1.35	959.20	1.38	957.82	1.39	956.43	1.43	955.00	1.45	953.55	1.47						
	0.46		0.47		0.49		0.50		0.51		0.53		0.54		0.56		0.56		0.59		0.59		0.60							
34	967.84	1.27	966.57	1.29	965.28	1.29	963.99	1.31	962.68	1.33	961.35	1.34	960.01	1.37	958.64	1.38	957.26	1.42	95584	1.43	954.41	1.46	952.95	1.49						
	0.46		0.48		0.49		0.51		0.52		0.53		0.55		0.56		0.58		0.58		0.60		0.62							
35	967,38	1,29	966,09	1,30	964,79	1,31	963,48	1,32	962,16	1,34	960,82	1,36	959,46	1,38	958,08	1,40	956,68	1,42	955,26	1,45	953,81	1,48	952,33	1,50						
	0.47		0.48		0.50		0.51		0.53		0.54		0.55		0.57		0.58		0.60		0.61		0.62							
36	966.91	1.30	965.61	1.32	964.29	1.32	962.97	1.34	961.63	1.35	960.28	1.37	958.91	1.40	957.51	1.41	956.10	1.44	954.66	1.46	953.20	1.49	951.71	1.51						
	0.48		0.49		0.50		0.52		0.53		0.55		0.56		0.57		0.59		0.60		0.61		0.62							
37	966.43	1.31	965.12	1.33	963.79	1.34	962.45	1.35	961.10	1.37	959.73	1.38	958.35	1.41	956.94	1.43	955.51	1.45	954.06	1.47	952.59	1.50	951.09	1.53						
	0.49		0.50		0.51		0.52		0.54		0.55		0.57		0.58		0.59		0.60		0.62		0.63							
38	965.94	1.32	964.62	1.34	963.28	1.35	961.93	1.37	960.56	1.38	959.18	1.40	957.78	1.42	956.36	1.44	954.92	1.46	953.46	1.49	951.97	1.51	950,4	1.54						
	0.49		0.50		0.52		0.53		0.54		0.56		0.57		0.58		0.60		0.61		0.62		0.64							
39	965.45	1.33	964.12	1.36	962.76	1.36	961.40	1.38	960.02	1.40	958.62	1.41	957.21	1.43	955.78	1.46	954.32	1.47	952.85	1.50	951.35	1.53	949.82	1.55						
	0.49		0.51		0.52		0.54		0.55		0.56		0.58		0.59		0.60		0.62		0.63		0.64							
40	964,96	1,35	963,61	1,37	962,24	1,38	960,86	1,39	959,47	1,41	958,06	1,43	956,63	1,44	955,19	1,47	953,72	1,49	952,23	1,51	950,72	1,54	949,18	1,57						

TABLE II

Titre alcoométrique international à 20°C

Table de corrections à effectuer sur le titre alcoométrique apparent pour corriger l'action de la température

Ajouter ou retrancher au titre alcoométrique apparent à *t*°C (**alcoomètre en verre ordinaire**) la correction indiquée ci-dessous

Températures	ajouter	Titres alcoométriques apparents à *t*°C																
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
0		0,76	0,77	0,82	0,87	0,95	1,04	1,16	1,31	1,49	1,70	1,95	2,26	2,62	3,03	3,49	4,02	4,56
1°		0,81	0,83	0,87	0,92	1,00	1,09	1,20	1,35	1,52	1,73	1,97	2,26	2,59	2,97	3,40	3,87	4,36
2°		0,85	0,87	0,92	0,97	1,04	1,13	1,24	1,38	1,54	1,74	1,97	2,24	2,54	2,89	3,29	3,72	4,17
3°		0,88	0,91	0,95	1,00	1,07	1,15	1,26	1,39	1,55	1,73	1,95	2,20	2,48	2,80	3,16	3,55	3,95
4°		0,90	0,92	0,97	1,02	1,09	1,17	1,27	1,40	1,55	1,72	1,92	2,15	2,41	2,71	3,03	3,38	3,75
5°		0,91	0,93	0,98	1,03	1,10	1,17	1,27	1,39	1,53	1,69	1,87	2,08	2,33	2,60	2,89	3,21	3,54
6°		0,92	0,94	0,98	1,02	1,09	1,16	1,25	1,37	1,50	1,65	1,82	2,01	2,23	2,47	2,74	3,02	3,32
7°		0,91	0,93	0,97	1,01	1,07	1,14	1,23	1,33	1,45	1,59	1,75	1,92	2,12	2,34	2,58	2,83	3,10
8°		0,89	0,91	0,94	0,98	1,04	1,11	1,19	1,28	1,39	1,52	1,66	1,82	2,00	2,20	2,42	2,65	2,88
9°		0,86	0,88	0,91	0,95	1,01	1,07	1,14	1,23	1,33	1,44	1,57	1,71	1,97	2,05	2,24	2,44	2,65
10°		0,82	0,84	0,87	0,91	0,96	1,01	1,08	1,16	1,25	1,35	1,47	1,60	1,74	1,89	2,06	2,24	2,43
11°		0,78	0,79	0,82	0,86	0,90	0,95	1,01	1,08	1,16	1,25	1 36	1,47	1,60	173	1,88	2,03	2,20
12°		0,72	0,74	0,76	0,79	0,83	0,88	0,93	0,99	1,07	1,15	1:24	1,34	1,44	1:56	1,69	1,82	1,96
13°		0,66	0,67	0,69	0,72	0,76	0,80	0,84	0,90	0,96	1,03	1,11	1,19	1,28	1,38	1,49	1,61	1,73
14°		0,59	0,60	0,62	0,64	0,67	0,71	0,74	0,79	0,85	0,91	0,97	1,04	1,12	1,20	1,29	1,39	1,49
15°		0,51	0,52	0,53	0,55	0,58	0,61	0,64	0,68	0,73	0,77	0,83	0,89	0995	1,02	1,09	1,16	1,24
16°		0,42	0,43	0,44	0,46	0,48	0,50	0,53	0956	0,60	0963	0,67	0,72	0,77	0,82	0,88	0,94	1,00
17°		0,33	0,33	0,34	0,35	0,37	0,39	0,41	0,43	0,46	0,48	0,51	0,55	0,59	0,62	0,67	0,71	0,75
18°		0,23	0,23	0,23	0,24	0,25	0,26	0,27	0,29	0,31	0,33	0,35	0,37	0,40	0,42	0,45	0,48	0,51
19°		0,12	0,12	0,12	0,12	0,13	0,13	0,14	0,15	0,16	0,17	0,18	0,19	0,20	0,21	0,23	0,24	0,25

TABLE II (suite)

Titre alcoométrique international à 20°C

Table de corrections à effectuer sur le titre alcoométrique apparent pour corriger l'action de la température

Ajouter ou retrancher au titre alcoométrique apparent à *t*°C (**alcoomètre en verre ordinaire**) la correction indiquée ci-dessous

Températures	retrancher	Titres alcoométriques apparents à *t*°C																	
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
21°			0,13	0,13	0,13	0,14	0,14	0,15	0,16	0,17	0,18	0,19	0,19	0,20	0,22	0,23	0,25	0,26
22°			0,26	0,27	0,28	0,29	0,30	0,31	0,32	0,34	0,36	0,37	0,39	0,41	0,44	0,47	0,49	0,52
23°			0,40	0,41	0,42	0,44	0,45	0,47	0,49	0,51	0,54	0,57	0,60	0,63	0,66	0,70	0,74	0,78
24°			0,55	0,56	0,58	0,60	0,62	0,64	0,67	0,70	0,73	0,77	0,81	0,85	0,89	0,94	0,99	1,04
25°			0,69	0,71	0,73	0,76	0,79	0,82	0,85	0,89	0,93	0,97	1,02	1,07	1,13	1,19	1,25	1,31
26°			0,85	0,87	0,90	0,93	0,96	1,00	1,04	1,08	1,13	1,18	1,24	1,30	1,36	1,43	1,50	1,57
27°				1,03	1,07	1,11	1,15	1,19	1,23	1,28	1,34	1,40	1,46	1,53	1,60	1,68	1,76	1,84
28°				1,21	1,25	1,29	1,33	1,38	1,43	1,49	1,55	1,62	1,69	1,77	1,85	1,93	2,02	2,11
29°				1,39	1,43	1,47	1,52	1,58	1,63	1,70	1,76	1,84	1,92	2,01	2,10	2,19	2,29	2,39
30°				1,57	1,61	1,66	1,72	1,78	1,84	1,91	1,98	2,07	2,15	2,25	2,35	2,45	2,56	2,67
31°				1,75	1,80	1,86	1,92	1,98	2,05	2,13	2,21	2,30	2,39	2,49	2,60	2,71	2,83	2,94
32°				1,94	2,00	2,06	2,13	2,20	2,27	2,35	2,44	2,53	2,63	2,74	2,86	2,97	3,09	3,22
33°					2,20	2,27	2,34	2,42	2,50	2,58	2,67	2,77	2,88	2,99	3,12	3,24	3,37	3,51
34°					2,41	2,48	2,56	2,64	2,72	2,81	2,91	3,02	3,13	3,25	3,38	3,51	3,65	3,79
35°					2,62	2,70	2,78	2,86	2,95	3,05	3,16	3,27	3,39	3,51	3,64	3,78	3,93	4,08
36°					2,83	2,91	3,00	3,09	3,19	3,29	3,41	3,53	3,65	3,78	3,91	4,05	4,21	4,37
37°						3,13	3,23	3,33	3,43	3,54	3,65	3,78	3,91	4,04	4,18	4,33	4,49	4,65
38°						3,36	3,47	3,57	3,68	3,79	3,91	4,03	4,17	4,31	4,46	4,61	4,77	4,94
39°						3,59	3,70	3,81	3,93	4,05	4,17	4,44	4,58	4,74	4,90	5,06	5,06	5,23
40°						3,82	3,94	4,06	4,18	4,31	4,44	4,57	4,71	4,86	5,02	5,19	5,36	5,53

TABLE II (suite)

Titre alcoométrique international à 20ºC

Table de corrections à effectuer sur le titre alcoométrique apparent pour corriger l'action de la température

Ajouter ou retrancher au titre alcoométrique apparent à *t*ºC (**alcoomètre en verre ordinaire**) la correction indiquée ci-dessous

Températures	ajouter	Titres alcoométriques apparents à *t*ºC																
		14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
0º		3,49	4,02	4,56	5,11	5,65	6,16	6,63	7,05	7,39	7,67	7,91	8,07	8,20	8,30	8,36	8,39	8,40
1º		3,40	3,87	4,36	4,86	5,35	5,82	6,26	6,64	6,96	7,23	7,45	7,62	7,75	7,85	7,91	7,95	7,96
2º		3,29	3,72	4,17	4,61	5,05	5,49	5,89	6,25	6,55	6,81	7,02	7,18	7,31	7,40	7,47	7,51	7,53
3º		3,16	3,55	3,95	4,36	4,77	5,17	5,53	5,85	6,14	6,39	6,59	6,74	6,86	6,97	7,03	7,07	7,09
4º		3,03	3,38	3,75	4,11	4,48	4,84	5,17	5,48	5,74	5,97	6,16	6,31	6,43	6,53	6,59	6,63	6,66
5º		2,89	3,21	3,54	3,86	4,20	4,52	4,83	5,11	5,35	5,56	5,74	5,89	6,00	6,10	6,16	6,20	6,23
6º		2,74	3,02	3,32	3,61	3,91	4,21	4,49	4,74	4,96	5,16	5,33	5,47	5,58	5,67	5,73	5,77	5,80
7º		2,58	2,83	3,10	3,36	3,63	3,90	4,15	4,38	4,58	4,77	4,92	5,05	5,15	5,24	5,30	5,34	5,37
8º		2,42	2,65	2,88	3,11	3,35	3,59	3,81	4,02	4,21	4,38	4,52	4,64	4,74	4,81	4,87	4,92	4,95
9º		2,24	2,44	2,65	2,86	3,07	3,28	3,48	3,67	3,84	3,99	4,12	4,23	4,32	4,39	4,45	4,50	4,53
10º		2,06	2,24	2,43	2,61	2,80	2,98	3,16	3,33	3,48	3,61	3,73	3,83	3,91	3,98	4,03	4,08	4,11
11º		1,88	2,03	2,20	2,36	2,52	2,68	2,83	2,98	3,12	3,24	3,34	3,43	3,50	3,57	3,62	3,66	3,69
12º		1,69	1,82	1,96	2,10	2,24	2,38	2,51	2,64	2,76	2,87	2,96	3,04	3,10	3,16	3,21	3,25	3,27
13º		1,49	1,61	1,73	1,84	1,96	2,08	2,20	2,31	2,41	2,50	2,58	2,65	2,71	2,76	2,80	2,83	2,85
14º		1,29	1,39	1,49	1,58	1,68	1,78	1,88	1,97	2,06	2,13	2,20	2,26	2,31	2,36	2,39	2,42	2,44
15º		1,09	1,16	1,24	1,32	1,40	1,48	1,56	1,64	1,71	1,77	1,83	1,88	1,92	1,96	1,98	2,01	2,03
16º		0,88	0,94	1,00	1,06	1,12	1,19	1,25	1,31	1,36	1,41	1,46	1,50	1,53	1,56	1,58	1,60	1,62
17º		0,67	0,71	0,75	0,80	0,84	0,89	0,94	0,98	1,02	1,05	1,09	1,12	1,14	1,17	1,18	1,20	1,21
18º		0,45	0,48	0,51	0,53	0,56	0,59	0,62	0,65	0,68	0,70	0,72	0,74	0,76	0,78	0,79	0,80	0,81
19º		0,23	0,24	0,25	0,27	0,28	0,30	0,31	0,33	0,34	0,35	0,36	0,37	0,38	0,39	0,40	0,41	0,41

TABLE II (suite)

Titre alcoométrique international à 20°C

Table de corrections à effectuer sur le titre alcoométrique apparent pour corriger l'action de la température

Ajouter ou retrancher au titre alcoométrique apparent à *t*°C (**alcoomètre en verre ordinaire**) la correction indiquée ci-dessous

Températures	retrancher	Titres alcoométriques apparents à *t*°C																	
		14			15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
	21°	0,23	0,25	0,26	0,28	0,29	0,30	0,31	0,33	0,34	0,35	0,35	0,37	0,38	0,38	0,39	0,39	0,40	
	22°	0,47	0,49	0,52	0,55	0,57	0,60	0,62	0,65	0,67	0,70	0,72	0,74	0,75	0,76	0,78	0,79	0,80	
	23°	0,70	0,74	0,78	0,82	0,86	0,90	0,93	0,97	1,01	1,04	1,07	1,10	1,12	1,15	1,17	1,18	1,19	
	24°	0,94	0,99	1,04	1,10	1,15	1,20	1,25	1,29	1,34	1,39	1,43	1,46	1,50	1,53	1,55	1,57	1,59	
	25°	1,19	1,25	1,31	1,37	1,43	1,49	1,56	1,62	1,68	1,73	1,78	1,83	1,87	1,90	1,94	1,97	1,99	
	26°	1,43	1,50	1,57	1,65	1,73	1,80	1,87	1,94	2,01	2,07	2,13	2,19	2,24	2,28	2,32	2,35	2,38	
	27°	1,68	1,76	1,84	1,93	2,01	2,10	2,18	2,26	2,34	2,41	2,48	2,55	2,61	2,66	2,70	2,74	2,77	
	28°	1,93	2,02	2,11	2,21	2,31	2,40	2,49	2,58	2,67	2,76	2,83	2,90	2,98	3,03	3,08	3,13	3,17	
	29o	2,19	2,29	2,39	2,50	2,60	2 70	2,81	2,91	3,00	3,09	3,18	3,26	3,34	3,40	3,46	3,51	3,55	
	30o	2,45	2,56	2,67	2,78	2,90	3,01	3,12	3,23	3,34	3,44	3,53	3,62	3,70	3,77	3,84	3,90	3,95	
	31°	2,71	2,83	2,94	3,07	3,19	3,31	3,43	3,55	3,67	3,78	3,88	3,98	4,07	4,15	4,22	4,28	4,33	
	32o	2,97	3,09	3,22	3,36	3,49	3,62	3,74	3,87	4,00	4,11	4,22	4,33	4,43	4,51	4,59	4,66	4,72	
	33o	3,24	3,37	3,51	3,65	3,79	3,92	4,06	4,20	4,33	4,45	4,57	4,68	4,79	4,88	4,97	5,04	5,10	
	34°	3,51	3,65	3,79	3,94	4,09	4,23	4,37	4,52	4,66	4,79	4,91	5,03	5,15	5,25	5,34	5,42	5,49	
	35°	3,78	3,93	4,08	4,23	4,38	4,53	4,69	4,84	4,98	5,12	5,26	5,38	5,50	5,61	5,71	5,80	5,87	
	36°	4,05	4,21	4,37	4,52	4,68	4,84	5,00	5,16	5,31	5,46	5,60	5,73	5,86	5,97	6,08	6,17	6,25	
	37°	4,33	4,49	4,65	4,82	4,98	5,15	5,31	5,48	5,64	5,80	5,95	6,09	6,22	6,33	6,44	6,54	6,63	
	38°	4,61	4,77	4,94	5,12	5,29	5,46	5,63	5,80	5,97	6,13	6,29	6,43	6,57	6,69	6,81	6,92	7,01	
	39°	4,90	5,06	5,23	5,41	5,59	5,77	5,94	6,12	6,30	6,47	6,63	6,78	6,93	7,06	7,18	7,29	7,39	
	40°	5,19	5,36	5,53	5,71	5,90	6,08	6,26	6,44	6,62	6,80	6,97	7,13	7,28	7,41	7,54	7,66	7,76	

TABLE III

Titre alcoométrique international à 20°C

Table des masses volumiques apparentes des mélanges hydroalcooliques – Appareils en verre ordinaire

Masses volumiques à t°C corrigés de la poussée de l'air

	Titre alcoométrique volumique en %																							
t°	**0**		**1**		**2**		**3**		**4**		**5**		**6**		**7**		**8**		**9**		**10**		**11**	
0	999,34	1,52	997,82	1,45	996,37	1,39	994,98	1,35	993,63	1,29	992,34	1,24	991,10	1,18	989,92	1,15	988,77	1,09	987,68	1,05	986,63	1,00	985,63	0,96
	--0,09		-0,09		-0,09		-0,08		-0,08		-0,08		-0,07		-0,05		-0,05		-0,04		-0,03		-0,02	
1	999,43	1,52	997,91	1,45	996,46	1,40	995,06	1,35	993,71	1,29	992,42	1,25	991,17	1,20	989,97	1,15	988,82	1,10	987,72	1,06	986,66	1,01	985,65	0,97
	--0,06		-0,06		-0,06		-0,06		-0,06		-0,05		-0,05		-0,04		-0,03		-0,02		0,02		-0,01	
2	999,49	1,52	997,97	1,40	996,52	1,40	995,12	1,35	993,77	1,30	992,47	1,25	991,22	1,21	990,01	1,16	988,85	1,11	987,74	1,06	986,68	1,02	985,66	0,98
	-0,05		-0,05		-0,04		-0,04		-0,04		-0,04		-0,03		-0,03		-0,03		-0,02		0,00		0,01	
3	999,54	1,52	998,02	1,46	996,56	1,40	995,16	1,35	993,81	1,30	992,51	1,26	991,25	1,21	990,04	1,16	988,88	1,12	987,76	1,08	986,68	1,03	985,65	0,99
	-0,03		-0,03		-0,03		-0,03		-0,02		-0,02		-0,02		-0,01		0,00		0,01		0,01		0,02	
4	999,57	1,52	998,05	1,46	996,59	1,40	995,19	1,36	993,83	1,30	992,53	1,26	991,27	1,22	990,05	1,17	98888	1,13	987,75	1,08	986,67	1,04	985,63	1,00
	-0,02		-0,02		-0,02		-0,02		-0,02		-0,01		0,00		0,00		0,00		0,01		0,02		0,03	
5	999,59	1,52	998,07	1,46	996,61	1,40	995,21	1,36	993,85	1,31	992,54	1,27	991,27	1,22	990,05	1,17	988,88	1,14	987,74	1,09	986,65	1,05	985,60	1,02
	0,00		0,00		0,00		0,01		0,01		0,01		0,01		0,02		0,03		0,03		0,04		0,06	
6	999,59	1,52	998,07	1,46	996,61	1,41	995,20	1,36	993,84	1,31	992,53	1,27	991,26	1,23	990,03	1,18	988,85	1,14	987,71	1,10	986,61	1,07	985,54	1,02
	0,01		0,01		0,01		0,01		0,01		0,02		0,02		0,02		0,03		0,04		0,05		0,06	
7	999,58	1,52	998,06	1,46	996,60	1,41	995,19	1,36	99383	1,32	992,51	1,27	991,24	1,23	990,01	1,19	988,82	1,15	987,67	1,11	986,56	1,08	985,48	1,04
	0,03		0,03		0,03		0,03		0,04		0,04		0,05		0,05		0,06		0,07		0,07		0,08	
8	999,55	1,52	998,03	1,46	996,57	1,41	995,16	1,37	993,79	1,32	992,47	1,28	991,19	1,23	989,96	1,20	988,76	1,16	987,60	1,11	986,49	1,09	985,40	1,05
	0,04		0,04		0,04		0,04		0,04		0,04		0,05		0,06		0,06		0,06		0,08		0,08	
9	99951	1,52	997,99	1,46	996,53	1,41	995,12	1,37	993,75	1,32	992,43	1,29	991,14	1,24	989,90	1,20	988,70	1,16	987,54	1,13	986,41	1,09	985 32	1,06
	0,06		0,06		0,06		0,06		0,06		0,07		0,07		0,07		0,08		0,09		0,10		0,11	
10	999,45	1,52	997,93	1,46	996,47	1,41	995,06	1,37	993,69	1,33	992,36	1,29	991,07	1,24	989,83	1,21	988,62	1,17	987,45	1,14	986,31	1,10	985,21	1,07
	0,07		0,06		0,06		0,07		0,07		0,07		0,07		0,08		0,09		0,10		0,10		0,11	
11	999,38	1,51	997,87	1,46	996,41	1,42	994,99	1,37	993,62	1,33	992,29	1,29	991,00	1,25	989,75	1,22	988,53	1,18	987,35	1,14	986,21	1,11	985,10	1,08
	0,09		0,09		0,09		0,09		0,09		0,09		0,10		0,11		0,11		0,11		0,1 2		0,13	
12	999,29	1,51	997,78	1,46	996,32	1,42	994,90	1,37	993,53	1,33	992,20	1,30	990,90	1,26	989,64	1,22	988,42	1,18	987,24	1,15	986,109	1,12	984,97	1,09
	0,09		0,09		0,09		0,09		0,10		0,10		0,10		0,10		0,11		0,12		0,13		0,14	
13	999,20	1,51	997,69	1,46	996,23	1,42	994,81	1,38	993,43	1,33	992,10	1,30	990,80	1,26	989,54	1,23	988,31	1,19	987,12	1,16	985,96	1,13	984,83	1,10
	0,11		0,11		0,11		0,11		0,11		0,12		0,12		0,13		0,13		0 14		0,15		0,16	
14	999,09	1,51	997,58	1,46	996,12	1,42	994,70	1,38	993,32	1,34	991,98	1,30	990,68	1,27	989,41	1,23	988,18	1,20	986,98	1,17	985,81	1,14	984,67	1,11
	0,12		0,12		0,12		0,12		0,12		0,12		0,13		0,13		0,14		0,14		0,15		0,16	
15	998,97	1,51	997,46	1,46	996,00	1,42	994,58	1,38	993,20	1,34	991,86	1,31	990,55	1,27	989,28	1,24	988,04	1,20	986,94	1,18	985,66	1,15	984,51	1,12
	0,13		0,13		0,13		0,13		0,14		0,14		0,14		0,15		0,15		0,17		0,17		0,18	
16	998,84	1,51	997,33	1,46	995,87	1,42	994,45	1,39	993,06	1,34	991,72	1,31	990,41	1,28	989,13	1,24	987,89	1,22	986,67	1,18	985,49	1,16	984,33	1,13
	0,14		0,14		0,14		0,14		0,14		0,15		0,15		0,15		0,16		0,17		0,17		0,18	
17	998,70	1,51	997,19	1,46	995,73	1,42	994,31	1,39	992,92	1,35	991,57	1,31	990,26	1,28	988,98	1,25	987,73	1,22	986,50	1,18	985,32	1,17	984,15	1,14
	0,15		0,15		0,16		0,16		0,16		0,16		0,17		0,17		0,18		0,18		0,19		0,19	
18	998,55	1,51	997,04	1,47	995,57	1,42	994,15	1,39	992,76	1,35	991,41	1,32	990,09	1,28	988,81	1,26	987,55	1,23	986,32	1,19	985,13	1,17	983,96	1,15
	0,17		0,16		0,16		0,16		0,16		0,16		0,17		0,18		0,18		0,19		0,20		0,21	
19	998,38	1,50	996,88	1,47	995,41	1,42	993,99	1,39	992,60	1,35	991,25	1,33	989,92	1,29	988,63	1,26	987,37	1,24	986 13	1,20	98493	1,18	983,75	1,16
	0,18		0,18		0,18		0,18		0,19		0,19		0,19		0,20		0,21		0,22		0,22		0,23	

20	998,20	1,50	996,70	1,47	995,23	1,42	993,81	1,40	992,41	1,35	991,06	1,33	989,73	1,30	988,43	1,27	987,16	1,24	985 92	1,21	984,71	1,19	983 52	1,17

TABLE III (suite)

Titre alcoométrique international à 20°C

Table des masses volumiques apparentes des mélanges hydroalcooliques – <u>Appareils en verre ordinaire</u>

Masses volumiques à *t*°C corrigés de la poussée de l'air

	Titre alcoométrique volumique en %																							
t°	**0**		1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11	
20	998,20	1,50	996,70	1,47	995,23	1,42	993,81	1,40	992,41	1,35	991,06	1,33	989,73	1,30	988,43	1,27	987,16	1,24	985,92	1,21	984,71	1,19	983,52	1,17
	0,19		0,19		0,19		0,19		0,19		0,20		0,20		0,21		0,21		0,22		0,23		0,23	
21	998,01	1,50	996,51	1,47	995,04	1,42	993,62	1,40	992,22	136	990,86	1,33	989,53	1,31	988,22	1,27	986,95	1,25	985,70	1,22	984,48	1,19	983,29	1,17
	0,20		0,20		0,19		0,20		0,20		0,20		0,21		0,21		0,22		0,22		0,23		0,24	
22	987,81	1,50	996,31	1,46	994,85	1,43	993,42	1,40	992,02	1,36	990,66	1,34	989,32	1,31	988,01	1,28	986,73	1,25	985,48	1,23	984,25	1,20	983,05	1,18
	0,21		0,21		0,21		0,21		0,21		0,22		0,22		0,22		0,23		0,24		0,24		0,25	
23	997,60	1,50	996,10	1,46	994,64	1,43	993,21	1,40	991,81	1,37	990,44	1,34	989,10	1,31	987,79	1,29	986,50	1,26	985,24	1,23	984,01	1,21	982,80	1,19
	0,21		0,21		0,22		0,22		0,22		0,22		0,23		0,23		0,23		0,24		0,25		0,26	
24	997,39	1,50	995,89	1,47	994,42	1,43	992,99	1,40	991,59	1,37	990,22	1,35	988,87	1,31	987,56	1,29	986,27	1,27	985,00	1,24	98376	1,22	982,54	1,20
	0,23		0,23		0,23		0,23		0,24		0,24		0,24		0,25		0,25		0,25		0,26		0,27	
25	997,16	1,50	995,66	1,47	994,19	1,43	992,76	1,41	991 35	1,37	989,98	1,35	988,63	1,32	987,31	1,29	986,02	1,27	984,75	1,25	983,50	1,23	982,27	1,21
	0,23		0,23		0,23		0,24		0,24		0,24		0,24		0,25		0,26		0,27		0,27		0,28	
26	996,93	1,50	995,43	1,47	993,96	1,44	992,52	1,41	991,11	1,37	989,74	1,35	988,39	1,33	987,06	1,30	985,76	1,28	984,48	1,25	983,23	1,24	981,99	1,22
	0,25		0,25		0,25		0,25		0,25		0,26		0,26		0,26		0,27		0,28		0,29		0,29	
27	996,68	1,50	995,18	1,47	993,71	1,44	992,27	1,41	990,86	1,38	989,48	1,35	988,13	1,33	986,80	1,31	985,49	1,29	994,20	1,26	982,94	1,24	981,70	1,23
	0,25		0,25		0,26		0,26		0,26		0,26		0,27		0,28		0,28		0,28		0,29		0,30	
28	996,43	1,50	994,93	1,48	993,45	1,44	992,01	1,41	990,60	1,38	989,22	1,36	987,86	1,34	986,52	1,31	985,21	1,29	983,92	1,27	982,65	1,25	981,40	1,23
	0,26		0,27		0,27		0,27		027		0,28		0,28		0,28		0,29		0,29		0,30		0,31	
29	996 17	1,51	994,66	1,48	993 18	1,44	991,74	1,41	990,33	1,39	988,94	1,36	98758	1,34	98624	1,32	984,92	1,29	983,63	1,28	98235	1,26	98109	1,24
	0,27		0,27		0,27		0,28		0,28		0,28		0,28		0,29		0,29		0,30		0,31		0,32	
30	995,90	1,51	994,39	1,48	992,91	1,45	991,46	1,41	990,05	1,39	988,66	1,37	987,29	1,34	985,95	1,32	984,63	1,30	983,33	1,29	982,04	1,27	980,77	1,25
	0,29		0,29		0,29		0,29		0,30		0,30		0,30		0,31		0,31		0,32		0,32		0,32	
31	995,61	151	994,10	1,48	992,62	1,45	991,17	1,42	989,75	1,39	988,36	1,37	986,99	1,35	985,64	1,33	984,31	1,30	983,01	1,29	981,72	1,27	980,45	1,26
	0,29		0,29		0,29		0,29		0,30		0,31		0,31		0,31		0,31		0,32		0,33		0,34	
32	995,32	1,51	993,81	1,48	992,33	1,45	990,88	1,42	989,45	1,40	988,05	1,37	986,68	1,35	985,33	1,33	984,00	1,31	982,69	1,30	981,39	1,28	980,11	1,26
	0,30		0,31		0,31		0,31		0,31		0,31		0,31		0,32		0,33		0,33		0,34		0,34	
33	995,02	1,52	993,50	1,48	992,02	1,45	990,57	1,43	989,14	1,40	987,74	1,37	986,37	1,36	985,01	1,34	983,67	1,31	982,36	1,31	981,05	1,28	979,77	1 27
	0,30		0,31		0,31		0,31		0,31		0,32		0,33		0,33		0,33		0,34		0,34		0,35	
34	994,72	1,53	993,19	1,48	991,71	1,45	990,26	1,43	988,83	1,41	987,42	1,38	98604	1,36	984,68	1,34	983,34	1,32	982,02	1,31	980,71	1,29	979,42	1,28
	0,32		0,32		0,32		0,33		0,33		0,33		0,33		0,33		0,33		0,34		0,34		0,35	
35	994,40	1,53	992,87	1,48	991,39	1,46	989,93	1,43	988,50	1,41	987,09	1,38	985,71	1,36	984,35	1,34	983,01	1,33	981,68	1,31	980,37	1,30	979,07	1,29
	0,32		0,32		0,33		0,33		0,33		0,33		0, 34		0,34		0,35		0,35		0,36		0,37	
36	994,08	1,53	992,55	1,49	991,06	1,46	989,60	1,43	988,17	1,41	986,76	1,39	985,37	1,36	984,01	1,35	982,66	1,33	981,33	1,32	980,01	1,31	978,70	1,29
	0,33		0,34		0,34		0,34		0,35		0,35		0,35		0,35		0,36		0,36		0,36		0,37	
37	993,75	1,54	992,21	1,49	990,72	1,46	989,26	1,44	987,82	1,41	986,41	1,39	985,02	1,37	983,65	1,35	982,30	1,33	980,97	1,32	979,65	1,32	978,33	1,30
	0,34		0,34		0,35		0,36		0,36		0,36		0,36		0,36		0,37		0,38		0,38		0,38	
38	993,41	1,54	991,87	1,50	990,37	1,47	988,90	1,44	87,46	1,41	986,05	1,39	984,66	1,37	983,29	1,36	981,93	1,34	980,59	1,32	979,27	1,32	977,95	1,31
	0,35		0,35		0,36		0,36		0,36		0,37		0,37		0,37		0,37		0,38		0,38		0,39	
39	993,06	1,54	991,52	1,51	990,01	1,47	98854	1,44	987,10	1,41	98568	1,39	984,29	1,37	982,92	1,36	981,56	1,34	980,22	1,33	978,89	1,33	977,56	1,31
	0,35		0,36		0,36		0,37		0,38		0,38		0,38		0,38		0,38		0,39		0,39		0,39	
40	992,71	1,55	991,16	1,51	989,65	1,48	988,17	1,45	986,72	1,42	985,30	1,39	983,91	1,37	982,54	1,36	981,18	1,35	979,83	1,33	978,50	1,33	977,17	1,32

TABLE III (suite)

Titre alcoométrique international à 20°C

Table des masses volumiques apparentes des mélanges hydroalcooliques – Appareils en verre ordinaire

Masses volumiques à *t*°C corrigés de la poussée de l'air

	Titre alcoométrique volumique en %																							
t°	10		11		12		13		14		15		16		17		18		19		20		21	
0	986,63	1,00	985,63	0,96	984,67	0,92	983,75	0,87	982,88	0,84	982,04	0,81	981,23	0,77	980,46	0,75	979,71	0,73	978,98	0,72	978,26	0,70	977,56	0,70
	-0,03		-0,02		-0,01		0,00		0,02		0,04		0,05		0,07		0,09		0,11		0,13		0,15	
1	986,66	1,01	985,65	0,97	984,68	0,93	983,75	0,89	982,86	0,86	982,00	0,82	981,18	0,79	98039	0,77	979,62	0,75	978,87	0,74	978,13	0,72	977,41	0,72
	-0,02		-0,01		0,00		0,01		0,03		0,04		0,06		0,08		0,10		0,12		0,14		0,17	
2	986,68	1,02	985,66	0,98	984,68	0,94	983,74	0,91	982,83	0,87	981,96	0,84	981,12	0,81	980,31	0,79	979,52	0,77	978,75	0,76	977,99	0,75	977,24	0,74
	0,00		0,01		0,02		0,04		0,05		0,06		0,08		0,10		0,12		0,14		0,16		0,18	
3	986,68	1,03	985,65	0,99	984,66	0,96	983,70	0,92	982,78	0,88	981,90	0,86	981,04	0,83	980,21	0,81	979,40	0,79	978,61	0,78	977,83	0,77	977,06	0,76
	0,01		0,02		0,03		0,04		0,05		0,07		0,08		0,10		0,12		0,14		0,16		0,18	
4	986,67	1,04	985,63	1,00	984,63	0,97	983,66	0,93	982,73	0,90	981,83	0,87	980,96	0,85	980,11	0,83	979,28	0,81	978,47	0,80	977,67	0,79	976,88	0,79
	0,02		0,03		0,05		0,06		0,08		0,09		0,11		0,13		0,14		0,16		0,18		0,20	
5	986,65	1,05	985,60	1,02	984,58	0,98	983,60	0,95	982,65	0,91	981,74	0,89	980,85	0,87	979,98	0,84	979,11	0,83	978,31	0,82	977,49	0,81	976,68	0,81
	0,04		0,06		0,06		0,07		0,08		0,10		0,11		0,13		0,15		0,17		0,19		0,21	
6	986,61	1,07	985,54	1,02	984,52	0,99	983,53	0,96	982,57	0,93	981,64	0,90	980,74	0,89	979,85	0,86	978,99	0,85	978,14	0,84	977,30	0,83	976,47	0,83
	0,05		0,06		0,08		0,09		0,10		0,12		0,14		0,15		0,17		0,19		0,20		0,22	
7	986,56	1,08	985,48	1,04	994,44	1,00	983,44	0,97	982,47	0,95	981,52	0,92	980,60	0,90	979,70	0,88	978,82	0,87	977,95	0,85	977,10	0,85	976,25	0,85
	0,07		0,08		0,09		0,10		0,11		0,12		0,14		0,16		0,18		0,19		0,21		0,23	
8	986,49	1,09	985,40	1,05	984,35	1,01	983,34	0,98	982,36	0,96	981,40	0,94	980,46	0,92	979,54	0,90	978,64	0,88	977,76	0,87	976,89	0,87	976,02	0,97
	0,08		0,08		0,09		0,11		0,13		0,14		0,15		0,16		0,18		0,20		0,22		0,24	
9	986,41	1,09	985,32	1,06	984,26	1,03	983,23	1,00	982,23	0,97	981,26	0,95	980,31	0,93	979,38	0,92	978,48	0,90	977,56	0,89	976,67	0,89	975,78	0,89
	0,10		0,11		0,12		0,13		0,14		0,16		0,17		0,18		0,19		0,21		0,23		0,25	
10	986,31	1,10	985,21	1,07	984,14	1,04	983,10	1,01	982,09	0,99	981,10	0,96	980,14	0,94	979,20	0,93	918,27	0,92	977,35	0,91	976,44	0,91	975,53	0,91
	0,10		0,11		0,12		0,13		0,15		0,16		0,17		0,19		0,21		0,23		0,25		0,27	
11	986,21	1,11	985,10	1,08	984,02	1,05	982,97	1,03	981,94	1,00	980,94	0,97	979,97	0,96	979,01	0,95	978,06	0,94	977,12	0,93	976,19	0,93	975,26	0,92
	0,12		0,13		0,14		0,15		0,16		0,17		0,19		0,21		0,22		0,24		0,26		0,27	
12	986,09	1,12	984,97	1,09	983,88	1,06	982,82	1,04	981,78	1,01	980,77	0,99	979,78	0,98	978,80	0,96	977,84	0,96	976,88	0,95	975,93	0,94	974,99	0,94
	0,13		0,14		0,15		0,16		0,17		0,19		0,20		0,21		0,23		0,24		0,26		0,28	
13	985,96	1,13	984,83	1,10	983,73	1,07	982,66	1,05	981,61	1,03	980,58	1,00	979,58	0,99	978,59	0,98	977,61	0,97	976,64	0,97	975,67	0,96	974,71	0,96
	0,15		0,16		0,17		0,18		0,19		0,20		0,22		0,23		0,24		0,26		0,27		0,29	
14	985,81	1,14	984,67	1,11	983,56	1,08	982,48	1,06	981,42	1,04	980,38	1,02	979,36	1,00	978,36	0,99	977,37	0,99	976,38	0,98	975,40	0,98	974,42	0,98
	0,15		0,16		0,17		0,18		0,19		0,20		0,22		0,24		0,26		0,27		0,28		0,30	
15	985,66	1,15	984,51	1,12	983,39	1,09	982,30	1,07	981,23	1,05	980,18	1,04	979,14	1,02	978,12	1,01	977,11	1,00	976,11	0,99	975,12	1,00	974,12	1,00
	0,17		0,18		0,19		0,20		0,21		0,22		0,23		0,25		0,26		0,28		0,30		0,31	
16	985,49	1,16	984,33	1,13	983,20	1,10	982,10	1,08	981,02	1,06	979,96	1,05	978,91	1,04	977,87	1,02	976,85	1,02	975,83	1,01	974,82	1,01	973,81	1,02
	0,17		0,18		0,19		0,20		0,21		0,23		0,24		0,25		0,27		0,29		0,30		0,31	
17	985,32	1,17	984,15	1,14	98,301	1,11	981,90	1,09	980,81	1,08	979,73	1,06	978,67	1,05	977,62	1,04	976,58	1,04	975,54	1,02	974,52	1,02	973,95	1,04
	0,19		0,19		0,20		0,22		0,24		0,25		0,26		0,27		0,28		0,29		0,31		0,33	
18	985,13	1,17	983,96	1,15	982,81	1,13	981,68	1,11	980,57	1,09	979,48	1,07	978,41	1,06	977,35	1,05	976,30	1,05	975,25	1,04	974,21	1,04	973,17	1,05
	0,20		0,21		0,22		0,23		0,24		0,25		0,26		0,27		0,29		0,30		0,32		0,34	
19	984,93	1,18	983,75	1,16	982,59	1,14	981,45	1,12	980,33	1,10	979,23	1,08	978 15	107	977,08	1,07	976,01	1,06	974,94	1,05	973,89	1,06	972,83	1,06
	0,22		0,23		0,24		0,24		0,25		0,26		0,28		0,29		0,30		0,31		0,33		0,35	
20	984,71	1,19	983,52	1,17	982,35	1,14	981,21	1,13	980,08	1,11	978,97	1,10	977,87	1,08	976,79	1,08	975,71	1,08	974,63	1,07	973,56	1,08	972,48	1,08

TABLE III (suite)

Titre alcoométrique international à 20°C

Table des masses volumiques apparentes des mélanges hydroalcooliques – Appareils en verre ordinaire

Masses volumiques à t°C corrigés de la poussée de l'air

	Titre alcoométrique volumique en %																							
t°	10		11		12		13		14		15		16		17		18		19		20		21	
20	984.71	1.19	983.52	1.17	982.3	1.1	981.21	1.13	980.08	1.11	978.97	1.1	977.87	1.0	976.79	1.08	975.71	1.08	974.63	1.07	973.56	1.08	972.48	1.08
	0.23		0.23		0.23		0.25		0.26		0.28		0.29		0.31		0.32		0.33		0.35		0.36	
21	984.48	1.19	983.29	1.17	982.1	1.1	980.96	1.14	979.82	1.13	978.69	1.1	97758	1.1	976.48	1.09	975.39	1.09	974.30	1.09	973.21	1.09	972.12	1.09
	0.23		0.24		0.25		0.26		0.27		0.28		0.29		0.31		0.32		0.33		0.35		0.36	
22	984.25	1.20	983.05	1.18	981.9	1.1	980.70	1.15	979.55	1.14	978.41	1.1	977.29	1.1	976.17	1.10	975.07	1.10	973.97	1.10	972.86	1.10	971.76	1.11
	0.24		0.25		0.26		0.27		0.28		0.29		0.30		0.31		0.33		0.34		0.35		0.37	
23	984.01	1.21	982.80	1.19	981.6	1.1	980.43	1.16	979.27	1.15	978.12	1.1	976.99	1.1	975.86	1.12	974.74	1.11	973.63	1.12	972.51	1.12	971.39	1.13
	0.25		0.26		0.27		0.28		0.29		0.30		0.31		0.32		0.33		0.35		0.36		0.38	
24	983.76	1.22	982.54	1.20	981.3	1.1	980.15	1.17	978.98	1.16	977.82	1.1	976.68	1.1	97554	1.13	974.41	1.13	97328	1.13	972.15	1.14	971.01	1.14
	0.26		0.27		0.28		0.29		0.30		0.31		0.32		0.33		0.35		0.36		0.38		0.39	
25	983.50	1.23	982.27	1.21	981.0	1.2	979.86	1.18	978.68	1.17	977.51	1.1	976.36	1.1	975.21	1.15	974.06	1.14	972.92	1.15	971.77	1.15	970.62	1.15
	0.27		0.28		0.29		0.29		0.30		0.31		0.33		0.34		0.35		0.37		0.38		0.39	
26	983.23	1.24	981.99	1.22	980.7	1.2	979.57	1.19	978.38	1.18	977.20	1.1	976.03	1.1	974.87	1.16	973.71	1.16	972.55	1.16	971.39	1.16	970.23	1.17
	0.29		0.29		0.30		0.31		0.32		0.33		0.34		0.36		0.37		0.38		0.39		0.41	
27	982.94	1.24	981.70	1.23	980.4	1.2	979.26	1.20	978.06	1.19	976.87	1.1	975.69	1.1	974.51	1.17	973.34	1.17	972.17	1.17	971.00	1.18	969.82	1.18
	0.29		0.30		0.30		0.31		0.32		0.33		0.35		0.36		0.38		0.39		0.40		0.41	
28	982.65	1.25	981.40	1.23	980.1	1.2	978.95	1.21	977.74	1.20	976.54	1.2	975.34	1.1	974.15	1.19	972.96	1.18	971.78	1.18	970.60	1.19	969.41	1.20
	0.30		0.31		0.32		033		0.34		0.35		0.36		0.37		0.38		0.39		0.40		0.42	
29	982.35	1.26	981.09	1.24	979.8	1.2	978.62	1.22	977.40	1.21	976.19	1.2	974.98	1.2	973.78	1.20	972.58	1.19	971.39	1.19	970.20	1.21	968.99	1.21
	0.31		0.32		0.33		0.34		0.35		0.36		0.37		0.38		0.38		0.40		0.42		0.43	
30	982.04	1.27	980.77	1.25	979.5	1.2	978.28	1.23	977.05	1.22	975.83	1.2	974.62	1.2	973.41	1.21	972.20	1.21	970.99	1.21	969.78	1.22	968.56	1.23
	0,32		0,32		0,33		0,34		0,35		0,36		0,37		0,38		0,39		0,40		0,42		0,43	
31	981.72	1.27	980.45	1.26,	979.1	1.2	977.94	1.24	976.70	1.23	975.47	1.2	974.25	1.2	973.03	1.22	971.81	1.22	970.59	1.23	969.36	1.23	968.13	1.24
	0.33		0.34		0.34		0.35		0.36		0.37		0.38		0.39		0.40		0.42		0.43		0.45	
32	981.39	1.28	980.11	1.26	978.9	1.2	977.59	1.25	976.34	1.24	975.10	1.2	973.87	1.2	972.64	1.23	971.41	1.24	970.17	1.24	968.93	1.25	967.68	1.26
	0.34		0.34		0.35		0.35		0.36		0.37		0.39		0.40		0.41		0.42		0.43		0.45	
33	981.05	1.28	979.77	1.27	978.5	1.2	977.24	1.26	975.78	1.25	974.73	1.2	973.48	1.2	972.24	1.24	971.00	1.25	969.75	1.25	968:50	1.27	967.23	1.27
	0.34		0.35		0.36		0.37		0.38		0.39		0.40		0.41		0.42		0.43		0.45		0.45	
34	98071	1.29	979.42	1.28	978.1	1.2	976.97	1.27	975,	1.26	974.34	1.2	973.08	1.2	971.83	1.25	970.58	1.26	969.32	1.27	968.05	1.27	966.78	1.29
	0.34		0.35		0.36		0.37		0.38		0.39		0.40		0.41		0.43		0.44		0.45		0.47	
35	980.37	1.30	979.07	1.29	977.7	1.2	976.50	1.28	975.22	1.27	973.95	1.2	972.68	1.2	971.42	1.27	970.15	1.27	968.88	1.28	967.60	1.29	966.31	1.30
	0.36		0.37		0.37		0.38		0.38		0.39		0.40		0.42		0.43		0.44		0.45		0.47	
36	980.01	1.31	978.70	1.29	977.4	1.2	976.12	1.28	974.84	1.28	973.56	1.2	972.28	1.2	971.00	1.28	969.72	1.28	968.44	1.29	967.15	1.31	965.84	1.31
	0.36		0.37		0.38		0.39		0.40		0.41		0.42		0.43		0.44		0.45		0.46		0.47	
37	979.65	1.32	978.33	1.30	977.0	1.3	975.73	1.29	974.44	1.29	973.15	1.2	971.86	1.2	970.57	1.29	969.28	1.29	967.99	1.30	966.69	1.32	965.37	1.32
	0.38		0.38		0.39		0.39		0.40		0.41		0.42		0.43		0.44		0.46		0.47		0.48	
38	979.27	1.32	977.95	1.31	976.6	1.3	975.34	1.30	974.04	1.30	972.74	1.3	971.44	1.3	970.14	1.30	968.84	1.31	967.53	1.31	966.22	1.33	964.89	1.34
	0.38		0.39		0.39		0.40		0.41		0.42		0.43		0.44		0.45		0.46		0.48		0.49	
39	978.89	1.33	977.56	1.31	976.2	1.3	974.94	1.31	973.63	1.31	972.32	1.3	971.01	1.3	969.70	1.31	968.39	1.32	967.07	1.33	965.74	1.34	964.40	1.36
	0.39		0.39		0.40		0.41		0.42		0.42		0.43		0.45		0.47		0.48		0.49		0.50	
40	978.50	1.33	977.17	1.32	975.8	1.3	974.53	1.32	973.21	1.31	971.90	1.3	970.58	1.3	969.25	1.33	967.92	1.33	966.59	1.34	565.25	1.35	963.90	1.37

TABLE III (suite)

Titre alcoométrique international à 20°C

Table des masses volumiques apparentes des mélanges hydroalcooliques – Appareils en verre ordinaire

Masses volumiques à t°C corrigés de la poussée de l'air

	Titre alcoométrique volumique en %																													
t°	**20**		**21**		**22**		**23**		**24**		**25**		**26**		**27**		**28**		**29**		**30**		**31**	
0	978.26	0.70	977.56	0.70	976.86	0.69	976.17	0.70	975.47	0.72	974.75	0.72	974.03	0.74	973.29	0.77	972.52	0.80	971.72	0.83	970.89	0.87	970.02	0.90
	0.13		0.15		0.17		0.20		0.22		0.24		0.27		0.30		0.32		0.35		0.37		0.39	
1	978.13	0.72	977.41	0.72	976.69	0.72	975.97	0.72	975.25	0.74	974.51	0.75	973.76	0.77	972.99	0.79	972.20	0.83	971.37	0.85	970.52	0.89	969.63	0.93
	0.14		0.17		0.19		0.21		0.24		0.26		0.29		0.31		0.34		0.36		0.38		0.41	
2	977.99	0.75	977.24	0.74	976.50	0.74	975.76	0.75	975.01	0.76	974.25	0.78	973.47	0.79	972.68	0.82	971.86	0.85	971.01	0.87	970.14	0.92	960.22	0.96
	0.16		0.18		0.20		0.23		0.25		0.27		0.29		0.32		0.34		0.36		0.38		0.40	
3	977.83	0.77	977.06	0.76	976.30	0.77	975.53	0.77	974.76	0.78	973.98	0.80	973.18	0.82	972.36	0.84	971.52	0.87	970.65	0.89	969.76	0.94	968.82	0.98
	0.16		0.18		0.21		0.23		0.25		0.28		0.30		0.32		0.34		0.36		039		0.42	
4	977.67	0.79	976.98	0.79	976.09	0.79	975.30	0.79	974.51	0.81	973.70	0.82	972.88	0.84	972.04	0.86	971.18	0.89	970.29	0.92	969.37	0.96	968.40	1.00
	0.18		0.20		0.22		0.24		0.26		0.28		0.30		0.33		0.35		0.38		0.40		0.41	
5	977.49	0.81	976.68	0.81	975.87	0.81	975.06	0.81	974.25	0.83	973.42	0.84	972.58	0.86	971.71	0.88	970.83	0.92	969.91	0.94	968.97	0.98	967.99	1.02
	0.19		0.21		0.23		0.25		0.27		0.30		0.33		0.34		0.37		0.39		0.41		0.43	
6	977.30	0.83	976.47	0.83	975.64	0.83	974.81	0.84	973.97	0.85	973.12	0.87	972.25	0.88	971.37	0.91	970.46	0.94	969.52	0.96	968.56	1.00	967.56	1.04
	0.20		0.22		0.24		0.26		0.28		0.30		0.32		0.35		0.37		0.39		0.41		0.43	
7	976.10	0.85	976.25	0.85	975.40	0.85	974.55	0.96	973.69	0.87	972.82	0.89	971.93	0.91	971.02	0.93	970.09	0.96	969.13	0.98	968.15	1.02	967.13	1.06
	0.21		0.23		0.25		0.27		0.29		0.31		0.33		0.35		0.37		0.39		0.42		0.44	
8	976.89	0.87	976.02	0.87	975.15	0.87	974.28	0.88	973.40	0.89	972.51	0.91	971.60	0.93	970.67	0.95	969.72	0.98	968.74	1.01	967.73	1.04	966.69	1.08
	0.22		0.24		0.26		0.28		0.30		0.32		0.34		0.36		0.39		0.41		0.43		0.45	
9	976.67	0.89	975.78	0.89	974.89	0.89	974.00	0.90	973.10	0.91	972.19	0.93	971.26	0.95	970.31	0.98	969.33	1.00	968.33	1.03	967.30	1.06	966.24	1.09
	0.23		0.25		0.27		0.29		0.31		0.33		0.35		0.37		0.39		0.41		0.43		0.45	
10	976.44	0.91	975.53	0.91	974.62	0.91	973.71	0.92	972.79	0.93	971.86	0.95	970.91	0.97	969.94	1.00	968.94	1.02	967.92	1.05	966.87	1.08	965.79	1.11
	0.25		0.27		0.28		0.30		0.32		0.34		0.36		0.38		0.40		0.42		0.44		0.45	
11	976.11	0.93	975.26	0.92	97434	0.93	973.41	0.94	972.47	0.95	971.52	0.97	970.55	0.99	969.56	1.02	968.54	1.04	967.50	1.07	966.43	1.09	965.34	1.13
	0.26		0.27		0.29		0.31		0.33		0.35		0.37		0.39		0.40		0.42		0.44		0.46	
12	975.93	0.94	974.99	0.94	974.05	0.95	973.10	0.96	972.14	0.97	971.17	0.99	970.18	1.01	969.17	1.03	968.14	1.06	967.08	1.09	965.99	1.11	964.88	1.15
	0.26		0.28		0.30		0.32		0.34		0.36		0.38		0.39		0.41		0.43		0.45		0.47	
13	975.67	0.96	974.71	0.96	973.75	0.97	972.78	0.98	971.80	0.99	970.81	1.01	969.80	1.02	968.78	1.05	967.73	1.08	966.65	1.11	965.54	1.13	964.41	1.17
	0.27		0.29		0.31		0.33		0.35		0.37		0.38		0.40		0.42		0.44		0.45		0.47	
14	975.40	0.98	974.42	0.98	973.44	0.99	972.45	1.00	971.45	1.01	970.44	1.02	969.42	1.04	968.38	1.07	967.31	1.10	966.21	1.12	965.09	1.15	963.94	1.19
	0.28		0.30		0.32		0.33		0.35		0.37		0.39		0.41		0.43		0.45		0.47		0.49	
15	975.12	1.00	974.12	1.00	973.12	1.00	972.12	1.02	971.10	1.03	970.07	1.04	969.03	1.06	967.97	1.09	966.88	1.12	965.76	1.14	964.62	1.17	963.45	1.20
	0.30		0.31		0.33		0.35		0.36		0.38		0.40		0.42		0.44		0.45		0.47		0.49	
16	974.82	1.01	973.81	1.02	972.79	1.02	971.77	1.03	970.74	1.05	969.69	1.06	968.63	1.08	967.55	1.11	966.44	1.13	965.31	1.16	964.15	1.19	962.96	1.22
	0.30		0.31		0.33		0.35		0.37		0.38		0.40		0.42		0.43		0.45		0.47		0.49	
17	974.52	1.02	973.50	1.04	972.46	1.04	971.42	1.05	970.37	1.06	969.31	1.08	968.23	1.10	967.13	1.12	966.01	1.15	964.86	1.18	963.68	1.21	962.47	1.24
	0.31		0.33		0.34		0.36		0.38		0.40		0.42		0.43		0.45		0.47		0.48		0.50	
18	974.21	1.04	973.17	1.05	972.12	1.06	971.06	1.07	969.99	1.08	968.91	1.10	967. 81	1.11	966.70	1.14	965.56	1.17	964.39	1.19	963.20	1.23	961.97	1.26
	0.32		0.34		0.35		0.36		0.38		0.40		0.42		0.44		0.46		0.47		0.49		0.50	
19	973.89	1.06	972.83	1.06	971.77	1.07	970.70	1.09	969.61	1.10	968.51	1.11	967.39	1.13	966.26	1.16	965.10	1.18	963.92	1.21	962.71	1.24	961.47	1.28
	0.33		0.35		0.37		0.39		0.40		0.41		0.42		0.45		0.46		0.48		0.51		052	
20	973.56	1.08	972.48	1.08	971.40	1.09	979.31	1.10	969.21	1.11	968.10	1.13	966.97	1.14	965.81	1.17	964.64	1.20	963.44	1.23	962.21	1.26	960.95	1.29

TABLE III (suite)

Titre alcoométrique international à 20°C

Table des masses volumiques apparentes des mélanges hydroalcooliques – Appareils en verre ordinaire

Masses volumiques à *t*°C corrigés de la poussée de l'air

t°	Titre alcoométrique volumique en %																							
	20		21		22		23		24		25		26		27		28		29		30		31	
20	973.56	1.08	972.48	1.08	971.40	1.09	970.31	1.10	969.21	1.11	968.10	1.13	966.97	1.16	965.81	1.17	964.64	1.20	963.44	1.23	962.21	1.26	960.95	1.2
	0.35		0.36		0.37		0.39		0.40		0.42		0.44		0.45		0.47		0.49		0.50		0.52	
21	973.21	1.09	972.12	1.09	971.03	1.11	969.92	1.11	968.81	1.13	967.68	1.15	966.53	1.17	965.36	1.19	964.17	1.22	962.95	1.24	961.71	1.28	960.43	1.3
	0.35		0.36		0.38		0.39		0.41		0.43		0.44		0.46		0.48		0.49		0.51		0.52	
22	972.86	1.10	971.76	1.11	970.65	1.12	969.53	1.13	968.40	1.15	967.25	1.16	966.09	1.19	964.90	1.21	963.69	1.23	962.46	1.26	961.20	1.29	959.91	1.3
	0.35		0.37		0.39		0.40		0.42		0.43		0.45		0.46		0.48		0.50		0.52		0.53	
23	972.51	1.12	971.39	1.13	970.26	1.13	969.13	1.15	967.98	1.16	966.82	1.18	965.64	1.20	964.44	1.23	963.21	1.25	961.96	1.28	960.68	1.30	959.38	1.3
	0.36		0.38		0.39		0.41		0.42		0.44		0.46		0.48		0.49		0.51		0.53		0.54	
24	972.15	1.14	971.01	1.14	969.87	1.15	968.72	1.16	967.56	1.18	966.38	1.20	965.18	1.22	963.96	1.24	962.72	1.27	961 45	1.29	960.16	1.32	958.84	1.3
	0,38		0.39		0.40		0.42		0.44		0.45		0.46		0.48		0.50		0.51		0.53		0.54	
25	971.77	1.15	970.62	1.15	969.47	1.17	968.30	1. 18	96	1.19	965.93	1.21	964.72	1.24	963.48	1.26	962.22	1.28	960.94	1.31	959.63	1.33	958.30	1.3
	0,38		0,39		0,41		0,42		0,44		0,46		0,48		0,49		0,50		0,52		0,53		0,55	
26	971.39	1.16	970.23	1.17	969.06	1.18	967.88	1.20	966.68	1.21	965.47	1.23	964.24	1.25	962.99	1.27	961.72	1.30	960.42	1.32	959.10	1.35	957.75	1.3
	0.39		0.41		0.42		0.44		0.45		0.46		0.48		0.50		0.51		0.52		0.53		0.55	
27	971.00	1.18	969.82	1.18	968.64	1.20	967.44	1.21	966.23	1.22	965.01	1.25	963.76	1.27	962.49	1.28	961.21	1.31	959.90	1.33	958.57	1.37	957.20	1.4
	0.40		0.41		0.43		0.44		0.46		0.48		0.49		0.50		0.52		0.53		0.55		0.56	
28	970.60	1.19	969.41	1.20	968.21	1.21	967.00	1.23	965.77	1.24	964.53	1.26	963.27	1.28	961.99	1.30	960.69	1.32	959.37	1.35	958.02	1.38	956.64	1.4
	0.40		0.42		0.43		0.45		0.46		0.48		0.49		0.50		0.52		0.54		0.55		0.56	
29	970.20	1.21	968.99	1.21	96778	1.23	966.55	1.24	965.31	1.26	964.05	1.27	962.78	1.29	961.49	1.32	960.17	1.34	958.83	1.36	957.47	1.39	956.08	1.4
	0.42		0.43		0.45		0.46		0.47		0.48		0.50		0:52		0.53		0.54		0.56		0.58	
30	969.78	1.22	968.56	1.23	967.33	1.24	966.09	1.25	964.84	1.27	963.57	1.29	962.28	1.31	960.97	1.33	959.64	1.35	958.29	1.38	956.91	1.41	955.50	1.4
	0.42		0.43		0.44		0.45		0.47		0.49		0.51		0.52		0.53		0.55		0.56		0.58	
31	969.36	1.23	968.13	1.24	966.89	1.25	965.64	1.27	964.37	1.29	963.08	1.31	961.77	1.32	960.45	1.34	959.11	1.37	957.74	1.39	956.35	1.43	954.92	1.4
	0.43		0.45		0.46		0.48		0.49		0.50		0.51		0.52		0.54		0.56		0.57		0.58	
32	968.93	1.25	967.68	1.25	966.43	1.27	965.16	1.28	963.88	1.30	962.58	1.32	961.26	1.33	959.93	1.36	958.57	1.39	957.18	1.40	955.78	1.44	954.34	1.4
	0.43		0.45		0.47		0.48		0.50		0.51		0.52		0.54		0.55		0.56		0.58		0.59	
33	968.50	1.27	967.23	1.27	965.96	1.28	964.68	1.30	963.38	1.31	962.07	1.33	960.74	1.35	959.39	1.37	958.02	1.40	956.62	1.42	955.20	1.45	953.75	1.4
	0.45		0.45		0.47		0.49		0.50		0.51		0.52		0.54		0.55		0.56		0.58		0.60	
34	968.05	1.27	966.78	1.29	965.49	1.30	964 19	1.31	962.88	1.32	961.56	1.34	960.22	1.37	958.85	1.38	957.47	1.41	956.06	1.44	954.62	1.47	953.15	1.4
	0.45		0.47		0.48		0.49		0.50		0.52		0.54		0.55		0.57		0.58		0.59		0.60	
35	967.60	1.29	996.31	1.30	965.01	1.31	963.70	1.32	962.38	1.34	961.04	1.36	959.68	1.38	958. 0	1.40	956.90	1.42	955.48	1.45	954.03	1.48	952.55	1.5
	0,45		0,47		0,48		0,49		0,51		0,53		0,54				0,57		0,59		0,60		061	
36	967.15	1.31	965.84	1.31	964.53	1.32	963.21	1.34	961.87	1.36	960.51	1.37	959.14	1.39	957.75	1.42	956.33	1.44	954.89	1.46	953.43	1.49	951.94	1.5
	0.46		0.47		0.48		0.50		0.52		0.53		0.55		0.56		0.57		0.58		0.60		0.61	
37	966.69	1.32	965.37	1.32	964.05	1.34	962.71	1.36	961.35	1.37	959.98	1.39	958.59	1.40	957.19	1.43	955.76	1.45	954.31	1.48	952.83	1.50	951.33	1.5
	0.47		0.48		0.50		0.51		0.52		0.54		0.55		0.57		0.58		0.59		0.60		0.61	
38	966.22	1.33	964.89	1.34	963.55	1.35	962.20	1.37	960.83	1.39	959.44	1.40	958.04	1.42	956.62	1.44	955.18	1.46	953.72	1.49	952.23	1.51	950.72	1.5
	0.48		0.49		0.51		0.52		0.53		0.54		0.56		0.57		0.58		0.60		0.61		0.62	
39	965.74	1.34	964.40	1.36	963.04	1.36	961.68	1.38	960.30	1.40	958.90	1.42	957.48	1.43	956.05	1.45	954.60	1.48	953 12	1.50	951.62	1.52	950.10	1.5
	0.49		0.50		0.51		0.53		0.54		055		0.56		058		0.60		0.61		0.62		0.64	
40	965.25	1.35	963.90	1.37	962.53	1.38	961.15	1.39	959.76	1.41	958.35	1.43	956.92	1.45	955.47	1.47	954.00	1.49	952.51	1.51	951.00	1.54	949.49	1.5

TABLE IV

Table de correspondence entre les indices de refraction à 20 °C et les titres alcoométriques à 20 °C des mélanges hydroalcooliques purs et des distillats

Indice de réfraction À 20 °C	Titres alcoométriques à 20 °C				Indice de réfraction À 20 °C	Titres alcoométriques à 20 °C			
	Mélanges hydroalcooliques		Distillats			Mélanges hydroalcooliques		Distillats	
1.33628	6.54	0.25	6.48	0.26	1.34222	16.76	0.23	16.65	0.23
1.33642	6.79	0.26	6.74	0.26	1.34236	16.99	0.23	16.88	0.24
1.33656	7.05	0.25	7.00	0.27	1.34250	17.22	0.22	17.12	0.22
1.33670	7.30	0.28	7.27	0.27	1.34264	17.44	0.24	17.34	0.22
1.33685	7.58	0.25	7.54	0.25	1.34278	17.68	0.21	17.56	0.22
1.33699	7.83	0.26	7.79	0.26	1.34291	17.89	0.23	17.78	0.23
1.33713	8.09	0.25	8.05	0.25	1.34305	18.12	0.24	18.01	0.22
1.33727	8.34	0.28	8.30	0.26	1.34319	18.36	0.23	18.23	0.23
1.33742	8.62	0.25	8.56	0.25	1.34333	18.59	0.23	18.46	0.24
1.33756	8.87	0.25	8.81	0.25	1.34347	18.82	0.23	18.70	0.22
1.33770	9.12	0.24	9.06	0.24	1.34361	19.05	0.23	18.92	0.25
1.33784	9.36	0.27	9.30	0.25	1.34375	19.28	0.23	19.17	0.23
1.33799	9.63	0.24	9.55	0.26	1.34389	19.51	0.24	19.40	0.22
1.33813	9.87	0.25	9.81	0.24	1.34403	19.75	0.23	19.62	0.24
1.33827	10.12	0.23	10.05	0.24	1.34417	19.98	0.24	19.86	0.23
1.33841	10.35	0.26	10.29	0.25	1.34431	20.22	0.22	20.09	0.24
1.33856	10.61	0.25	10.54	0.24	1.34445	20.44	0.21	20.33	0.21
1.33870	10.86	0.24	10.78	0.24	1.34458	20.65	0.24	20.54	0.22
1.33884	11.10	0.23	11.02	0.24	1.34472	20.89	0.22	20.76	0.23
1.33898	11.33	0.24	11.26	0.24	1.34486	21.11	0.23	20.99	0.22
1.33912	11.47	0.24	11.50	0.24	1.34500	21.34	0.21	21.21	0.23
1.33926	11.81	0.24	11.74	0.24	1.34513	21.55	0.23	21.44	0.21
1.33940	12.05	0.25	11.98	0.24	1.34527	21.78	0.22	21.65	0.22
1.33955	12.30	0.23	12.22	0.24	1.34541	22.00	0.23	21.87	0.23
1.33969	12.53	0.23	12.46	0.23	1.34555	22.23	0.21	22.10	0.21
1.33983	12.76	0.24	12.69	0.23	1.34568	22.44	0.23	22.31	0.23
1.33997	13.00	0.23	12.92	0.23	1.34582	22.67	0.23	22.54	0.21
1.34011	13.23	0.24	13.15	0.25	1.34596	22.90	0.23	22.75	0.21
1.34025	13.47	0.23	13.40	0.22	1.34610	23.13	0.20	22.96	0.21
1.34039	13.70	0.23	13.62	0.24	1.34623	23.33	0.24	23.17	0.23
1.34053	13.93	0.23	13.86	0.23	1.34637	23.57	0.24	23.40	0.21
1.34067	14.16	0.25	14.09	0.23	1.34651	23.81	0.23	23.61	0.24
1.34081	14.41	0.25	14.32	0.25	1.34665	24.04	0.22	23.85	0.24
1.34096	14.66	0.23	14.57	0.24	1.34678	24.26	0.22	24.09	0.22
1.34110	14.89	0.24	14.81	0.25	1.34692	24.48	0.24	24.31	0.25
1.34124	15.13	0.23	15.06	0.22	1.34706	24.72	0.23	24.56	0.22
1.34138	15.36	0.23	15.28	0.22	1.34720	24.95	0.21	24.78	0.22
1.34152	15.59	0.24	15.50	0.24	1.34733	25.16	0.24	25.00	0.23
1.34166	15.83	0.23	15.74	0.22	1.34747	25.40	0.22	25.23	0.22
1.34180	16.06	0.23	15.96	0.23	1.34760	25.62	0.24	25.45	0.25
1.34194	16.29	0.23	16.19	0.22	1.34774	25.86	0.24	25.70	0.23
1.34208	16.52	0.24	16.41	0.24	1.34788	26.10	0.22	25.93	0.22

Méthode OIV-MA-AS312-03A Méthode Type II

Méthanol

(A41, révision par OIV/OENO 377/2009
OIV-OENO 480-2014

1. Portée et domaine d'application

Cette méthode est applicable au dosage du méthanol dans les vins pour des concentrations comprises entre 50 et 500 mg/L.

2. Principe

Le méthanol est dosé par chromatographie en phase gazeuse couplée à une détection à ionisation de flamme (FID) dans le distillat, auquel est ajouté un étalon interne.

3. Réactifs et matériel

3.1. Eau de type II, conformément à la norme ISO 3696

3.2. Éthanol : pureté ≥ 96 % ; nº CAS 64-17-5

3.3. Hydrogène : spécifications minimales : pureté à 99,999 % ; nº CAS 1333-74-0

3.4. Hélium : spécifications minimales : pureté à 99,999 % ; nº CAS 7440-59-7

3.5. Méthanol : pureté ≥ 99 % ; nº CAS 67-56-1

3.6. 4-méthylpentan-2-ol (étalon interne) : pureté ≥ 98 % ; nº CAS 108-11-2. Étalon interne utilisé pour la validation

Remarque 1 : il est possible d'utiliser d'autres étalons internes, entre autres :

- Pentan-3-ol : pureté ≥ 98 % ; nº CAS 584-02-1,
- 4-méthylpentan-1-ol : pureté ≥ 98 % ; nº CAS 626-89-1,
- Nonanoate de méthyle : pureté ≥ 98 % ; nº CAS 1731-84-6.

3.7. Matériaux de référence : il peut par exemple s'agir de vins issus d'essais d'inter-comparaison entre laboratoires.

3.8. Préparation des solutions de travail (à titre d'exemple)

3.8.1. Mélange hydroalcoolique à environ 10 % v/v : ce mélange doit présenter un degré alcoolique le plus proche possible de celui du vin à analyser.

Verser 100 mL d'éthanol (3.2) dans une fiole jaugée de 1 L (4.2), ajuster le volume avec de l'eau déminéralisée (3.1) et homogénéiser.

3.8.2. Solution d'étalon interne à 10 g/L

Peser environ 1 g d'étalon interne (3.6) au moyen d'une balance analytique (4.1) dans une fiole jaugée de 100 mL (4.3) contenant environ 60 mL de solution d'éthanol à 10 % v/v (3.8.1) afin de réduire au maximum l'évaporation de l'étalon interne. Ajuster à 100 mL avec la solution d'éthanol (3.8.1) et homogénéiser.

3.8.3. Solution d'étalon interne à 1 g/L

Pipeter 10 mL (4.8) de la solution d'étalon interne à 10 g/L (3.8.2) et ajuster à 100 mL (4.3) avec le mélange hydroalcoolique à 10 % v/v (3.8.1).

3.8.4. Solution mère de méthanol à 5 g/L

Peser environ 500 mg de méthanol (3.5) au moyen d'une balance analytique (4.1) dans une fiole jaugée de 100 mL (4.3) contenant environ 60 mL de solution d'éthanol à 10 % v/v (3.8.1) afin de réduire au maximum l'évaporation du méthanol. Ajuster à 100 mL avec la solution d'éthanol (3.8.1) et homogénéiser.

3.8.5. Solutions de travail d'étalonnage

Une procédure destinée à réaliser une gamme d'étalonnage est présentée ci-après à titre d'exemple.

Toutes les solutions doivent être préparées avec le mélange hydroalcoolique à 10 % v/v (3.8.1).

3.8.5.1. Solution étalon de méthanol à 500 mg/L

Pipeter 10 mL (4.8) de la solution mère à 5 g/L (3.8.4) dans une fiole jaugée de 100 mL (4.3) et ajuster le volume avec la solution d'éthanol à 10 % v/v (3.8.1).

3.8.5.1.1. Solution étalon de méthanol à 250 mg/L

Pipeter 10 mL (4.8) de la solution de méthanol à 500 mg/L (3.8.5.1) dans une fiole jaugée de 20 mL (4.5) et ajuster le volume avec la solution d'éthanol à 10 % v/v (3.8.1).

3.8.5.1.2. Solution étalon de méthanol à 200 mg/L

Pipeter 20 mL (4.7) de la solution de méthanol à 500 mg/L (3.8.5.1) dans une fiole jaugée de 50 mL (4.4) et ajuster le volume avec la solution d'éthanol à 10 % v/v (3.8.1).

3.8.5.1.3. Solution étalon de méthanol à 150 mg/L

Pipeter 6 mL (4.9) de la solution de méthanol à 500 mg/L (3.8.5.1) dans une fiole jaugée de 20 mL (4.5) et ajuster le volume avec la solution d'éthanol à 10 % v/v (3.8.1).

3.8.5.1.4. Solution étalon de méthanol à 100 mg/L

Pipeter 4 mL (4.10) de la solution de méthanol à 500 mg/L (3.8.5.1) dans une fiole jaugée de 20 mL (4.5) et ajuster le volume avec la solution d'éthanol à 10 % v/v (3.8.1).

3.8.5.1.5. Solution étalon de méthanol à 50 mg/L

Pipeter 2 mL (4.11) de la solution de méthanol à 500 mg/L (3.8.5.1) dans une fiole jaugée de 20 mL (4.5) et ajuster le volume avec la solution d'éthanol à 10 % v/v (3.8.1).

4. Appareillage

4.1. Balance analytique (précision de 1 mg)

4.2. Fioles jaugées de classe A de 1 L

4.3. Fioles jaugées de classe A de 100 mL

4.4. Fioles jaugées de classe A de 50 mL

4.5. Fioles jaugées de classe A de 20 mL

4.6. Fioles jaugées de classe A de 10 mL

4.7. Pipettes jaugées de classe A de 20 mL

4.8. Pipettes jaugées de classe A de 10 mL

4.9. Pipettes jaugées de classe A de 6 mL

4.10. Pipettes jaugées de classe A de 4 mL

4.11. Pipettes jaugées de classe A de 2 mL

4.12. Pipettes jaugées de classe A de 1 mL ou micropipettes de 1 mL

4.13. Chromatographe en phase gazeuse à température programmable couplé à un détecteur à ionisation de flamme et équipé d'un système de traitement des données capable de calculer les aires ou de mesurer les hauteurs de pic

4.14. Colonne capillaire en silice fondue avec phase stationnaire polaire de type Carbowax 20M, par exemple :

- Chrompack CPwax 57CB, 50 m x 0,32 mm x 0,45 µm
- DB-WAX 52, 30 m x 25 mm x 0,2 µm

5. Préparation de l'échantillon

Les vins mousseux et/ou jeunes doivent être préalablement dégazés, en agitant par exemple 200 mL de vin dans une fiole jaugée de 1 L. Postérieurement, les échantillons sont distillés conformément à la méthode de détermination du titre alcoométrique volumique (OIV-MA-AS312-01), la distillation pouvant être réalisée sans ajout d'hydroxyde de calcium.

5.1. Ajout de l'étalon interne (indiqué à titre d'exemple)

Verser 10 mL de distillat dans une fiole jaugée de 10 mL (4.6), ajouter 1 mL (4.12) de solution d'étalon interne (3.8.3) et homogénéiser.

6. Mode opératoire

Les étalons de la gamme d'étalonnage doivent être traités de la même manière que les échantillons (point 5.1).

Il conseillé d'injecter le mélange hydroalcoolique (3.8.1) en début de séquence afin de contrôler qu'il ne contient pas de méthanol.

6.1. Conditions opératoires (orientatif) :

Gaz vecteur : hélium ou hydrogène

Débit du gaz vecteur : 7 mL/min

Injection : split (rapport : 7:50)

Volume d'injection : 1 ou 2 µL

Température de l'injecteur : 200-260 ºC

Température du détecteur : 220-300 ºC

Programme de température : de 35 ºC (pendant 2 minutes) jusqu'à 170 ºC, à un rythme de 7,5 ºC/min.

7. Calculs

Calculer la concentration en méthanol (Ci) au moyen de l'équation suivante :

$$C_i = \frac{C_p}{m}\left(\frac{A_i}{A_p} - b\right)$$

Ai - aire du pic de méthanol
Ap - aire du pic d'étalon interne
Cp - concentration de l'étalon interne
m - pente de la gamme d'étalonnage
b - ordonnée à l'origine de la gamme d'étalonnage

8. Expression des résultats

La concentration en méthanol peut être exprimée en mg/L ou en mg/100 mL d'alcool absolu ; dans ce cas, il convient de déterminer le titre alcoométrique volumique du vin.

Remarque 2 : mg/100 mL d'alcool absolu = mg/Lx10/Titre alcoométrique volumique.

9. Fidélité

Les données issues de l'essai interlaboratoires réalisé au niveau international sont indiquées en annexe A.

10. Maîtrise de la qualité

Le contrôle interne de la qualité peut être réalisé en utilisant des matériaux de référence certifiés ou des vins dont les caractéristiques ont été déterminées de manière consensuelle (3.7). Ils doivent être préparés comme les échantillons (point 5). Il est recommandé de participer à des essais d'inter-comparaison.

11. Report des résultats

Les résultats sont exprimés sans décimales (conformément à l'incertitude).

12. Bibliographie

Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts. Méthode OIV-MA-AS312-01 (Titre alcoométrique volumique).

Annexe A

Résultats statistiques de l'essai interlaboratoires

Conception de l'étude de validation

L'étude de validation a été réalisée avec 10 échantillons :2 de vin blanc, un sec et un doux ; 2 de vin rouge, l'un d'eux élevé en fût ; et 1 vin de liqueur (vin de Porto) avec conduite en double aveugle, conformément aux recommandations de l'OIV. Les concentrations approximatives en méthanol sont indiquées dans le tableau suivant :

Échantillon	Vin blanc sec	Vin blanc doux	Vin rouge	Vin rouge en fût	Vin de liqueur Porto
Méthanol (mg/L)	50	150*	270	400*	120

(*) Dans ces cas, du méthanol est ajouté au vin afin de couvrir une plus grande plage de concentrations. Ensuite, le vin a été homogénéisé, stabilisé et mis en bouteille.

Laboratoires participants :

Les échantillons ont été envoyés à 17 laboratoires de 9 pays différents.

Laboratorios Agroalimentarios, Madrid (Espagne)

Estación de Viticultura y Enología de Galicia, EVEGA (Espagne)

Estació de Viticultura i Enologia de Vilafranca del Penedès (Espagne)

Estación Enológica de Haro, La Rioja (Espagne)

Estación de Viticultura y Enología de Galicia (Espagne)

Lab. de Bordeaux, service commun des lab., Pessac (France)

Laboratoire d'Île de France, Paris (France)

Laboratoires Inter Rhône (France)

Comité interprofessionnel du vin de Champagne (CIVC) (France)

Bfr-Bundesinst. f. Risikobewertung (Allemagne)

Landesuntersuchungsamt Mainz (Allemagne)

Instituto Nacional de Vitivinicultura, Mendoza (Argentine)

ALKO Inc., Alcohol Control Lab. (ACL) (Finlande)

Instituto dos Vinhos do Douro e do Porto (Portugal)

Czech Agriculture and Food Inspection Authority (CAFIA), Brno (République tchèque)

National Food Safety Office, Directorate of Oenology and Alcoholic Beverages (NÉBIH BAII), Budapest (Hongrie)

Lehr- und Forschungszentrum, Klosterneuburg (Autriche)

Étude collaborative du méthanol

	Blanc sec		Blanc doux		Rouge		Rouge en fût		Porto	
Code du laboratoire	A	G	B	H	C	I	D	J	E	K
A	39,99	38,13	127,42	136,25	144,80	145,71	496,53	513,00	192,13	219,39
B	41,20	40,90	157,60	160,50	150,40	146,90	484,90	477,80	222,40	219,60
C	36,80	35,60	133,50	129,20	119,10	134,10	454,10	478,40	197,00	174,80
D	36,00	39,60	**177,40**	**145,50**	160,80	138,00	**302,00**	**494,50**	216,10	248,50
E	**68,00**	**70,00**	163,00	169,00	178,00	177,00	503,00	495,50	225,00	227,00
F	37,00	37,10	148,30	148,20	143,40	142,40	484,10	474,00	206,30	206,90
G	41,40	42,30	152,60	152,40	149,70	150,50	489,60	491,10	216,60	217,20
H	36,80	32,40	140,80	129,10	128,00	137,70	440,60	429,30	187,50	192,80
I	42,90	43,30	153,50	155,50	139,70	147,40	468,30	456,10	225,30	225,60
J	40,90	40,60	155,50	154,60	148,50	149,10	496,40	499,80	217,10	217,00
K	39,30	36,20	**103,10**	**143,10**	131,90	115,90	**437,90**	**334,00**	156,10	172,60
L	35,00	39,00	164,00	167,00	157,00	160,00	492,00	508,00	249,00	220,00
M	43,60	43,40	157,30	154,90	155,50	158,90	506,80	496,10	217,70	219,50
N	34,20	33,60	126,50	125,70	125,90	133,60	429,10	429,00	192,10	188,90
O	34,00	35,70	149,00	154,80	144,20	141,80	482,80	473,60	210,40	218,10
P	44,70	43,70	151,60	146,90	140,70	147,60	451,20	472,80	205,40	205,80
Q	40,70	38,80	153,00	149,80	158,20	153,40	498,20	497,50	225,50	217.20

Remarque : les valeurs qui apparaissent en gras correspondent aux valeurs rejetées conformément aux tests de Cochran (variance aberrante) et de Grubbs (moyennes aberrantes).

Indicateurs	Blanc sec	Blanc doux	Rouge	Rouge en fût	Porto
Nombre de laboratoires acceptés	16	15	17	15	17
Nombre de répétitions	2	2	2	2	2
Minimum	32,40	125,70	115,90	429,00	156,10
Maximum	44,70	169,00	178,00	513,00	249,00
Variance de répétabilité s_r^2	2,2466	12,1330	39,0164	76,3567	105,3390
Variance intergroupes s_r^2	9,61893	146,39249	151,90249	535,61827	292,14282
Variance de reproductibilité s_r^2	11,8655	158,5254	190,9189	611,9750	397,4819
Moyenne globale	38,90	148,92	145,76	478,97	210,37
Écart type de répétabilité	1,50	3,48	6,25	8,74	10,26
Limite r	4,242	9,858	17,677	24,729	29,046
CV de répétabilité	3,9	2,3	4,3	1,8	4,9
Écart type de reproductibilité	3,44	12,59	13,82	24,74	19,94
Limite R	9,748	35,632	39,103	70,009	56,422
CV de reproductibilité	8,9	8,5	9,5	5,2	9,5
Horwitz RSD	6,09	4,97	4,99	4,17	4,72
Horrat r	0,6	0,5	0,9	0,4	1,0
Horwitz RSD	9,22	7,53	7,56	6,32	7,15
Horrat R	1,0	**1,1**	**1,3**	0,8	**1,3**

D'après les valeurs Horrat, la répétabilité et la reproductibilité de la méthode sont acceptables.

<u>Scores Z obtenus par les participants</u> : sur 85 scores Z obtenus, 3 sont non satisfaisants 4 sont questionnables.

Code du laboratoire	Score Z Vin blanc sec	Score Z Vin blanc doux	Score Z Vin rouge	Score Z Vin rouge en fût	Score Z Porto
A	0,05	-1,36	-0,04	1,04	-0,23
B	0,62	0,80	0,21	0,10	0,53
C	-0,78	-1,40	-1,39	-0,51	-1,23
D	-0,32	1,00	0,26	**-3,26**	1,10
E	**8,74**	1,36	**2,30**	0,81	0,78
F	-0,54	-0,05	-0,21	0,00	-0,19
G	0,86	0,28	0,31	0,46	0,33
H	-1,25	-1,11	-0,93	-1,78	-1,01
I	1,22	0,44	-0,16	-0,68	0,76
J	0,54	0,49	0,22	0,77	0,34
K	-0,33	**-2,05**	-1,58	**-3,76**	**-2,31**
L	-0,55	1,32	0,92	0,85	1,21
M	1,34	0,57	0,83	0,91	0,41
N	-1,45	-1,81	-1,16	**-2,02**	-1,00
O	-1,18	0,24	-0,20	-0,03	0,19
P	1,54	0,03	-0,12	-0,69	-0,24
Q	0,25	0,20	0,73	0,76	0,55

Méthode OIV-MA-AS312-03B Méthode Type IV

Méthanol
(A41, révision par OIV/OENO 377/2009)

1. Principe des méthodes

Le méthanol est oxydé en méthanal par le permanganate de potassium acidulé par l'acide phosphorique sur le distillat du vin amené par dilution à contenir 5 p. 100 (*v/v*). Le méthanal est ensuite dosé grâce à la coloration violette qu'il donne en milieu sulfurique avec l'acide chromotropique, l'intensité de la coloration étant déterminée au spectrophotomètre à 575 nm.

3. Méthode

3.1 *Réactifs*

3.1.1 *Acide chromotropique*

Acide di-hydroxy 4,5-naphthalène di-sulfonic 2,7 $C_{10}H_8O_8S_2$□□ $2H_2O$ de poids moléculaire 356,34 g.

Poudre blanche ou brun clair, soluble dans l'eau. On emploi également le sel disodique de cet acide qui se présente sous forme d'un produit jaune ou brun clair, très soluble dans l'eau.

Purification – L'acide chromotropique doit être pur et ne donner qu'une coloration négligeable dans l'essai à blanc des réactifs préparés avec lui. Dans le cas contraire, on peut le purifier par le procédé suivant :

Dissoudre 10 g d'acide chromotropique ou de sel dans 25 ml d'eau distillée. Si c'est le sel qui a été utilisé, ajouter 2 ml d'acide sulfurique concentré (□□□ = 1,84 g/ml) pour libérer l'acide. Ajouter 50 ml de méthanol, chauffer à l'ébullition et filtrer. Ajouter 100 ml d'alcool isopopylique pour précipiter l'acide libre pur cristallisé, laisser sécher à froid les cristaux essorés.

Réaction – L'addition de chlorure ferrique (I goutte) à 10 ml d'une solution à 0,1 g/p.1000 donne une coloration verte.

Essai de sensibilité - Diluer 0,5 ml de soluté officinal de formaldéhyde à 1000 ml avec de l'eau. A 5 ml de solution à 0,05 p. 100 d'acide chromotropique dans l'acide sulfurique à 75% (*v/v*), ajouter 0,1 ml de solution de formaldéhyde ci-dessus et chauffer à 70°C pendant 20 min. Il doit se produire une coloration violette.

3.1.*2 Solution d'acide chromotropique à 0,05 p. 100 dans l'acide sulfurique à 75 p. 100 (v/v).*

Dissoudre 50 mg d'acide chromotropique ou de son sel de sodium dans 35 ml d'eau distillée. Placer cette solution dans un bain d'eau et de glace et ajouter avec précaution par petites portions et en agitant 75 ml d'acide sulfurique concentré (= 1,84 g/ml).

Cette solution doit être préparée au moment de l'emploi.

3.1.3 *Solution étalon de méthanol à 5 g/l d'alcool à 5 p. 100 (v/v)*

Méthanol pur (E_{760} = 64,7 ± 0,2) ..... 0.5 g
Alcool absolu (exempt de méthanol) ..... 50 ml
Eau distillée q.s.p. ..... 1 litre

3.1.4 *Solution de dilution*

Alcool absolu (exempt de méthanol) ..... 50 ml
Eau distillée q.s.p. ..... 1 litre

3.1.5 *Solution d'acide phosphorique à 50 p. 100 (m/v)*

3.1.6 *Solution de permanganate de potassium à 5 p. 100 (m/v)*

3.1.7 *Solution de sulfite neutre de sodium à 2 p. 100 (m/v)*

Solution rapidement oxydée par l'air. Vérifier son titre par titrage iodométrique.

3.2 *Mode opératoire*

Diluer le distillat de vin (voir chapitre *Titre alcoométrique*) de manière à ramener son titre alcoométrique à 5% vol.

Dans un tube à essai bouché à l'émeri, placer 0,5 ml de ce distillat dilué, ajouter I goutte d'acide phosphorique à 50 p. 100, II gouttes de solution de permanganate de potassium à 5 p. 100, agiter et laisser au repos 10 min.

Décolorer le permanganate par quelques gouttes, IV en général, de solution à 2 p. 100 de sulfite neutre de sodium (éviter tout excès). Ajouter 5 ml de solution sulfurique d'acide chromotropique à 0,05 p. 100. Porter dans un bain d'eau à 70°C pendant 20 min. Laisser refroidir.

Déterminer l'absorbance A_S, à 570 nm, le zéro de l'échelle des absorbance étant réglé sur le témoin préparé avec 0,5 ml de solution de dilution.

Etablissement de la courbe d'étalonnage

Dans une série de ballons jaugés de 50 ml, placer 2,5-5-10-15-20-25 ml de solution de méthanol à 0,5 g/l dans l'alcool à 5 p. 100. Compléter au trait de jauge avec la solution hydroalcoolique de dilution à 5 p. 100. Ces solutions contiennent, par litre, dans l'alcool à 5 p. 100, 25-50-100-150-200-250 mg de méthanol.

Traiter 0,5 ml de solution hydroalcoolique de dilution et 0,5 ml de chacune de ces solutions étalons, simultanément et selon la même technique que le distillat de vin ramené à une teneur en alcool de 5 p. 100.

Déterminer l'absorbance de ces solutions à 570 nm, dans les conditions ci-dessus.

La représentation graphique des absorbances des solutions étalons en fonction des concentrations est une droite.

3.3 *Calculs*

Déterminer la teneur en méthanol, exprimée en mg/l du distillat de vin ramené à un titre alcoométrique de 5% vol., en reportant A_S sur la droite d'étalonnage.

Exprimer la teneur du vin en mg/l en tenant compte de la dilution effectuée pour ramener son titre à 5% vol.

Méthode OIV-MA-AS312-04 Méthode Type IV

Glycérol et 2,3-Butanediol P 143
(A21, révision par OIV/OENO 377/2009)

1. Principe
Après un traitement par une colonne de résine échangeuse d'anions pour fixer les sucres et une quantité importante de mannitol et de sorbitol, on oxyde le glycérol et le 2,3 butanediol par de l'acide périodique. La combinaison obtenue par action de la phloroglucine sur le méthanal, lui-même formé par oxydation du glycérol, est dosée colorimétriquement à 480 nm. La combinaison de la pipéridine et du nitroprussiate de sodium avec l'éthanal formé par oxydation du 2,3-butanediol est dosée colorimétriquement à 570 nm.

2. Appareillage
2.1. Colonne de verre de 300 mm environ de longueur et de 10-11 mm de diamètre intérieur munie d'un régulateur de débit (robinet).

2.2. Spectrophotomètre permettant des mesures entre 300 et 700 nm et cuves de 1 cm de trajet optique.

3. Réactifs
3.1. Glycérol, $C_3H_8O_3$

3.2. 2,3-Butanediol, $C_4H_{10}O_2$

3.3. Échangeur d'anions de forte basicité, par exemple échangeur III de Merck ou Amberlite IRA 400.

3.4. Polyvinylpyrolidone polymérisé (PVPP). (Voir *Codex œnologique international*).

3.5. Solution d'acide périodique O,1 M dans de l'acide sulfurique 0,05 M :
Peser 10,696 g de métaperiodate de sodium ($NaIO_4$) ; dissoudre dans un ballon jaugé de 500 ml avec 50 ml d'acide sulfurique 0,5 M ; amener au trait de jauge avec de l'eau distillée.

3.6. Solution d'acide périodique 0,05 M dans de l'acide sulfurique 0,025 M :
Diluer la solution précédente avec de l'eau distillée 1 + 1.

3.7. Solution d'acide sulfurique 0,5 M.

3.8. Solution d'hydroxyde de sodium 1 M.

3.9. Solution d'hydroxyde de sodium à 5 p. 100 (m/v).

3.10. Alcool à 96% 100 vol.

3.11. Solution de phloroglucine à 2 p. 100 (m/v) à renouveler tous les jours.

3.12. Solution d'acétate de sodium anhydre, Na CH_3COO à 27 p. 100 (m/v).

3.13. Solution de nitroprussiate de sodium, $Na_2Fe(CN)_5NO.2H_2O$ à 2 p. 100 (m/v) à renouveler tous les jours.

3.14. Solution de pipéridine $C_5H_{11}N$ à 25 p. 100 (v/v) ; à renouveler tous les jours.

3.15. Solution étalon de Glycérol.

Préparer une solution contenant 250 mg dans 100 ml de l'échantillon du glycérol dont on dispose et déterminer le titre en glycérol de cet échantillon par la méthode enzymatique ou par periodimétrie (voir ci-dessous en 6).

Préparer ensuite la solution étalon de glycérol en pesant dans une fiole jaugée de 100 ml une masse « m » correspondant à 250 mg de glycérol pur ; porter au trait de jauge avec de l'eau.

3.16. Solution étalon de 2,3-butanediol

Préparer une solution contenant 250 mg dans 100 ml de l'échantillon de 2,3 butanediol dont on dispose et déterminer le titre en 2,3 butanediol de cet échantillon par periodimétrie (voir ci-dessous en 6).

Préparer ensuite la solution étalon de 2,3 butanediol en pesant dans une fiole jaugée de 100 ml une masse « m » correspondant à 250 mg de 2,3-butanediol pur ; porter au trait de jauge avec de l'eau.

3.17 Solution cupro-alcaline.

Solution cuprique A

Sulfate de cuivre, $CuSO_4.5H_20$	40 g
Acide sulfurique (r=1.84 g/mL)	2 ml
Eau q.s.p	1000 ml

Solution tartro-alcaline B

Tartrate de sodium et de potassium,

$KNaC_4H_4O_6.4H_2O$	200 g
Hydroxyde de sodium	150 g
Eau q.s.p	1000 ml

La solution cupro-alcaline est obtenue en mélangeant, au moment de l'emploi, les solutions A et B à parties égales.

4. Mode opératoire

4.1. *Préparation de la colonne d'échangeur d'anions*

La résine échangeuse d'anions (qui se trouve en général sous la forme $C1^-$) doit être conservée dans un flacon en étant recouverte d'eau distillée décarboniquée.

Introduire 30 ml de résine échangeuse d'anions dans la colonne. Placer à la partie supérieure de la colonne un tampon de coton de verre ; on évite ainsi les inclusions d'aire dans le lit de résine. Faire passer 150 ml de solution

d'hydroxyde de sodium à 5 p. 100 avec un débit de 3,5 à 5 ml par minute et faire passer ensuite avec le même débit une quantité d'eau distillée décarboniquée jusqu'à réaction neutre ou légèrement alcaline à la phénolphtaléine. La résine est alors prête à l'emploi.

L'échangeur d'anions ne peut servir qu'une seule fois. Après, il doit être régénéré avec de l'acide chlorhydrique à 5 p. 100 pendant quelques heures ; on lave ensuite avec de l'eau jusqu'à ce que l'eau de rinçage soit exempte de chlorures (vérifier l'absence de chlorures).

4.2. *Préparation de l'échantillon*

Diluer le vin au 1/5 (10 ml/50 ml).

Dans le cas de vins fortement colorés, procéder à une décoloration préalable ay moyen de PVPP : placer 10 ml de vin dans une fiole jaugée de 50 ml ; diluer avec de l'eau (20 ml) et ajouter 300 mg de PVPP ; agiter de temps en temps pendant 20 minutes, ajuster au trait de jauge et filtrer sur papier filtre plissé.

Prélever 10 ml de la dilution de vin (traité ou non au PVPP) et les mettre sur l'échangeur d'anions. Laisser le vin dilué s'écouler goutte à goutte de façon à ne pas dépasser un débit de 2 ml par minute. Quand le niveau du vin dilué arrive à 5-10 mm au-dessus du coton de verre, faire passer de l'eau distillée décarboniquée en quantité suffisante pour amener le volume de l'éluat à 100 ml, à la vitesse de 2-3 ml par minute. Il faut vérifier que l'éluat est exempt de sucres. Pour cela, on fait bouillir brièvement 5 ml d'éluat avec 5 ml de solution cuproalcaline ; il ne doit se produire ni coloration ni précipité.

4.3. *Dosage du glycérol*.

4.3.1. Dosage photométrique.

Introduire dans une fiole conique de 100 ml à bouchage émeri :

10 ml d'éluat et ajouter successivement
10 ml d'eau distillée et
10 ml de solution 0,05 M d'acide périodique.

Agiter avec précaution pour bien mélanger et laisser l'oxydation s'effectuer pendant 5 minutes (exactement mesurées). Ajouter ensuite : 10 ml de solution d'hydroxyde de sodium 1 M et 5 ml d'alcool à 96% vol.

Agiter après chaque addition, puis ajouter : 10 ml de solution de phloroglucine.

Mélanger rapidement et transvaser la solution dans la cuve spectrophotométrique de 1 cm de trajet optique. La coloration violette obtenue évolue très rapidement, son intensité passe par un maximum au bout de 50 à 60 secondes et diminue ensuite. Noter l'absorbance maximale. La mesure est effectuée par rapport à une couche d'aire équivalente à la longueur d'onde de 480 nm.

4.3.2. Etablissement de la courbe d'étalonnage.

Mettre dans des fioles jaugées de 100 ml :

3,0 – 4,0 – 5,0 - 6,0 – 7,0 et 8,0 ml de solution étalon de glycérol et ajuster aux traits de jauge avec de l'eau distillée.

Ces solutions correspondent, dans les conditions décrites au point 4.2., aux concentrations suivantes :

3,75 – 5,00 – 6,25 – 7,50 – 8,75 et 10,00 g/l de glycérol.

Procéder au dosage décrit en 4.3.1. en mettant à chaque fois le même volume de solution-étalon à la place de l'éluat. La droite d'étalonnage ne passe pas par l'origine.

4.4. *Dosage du 2,3-butanediol*

4.4.1. Dosage photométrique

Introduire dans une fiole conique de 100 ml à bouchage émeri :

20 ml d'éluat et ajouter successivement :

5 ml de la solution d'acétate de sodium et

5 ml de la solution 0,1 M d'acide périodique.

Agiter doucement pour mélanger et laisser au repos 2 minutes exactement pour que l'oxydation se produise.

Ajouter :

5 ml de la solution de nitroprussiate de sodium et

5 ml de la solution de pipéridine.

Transvaser la solution dans la cuve spectrophotométrique de 1 cm d'épaisseur. La coloration violette obtenue évolue très rapidement : son intensité est maximale au bout de 30 à 40 secondes et diminue ensuite. Noter l'absorbance maximale. La mesure est effectuée par rapport à la couche d'aire équivalente sur la longueur d'onde de 570 nm.

4.4.2. Etablissement de la courbe d'étalonnage

Mettre 10,0 ml de solution étalon de 2,3-butanediol dans une fiole jaugée de 100 ml et ajuster au trait de jauge avec de l'eau distillée. A partir de cette solution, préparer les solutions étalons en mettant respectivement dans des fioles jaugées de 100 ml :

2,0 – 4,0 – 6,0 – 8,0 et 10,0 ml et en ajustant à chaque fois au trait de jauge avec de l'eau distillée.

Ces solutions correspondent, dans les conditions décrites en 4.2., aux concentrations suivantes :

0,25 – 0,50 – 0,75 – 1,00 et 1,25 g/l de 2,3-butanediol.

Procéder au dosage décrit au point 4.4.1. en mettant à la place de l'éluat le même volume de chacune des solutions étalons. La droite d'étalonnage ne passe pas par l'origine.

5. Calcul et expression des résultats

5.1. *Glycérol*

5.1.1. Mode de calcul

Lire la teneur en glycérol sur la courbe d'étalonnage. Le résultat s'exprime en g/l avec une décimale.

5.1.2. Répétabilité

5.1.3. Reproductibilité

5.2. 2,3-Butanediol

5.2.1. Mode de calcul
Lire la teneur en 2,3-butanedial sur la courbe d'étalonnage. Le résultat s'exprime en g/l avec deux décimales.

5.2.2. Répétabilité

5.2.3. Reproductibilité

6. Titrage Périodimétrique du glycérol et du 2,3-butanediol.

6.1. *Réactifs.*

6.1.1. Solution d'hydroxyde de sodium 1 M

6.1.2. Solution d'acide sulfurique 0,5 M

6.1.3. Solution d'acide périodique 0,025 M

6.1.4. Solution d'hydrogénocarbonate de sodium, $NaHCO_3$ à 8 p. 100 (m/v).

6.1.5 Solution d'arsénite de sodium 0,025 M.

Dans une fiole jaugée de 1000 ml, dissoudre 2,473 g d'anhydride arsénieux, As_2O_3 avec 30 ml d'hydroxyde de sodium 1 M, ajouter 35 ml d'acide sulfurique 0,5 M et ajuster au trait de jauge avec de l'eau distillée.

6.1.6. Solution d'iode 0,025 M.

6.1.7. Solution d'iodure de potassium à 10 p. 100 (m/v).

6.1.8. Solution d'empois d'amidon à 2 p. 100 (m/v).

6.2. *Mode opératoire*

Dans une fiole conique de 300 ml, mettre :
5 ml de la solution de l'échantillon de glycérol (3.15)
45 ml d'eau distillée
ou 25 ml de la solution de l'échantillon de 2,3-butanediol (3.16)
25 ml d'eau distillée.

Ajouter alors :
20 ml d'acide périodique 0,025 M, puis laisser au repos 15 minutes en agitant de temps en temps,
10-20 ml de solution d'hydrogénocarbonate de sodium
20 ml de la solution d'arsénite de sodium,

Laisser au repos 15 minutes en agitant de temps en temps, ajouter :

5 ml de la solution d'iodure de potassium
2 ml d'empois d'amidon.

Titrer l'arsénite de sodium excédentaire avec la solution d'iode 0,025 M.

Effectuer parallèlement un essai à blanc en utilisant 50 ml d'eau distillée et les même quantités de réactifs.

6.3. *Mode de calcul*

6.3.1. Glycérol

1 ml d'acide périodique 0,025 M oxyde 1,151 mg de glycérol.

La teneur en glycérol en g/l de la solution de l'échantillon de glycérol (3-15) est :

$$G = \frac{(X-B) \times 1{,}151}{\alpha}$$

Le titre en p. 100 en glycérol de l'échantillon de glycérol (3.1) utilisé est :

$$\frac{G}{2{,}5} \times 100$$

X = ml de la solution d'iode 0,025 M. consommés par la solution de l'échantillon utilisé (3.15).
B = ml de la solution d'iode 0,025 M consommés dans l'essai à blanc.
a = ml de la prise d'essai de la solution (3.15) (égal à 5 ml)

6.3.2. 2,3-Butanediol

1 ml d'acide périodique 0,025 M oxyde 2,253 mg de 2,3-butanediol.

La teneur en 2,3-butanediol en g/l de la solution de l'échantillon de 2,3-butanediol (3.16.) est :

$$BD = \frac{(X' - B') \times 2{,}253}{b}$$

Le titre en p.100 en 2,3-butanediol de l'échantillon de 2,3 butanediol (3.2) utilisé est

$$\frac{BD}{2{,}5} \times 100$$

X' = ml de la solution d'iode 0,025 M. consommés par la solution de l'échantillon utilisé (3.16).
B' = ml de la solution d'iode 0,025 M consommés dans l'essai à blanc
B = ml de la prise d'essai de la solution (3.16) (étal à 25 ml).

BIBLIOGRAPHIE

REBELEIN H., Z. *Lebensm. Unters. U. Forsch*., 1957, **4**, 296, *F.V. O.I.V*., N° 63.
TERCERO C., SANCHEZ O., *F.V. O.I.V.,* 1977, n° 651 et 1981, N° 731

Méthode OIV-MA-AS312-05 Méthode Type IV

Glycérol

(Recueil OIV ed. 1990, révision par OIV/OENO 377/2009)

1. **Principe**

La glycérokinase (GK) catalyse la phosphorylation du glycérol en glycérol-3-phospate par l'adénosine-5'-triphosphate (ATP) (1) :

(1) $$\text{Glycerol + ATP} \xrightleftharpoons{\text{GK}} \text{glycerol-3-phosphate + ADP}$$

L'adénosine-5'-diphosphate (ADP) formé est à nouveau transformé en ATP par le phosphoénol-pyruvate (PEP) en présence de pyruvate-kinase (PK) avec formation de pyruvate (2) :

(2) $$\text{ADP + PEP} \xrightleftharpoons{\text{PK}} \text{ATP + pyruvate}$$

Le pyruvate est réduit en lactate par le nicotinamide-adénine dinucléotide réduit (NADH) en présence de lactate-déshydrogénase (LDH) (3) :

(3) $$\text{pyruvate + NADH + H}^+ \xrightleftharpoons{\text{LDH}} \text{lactate + NAD}^+$$

La quantité de NAD+ formé durant la réaction est proportionnelle à la quantité de glycérol. L'oxydation de NADH est mesurée par la diminution de son extinction à la longueur d'onde de 334 nm, 340 nm ou 365 nm.

2. Appareillage

2.1. 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 ou à 365 nm.

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

2.3. Micropipettes permettant de prélever des volumes allant de 0,02 à 2 ml.

3. Réactifs

3.1. Tampon (glycylglycine 0,75 M, Mg^{2+} 10^{-3} M, pH = 7,4) :

Dissoudre 10,0 g de glycylglycine et 0,25 g de sulfate de magnésium, $MgSO_4,7H_20$, dans environ 80 ml d'eau bidistillée ; ajouter environ 2,4 ml de NaOH (5M) pour obtenir un pH de 7,4 et ajuster le volume à 100 ml.

Cette solution peut se conserver environ trois mois à + 4°C.

3.2. (NADH 8,2.10^{-3} M, ATP 33. 10^{-3} M, PEP 46. 10^{-3} M)

Dissoudre :
42 mg de nicotinamide-adénine-dinucléotide réduit – Na_2,
120 mg d'adénosine-5'-triphosphate, Na_2H_2,
60 mg de phosphoénolpyruvate, Na et
300 mg d'hydrogénocarbonate de sodium ($NaHCO_3$)
dans 6 ml d'eau bidistillée.

Cette solution se conserve pendant 2-3 jours à + 4 °C.

3.3. Pyruvate-kinase/lactate-déshydrogénase (PK/LDH)
(3 mg PK/ml, 1 mg LDH/ml)

Utiliser la suspension sans la diluer.
Le mélange peut se conserver environ un an à + 4 °C.

3.4. Glycérokinase, GK –(1 mg/ml)

La suspension peut se conserver environ un an à + 4 °C.

Remarque : L'ensemble des réactifs nécessaires pour ce dosage est commercialisé.

4. Préparation de l'échantillon

Le dosage du glycérol s'effectue généralement directement sur le vin, après dilution avec de l'eau bidistillée de sorte que la concentration en glycérol de la dilution se situe entre 30 et 500 mg/l (quantité de glycérol dans la prise d'essai comprise entre 3 et 50 µg). Une dilution au 1/50 (2 ml dans 100 ml) est généralement suffisante.

5. Mode opératoire

Le spectrophotomètre étant réglé sur la longueur d'onde 340nm, 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).

Dans les cuves de 1 cm de trajet optique introduire :

	Témoin	Dosage
Solution 3.1	1,00 ml	1,00 ml
Solution 3.2	0,10 m 1	0,10 ml
Essai	-	0,10 ml
Eau	2,00 ml	1,90 ml
Suspension 3.3.	0,01 ml	0,01 ml

Mélanger ; au bout de 5 min. environ, lire les absorbances (A_1). Déclencher la réaction par addition de :

Suspension 3.4	0,01 ml	0,01 ml

Mélanger, attendre la fin de la réaction (environ 5 à 10 min.) et lire les absorbances des solutions (A_2). Si la réaction n'est pas terminée au bout de 10 min., continuer à lire les absorbances de 2 min. en 2 min., jusqu'à ce que la diminution de l'absorbance soit constante sur 2 min.
Déterminer les différences d'absorbance :

$$A_2 - A_1$$

pour le témoin et pour le dosage.

Déduire la différence d'absorbance du témoin (ΔA_T) de celle du dosage (ΔA_D) et établir :

$$(\Delta A = (\Delta A_D) - (\Delta A_T)$$

6. Expression des résultats

6.1. *Mode de calcul*

La concentration en grammes par litre est donnée par la formule générale :

$$C = \frac{V \times PM}{\varepsilon \times d \times v \times 1000} \times \Delta A$$

V = volume du test en ml (ici 3,12 ml)
v = volume de l'échantillon en ml (ici 0,1 ml)
PM = poids moléculaire de la substance à doser (ici glycérol = 92,1)
d = trajet optique de la cuve (ici 1 cm)
ε = coefficient d'absorption du NADH à 340 nm :

$$\varepsilon = 6{,}3 \text{ (mmole}^{-1} \times l \times \text{cm}^{-1})$$

On obtient :

$$C = 0{,}456 \times \Delta A \times F$$

F = facteur de dilution

Remarque :
- mesure à 334 nm, $\varepsilon = 6{,}2$ ($\text{mmole}^{-1} \times l \times \text{cm}^{-1}$)

$$C = 0{,}463 \times \Delta A \times F$$

- mesure à 365 nm; $\varepsilon = 3{,}4$ ($\text{mmole}^{-1} \times l \times \text{cm}^{-1}$)

$$C = 0{,}845 \times \Delta A \times F$$

6.2. *Répétabilité*

6.3. *Reproductibilité*

BIBLIOGRAPHIE

BOEHRINGER , Mannheim, *Méthodes d'analyse enzymatique en chimie alimentaire*, documentation technique.

Méthode OIV-MA-AS312-06 Méthode Type II

Determination par spectrometrie de masse isotopique du rapport d'isotopes $^{13}C/^{12}C$ de l'ethanol du vin ou de celui obtenu par fermentation des mouts, des mouts concentres ou du sucre de raisin

(Résolution OENO 17/2001)

1. CHAMP D'APPLICATION

La méthode permet la mesure du rapport isotopique $^{13}C/^{12}C$ de l'éthanol du vin et de celui de l'éthanol obtenu après fermentation des produits dérivés de la vigne (moût, moût concentré, sucre de raisin).

2. REFERENCES NORMATIVES

ISO 5725 : 1994 « Fidélité des méthodes d'essai- Détermination de la répétabilité et de la reproductibilité d'une méthode d'essai normalisée par essais interlaboratoires. »

V-PDB : Vienna-Pee-Dee Belemnite (R_{PDB} = 0,0112372).

Méthode OIV «Détection de l'enrichissement des moûts , des moûts concentrés, du sucre de raisin et des vins par application de la résonance magnétique nucléaire du deutérium (RMN-FINS): »

3. TERMES ET DEFINITIONS

$^{13}C/^{12}C$: rapport des isotopes du carbone 13 et du carbone 12 pour un échantillon donné

$\delta^{13}C$: teneur en carbone 13 (^{13}C) exprimée en parties pour mille (‰)

RMN-FINS : Fractionnement Isotopique Naturel Spécifique étudié par Résonance Magnétique Nucléaire

V-PDB : Vienna-Pee-Dee Belemnite. Le PDB, référence primaire pour la mesure des variations naturelles des teneurs isotopiques en carbone 13, était un carbonate de calcium provenant d'un rostre de bélemnite du Crétacé de la formation Peedee de la Caroline du sud (USA). Son rapport isotopique $^{13}C/^{12}C$ ou R_{PDB} est

R_{PDB} = 0,0112372. Le PDB est épuisé depuis longtemps mais est resté la référence primaire pour exprimer les variations naturelles des teneurs isotopiques en carbone 13, contre laquelle sont calibrés les matériaux de référence, disponibles à l'Agence Internationale de l'Energie Atomique (IAEA) à Vienne (Autriche).

Les déterminations isotopiques des abondances naturelles en carbone 13 sont alors exprimées, par convention, par rapport au V-PDB.

m/z : rapport masse sur charge

4. PRINCIPE

Lors de la photosynthèse, l'assimilation du gaz carbonique par les végétaux s'effectue selon deux principaux types de métabolismes qui sont les métabolismes C_3 (cycle de Calvin) et C_4 (Hatch et Slack). Ces deux mécanismes de photosynthèse présentent un fractionnement isotopique différent. Ainsi, les produits issus des plantes C_4 , tel que les sucres et l'alcool dérivé par fermentation, présentent des teneurs en carbone 13 plus élevées que celles de leurs homologues provenant des plantes C_3. La plupart des végétaux tels que la vigne et la betterave, appartiennent au groupe C_3. La canne à sucre et le maïs appartiennent au groupe C_4. La mesure de la teneur en carbone 13 permet donc la détection et la quantification du sucre d'origine C_4 (sucre de canne ou l'isoglucose de maïs) ajouté aux produits dérivés du raisin (moûts de raisins, vins...). Les informations combinées de la teneur en carbone 13 avec celles obtenues par RMN-FINS permettent également la quantification de l'addition de mélanges de sucres ou d'alcools d'origine des plantes C_3 et C_4.

La teneur en carbone 13 est déterminée sur le gaz carbonique résultant de la combustion complète de l'échantillon. Les abondances des principaux isotopomères de masses 44 ($^{12}C^{16}O_2$), 45 ($^{13}C^{16}O_2$ et $^{12}C^{17}O^{16}O$) et 46 ($^{12}C^{16}O^{18}O$), résultant des différentes combinaisons possibles des isotopes ^{18}O, ^{17}O, ^{16}O, ^{13}C et ^{12}C, sont déterminées à partir des courants ioniques mesurés sur trois collecteurs différents d'un spectromètre de masse isotopique. Les contributions des isotopomères $^{13}C^{17}O^{16}O$ et $^{12}C^{17}O_2$ peuvent être négligées en raison de leur très faible abondance. Le courant ionique pour m/z = 45 est corrigé de la contribution de $^{12}C^{17}O^{16}O$ qui est calculée en fonction de l'intensité du courant mesuré pour m/z = 46 en considérant les abondances relatives de ^{18}O et ^{17}O (correction de Craig). La comparaison avec une référence calibrée contre la référence internationale V-PDB permet le calcul de la teneur en carbone 13 sur l'échelle relative $\delta^{13}C$.

5. REACTIFS

Les matériaux et les consommables dépendent de l'appareillage (6) utilisé par le laboratoire. Les systèmes généralement utilisés sont ceux fondés sur l'analyseur élémentaire. Celui ci peut être équipé pour l'introduction d'échantillons placés dans des capsules métalliques scellées, ou pour l'injection d'échantillons liquides à travers un septum au moyen d'une seringue.

Selon le type d'instrumentation utilisé, les matériaux de référence, réactifs et consommables suivants peuvent être utilisés :

- Matériaux de référence disponibles auprès de l'IAEA :

Nom	Matériel	$\delta^{13}C$ versus V-PDB (9)
- IAEA-CH-6	saccharose	-10,4 ‰
-IAEA-CH-7	polyéthylène	-31,8 ‰
- NBS22	huile	-29,7 ‰
- USGS24	graphite	-16,1 ‰

disponibles auprès de l'IRMM de Geel (B) (Institut des Matériaux et Mesures de Référence) :

Nom	Matériel	$\delta^{13}C$ versus V-PDB (9)
- CRM 656	alcool de vin	-26,93 ‰
- CRM 657	glucose	-10,75 ‰
- CRM 660	solution hydroalcoolique (TAV 12%)	-26,72 ‰

Echantillon standard de travail ayant un rapport $^{13}C/^{12}C$ connu calibré contre les matériaux de référence internationaux.

La liste indicative de consommables ci-dessous est établie pour les systèmes à flux continu :

- Hélium pour analyse (CAS 07440-59-7)
- Oxygène pour analyse (CAS 07782-44-7)
- Dioxyde de carbone pour analyse, utilisé comme gaz de référence secondaire pour la teneur en carbone 13 (CAS 00124-38-9)
- Réactif d'oxydation pour le four du système de combustion comme par exemple oxyde de cuivre (II) pour analyse élémentaire (CAS 1317-38-0)
- Desséchant pour éliminer de l'eau produite par la combustion. Par exemple anhydrone pour analyse élémentaire (perchlorate de magnésium) (CAS 10034-81-8).

Non nécessaire pour les appareillages équipés avec un sytème d'élimination de l'eau par cryopiégeage ou au moyen d'un capillaire sélectivement perméable.

6. APPAREILLAGE ET MATERIEL

6.1. Spectromètre de masse de rapport isotopique (SMRI)

Spectromètre de masse de rapport isotopique (SMRI), permettant de déterminer la teneur relative de ^{13}C du gaz CO_2 en abondance naturelle avec une précision interne de 0,05 ‰ ou mieux exprimée en valeur relative (9). La précision interne

est ici définie comme la différence entre deux mesures du même échantillon de CO_2. Le spectromètre de masse, destiné à la mesure des rapports isotopiques, est généralement équipé d'un collecteur triple pour mesurer simultanément les intensités pour m/z = 44, 45 et 46. Le spectromètre de masse de rapport isotopique doit, soit être équipé d'un système d'introduction double, pour mesurer en alternance l'échantillon inconnu et un échantillon de référence, soit utiliser un système intégré qui effectue la combustion quantitative des échantillons et sépare le dioxyde de carbone des autres produits de combustion préalablement à la mesure dans le spectromètre de masse.

6.2. Appareillage de combustion

Appareillage de combustion capable de convertir quantitativement l'éthanol en dioxyde de carbone et d'éliminer tous les autres produits de combustion y compris l'eau sans aucun fractionnement isotopique. L'appareillage peut être, soit un système à flux continu intégré à l'instrumentation de spectrométrie de masse (6.2.1), soit un système de combustion autonome (6.2.2). L'appareillage doit permettre d'obtenir une précision au moins équivalente à celle indiquée en (11).

6.2.1. Systèmes à flux continu

Ceux-ci sont constitués soit par un analyseur élémentaire, soit par un chromatographe en phase gazeuse équipé d'un système de combustion en ligne.

Pour les systèmes équipés pour l'introduction des échantillons contenus dans des capsules métalliques, le matériel de laboratoire suivant est utilisé :

- micropipette volumétrique avec cônes appropriés
- balance à 1 µg de précision ou mieux
- pince pour encapsulage
- capsules d'étain pour échantillons liquides
- capsules d'étain pour échantillons solides

Lors de l'utilisation d'un analyseur élémentaire équipé d'un injecteur pour liquides ou dans le cas d'un système de préparation par chromatographie-combustion, le matériel de laboratoire suivant est utilisé :

- seringue pour liquides
- flacons équipés d'un système de fermeture étanche et de septa inertes.

Les matériels de laboratoire indiqués dans les listes ci-dessus constituent des exemples et sont susceptibles d'être remplacés par d'autres matériels de performances équivalentes selon le type d'appareillage de combustion et de spectrométrie de masse utilisé par le laboratoire.

6.2.2. Systèmes autonomes de préparation

Dans ce cas, les échantillons de dioxyde de carbone résultant de la combustion des échantillons à analyser et de la référence sont collectés dans des ampoules qui sont ensuite installées au double système d'entrée du spectromètre pour réaliser l'analyse isotopique. Plusieurs types d'appareillages de combustion décrits dans la littérature sont utilisables:

- Système clos de combustion rempli avec du gaz oxygène circulant
- Analyseur élémentaire avec flux d'hélium et d'oxygène
- Ampoule scellée en verre remplie avec de l'oxyde de cuivre (II) comme agent d'oxydation

7. PREPARATION DES ECHANTILLONS POUR ESSAI

L'éthanol doit être extrait à partir du vin avant détermination isotopique. Cette extraction est effectuée par la distillation du vin comme décrit dans §3.1 de la méthode RMN-FINS.

Dans le cas du moût de raisins, du moût de raisins concentré et du moût de raisins concentré rectifié (sucre de raisin), les sucres doivent être fermentés en éthanol, d'abord comme décrit dans §3.2 de la méthode RMN-FINS.

8. MODE OPERATOIRE

Toutes les étapes préparatoires doivent être effectuées sans aucune perte significative d'éthanol par évaporation qui changerait la composition isotopique de l'échantillon.

La description qui suit fait référence aux procédures généralement utilisées pour la combustion des échantillons d'éthanol au moyen des systèmes automatisés de combustion commerciaux. Toute autre méthode, assurant que l'échantillon d'éthanol est quantitativement converti en dioxyde de carbone sans aucune perte par évaporation d'éthanol peut convenir pour la préparation du dioxyde de carbone pour l'analyse isotopique.

Procédure expérimentale fondée sur l'utilisation d'un analyseur élémentaire :

a) Mise en capsule des échantillons :

- utiliser des capsules, une pince et un plateau de préparation propres
- prendre une capsule de la dimension appropriée à l'aide de la pince
- introduire le volume nécessaire de liquide dans la capsule à l'aide de la micropipette

Note: 3,84 mg d'éthanol absolu ou 4,17 mg de distillat ayant un titre alcoolique de 92% m/m sont nécessaires pour obtenir 2 mg de carbone. La quantité appropriée de distillat doit être calculée de la même manière selon la quantité de carbone nécessaire en fonction de la sensibilité de l'instrumentation de spectrométrie de masse.

- refermer la capsule à l'aide des pinces.
- chaque capsule doit être fermée de façon absolument étanche. En cas contraire, elle doit être rejetée et une nouvelle capsule doit être repréparée.
- pour chaque échantillon, préparer deux capsules.
- placer les capsules à l'endroit approprié sur le plateau du passeur automatique d'échantillon de l'analyseur élémentaire. Chaque capsule doit être soigneusement identifiée par un numéro d'ordre.
- placer systématiquement des capsules contenant les références de travail au début et à la fin de la série d'échantillons.
- insérer régulièrement des échantillons de contrôle dans la série d'échantillons.

b) Contrôle et ajustement de l'instrumentation d'analyse élémentaire et de spectrométrie de masse

- ajuster la température des fours de l'analyseur élémentaire et les flux de gaz d'hélium et d'oxygène pour une combustion optimale de l'échantillon.
- vérifier l'absence de fuite dans le système d'analyse élémentaire et de spectrométrie de masse (par exemple en contrôlant le courant ionique pour m/z = 28 correspondant à N_2.).
- ajuster le spectromètre de masse pour mesurer les intensités des courants ioniques pour m/z = 44, 45 et 46.
- vérifier le système à l'aide d'échantillons de contrôle connus avant de commencer les mesures sur les échantillons.

c) Déroulement d'une série de mesures

Les échantillons placés sur le passeur automatique d'échantillons de l'analyseur élémentaire (ou du chromatographe) sont introduits successivement. Le dioxyde de

carbone de chaque combustion d'échantillon est élué vers le spectromètre de masse qui mesure les courants ioniques. L'ordinateur interfacé à l'instrumentation enregistre les intensités des courants ioniques et calcule les valeurs δ pour chaque échantillon (9).

9. CALCUL

L'objectif de la méthode est de mesurer le rapport isotopique $^{13}C/^{12}C$ de l'éthanol extrait à partir du vin ou à partir des produits dérivés du raisin après fermentation. Le rapport isotopique $^{13}C/^{12}C$ peut être exprimé par sa déviation par rapport à une référence de travail. La déviation isotopique carbone 13 ($\delta\ ^{13}C$) est alors calculée sur une échelle delta pour mille par comparaison des résultats obtenus pour l'échantillon à mesurer contre ceux de la référence de travail précédemment calibrée par rapport à la référence primaire internationale (V-PDB). Les valeurs $\delta\ ^{13}C$ sont exprimées par rapport à la référence de travail selon :

$$\delta^{13}C_{ech/ref}‰ = 1000 \times (R_{ech}-R_{ref})/R_{ref}$$

où R_{ech} et R_{ref} sont respectivement les rapports isotopiques $^{13}C/^{12}C$ de l'échantillon et ceux de la référence de travail.

Les valeurs $\delta\ ^{13}C$ sont alors exprimées par rapport au V-PDB selon :

$$\delta^{13}C_{ech/V\text{-}PDB}‰ = \delta^{13}C_{ech/ref} + \delta^{13}C_{ref/V\text{-}PDB} + (\delta^{13}C_{ech/ref} \times \delta^{13}C_{ref/V\text{-}PDB})/1000$$

où $\delta^{13}C_{ref/V\text{-}PDB}$ est la déviation isotopique préalablement déterminée pour la référence de travail contre le V-PDB.

Pendant la mesure en ligne des petites dérives dues à la variation, des conditions instrumentales peuvent être observées. Dans ce cas, les $\delta\ ^{13}C$ des échantillons doivent être corrigés en fonction de la différence de la valeur $\delta^{13}C$ de la référence de travail et sa valeur vraie, précédemment calibrée contre le V-PDB par comparaison avec l'un des matériaux de référence international. Entre deux mesures de la référence de travail, la dérive et donc la correction à appliquer aux résultats des échantillons peuvent être assumées linéaires. La référence de travail doit être mesurée en début et en fin de toute série d'échantillons. Une correction peut ensuite être calculée pour chaque échantillon au moyen d'une interpolation linéaire entre les deux valeurs des différences entre la valeur assignée à la référence de travail et les mesures de valeurs obtenues.

10. ASSURANCE QUALITE ET CONTROLE

Contrôler que la valeur ^{13}C pour la référence de travail ne diffère pas de plus de 0,5‰ de la valeur admise. En cas contraire, les réglages de l'instrumentation du spectromètre devront être contrôlés et éventuellement réajustés.

Pour chaque échantillon, vérifier que la différence de résultat entre les deux capsules mesurées successivement est inférieure à 0,3 ‰. Le résultat final pour un échantillon donné est alors la valeur moyenne des deux capsules. Si la déviation est plus élevée que 0,3‰, la mesure doit être répétée.

Un contrôle du fonctionnement correct de la mesure peut être fondé sur l'intensité du courant ionique pour $m/z = 44$ qui est proportionnel à la quantité de carbone injectée dans l'analyseur élémentaire. Dans les conditions type, l'intensité de ce courant ionique devrait être pratiquement constante pour les échantillons en analyse. Une déviation significative doit conduire à soupçonner une évaporation d'éthanol (par exemple une capsule imparfaitement scellée) ou bien une instabilité de l'analyseur élémentaire ou du spectromètre de masse.

11. CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE DE LA METHODE (Précision)

Une première analyse collaborative (11.1) a été réalisée sur des distillats comportant des alcools d'origine vinique, et des alcools de canne et de betterave ainsi que différents mélanges de ces trois origines. Cette étude n'ayant pas pris en compte l'étape de distillation, des informations complémentaires provenant d'autres essais interlaboratoires réalisés sur des vins (11.2) et notamment des circuits de tests d'aptitudes (11.3) pour les mesures isotopiques ont également été considérées. Les résultats démontrent que les différents systèmes de distillation utilisés dans des conditions satisfaisantes, et en particulier ceux applicables pour les mesures RMN-FINS, n'apportent pas de variabilité significative pour les déterminations $\delta^{13}C$ de l'éthanol du vin. Les paramètres de fidélité observés pour les vins sont quasiment identiques à ceux obtenus lors de l'étude collaborative (11.1) sur les distillats.

11.1. Étude collaborative sur les distillats

Année de l'essai interlaboratoires : 1996

Nombre de laboratoires : 20

Nombre d'échantillons 6 échantillons en double aveugle

Analyte : $\delta\ ^{13}C$ de l'éthanol

Code des échantillons	Alcool d'origine vinique	Alcool de betterave	Alcool de canne
A & G	80%	10%	10%
B & C	90%	10%	0%
D & F	0%	100%	0%
E & I	90%	0%	10%
H & K	100%	0%	0%
J & L	0%	0%	100%

Échantillons	A / G	B / C	D / F	E / I	H / K	J / L
Nombre de laboratoires retenus après élimination des résultats aberrants	19	18	17	19	19	19
Nombre de résultats acceptés	38	36	34	38	38	38
Valeur moyenne ($\delta\ ^{13}C$) ‰	-25,32	-26,75	-27,79	-25,26	-26,63	-12,54
Sr^2	0,0064	0,0077	0,0031	0,0127	0,0069	0,0041
Écart-type de répétabilité (Sr) ‰	0,08	0,09	0,06	0,11	0,08	0,06
Limite de répétabilité r ($2,8\times S_r$) ‰	0,22	0,25	0,16	0,32	0,23	0,18
S_R^2	0,0389	0,0309	0,0382	0,0459	0,0316	0,0584
Écart-type de reproductibilité (S_R) ‰	0,20	0,18	0,20	0,21	0,18	0,24
Limite de reproductibilité R ($2,8\times S_R$) ‰	0,55	0,49	0,55	0,60	0,50	0,68

11.2. *Etude interlaboratoires sur deux vins et un alcool*

Année de l'essai interlaboratoires : 1996

Nombre de laboratoires : 14 pour la distillation des vins dont 7 pour également la mesure $\delta\ ^{13}C$ de l'éthanol des vins

8 pour la mesure $\delta\ ^{13}C$ de l'échantillon d'alcool

Nombre d'échantillons 3 (Vin blanc TAV 9,3% vol., Vin blanc de TAV 9,6% vol. et Alcool de titre alcoométrique 93% m/m)

Analyte : $\delta\ ^{13}C$ de l'éthanol

Échantillons	Vin rouge	Vin blanc	Alcool
Nombre de laboratoires	7	7	8
Nombre de résultats acceptés	7	7	8
Valeur moyenne ($\delta\ ^{13}C$) ‰	-26,20	-26,20	-25,08
Variance de reproductibilité S_R^2	0,0525	0,0740	0,0962
Écart-type de reproductibilité (S_R) ‰	0,23	0,27	0,31
Limite de reproductibilité R (2,8× S_R) ‰	0,64	0,76	0,87

Différents systèmes de distillation ont été utilisés par les laboratoires participants. Les déterminations isotopiques $\delta\ ^{13}C$ réalisées dans un seul laboratoire sur l'ensemble des distillats retournés par les participants ne montrent ni valeur aberrante ni valeur significativement distincte des valeurs moyennes. La variance des résultats ($S^2 = 0,0059$) est comparable aux variances de répétabilité Sr^2 de l'étude collaborative sur les distillats (11.1).

11.3. Résultats des exercices des circuits d'aptitude aux essais isotopiques

Depuis décembre 1994 des exercices d'aptitude internationaux pour les déterminations isotopiques sur les vins et alcools (distillats de TAV 96% vol.) sont organisés régulièrement. Les résultats permettent aux laboratoires participants de contrôler la qualité de leurs analyses. L'exploitation statistique des résultats permet d'apprécier la variabilité des déterminations dans des conditions de reproductibilité et donc d'estimer les paramètres de variance et de limite de reproductibilité. Les résultats obtenus pour les déterminations $\delta\ ^{13}C$ de l'éthanol des vins et distillats sont résumés dans le tableau suivant :

	Vins				Distillats			
Date	N	S_R	S^2_R	R	N	S_R	S^2_R	R
Déc. 1994	6	0,210	0,044	0,59	6	0,151	0,023	0,42
Juin 1995	8	0,133	0,018	0,37	8	0,147	0,021	0,41
Déc. 1995	7	0,075	0,006	0,21	8	0,115	0,013	0,32
Mars 1996	9	0,249	0,062	0,70	11	0,278	0,077	0,78
Juin 1996	8	0,127	0,016	0,36	8	0,189	0,036	0,53
Sep. 1996	10	0,147	0,022	0,41	11	0,224	0,050	0,63
Déc. 1996	10	0,330	0,109	0,92	9	0,057	0,003	0,16
Mars 1997	10	0,069	0,005	0,19	8	0,059	0,003	0,16
Juin 1997	11	0,280	0,079	0,78	11	0,175	0,031	0,49
Sep 1997	12	0,237	0,056	0,66	11	0,203	0,041	0,57
Déc. 1997	11	0,127	0,016	0,36	12	0,156	0,024	0,44
Mars 1998	12	0,285	0,081	0,80	13	0,245	0,060	0,69
Juin 1998	12	0,182	0,033	0,51	12	0,263	0,069	0,74
Sep 1998	11	0,264	0,070	0,74	12	0,327	0,107	0,91
Moyenne pondérée		0,215	0,046	0,60		0,209	0,044	0,59

N : nombre de laboratoires participants

12. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Détection de l'enrichissement des moûts, des moûts concentrés, du sucre de raisin et des vins par l'application de la résonance magnétique nucléaire du deutérium (RMN-FINS/SNIF-NMR)

OIV Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts.

E.C. Regulation. Community analytical methods which can be applied in the wine sector, N°.2676/90. Detecting enrichment of grape musts, concentrated grape musts, rectified concentrated grape musts and wines by application of nuclear magnetic resonance of deuterium (SNIF-NMR*)*

Official Journal of the European Communities, NºL 272, Vol 33, 64-73, 3 October 1990.

Interlaboratory study about the determination of $\delta^{13}C$ in wine ethanols

OIV FV Nº 1051

Fidelity of the determination of the $^{13}C/^{12}C$ isotopic ratio of ethanol of wine

OIV FV Nº 1116.

Stable carbon isotope content in ethanol of EC data bank wines from Italy, France and Germany. A Rossmann ; H.-L. Schmidt ; F. Reniero ; G. Versini ; I. Moussa ; M.-H. Merle.

z. Lebensm. Unters. Forsch., 1996, 203, p 293-301.

METHODE OIV-MA-AS312-07 Type de la méthode IV

Méthode de détermination du rapport isotopique $^{13}C/^{12}C$ du glycérol dans les vins par chromatographie gazeuse couplée à un four à combustion ou par chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse de rapport isotopique (CG-C-SMRI)

(OIVOENO 343/2010)

1. CHAMP D'APPLICATION

Les méthodes présentes, fondées sur la chromatographie gazeuse [1] ou la chromatograhie liquide [2] couplée à un spectromètre de masse de rapport isotopique (CG-C-SMRI ou CLHP-SMRI), permettent la mesure du rapport $^{13}C/^{12}C$ de glycérol. Si sa quantification est exigée en même temps que le rapport isotopique $^{13}C/^{12}C$, le CG-C-SMRI peut être utilisé.
L'emploi de pentaméthylèneglycol, en étalon interne, permet également de déterminer la concentration de glycérol au cours de la même analyse du rapport $^{13}C/^{12}C$.

2. DÉFINITIONS

- $^{13}C/^{12}C$: rapport entre l'isotope 13 de carbone (^{13}C) et l'isotope 12 de carbone (^{12}C) pour un échantillon donné.
- $\delta^{13}C$: teneur en carbone 13 (^{13}C) exprimée en parties par millier (‰).
- CG-C-SMRI : technique couplée de chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse de rapport isotopique et à un four à combustion.
- V-PDB : *Vienna-Pee-Dee-Belemnite*. Le PDB est la matière de référence primaire pour la mesure des variations naturelles de la teneur isotopique du carbone 13, consistant en carbonate de calcium issu d'un rostre de bélemnite du Crétacé de la formation Pee Dee de

la Caroline du sud (États-Unis). Son rapport isotopique $^{13}C/^{12}C$ ou R_{PDB} est de 0,0112372. Les réserves de PDB sont épuisées depuis

-
- longtemps, mais cette matière continue de faire fonction de référence primaire pour exprimer les variations naturelles de la teneur isotopique du carbone 13 et pour calibrer les matériaux de référence disponibles auprès de l'AIEA (Agence internationale de l'Énergie atomique) de Vienne, en Autriche. Les déterminations isotopiques des abondances naturelles en carbone 13 sont normalement exprimées par rapport au V-PDB.

3. PRINCIPE

Il existe une importante différence entre la teneur en carbone 13 des sucres végétaux à l'issue des différents cycles de photosynthèse C_3 (cycle de Calvin) et C_4 (Hatch-Slack). La plupart des plantes, comme la vigne et la betterave, appartiennent au groupe C_3 ; tandis que le maïs et la canne à sucre appartiennent au groupe C_4. Les teneurs en carbone 13 du sucre et des métabolites correspondants obtenus par fermentation (éthanol, glycérol) sont corrélées.

La mesure de la teneur en carbone 13 du glycérol peut permettre de détecter l'adjonction de glycérol de maïs (plante C_4) ou de synthèse (sources fossiles) à du vin ou autres boissons alcoolisées.

La séparation du glycérol de la matrice du vin est effectuée au moyen d'un chromatographe en phase gazeuse ou liquide.
Dans le GC-C-SMRI après cette séparation chromatographique, l'effluent est soumis à une combustion puis à une réduction, dans les fours d'oxydation et de réduction d'une interface de combustion. Les composants autres que le glycérol, à savoir le solvant, sont dégazés au moyen d'une soupape de rétrobalayage pendant le cycle de manière à éviter toute contamination des fours et toute interférence dans les chromatogrammes. La teneur en carbone 13 est déterminée sur le dioxyde de carbone produit par l'oxydation du glycérol contenu dans l'échantillon. Une fois le glycol oxydé, il y a production de CO2 et H2O. L'eau produite durant la combustion est éliminée par un piège évacuateur d'eau, consistant en une

membrane de Nafion®. Le dioxyde de carbone est élué par un courant d'hélium vers la source SMRI pour l'analyse $^{13}C/^{12}C$.

Dans le HPLC-SMRI après la séparation chromatographique, l'échantillon est oxydé alors qu'il est encore en phase mobile au niveau de l'interface. Le CO_2 formé est retiré en ligne du flux de solvent via une membrane pour échange de gaz et envoyé dans un écoulement de He. Cet écoulement traverse un piège évacuateur d'eau, consistant en une membrane de Nafion®, avant d'être admis dans la source d'ions du SMRI par une fente.
Les diverses combinaisons possibles des isotopes ^{18}O, ^{17}O, ^{16}O et ^{13}C, ^{12}C conduisent à la masse 44 correspondant à l'isotopomère $^{12}C^{16}O_2$, à la masse 45 correspondant aux espèces $^{13}C^{16}O_2$ et $^{12}C^{17}O^{16}O$ et à la masse 46 pour l'isotopomère $^{12}C^{16}O^{18}O$ ($^{13}C^{17}O^{16}O$ et $^{12}C^{17}O_2$ peuvent être négligés du fait de leur très faible abondance). Les courants ioniques correspondants sont déterminés sur trois différents collecteurs. Le courant ionique m/z 45 est corrigé de la contribution de $^{12}C^{17}O^{16}O$ qui est calculée en fonction de l'intensité du courant mesuré pour $m/z = 46$ en tenant compte de l'abondance relative de ^{18}O et de ^{17}O (correction de Craig). La comparaison avec une référence calibrée par rapport à l'étalon international de V-PDB permet le calcul de la teneur en carbone 13 sur l'échelle relative $\delta^{13}C$ ‰.

4. RÉACTIFS

Les réactifs et étalons de travail suivants doivent être utilisés :

4.1 Éthanol anhydre (numéro CAS 64-17-5).
4.2 Glycérol pur ≥ 99 % (CAS 56-81-5).
4.3 Pentaméthylèneglycol (CAS 111-29-5).
4.4 Solution principale de pentaméthylèneglycol (4.3) dans l'éthanol (4.1). Cette solution préparée à une concentration précisément connue, entre 0,5 et 1,0 g L^{-1}, est utilisée pour diluer des échantillons de vin.
4.5 Acide orthophosphorique
4.6 Peroxodisulfate de sodium utilisé comme réactif d'oxydation
4.7 Hélium pour analyse, utilisé comme gaz vecteur (CAS 07440-59-7).
4.8 Oxygène pour analyse, utilisé comme gaz régénérant pour le réacteur de combustion (CAS 07782-44-7).

4.9 Bouteille de dioxyde de carbone pour analyse, utilisé comme gaz de référence secondaire pour la teneur en carbone 13 (CAS 00124-38-9).

4.10 Échantillons standard de travail de glycérol avec un rapport $^{13}C/^{12}C$ connu, calibrés par rapport aux matériaux de référence internationaux.

4.11 Échantillons standard de travail de pentaméthylèneglycol avec un rapport $^{13}C/^{12}C$ connu, calibrés par rapport aux matériaux de référence internationaux.

5. APPAREILS ET EQUIPEMENTS

5.1 Spectromètre de masse de rapport isotopique

Spectromètre de masse isotopique (SMRI) capable de déterminer la teneur relative en ^{13}C du CO_2 en abondance naturelle avec une précision interne de 0,05 ‰, ou mieux, exprimée en valeur relative (point 8. Calculs). La précision interne se définit ici comme la différence entre deux mesures du même échantillon de CO_2. Le spectromètre de masse utilisé pour mesurer les rapports isotopiques est équipé d'un collecteur triple afin de mesurer simultanément les intensités pour m/z = 44, 45 et 46. Le SMRI est équipé d'un logiciel dédié au pilotage de l'analyse, à l'acquisition de données et au traitement des résultats d'analyse pour le calcul des rapports isotopiques.

5.2 Chromatographe en phase gazeuse

Chromatographe en phase gazeuse (GC) couplé à un spectromètre de masse de rapport isotopique par l'intermédiaire d'un four à combustion (5.1).

Chromatographe en phase gazeuse doit être équipé d'une colonne capillaire polaire permettant de séparer par chromatographie le glycérol des autres composants du vin (p. ex. colonne capillaire en silice fondue Chrompack WCOT remplie de polyéthylène glycol collé CP-Wax-57 CB, 25 m, di 0,25 mm, film épaisseur 0,20 µm).

Interface de combustion généralement composée d'un réacteur d'oxydation (tube de céramique contenant des fils de nickel, de platine et de cuivre) et d'un réacteur de réduction (tube de céramique contenant des fils de cuivre).

5.3 Chromatographe en phase liquide

Chromatographe en phase liquide (LC) couplé à un spectromètre de masse de rapport isotopique (5.1) par l'intermédiaire d'une interface Isolink LC.

Le chromatographe en phase liquide doit être équipé d'une colonne permettant de séparer par chromatographie le glycérol des autres composants du vin sans recourir à des solvants ou additifs organiques (p. ex. colonnes Carbohydrate HyperREZ H^+, 30 cm, 8 mm).

Interface Isolink constituée d'un réacteur d'oxydation à capillaire et d'un échangeur à membranes (trois membranes).

5.4. Matériels

Matériels de laboratoire habituels, notamment :

-Seringues d'injection pour échantillons ou autosampler

-Fioles calibrées, filtres de 0,2 µm, flacons chromatographiques et seringue à liquide 10 µ L.

Les équipements de laboratoire figurant dans la liste ci-dessus sont des exemples et peuvent être remplacés par d'autres équipements dont les performances sont équivalentes.

6. PRÉPARATION D'ÉCHANTILLONS AVANT ESSAIS

6.1. Détermination $^{13}C/^{12}C$ de glycérol par GC-C-SMRI
Chaque échantillon de vin est filtré au moyen d'un filtre de 0,2 µm, puis une partie aliquote est diluée (rapport 1/4) avec de l'éthanol. Chaque échantillon

est ensuite versé dans un flacon chromatographique spécial, lequel est alors scellé et stocké à T ≤ 4 °C jusqu'à l'analyse.

6.2. Rapport de glycérol $^{13}C/^{12}C$ et sa quantification par GC-C-SMRI

Chaque échantillon de vin est filtré au moyen d'un filtre de 0,2 µm, puis une partie aliquote est diluée (rapport 1/4) avec la solution en vrac de pentaméthylèneglycol (4.4). Chaque échantillon est ensuite versé dans un flacon chromatographique spécial, lequel est alors scellé et stocké à T ≤ 4 °C jusqu'à l'analyse.

6.3. Détermination de glycérol $^{13}C/^{12}C$ par CLHP-SMRI

Chaque échantillon de vin est filtré au moyen d'un filtre de 0,2 µm, puis une partie aliquote est diluée dans de l'eau. Chaque échantillon est ensuite versé dans un flacon chromatographique spécial, lequel est alors scellé et stocké à T ≤ 4 °C jusqu'à l'analyse.

7. PROCÉDURE

7.1 GC-C-SMRI

La description suivante renvoie aux procédures généralement appliqués pour déterminer le rapport isotopique $^{13}C/^{12}C$ de glycérol, à l'aide de systèmes GC-C-SMRI automatisés du commerce.

> Les procédures peuvent être adaptées en fonction des changements introduits par les fabricants. Remarque : les volumes, la température, les écoulements et la durée sont donnés à titre indicatif. Les valeurs correctes doivent être optimisées suivant les indications du fabricant.

7.1.1 Conditions opératoires

Avec la colonne et l'interface de combustion décrites plus haut à titre d'exemple au point (5.2), les paramètres suivants peuvent être appliqués :

A. La température de l'injecteur est réglée sur 270 °C.

B. Le programme thermique est défini comme suit : la température initiale de la colonne est fixée à 120 °C, avec une durée de maintien de 2 minutes, puis la température est programmée à raison de 10 °C.min^{-1} jusqu'à atteindre la valeur finale de 220 °C,

avec un isotherme final de 2 minutes. Chaque cycle dure 14 minutes, sans tenir compte du temps de refroidissement.

C. Il est utilisé comme gaz porteur.

D. Les températures des réacteurs de combustion et de réduction de l'interface de combustion GC sont réglées à 960 et 640 °C respectivement.

E. À chaque injection, 0,3 µL de solution d'échantillon est introduite dans la colonne avec un mode de division élevé à l'injection (débit de fuite de l'injecteur : 120 mL. min^{-1}).

A intervalles réguliers (p. ex. une fois par semaine) une réoxydation du réacteur d'oxydation au O_2 est indispensable (les intervalles sont fonction des quantités totales de substances qui sont passées dans le réacteur).

7.1.2. Rapport de glycérol $^{13}C/^{12}C$

Pour chaque analyse $^{13}C/^{12}C$, au minimum deux injections de gaz de référence de la bouteille de CO_2 (4.9) sont effectuées. Ce CO_2 a été précédemment calibré par rapport à d'autres étalons internationaux de V-PDB, eux-mêmes calibrés par rapport aux étalons internationaux de l'AIEA. Le CO_2 de référence peut également être calibré avec des étalons internes.

Chaque échantillon de vin (6.1) est injecté trois fois. Des références de contrôle appropriées doivent être incluses dans chaque lot.

Un lot-type se présente comme suit :

- Échantillon témoin
- Échantillon témoin
- Échantillon } 1
- Échantillon } 1
- Échantillon } 1

- Échantillon 2

Chaque échantillon est mesuré 3 fois
• Echantillon 6
- Échantillon 6
- Échantillon 6
- Échantillon témoin
- Échantillon témoin

L'échantillon témoin est une solution de glycérol dans l'éthanol d'une valeur $\delta^{13}C$ connue et précisément mesurée (par un analyseur élémentaire SMRI, par exemple) et permet également de vérifier la dérive dans la séquence de mesures et la donc la correction des résultats.

7.1.3 Rapport $^{13}C/^{12}C$ de glycérol et sa quantification

Si la quantification du glycérol est exigée en même temps que la mesure du rapport isotopique $^{13}C/^{12}C$, la procédure précédente (7.1.2) est appliquée aux échantillons préparés suivant la description au point 6.2.

Le pentaméthylèneglycol (5.3) permet de déterminer la concentration de glycérol. En outre, les valeurs $\delta\ ^{13}C$ de la référence interne peuvent être utilisées pour évaluer la justesse des injections et le contrôle qualité des déterminations isotopiques et de la phase de réaction de la combustion.

La concentration de glycérol dans des échantillons de vin est déterminée au moyen de la méthode de l'Étalon interne. Une courbe de calibrage doit être établie à cette fin, en prenant une concentration constante connue pour l'étalon interne, le pentaméthylèneglycol, et cinq solutions de glycérol à différentes concentrations connues, de 0,50 à 10 g L^{-1}. Ces solutions sont préparées en pesant et en dissolvant du glycérol (4.2) et du pentaméthylèneglycol dans de l'éthanol (4.1) dans des flacons calibrés. Il faut s'assurer que la réponse est linéaire en analysant successivement, à trois reprises, chacune des solutions normales de linéarité contenant un étalon interne.

7.2. CLHP-SMRI

La description suivante renvoie aux procédures généralement appliquées pour déterminer le rapport isotopique $^{13}C/^{12}C$ du glycérol à l'aide de systèmes CLHP-SMRI automatisés du commerce.

Les procédures peuvent être adaptées en fonction des changements introduits par les fabricants. Remarque : les volumes, la température, les écoulements et la durée sont donnés à titre indicatif. Les valeurs correctes doivent être optimisées suivant les indications du fabricant.

7.2.1 Conditions opératoires

Avec la colonne et l'interface décrites à titre exemple au point (5.3), les paramètres suivants peuvent être appliqués :

A. Le débit de l'éluent est réglé à 400 □L min^{-1}.

B. Le débit des réactifs acides et oxydants dans l'interface LC interface est réglé à 40 et 30 □L min^{-1}, respectivement

C. Les températures du réacteur de l'interface et de la colonne sont réglées à 99,9 et 65 °C, respectivement.

D. Le débit d'hélium de l'unité de séparation est réglé à 1 □L min^{-1}.

Les bouteilles de réactif subissent un dégazage à l'hélium durant la totalité de la campagne chromatographique.

7.2.2. Rapport $^{13}C/^{12}C$ de glycérol

Pour chaque analyse $^{13}C/^{12}C$, au minimum deux injections de gaz de référence de la bouteille de CO_2 (4.9) sont effectuées (voir exemple du chromatogramme en 11.2). Ce CO_2 a été précédemment calibré par rapport à d'autres étalons internationaux de V-PDB, eux-mêmes calibrés par rapport aux étalons internationaux de l'AIEA. Le CO_2 de référence peut également être calibré par rapport à des étalons internes.

Chaque échantillon de vin (6.3) est injecté trois fois. Des références de contrôle appropriées doivent être incluses dans chaque lot.

Un lot-type se présente comme suit :

• Echantillon témoin
• Echantillon témoin
• Echantillon 1
• Echantillon 1
• Echantillon 1
• Echantillon 2

Chaque échantillon est mesuré 3 fois
• …..
• Echantillon 6
• Echantillon 6
• Echantillon 6
• Echantillon témoin
• Echantillon témoin

L'échantillon témoin est une solution de glycérol d'une valeur $\delta^{13}C$ connue et mesurée avec précision (par un analyseur élémentaire SMRI, par exemple) et permet également de vérifier la dérive dans la séquence de mesures et donc la correction des résultats.

8. CALCULS

8.1. Rapport $^{13}C/^{12}C$

Le rapport isotopique $^{13}C/^{12}C$ peut être exprimé par son écart avec une référence de travail.
L'écart isotopique du carbone 13 ($\delta^{13}C$) est alors calculé sur une échelle delta pour mille (δ/1 000 ou δ ‰) en comparant les résultats obtenus pour l'échantillon à mesurer avec ceux d'une référence de travail préalablement calibrée par rapport à la référence internationale primaire (V-PDB). Pendant les analyses $^{13}C/^{12}C$, du CO_2 de référence est introduit, calibré par rapport à d'autres étalons internationaux de PDB.
Les valeurs $\delta\ ^{13}C$ sont exprimées par rapport à la référence de travail, comme suit :

$$\delta\ ^{13}C_{Échantillon/Réf.}\ ‰ = (R_{Échantillon}/R_{réf} - 1)\ X\ 1\ 000$$

où $R_{Échantillon}$ et $R_{Réf.}$ sont respectivement les rapports isotopiques $^{13}C/^{12}C$ de l'échantillon et du dioxyde de carbone utilisé comme gaz de référence (4.9).
Les valeurs $\delta\ ^{13}C$ sont exprimées par rapport au V-PDB, comme suit :
$\delta\ ^{13}C_{Échantillon/V\text{-}PDB}$ ‰ = $\delta\ ^{13}C_{Échantillon/Réf.} + \delta\ ^{13}C_{Réf./V\text{-}PDB} + (\delta\ ^{13}C_{Échantillon/réf} \times \delta\ ^{13}C_{Réf./V\text{-}PDB})/1\ 000$
où $\delta^{13}C_{Réf./V\text{-}PDB}$ est l'écart isotopique précédemment déterminé entre la référence de travail et le V-PDB.

De faibles variations peuvent survenir lors de la mesure en ligne en raison de changements des conditions instrumentales. Dans ce cas, les valeurs $\delta\ ^{13}C$ des échantillons doivent être corrigées en fonction de la différence entre la valeur mesurée $\delta^{13}C$ de l'échantillon de travail standard et sa vraie valeur précédemment étalonné par rapport à V-PDB par comparaison à l'un des matériaux de référence internationaux. Entre deux mesures de l'échantillon de travail standard, la variation, et par conséquent la correction à appliquer aux résultats obtenus avec les échantillons, peuvent être supposées linéaires. L'échantillon de travail standard doit être mesuré au début et à la fin de toutes les séries d'échantillons. Une correction peut être ensuite calculée pour chaque échantillon par interpolation linéaire.

8.2. Concentration de glycérol par GC SMRI

Lors de la génération de la courbe d'étalonnage, pour chaque injection, le paramètre mesuré qui est pris en compte est la surface S (dans V*s) donnée par le spectromètre. Calculer le rapport R et tracer un graphique représentant R en fonction du rapport de concentration du glycérol et de l'étalon interne (EI), C. Un tracé linéaire doit être obtenu, avec un coefficient de corrélation d'au moins 0,99.

Équation 1 $$R = \frac{\text{Surface du pic}}{\text{Surface du pic EI}}$$

Avec les mêmes conditions d'analyse (7.1.1), le pentaméthylèneglycol, qui est moins polaire que le glycérol, a un temps de rétention d'environ 310 secondes, alors que celui du glycérol est de 460 secondes (voir un exemple de chromatogramme au point 11.1).
La concentration de glycérol dans chaque injection est calculée par l'équation suivante :

Équation 2

$$C_{glyc_{Échantillon}} = K \cdot C_{1,5PD_{Échantillon}} \cdot \frac{S_{glyc_{Échantillon}}}{S_{1,5PD_{Échantillon}}} \times \text{Facteur de dilution}$$

avec :
$Cx_{Échantillon}$ est la concentration en g L^{-1} de l'espèce dans l'échantillon ;
$SX_{Échantillon}$ est la surface des pics produits ;

K (le facteur de réponse) est calculé comme suit :

$$K = \frac{C_{glyc_{St}}}{C_{1,5PD_{St}}} \cdot \frac{S_{1,5PD_{St}}}{S_{glyc_{St}}}$$ Équation 3 (voir 8.2)

Le suffixe St indique les concentrations et les surfaces de pentaméthylèneglycol et de glycérol dans les cinq solutions normales préparées pour le calibrage (7.1.3) ;
Facteur de dilution : compte tenu des conditions de calibrage susvisées (7), le facteur de dilution est 4.

La valeur de concentration en g L^{-1} de chaque échantillon est la moyenne des trois injections.

9. ASSURANCE ET CONTROLE QUALITE

9.1. GC-C-SMRI

Pour chaque échantillon, vérifier que l'écart type (ET) dans trois fioles mesurées successivement est inférieur à 0,6 ‰. Le résultat final pour un échantillon donné est la valeur moyenne pour les trois mesures. Si l'écart est supérieur à 0,6 ‰, la mesure doit être répétée.

Les contrôles de mesure correcte peuvent être basés sur le courant ionique pour lequel m/z = 44, lequel est proportionnel à la quantité de carbone injectée dans le système. Dans des conditions standard, le courant ionique doit être quasiment constant pour les échantillons analysés. Un écart important peut signaler une séparation imparfaite et une oxydation du glycérol ou une instabilité du spectromètre de masse.

9.2. CLHP-SMRI

Vérifier que la valeur ^{13}C de la référence de travail ne s'écarte pas de plus de 0,5 ‰ de la valeur admissible. Dans le cas contraire, les réglages de l'appareil de spectrométrie doivent être vérifiés et, si besoin, ajustés.

Pour chaque échantillon, vérifier que l'écart type (ET) dans trois fioles mesurées successivement est inférieur à 0,6 ‰. Le résultat final pour un échantillon donné est la valeur moyenne pour les trois mesures. Si l'écart est supérieur à 0,6 ‰, la mesure doit être répétée.

Les contrôles de mesure correcte peuvent être basés sur le courant ionique pour lequel m/z = 44, lequel est proportionnel à la quantité de carbone injectée dans le système. Dans des conditions standard, le courant ionique doit être quasiment constant pour les échantillons analysés. Un écart important peut signaler une séparation imparfaite et une oxydation du glycérol ou une instabilité du spectromètre de masse.

10. CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCES DE LA METHODE

10.1. GC-C-SMRI

10.1.1 Précision

Des études préliminaires ont été conduites sur 4 solutions de vin synthétiques (eau-éthanolglycérol), préparées avec des échantillons de glycérol de différentes origines et d'une valeur $\delta\ ^{13}C$ préalablement déterminée par EA-SMRI. Pour les 3 répétitions, n = 3, par la technique CG-C-SMRI, un écart-type ET ≤ 0,6 ‰ a été jugé admissible.

La précision peut être affectée par un chevauchement entre le pentaméthylèneglycol et d'autres composants ou sous-produits du vin dans la détermination des vins liquoreux.

10.1.2. Détermination de la concentration de glycérol

Pour la validation de cette méthode, deux solutions de glycérol ont été employées. Si l'on suppose que la concentration-type de glycérol est de 4-10 g L^{-1} dans le vin sec, ces deux solutions représentent cette étendue. La première solution est de 4,0 g L^{-1} et a donné une concentration expérimentale de 3,6 g L^{-1} (ET = 0,2, n = 8). La seconde solution, de 8,0 g L^{-1}, a donné une valeur de 7,9 g L^{-1} (ET = 0,3, n = 8).
En outre, cinq échantillons de vin (A-E) avec une concentration de glycérol prédosée, par application d'autres méthodes* par le test de compétence BIPEA, ont été injectés afin de tester la méthode.

Tableau 1 : Comparaison de concentrations avec 5 vins dosés

Echantillon	A	B	C	D	E
Type	Blanc	Rosé	Blanc	Rouge	Blanc
Fourchette donnée	6,2-8,4	4,8-6,6	5,7-7,7	6,3-8,5	4,6-6,2
Valeur moyenne	7,3	5,4	6,7	7,4	5,4
par GC-C-IRMS	6,4	5,4	6,7	7,8	5,4

Les déterminations BIPEA ont été réalisées par HPLC et/ou analyses enzymatiques
Les concentrations sont données en g/L n>3 et SD<0,6

Tableau 1 : Comparaison avec la concentration de 5 vins dosés
Echantillon Type de vin Gamme de mesure Valeur moyenne par CG-C-SMRI Blanc Rosé Blanc Rouge Blanc

* Les déterminations BIPEA ont été effectuées par CLHP et/ou analyse enzymatique.
Les concentrations sont indiquées en g L^{-1}. n > 3 et ET < 0,6.

Les concentrations de glycérol trouvées par GC-C-SMRI sont conformes aux valeurs obtenues utilisant d'autres techniques analytiques comme la détermination enzymatique ou par CLHP.

10.2. CLHP-SMRI

Validation interne de la méthode CLHP-SMRI

Pour la validation de la méthode CLHP_SMRI, les échantillons suivants ont été utilisés : un échantillon de glycérol standard, trois vins synthétiques (les concentrations de glycérol varient au sein de la gamme typique des vins) et un vin.
La précision de la mesure du glycérol fût déterminée en répétant l'analyse dix fois pour chaque échantillon pendant trois jours, sous des conditions reproductibles (Tableau 2)

		HPLC-IRMS							
		Jour 1		Jour 2		Jour 3		Précision	
Echantillon	Répétitions par échantillon	Moyenne $\delta^{13}C$ (‰)	Ecart type (‰)	Moyenne $\delta^{13}C$ (‰)	Ecart type (‰)	Moyenne $\delta^{13}C$ (‰)	Ecart type (‰)	r (‰)	R (‰)
Glycérol (standard)[b]	10	-27.99	0.05	-27.94	0.04	-27.95	0.08	0.17	0.18
Vin synthétique (6 g/l)	10	-28.06	0.13	-28.14	0.12	-28.14	0.11	0.34	0.35
Vin synthétique (8 g/l)	10	-28.11	0.12	-28.18	0.07	-28.21	0.07	0.25	0.28
Vin synthétique (10 g/l)	10	-28.06	0.06	-28.06	0.09	-28.05	0.09	0.23	0.24
Vin	10	-28.88	0.10	-28.85	0.27	-28.72	0.23	0.60	0.62

Tableau 2. Accuracy and precision of δ13C values of glycerol obtained by HPLC-IRMS[a]

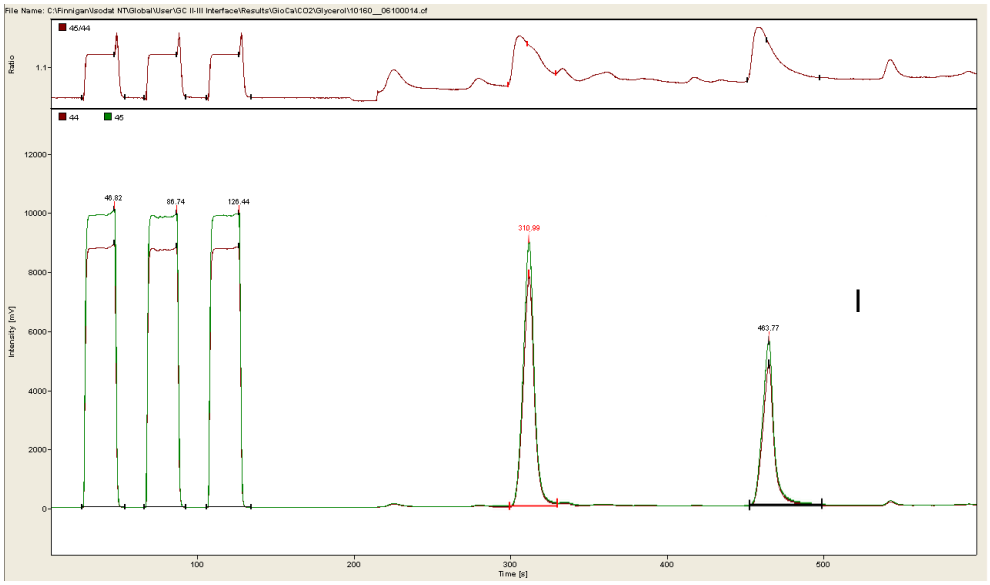
[a]Valeurs de $\delta^{13}C$ sont exprimées en ‰ du rapport V-PDB
[b]EA-IRMS glycérol (standard) résultat : -28.02 ± 0.09 ‰

Les paramètres de performance suivants pour la détermination du $\delta^{13}C$ du glycérol furent obtenus à partir d'un échantillon de vin :

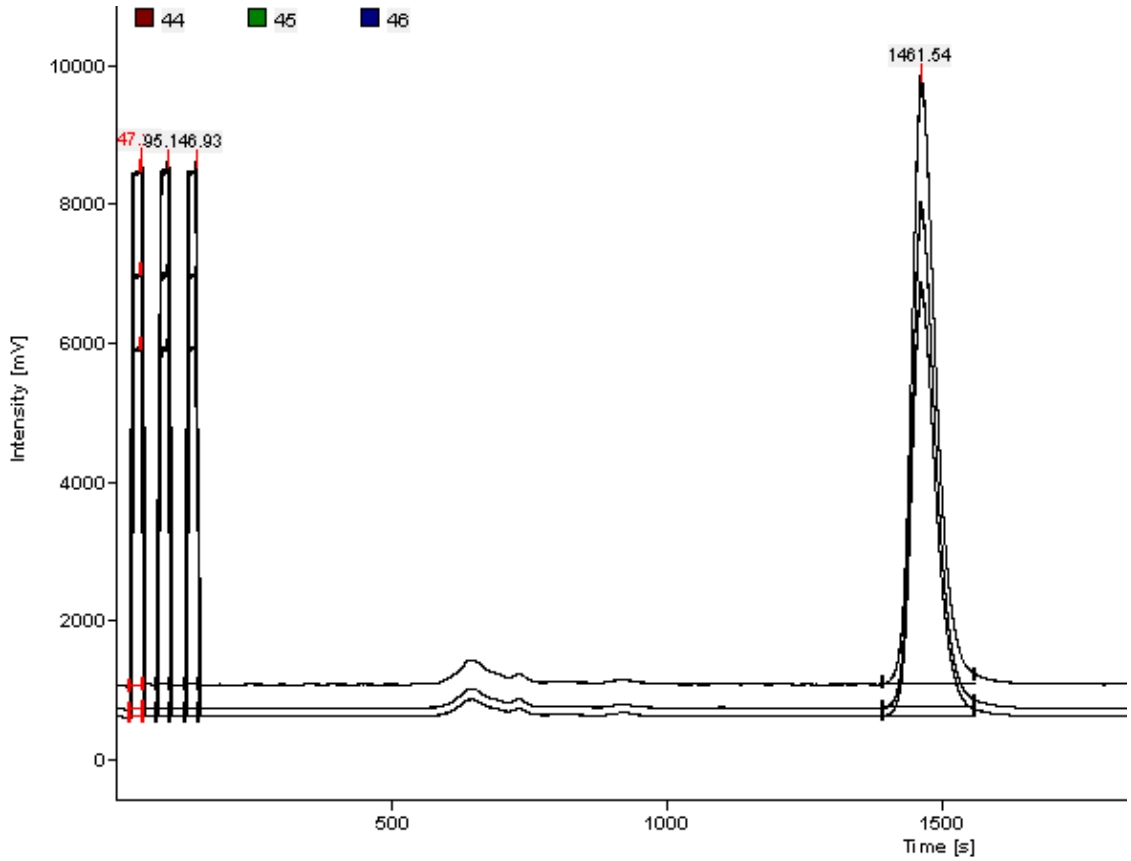
- Répétabilité **r: 0,60 ‰**
- Reproductibilité **R: 0,62 ‰**

11. ANNEXE

11.1 Chromatogramme type d'une analyse CG-C-SMRI de glycérol dans du vin



11.2 Chromatogramme typique d'une analyse CLHP-SMRI du glycérol



12. BIBLIOGRAPHIE

1 Calderone G., Naulet N., Guillou C., Reniero F., "Characterization of European wine glycerol: stable carbon isotope approach". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52, 5902-5906

2. Cabanero AI, Recio JL, Ruperez M. Simultaneous stable carbon isotopic analysis of wine glycerol and ethanol by liquid chromatography coupled to isotope ratio mass spectrometry.

Méthode OIV-MA-AS313-01 Méthode Type I

Acidité totale

(Révision par OIV-OENO 551-2015)

1. Définition

L'acidité totale est la somme des acidités titrables lorsqu'on amène le pH à 7 par addition d'une solution alcaline titrée.

Le dioxyde de carbone n'est pas compris dans l'acidité totale.

2. Principe de la méthode

Titrage potentiométrique ou titrage en présence de bleu de bromothymol comme indicateur de fin de réaction par comparaison à un étalon de coloration.

3. Appareillage

3.1. Trompe à vide à eau.

3.2. Fiole à vide de 500 ml.

3.3. Potentiomètre à échelle étalonnée en unités pH et électrodes. L'électrode de verre doit être conservée dans l'eau distillée. L'électrode au calomel-chlorure de potassium saturé doit être conservée dans une solution saturée de chlorure de potassium.

3.4. Vases cylindriques de 12 cm de diamètre ou autres récipients appropriés.

4. Réactifs

4.1. Solution tampon pH 7,0 :

Phosphate monopotassique KH_2PO_4	107,3 g
Solution M d'hydroxyde de sodium	500 ml
Eau q.s.p.	1 000 ml

La solution tampon pH 7 du commerce peut également être utilisée.

4.2. Solution 0,1 M d'hydroxyde de sodium.

4.3. Solution de bleu de bromothymol à 4 g/l.

Bleu de bromothymol ($C_{27}H_{28}Br_2O_5S$)	4 g
Alcool neutre 96 % vol.	200 ml
Après solubilisation ajouter :	
Eau sans CO_2	200 ml
Solution M d'hydroxyde de sodium, q.s.p. coloration bleu-vert (pH 7)	7,5 ml
Eau q.s.p.	1000 ml

5. Mode opératoire

5.1. *Préparation de l'échantillon* : Élimination du dioxyde de carbone.

Placer environ 50 ml de vin dans une fiole à vide, agiter et en même temps faire le vide au moyen de la trompe à vide à eau. L'agitation doit durer 1 à 2 minutes. D'autres systèmes d'élimination de CO_2 peuvent être utilisés si l'élimination est garantie.

5.2. *Titrage potentiométrique*

5.2.1. Étalonnage du pH mètre

L'étalonnage du pH mètre s'effectue à 20 °C en suivant les indications données pour l'appareil utilisé avec la solution tampon de pH 7,00 à 20 °C.

5.2.2. Technique d'une mesure

Dans un vase cylindrique (3.4) placer 10 ml de vin préparé comme indiqué en 5.1.

Ajouter 10 ml environ d'eau distillée et verser à la burette la solution 0,1 M d'hydroxyde de sodium jusqu'à ce que le pH soit égal à 7 à 20 °C.

L'addition de solution alcaline doit être faite lentement et la solution constamment agitée. Soit *n* le nombre de millilitres de NaOH 0,1 M versés.

5.3. *Titrage avec indicateur (bleu de bromothymol)*

5.3.1. Essai préalable : établissement de l'étalon de coloration

Dans un vase cylindrique (3.4), placer 25 ml d'eau distillée bouillie, 1 ml de solution de bleu de bromothymol et 10 ml de vin préparé comme indiqué en 5.1.

Ajouter la solution 0,1 M d'hydroxyde de sodium jusqu'à obtention d'une coloration bleu-vert. Ajouter 5 ml de la solution tampon pH 7

5.3.2. Dosage

Dans un vase cylindrique (3.4), placer 30 ml d'eau distillée bouillie, 1 ml de solution de bleu de bromothymol et 10 ml de vin préparé comme indiqué en 5.1.

6. Expression des résultats

6.1. *Mode de calcul*

L'acidité totale exprimée en milliéquivalents par litre sera :

$$A = 10\ n$$

Elle est donnée avec une décimale.

L'acidité totale exprimée en grammes d'acide tartrique par litre sera :

$$A' = 0{,}075 \times A$$

Elle est donnée avec deux décimales.

L'acidité totale exprimée en grammes d'acide sulfurique par litre sera :

$$A' = 0{,}049 \times A$$

Elle est donnée avec deux décimales.

6.2. *Répétabilité* (*r*) pour le titrage avec indicateur 5.3.) :

r = 0,9 meq/l
r = 0,04 g d'acide sulfurique/l,
r = 0,07 g d'acide tartrique/l .

6.3. *Reproductibilité* (R) pour le titrage avec indicateur (5.3).

Pour les vins blancs et rosés :

R = 3,6 meq/l
R = 0,2 g d'acide sulfurique/l,
R = 0,3 g d'acide tartrique/l .

Pour les vins rouges :

R = 5,1 meq/l
R = 0,3 g d'acide sulfurique/l,
R = 0,4 g d'acide tartrique/l .

BIBLIOGRAPHIE

SEMICHON L., FLANZY M., *Ann. Fals. Fraudes*, 1930, **23**,5.
FÉRE L., *Ibid.*, 1931, **24**, 75.
JAULMES P., *Bull. O.I.V.*, 1953, 26, n^{o} 274, 42; *Ann. Fals. Fraudes*, 1955, **48**, 157.

Méthode OIV-MA-AS313-02 Méthode Type I

Acidité volatile

(Révisé par OIV-OENO 549-2015)

1. Définition

L'acidité volatile est constituée par les acides appartenant à la série acétique qui se trouvent dans le vin à l'état libre et à l'état salifié.

2. Principe de la méthode

Titrage des acides volatils séparés du vin par entraînement à la vapeur d'eau et rectification des vapeurs.

Le vin est au préalable débarrassé du dioxyde de carbone.

L'acidité du dioxyde de soufre libre et du dioxyde de soufre combiné distillés dans ces conditions doit être retranchée de l'acidité du distillat.

L'acidité de l'acide sorbique éventuellement ajouté au vin doit également être retranchée.

Remarque : L'acide salicylique utilisé dans certains pays pour stabiliser les vins préalablement à l'analyse se retrouve en partie dans le distillat. Il est nécessaire de le doser et de le défalquer de l'acidité. La méthode de dosage est donnée en annexe de ce chapitre.

3. Appareillage

3.1. Appareil à entraînement à la vapeur d'eau composé :

- d'un générateur de vapeur d'eau; la vapeur d'eau produite doit être exempte de dioxyde de carbone,
- d'un barboteur,
- d'une colonne rectificatrice,
- d'un réfrigérant.

Cet appareil doit répondre aux trois essais suivants :

a) Placer dans le barboteur 20 ml d'eau bouillie; recueillir 250 ml de distillat et les additionner de 0,1 ml de solution 0,1 M d'hydroxyde de sodium et 2 gouttes de la solution de phénolphtaléine; la coloration rose doit être stable pendant au moins 10 secondes (vapeur d'eau exempte de dioxyde de carbone).

b) Placer dans le barboteur 20 ml d'une solution 0,1 M d'acide acétique. Recueillir 250 ml de distillat. Titrer avec la solution 0,1 M d'hydroxyde de sodium. Le volume versé doit être au moins égal à 19,9 ml. (acide acétique entraîné ≥ 99,5 %).

c) Placer dans le barboteur 20 ml d'une solution M d'acide lactique. Recueillir 250 ml de distillat et titrer l'acidité avec la solution 0,1 M d'hydroxyde de sodium.
Le volume versé doit être inférieur ou égal à 1,0 ml (acide lactique distillé ≤ 0,5 %).
Tout appareil ou toute technique qui satisfait à ces essais constitue un appareil ou une technique officielle internationale.

3.2. Trompe à vide d'eau.

3.3. Fiole à vide.

4. Réactifs

4.1. Acide tartrique cristallisé.

4.2. Solution 0,1 M d'hydroxyde de sodium.

4.3. Solution de phénolphtaléine à 1 p. 100 dans l'alcool à 96 % vol. neutre.

4.4. Acide chlorhydrique (ρ_{20} = 1,18 g/ml) dilué ¼ (v/v).

4.5. Solution 0,005 M d'iode.

4.6. Iodure de potassium cristallisé.

4.7. Empois d'amidon à 5 g/l :
Délayer 5 g d'amidon dans 500 ml d'eau environ. Porter à ébullition en agitant et maintenir l'ébullition pendant 10 minutes; ajouter 200 g de chlorure de sodium. Porter au litre après refroidissement.

4.8. Solution saturée de borate de sodium ($Na_2B_4O_7$. 10 H_2O), soit environ 55 g/l à 20 °C.

4.9. Solution 0,1 M d'acide acétique.

4.10. Solution M d'acide lactique

100 ml d'acide lactique sont dilués dans 400 ml d'eau. Cette solution placée dans une capsule est chauffée sur un bain d'eau bouillant pendant 4 heures, en complétant de temps en temps le volume avec de l'eau distillée. Porter au litre après refroidissement. Titrer l'acide lactique sur 10 ml de cette solution avec une solution d'hydroxyde de sodium M. Ajuster la solution à 1 mole d'acide lactique par litre (90 g).

5. Mode opératoire

5.1. *Préparation de l'échantillon* : élimination du dioxyde de carbone.

Placer environ 50 ml de vin dans une fiole à vide; agiter et en même temps faire le vide au moyen de la trompe à vide d'eau. L'agitation doit durer 1 à 2 min. D'autres systèmes d'élimination de CO_2 peuvent être utilisés si l'élimination est garantie.

5.2. *Entraînement à la vapeur d'eau.*

Placer 20 ml de vin décarboniqué comme indiqué en 5.1 dans le barboteur. Ajouter 0,5 g environ d'acide tartrique. Recueillir au moins 250 ml de distillat.

5.3. *Titrage*

Titrer par la solution 0,1 M d'hydroxyde (3.2) de sodium en présence de 2 gouttes de solution de phénolphtaléine, soit n ml le volume versé.

Ajouter 4 gouttes d'acide chlorhydrique dilué ¼, 2 ml d'empois d'amidon et quelques cristaux d'iodure de potassium. Titrer le dioxyde de soufre libre par la solution 0,005 M d'iode.

Soit n' ml le volume versé.

Ajouter la solution saturée de borate de sodium jusqu'à réapparition de la coloration rose. Titrer le dioxyde de soufre combiné par la solution 0,005 M d'iode. Soit n'' ml le volume versé.

6. Expression des résultats

6.1. *Mode de calcul*

L'acidité volatile exprimée en milliéquivalents par litre avec une décimale sera :

$$5\ (n - 0{,}1\ n' - 0{,}05\ n'').$$

L'acidité volatile exprimée en g d'acide sulfurique par litre avec deux décimales sera :

$$0{,}245\ (n - 0{,}1\ n' - 0{,}05\ n'').$$

L'acidité volatile exprimée en g d'acide acétique par litre avec deux décimales sera :

$$0{,}300\ (n - 0{,}1\ n' - 0{,}05\ n'').$$

6.2. *Répétabilité* (r) : $r = 0{,}7$ me/l
$r = 0{,}03$ g d'acide sulfurique/l
$r = 0{,}04$ g d'acide acétique/l.

6.3 *Reproductibilité* (R) : R = 1,3 me/l
R = 0,06 g d'acide sulfurique/l
R = 0,08 g d'acide acétique/l.

6.4. Cas d'un vin additionné d'acide sorbique.

L'acide sorbique étant entraînable à la vapeur d'eau à 96 % pour un volume de distillat de 250 ml, son acidité doit être retranchée de l'acidité volatile, sachant que 100 mg d'acide sorbique correspondent à une acidité de 0,89 milliéquivalent, ou de 0,044 g d'acide sulfurique ou de 0,053 g d'acide acétique et connaissant la teneur en acide sorbique (mg/l) déterminée par ailleurs.

ANNEXE

Dosage de l'acide salicylique entraîné dans le distillat de l'acidité volatile

1. *Principe*

Après le dosage de l'acidité volatile et la correction du dioxyde de soufre, la présence d'acide salicylique est caractérisée, après acidification, par la coloration violette qui apparaît après addition d'un sel de fer III.

Le dosage de l'acide salicylique entraîné dans le distillat avec l'acidité volatile est effectué sur un deuxième distillat de volume égal à celui sur lequel a été effectué le dosage de l'acidité volatile. Dans ce distillat, l'acide salicylique est dosé par une méthode colorimétrique de comparaison. Il est défalqué de l'acidité du distillat de l'acidité volatile.

2. *Réactifs*

- Acide chlorhydrique (ρ_{20} = 1,18 à 1,19 g/ml).
- Thiosulfate de sodium ($Na_2S_2O_3.5H_2O$ en solution 0,1 M.
- Solution de sulfate de fer III et d'ammonium, $Fe_2(SO_4)_3.(NH_4)_2SO_4.24H_2O$ à 10 p. 100 (m/v).
- Solution de salicylate de sodium 0,01 M. Solution contenant 1,60 g/l de salicylate de sodium $NaC_7H_5O_3$.

3. *Mode opératoire*

3.1. Caractérisation de l'acide salicylique dans le distillat de l'acidité volatile.

Immédiatement après le dosage de l'acidité volatile et la correction du dioxyde de soufre libre et combiné, ajouter dans la fiole conique 0,5 ml d'acide chlorhydrique, 3 ml de la solution 0,1 M de thiosulfate de sodium et 1 ml de la solution de sulfate de fer III et d'ammonium.

En présence d'acide salicylique, une coloration violette apparaît.

3.2. Dosage de l'acide salicylique

Sur la fiole conique précédente, indiquer par un trait repère le volume du distillat. Vider et rincer la fiole.

Soumettre à l'entraînement à la vapeur d'eau une nouvelle prise d'essai de 20 ml de vin et recueillir le distillat dans la fiole conique jusqu'au trait repère. Ajouter 0,3 ml d'acide chlorhydrique pur et 1 ml de la solution de sulfate de fer III et d'ammonium.

Le contenu de la fiole conique se colore en violet.

Dans une fiole conique identique à celle portant le trait repère, placer de l'eau distillée jusqu'au même niveau que celui du distillat. Ajouter 0,3 ml d'acide chlorhydrique pur, 1 ml de solution de sulfate de fer III et d'ammonium. Verser à la burette la solution de salicylate de sodium 0,01 M jusqu'à obtention d'une

coloration violette de même intensité que celle de la fiole conique contenant le distillat de vin.

Soit *n'''*, le nombre de millilitres versés.

4. *Correction de l'acidité volatile*

Retrancher le volume 0,1 x *n'''* du volume *n* ml de solution d'hydroxyde de sodium 0,1 M utilisé pour titrer l'acidité du distillat lors du dosage de l'acidité volatile.

BIBLIOGRAPHIE

Méthode unique :

JAULMES P., *Recherches sur l'acidité volatile des vins*, Thèse Diplôme. Pharm. 1991, Montpellier, Nîmes.

JAULMES P., *Ann. Fals. Frauds,* 1950, **43**, 110.

JAULMES P., *Analyse des vins*, 1951, 396, Montpellier.

JAULMES P., *Bull. O.I.V.*, 1953., **26**, n^{o} 274, 48.

JAULMES P., MESTRES R., MANDROU Mlle B., *Ann. Fals. Exp. Chim.*, 1964, **57**, 119.

Méthode OIV-MA-AS313-03 Méthode Type I

Acidité fixe
(A11, révision par OIV/OENO 377/2009)

1. Principe

L'acidité fixe est déterminée par la différence entre l'acidité totale et l'acidité volatile.

2. Expression des résultats

L'acidité fixe est exprimée :
— en milliéquivalents par litre.
— en grammes d'acide sulfurique par litre.
— en grammes d'acide tartrique par litre.

Méthode OIV-MA-AS313-04 Méthode Type IV

Acides organiques
(Recueil OIV ed.1990, révision par OIV/OENO 377/2009)

Les acides organiques du vin peuvent être séparés et éventuellement dosés simultanément par *chromatographie liquide haute performance* (CLHP).

1. Principe de la méthode

Les acides organiques du vin peuvent être séparés sur deux types de phase stationnaire : silice greffée octyl et résine échangeuse d'ions. Les acides sont détectés par spectrophotométrie d'absorption dans l'ultraviolet.

Pour le dosage des acides tartrique et malique, il est préférable d'utiliser la séparation sur silice greffée octyl et pour les acides citrique et lactique, la séparation sur échangeur d'ions. Le dosage de ces acides est effectué par rapport à un étalon externe analysé dans les mêmes conditions.

Cette méthode permet, en outre, une évaluation des teneurs en acides shikimique, acétique, succinique et fumarique.

Remarque : D'autres types de colonnes peuvent également permettre une bonne séparation. Les conditions opératoires et le mode opératoire décrits ci-dessous sont donnés à titre d'exemple.

2. Appareillage

2.1. Dispositif de filtration sur membrane de cellulose
(diamètre des pores : 0,45 µm).

2.2. Cartouches garnies de silice greffée octadécyl (exemple : Sep Pak WATERS ASS.).

2.3. Chromatographe en phase liquide haute performance équipé :

- d'un injecteur à boucle de 10 µl,
- d'un dispositif de thermostatisation,
- d'un détecteur, spectrophotomètre permettant les mesures d'absorbance à 210 nm,
- d'un enregistreur, éventuellement d'un intégrateur.

Conditions opératoires

2.3.1. Cas de la séparation des acides citrique, lactique et acétique :

- colonne garnie de résine échangeuse de cations forte (H^+) (ex. : HPX-87 H BIO-RAD, longueur 300 mm, diamètre interne 7,8 mm, particules de 9 µm),

- phase mobile : solution d'acide sulfurique 0,0125 M,
- débit de la phase mobile : 0,6 ml/min.,
- température : 60-65 °C (selon le lot de résine).

2.3.2.Cas de la séparation des acides tartrique, malique, lactique, shikimique, succinique et fumarique

- deux colonnes (250 mm de longueur et 4 mm de diamètre interne) placées en série, garnies de silice greffée octyl, particules sphériques de 5 µm de diamètre,
- phase mobile : solution titrant 70 g/l en dihydrogénophosphate de potassium, 14 g/l en sulfate d'ammonium et ajustée à pH 2,1 par addition d'acide phosphorique,
- débit de la phase mobile : 0,8 ml/min.
- température : 20 °C.

3. Réactifs

3.1. Eau distillée ou de qualité CLHP

3.2. Méthanol distillé

3.3. Acide tartrique

3.4. Acide malique

3.5. Lactate de sodium

3.6. Acide shikimique

3.7. Acétate de sodium

3.8. Acide succinique

3.9. Acide citrique

3.10. Acide fumarique

3.11. Acide sulfurique (ρ_{20} = 1.84 g/ml)

3.12. Solution d'acide sulfurique 0,0125 M

3.13. Dihydrogénophosphate de potassium, KH2 PO4

3.14. Sulfate d'ammonium $(NH_4)_2SO_4$

3.15. Acide orthophosphorique à 85% (ρ_{20} = 1.71 g/ml)

3.16. Solution de référence composée de : acide tartrique (5 g/l), acide malique (5 g/l), lactate de sodium (6,22 g/l), acide shikimique (0,05 g/l), acétate de sodium (6,83 g/l), acide succinique (5 g/l), acide fumarique (0,01 g/l) et acide citrique (5 g/l).

4. Mode opératoire

4.1. Préparation de l'échantillon

Laver préalablement une cartouche par 10 ml de méthanol puis par 10 ml d'eau.

Dégazer l'échantillon de vin ou de moût. Filtrer sur membrane (0,45 µm). Prélever 8 ml d'échantillon filtré dans une seringue préalablement rincée avec l'échantillon ; faire passer sur la cartouche. Éliminer les trois premiers ml et recueillir les 5 ml suivants (éviter d'amener la cartouche à sec).

4.2. Chromatographie

Injecter dans le chromatographe successivement 10 µl de solution de référence et 10 µl de l'échantillon préparé selon 4.1. Répéter trois fois ces injections dans le même ordre.

Enregistrer le chromatogramme.

5. Calculs

5.1. Analyse qualitative

Déterminer les temps de rétention respectifs de chacun des composés élués.

Les acides organiques de la solution de référence sont séparés dans l'ordre d'élution suivant :

- acides citrique, tartrique, malique, succinique + shikimique, lactique fumarique, acétique dans la technique 2.3.2.
- acides tartrique, malique, shikimique, lactique, acétique, citrique, succinique et fumarique dans la technique 2.3.2.

5.2. Analyse quantitative

Mesurer la surface de chacun des pics et déterminer la moyenne des trois réponses pour la solution de référence et pour l'échantillon à analyser.
Déduire la concentration de l'échantillon en acides organiques.

6. Expression des résultats

Les concentrations sont exprimées :

- en grammes par litre avec une décimale pour les acides tartrique, malique, lactique et succinique,
- en milligrammes par litre pour les acides citrique, acétique et fumarique.

BIBLIOGRAPHIE

TUSSEAU D. et BENOIT C., *F.V. O.I.V.*, 1986, N°s 800 et 813 ; J. *Chromatogr.*, 1987, **395**, 323-333.

Méthode OIV-MA-AS313-05A Méthodes Type IV

Acide tartrique
(A12, révision par OIV/OENO 377/2009)

1. **Principe des méthodes**

L'acide tartrique, précipité sous forme de racémate de calcium, est dosé pondéralement. Ce dosage peut être complété par un dosage volumétrique de comparaison. Les conditions de précipitation : pH, volume total mis en oeuvre, concentration des ions précipitants, sont telles que la précipitation du racémate de calcium est totale tandis que le D(-)tartrate de calcium demeure en solution.
Lorsque le vin a été additionné d'acide métatartrique, qui rend la précipitation du racémate de calcium incomplète, il devra subir un traitement préalable d'hydrolyse.

2. Méthode

2.1. *Méthode pondérale*

2.1.1. Réactifs

– Solution d'acétate de calcium contenant 10 g/l de calcium :

Carbonate de calcium : Ca CO3	25 g
Acide acétique (ρ_{20} = 1,05 g/ml)	40 ml
Eau q.s.p.	1 l

– Racémate de calcium cristallisé : $CaC_4O_6H_4$. $4H_2O$:
Dans un vase cylindrique de 400 ml, introduire 20 ml d'une solution d'acide L(+)tartrique à 5 g/l, 20 ml d'une solution de D(-)tartrate d'ammonium à 6,126 g/l et 6 ml de la solution d'acétate de calcium à 10 g/l de calcium.

Laisser précipiter pendant 2 heures. Recueillir le précipité sur un creuset filtrant de porosité n° 4, le laver à 3 reprises avec 30 ml environ d'eau distillée. Sécher à l'étuve à 70 °C jusqu'à un poids constant. Avec les quantités de réactif mises en oeuvre, on obtient environ 340 mg de racémate de calcium cristallisé.

Conserver en flacon bouché.

– Liqueur de précipitation (pH 4,75**)** :

D(-)Tartrate d'ammonium	150 mg
Solution d'acétate de calcium à 10 g de calcium par litre	8,8 ml
Eau q.s.p.	1 l

Dissoudre le D(-)tartrate d'ammonium dans 900 ml d'eau ; ajouter 8,8 ml de solution d'acétate de calcium et porter au litre. Le racémate de calcium étant légèrement soluble dans cette liqueur, il convient d'y introduire 5 mg de racémate de calcium par litre, de soumettre à l'agitation pendant 12 heures et filtrer.

Remarque : La liqueur de précipitation peut être préparée à partir d'acide D(-)tartrique

Acide D(-)tartrique ..... 122 mg
Solution d'hydroxyde d'ammonium (ρ_{20} = 0,97 g/ml) à 25 % (v/v) ... 0,3 ml

Dissoudre l'acide D(-)tartrique, ajouter l'hydroxyde d'ammonium ; porter le volume à 900 ml environ. Ajouter 8,8 ml de solution d'acétate de calcium et, après mélange, ajuster le pH à 4,75 par addition d'acide acétique. Porter au litre.

Ajouter 5 mg de racémate de calcium par litre, soumettre à l'agitation pendant 12 heures et de filtrer.

2.1.2. Mode opératoire

- Cas des vins non additionnés d'acide métatartrique

Dans un vase cylindrique de 600 ml, placer 500 ml de liqueur de précipitation et 10 ml de vin. Mélanger et amorcer la précipitation en frottant les parois du vase avec l'extrémité d'une baguette de verre. Laisser précipiter pendant 12 heures (une nuit).

Filtrer sur creuset filtrant de porosité no 4, taré et disposé sur une fiole à vide propre, en entraînant le précipité. Rincer le vase où s'est effectuée la précipitation avec le filtrat et entraîner les dernières particules de précipité.
Sécher à l'étuve à 70 °C jusqu'à poids constant. Peser : soit *p* le poids de racémate de calcium $CaC_4O_6H_4$ cristallisé avec 4 molécules d'eau.

- Cas des vins additionnés d'acide métatartrique

Lorsqu'on a affaire à un vin additionné d'acide métatartrique ou que l'on soupçonne cette addition, procéder à l'hydrolyse de cet acide dans les conditions suivantes.

Dans une fiole conique de 50 ml, placer 10 ml de vin et 0,4 ml d'acide acétique pur. Fermer la fiole par un bouchon muni d'un crachoir et porter à ébullition pendant 30 minutes. Après refroidissement, transvaser le liquide contenu dans la fiole conique dans un vase cylindrique ; rincer la fiole deux fois par 5 ml d'eau et continuer comme il est indiqué dans le mode opératoire ci-dessus.

L'acide métatartrique est compté comme acide tartrique dans le résultat du dosage.

2.1.3. Expression des résultats

Une molécule de racémate de calcium correspond à une demi-molécule d'acide L(+) tartrique du vin.

La quantité d'acide tartrique par litre de vin, exprimée en milliéquivalents est égale à :

$$384{,}5\ p.$$

Elle est donnée avec une décimale.

La quantité d'acide tartrique par litre de vin, exprimée en grammes d'acide tartrique, est égale à :

$$28{,}84\ p.$$

Elle est donnée avec une décimale.

La quantité d'acide tartrique par litre de vin, exprimée en grammes de tartrate acide de potassium, est égale à :

$$36{,}15\ p.$$

Elle est donnée avec une décimale.

2.2. *Dosage volumétrique de comparaison*

2.2.1. Réactifs

- Acide chlorhydrique (ρ_{20} = 1,18 à 1,19 g/ml) dilué au 1/5 (v/v).
- Solution d'EDTA 0,05 M :

  EDTA (sel disodique bihydraté de l'acide éthylènediamine-tétracétique ou complexon III) ..... 18,61 g
  Eau distillée q.s.p. ..... 1 l

- Solution d'hydroxyde de sodium à 40 % (m/v) :

  Hydroxyde de sodium ..... 40 g
  Eau distillée q.s.p. ..... 100 ml

- Indicateur compléxométrique à l'acide calcone-carbonique :

  Acide calcone carbonique ou acide 2-hydroxy-4-sulfo-1-naphtylazo-3-naphtoïque ..... 1 g
  Sulfate de sodium anhydre ..... 100 g

2.2.2. Mode opératoire

Après pesée, replacer le creuset contenant le précipité de racémate de calcium sur la fiole à vide et dissoudre le précipité avec 10 ml d'acide chlorhydrique dilué. Laver le creuset filtrant avec 50 ml d'eau distillée.

Ajouter 5 ml de solution d'hydroxyde de sodium 40 % et 30 mg environ (une pincée) d'indicateur. Titrer par l'EDTA 0,05 M. Soit *n* le nombre de millilitres versés.

2.2.3. Expression des résultats

La quantité d'acide tartrique par litre de vin, exprimée en milliéquivalents est égale à :

$$5\ n.$$

Elle est donnée avec une décimale.

La quantité d'acide tartrique par litre de vin, exprimée en grammes d'acide tartrique est égale à :

$$0{,}375\ n.$$

Elle est donnée avec une décimale.

La quantité d'acide tartrique par litre de vin exprimée en grammes de tartrate acide de potassium est égale à :

$$0{,}470\ n.$$

Elle est donnée avec une décimale.

BIBLIOGRAPHIE

KLING A., *Bull. Soc. Chim*., 1910, **7**, 567.
KLING A., FLORENTIN D., *Ibid*, 1912, **11**, 886.
SEMICHON L., FLANZY M., *Ann. Fals. Fraudes*, 1933, **26**, 404.
PEYNAUD E., *Ibid*, 1936, **29**, 260.
PATO M., *Bull. O.I.V.*, 1944, **17**, n°, 161, 59, n°, 162, 64.
POUX C., *Ann. Fals. Fraudes*, 1949, **42**, 439.
PEYNAUD E., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1951, **18**, 911 ; *Ref. Z. Lebensmit. Forsch.* , 1953, **97**, 142.
JAULMES P., BRUN Mme S., VASSAL Mlle M., *Trav. Soc, Pharm.*, Montpellier, 1961, **21**, 46-51.
JAULMES P., BRUN Mme S., CABANIS J.C., *Bull. O.I.V.*, 1969, n^{os} 462-463, 932.

Méthode OIV-MA-AS313-05B Méthodes Type IV

Acide tartrique

Principe des méthodes

L'acide tartrique, isolé à l'aide d'une colonne échangeuse d'anions, est dosé colorimétriquement dans l'éluat grâce à la coloration rouge qu'il donne avec l'acide vanadique. Cet éluat contient aussi les acides lactique et malique qui ne sont pas gênants.

SUPPRIMÉE
(Résolution OIV-Oeno-377-2009)

Méthode OIV-MA-AS313-06

Acide lactique

Méthode chimique

Principe de la méthode

Méthode usuelle : l'acide lactique, séparé sur colonne de résine échangeuse d'anions, est oxydé en éthanal et dosé par colorimétrie après réaction avec le nitroprussiate de sodium et la pipéridine.

SUPPRIMÉE

(Résolution OIV/Oeno 377/2009)

Méthode OIV-MA-AS313-07 Méthode Type II

Acide lactique

Méthode enzymatique

(Recueil OIV ed.1990, révision par OIV/OENO 377/2009)

1. Principe de méthode

En présence de nicotinamide-adénine-dinucléotide (NAD) l'acide lactique total (L–lactate et D-lactate) est oxydé en pyruvate dans une réaction catalysée par la L–lactate déshydrogénase (L-LDH) et la D-lactate déshydrogénase (D-LDH).

L'équilibre de la réaction est en faveur du lactate. L'élimination du pyruvate du milieu réactionnel déplace l'équilibre de la réaction dans le sens de la formation de pyruvate.

En présence de L-glutamate, le pyruvate est transformé en L-alanine, réaction catalysée par la glutamate-pyruvate-transaminase (GPT).

(1) L-lactate + NAD^+ $\xrightleftharpoons{\text{L-LDH}}$ pyruvate + NADH + H^+

(2) D-lactate + NAD^+ $\xrightleftharpoons{\text{L-LDH}}$ pyruvate + NADH + H^+

(3) Pyruvate + L-glutamate $\xrightleftharpoons{\text{L-LDH}}$ L-alanine + α-cétoglutarate

La formation de NADH, mesurée par l'augmentation de l'absorbance à la longueur d'onde de 340 nm, est proportionnelle à la quantité de lactate présente.

Remarque : L'acide L-lactique peut être déterminé individuellement par application des réactions (1) et (3). L'acide D-lactique peut être déterminé individuellement par application des réactions (2) et (3).

2. Appareillage

2.1. Spectrophotomètre permettant d'effectuer les mesures à 340 nm, maximum d'absorption du NADH.
À défaut, photomètre à spectre discontinu permettant d'effectuer les mesures à 334 nm ou à 365 nm.

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

2.3. Micropipettes permettant de prélever des volumes compris entre 0,02 et 2 ml.

3. Réactifs

Eau bidistillée

3.1. Solution tampon pH 10 (glycylglycine 0,6 mole/l ; L-glutamate 0,1 mole/l).
Dissoudre 4,75 g de glycylglycine, 0,88 g d'acide L-glutamique dans environ 50 ml d'eau bidistillée ; ajuster le pH à 10 avec quelques millilitres de solution d'hydroxyde de sodium 10 M et porter à 60 ml avec de l'eau bidistillée.
La solution reste stable pendant au moins 12 semaines à + 4 °C.

3.2. Solution de nicotinamide-adénine-dinucléotide (NAD) environ 40×10^{-3} M ; dissoudre 900 mg de NAD dans 30 ml d'eau bidistillée. La solution reste stable pendant au moins 4 semaines à + 4 °C.

3.3. Suspension de glutamate-pyruvate-transaminase (GPT) à 20 mg/ml. La suspension est stable pendant au moins un an à + 4 °C.

3.4. Suspension de L-lactate-déshydrogénase (L-LDH) à 5 mg/ml. La suspension est stable pendant au moins un an à + 4 °C.

3.5. Suspension de D-lactate-déshydrogénase (D-LDH) à 5 mg/ml. La suspension est stable pendant au moins un an à + 4 °C.
Il est recommandé de procéder, préalablement au dosage, à la vérification de l'activité de l'enzyme.

Remarque : L'ensemble des réactifs nécessaires pour le dosage est disponible dans le commerce.

4. Préparation de l'échantillon

Le dosage du lactate s'effectue généralement directement sur le vin sans décoloration préalable et sans dilution si la concentration en acide lactique est inférieure à 100 mg/l. Si la concentration du vin en acide lactique est comprise entre :

100 mg/l et 1 g/l diluer $^1/_{10}$ avec de l'eau bidistillée ;
1 g/l et 2,5 g/l diluer $^1/_{25}$ avec de l'eau bidistillée ;
2,5 g/l et 5 g/l diluer $^1/_{50}$ avec de l'eau bidistillée.

5. **Mode opératoire**

Remarques préliminaires :

Eviter de toucher avec les doigts la partie de la verrerie qui entre en contact avec le milieu réactionnel, ceci pouvant être une cause d'apport d'acide L-lactique qui fausserait le résultat.

La solution tampon doit être ramenée à 20-25 °C avant de procéder au dosage.

5.1. *Dosage de l'acide lactique total*

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 (ml)	Dosage (ml)
Solution 3.1.	1.00	1.00
Solution 3.2.	0.20	0.20
Eau bidistillée	1.00	0.80
Suspension 3.3.	0.02	0.02
Echantillon	—	0.20

Mélanger à l'aide d'un agitateur de verre ou d'une baguette de matière synthétique à bout aplati ; après environ 5 minutes, mesurer les absorbances des solutions témoin et dosage (A_1).

Ajouter 0,02 ml de solution 3.4 et 0,05 ml de solution 3.5, homogénéiser, attendre la fin de la réaction (environ 30 minutes) et mesurer les absorbances des solutions témoin et dosage (A_2).

Déterminer les différences d'absorbances (A_2-A_1) du témoin et du dosage.

Déduire la différence d'absorbances du témoin de la différence d'absorbance du dosage.

$$\Delta A = \Delta A_D - \Delta A_T$$

5.2. *Dosage de l'acide L-lactique et de l'acide D-lactique*

Le dosage de l'acide L-lactique et D-lactique peut être réalisé individuellement en appliquant le mode opératoire indiqué pour l'acide lactique total, mais en opérant ainsi après avoir déterminé A_1 :

Ajouter 0,02 ml de solution 3.4, homogénéiser, attendre la fin de la réaction (environ 20 minutes) et mesurer les absorbances des solutions témoin et dosage (A_2).

Ajouter 0,05 ml de solution 3.5, homogénéiser, attendre la fin de la réaction (environ 30 minutes) et mesurer les absorbances des solutions témoin et dosage (A_3).

Déterminer les différences d'absorbances (A_2-A_1) pour l'acide L-lactique et (A_3–A_2) pour l'acide D-lactique dans le cas du témoin et dans le cas du dosage.

Déduire la différence d'absorbance du témoin de la différence d'absorbance du dosage

$$\Delta A = \Delta A_D - \Delta A_T$$

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. Lorsqu'on dose l'acide L-lactique seul, le temps

d'incubation après addition de la L-lactate deshydrogénase peut être ramené à 10 minutes.

6. Expression des résultats

La concentration en acide lactique est donnée en grammes par litre (g/l) avec 1 décimale.2.5.1. Mode de calcul

6.1. *Mode de calcul*

La concentration en grammes par litre est calculée par la formule générale :

$$C = \frac{V \times PM}{\varepsilon \times \delta \times \nu \times 1000} \times \Delta A$$

V = volume du test en millilitres (V = 2,24 ml pour l'acide L-lactique, V = 2,29 ml pour l'acide D-lactique et l'acide lactique total).
ν = volume de l'échantillon en millilitres (ici 0,2 ml)
PM = masse moléculaire de la substance à doser (ici acide DL-lactique = 90,08)
δ = trajet optique de la cuve en centimètres (ici 1 cm)
ε = coefficient d'absorption du NADH à 340 nm
(ε= 6,3 $mmole^{-1} \times l \times cm^{-1}$).

6.1.1 Acide lactique total et acide D-lactique

$$C = 0{,}164 \times \Delta A$$

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

Remarque :

- Mesure à 334 nm : $\varepsilon = 6{,}2$ ($mmole^{-1} \times l \times cm^{-1}$).
  $C = 0{,}167 \times \Delta A$,
- Mesure à 365 nm : $\varepsilon = 3{,}4$ ($mmole^{-1} \times l \times cm^{-1}$).
  $C = 0{,}1303 \times \Delta A$,

6.1.2 Acide L-lactique

$$C = 0{,}160 \times \Delta A$$

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

Remarque :

- Mesure à 334 nm : $\varepsilon = 6{,}2$ ($mmole^{-1} \times 1 \times cm^{-1}$).
  $C = 0{,}163 \times \Delta A$,

- Mesure à 365 nm : $\varepsilon = 3,4$ ($mmole^{-1}$ x 1 x cm^{-1}).

$$C = 0,297 \times \Delta A,$$

6.2. *Répétabilité (r)*

$$r = 0,02 + 0,07\ x_i$$

x_i = concentration en acide lactique de l'échantillon en g/l.

6.3. *Reproductibilité* (R)

$$R = 0,05 + 0,125\ x_i$$

x_i = concentration en acide lactique de l'échantillon en g/l.

BIBLIOGRAPHIE

HOHORST H.J., in *Méthodes d'analyse enzymatique*, par BERGMEYER H.U., 2e éd., p. 1425, Verlag-Chemie Weinheim/Bergstaße, 1970.
GAWEHN K. et BERGMEYER H.U., ibid., p. 1450.
BOEHRINGER, Mannheim, *Méthodes d'analyse enzymatique en chimie alimentaire*, documentation technique.
JUNGE Ch., *F.V., O.I.V.*, 1974, no 479.
VAN DEN DRIESSCHE S. et THYS L., *F.V., O.I.V.*, 1982, no 755.

Méthode OIV-MA-AS313-08 Méthode Type IV

Acide citrique

Méthode chimique

1. Principe de la méthode

L'acide citrique est fixé avec les autres acides du vin par une résine échangeuse d'anions. On procède à une élution fractionnée qui permet de le séparer de l'acide citramalique.

L'acide citrique est transformé par oxydation ménagée en acétone, que l'on sépare par distillation. L'éthanal entraîné est oxydé en acide acétique et on dose l'acétone par iodométrie.

2. Appareillage

2.1. *Colonne d'échangeur d'anions*

Dans une burette à robinet de 25 ml, placer un tampon de laine de verre et verser 20 ml de résine Dowex 1 X 2.

Au commencement, faire subir à la résine deux cycles complets de régénération avec passages alternés de solution M d'acide chlorhydrique et d'hydroxyde de sodium. Rincer avec 50 ml d'eau distillée[1]. Saturer la résine d'ions acétate par passage de 250 ml d'une solution 4 M d'acide acétique ; laver avec 100 ml d'eau distillée.

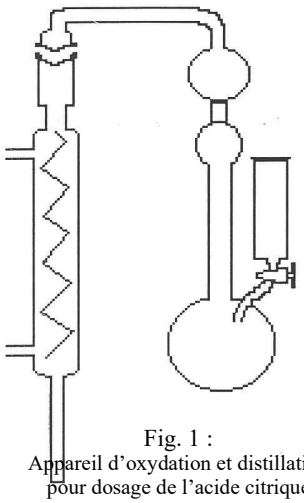


Fig. 1 :
Appareil d'oxydation et distillation pour dosage de l'acide citrique

L'échantillon à analyser est passé sur la colonne conformément à la description ci-dessous. Après l'élution des acides, rincer avec 50 ml d'eau distillée et procéder à nouveau à la saturation de la résine avec la solution d'acide acétique 4 M. Rincer avec 100 ml d'eau. La résine est prête pour un nouveau dosage.

2.2 *Appareil pour oxydation*

L'emploi d'un appareil à distiller muni d'un ballon à oxydation, dont le schéma est donné fig. 1, facilite l'introduction de la solution de permanganate de potassium, qui est alors très régulière.

A défaut, utiliser un ballon à fond rond de 500 ml, surmonté d'un entonnoir à robinet, dont le

[1] Le passage de la solution d'hydroxyde de sodium provoque une contraction qui, suivie d'un gonflement lors du lavage à l'eau, empêche l'écoulement. Il est recommandé d'agiter la résine dès que les premiers millilitres d'eau passent à travers la colonne, pour la décoller du fond de la burette.

bout est effilé afin que l'addition de permanganate de potassium soit aussi régulière que possible.

3. Réactifs

- Résine Dowex 1 X 2 (50-100 mesh.).
- Solution 4 M d'acide acétique
- Solution 2,5 M d'acide acétique
- Solution 2 M d'hydroxyde de sodium
- Acide sulfurique ($(r_{20}$ = 1,84 g/ml) dilué au $^1/_5$ (v/v)
- Solution tampon de pH 3,2-3,4

Dihydrogénophosphate de potassium, KH_2PO_4 ..... 150 g
Acide phosphorique pur ($(r_{20}$ = 1,70 g/ml) ..... 5 ml
Eau q.s.p. ..... 1000 ml

- Solution de sulfate de manganèse, $MnSO_4.H_2O$, à 50 g/l
- Pierre ponce
- Solution 0,01 M de permanganate de potassium
- Acide sulfurique (dilué au $^1/_3$ (v/v)
- Solution 0,4 M de permanganate de potassium
- Solution de sulfate de fer II, $FeSO_4.7H_2O$ à 40 p. 100 (m/v)
- Solution 5 M d'hydroxyde de sodium
- Solution 0,01 M d'iode
- Solution 0,02 M de thiosulfate de sodium
- Thiodène ou empois d'amidon.

4 Mode opératoire

4.1. *Séparation des acides citrique et citramalique*

Faire passer 25 ml de vin à travers la colonne d'échangeur d'anions Dowex 1 x 2 sous forme acétate à raison de 3 ml toutes les 2 minutes. Rincer la colonne avec 20 ml d'eau distillée à trois reprises. Éluer les acides avec 200 ml de solution 2,5 M d'acide acétique que l'on fait passer à la même vitesse. Dans cette fraction d'éluat on retrouve les acides succinique, lactique, galacturonique, citramalique et la presque totalité de l'acide malique.

Procéder ensuite à l'élution des acides citrique et tartrique en faisant passer à travers la colonne 100 ml d'une solution 2 M d'hydroxyde de sodium et recueillir l'éluat dans le ballon de l'appareil pour l'oxydation.

4.2. *Oxydation*

Dans le ballon contenant ce deuxième éluat, ajouter de l'acide sulfurique dilué au 1/5 (environ 20 ml) pour amener le pH entre 3,2 et 3,8. Ajouter alors 25 ml de solution tampon pH 3,2-3,4, 1 ml de solution de sulfate de manganèse et quelques grains de pierre ponce.

Porter à l'ébullition et distiller 50 ml que l'on rejette.

Placer la solution 0,01 M de permanganate de potassium dans l'entonnoir à robinet et l'introduire à raison de 1 goutte par seconde dans l'éluat en

ébullition. Le distillat est recueilli dans un flacon de 500 ml bouchant à l'émeri et contenant quelques millilitres d'eau. Poursuivre l'oxydation jusqu'à coloration brune du liquide indiquant un excès de permanganate de potassium.

4.3. *Séparation de l'acétone*

Si le volume de distillat est inférieur à 90 ml, porter à ce volume avec de l'eau distillée ; ajouter 4,5 ml d'acide sulfurique dilué au $^1/_3$ et 5 ml d'une solution 0,4 M de permanganate de potassium.

Si le distillat recueilli dépasse largement ce volume, compléter à 180 ml et doubler la dose des réactifs.

Dans ces conditions (milieu 0,25 M en acide sulfurique et 0,02 M en permanganate de potassium), l'éthanal est oxydé en acide acétique tandis que l'acétone reste intacte.

Le flacon est bouché et laissé au repos pendant 45 min. à la température ambiante. Au bout de ce temps l'excès de permanganate de potassium est détruit par addition de la solution de sulfate de fer (II).

Distiller et recueillir 50 ml environ de distillat dans un flacon bouchant à l'émeri contenant 5 ml d'une solution 5 M d'hydroxyde de sodium.

4.4. *Dosage de l'acétone*

Ajouter au contenu du flacon 25 ml d'une solution 0,01 M d'iode[2].

Laisser en contact 20 min. Ajouter 8 ml d'acide sulfurique dilué au $^1/_5$ et titrer l'excès d'iode par le thiosulfate 0,02 M en présence de thiodène, soit *n* ml.

Faire dans les même conditions un dosage à blanc en remplaçant les 50 ml de distillat par 50 ml d'eau distillée.

Soit *n'* ml de thiosulfate utilisés.

5. Calculs

1 ml d'iode 0,01 M correspond à 0,64 mg d'acide citrique.

Dans les conditions opératoires décrites, la quantité d'acide citrique en milligrammes par litre, est donné par

$$(n' - n) \times 25{,}6$$

6. Expression des résultats

La concentration en acide citrique est exprimée en milligrammes par litre sans décimale.

BIBLIOGRAPHIE

[2] Cette dose convient pour des teneurs en acide citrique ne dépassant pas 0,5 à 0,6 g/l. Pour des teneurs supérieures le volume prescrit de la solution d'iode n'est pas suffisant et la solution ne prend pas une coloration jaune, caractéristique d'un excès d'iode. Dans ce cas doubler ou tripler la quantité d'iode ajoutée, jusqu'à ce que la solution devienne nettement jaune. Cependant, dans les cas exceptionnels où la teneur du vin en acide citrique dépasse 1,5 g/l, il est préférable de recommencer l'analyse sur 10 ml de vin.

KOGEN A., Z. *Anal. chem.*, 1930, **80**, 112.
BARTELS W., Z. *Unters. Lebensm*. 1933, **65**, 1.
PEYNAUD E., *Bull. O.I.V.*, 1938, **11**, nº 118, 33.
GODET C., CHARRIERE R., *Trav. Chim. Alim. Hyg*., 1948, **37**, 317.
KOURAKOU Mme S., *Ann. Fals. Exp. Chim*., 1962, **55**, 149.

Méthode OIV-MA-AS313-09 Méthode Type II

Acide citrique

Méthode enzymatique

1 Principe de la méthode

L'acide citrique est transformé en oxaloacétate et acétate dans une réaction catalysée par la citrate-lyase (CL) :

$$\text{Citrate} \xrightleftharpoons{\text{CL}} \text{oxaloacétate} + \text{acétate}$$

En présence de la malate-déshydrogénase (MDH) et de la lactate-déshydrogénase (LDH), l'oxaloacétate et son dérivé de décarboxylation, le pyruvate, sont réduits en L-malate et en L-lactate par le nicotinamide-adénine-dinucléotide réduit (NADH) :

$$\text{Oxaloacétate} + \text{NADH} + \text{H}^+ \xrightleftharpoons{\text{MDH}} \text{L-malate} + \text{NAD}^+$$

$$\text{pyruvate} + \text{NADH} + \text{H}^+ \xrightleftharpoons{\text{LDH}} \text{L-lactate} + \text{NAD}^+$$

La quantité de NADH oxydé en NAD+ dans ces réactions est proportionnelle au citrate présent. L'oxydation du NADH est mesurée par la diminution de son absorbance à la longueur d'onde 340 nm.

2 Appareillage

2.1 Spectrophotomètre permettant d'effectuer les mesures à 340 nm, maximum d'absorption du NADH.
À défaut, photomètre à spectre discontinu permettant d'effectuer les mesures à 334 nm ou à 365 nm

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

2.3. Micropipettes permettant de prélever des volumes allant de 0,02 à 2 ml.

3. Réactifs

3.1. Tampon pH 7,8 (glycylglycine 0,51 M ; pH = 7,8 ; Zn^{2+} : $0,6 \times 10^{-3}$M) :
Dissoudre 7,13 g de glycylglycine dans environ 70 ml d'eau bidistillée.

Ajuster le pH à 7,8 avec environ 13 ml de solution d'hydroxyde de sodium 5 M ; ajouter 10 ml de solution de chlorure de zinc ZnCl2, à 80 mg dans 100 ml et porter à 100 ml avec de l'eau bidistillée.
La solution reste stable pendant au moins 4 semaines à + 4 °C.

3.2. Solution de nicotinamide-adénine-dinucléotide réduit (NADH), environ 6.10^{-3} M : dissoudre 30 mg de NADH et 60 mg de $NaHCO_3$ avec 6 ml d'eau bidistillée. La solution reste stable pendant au moins 4 semaines à + 4 °C.

3.3. Solution de malate déshydrogénase/lactate déshydrogénase, (MDH/LDH) (0,5 g MDH/ml ; 2,5 mg LDH/ml) : on fait un mélange de 0,1 ml MDH (5 g MDH/ml), 0,4 ml de solution de sulfate d'ammonium (3,2 M) et 0,5 ml LDH (5 mg/ml).
Cette suspension est stable pendant au moins un an à + 4 °C.

3.4. Solution de citrate-lyase CL (5 mg de protéine/ml). Dissoudre 168 mg de lyophilisat dans 1 ml d'eau glacée. La solution est stable pendant au moins une semaine à + 4 °C et pendant au moins 4 semaines sous forme congelée.
Il est recommandé de procéder, préalablement au dosage, à la vérification de l'activité de l'enzyme.

3.5. Polyvinylpolypyrolidone (PVPP) *(Voir Codex œnologique international)*.

Remarque : L'ensemble des réactifs nécessaires pour ce dosage est disponible dans le commerce.

4. Préparation de l'échantillon

Le dosage du citrate s'effectue généralement directement sur le vin sans décoloration préalable et sans dilution, à condition que la teneur en acide citrique soit inférieure à 400 mg/l. Sinon, procéder à la dilution du vin de manière que la concentration en citrate se situe entre 20 et 400 mg/l (quantité de citrate dans la prise d'essai comprise entre 5 µg et 80 µg).

Dans le cas de vins rouges riches en composés phénoliques, il est recommandé de le traiter au préalable par la PVPP : mettre en suspension dans l'eau 0,2 g environ de PVPP, laisser reposer 15 minutes. Filtrer sur filtre plissé.

À 10 ml de vin placé dans une fiole conique de 50 ml, ajouter la PVPP humide prélevée à la spatule sur le filtre. Agiter pendant 2 à 3 minutes. Filtrer.

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, l'absorbance zéro étant réglée par rapport à l'air (pas de cuve sur le trajet optique).

Dans les cuves de 1 cm d'épaisseur, introduire :

	Témoin	Dosage
Solution 3.1	1,00 ml	1,00 ml
Solution 3.2	0,10 ml	0,10 ml
Echantillon	-	0,20 ml
Eau bidistillée	2,00 ml	1,80 ml
Solution 3.3.	0,02 ml	0,02 ml

Mélanger ; après environ 5 minutes, lire les absorbances des solutions témoin et dosage (A_1).
Ajouter :

Solution 3.4	0,02 ml	0,02 ml

Mélanger ; attendre la fin de la réaction (environ 5 min.) et lire les absorbances des solutions témoin et dosage (A_2).
Déterminer les différences d'absorbances (A_1-A_2) du témoin et du dosage.
Déduire la différence d'absorbances du témoin de la différence d'absorbances du dosage : ΔA_D and ΔA_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.

6. Expression des résultats

La concentration en acide citrique est donnée, en milligrammes par litre (mg/l) sans décimale.

6.1. *Mode de calcul*

La concentration en milligrammes par litre est donnée par la formule générale :

$$C = \frac{V \times PM}{\varepsilon \times \delta \times \nu} \times \Delta A$$

V = volume du test en millilitres (ici 3,14 ml)
v = volume de l'échantillon en millilitres (ici 0,2 ml)
PM = masse moléculaire de la substance à doser (ici, acide citrique anhydre = 192,1)
δ = trajet optique de la cuve en centimètres (ici 1 cm)
ε = coefficient d'absorption du NADH ; à 340 nm,
$\varepsilon = 6.3 \text{ mmole}^{-1} \times l \times \text{cm}^{-1}$

on obtient :

$$C = 479 \times \Delta A$$

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

Remarque :

- Mesure à 334 nm : C = 488 x ΔA (ε = 6,3 $mmole^{-1}$ x l x cm^{-1}).
- Mesure à 365 nm : C = 887 x ΔA (ε = 3,4 $mmole^{-1}$ x l x cm^{-1}).

6.2. *Répétabilité* (*r*)

Teneur en acide citrique inférieure à 400 mg/l : *r* = 14 mg/l.

Teneur en acide citrique supérieure à 400 mg/l : *r* = 28 mg/l.

6.3. *Reproductibilité* (R)

Teneur en acide citrique inférieure à 400 mg/l : R = 39 mg/l.

Teneur en acide citrique supérieure à 400 mg/l : R = 65 mg/l.

BIBLIOGRAPHIE

MAYER K. et PAUSE G., *Lebensm. Wiss. u. Technol.*, 1969. **2**, 143

JUNGE Ch., *F.V., O.I.V.*, 1970, n° 364

BOEHHRINGER, Mannheim, *Méthodes d'analyse enzymatique en chimie alimentaire*, documentation technique.

VAN DEN DREISCHE S. et THYS L., *F.V., O.I.V.*, 1982, n° 755.

Méthode OIV-MA-AS313-10 Méthode Type IV

Acide malique total

Méthode usuelle

(A33, révision par OIV/OENO 377/2009)

1 Principe de la méthode

L'acide malique isolé à l'aide d'une colonne de résine échangeuse d'anions est dosé colorimétriquement dans l'éluat grâce à la coloration jaune qu'il donne sous l'action de l'acide sulfurique à 96 p. 100 et de l'acide chromotropique. Les substances contenues dans l'éluat interfèrent dans cette réaction. Mais ces substances réagissent, contrairement à l'acide malique, avec l'acide sulfurique à 86 pour 100 et l'acide chromotropique. Pour éliminer cette interférence, il suffit donc de soustraire de l'absorbance obtenue après réaction avec l'acide chromotropique et l'acide sulfurique à 96 p. 100, l'absorbance obtenue après réaction avec l'acide chromotropique et l'acide sulfurique à 86 p. 100.

2. Appareillage

2.1. Colonne de verre de 250 mm environ de longueur et de 35 mm de diamètre intérieur, munie d'un robinet.

2.2. Colonne de verre de 300 mm environ de longueur et de 10 – 11 mm de diamètre intérieur, munie d'un robinet.

2.3. Bain d'eau à 100 °C.

2.4. Spectrophotomètre permettant les mesures d'absorbance à la longueur d'onde de 420 nm avec cuves de 10 mm de trajet optique.

3. Réactifs

3.1. *Échangeur d'anions de forte basicité (par exemple Merck III).*

3.2. *Hydroxyde de sodium à 5 p. 100 (m/v).*

3.3. *Acide acétique à 30 p. 100 (m/v).*

3.4. *Acide acétique à 0,5 p. 100 (m/v).*

3.5. *Solution de sulfate de sodium (Na_2SO_4) à 10 p. 100 (m/v).*

3.6. *Acide sulfurique concentré à 95-97 % (m/m).*

3.7. *Acide sulfurique à 86 p. 100 (m/m).*

3.8. *Solution d'acide chromotropique à 5 p. 100 (m/v).*

À préparer extemporanément avant chaque dosage en dissolvant 500 mg de chromotropate de sodium ($C_{10}H_6Na_2O_8S_2.2H_2O$) dans 10 ml d'eau distillée.

3.9. *Solution d'acide DL-malique à 0,5 g/l.*

Dissoudre 250 mg d'acide malique ($C_4H_6O_5$) dans une quantité suffisante de solution de sulfate de sodium à 10 p. 100 (3.5) pour avoir 500 ml.

4. **Mode opératoire**

4.1. *Préparation de l'échangeur d'ions*

Placer dans la colonne de verre 35 × 250 mm au-dessus du robinet un tampon de coton de verre imprégné d'eau distillée. Verser dans la colonne de l'échangeur d'ions mis en suspension dans l'eau de manière à avoir un espace libre d'environ 50 mm au-dessus de la surface de l'échangeur d'ions. Après rinçage avec 1000 ml d'eau distillée, remplir la colonne avec la solution d'hydroxyde de sodium à 5 p. 100, laisser écouler le liquide jusqu'à environ 2–3 mm au-dessus de la surface de l'échangeur d'ions, répéter encore 2 fois cette opération et laisser en contact durant 1 heure. Laver la colonne avec 1000 ml d'eau distillée. Ensuite, remplir la colonne avec la solution d'acide acétique à 30 p. 100, laisser écouler le liquide jusqu'à environ 2-3 mm au-dessus de la surface de l'échangeur d'ions, répéter cette opération 2 fois et laisser en contact durant au moins 24 heures avant l'emploi. Conserver ensuite l'échangeur d'ions dans l'acide acétique à 30 p. 100 pour les dosages ultérieurs.

4.2. *Préparation de la colonne d'échangeur d'ions*

Placer dans la colonne de verre 11 × 300 mm au-dessus du robinet un tampon de coton de verre. Verser dans la colonne l'échangeur d'ions, préparé comme décrit en 4.1, sur une hauteur de 10 cm. Le robinet étant ouvert, laisser la solution d'acide acétique à 30 p. 100 s'écouler jusqu'à environ 2-3 mm au-dessus de la surface de l'échangeur. Laver l'échangeur avec 50 ml de la solution d'acide acétique à 0,5 p. 100.

4.3. *Isolement de l'acide DL-malique*

Verser sur l'échangeur préparé comme décrit en 4.2, 10 ml de vin ou de moût. Laisser écouler le vin goutte à goutte (débit moyen : une goutte par seconde) jusqu'à environ 2-3 mm au-dessus de la surface de l'échangeur d'ions. Laver la colonne d'abord avec environ 50 ml de la solution d'acide acétique à 0,5 pour 100 et puis avec environ 50 ml d'eau distillée ; laisser écouler ces liquides avec la même vitesse que le vin.

Éluer les acides fixés sur l'échangeur d'ions à l'aide de la solution de sulfate de sodium à 10 p. 100 avec la même vitesse que les opérations précédentes (1 goutte/sec.), recueillir l'éluat dans une fiole jaugée de 100 ml jusqu'à ajustage au trait de jauge.

On peut régénérer l'échangeur comme décrit en 4.1.

4.4. *Dosage de l'acide malique*

Prendre deux tubes à large ouverture de 30 ml, bouchant à l'émeri,"A" et "B". Introduire dans chaque tube 1,0 ml d'éluat et 1,0 ml de la solution d'acide chromotropique à 5 p. 100. Ajouter dans le tube "A" 10,0 ml d'acide sulfurique à 86 p. 100 (témoin) et dans le tube "B" 10,0 ml d'acide sulfurique à 96 p. 100 (mesure). Boucher et agiter pour obtenir une homogénéité parfaite sans mouiller le rodage. Plonger les tubes pendant 10 minutes exactement dans un bain d'eau porté préalablement à une vive ébullition. Refroidir les tubes à 20 °C à l'obscurité. Exactement 90 minutes après le début du refroidissement, mesurer l'absorbance du tube "B" par rapport au témoin (tube "A") à la longueur d'onde 420 nm dans les cuves de 1 cm de trajet optique.

4.5. *Établissement de la courbe d'étalonnage*

Prélever 5 - 10 - 15 et 20 ml de la solution d'acide malique à 0,5 g/l et les introduire dans des fioles jaugées de 50 ml ; porter au trait de jauge avec la solution de sulfate de sodium à 10 p. 100.

Les solutions ainsi obtenues correspondent à des éluats obtenus à partir de vins contenant 0,5 - 1,0 - 1,5 et 2,0 g d'acide DL-malique par litre.

Continuer comme il est indiqué en 4.4.

Les valeurs de l'absorbance obtenues avec ces solutions-étalons reportées en fonction des teneurs en acide malique correspondantes s'alignent sur une droite passant par l'origine.

Étant donné que l'intensité de la coloration dépend beaucoup de la concentration de l'acide sulfurique, il est nécessaire de vérifier la courbe d'étalonnage pour au moins 1 point lors de chaque série de mesures pour mettre en évidence un changement éventuel dans la concentration de l'acide sulfurique.

5. Expression des résultats

Reporter l'absorbance mesurée pour l'éluat sur la courbe d'étalonnage pour obtenir la teneur en acide DL-malique en grammes par litre. Cette teneur est exprimée avec 1 décimale.

BIBLIOGRAPHIE

REINHARD C., KOEDING, G., *Zur Bestimmung der Apfelsäure in Fruchtsäften, Flüssiges Obst.*, 1989, **45**, S, 373 ff.

Méthode OIV-MA-AS313-11 Méthode Type II

Acide L-malique

Méthode enzymatique

(Recueil OIV ed. 1990, révision par OIV/OENO 377/2009)

1. Principe de la méthode

En présence de nicotinamide-adénine-dinucléotide (NAD) l'acide L–malique (L–malate) est oxydé en oxaloacétate dans une réaction catalysée par la L–malate-deshydrogénase (L-MDH).
L'équilibre de la réaction est en faveur du malate. L'élimination de l'oxaloacétate du milieu réactionnel délace l'équilibre de la réaction dans le sens de la formation d'oxaloacétate. En présence de L-glutamate, l'oxaloacétate est transformé en L–aspartate, réaction catalysée par la glutamate-oxaloacétate-transaminase (GOT).

(1) L-malate + NAD^+ $\overset{\text{L-MDH}}{\rightleftharpoons}$ oxaloacétate + NADH + H^+

(2) Oxaloacétate + L-glutamate $\overset{\text{GOT}}{\rightleftharpoons}$ -aspartate + α – cétoglutarate

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

2. **Appareillage**

2.1. Spectrophotomètre permettant d'effectuer les mesures à 340 nm, maximum d'absorption du NADH.
À défaut, photomètre à spectre discontinu permettant d'effectuer les mesures à 334 nm ou à 365 nm.

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

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

3. **Réactifs**

Eau bidistillée

3.1. Tampon pH 10 (glycylglycine 0,60 mol/l, L-glutamate 0,1 mol)
Dissoudre 4,75 g de glycylglycine et 0,88 g d'acide L-glutamique dans environ 50 ml d'eau bidistillée ; ajuster le pH à 10 avec environ 4,6 ml de solution d'hydroxyde de sodium 10 M et porter à 60 ml avec de l'eau bidistillée.
La solution reste stable pendant au moins 12 semaines + 4 °C.

3.2. Solution de nicotinamide-adénine-dinucléotide (NAD), environ 0,047 M :

dissoudre 420 mg de NAD dans 12 ml d'eau bidistillée. La solution reste stable pendant au moins 4 semaines à + 4 °C.

3.3. Suspension de glutamate-oxaloacétate-transaminase (GOT) à 2 mg/ml.
La suspension est stable pendant au moins un an à + 4 °C.

3.4. Solution de L-malate-deshydrogénase (L-MDH) à 5 mg/ml.
La solution est stable pendant au moins un an à + 4 °C.

Remarque : L'ensemble des réactifs nécessaires pour le dosage est disponible dans le commerce.

4. **Préparation de l'échantillon**

Le dosage du L-malate s'effectue généralement directement sur le vin sans décoloration préalable et sans dilution, à condition que la teneur en acide L–malique soit inférieure à 350 mg/l (mesures à 365 nm). Sinon, procéder à la dilution du vin avec de l'eau bidistillée de sorte que la concentration en L–malate se situe entre 30 et 350 mg/l (quantité de L-malate dans la prise d'essai comprise entre 3 et 35 µg).

Si la concentration en malate du vin est inférieure à 30 mg/l le volume de la prise d'essai peut être augmenté jusqu'à 1 ml. Dans ce cas le volume de l'eau à ajouter est réduit afin que les volumes totaux soient les mêmes dans les deux cuves.

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 réglé 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	Dosage
Solution 3.1	1,00 ml	1,00 ml
Solution 3.2	0,20 ml	0,20 ml
Eau bidistillée	1,00 ml	0,90 ml
Suspension 3.3	0,01 ml	0.01 ml
Echantillon	-	0,10 ml

Mélanger ; après environ 3 min., mesurer les absorbances des solutions témoin et dosage (A_1). Ajouter :

Solution 3.4	0,01 ml	0,01 ml

Mélanger ; attendre la fin de la réaction (environ 5 à 10 minutes) et mesurer les absorbances des solutions témoin et dosage (A_2).

Déterminer les différences d'absorbances (A_2 - A_1) du témoin et du dosage.

Déduire la différence d'absorbances du témoin de la différence d'absorbances du dosage.

$$\Delta A = \Delta A_D - \Delta A_T$$

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.

6. EXPRESSION DES RÉSULTATS

La concentration en acide L-malique est donnée en grammes par litre (g/l) avec 1 décimale.

6.1. *Mode de calcul*

La concentration en grammes par litre est calculée par la formule générale :

$$C = \frac{V \times PM}{\varepsilon \times \delta \times 1000} \times \Delta A$$

V = volume du test en ml (ici 2,22 ml)
v = volume de l'échantillon en millilitres (ici 0,1 ml)
P.M = masse moléculaire de la substance à doser (ici, acide L-malique = 134,09)
δ = trajet optique de la cuve en centimètres (ici 1 cm)
ε = coefficient d'absorption du NADH ; à 340 nm,

$$\varepsilon = 6{,}3 \text{ mmole}^{-1} \times l \times \text{cm}^{-1}$$

on obtient pour le L-malate :

$$C = 0{,}473 \times \Delta A$$

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

Remarque :

- Mesure à 334 nm, $\varepsilon = 6{,}2$ (mmole^{-1} x *l* x cm^{-1}).
  $C = 0{,}482 \times \Delta A$

- Mesure à 365 nm, $\varepsilon = 3{,}4$ (mmole^{-1} x *l* x cm^{-1}).
  $C = 0{,}876 \times \Delta A$

6.2. *Répétabilité* (*r*)

$r = 0,03 + 0,034\ x_i$.
x_i = concentration en acide malique de l'échantillon en g/l.

6.3. *Reproductibilité* (R)

$R = 0,05 + 0,071\ x_i$
x_i = concentration en acide malique de l'échantillon en g/l.

BIBLIOGRAPHIE

BERGMEYER H.U., *Méthodes d'analyse enzymatique*, 2e éd., Verlag-Chemie Weinheim/Bergstrasse, 1970
BOERHINGER, Mannheim, *Méthodes d'analyse enzymatique en chimi alimentaire*, documentation technique.
VAN DEN DRIESSCHE S. et THYS L., F.C. O.I.V., 1982, n° 755

Méthode OIV-MA-AS313-12A Méthode Type II

Acide D-malique

(Résolution OENO 6/98 ; OIV/OENO 377/2009)

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.

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

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-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 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
Echantillon	-	0,10 ml

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

Ajouter,

	Témoin	Essai
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 (ΔA_T) et de l'essai (ΔA_D).

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

$$\Delta A = \Delta A_D - \Delta A_T$$

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 concentration en milligrammes par litre est calculée par la formule générale :

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

V = volume du test en ml (ici 2,95 ml)
ν = 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)
ε = 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($l\ mmol^{-1}\ cm^{-1}$).

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 le 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.

BIBLIOGRAPHIE

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

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.

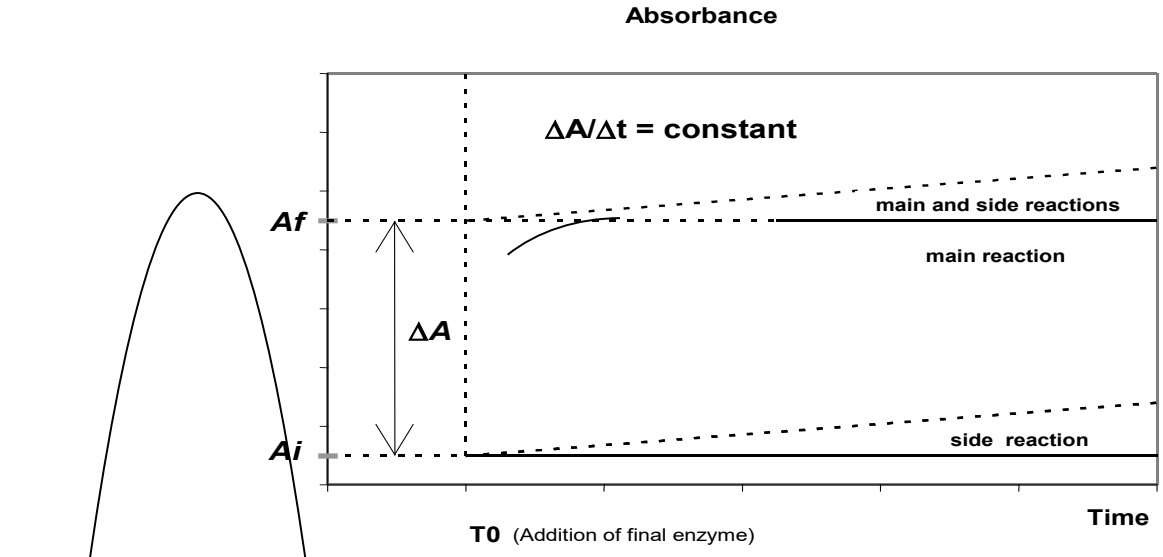


Figure 1 : réaction parasite

ANNEXE 2

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

Méthode OIV-MA-AS313-12B Méthode Type IV

Dosage de l'acide d-malique dans les vins pour des faibles teneurs, en employant la méthode enzymatique

(Résolution OENO 16/2002 ; OIV/OENO 377/2009)

1. DOMAINE D'APPLICATION

La méthode décrite est appliquée au dosage, par voie enzymatique, de l'acide D-malique des vins avec de teneurs inférieures à 50 mg/l.

2. PRINCIPE

Le principe de la méthode est basé sur l'oxydation de l'acide D-malique (D-malate) par le nicotinamide-adénine-dinucléotide (NAD) en oxaloacétate qui est transformé en pyruvate et dioxyde de carbone; la formation de NADH, mesurée par l'augmentation de l'absorbance à la longueur d'onde de 340 nm, est proportionnelle à la quantité de D-malate présente (principe de la méthode décrite pour le dosage de l'acide D-malique pour des teneurs supérieures à 50 mg/l), après l'introduction dans la cuve de mesure d'une quantité d'acide D-malique équivalente à 50 mg/l.

3. REACTIFS

Solution d'acide D-malique à 0,199 g/l, au-delà des réactifs indiqués dans la méthode décrite pour des teneurs supérieures à 50 mg/l.

4. APPAREILLAGE

L'appareillage indiqué dans la méthode décrite pour des teneurs supérieures à 50 mg/l.

5. PREPARATION DE L'ECHANTILLON

La préparation de l'échantillon est indiquée dans la méthode décrite pour des teneurs supérieures à 50 mg/l.

6. MODE OPERATOIRE

Le mode opératoire indiqué dans la méthode décrite pour des teneurs supérieures à 50 mg/l. (résolution Oeno 6/98), mais avec l'introduction dans la cuve d'une quantité d'acide D-malique équivalente à 50 mg/l. (introduction de 0,025 ml d'une solution d'acide D-malique à 0,199 g/l, en substitution du volume équivalent de l'eau) ; les valeurs obtenues sont diminuées de 50 mg/l.

7. VALIDATION INTERNE

Résumé du dossier de validation interne de la méthode de dosage de l'acide D-malique après adjonction préalable de 50 mg/l de cet isomère.

Gamme de travail	0 mg à 70 mg d'acide D-malique par litre. Dans ces limites, la méthode est linéaire, avec un coefficient de corrélation entre 0,990 et 0,994
Limite de quantification	24,4 mg/l
Limite de détection	8,3 mg/l
Sensibilité	0,0015 abs / mg/l
Taux de récupération	87,5 à 115,0% pour les vins blancs et 75 à 105% pour les vins rouges
Répétabilité	=12,4 mg/l pour les vins blancs (selon la méthode OIV, =12,5 mg/l) =12,6 mg/l pour les vins rouges (selon la méthode OIV, =12,7 mg/l)
Coefficient de variation	4,2% à 7,6% (vins blancs et vins rouges)
Variabilité intralaboratoire	CV=7,4% (s=4,4 mg/l; moyenne=59,3 mg/l)

8. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Chretien D., Sudraud P., 1993. Présence naturelle d'acide D(+)-malique dans les moûts et les vins, Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin, 27: 147-149.

Chretien D., Sudraud P., 1994. Présence naturelle d'acide D(+)-malique dans les moûts et les vins, Feuillet Vert de l'OIV, 966.

Delfini C., Gaetano G., Gaia P., Piangerelli M.G., Cocito C., 1995. Production of D(+)-malic acid by wine yeasts, Rivista de Viticoltura e di Enologia, 48: 75-76.

OIV, 1998. Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts.Mise à jour Septembre 1998. OIV, Paris.

Przyborski H., Wacha C., Bandion F., 1993. Zur bestimmung von D(+)Apfelsäure in wein, Mitteilung Klosterneuburg, 43: 215-218.

Machado M. et Curvelo-Garcia A.S.; 1999; , FV. O.I.V. N° 1082, Ref. 2616/220199.

Méthode OIV-MA-AS313-13A Méthode Type IV

Acide L-ascorbique
(A28, révision par OIV/OENO 377/2009)

1 Principe des méthodes

Les méthodes proposées permettent de doser l'acide ascorbique et l'acide déhydroascorbique présents dans les vins et les moûts.

L'acide L-ascorbique est oxydé par action du charbon actif en acide déhydroascorbique. Ceci forme un composé fluorescent par réaction avec l'orthophénylènediamine (O.P.D.A.). Un essai témoin en présence d'acide borique permet de déterminer la fluorescence parasite (par formation d'un complexe acide borique - acide déhydroascorbique) et de la déduire du dosage fluorimétrique.

2 Méthode (méthode fluorimétrique)

2.1. *Appareillage*

2.1.1. Fluorimètre.

Utiliser un spectrofluorimètre équipé d'une lampe à spectre continu en se plaçant à la puissance minimale de la lampe.

Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission optimales pour l'essai seront déterminées préalablement et dépendent de l'appareil utilisé. À titre indicatif la longueur d'onde d'excitation se situe au voisinage de 350 nm, la longueur d'onde d'émission au voisinage de 430 nm.
Cuves de 1 cm de trajet optique.

2.1.2. Filtre en verre fritté de porosité 3.

2.1.3. Tubes à essai (diamètre : 10 mm).

2.1.4. Agitateur pour tubes à essai

2.2.*Réactifs*

2.2.1. Solution de dihydrochlorure d'ortho-phénylènediamine ($C_6H_{10}Cl_2N_2$), à 0,02 g p. 100, préparée extemporanément.

2.2.2. Solution d'acétate de sodium trihydraté à 500 g/l.

2.2.3. Solution mixte d'acide borique et d'acétate de sodium

Dissoudre 3 g d'acide borique dans 100 ml de solution d'acétate de sodium à 500 g/l. Cette solution doit être préparée extemporanément.

2.2.4. Solution d'acide acétique (ρ_{20} = 1,05 g/ml) dilué à 56 p. 100 (v/v) de pH voisin de 1,2.

2.2.5. Solution de référence d'acide L-ascorbique à 1 g par litre

Dissoudre, au moment de l'emploi, 50 mg d'acide L-ascorbique, préalablement déshydraté dans un dessiccateur à l'abri de la lumière, dans 50 ml de solution d'acide acétique.

2.2.6. Charbon actif très pur pour analyses [4]

Placer dans une fiole conique de 2 litres de capacité, 100 g de charbon actif, ajouter 500 ml d'une solution d'acide chlorhydrique, (ρ_{20} = 1,19 g/ml) à 10 p. 100 (v/v). Porter à l'ébullition, filtrer sur filtre en verre fritté de porosité 3. Recueillir le charbon ainsi traité dans une fiole conique de 2 l de capacité. Ajouter 1 l d'eau, agiter et filtrer sur filtre de verre fritté de porosité 3. Répéter deux fois cette opération. Placer le résidu dans une étuve réglée à 115 ± 5 °C pendant 12 heures (une nuit par exemple).

2.3. *Mode opératoire*

2.3.1. Préparation de l'échantillon de vin ou de moût

Prélever un volume de vin ou de moût et le diluer à 100 ml dans une fiole jaugée avec la solution d'acide acétique à 56% afin d'obtenir une solution dont la concentration en acide L-ascorbique soit comprise entre 0 et 60 mg/litre. Homogénéiser le contenu de la fiole jaugée par agitation. Ajouter 2 g de charbon actif et laisser en contact durant 15 min. en agitant de temps en temps. Filtrer sur papier filtre ordinaire en éliminant les premiers millilitres de filtrat.

Dans deux fioles jaugées de 100 ml introduire 5 ml de filtrat et, respectivement, 5 ml de solution mixte d'acide borique et d'acétate de sodium (essai témoin) et 5 ml de solution d'acétate de sodium (dosage). Laisser en contact durant 15 minutes en agitant de temps en temps, compléter à 100 ml avec de l'eau distillée.

Prélever 2 ml du contenu de chacune des fioles, ajouter dans un tube à essai, ajouter 5 ml de solution d'ortho-phénylènediamine ; mélanger à l'aide de l'agitateur ; laisser la réaction se développer durant 30 min. à l'obscurité, puis effectuer la mesure au spectrofluorimètre.

2.3.2. Courbe d'étalonnage

Dans trois fioles jaugées de 100 ml placer respectivement 2, 4 et 6 ml de solution de référence d'acide L-ascorbique, compléter à 100 ml avec la solution d'acide acétique. Homogénéiser par agitation. Les solutions de référence préparées contiennent respectivement 2, 4 et 6 mg d'acide ascorbique/100 ml.

Ajouter 2 g de charbon actif dans chacune des fioles et laisser en contact durant 15 min. en agitant de temps en temps. Filtrer sur papier filtre ordinaire en éliminant les premiers millilitres.

[4] Une des appellations commerciales est "norite"

Introduire respectivement 5 ml de chacun des filtrats recueillis dans trois fioles jaugées de 100 ml (première série). Répéter l'opération dans une deuxième série de trois fioles jaugées. Ajouter dans chacune des fioles de la première série (correspondant à l'essai témoin) 5 ml de solution mixte d'acide borique et d'acétate de sodium et dans chacune des fioles de la deuxième série 5 ml de solution d'acétate de sodium.

Laisser en contact durant 15 min. en agitant de temps en temps. Compléter à 100 ml avec de l'eau distillée. Prélever 2 ml du contenu de chacune des fioles, ajouter 5 ml de solution d'ortho-phénylènediamine, agiter. Laisser la réaction se développer durant 30 min. à l'obscurité, puis effectuer la mesure au spectrofluorimètre.

2.3.3. Détermination fluorimétrique

Régler, pour chaque solution de la courbe d'étalonnage et pour la solution du dosage, le zéro de l'échelle des mesures sur l'essai témoin correspondant. Effectuer ensuite la mesure de l'intensité de la fluorescence pour chaque solution de la gamme d'étalonnage et pour le dosage.

Tracer la courbe d'étalonnage. Elle doit être linéaire et passer par l'origine. Reporter sur cette droite la valeur relative au dosage et déduire la teneur C en acide ascorbique + acide déhydroascorbique de la solution analysée.

2.4. *Expression des résultats*

La concentration du vin en acide L-ascorbique + acide déhydroascorbique exprimée en milligrammes par litre sera :

$$C \cdot X\ F$$

F = facteur de dilution

BIBLIOGRAPHIE

Norme AFNOR, 76-107, ARNOR, Tour Europe, Paris.
PROM T., *F.V., O.I.V.*, 1984, n° 788.

Méthode OIV-MA-AS315-13B Méthode Type IV

Acide L-ascorbique

Principe des méthodes

L'acide L-ascorbique est oxydé par l'iode en acide déhydroascorbique. Ce composé est précipité par la 2,4–dinitrophénylhydrazine en bis (2,4–dinitrophénylhydrazone). Après séparation par chromatographie sur couche mince et solubilisation en milieu acétique, ce composé coloré en rouge est dosé par spectrophotométrie à 500 nm.

SUPPRIMÉE
(Résolution OIV-Oeno-377-2009)

Méthode OIV-MA-AS313-14A Méthode Type IV

Acide sorbique
(A30 ; révision par OIV/OENO 377/2009)

1 Principe des méthodes

Méthode de dosage par spectrophotométrie d'absorption dans l'ultraviolet

L'acide sorbique (acide *trans*,trans-hexa-2,4-dièn oïque) extrait par entraînement à la vapeur d'eau est dosé dans le distillat du vin par spectrophotométrie d'absorption dans l'ultraviolet. Les substances interférant sur la mesure d'absorption dans l'ultraviolet sont éliminées par évaporation à sec de la prise d'essai du distillat légèrement alcalinisée par une solution d'hydroxyde de calcium. Les teneurs inférieures à 20 mg/l doivent être confirmées par la caractérisation par chromatographie en couche mince (sensibilité : 1 mg/l).

2 Méthode de dosage par spectrophotométrie d'absorption dans l'ultraviolet

2.1. *Appareillage*

2.1.1. Appareil d'entraînement par la vapeur d'eau (cf. *Acidité volatile*).

2.1.2. Bain d'eau à 100 °C.

2.1.3. Spectrophotomètre permettant des mesures à la longueur d'onde de 256 nm avec cuves en quartz de 1 cm de trajet optique.

2.2 *Réactifs*

2.2.1. Acide tartrique cristallisé.

2.2.2. Solution d'hydroxyde de calcium environ 0,02 M.

2.2.3. Solution de référence d'acide sorbique à 20 mg par litre.

Dissoudre 20 mg d'acide sorbique dans 2 ml environ de solution 0,1 M d'hydroxyde de sodium. Verser dans une fiole jaugée de 1000 ml, ajuster au trait de jauge avec de l'eau. On peut également dissoudre 26,8 mg de sorbate de potassium dans l'eau et compléter à 1000 ml avec de l'eau.

2.3. *Mode opératoire*

2.3.1.Distillation

Placer dans le barboteur de l'appareil d'entraînement par la vapeur d'eau 10 ml de vin, ajouter environ 1 g d'acide tartrique. Recueillir 250 ml de distillat.

2.3.2. Courbe d'étalonnage

Préparer par dilutions avec l'eau à partir de la solution de référence quatre solutions de référence diluées titrant respectivement 0,5-1-2,5 et 5 mg d'acide sorbique par litre; mesurer à l'aide du spectrophotomètre leurs absorbances respectives à 256 nm par rapport à l'eau distillée. Tracer la courbe des variations de l'absorbance en fonction des concentrations des solutions. La variation est linéaire.

2.3.3. Dosage

Dans une capsule de 55 mm de diamètre placer 5 ml de distillat, ajouter 1 ml de solution d'hydroxyde de calcium. Évaporer à sec sur bain d'eau bouillante.

Reprendre le résidu par quelques millilitres d'eau distillée, entraîner quantitativement dans une fiole jaugée de 20 ml et ajuster au trait de jauge avec les eaux de rinçage. Mesurer l'absorbance à 256 nm à l'aide du spectrophotomètre comparativement à une solution témoin obtenue par dilution à 20 ml avec de l'eau de 1 ml de solution d'hydroxyde de calcium.

Porter la valeur de l'absorbance mesurée sur la droite d'étalonnage, en déduire la concentration C de la solution en acide sorbique.

Remarque : Dans la pratique courante, cette évaporation à sec peut être négligée. Opérer directement la mesure d'absorbance sur le distillat dilué au ¼ par rapport à l'eau distillée.

2.4. *Expression des résultats*

2.4.1. Mode de calcul

La concentration en acide sorbique du vin exprimée en milligrammes par litre est égale à :

$$100 \times C$$

C = concentration en acide sorbique de la solution analysée par spectrophotométrie, exprimée en milligrammes par litre.

BIBLIOGRAPHIE

JAULMES P., MESTRES R. & MANDROU B., *Ann. Fals. Exp. Chim.,* n° spécial, réunion de Marseille, 1961, 111-116.
MANDROU, B., BRUN, S. & ROUX E., *Ann. Fals. Exp. Chim.,* 1975, 725, 29-48.
CHRETIEN D., PEREZ L. & SUDRAUD P., *F.V., O.I.V.,* 1980, n° 720

Méthode OIV-MA-AS313-14B Méthode Type IV

Acide sorbique
(A30 ; révision par OIV/OENO 377/2009)

1 Principe des méthodes

Méthode de dosage par chromatographie gazeuse

L'acide sorbique extrait dans l'éther éthylique est dosé par chromatographie en phase gazeuse en présence d'un étalon interne.

2. Méthode de dosage par chromatographie en phase gazeuse

2.1. Appareillage

2.1.1. Chromatographe en phase gazeuse équipé d'un détecteur à ionisation de flamme et d'une colonne en acier inoxydable (4 m × 1/8 de pouce) préalablement traitée par le diméthyldichlorosilane et garnie de phase stationnaire, constituée par un mélange de diéthylèneglycol succinate (5%) et d'acide phosphorique (1%) (DEGS-H_3PO_4) ou par un mélange de diéthylèneglycol adipate (7%) et d'acide phosphorique (1%) (DEGA-H_3PO_4) fixé sur Gaschrom Q 80-100 mesh.

Pour le traitement au diméthyldichlorosilane (DMDCS), faire passer dans la colonne une solution titrant 2 à 3 g de DMDCS dans le toluène.

Laver immédiatement la colonne avec du méthanol; faire passer un courant d'azote, puis de l'hexane et à nouveau un courant d'azote. La remplir ensuite.

Conditions opératoires :

- température du fou : 175 °C.
- température de l'injecteur et du détecteur : 230 °C.
- gaz vecteur : azote (débit 20 ml/min.).

Note: D'autres types de colonnes peuvent aussi donner une bonne séparation, en particulier les colonnes capillaires (par exemple FFAP). La méthode de travail décrites ci-dessous est donnée comme exemple

2.1.2. Microseringue de 10 microlitres de capacité graduée par 0,1 microlitre.

2.2. *Réactifs*

2.2.1. Éther éthylique distillé au moment de l'utilisation.

2.2.2. Solution de l'étalon interne : solution d'acide undécanoïque dans l'éthanol à 95 pour 100 vol. titrant 1 g par litre.

2.2.3. Solution aqueuse d'acide sulfurique, (ρ_{20} = 1,84 g/ml) dilué $^1/_3$ (v/v).

2.3. *Mode opératoire*

2.3.1. Préparation de l'échantillon à analyser

Dans un tube de verre de 40 ml environ de capacité et muni d'un bouchon rodé introduire 20 ml de vin, ajouter 2 ml de solution de l'étalon interne et 1 ml de solution diluée d'acide sulfurique.

Après agitation par retournements successifs, ajouter au contenu du tube 10 ml d'éther éthylique. Extraire l'acide sorbique dans la phase organique par agitation du tube durant 5 min. Laisser décanter.

2.3.2. Préparation de la solution de référence

Sélectionner un vin dont le chromatogramme de l'extrait à l'éther ne présente aucun pic au niveau de l'élution de l'acide sorbique; surcharger ce vin en acide sorbique à la concentration de 100 mg par litre. Traiter 20 ml de l'échantillon ainsi préparé selon le mode opératoire décrit en 2.3.1.

2.3.3. Chromatographie

Injecter successivement dans le chromatographe à l'aide d'une microseringue 2 µl de la phase éthérée obtenue en 2.3.2 et 2 µl de la phase éthérée obtenue en 2.3.1.

Enregistrer les chromatogrammes respectifs; vérifier l'identité des temps de rétention respectifs de l'acide sorbique et de l'étalon interne. Mesurer la hauteur (ou la surface) de chacun des pics enregistrés.

2.4. *Expression des résultats*

2.4.1. Mode de calcul

La concentration en acide sorbique du vin analysé, exprimée en milligrammes par litre, est égale à :

$$100 \times \frac{h}{H} \times \frac{I}{i}$$

H = hauteur du pic de l'acide sorbique dans la solution de référence.
h = hauteur du pic de l'acide sorbique dans l'échantillon à analyser.
I = hauteur du pic de l'étalon interne dans la solution de référence.
I = hauteur du pic de l'étalon interne dans l'échantillon à analyser.

NOTE : La concentration en acide sorbique peut être déterminée de la même manière à partir des mesures de la surface des pics respectifs.

BIBLIOGRAPHIE

JAULMES P., MESTRES R. & MANDROU B., *Ann. Fals. Exp. Chim.,* n° spécial, réunion de Marseille, 1961, 111-116.
MANDROU, B., BRUN, S. & ROUX E., *Ann. Fals. Exp. Chim.,* 1975, 725, 29-48.
CHRETIEN D., PEREZ L. & SUDRAUD P., *F.V., O.I.V.,* 1980, n° 720

Méthode OIV-MA-AS313-14C Méthode Type IV

Acide sorbique
(A30 ; révision par OIV/OENO 377/2009)

1 Principe des méthodes

Méthode de recherche de traces par chromatographie sur couche mince

L'acide sorbique extrait dans l'éther éthylique est séparé par chromatographie sur couche mince et sa concentration est évaluée semi-quantitativement.

2. Méthode de recherche de traces d'acide sorbique par chromatographie sur couche mince

2.1. *Appareillage*

2.1.1. Plaques pour chromatographie sur couche mince prêtes à l'emploi, 20 × 20 cm recouvertes de gel de polyamide (épaisseur : 0,15 mm) additionné d'un indicateur de fluorescence.

2.1.2. Cuve pour chromatographie sur couche mince.

2.1.3. Micropipette ou microseringue permettant de délivrer des volumes de 5 µl à ± 0,1 µl près.

2.1.4. Lampe à rayonnement ultraviolet (254 nm).

2.2. *Réactifs*

2.2.1. Éther éthylique

2.2.2. Solution aqueuse d'acide sulfurique (ρ_{20} = 1,84 g/ml) dilué 1/3 (v/v).

2.2.3. Solution de référence d'acide sorbique dans un mélange hydroéthanolique à 10 % d'éthanol (vol.) environ titrant 20 mg par litre.

2.2.4. Phase mobile : hexane-pentane-acide acétique (20:20:3)

2.3. *Mode opératoire*

2.3.1. Préparation de l'échantillon à analyser

Dans un tube en verre de 25 ml environ de capacité et muni d'un bouchon rodé, placer 10 ml de vin, ajouter 1 ml de solution d'acide sulfurique dilué et 5 ml d'éther éthylique. Agiter par retournements successifs. Laisser décanter.

2.3.2. Préparation des solutions diluées de référence

Par dilution à partir de la solution 2.2.3 préparer cinq solutions diluées de référence titrant respectivement 2, 4, 6, 8 et 10 mg d'acide sorbique par litre.

2.3.3. Chromatographie

À 2 cm du bord inférieur de la plaque, déposer à l'aide d'une microseringue ou d'une micropipette 5 µl de phase éthérée obtenue en 2.3.1 et 5 µl de chacune des solutions diluées de référence, les dépôts étant distants de 2 cm.

Placer la phase mobile dans la cuve pour chromatographie sur une hauteur de 0,5 cm environ et laisser l'atmosphère de la cuve se saturer des vapeurs des solvants. Placer la plaque dans la cuve. Laisser développer le chromatogramme sur 12 à 15 cm (la durée de développement est de 30 minutes environ). Sécher la plaque sous un courant d'air froid. Examiner le chromatogramme sous une lampe à rayonnement ultraviolet à 254 nm.

Les taches relatives à l'acide sorbique apparaissent en violet sombre sur le fond jaune fluorescent de la plaque.

2.4. *Expression des résultats*

La comparaison de l'intensité du spot de l'échantillon à analyser et des spots des solutions de référence permet d'évaluer semi-quantitativement la concentration en acide sorbique entre 2 et 10 mg par litre. Une concentration égale à 1 mg par litre pourra être déterminée avec un dépôt de 10 µl de solution de l'échantillon à analyser.

Des concentrations supérieures à 10 mg par litre pourront être déterminées avec un volume de dépôt de la solution à analyser inférieur à 5 µl (mesuré à l'aide d'une microseringue).

BIBLIOGRAPHIE

JAULMES P., MESTRES R. & MANDROU B., *Ann. Fals. Exp. Chim.,* n° spécial, réunion de Marseille, 1961, 111-116.
MANDROU, B., BRUN, S. & ROUX E., *Ann. Fals. Exp. Chim.,* 1975, 725, 29-48.
CHRETIEN D., PEREZ L. & SUDRAUD P., *F.V., O.I.V.,* 1980, n° 720

Méthode OIV-MA-AS313-15 Méthode Type I

pH

Résolution OIV-OENO 438-2011

1. Principe

Mesure de la différence de potentiel entre deux électrodes plongées dans le moût ou le vin. L'une des électrodes a un potentiel qui est une fonction définie du pH du liquide, l'autre a un potentiel fixe et connu et constitue l'électrode de référence.

2. Appareillage

2.1 pH mètre étalonné en unités pH permettant des mesures à 0,01 unité près..

2.2 Électrodes :

- électrode de verre, à conserver dans l'eau distillée;
- électrode de référence au calomel-chlorure de potassium saturé, à conserver dans une solution saturée de chlorure de potassium;
- ou électrode combinée à conserver dans l'eau distillée.

3. Réactifs

– Solutions tampons :

- Solution saturée de tartrate acide de potassium. Solution, contenant au moins 5,7 g/l de hydrogénotartrate de potassium (HOOC $C_2H_4O_2$ COOK) à 20 °C. Cette solution peut se conserver 2 mois en présence de 0,1 g de thymol pour 200 ml.

$$\text{pH} \begin{cases} 3{,}57 \text{ à } 20\ ^{o}\text{C} \\ 3{,}56 \text{ à } 25\ ^{o}\text{C} \\ 3{,}55 \text{ à } 30\ ^{o}\text{C} \end{cases}$$

- Solution 0,05 M de phtalate acide de potassium. Solution contenant 10,211 g/l de hydrogénophtalate de potassium (HOOC C_6H_4 COOK) à 20 °C.
  (Durée maximale de conservation : 2 mois.)

$$\text{pH} \begin{cases} 3{,}999 \text{ à } 15\ ^{o}\text{C} \\ 4{,}003 \text{ à } 20\ ^{o}\text{C} \\ 4{,}008 \text{ à } 25\ ^{o}\text{C} \\ 4{,}015 \quad \text{à} \quad 30 \quad ^{o}\text{C} \end{cases}$$

- Solution contenant :
  Dihydrogénophosphate de potassium, KH_2PO_4 ..... 3,402 g
  Hydrogénophosphate de potassium, K_2HPO_4 ..... 4,354 g
  Eau q.s.p. ..... 1 l
  (Durée maximale de conservation : 2 mois)

$$pH \begin{cases} 6{,}90 \text{ à } 15\ ^{o}C \\ 6{,}88 \text{ à } 20\ ^{o}C \\ 6{,}86 \text{ à } 25\ ^{o}C \\ 6{,}85 \text{ à } 30\ ^{o}C \end{cases}$$

N.B. : - N.B. Les solutions tampons de référence du commerce traçables au SI peuvent être utilisées.

Par exemple : pH 1,679 ±0.01 à 25°C

pH 4,005 ±0.01 à 25°C

pH 7,000 ±0.01 à 25°C

4. Mode opératoire

4.1 *Mise au zéro de l'appareil*

La mise à zéro s'effectue avant toute mesure, en suivant les indications données pour l'appareil utilisé.

4.2 *Étalonnage du pH mètre*

L'étalonnage de l'appareil doit être réalisé à 20°C avec des solutions tampon étalon raccordées au SI. Les valeurs de pH choisies doivent encadrer la gamme des valeurs pouvant être rencontrées dans les moûts et les vins. Dans le cas où le matériel utilisé ne permet pas d'assurer un étalonnage avec des valeurs suffisamment basses, une vérification utilisant un solution tampon étalon raccordée au SI et présentant une valeur de pH proche des valeurs des moûts et des vins peut être introduite.

4.3 *Mesure*

Plonger l'électrode dans le vin ou le moût dont la température doit être comprise entre 20 et 25 °C et aussi proche que possible de 20 °C. Lire directement sur l'échelle la valeur du pH.

Effectuer au moins deux déterminations sur le même vin.

Prendre comme résultat la moyenne arithmétique des deux déterminations.

5. Expression des résultats

Le pH du moût ou du vin est exprimé avec 2 décimales.

Méthode OIV-MA-AS313-16 Méthode Type IV

Dosage des acides organiques et anions mineraux dans les vins par chromatographie ionique

(Résolution OENO 23/2004 ; OIV/OENO 377/2009)

Préambule

Le développement de la chromatographie ionique haute performance dans les laboratoires a permis d'étudier le dosage par cette technique des acides organiques et anions minéraux dans les boissons alcoolisées ou non.
S'agissant particulièrement de l'analyse des vins, les résultats des essais d'intercomparaison et les mesures des taux de recouvrement ont permis de valider une méthodologie analytique.
L'intérêt majeur de cette méthode tient au fait que les colonnes échangeuses d'ions permettent une séparation de la plupart des acides organiques et anions et la détection par conductimétrie affranchit l'analyste des interférences dues à la présence de composés phénoliques. Or, ce type d'interférences est très notable dans les méthodes chromatographiques qui comportent une détection dans l'ultra-violet à 210 nm.

1 - OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION

La méthode de dosage des anions minéraux et acides organiques par chromatographie ionique est applicable aux boissons alcoolisées (vins, eaux-de-vie et liqueurs). Elle permet de doser les acides organiques dans les domaines de concentration, rapportés dans le tableau 1; ces concentrations sont obtenues par dilution des échantillons.

Tableau 1 : Domaine de concentration des anions pour leur analyse par chromatographie ionique

Sulfate	0,1 à 10	mg/l
Ortho-phosphate	0,2 à 10	mg/l
Acide malique	1 à 20	mg/l
Acide tartrique	1 à 20	mg/l
Acide citrique	1 à 20	mg/l
Acide isocitrique	0,5 à 5	mg/l

Les gammes de travail mentionnées ci-dessus sont données à titre indicatif. Elles englobent les modes d'étalonnage couramment pratiqués et sont donc modulables en fonction du type d'appareillage utilisé (nature de la colonne,

sensibilité du détecteur, ...) et du mode opératoire (volume d'échantillon injecté, dilution, ...).

2- PRINCIPE

Séparation des anions minéraux et acides organiques sur une résine échangeuse d'ions.
Détection par conductimétrie.
Identification d'après le temps de rétention et quantification au moyen d'une courbe d'étalonnage.

3 - REACTIFS

Tous les réactifs utilisés lors de l'analyse doivent être de qualité analytique. L'eau servant à la préparation des solutions doit être de l'eau distillée ou désionisée d'une conductivité inférieure à 0,06 µS, exempte des anions dosés à des seuils compatibles avec les limites de détection que permet d'atteindre l'appareillage utilisé.

3.1 Eluant

La composition de l'éluant dépend de la nature de la colonne de séparation et de la nature de l'échantillon à analyser. Elle est cependant toujours préparée à partir de solutions aqueuses d'hydroxyde de sodium.
Les performances de l'analyse chromatographique sont altérées par carbonatation de la solution d'hydroxyde de sodium; en conséquence, les flacons de phase mobile sont balayés à l'hélium avant adjonction d'hydroxyde de sodium et il faut prendre toutes les précautions afin d'éviter de les contaminer par l'air ambiant.
Enfin, ce sont des solutions d'hydroxyde de sodium concentrées commerciales qui seront utilisées.

Remarque
Le tableau du chapitre 7 rappelle les principaux interférents susceptibles d'être présents dans les échantillons.
Il est donc nécessaire de savoir au préalable s'ils coéluent avec les ions à doser et s'ils sont présents à une concentration telle que l'analyse est perturbée.
Les boissons fermentées contiennent de l'acide succinique qui peut interférer avec l'acide malique. A cet effet, il est nécessaire d'ajouter du méthanol dans l'éluant pour améliorer la résolution de la colonne au niveau de ces deux substances (20 % de méthanol).

3.2 Solutions mères étalons

Préparer des solutions mères étalons de concentrations précises voisines de celles indiquées sur le tableau suivant. Dissoudre dans l'eau, dans des fioles jaugées de 1000 ml, des quantités de sels ou d'acides correspondants. (Tableau 2)

Tableau 2 : Concentration des anions dosés dans les solutions mères étalons

Anions et acides	Composés pesés	Concentration finale (mg/l)	Quantité pesée (mg)
Sulfate	Na_2SO_4	500	739,5
Orthophosphate	KH_2PO_4	700	1003,1
Ac. malique	Ac. malique	1000	1000,0
Ac. tartrique	Ac. tartrique	1000	1000,0
Ac. citrique	Ac. Citrique.H_2O	1000	1093,8
Ac. isocitrique	Isocitrate 3Na.2H_2O	400	612,4

Remarque

Le laboratoire doit prendre les précautions nécessaires au regard du caractère hygroscopique de certains sels.

3.3 Solutions d'étalonnage

Les solutions d'étalonnage sont obtenues par dilution dans l'eau des solutions mères de chaque ion ou acide.
Ces solutions doivent contenir l'ensemble des ions ou acides dosés dans une gamme de concentrations recouvrant nécessairement celle correspondant aux échantillons à analyser. Elles doivent être préparées le jour de leur emploi.

Au moins deux solutions d'étalonnage et un blanc doivent être analysés de façon à établir, par substance, des courbes d'étalonnage à l'aide de trois points (0, demi-concentration maximale, concentration maximale).

Remarque
Le tableau 1 donne des indications sur les concentrations maximales en anions et acides dans les solutions d'étalonnage mais les performances des colonnes chromatographiques sont meilleures avec des solutions très diluées.

Il faut donc rechercher au mieux l'adéquation entre les performances de la colonne et le niveau de dilution des échantillons.

En général, on est amené à diluer l'échantillon entre 50 et 200 fois au maximum, sauf cas particulier.
Pour améliorer la durée de vie des solutions filles, il est souhaitable de les préparer en solution dans un mélange eau/ méthanol (80/20).

4 - APPAREILLAGE

Matériel courant de laboratoire et,

4.1 Ensemble instrumental pour la chromatographie ionique comprenant:

4.1.1 Réservoir(s) d'éluant(s)

4.1.2 Pompe à débit constant, sans effet de pulsation

4.1.3 Dispositif d'injection, soit manuel, soit automatique, constitué d'une vanne à boucle d'échantillonnage (par exemple 25 ou 50 µl).

4.1.4 Colonnes de séparation
Ensemble constitué d'une colonne échangeuse d'anions, de performance contrôlée, éventuellement d'une précolonne de même nature que la colonne principale. A titre d'exemple, il est possible d'utiliser les colonnes AS11 et précolonne AG11 de DIONEX®.

4.1.5 Système de détection
Cellule de conductivité à circulation, de très faible volume, reliée à un conductimètre comportant plusieurs gammes de sensibilité.
Afin d'abaisser la conductivité de l'éluant, un dispositif de suppression chimique, échangeur de cations est installé en amont de la cellule de conductivité.

4.1.6 Enregistreur, intégrateur ou autre dispositif de traitement des signaux.

4.2 Balance sensible au 1 mg

4.3 Fioles jaugées de 10 à 1000 ml

4.4 Pipettes calibrées de 1 à 50 ml

4.5 Membranes filtrantes de diamètre moyen de pore de 0,45 µm.

5 - ECHANTILLONNAGE

Les échantillons sont dilués en tenant compte des anions minéraux et des acides organiques que l'on souhaite doser.
Si leur concentration est très variable dans l'échantillon, deux niveaux de dilution seront nécessaires afin de respecter les domaines de concentration couverts par les solutions d'étalonnage.

6 - MODE OPERATOIRE

Mettre en marche l'appareillage en suivant les instructions du constructeur.
Régler les conditions de pompage (flux d'éluant) et de détection de manière à obtenir une séparations sélective des pics dans la gamme de concentrations des ions à analyser.
Laisser le système s'équilibrer jusqu'à obtention d'une ligne de base stable.

6.1 Etalonnage

Préparer les solutions d'étalonnage comme indiqué en 3.3.
Injecter les solutions d'étalonnage de façon à ce que le volume injecté soit au moins de 5 fois celui de la boucle d'échantillonnage pour permettre le rinçage du système.
Tracer les courbes d'étalonnage pour chaque ion. Celles-ci doivent être normalement des droites.

6.2 Essai à blanc

Injecter l'eau utilisée dans la préparation des solutions d'étalonnage et des échantillons.
Contrôler l'absence de pics parasites et quantifier les anions minéraux présents (chlorure, sulfate..).

6.3 Analyse

Diluer l'échantillon éventuellement à deux niveaux différents comme indiqué en 5, de sorte que les anions et acides à doser soient présents dans la gamme des concentrations des solutions d'étalonnage.
Filtrer l'échantillon dilué sur une membrane filtrante (4.5) avant injection.
Procéder ensuite comme pour l'étalonnage (6.1).

7 - REPETABILITE, REPRODUCTIBILITE

Cette méthode a été testée par un circuit interlaboratoire mais il ne s'agit pas d'une validation formelle selon le protocole OIV (Oeno 6/99).
La limite de répétabilité et la limite de reproductibilité du dosage de chaque ion dans les
vins ont été calculées selon la norme ISO 5725.
Chaque analyse a été répétée 3 fois.

Nombre de laboratoires participants: 11; Les résultats sont les suivants:

Vin blanc

	Nb labos retenus	**Moyenne** (mg/l)	**Répétabilité** (mg/l)	**Reproductibilité** (mg/l)
Acide malique	11/11	2745	110	559
Acide citrique	9/11	124	13	37
Acide tartrique	10/11	2001	96	527
Sulfate	10/11	253	15	43
O.phosphate	9/11	57	5	18

Vin rouge

	Nb labos retenus	**Moyenne** (mg/l)	**Répétabilité** (mg/l)	**Reproductibilité** (mg/l)
Acide malique	8/11	128	16	99
Acide citrique	8/10	117	8	44
Acide tartrique	9/11	2154	48	393
Sulfate	10/11	324	17	85
O.phosphate	10/11	269	38	46

8 - CALCUL DES TAUX DE RECOUVREMENT

L'échantillon supplémenté est un vin blanc

Détermination	Nb labos retenus	Concentration initiale (mg/l)	Ajout réel (mg/l)	Ajout mesuré (mg/l)	Taux de récupération (%)
Ac. citrique	11/11	122	25,8	24,2	93,8
Ac. malique	11/11	2746	600	577	96,2
Ac. tartrique	11/11	2018	401	366	91,3

9 - RISQUES D'INTERFERENCES

Toute substance dont le temps de rétention coïncide avec celui de l'un des ions analysés peut constituer une interférence.

Les interférences les plus courantes sont les suivantes:

Anions ou acides	Interférents
Nitrate	bromure
Sulfate	oxalate, maléate
Orthophosphate	phtalate
Ac. malique	Ac. succinique, Ac. citramalique
Ac. tartrique	Ac. malonique
Ac. citrique	-
Ac. isocitrique	-

Remarque
L'ajout de méthanol dans la phase mobile peut résoudre certains problèmes analytiques.

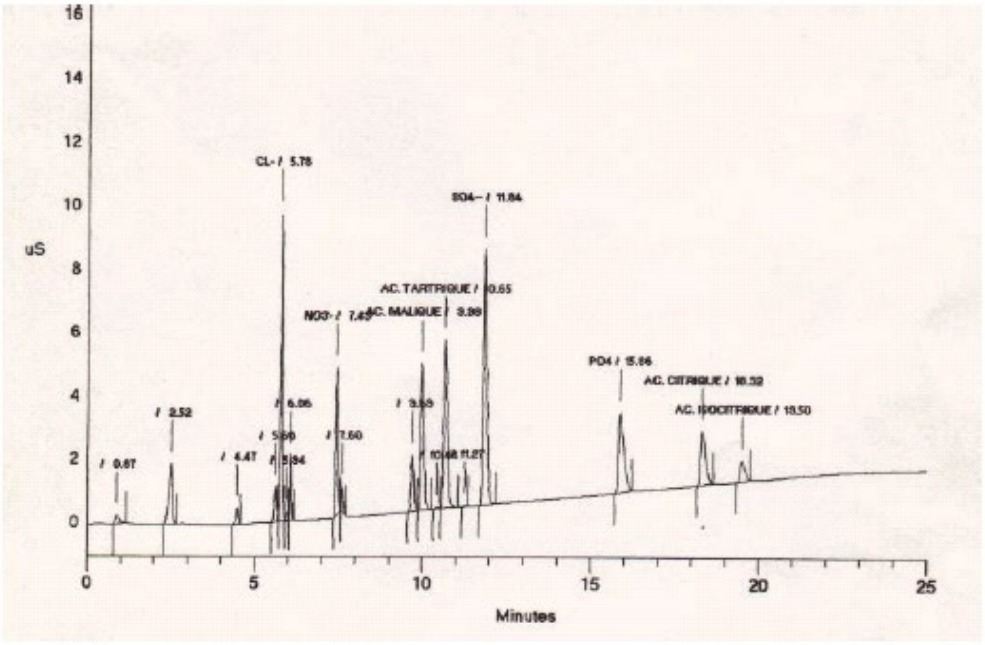
Par exemple:
- La présence de méthanol dans la phase mobile n'est pas toujours requise; cependant elle est indispensable pour obtenir une résolution convenable entre acide succinique et acide malique lors de l'analyse des vins.

- Les ions oxalates et sulfates coéluent avec la plupart des conditions chromatographiques; il faut 13% de méthanol dans la phase mobile pour les séparer.

- La résolution des pics correspondant aux acides acétique et lactique est satisfaisante si l'on réalise un gradient d'élution en hydroxyde de sodium, sans méthanol.

10 - EXEMPLES DE CHROMATOGRAMMES

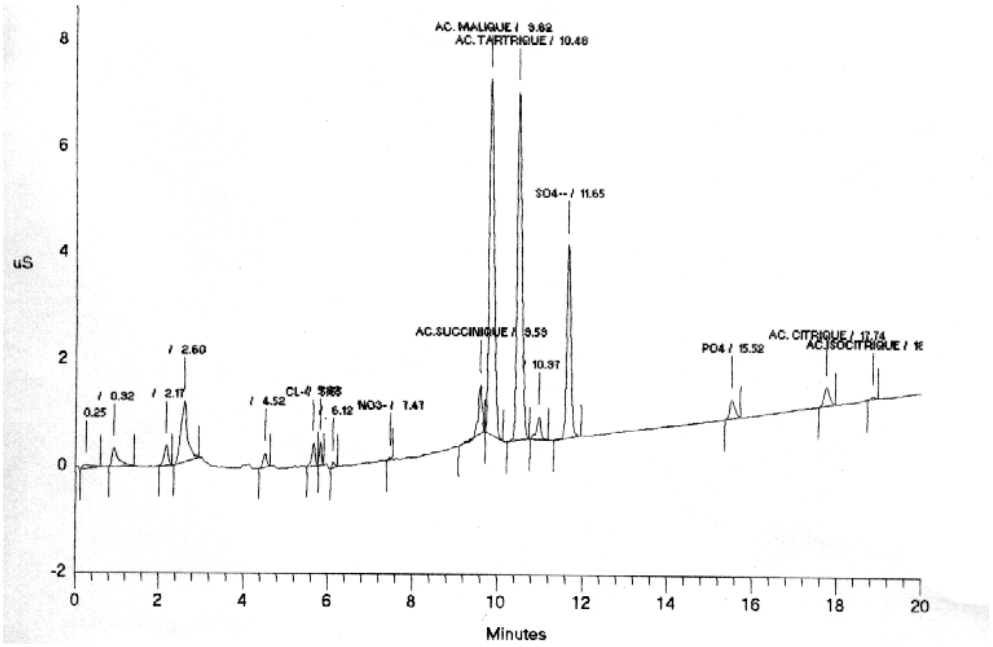
Annexe (a)



Chromatogramme d'une solution d'étalonnage d'acides organiques et d'anions minéraux: Chlorure (1,96 mg/l), Nitrate (2,21 mg/l), Acide malique (5,35 mg/l), Acide tartrique (5,08 mg/l), Sulfate (2,8 mg/l), O.phosphate (3,9 mg/l), Acide citrique (3,24 mg/l), Acide isocitrique (1,6 mg/l).

Appareillage utilisé de marque DIONEX: Pompe, Détecteur PED, suppresseur AMMSII avec AUTOREGEN, colonne AS11 et précolonne AG11.
Débit 2ml/mn -
Phase mobile 1: Eau-NaOH 0,5mM/l, méthanol (80/20)
Phase mobile 2: Eau-NaOH 100mM/l, méthanol (80/20)
Gradient d'élution: 100% Phase mobile 1 à 65% phase mobile 1 en 25 mn.

Annexe (b)



Chromatogramme d'un vin rosé dilué 200 fois:

Appareillage utilisé de marque DIONEX: Pompe, Détecteur PED, suppresseur AMMSII avec AUTOREGEN, colonne AS11 et précolonne AG11.
Débit 2ml/mn -
Phase mobile 1: Eau-NaOH 0,5mM/l, méthanol (80/20)
Phase mobile 2: Eau-NaOH 100mM/l, méthanol (80/20)
Gradient d'élution: 100% Phase mobile 1 à 65% phase mobile 1 en 25 mn.

Méthode OIV-MA-AS313-17 Méthode Type II

Dosage de l'acide shikimique dans le vin par chromatographie liquide haute performance et détection UV

(Résolution OENO 33/2004 ; OIV/OENO 377/2009)

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).

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 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

1. 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

2. 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

*) 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.

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.

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

<u>Note:</u> 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 (α) 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 (α)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 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:

$s_r = 0{,}0146 \times + 0.2716$
$s_R = 0{,}0286 \times + 1.4883$

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.

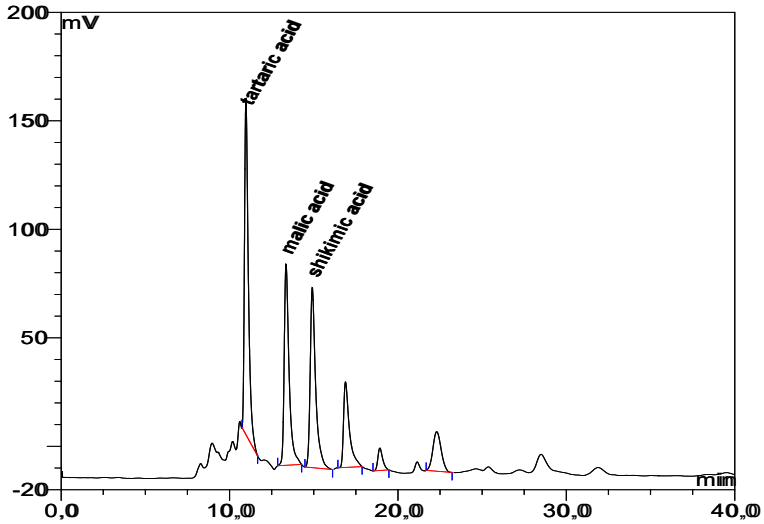
Les statistiques provenant des résultats d'une étude inter laboratoire sont fournis dans l'annexe 3.

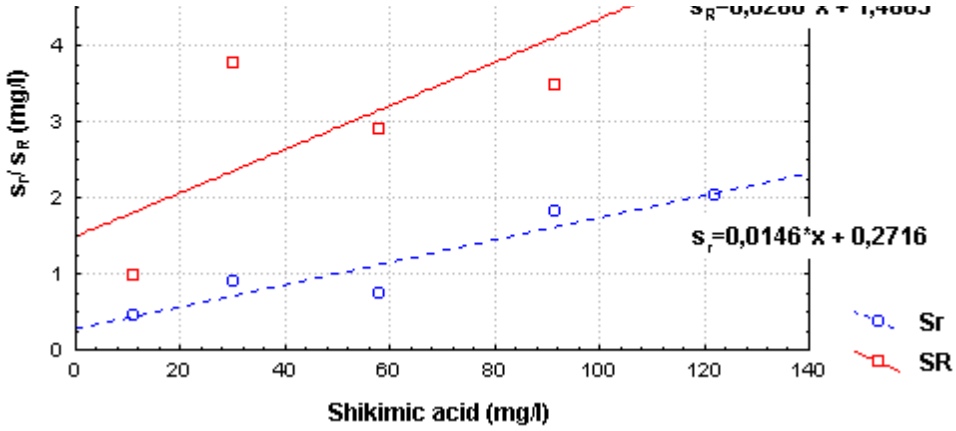
11. Références

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

[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


mV
200
150
100
50
-20
tartaric acid
malic acid
shikimic acid
min
0,0
10,0
20,0
30,0
40,0


s_r/ s_R (mg/l)
4
3
2
1
0
0
20
40
60
80
100
120
140
Shikimic acid (mg/l)
s_r=0,0146*x + 0,2716
Sr
SR

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
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

Méthode OIV-MA-AS313-18 Méthode Type IV

Dosage de l'acide sorbique dans les vins par électrophorèse capillaire

(Résolution OENO 4/2006 ; OIV/OENO 377/2009)

1 Domaine d'application

La présente méthode permet de doser l'acide sorbique dans les vins dans une gamme de 0 à 300 mg/l.

2 Principe

La charge négative de l'ion sorbate permet de le séparer efficacement par électrophorèse capillaire. En sortie de colonne, la détection est effectuée dans l'ultraviolet à 254 nm.

3 Réactifs et produits

3.1 Réactifs

3.1.1 Dihydrogénophosphate de sodium [10049-21-5] pureté > 96%
3.1.2 Hydrogénophosphate de sodium [10028-24-7] pureté > 99%
3.1.3. Hydroxyde de sodium [1310-73-2] pureté > 97%
3.1.4. Hippurate de sodium [532-94-5] pureté > 99%
3.1.5 Eau déminéralisée (< 15 MOHMS) ou bidistillée

3.2 Solution tampon de migration

Le tampon de migration est constitué d'une solution aqueuse de :

Dihydrogénophosphate de sodium (3.1.1) 5 mM
Hydrogénophosphate de sodium (3.1.2) 5 mM

3.3 Standard interne

Hippurate de sodium (3.1.4) en solution aqueuse à 0.5 g.L-1.

3.4 Solutions de rinçage

3.4.1 Hydroxyde de sodium (3.1.3) N/10

3.4.2 Hydroxyde de sodium (3.1.3) N

4 Préparation des échantillons

Les échantillons de vin sont préparés selon le schéma suivant qui entraîne une dilution au 1/20 :

Vin à analyser :	0.5 ml
Hydroxyde de sodium (3.1.3) N/10 :	0.5 ml
Standard interne (3.1.4) à 0.5 g.L-1 :	0.5 ml
qsp 10 ml avec de l'eau déminéralisée (3.1.5)	

5 Conditions opératoires

5.1 Conditionnement du capillaire

Avant sa première utilisation, et dès que les temps de migration augmentent, le capillaire doit être conditionné selon le processus suivant :

5.1.1 Rinçage avec une solution d'hydroxyde de sodium 1N (3.4.2) sous 20 psi (140 kPA) pendant 8 mn.
5.1.2 Rinçage avec une solution d'hydroxyde de sodium (3.4.1) 0.1 N sous 20 psi (140 kPA) pendant 12 mn
5.1.3 Rinçage à l'eau (3.1.5) sous 20 psi (140 kPA) pendant 10 mn
5.1.4 Rinçage au tampon de migration (3.2) sous 20 psi (140 kPA) pendant 30 mn

5.2 Conditions de migration

Ces conditions peuvent éventuellement être sujettes à de légères modifications en fonction de l'appareillage utilisé.

5.2.1 Le capillaire en silice fondue est de 31 cm de longueur, avec un diamètre de 50 microns.
5.2.2 Température de migration : 25 °C
5.2.3 Longueur d'onde de lecture : 254 nm.
5.2.4 Lecture du signal en mode direct (l'acide sorbique absorbe dans l'UV).
5.2.5 Premier prérinçage sous pression à 30 psi (210 kPA) avec une solution d'hydroxyde de sodium 0,1 N (3.4.1) pendant 30 secondes

5.2.6 Deuxième prérinçage sous pression à 30 psi (210 kPA) au tampon de migration (3.2) pendant 30 secondes.

5.2.7 L'injection se fait sous pression de 0,3 psi (2,1 kPA) pendant 10 secondes.

5.2.8 La migration dure environ 1.5 à 2 minutes sous une différence de potentiel de + 25 kV, en polarité normale (cathode à la sortie).

5.2.9 Certains appareils d'électrophorèse capillaire proposent des vials de grande contenance pour les solutions tampon de migration. Ceci est préférable lorsque plusieurs analyses sont réalisées à la suite, car les propriétés électrolytes se conservent plus longtemps.

5.3 Lecture des résultats

Les pics d'absorption du standard interne et de l'acide sorbique sont obtenus en moyenne 1 à 1,5 minutes après le début de la phase de migration sous tension. Le temps de migration est assez constant, mais peut légèrement varier en fonction de l'état du capillaire. En cas de dégradation du temps de migration, un reconditionnement du capillaire est nécessaire, et si les conditions nominales ne sont pas rétablies, le capillaire doit être remplacé.

6 Caractéristiques de la méthode

Les différentes étapes de validation interne décrites ont été effectuées selon la résolution OIV OENO 10/2005.

6.1 Répétabilité intralaboratoire

Écart type de répétabilité **Sr**	**1,6 mg.L^{-1}**
Répétabilité **r**	**4,6 mg.L^{-1}**

6.2 Linéarité

Droite de régression	Y = **0,99491 X + 2,52727**
Coefficient de corrélation **r**	**0,9997**
Écart type résiduel **Sxy**	**1,6 mg.L^{-1}**
Écart type pente **Sb**	**0,008 mg.L^{-1}**

6.3 Reproductibilité intralaboratoire

Écart type de reproductibilité **SR**	2,1 mg.L-1
Reproductibilité **R**	5,8 mg.L-1

6.4 Limites de détection et de quantification

Limite de détection **Ld**	**1,8 mg.L^{-1}**
Limite de quantification **Lq**	**4,8 mg.L^{-1}**

6.5 Robustesse

La méthode étant relative, les éventuelles légères variations des conditions d'analyse n'auront pas d'influence sur le résultat final, mais auront essentiellement des influences sur le temps de migration.

6.6 Spécificité de la méthode

L'éventuelle influence des principaux additifs œnologiques a été testée. Aucun n'entraîne une modification des résultats.

6.7 Raccordement de la méthode à la méthode de référence OIV

La méthode de référence OIV est le dosage par spectrométrie d'absorption dans l'ultraviolet. L'acide sorbique, extrait par entraînement à la vapeur d'eau, est dosé dans le distillat du vin par spectrométrie d'absorption dans l'ultraviolet à 256 nm.

6.7.1 Comparaison des répétabilités

	Électrophorèse capillaire	Méthode de référence OIV

Écart type de répétabilité S_r	**1,6 mg.L^{-1}**	**2,5 mg.L^{-1}**
Répétabilité **r**	**4,6 mg.L^{-1}**	**7,0 mg.L^{-1}**

6.7.2 Justesse de la méthode usuelle par rapport à la méthode de référence

Coefficient de corrélation **r**	**0,999**
Biais moyen **Md**	**0,03 mg.L^{-1}**
Écart type biais moyen **Sd**	**3,1 mg.L^{-1}**
Z-score (**Md/ Sd)**	**0,01**

Méthode OIV-MA-AS313-19 Méthode Type II et III

Dosage des principaux acides organiques des vins et des sulfates par électrophorèse capillaire

(Résolution OIV-OENO 5/2006, révision per OIV-OENO 407-2011)

1. Introduction

Les acides tartrique, malique et lactique et sulfates sont séparés et dosés par électrophorèse capillaire après simple dilution et addition d'étalon interne.

2. Titre

DOSAGE DES PRINCIPAUX ACIDES ORGANIQUES DES VINS ET DES SULFATES PAR ELECTROPHORESE CAPILLAIRE

3. Domaine d'application

L'électrophorèse capillaire permet de doser les acides tartrique et malique des moûts ainsi que les acides tartrique, malique, lactique et les sulfates des vins préalablement dilués, dégazés et filtrés si besoin.

4. Définitions

4.1 Electrophorèse capillaire
L'électrophorèse capillaire : ensemble de techniques qui utilisent un capillaire de silice de très faible diamètre pour séparer efficacement à l'aide d'un tampon approprié, à la fois des petites et des grosses molécules électriquement chargées en présence d'un courant électrique de fort voltage.

4.2 Tampon pour électrophorèse
Solution contenant un ou plusieurs solvants et des solutés de mobilités électrophorétiques convenables capables de tamponner le pH de cette solution.

4.3 Mobilité electrophoretique
Aptitude d'un ion à se déplacer rapidement sous l'effet d'un champ électrique.

4.4 Flux electroosmotique
Ecoulement du solvant du tampon le long de la paroi interne du capillaire dû aux déplacements des ions solvatés sous les effets du champ et des charges électriques de la silice

5. Principe

Les séparations des solutés d'un mélange par électrophorèse capillaire sont obtenues par migrations différentielles dans un électrolyte tamponné appelé tampon. L'électrophorèse se déroule dans un tube de silice de diamètre intérieur compris entre 25 et 75 µm. Les solutés à séparer sont entraînés simultanément par
2 forces qui peuvent agir dans le même sens ou en sens contraire. Ces deux forces sont dues au **champ électrique** et au **flux électroosmotique**.

Le champ électrique est représenté par la tension en volts appliquée entre les électrodes ramenée à un centimètre de capillaire, il est exprimé en $V.cm^{-1}$. La mobilité est une caractéristique de l'ion. Plus les molécules sont petites et chargées plus leur mobilité électrophorétique est importante.

Dans le cas où la paroi interne du capillaire est non revêtue, les charges électriques négatives de la silice vont engendrer une fixation d'une partie des cations du tampon. La solvatation et le déplacement vers la cathode d'une partie des cations du tampon créent le flux électroosmotique. Les choix du pH du tampon et l'utilisation d'additifs permettent de contrôler le sens et l'intensité de ce flux électroosmotique.

L'addition d'un ion chromophore dans le tampon permet l'obtention de pics négatifs qui représentent quantitativement les solutés à séparer qui n'absorbent pas à la longueur d'onde utilisée.

6. Réactifs et produits

6.1 Produits purs de qualité pure pour analyse à 99 % au moins

6.1.1 Sulfate de sodium ou sulfate de potassium
6.1.2 Acide L-tartrique
6.1.3 Acide D,L-malique
6.1.4 Acide citrique monohydraté
6.1.5 Acide succinique
6.1.6 Acide D,L-lactique
6.1.7 Dihydrogénophosphate de sodium
6.1.8 Gluconate de sodium
6.1.9 Chlorate de sodium
6.1.10 Acide dipicolinique
6.1.11 Bromure de céthyl-triméthyl-ammonium
6.1.12 Acétonitrile pour CLHP
6.1.13 Eau pure désionisée, ultrafiltrée
6.1.14 Hydroxyde de sodium
6.2 Solutions

6.2.1 Solution mère d'étalonnage
- Solution dans l'eau pure (6.1.13) des différents acides et sulfate à doser (6.1.1 à 6.1.6) à des concentrations exactement connues comprises entre 800 et 1200 mg l^{-1}
- Solution à conserver à +5° C pendant 1 mois maximum.

6.2.2 Solution d'étalon interne
- Solution de chlorate de sodium (6.1.9) à environ 2 g l-1 dans l'eau pure (6.1.13)
- Solution à conserver à +5° C pendant 1 mois maximum

6.2.3 Solution d'étalonnage à injecter
Dans une fiole jaugée de 50 ml de classe "A", déposer à l'aide de pipettes de classe
"A":
- 2 ml de la Solution d'étalonnage (6.2.1)
- 1 ml de solution d'étalon interne (6.2.2) Compléter à 50 ml avec de l'eau pure (6.1.13) Homogénéiser par agitation

Solution à préparer chaque jour

6.2.4 Solutions d'hydroxyde de sodium

6.2.4.1 Solution d'hydroxyde de sodium M

Placer dans une fiole de 100 ml 4 g d'hydroxyde de sodium (6.1.14)
Compléter avec de l'eau pure (6.1.13)
Agiter jusqu'à dissolution complète.

6.2.4.2 Solution d'hydroxyde de sodium 0,1 M
Placer dans une fiole de 100 ml 10 ml d'hydroxyde de sodium M (6.2.4.1)
Compléter avec de l'eau pure (6.1.13)
Homogénéiser.

6.2.5 Tampon électrophorétique

- Dans une fiole jaugée de 200 ml de classe "A", déposer
- 0.668 g d'acide dipicolinique (6.1.10)
- 0.364 g de bromure de céthyl-triméthyl-ammonium (6.1.11)
- 20 ml d'acétonitrile (6.1.12)
- 160 ml environ d'eau pure (6.1.13)
- Agiter jusqu'à complète dissolution (si besoin placer dans un bain à ultrasons pour éliminer les agrégats)
- Amener à pH 5.64 avec tout d'abord de la solution d'hydroxyde de sodium M (6.2.4.1) puis avec de la solution d'hydroxyde de sodium 0,1 M (6.2.4.2)
- Compléter à 200 ml avec de l'eau pure (6.1.13) Homogénéiser par agitation
- Solution à préparer chaque mois. Conservation à la température du laboratoire.
- Ce tampon peut être remplacé par un produit équivalent disponible sur le marché.

7. Appareillage

Un équipement d'électrophorèse capillaire nécessaire pour ces dosages contient essentiellement :

- Un passeur d'échantillons
- Deux flacons (vials) contenant du tampon
- Un capillaire de silice non revêtue de 50 µm de diamètre interne et de 60 cm de longueur entre l'entrée du capillaire et la cellule de détection. De 7 à 15 cm, suivant les appareils, supplémentaires sont nécessaires pour que la sortie du capillaire soit immergée au centre d'un autre flacon

- Une alimentation haute tension de courant continu capable de délivrer des tensions de 30 à + 30 kv. Les électrodes immergées dans les deux flacons où débouchent les extrémités du capillaire sont reliées aux bornes du générateur
- Un système de pressurisation capable de faire circuler le tampon dans le capillaire et permettre l'injection de la prise d'essai
- Un détecteur UV
- Un système d'acquisition des données

8. Préparation des échantillons pour essai

8.1 Dégazage et filtration
Les échantillons riches en gaz carbonique sont dégazés pendant 2 min aux ultrasons. Les échantillons troubles sont filtrés sur une membrane dont le diamètre des pores moyen est de 0,45 µm.

8.2 Dilution et ajout d'étalon interne
Placer 2 ml d'échantillon dans une fiole jaugée de 50 ml. Ajouter 1 ml de solution d'étalon interne (6.2.2). Compléter à 50 ml avec de l'eau pure (6.1.13) Homogénéiser.

9. Mode opératoire

9.1 Conditionnement d'un capillaire neuf (á titre indicatif)

- Circulation d'eau pure (6.1.13) en sens inverse (de la sortie du capillaire vers le flacon d'entrée) pendant 5 mn avec une pression de 40 psi environ (2,76 bar ou 276 kPa)
- Circulation d'hydroxyde de sodium 0,1 M (6.2.4.2) en sens inverse pendant 5 mn à la même pression
- Circulation d'eau pure (6.1.13) en sens inverse (de la sortie du capillaire vers le flacon d'entrée) pendant 5 mn à la même pression
- Recommencer ce cycle : passages d'eau pure, d'hydroxyde de sodium 0,1 M, eau pure
- Circulation du tampon électrophorétique (6.2.5) en sens inverse pendant 10 mn.

9.2 Reconditionnement d'un capillaire en cours d'utilisation (facultatif)

Lorsque que la qualité des séparations devient insuffisante un nouveau conditionnement du capillaire s'impose. Si les résultats obtenus ne sont toujours pas satisfaisants, changer le capillaire et le conditionner.

9.3 Vérification de la qualité du capillaire (facultatif)

Analyser à 5 reprises la solution d'étalonnage (6.2.3) dans les conditions d'analyses préconisées.

9.4 Conditions de séparation et de détection (à titre indicatif)

- Allumage de la lampe du détecteur 1 heure avant le début des analyses
- Rinçage du capillaire par circulation du tampon électrophorétique (6.2.5) pendant 3 mn en sens inverse sous une pression de 40 psi
- Injection par pression à 0,5 psi pendant 6 à 15 secondes des échantillons préparés en 8.1
- La polarité est réglée afin que l'anode soit du côté du détecteur
- Appliquer une tension de 0 à 16 Kv en 1 mn puis de 16 Kv pendant 18 mn environ
- (la durée de la séparation peut légèrement varier en fonction de la qualité du capillaire)
- La température est maintenue à + 25 °C
- La détection dans l'ultra violet est faite à 254 nm
- Rinçage du capillaire par circulation du tampon électrophorétique (6.2.5) pendant 2 mn en sens inverse sous une pression de 40 psi
- Changer le du tampon électrophorétique (6.2.5) contenu dans flacons d'entrée et de sortie tous les 6 injections au minimum.

9.5 Ordre dans lequel les analyses doivent être effectuées (à titre indicatif)

Changer le tampon électrophorétique (6.2.5) à chaque nouvelle série d'analyses

La séquence des analyses contient dans l'ordre :

- Analyse de la solution d'étalonnage (6.2.3)
- Analyse du matériau de référence (échantillon externe de concentration connue pour les différents acides à doser)
- Analyse des échantillons préparés en 8.2, les chromatogrammes devraient ressembler à ceux présentés en annexe A.

- A la fin des analyses effectuer un rinçage à l'eau pure (6.1.13) de 10 mn en sens inverse, (de la sortie du capillaire vers l'entrée),
- Eteindre la lampe du détecteur.

10. Calculs des résultats

Les calculs sont faits à partir des surfaces des pics obtenues après intégrations.

Les surfaces des pics de solutés de la solution d'étalonnage (6.2.3) sont corrigées en tenant compte des variations de surfaces des pics de l'étalon interne. Le coefficient de réponse pour chaque acide est calculé.

Les surfaces des pics de l'étalon interne et des pics des solutés sont relevées pour chaque échantillon. Les surfaces des solutés à doser sont recalculées en tenant compte de nouveau des variations de surfaces des pics de l'étalon interne pour obtenir des surfaces dites "corrigées".

Les surfaces corrigées sont ensuite multipliées par la valeur du coefficient de réponse correspondant.

Il est possible d'utiliser un système automatisé de gestion des données, pour autant que celles-ci puissent être contrôlées conformément aux principes décrits ci-dessus et aux bonnes pratiques (calcul du facteur de réponse et/ou établissement d'une courbe d'étalonnage).

FORMULE DE CALCULS

Les abréviations utilisées pour le calcul de la concentration d'un acide sont données dans le tableau suivant:

Les surfaces sont exprimées par les nombres entiers d'unités d'intégration.

Les concentrations sont données en g/L. (ne conserver que deux décimales).

ABREVIATIONS

	SOLUTION DE REFERENCE	**ECHANTILLON**
SURFACES DU PIC DOSE	**S_{AR}**	**S_{AE}**
PICS D'ETALON INTERNE	**S_{EIR}**	**S_{EIE}**
CONCENTRATION	**C_{AR}**	**C_E**

La formule de calcul est:

$$C_E = \frac{C_{AR} \times S_{AE} \times S_{EIR}}{S_{AR} \times S_{EIE}}$$

Chaque fois que cela est possible, l'analyse en double exemplaire permet de mettre en évidence une erreur éventuelle dans la reconnaissance des pics ou une imprécision des intégrations. Le passeur d'échantillons permet de réaliser les analyses en mode automatique tout au long du jour et de la nuit.

11. Fidélité

11.1 Organisation des essais

Les essais interlaboratoires et leurs résultats sont décrits dans les annexes B1 et B2.

11.2 Mesure de la fidélité

ESTIMATION DE LA FIDELITE APRES ANALYSES INTERLABORATOIRES

Nombre de laboratoires participants: 5

Résultats donnés en mg / l

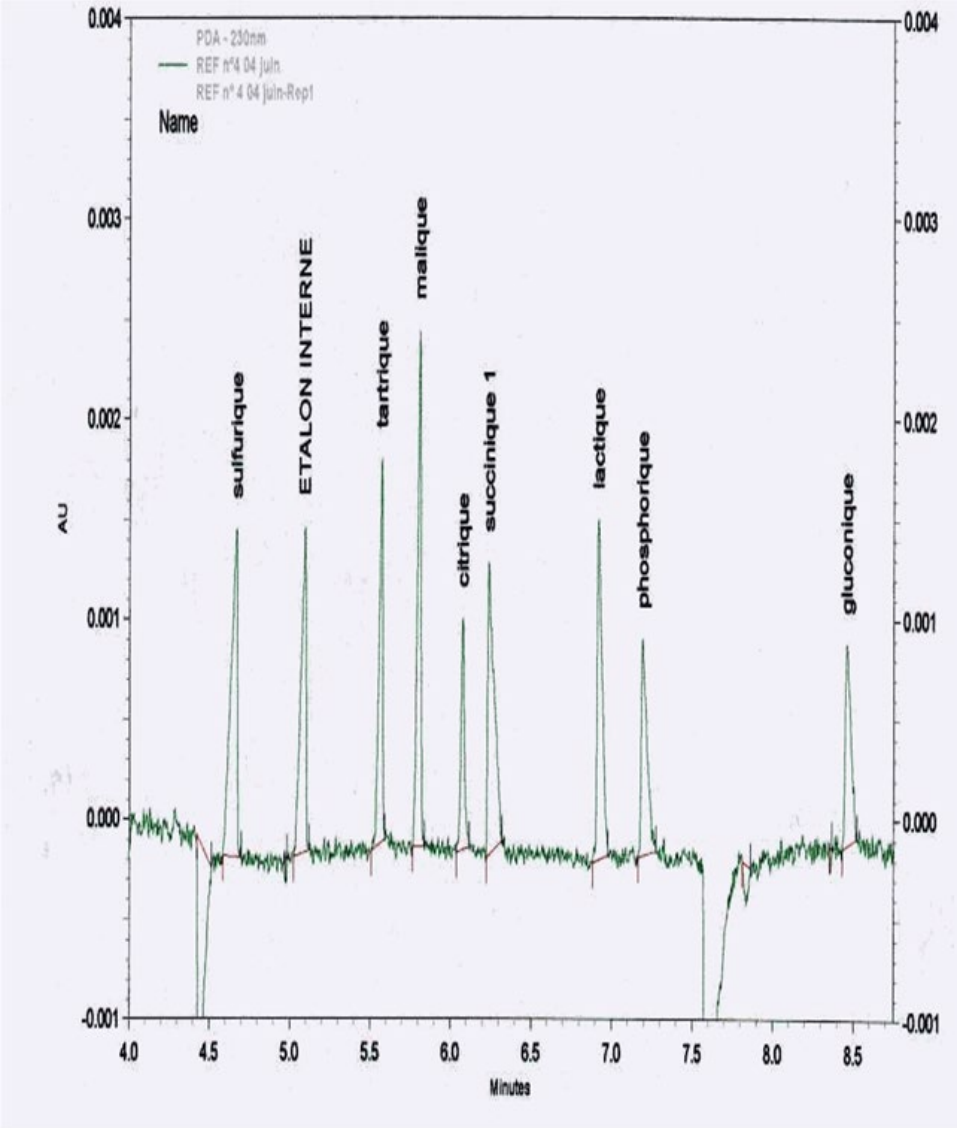
	Acide tartrique	Acide malique	Acide lactique

valeurs moyennes des concentrations	1395	1884	1013
valeurs moyennes des écarts types de répétabilité	38	54	42
valeurs moyennes des écarts types de réproductibilité	87	113	42

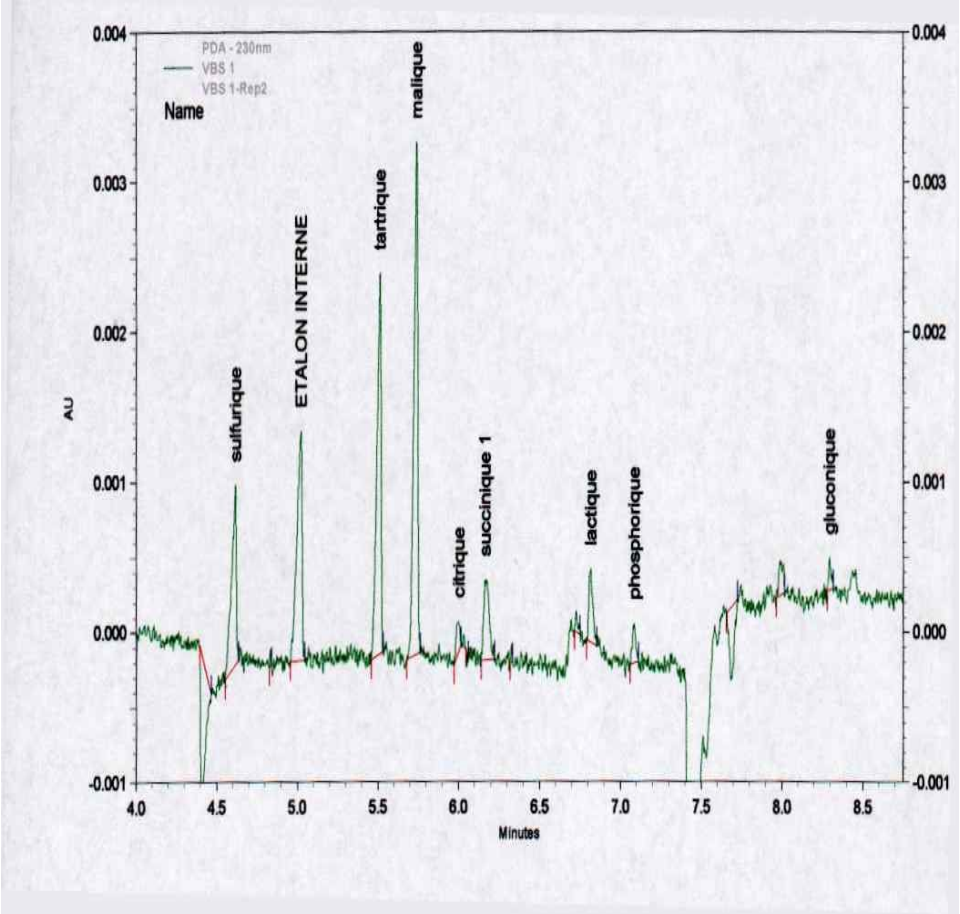
12. ANNEXES

ANNEXE A

ELECTROPHOREGRAMME D'UNE SOLUTION ETALON D'ACIDES



ELECTROPHOREGRAMME D'UN VIN


PDA - 230nm
VBS 1
VBS 1-Rep2
Name
sulfurique
ETALON INTERNE
tartrique
malique
citrique
succinique 1
lactique
phosphorique
gluconique
AU
Minutes
0.004
0.003
0.002
0.001
0.000
-0.001
4.0
4.5
5.0
5.5
6.0
6.5
7.0
7.5
8.0
8.5

ANNEXE B1

Données statistiques obtenues à partir des résultats des essais interlaboratoire (2006)

Conformément à l'ISO 5725-2:1994, les paramètres suivants ont été définis au cours d'un essai interlaboratoire. Cet essai a été conduit par le laboratoire de la Direction Générale de la Consommation et de la Répression des Fraudes de Bordeaux (France).

Année de l'essai interlaboratoire : 2006

Nombre de laboratoires : 5

Nombre d'échantillons : 8 en double aveugle (2 vins blancs secs, 2 vins blancs liquoreux, 2 vins rosés et 2 vins rouges)

ESSAIS INTERLABORATOIRES

Dosage de l'ACIDE TARTRIQUE par électrophorèse capillaire

Identification de l'échantillon	vins blancs secs		vins blancs liquoreux		vins rosés		vins rouges	
	A et D	B et C	E et F	G et H	I et J	K et L	M et N	O et P
Nombre de laboratoires participants	5	5	5	5	5	5	5	5
Nombre de résultats acceptés	5	5	4	5	5	5	4	5
Valeur moyenne en mg/l	1943	2563	1440	255	553	1885	1373	1148
Valeur acceptée en mg/l	1943	2563	1387	2217	1877	1593	1370	1830
Ecart-type de répétabilité (Sr)	27	25	106	23	40	31	25	24
Coefficient de variation de répétabilité	1,4	1	7,7	1	2,2	1,9	1,8	1,3
Limite de répétabilité (r)	77	70	298	65	113	86	70	66
Ecart-type de reproductibilité (SR)	96	128	174	80	57	55	52	53
Coefficient de variation de reproductibilité en %	4,9	5	12,6	3,6	3	3,5	3,8	2,9
Limite de reproductibilité (R)	268	359	488	223	160	154	145	148

Dosage de l'ACIDE MALIQUE par électrophorèse capillaire

Identification de l'échantillon	vins blancs secs		vins blancs liquoreux		vins rosés		vins rouges	
	A et D	B et C	E et F	G et H	I et J	K et L	M et N	O et P
Nombre de laboratoires participants	5	5	5	5	5	5	5	5
Nombre de résultats acceptés	5	5	4	5	5	5	4	4 5
Valeur moyenne en mg/l	2571	1602	1580	2539	3524	2109	173	869
Valeur acceptée en mg/l	2571	1602	1580	2539	3524	2109	177	869
Ecart-type de répétabilité (Sr)	54	19	113	36	61	109	7	32
Coefficient de variation de répétabilité	2,1	1,2	6,7	1,4	1,7	5,2	4,1	3,7
Limite de répétabilité (r)	151	54	315	99	170	305	20	89
Ecart-type de reproductibilité (SR)	90	51	171	97	279	142	21	53
Coefficient de variation de reproductibilité en %	13,6	9,8	41	39,6	14,7	9	14,1	7,6
Limite de reproductibilité (R)	252	142	479	273	782	397	59	148

Dosage de l'ACIDE LACTIQUE par électrophorèse capillaire

Identification de l'échantillon	vins blancs secs		vins blancs liquoreux		vins rosés		vins rouges	
	A et D	B et C	E et F	G et H	I et J	K et L	M et N	O et P
Nombre de laboratoires participants	5	5	5	5	5	5	5	5
Nombre de résultats acceptés	4	5	4	5	5	5	4	4 5
Valeur moyenne en mg/l	659	1324	258	255	553	1885	2066	1148
Valeur acceptée en mg/l	650	1324	258	255	553	1885	2066	1148
Ecart-type de répétabilité (Sr)	20	42	20	39	27	99	75	16
Coefficient de variation de répétabilité	3,1	3,2	7,8	15,1	4,8	5,3	3,7	16
Limite de répétabilité (r)	57	117	56	108	75	278	211	46
Ecart-type de reproductibilité (SR)	20,357	41,79	20	38,57	26,786	99,29	75,36	16,429
Coefficient de variation de reproductibilité en %	13,6	9,8	41	39,6	14,7	9	14,1	7,6
Limite de reproductibilité (R)	247	363	296	283	227	475	802	243

ANNEXE B2

Données statistiques obtenues à partir des résultats des essais interlaboratoire (sulfates 2010)

Conformément à l'ISO 5725-2:1994, les paramètres suivants ont été définis au cours d'un essai interlaboratoire. Cet essai a été conduit par le laboratoire Instituto dos Vinhos do Douro e do Porto (Portugal).

Années de l'essai interlaboratoire : 2010 - 2011

Nombre de laboratoires : 7 (un laboratoire a envoyé deux séries de résultats obtenus avec deux appareils différents)

Nombre d'échantillons : 6 en double aveugle

Indicateurs	Vin blanc (A/G)	Rosé (B/F)	Rosé (C/O)	Vin Rouge (D/M)	Vin liqueur (E/N)	Vin liqueur (I/K)	Vin blanc (H/Q)	Vin rouge (J/P)	Vin liqueur (L)
Nombre de groupes	7	7	6	7	8	7	7	7	8
Nombre de répétitions	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Minimum (g/L K_2SO_4)	0,71	0,34	0,40	0,62	1,79	1,06	1,38	1,96	2,17
Maximum (g/L K_2SO_4)	0,88	0,54	0,52	0,75	2,40	1,35	1,70	2,30	2,85
variance de répétabilité s_r^2	0,0012	0,0011	0,0001	0,0016	0,0063	0,0013	0,0036	0,0015	0,0053
variance intergroupe s_L^2	0,00148	0,00230	0,00163	0,00055	0,01952	0,01082	0,00668	0,01744	0,03552
variance de reproductibilité s_R^2	0,0027	0,0034	0,0018	0,0022	0,0258	0,0122	0,0103	0,0189	0,0408
Moyenne générale (g/L K_2SO_4)	**0,78**	**0,43**	**0,44**	**0,69**	**2,01**	**1,19**	**1,49**	**2,15**	**2,41**
Ecart-type de répétabilité (g/LK_2SO_4)	**0,04**	**0,03**	**0,01**	**0,04**	**0,08**	**0,04**	**0,06**	**0,04**	**0,07**
Limite r (g/L K_2SO_4)	0,100	0,093	0,031	0,115	0,224	0,103	0,170	0,109	0,206
CV de répétabilité	5%	8%	3%	6%	4%	3%	4%	2%	3%
Ecart-type de reproductibilité (g/L K_2SO_4)	**0,05**	**0,06**	**0,04**	**0,05**	**0,16**	**0,11**	**0,10**	**0,14**	**0,20**
Limite R (g/L K_2SO_4)	0,148	0,165	0,118	0,132	0,454	0,312	0,287	0,389	0,572
CV de reproductibilité	7%	14%	10%	7%	8%	9%	7%	6%	8%
HORRAT	1,1	2,1	1,5	1,1	1,6	1,7	1,3	1,3	1,7

13.
Bibliographie

ARELLANO M., COUDERC F. et PUIG .L (1997) : Simultaneous separation of organic and inorganic acids by capillary zone electrophoresis. Application to wines and fruit juices. Am. J. Enol. Vitic., 48, 408-412.

KANDL T. et KUPINA S. (1999): An improved capillary electrophoresis procedure for the determination of organics acids in grape juices and wine. Am. J. Vitic., 50, 155-161.

KLAMPF C.F. (1999): Analysis of organics acids and inorganics anions in different types of beer using capillary zone electrophoresis. J. Agric. Food Chem., 47, 987-990.

Méthode OIV-MA-AS313-20 Méthode Type II / IV

Dosage des acides sorbique, benzoïque, salicylique dans les vins par chromatographie liquide à haute performance

(Résolution OENO 6/2006 ; OIV/OENO 377/2009 ; OIV-OENO 687-2023)
(Type II pour l'acide sorbique ; type IV pour les acides benzoïque et salicylique)

1. Introduction

L'acide sorbique et son sel de potassium est un antiseptique utilisable en Œnologie mais certains pays ne tolèrent pas sa présence dans les vins y compris à l'état de trace. Ceci se justifiant en particulier en raison de l'odeur de géranium apparaissant lors de la dégradation de l'acide sorbique par les bactéries lactiques. Les acides benzoïques et salicyliques sont toujours interdits dans les vins mais ils sont utilisés dans d'autres boissons.

2. Domaine d'application

Tous les vins ou moûts de raisin en particulier ceux qui sont susceptibles de ne contenir que des traces d'acide sorbique, benzoïque ou salicylique.

3. Principe

Les antiseptiques sont dosés par HPLC par injection directe de l'échantillon dans une colonne fonctionnant par partage en phases inverses en isocratique avec détection dans l'ultraviolet[5].

4. Produits

4.1 Eau pure microfiltrée (par exemple de résistivité supérieure à 18,2 MΩ)
4.2 Tétrahydrofuranne pur
4.3 Méthanol pur
4.4 Acide chlorhydrique 0,1 M (préparé à partir d'ampoules à diluer)
4.5 Eau à pH2 amener 650 ml d'eau (4.1) à pH2 contrôlé à l'aide du pHmètre (5.5) en versant goutte à goutte sans agitation l'acide chlorhydrique 0,1 M (4.4)

[5] Pour l'analyse de l'acide sorbique, la colonne et la longueur d'onde sont fournies à titre d'exemple.

4.6 Solution d'élution. Mélanger 650 ml d'eau à pH2 (4.5), 280 ml de méthanol (4.3) et 7 ml de tétrahydrofuranne (4.2).

Remarque : il est également possible d'utiliser d'autres solvants d'élution, par exemple : 80% d'une solution d'acétate d'ammonium 0,005M (0,38 g/l) ajustée à pH 4 avec de l'acide acétique pur + 20% d'acétonitrile

4.7 Acide sorbique pur
4.8 Acide benzoïque pur
4.9 Acide salicylique pur
4.10 Alcool pur
4.11 Solution hydroalcoolique à 50 % vol. ou autre concentration adéquate : placer 500 ml d'alcool pur (4.10) dans une fiole de 1 l compléter avec de l'eau distillée (4.1)
4.12 Solution mère des acides à 500 mg/l. Dissoudre 50 mg des acides sorbique (4.7), benzoïque (4.8), salicylique (4.9) dans 100 ml de la solution hydroalcoolique à 50 % vol. (4.11)
4.13 Solution filles des acides sorbique, benzoïque, salicylique. Diluer la solution mère (4.12) dans la solution hydroalcoolique (4.11) de manière à obtenir les concentrations finales désirées par exemple pour une solution à

- 200 mg/l placer 20 ml de la solution mère (4.12) dans une fiole de 50 ml compléter au trait de jauge avec (4.11).
- 1 mg/l placer 2 ml de solution mère (4.12) dans une fiole de 50 ml. Compléter au trait de jauge avec 4.11

Des solutions intermédiaires peuvent être réalisées de la même manière selon les nécessités de l'étalonnage

5. Appareils

5.1 Verrerie de laboratoire en particulier pipette et fioles jaugées
5.2 Bain à ultrasons
5.3 Dispositif de filtrations sous vide pour volume important (1 l) utilisant des membranes filtrantes de diamètre de pore inférieur à 1 µm (généralement 0,45 µm)
5.4 Minifiltre pour échantillon (1 à 2 ml) utilisant des membranes filtrantes de diamètre de pore inférieur à 1 µm (généralement 0,45 µm)
5.5 pH mètre
5.6 Chromatographe en phase liquide fonctionnant en mode isocratique muni d'un dispositif d'injection pour faibles volumes (par exemple) vanne à boucle de 10 ou 20 µl.

5.7 Détecteur pouvant fonctionner dans l'ultra violet 235 nm (voir note 1) muni d'une cuve à circulation pour CLHP (par exemple de 8 µl pour 1 cm de trajet optique)
5.8 Colonne pour CLHP de phase stationnaire de 5 µm type silice greffée par des groupes octadécyles (C18) de 20 cm de long 4 mm de diamètre intérieur (voir note 1).
5.9 Système d'acquisition des données

6. Préparation des échantillons et du solvant d'élution

6.1 Filtrer les échantillons à analyser à l'aide du minifiltre (5.4)
6.2 Dégazer le solvant d'élution (4.6) durant 5 minutes à l'aide du bain à ultrasons (5.2) ou tout autre procédé adéquat.
6.3 Filtrer le solvant à l'aide du dispositif (5.3)

7. Mode opératoire

7.1 Conditionnement de la colonne. Avant l'injection mettre en route la pompe et rincer la colonne avec le solvant durant au minimum 30 minutes
7.2 Injecter une des solutions filles (4.13) afin de s'assurer de la sensibilité du système et de la bonne résolution des pics des substances à analyser.
7.3 Injecter l'échantillon à analyser faire éventuellement l'analyse d'un échantillon identique ayant été supplémenté par les acides à rechercher (adapter l'ajout à la quantité éventuellement décelée lors de l'analyse précédente, pour 1 mg présent ajouter également 1 mg…)

S'assurer de la bonne résolution des pics des acides recherchés avec les pics du vins (normalement il n'en existe pas dans cette zone)

8. Calcul

Après avoir repéré les pics des acides à doser dans l'échantillon comparer l'aire des pics avec celles des acides d'une solution fille (4.13) de concentration C connue

Par exemple soit s l'aire du pic de l'acide à doser. S l'aire du pic de la solution (4.13) de concentration C

$$X_{\text{dans l'échantillon}} = C \times \frac{s}{S} \qquad \text{en mg/l}$$

Il est également possible d'utiliser une gamme d'étalonnage et de déterminer la concentration par interpolation.

9. Caractéristiques de la méthode

9.1 Pour l'acide sorbique

L'étude interlaboratoires et les résultats correspondants sont décrits en annexe A.

- r = 0.0148 x + 0.5498
- R = 0.0936 x + 1.5542
- x : concentration en acide sorbique (mg/l)

9.2 Pour les acides benzoïque et salicylique

	Acide benzoïque	Acide salicylique
Domaine de linéarité	0 à 200 mg/l	0 à 200 mg/l
Justesse (taux de récupération)	> 90 %	> 90 %
Répétabilité : r*	3%	8%
Reproductibilité : R*	9%	12%
Limite de détection	3 mg/l	3 mg/l
Limite de quantification	6 mg/l	7 mg/l
Incertitude	12%	13%

10. Bibliographie

- Dosage de l'acide sorbique dans les vins par chromatographie en phase gazeuse. 1978. BERTRAND A. et SARRE Ch., *Feuillets Verts O.I.V.,* 654-681.

- Dosage de l'acide salicylique dans les vins par chromatographie en phase gazeuse. 1978. BERTRAND A. et SARRE Ch., *Feuillets Verts Ol.V.,* 655-682.

- Dosage de l'acide benzoïque, dans les sodas et autres produits alimentaires liquides, par chromatographie en phase gazeuse. 1978. BERTRAND A. et SARRE Ch. *Ann. Fals. Exp. Chim. 71, 761,* 35-39.

-Application de la chromatographie liquide à l'analyse des vins et des moûts. 1979. SALAGOITY-AUGUSTE M.-H. Doctorat de l'université de Bordeaux 2.

ANNEXE A. Données statistiques obtenues à partir des résultats de l'étude interlaboratoires

Les paramètres suivants ont été définis au cours d'une étude interlaboratoires. Cette étude a été conduite par le laboratoire de l'Institut des vins du Douro et de Porto (Portugal).

Année de l'étude interlaboratoires : 2020

1. Laboratoires : 23 laboratoires de 14 pays différents

HBLA und Bundesamt für Wein- und Obstbau Klosterneuburg	Autriche
Département de l'agriculture	Chypre
Autorité tchèque de contrôle agricole et alimentaire	République tchèque
Comité interprofessionnel du vin de Champagne	France
Laboratoires Dubernet	France
Service commun des laboratoires, laboratoire de Montpellier	France
Service commun des laboratoires, laboratoire de Bordeaux	France
Landesuntersuchungsamt, Institut für Lebensmittelchemie	Allemagne
Lebensmittel- u. Veterinärinstitut Braunschweig/Hannover	Allemagne
Office national de la sécurité de la chaîne alimentaire	Hongrie
Unione Italiana Vini Servizi	Italie
Vassanelli Lab s.r.l.	Italie
AsureQuality Ltd Laboratory Services	Nouvelle-Zélande
Arcus Norway AS	Norvège
Autorité pour la sécurité alimentaire et économique (ASAE)	Portugal
Institut des vins du Douro et de Porto	Portugal
Université RUDN	Fédération de Russie
Laboratoire national pour la santé, l'environnement et l'alimentation (Novo Gorica)	Slovénie
Institut national de chimie	Slovénie

Laboratoire national pour la santé, l'environnement et l'alimentation (Novo Mesto)	Slovénie
Laboratorio Arbitral Agroalimentario	Espagne
Estación Enológica de Haro-La Rioja	Espagne
Département de génie agroalimentaire de l'Université de Çukurova	Turquie

2. Nombre d'échantillons : six échantillons en double

- 2 vins blancs : A/G, C/K
- 1 vin blanc de récolte tardive : I/O
- 1 vin rouge : D/M
- 1 vin rosé : B/F
- 1 vin rouge fortifié (titre alcoométrique : 19 % vol.) : E/N

3. Conditions d'analyse

Les conditions d'analyse sont résumées dans le tableau 1.

4. Résultats individuels

Les résultats individuels (mg/L) pour l'acide sorbique sont résumés dans le tableau 2.

5. Analyse des données

- Une analyse statistique a été réalisée suivant les recommandations de l'OIV afin d'obtenir des données de précision.
- Les valeurs en-deçà de la limite de quantification ont été traitées comme des valeurs normales.
- La détermination des valeurs aberrantes a été évaluée par les tests de Cochran et de Grubbs
- Les résultats sont résumés dans les tableaux 3 et 4.
- Les limites de répétabilité et de reproductibilité en fonction de la concentration en acide sorbique sont représentées dans la figure 1.
- Les z-score de chaque laboratoire a été évalué par rapport aux valeurs globales pour les différents échantillons. Les résultats sont indiqués dans la figure 2.

TABLEAU 1. CONDITIONS D'ANALYSE

Code Lab.	Courbe d'étalonnage	Colonne	Détection	Phase mobile	Débit (mL/min)	Température de la colonne (°C)	Volume d'injection (µL)
1	oui	Altima C18LL 5 µm 250 x 4,6 mm	λ = 235 nm	Eau pH = 2,0 / MeOH/ THF (650/280/70)	1	ambiante	20
2	oui	C18 250 x 4,6 Luna Phenomenex	λ = 235 nm	Acétate d'ammonium dans 1 L eau + 250 mL ACN (pH = 4 rectifié par CH_3COOH)	1,25	35	20
3	oui	Poreshell 120 EC-C18 150 x 4,4 mm ; 2,7 µm	λ = 235 nm	A : eau 0,7 % THF (pH = 2) / B : MeOH (80 % A et 20 % B)	1,5	40	5
4	oui	RP-18 (250-4)	λ = 254 nm	Tampon acétate d'ammonium (pH 4,4) : MeOH = 70:30	1	40	20

6	oui	PerfectSil Target ODS-3 HD. 5 µm. 250 x 4,6 mm	λ = 235 nm	ACN:Solution tampon (35:65) ; solution tampon = acétate d'ammonium (1,8 g/L) + acide acétique. pH = 4,3	1	40	2
7	oui	PoroShell C18 4.6 x 75 mm ; 2,7 µm	λ = 235 nm	Isocratique : 80 % eau acidifiée par acide sulfurique ; 20 % ACN	1,5	25	20
8	oui	Rezex-ROA- acide organique H+ (8 %) -300 x 7,8 mm	λ = 254 nm	Solvant d'élution acide sulfurique = 0,025 M	1	90	50
9	oui	HICROM Ultrasphere 5 µm ODS column. 250 x 4.6 mm	λ = 235 nm	650 mL eau pH 2 + 280 mL MeOH + 7 mL THF	0,6	25	20
10	oui	Teknokroma Trace Excel 120 ODSB 5 µm. 20 x 0.4 cm	λ = 235 nm	650 mL eau pH 2 (HCl 0,1 M) + 280 mL MeOH + mL THF	1	24	20
11	oui	C18 5 µm. 200 x 4 mm	λ = 235 nm				
12	oui	RP18 Chromolith 100 x 4,6 mm ; 5 µm	λ = 235 nm	770 eau pH = 2,3 (0,8 mL H_3PO_4): isopropanol 200 mL. ACN 30 mL	1	25	10

13	oui	Phenomenex Gemini 5 µm. C18; 150 x 2 mm	λ = 240 nm	0,925 g acétate d'ammonium + 1,2 L eau + 0,8 L MeOH (pH 5,5 acide acétique)	0,4	40	10
15	oui	C18 5 µm. 200 x 4 mm	λ = 235 nm	90 % v/v eau 15 mL acide acétique + 15 g acétate d'ammonium 10 % v/v MeOH	1	40	10
16	oui	Prodigy 5 µm ODS-3 100. 150 x 4,6 mm avec colonne de garde C18	λ = 261 nm	80 % v/v eau pH = 4 (acide acétique pur) + 0,005 M acétate d'ammonium 20 % v/v ACN	1,2	40	50
17		Kinetex RP-C18 150 x 4,6 mm ; 5 µm	λ = 230 nm	11/89. MeOH:Tampon (Tampon = 3,0 g KH_2PO_4 + 3,0 g K_2HPO_4 + 100 mL eau)	0,6	40	6
18	oui	C18 Luna. Phenomenex	λ = 224 nm	95 % tampon phosphate : 5 % ACN	1,2	ambiante	20

19	oui	Phenomenex Aqua C18 125A 250 x 4,6 mm ; 5 µm	λ = 235 nm	0,005 M acétate d'ammonium (pH 4):ACN = 8:2	1	25	2
20	oui	Zorbax Eclipse XDB-C18 4.6 x 150 mm. 5 µm	λ = 235 nm	650 mL eau pH 2 (HCl 0,1 M) + 280 mL MeOH + 7 mL THF	1	ambiante	5
21	oui	RP-18 Nucloedur 100-C18. 3 µm. 50 mm	λ = 262 nm	A:B = 80:20 ; A : acétate d'ammonium. 0,002 mol/L. pH = 4,1 (rectifié par acide acétique conc.) ; B : MeOH/ACN 2:1	1	60	6
22	oui	HYPERSIL ODS 250X4,6 mm. 5 µm	λ = 235 nm		1,8	40	20
23	oui	RP-C18. 150 x 4,6 mm ; 5 µm	λ = 235 nm		1	25	20
24	oui	RP-C18 Purospher 125 x 4 mm ; 5 µm	λ = 235 nm	MeOH/0,02 M tampon acétate de sodium pH 4,4 = (30/70 v/v)	0,8	40	5
26	oui	Kinetex XB-C18 100 x 4,6 mm ; 2,6 µm	λ = 254 nm	Eau 0,1 % TFA. ACN 0,1 % TFA	1,5	30	10

TABLEAU 2.RÉSULTATS INDIVIDUELS POUR L'ACIDE SORBIQUE (mg/L)

	Vin blanc (A)		Rosé (B)		Vin blanc (C)		Vin rouge (D)		Vin fortifié (E)		Rosé (F)		Vin blanc (G)		Vin blanc (I)		Vin blanc (K)		Vin rouge (M)		Vin fortifié (N)		Vin blanc (O)	
Code du labora-toire	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
1	36,3	35,5	226,0	221,0	88,0	86,0	5,2	5,3	1,7	1,8	226,0	224,0	36,1	35,9	125,0	124,0	90,0	87,0	4,7	4,6	1,8	2,0	126,0	126,0
2	33,1	33,2	210,7	208,3	80,9	81,4	4,5	4,4	1,7	2,4	210,4	209,5	33,0	32,5	116,0	114,9	81,2	80,6	4,3	5,7	2,0	2,4	116,3	116,1
3	34,1	34,5	216,8	215,5	84,7	84,5	5,3	5,2	2,5	2,3	216,3	217,2	34,5	34,3	119,8	120,1	84,5	84,3	5,7	5,7	2,4	2,4	120,5	120,2
4	34,7	35,0	223,1	224,7	89,3	88,6	5,1	5,1	2,1	2,2	220,0	221,6	34,5	34,8	123,1	123,2	86,7	86,4	5,2	5,2	2,1	2,1	123,1	123,5
6	34,3	34,6	214,2	215,2	83,9	84,0	5,5	5,6	1,9	2,0	215,0	215,6	34,6	34,7	120,6	120,7	83,6	83,9	6,2	6,5	2,0	2,1	120,1	121,1
7	34,0	35,0	217,0	218,0	84,0	85,0	5,0	6,0	3,0	3,0	218,0	218,0	35,0	35,0	122,0	123,0	86,0	84,0	5,0	5,0	2,0	2,0	122,0	122,0
8	33,9	33,4	216,8	218,5	86,2	83,8	4,5	4,5	2,0	2,0	218,8	215,5	35,2	33,9	122,0	118,9	84,2	84,3	4,3	4,1	2,0	2,0	124,5	123,3
9	32,5	32,5	197,4	198,2	81,0	80,7	3,4	3,4	1,4	1,4	197,0	195,8	32,1	32,2	112,5	112,2	79,3	79,4	3,3	3,3	1,3	1,2	113,5	113,7
10	34,1	34,1	216,0	217,0	83,7	83,6	5,7	5,6	2,2	2,1	216,0	216,0	34,2	34,0	118,0	119,0	83,4	83,4	5,6	5,8	2,1	2,1	120,0	119,0
11	36,8	37,0	227,2	229,9	90,2	90,4	4,6	4,8	2,1	1,9	224,2	225,6	37,1	36,8	127,4	127,0	88,4	89,0	4,0	4,3	2,1	1,9	128,0	128,5
12	31,0	31,0	207,0	202,0	78,0	78,0	4,0	3,0	2,0	2,0	209,0	209,0	32,0	32,0	111,0	111,0	79,0	78,0	4,0	5,0	2,0	2,0	109,0	109,0
13	35,0	35,0	219,0	220,0	86,0	87,0	6,0	6,0	3,0	3,0	220,0	220,0	35,0	36,0	124,0	124,0	85,0	87,0	7,0	7,0	3,0	3,0	123,0	123,0
15	32,0	32,0	200,0	199,0	79,0	78,0	4,0	4,0	1,7	1,6	200,0	199,0	32,0	32,0	111,0	111,0	79,0	78,0	4,0	4,0	1,7	1,6	111,0	111,0
16	31,3	29,1	213,1	214,2	84,7	84,2	4,3	4,3	1,9	1,9	217,3	216,0	30,3	31,0	120,1	119,6	83,5	84,2	4,2	4,6	2,0	2,0	119,3	120,1
17	35,6	35,4	217,8	221,4	87,0	86,0	5,2	5,4	2,3	2,4	215,5	219,5	35,6	35,3	122,2	123,4	85,9	86,5	5,4	5,5	2,7	2,5	122,3	123,9
18	35,0	37,0	235,0	246,0	88,0	85,0	6,1	5,2	7,5	7,7	220,0	209,0	36,0	37,0	124,0	125,0	94,0	88,0	6,5	6,6	7,8	7,4	127,0	128,0
19	31,0	30,0	183,0	187,0	71,0	72,0	8,0	8,0	-2,0	0,0	177,0	179,0	30,0	27,0	105,0	106,0	67,0	71,0	4,0	5,0	-1,0	-1,0	116,0	115,0
20	36,2	34,8	217,4	217,0	84,9	84,4	7,1	8,9	1,9	2,7	219,0	217,1	35,1	34,4	121,2	119,0	85,8	84,3	5,6	5,9	2,4	2,3	121,9	119,2
21	32,2	32,2	204,1	204,2	79,3	79,1	4,3	4,4	1,9	2,0	204,9	204,4	32,6	32,3	111,9	112,4	78,6	78,7	4,3	4,4	1,9	2,0	115,0	114,2
22	34,0	34,0	216,0	216,0	83,0	83,0	6,0	6,0	3,0	3,0	216,0	217,0	34,0	34,0	121,0	121,0	83,0	83,0	6,0	6,0	3,0	3,0	121,0	121,0
23	35,3	35,0	219,3	217,6	87,3	86,1	4,1	4,5	1,6	1,7	219,3	217,9	35,4	35,9	124,3	123,0	87,0	86,0	3,9	4,1	1,6	1,8	124,6	123,5
24	34,2	34,0	214,0	216,0	81,8	82,1	4,1	4,1	2,7	2,8	215,0	215,0	33,7	33,8	117,0	118,0	83,7	83,4	4,1	4,1	2,8	2,7	119,0	119,0
26	35,1	35,2	214,4	214,5	86,2	86,2	5,0	5,1	2,2	2,2	214,9	214,2	35,0	35,1	122,3	122,5	86,0	86,3	5,1	5,1	2,2	2,2	122,2	122,5

TABLEAU 3- RÉSULTATS POUR L'ACIDE SORBIQUE (mg/L)

	Vin blanc		Rosé		Vin blanc		Vin rouge		Vin fortifié		Vin blanc	
Code du laboratoire	A	G	B	F	C	K	D	M	E	N	I	O
1	35,90	36,00	223,50	225,00	87,00	88,50	5,25	4,65	1,75	1,90	124,50	126,00
2	33,15	32,25	209,50	209,95	81,15	80,80	4,45	5,00	2,05	2,20	115,45	116,20
3	34,30	34,40	216,15	216,75	84,60	84,40	5,25	5,70	2,40[c)]	2,40[c)]	119,95	120,35
4	34,85	34,65	223,90	221,00	88,95	86,55	5,10	5,20	2,15	2,10	123,15	123,30
6	34,45	34,65	214,70	215,30	83,95	83,75	5,58[c)]	6,34	1,95[c)]	2,08[c)]	120,65	120,60
7	34,50	35,00	217,50	218,00	84,50	85,00	5,50	5,00	*3,00[b)]*	*2,00[b)]*	122,50	122,00
8	33,65	34,55	217,65	217,15	85,00	84,25	4,50	4,20	2,00	2,00	120,45	123,90
9	32,49	32,16	197,83	196,38	80,81	79,40	3,42	3,32	1,41	1,25	112,38	113,56
10*	34,10	34,10	216,50	216,00	83,65	83,40	5,66	5,68	2,15[c)]	2,13[c)]	118,50	119,50
11*	36,90	36,95	228,55	224,90	90,30	88,70	4,70	4,15	2,00[c)]	2,00[c)]	127,20	128,25
12	31,00	32,00	204,50	209,00	78,00	78,50	3,50	4,50	2,00	2,00	111,00	109,00
13	35,00	35,50	219,50	220,00	86,50	86,00	6,00	7,00	3,00	3,00	124,00	123,00
15*	32,00	32,00	199,50	199,50	78,50	78,50	4,00	4,00	1,65	1,65	111,00	111,00
16	30,20	30,65	213,65	216,65	84,45	83,85	4,28	4,38	1,94	1,96	119,85	119,70
17	35,53	35,44	219,61	217,53	86,51	86,19	5,30	5,47	2,38	2,61	122,82	123,12
18	36,00	36,50	240,50[b)]	214,50[b)]	86,50[b)]	91,00[b)]	5,65	6,55	*7,60[a)]*	*7,60[a)]*	124,50	127,50
19	30,50[b)]	28,50[b)]	185,00[a)]	98,00[a)]	71,50[a)]	69,00[a)]	8,00[b)]	4,50[c)b)]	-1,00[c)a)]	-1,00[c)a)]	105,50[b)]	115,50[b)]
20	35,50	34,75	217,20	218,05	84,65	85,05	8,00[b)]	5,75[b)]	2,30[c)]	2,35[c)]	120,10	120,55
21	32,20	32,45	204,15	204,65	79,20	78,65	4,36	4,36	1,94	1,94	112,15	114,60
22	34,00	34,00	216,00	216,50	83,00	83,00	6,00	6,00	3,00	3,00	121,00	121,00
23	35,15	35,65	218,45	218,60	86,70	86,50	4,30	4,00	1,65[c)]	1,70[c)]	123,65	124,05
24	34,10	33,75	215,00	215,00	81,95	83,55	4,10[c)]	4,10[c)]	2,75[c)]	2,75[c)]	117,50	119,00
26	35,13	35,06	214,45	214,58	86,21	86,15	5,07	5,07	2,17	2,17	122,37	122,35

a) Valeurs rejetées par le test de Grubbs (valeurs aberrantes en moyenne)

b) Valeurs rejetées par le test de Cochran (valeurs aberrantes en variance)

c) Valeurs trouvées par le laboratoire situées en-deçà de la limite de quantification

TABLEAU 4. DONNÉES SUR LA PRÉCISION

Indicateurs	Vin blanc (A/G)	Rosé (B/F)	Vin blanc (C/K)	Vin rouge (D/M)	Vin fortifié (E/N)	Vin blanc (I/O)
Nombre de laboratoires	22	21	21	21	20	22
Nombre de répétitions	2	2	2	2	2	2
Minimum (mg/L)	30,20	196,38	78,00	3,32	1,25	109,00
Maximum (mg/L)	36,95	228,55	90,30	7,00	3,00	128,25
Variance de répétabilité s_r^2	0,0942	1,5249	0,4191	0,1201	0,0037	0,9397
Variance intergroupe s_L^2	2,6370	55,1140	9,7049	0,6418	0,1793	22,4914
Variance de reproductibilité s_R^2	2,7312	56,6389	10,1240	0,7619	0,1830	23,4311
Moyenne (mg/L)	**34,16**	**214,72**	**83,96**	**4,92**	**2,15**	**120,07**
Écart type de répétabilité (mg/L)	0,31	1,23	0,65	0,35	0,06	0,97
Limite de répétabilité (mg/L)	0,869	3,495	1,832	0,981	0,172	2,743
Écart type relatif de répétabilité (%)	0,9	0,6	0,8	7,0	2,8	0,8
Écart type de reproductibilité (mg/L)	1,65	7,53	3,18	0,87	0,43	4,84
Limite de reproductibilité (mg/L)	4,677	21,298	9,005	2,470	1,211	13,699

Écart type relatif de reproductibilité (%)	4,8	3,5	3,8	17,7	19,9	4,0
Horrat	**0,5**	**0,5**	**0,5**	**1,4**	**1,4**	**0,5**

FIGURE 1. CORRÉLATION ENTRE LA CONCENTRATION EN ACIDE SORBIQUE ET LA PRÉCISION

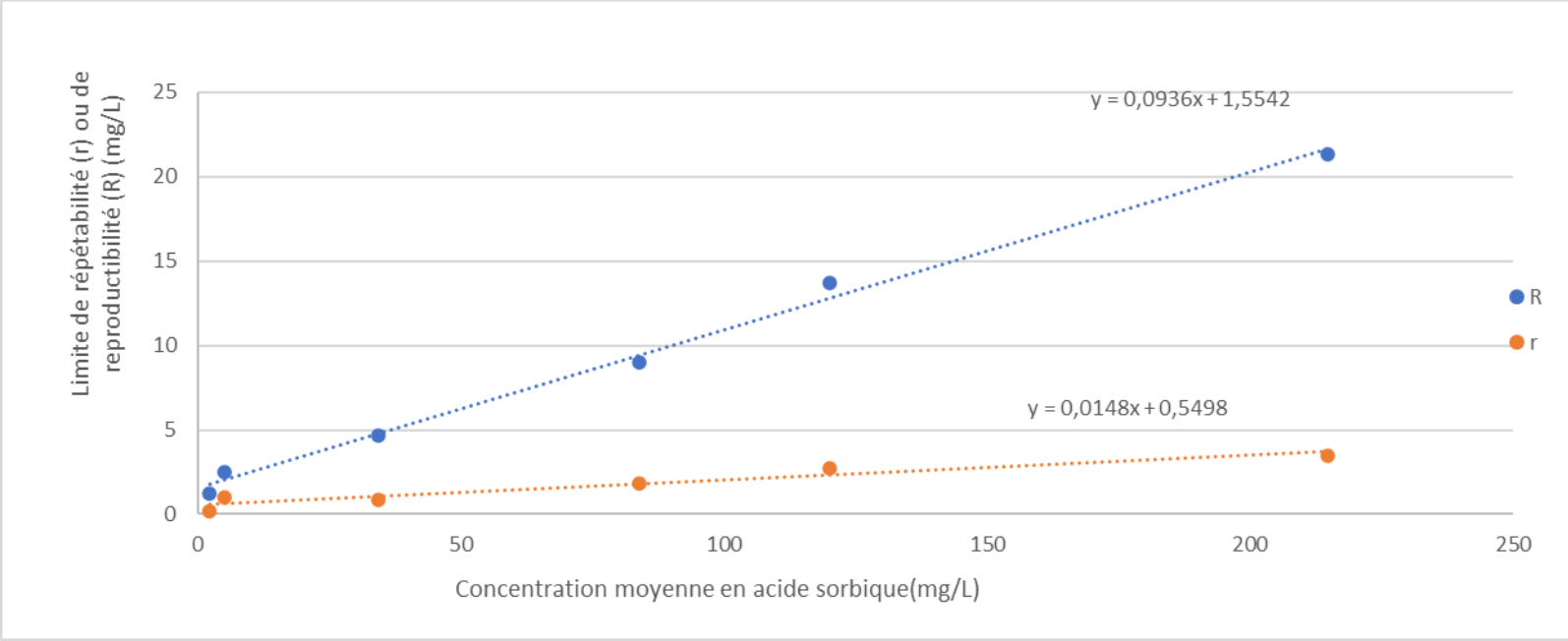
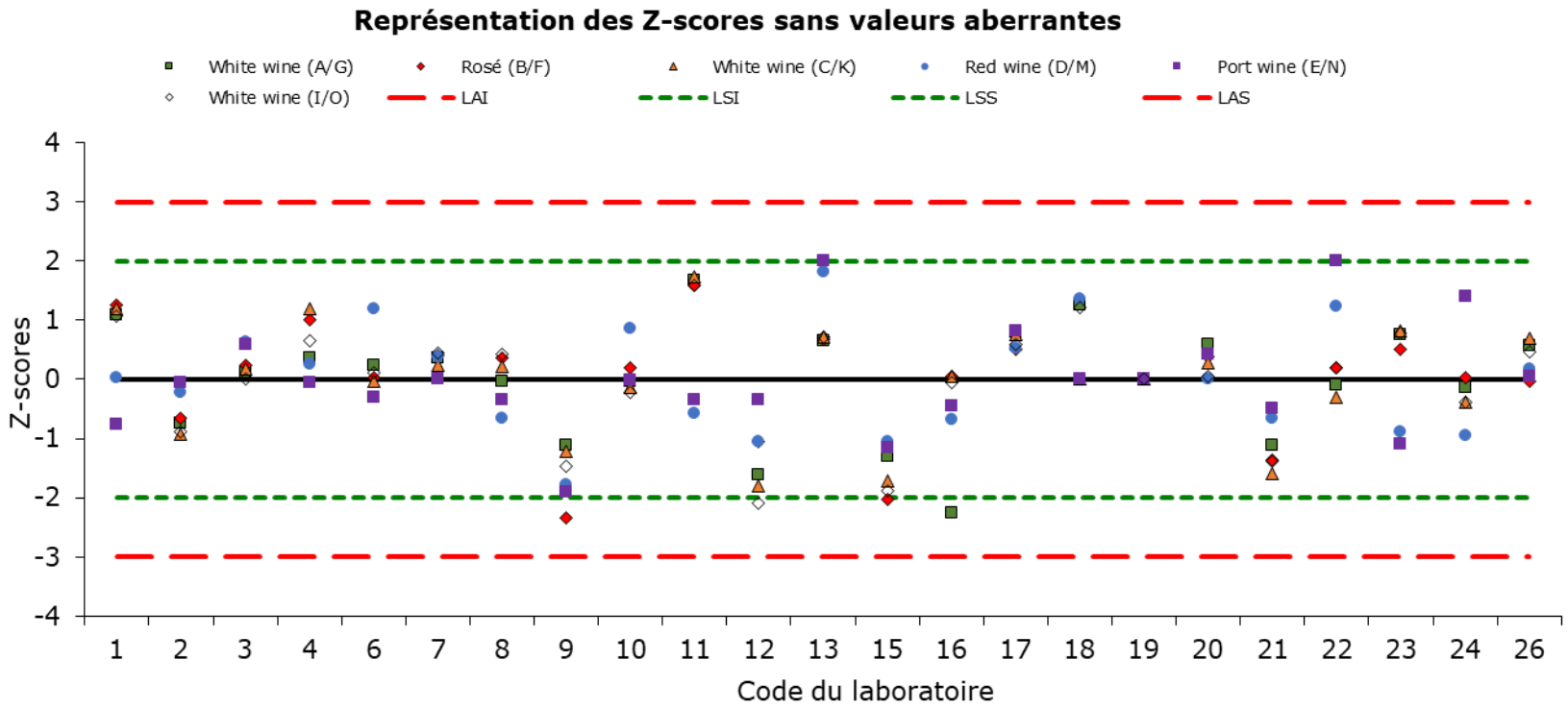


FIGURE 2. REPRÉSENTATION DES Z-SCORES SANS VALEURS ABERRANTES



*LAI : limite d'action inférieure ; LAS : limite d'action supérieure ; LSI : limite d'alerte inférieure ; LSS : limite d'alerte supérieure

Méthode OIV-MA-AS313-21 Méthode Type IV

Détermination de la présence d'acide metatartrique

(Résolution OENO 10/2007 ; OIV/OENO 377/2009)

1. Introduction

L'acide métatartrique ajouté au vin pour éviter les précipitations tartriques est traditionnellement dosé par différence entre l'acide tartrique total après hydrolyse à chaud de l'acide métatartrique et l'acide tartrique naturel avant hydrolyse. Toutefois, compte tenu de la précision du dosage de l'acide tartrique, des traces d'acide métatartrique ne sont pas décelables par cette méthode, il faut donc caractériser cet additif non accepté dans certains pays par une méthode plus spécifique.

2. Domaine d'application

Vins susceptibles de contenir de l'acide métatartrique à l'état de trace.

3. Principe

L'acide métatartrique forme avec l'acétate de cadmium en milieu moyennement acide, un précipité insoluble ; il est le seul de tous les éléments présents dans le moût et le vin à donner un tel précipité.

Remarque : L'acide tartrique est aussi précipité avec l'acétate de cadmium, mais seulement en présence d'une teneur en alcool supérieure à 25 % vol. Le précipité se re-dissous dans l'eau, contrairement au précipité obtenu avec l'acide métatartrique.

Le précipité cadmique d'acide métatartrique est décomposé par chauffage avec de l'hydroxyde de sodium et libère l'acide tartrique. Ce dernier forme avec le métavanadate d'ammonium une coloration orangée spécifique.

4. Réactifs

4.1 Solution d'acétate de cadmium à 5 p.100
- 4.1.1 Acétate de cadmium dihydraté à 98 %
- 4.1.2 Acide acétique pur
- 4.1.3 Eau distillée ou déminéralisée
- 4.1.4 Solution d'acétate de cadmium : dissoudre 5 g d'acétate de cadmium (4.1.1) dans 99 mL d'eau (4.1.3) ajouter 1 mL d'acide acétique pur (4.1.2)

4.2 Hydroxyde de sodium 1M
4.3 Acide sulfurique 1M
4.4 Solution de métavanadate d'ammonium à 2 p. 100 en poids
4.4.1 Métavanadate d'ammonium
4.4.2 Acétate de sodium trihydraté à 99 %
4.4.3 Solution d'acétate de sodium à 27 p. 100 : dissoudre 478 g d'acétate de sodium (4.4.2) dans 1 litre d'eau (4.1.3)
4.4.4 Solution de métavanadate d'ammonium : dissoudre 10 g de métavanadate d'ammonium (4.4.1) dans 150 mL d'hydroxyde de sodium 1 M (4.2) ajouter 200 mL de la solution d'acétate de sodium à 27 p. 100 (4.4.3) et compléter à 500 mL avec de l'eau (4.1.3)
4.5 Ethanol à 96 % vol.

5. Appareillage

5.1 Centrifugeuse avec un rotor pouvant recevoir des flacons de 50 mL de capacité
5.2 Spectromètre pouvant fonctionner dans le visible et recevoir des cuves de 1 cm de trajet optique.

6. Mode opératoire

6.1 Centrifuger 50 mL de vin pendant 10 minutes à 11000 rpm
6.2 Prélever 40 mL de vin limpide à l'éprouvette et les placer de nouveau dans un flacon pour centrifugeuse
6.3 Ajouter 5 mL d'éthanol à 96 % vol (4.5)
6.4 Ajouter 5 mL de la solution d'acétate de cadmium (4.1.4)
6.5 Mélanger et laisser reposer 10 minutes
6.6 Centrifuger pendant 10 minutes à 11000 rpm
6.7 Décanter par retournement total du flacon (une fois) et jeter le surnageant.

En présence d'acide métatartrique, il se forme un précipité lamellaire au fond du tube.

En l'absence de précipité, l'échantillon sera considéré comme exempt d'acide métatartrique. Dans le cas contraire ou si l'on veut établir avec certitude la présence d'un léger précipité, procéder comme suit :

6.8 Laver une fois le précipité avec 10 mL d'eau (4.1.3) sous la forme d'un jet énergique vers le fond du tube ce qui à pour but de détacher le précipité du fond
6.9 Ajouter 2 mL de solution d'acétate de cadmium (4.1.4)
6.10 Centrifuger à 11000 rpm pendant 10 minutes puis jeter le surnageant par retournement complet du tube (une fois)

6.11 Après addition d'un mL d'hydroxyde de sodium 1 M (4.2), plonger le tube à centrifuger pendant 5 minutes dans un bain d'eau à 100° C
6.12 Après refroidissement, ajouter 1 mL d'acide sulfurique 1M (4.3) et 1 mL de solution de métavanadate d'ammonium (4.4.4)
6.13 Attendre 15 minutes
6.14 Centrifuger durant 10 minutes à 11000 rpm

6.15 Verser le surnageant dans une cuve de spectrophotomètre et mesurer l'absorbance à 530 nm, après avoir fait le zéro avec de l'eau (4.1.3)

Soit Abs_E

Témoin. On réalise en parallèle un témoin constitué du même vin que celui analysé mais chauffé préalablement 2 minutes 30 à l'aide d'un générateur de micro-ondes réglé sur la puissance maximum ou encore au bain d'eau à 100° C durant 5 minutes

Soit Abs_T

7. Résultat

La présence d'acide métatartrique dans le vin est établie lorsque, à 530 nm :

$$Abs_E - Abs_T > 0{,}050$$

Méthode OIV-MA-AS313-22 Méthode Type II

Dosage simultané de l'acide L-ascorbique et de l'acide D-isoascorbique (acide érythorbique) dans le vin par HLPC et détection UV

(Résolution OENO 11/2008)

1. Introduction

L'acide ascorbique est un antioxydant présent naturellement dans toute une série de denrées alimentaires. La quantité normale d'acide ascorbique dans le raisin diminue lors de l'élaboration des moûts et au cours de la vinification. Il peut être ajouté aux moûts et aux vins dans certaines limites.
La méthode décrite a été validée dans le cadre d'essais interlaboratoires, par des analyses d'échantillons de vin avec des quantités ajoutées d'acide L-ascorbique et d'acide D-isoascorbique respectivement de 30 mg/L à 150 mg/L et de 10 mg/L à 100 mg/L.

2. Domaine d'application

Cette méthode convient au dosage simultané de l'acide L-ascorbique et de l'acide
D-isoascorbique (acide érythorbique) dans le vin par chromatographie liquide haute performance et détection UV dans une plage de 3 à 150 mg/L.
Pour des teneurs supérieures à 150 mg/L, une dilution de l'échantillon est nécessaire.

3. Principe

Les échantillons sont directement injectés dans le système HLPC après filtration sur membrane. Les analytes sont séparés sur une colonne à phase inversée et sont soumis à une détection UV à 266 nm. La quantification de l'acide L-ascorbique et de l'acide D-isoascorbique est effectuée par rapport à un étalon externe.
Remarque : Les colonnes et les conditions de fonctionnement sont données à titre d'exemple. D'autres types de colonnes peuvent également assurer une bonne séparation.

4. Réactifs et produits

4.1 Réactifs

4.1.1. n-octylamine, pureté ≥ 99,0 %
4.1.2. Acétate de sodium x 3 H_2O, pureté ≥ 99,0 %
4.1.3. Acide acétique pur, 100 %
4.1.4. Acide phosphorique, approx. à 25 %
4.1.5. Acide oxalique, pureté ≥ 99,0 %
4.1.6. Ascorbate oxydase
4.1.7. Acide L-ascorbique, ultra ≥ 99,5 %
4.1.8. Acide D-isoascorbique, pureté ≥ 99,0 %
4.1.9. Eau bidistillée
4.1.10. Méthanol, p.A. 99,8 %

4.2 Préparation de la phase mobile

4.2.1 Solutions pour la phase mobile

Préparer les solutions suivantes pour la phase mobile :

4.2.1.1 12,93 g de n-octylamine dans 100 mL de méthanol
4.2.1.2 68,05 g d'acétate de sodium x 3 H_2O dans 500 mL d'eau bidistillée
4.2.1.3 12,01 g d'acide acétique pur dans 200 mL d'eau bidistillée
4.2.1.4 Solution tampon (pH 5,4) : 430 mL de solution d'acétate de sodium (4.2.1.2) et 70 mL de solution d'acide acétique (4.2.1.3)

4.2.2 Préparation de la phase mobile

Ajouter 5 mL de solution de n-octylamine (4.2.1.1) à environ 400 mL d'eau bidistillée dans un bécher. Ajuster cette solution à un pH de 5,4 à 5,6, en ajoutant goutte à goutte de l'acide phosphorique à 25% (4.1.4). Ajouter 50 mL de la solution tampon (4.2.1.4) et transférer le composé dans une fiole jaugée de 1000 mL, puis compléter avec de l'eau bidistillée. Avant utilisation, la phase mobile doit être filtrée à l'aide d'une membrane (cellulose régénérée de 0,2 µm) et si possible dégazée avec de l'hélium (pendant environ 10 minutes) selon les besoins du système HLPC utilisé.

4.3 Préparation de la solution étalon

Remarque :
Toutes les solutions étalons (solution mère 4.3.1. et solutions de travail 4.3.2) doivent être préparées chaque jour et de préférence stockées dans un réfrigérateur avant injection.

4.3.1 Préparation de la solution mère (1 mg/mL)
Préparer une solution aqueuse d'acide oxalique à 2% et éliminer l'oxygène dissout par barbotage à l'azote.
Peser exactement 100 mg d'acide L-ascorbique et 100 mg d'acide D-isoascorbique dans une fiole jaugée de 100 mL, et la remplir de solution aqueuse d'acide oxalique à 2%.

4.3.2 Préparation des solutions de travail
Pour les solutions de travail, diluer la solution mère (4.3.1) aux concentrations désirées avec la solution d'acide oxalique à 2%. Des concentrations entre 10 mg/L et 120 mg/L sont recommandées. Par exemple 100 µl, 200 µl, 400 µl, 800 µl 1200µl à 10 mL, correspondant à 10, 20, 40, 80 et 120 mg/L.

5. Appareillage

Matériel courant de laboratoire, en particulier les équipements suivants :
5.1 Pompe HLPC
5.2 Injecteur à boucle de 20 µl
5.3 Détecteur UV

6. Échantillonnage

Des échantillons de vin sont filtrés sur une membrane d'un diamètre de pore de 0,2 µm avant injection.
Pour des teneurs supérieures à 150 mg/L, une dilution de l'échantillon est nécessaire.

7. Mode opératoire

7.1 Conditions d'utilisation du système HLPC

Injecter dans l'appareil chromatographique 20 µl de l'échantillon filtré sur membrane.

Précolonne : par exemple Nucléosil 120 C18 (4 cm x 4 mm x 7 µm)
Colonne : par exemple Nucléosil 120 C18 (25 cm x 4 mm x 7 µm)
Volume d'injection : 20 µl
Phase mobile : voir 4.2.2, isocratique
Débit : 1mL/min
Détection UV : 266 nm
Cycle de rinçage : au moins 30 mL d'eau bidistillée suivis de 30mL de méthanol et de 30 mL d'acétonitrile

7. 2 Identification/Confirmation

L'identification des pics s'effectue par comparaison des temps de rétention des étalons et des échantillons. Avec le système chromatographique décrit en exemple, les temps de rétention sont respectivement de 7,7 min pour l'acide L-ascorbique et 8,3 min pour l'acide D-isoascorbique (voir figure 1, chromatogramme A).
Pour confirmer des résultats positifs, ces échantillons doivent être traités avec une spatule d'ascorbate oxydase et mesurés de nouveau (voir figure 1, chromatogramme B).
En raison de la dégradation de l'acide L-ascorbique et de l'acide D-isoascorbique provoquée par l'ascorbate oxydase, aucun signal ne devrait être trouvé au temps de rétention de l'acide L-ascorbique et de l'acide D-isoascorbique. En cas de détection de

pics parasites, leur surface doit être prise en compte dans le calcul de la concentration des analytes.

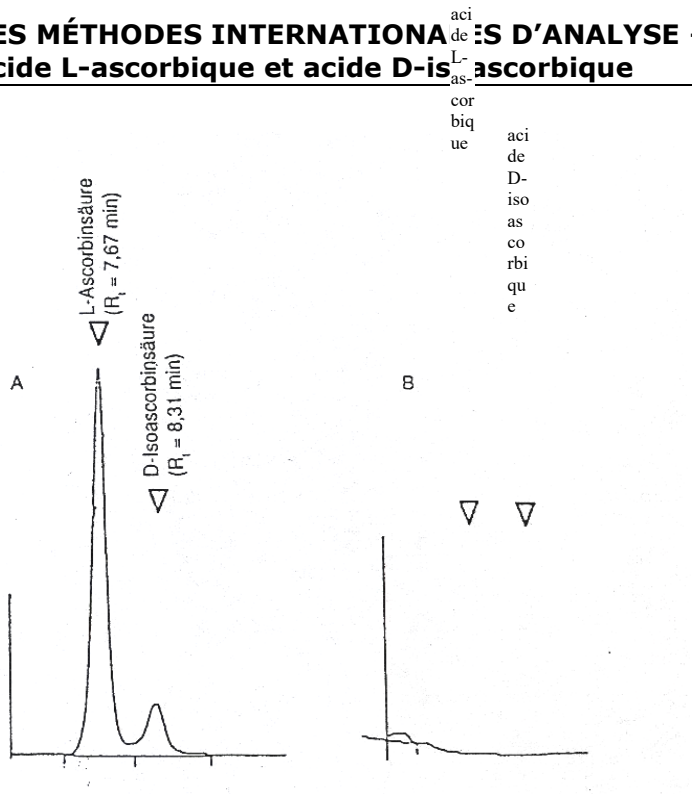


Figure 1 : Exemple de chromatogramme d'un vin blanc : A avant le traitement à l'ascorbate oxydase ; B après traitement

Remarque : Il est recommandé d'analyser les échantillons traités à l'ascorbate oxydase à la fin d'une séquence suivie du cycle de rinçage pour éliminer les restes d'ascorbate oxydase de la colonne, faute de quoi l'acide L-ascorbique et l'acide D-isoascorbique pourraient être convertis par les restes d'ascorbate oxydase lors de la mesure HPLC et le résultat pourrait s'en trouver affecté.

8. Calculs

Préparer une courbe d'étalonnage à partir des solutions de travail (4.3.2). Selon la méthode de l'étalon externe, la quantification de l'acide L-ascorbique et de l'acide
D-isoascorbique est réalisée en mesurant les surfaces des pics et en les comparant à la concentration correspondante sur la courbe d'étalonnage.

Expression des résultats
Les résultats sont exprimés à une décimale en mg/L d'acide L-ascorbique et d'acide
D-isoascorbique respectivement (par exemple 51,3 mg/L).
Pour des teneurs supérieures à 150 mg/L, prendre en compte la dilution.

9. Fidélité

La méthode a été testée dans le cadre d'un essai interlaboratoire organisé en 1994 par l'ancien Office fédéral d'hygiène publique (Bundesgesundheitsamt, Allemagne), auquel ont participé 27 laboratoires. Le programme de l'essai interlaboratoire a suivi le § 35 de la loi allemande relative aux denrées alimentaires, qui a été accepté par l'O.I.V jusqu'à l'introduction du nouveau protocole (OENO 6/2000).
L'étude a porté sur quatre échantillons différents de vin - deux vins blancs et deux vins rouges – avec cinq répétitions de chaque échantillon demandées. Étant donné qu'il n'était pas possible de préparer des échantillons avec une stabilité suffisante des analytes(vitesses de dégradation différentes), il a été décidé d'envoyer aux participants des quantités définies de substances étalons pures ainsi que les échantillons de vin. Les laboratoires ont reçu pour consigne de transférer les étalons quantitativement dans les échantillons de vin et de les analyser immédiatement. Des volumes de 30 à 150 mg/L pour l'acide L-ascorbique et de 10 à 100 mg/L pour l'acide D-isoascorbique ont été analysés. Les résultats détaillés de l'étude sont présentés dans l'ANNEXE. L'évaluation a été réalisée selon DIN/ISO 5725 (version 1988).

Les écarts-types de répétabilité (s_r) et de reproductibilité (s_R) étaient en adéquation avec les concentrations d'acide L-ascorbiques et d'acide D-isoascorbique. Le paramètre de précision réelle peut être calculé à l'aide des équations suivantes :

Acide L-ascorbique

$$s_r = 0{,}011\ x + 0{,}31$$
$$s_R = 0{,}064\ x + 1{,}39$$

x : concentration d'acide L-ascorbique (mg/L)

Acide D-isoascorbique

$s_r = 0{,}014\ x + 0{,}31$
$s_R = 0{,}079\ x + 1{,}29$
x : concentration d'acide D-isoascorbique (mg/L)

Exemple :
50 mg/L d'acide D-isoascorbique $s_r = 1{,}0$ mg/L
$s_R = 5{,}2$ mg/L

10. Autres caractéristiques de l'analyse

10.1 Limite de détection

La limite de détection de cette méthode a été estimée à 3 mg/L pour l'acide L-ascorbique et l'acide D-isoascorbique.

10.2 Justesse

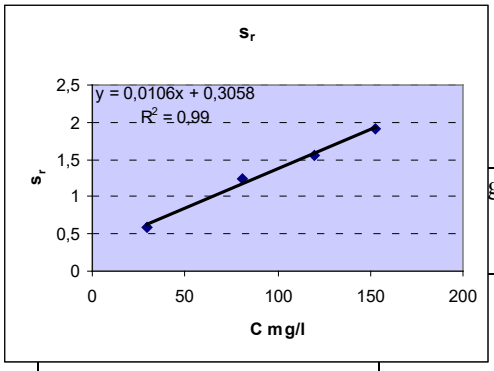
Le récupération moyenne calculée à partir de l'essai interlaboratoire mené sur quatre échantillons (voir l'ANNEXE) a été de :

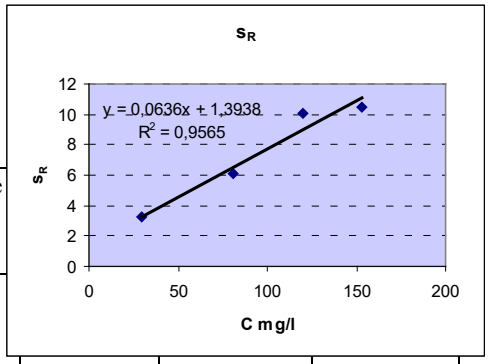
100,6 % pour l'acide L-ascorbique
103,3 % pour l'acide D-isoascorbique

11. Annexe : Essai interlaboratoires

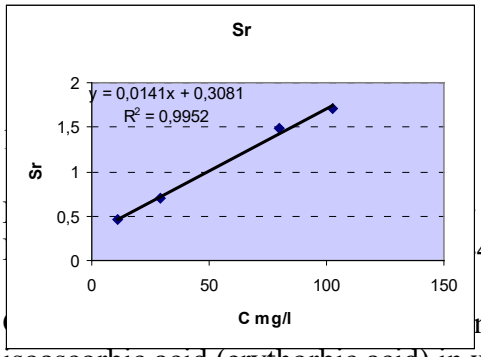
Acide L-ascorbique

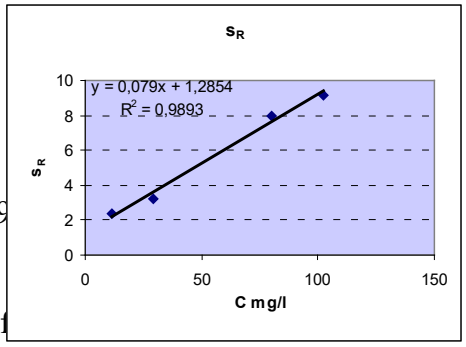
		Vin Rouge I	Vin Blanc II	Vin Rouge III	Vin Blanc IV
x	mg/L	**152,7**	**119,8**	**81,0**	**29,9**
Quantité ajoutée	mg/L	150	120	80	30
Récupération	%	101,8	99,8	101,3	99,7
n		25	23	25	23
Valeurs aberrantes		1	3	1	3
Répétabilité (s_r)	mg/L	1,92	1,55	1,25	0,58
Répétabilité relative (Rel. s_r)	%	1,3	1,3	1,5	1,9
Valeur de répétabilité d'Horrat		**0,17**	**0,17**	**0,19**	**0,20**
R	mg/L	5,4	4,3	3,5	1,6
Reproductibilité (s_R)	mg/L	10,52	10,03	6,14	3,26
Reproductibilité relative (Rel. s_R)	%	6,9	8,4	7,6	10,9
Coefficient de variation de reproductibilité d'Horwitz	%	7,5	7,8	8,3	9,6
Valeur de reproductibilité d'Horrat		**0,92**	**1,08**	**0,92**	**1,14**
R	mg/L	29,5	28,1	17,2	9,1





n		25	23	24	22
Valeurs aberrantes		1	3	2	4
Répétabilité (s_r)	mg/L	1,71	1,49	0,47	0,70
Répétabilité relative (Rel. s_r)	%	1,7	1,9	4,1	2,4
Valeur de répétabilité d'Horrat		**0,21**	**0,23**	**0,37**	**0,25**
r	mg/L	4,8	4,2	1,3	2,0
Reproductibilité (s_R)	mg/L	9,18	7,96	2,394	3,23
Reproductibilité relative (Rel. s_R)	%	9,0	10,0	21,2	11,0
Coefficient de variation de repro-ductibilité d'Horwitz	%	8,0	8,3	11,1	9,6
Valeur de reproductibilité d'Horrat		**1,12**	**1,21**	**1,91**	**1,14**
R	mg/L	25,7	22,3	6,7	9,0





(19
40
n of
isoascorbic acid (erythorbic acid) in wine by HPLC and UV-detection – OIV FV 1228, 2006

Méthode OIV-MA-AS313-23 Méthode Type IV

Détermination de l'origine de l'acide l-tartrique : végétale ou fossile par la détermination de son activité ^{14}C

(Résolution OENO 12/2008)

1. OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION

La méthode permet d'identifier l'origine de l'acide tartrique, végétale ou fossile et de déterminer les proportions respectives des 2 formes dans l'éventualité d'un mélange des deux. Dans ce dernier cas, la méthode permet de détecter la présence de quantités d'acide L-tartrique (L(+)-tartrique) d'origine fossile inférieures à 10 %.

2. PRINCIPE

L'acide tartrique d'origine végétale commercialisé est, dans la majorité des cas, un produit d'origine vinicole. C'est le hydrogénotartrate de potassium présent dans les lies qui est exploité et commercialisé sous forme d'acide L-tartrique. La teneur de cet acide en ^{14}C est donc, comme l'éthanol des vins, liée à la teneur en ^{14}C du dioxyde de carbone de l'année de production des vins dont il est issu. Cette activité est relativement élevée en liaison avec les activités humaines.
L'acide tartrique de synthèse, issu de produits fossiles, a lui une teneur en ^{14}C beaucoup plus basse voire négligeable.
La mesure de l'activité ^{14}C en DPM/g de carbone (Désintégration Par Minute) par scintillation liquide permet donc de déterminer l'origine et un éventuel mélange des deux formes.

3. REACTIFS ET PRODUITS

3.1 Réactifs

3.1.1 liquide scintillant, par exemple Instagel Plus
3.1.2 étalon toluène ^{14}C dont l'activité est certifiée par un laboratoire certifié pour l'étalonnage, pour le calcul de l'efficacité de l'appareil et de son rendement par l'établissement de la courbe de quenching.
3.1.3 standards ^{14}C, ^{3}H et du toluène ^{12}C pour le bruit de fond pour la calibration du compteur à scintillation
3.1.4 nitrométhane à 99 %
3.1.5 eau ultrapure (> 18 MΩ)

3.1.6 solution de toluène ^{14}C à environ 430 DPM/mL obtenue par dilution dans le toluène ^{12}C de la solution mère étalon ^{14}C

3.2 Etalons

3.2.1 Etablissement de la courbe de quenching
Après avoir réalisé une calibration du scintillateur avec les 3 standards certifiés ^{14}C et ^{3}H et du toluène ^{12}C réaliser la courbe de quenching suivant le protocole suivant.

Préparer une douzaine de flacons avec 10 mL d'une solution à 500 g/L d'acide L-tartrique fossile dans l'eau, rajouter ensuite une quantité telle d'étalon ^{14}C toluène pour avoir environ 400-1000 DPM au total par flacon (au besoin faire une solution intermédiaire de la solution étalon dans du toluène), puis ajouter des concentrations croissantes de nitrométhane, par exemple pour 12 tubes : 0, 0, 0, 5, 10, 15, 20, 35, 50, 100, 200 et 400 µL puis 10 mL de liquide scintillant. Il faut qu'il y ait au moins 3 échantillons sans nitrométhane.

Etablir la courbe de quenching une fois par an en analysant les tubes par ordre de teneur croissante en nitrométhane.
La courbe de quenching permet alors de déterminer l'efficacité ou le rendement moyen.

3.2.2 Détermination du bruit de fond (blanc de l'analyse)
A partir de l'acide L-tartrique fossile, par exemple celui utilisé pour le calcul du rendement, déterminer le bruit de fond ou blanc de l'analyse. Cette analyse doit être réalisée immédiatement après la courbe de quenching puis environ tous les mois.

3.2.3 Etablissement de la courbe d'étalonnage
Il faut vérifier la pureté des acides L-tartriques fossile et végétal par HPLC avant analyse par scintillation.

Etalonnage avec un mélange d'acide tartrique (dont on connaît de manière certaine l'origine végétale) contenant entre 0% et 100 % de cette forme en association avec la forme fossile.

Préparation des solutions à 500 g/L			
	Blanc ou bruit de fond	Etalons	Autocontrôle
Pesée	respectivement dans des fioles jaugées de 50 mL		
	25 g acide L-tartrique fossile	25 g de mélanges connus d'acide L-tartrique fossile et végétal	utiliser le blanc
Dissolution	boucher		
	bien homogénéiser le mélange par secouage et/ou retournement		
Préparation des mélanges scintillant			
	Dans des flacons en plastique ajouter respectivement		
Prise d'essai à partir des solutions à 500 g/L	10 mL à l'aide de pipettes jaugées		
Ajout dosé	//////////////////////////	//////////////////////////	100 µL
Ajout du liquide e scintillant	10 mL à l'aide d'un distributeur automatique		
	visser le bouchon et secouer fortement		
	attendre 15 min et mettre en analyse pendant 500 min		

3.3 AUTOCONTROLE

3.3.1 Nature du produit utilisé pour l'autocontrôle
Une solution d'acide L-tartrique fossile à 500 g/L est dopée avec du ^{14}C toluène (DPM<100)
La détermination du bruit de fond doit être réalisée conjointement avec la même solution d'acide L-tartrique fossile.
3.3.2 Type d'autocontrôle
L'ajout dosé mesuré permet de vérifier qu'il n'y a pas interférence spectrale dans le milieu examiné.
3.3.3 Limite de contrôle
La limite de contrôle dépend du matériel utilisé, une valeur de 5 % est acceptable.
3.3.4 Fréquence et séquence de la vérification
Une fois par mois en utilisation courante, ou à chaque série d'analyse, un autocontrôle est effectué sur le scintillateur. Ce contrôle est également effectué à chaque changement de lot de liquide scintillant ou après établissement d'une nouvelle courbe de quenching.

3.3.5 Règles de décision à prendre en fonction des résultats de l'autocontrôle
Si les résultats sortent des limites de contrôle, après vérification du protocole, procéder à une calibration du scintillateur puis refaire l'autocontrôle.
Si la calibration est correcte mais pas la mesure du nouvel autocontrôle, refaire une courbe de quenching et un autocontrôle.

4. APPAREILLAGE

4.1 spectromètre à scintillation liquide avec ordinateur et imprimante préalablement étalonné et dont la courbe de quenching a été établie, par exemple, avec du nitrométhane

4.2 flacons pauvres en potassium (40K) munis de bouchons à vis, à faible bruit de fond et identiques

4.3 pipettes de 10 mL à 2 traits

4.4 burette à distribution automatique s'adaptant au pas de vis du flacon de liquide scintillant

4.5 verrerie de laboratoire

5. ECHANTILLONS

La pureté des échantillons peut éventuellement être vérifiée par HPLC avant analyse par scintillation.
Faire une solution à 500 g/L d'échantillon à analyser dans de l'eau ultra pure.

Préparation des solutions à 500 g/L				
	Blanc analytique ou bruit de fond	Etalons	Autocontrôle	Echantillon
Pesée	respectivement dans des fioles jaugées de 50 mL			
	25 g acide L-tartrique fossile	25 g de mélanges connus d'acide L-tartrique fossile et végétal	utiliser le blanc	25 g
Dissolution	boucher			
	bien homogénéiser le mélange par secouage et/ou retournement			
Préparation des mélanges scintillants				
	Dans des flacons en plastique ajouter respectivement			
Prise d'essai à partir des solutions à 500 g/L	10 mL à l'aide de pipettes jaugées			
Ajout dosé	//////////////////////	//////////////////	100 µL	//////////////////
Ajout du liquide scintillant	10 mL à l'aide d'un distributeur automatique			
	visser le bouchon et secouer fortement			
	attendre 15 minutes et mettre en analyse pendant 500 minutes			
Remarques	passer un échantillon à 0 % d'acide tartrique végétal, soit 10 mL d'acide tartrique fossile et 10 mL de liquide scintillant, tous les 5 à 10 échantillons analysés.			
	effectuer une détermination du bruit de fond à la fin de chaque série d'analyses			

6. CALCULS

Les mesures sont données directement en Coups Par Minutes (CPM), mais il faut les convertir en DPM/g de carbone.

6.1 Résultats

Calcul de l'activité spécifique ^{14}C de l'échantillon en DPM/g de Carbone:

$$A = \frac{(X - X') \times 100 \times 3{,}125_{(1)}}{Rm \times m}$$

A : activité en désintégrations/minutes et par gramme de carbone
X : CPM de l'échantillon
X' : CPM pour l'acide L-tartrique fossile utilisé pour le bruit de fond
m : masse d'acide tartrique dans la prise d'essai de 10 mL de la solution à 500 g/L soit 5 g d'acide
Rm : c'est le rendement moyen exprimé en pourcentage

(1) il y a 3,125 grammes d'acide tartrique pour un gramme de carbone (rapport de la masse molaire de l'acide (150 g/mol) sur la masse totale du carbone (soit 4 x 12 = 48 g/mol)

Le résultat est donné avec une décimale.

6.2 Vérification des résultats avec l'autocontrôle

Il faut vérifier en comparant la valeur obtenue au § 6.1 avec le résultat donné par la méthode de l'ajout dosé. Si la différence est importante (> 5 %), dans ce cas recalculer la valeur en DPM à partir de la valeur en CPM suivant :

$$\text{DPM recalculées} = \frac{CPM}{Rm}$$

avec le rendement moyen obtenu à partir de la courbe de quenching.

Les 2 résultats ne doivent pas différer de plus de 5 % de la valeur moyenne. Sinon, refaire une analyse de l'échantillon en doublant la quantité d'étalon interne. Comparer les 2 résultats obtenus avec les étalons, s'ils ne diffèrent pas de plus de 5 % autour de la moyenne des 2, donner le résultat moyen.

Remarque : dans ce cas cela signifie que le quenching de l'échantillon est tel que l'analyse directe n'est pas exploitable.

6.3 Incertitude

L'incertitude obtenue dans des conditions standards d'analyse est de ± 0,7 DPM/g de carbone.

7. VALIDATION PAR RAPPORT A UNE METHODE DE REFERENCE

7.1 Principe

L'acide tartrique est transformé en CO_2 par combustion puis transformé en benzène ;

La mesure est alors effectué en scintillation liquide.

Après avoir subi un prétraitement destiné à éliminer les contaminations, le CO_2 de l'échantillon est transformé en benzène selon la chaîne de réactions suivantes:

$$C + O_2 \rightarrow CO_2 \quad (1)$$

$$CaCO_3 + 2\ HCl \rightarrow CO_2 + H_2O + Ca^{2+} + 2Cl^- \quad (2)$$

$$2\ CO_2 + 10\ Li \xrightarrow{800°C} Li_2C_2 + 4\ Li_2O \quad (3)$$

$$Li_2C_2 + 2\ H_2O \rightarrow C_2H_2 + 2\ LiOH \quad (4)$$

$$3\ C_2H_2 \xrightarrow{Al_2O_3\ avec\ Cr^{3+}\ et\ V} C_6H_6 \quad (5)$$

(1) Echantillon organique: Le carbone, avec un balayage d'oxygène et une source de chaleur (ou par combustion en présence d'oxygène sous pression) donne le dioxyde de carbone de l'échantillon CO_2.

(2) Echantillon minéral (carbonates marins ou continentaux, eaux, etc) : Le carbonate est attaqué par de l'acide chlorydrique pur (HCl) pour donner le dioxyde de carbone CO_2 de l'échantillon avec de l'eau et du calcium ionisé.

(3) L'action du dioxyde de carbone CO_2 sur du lithium métal chauffé entre +600°C et +800°C donne du carbure de lithium et de l'oxyde de lithium (Li_2O).

(4) L'action de l'eau (hydrolyse) sur le carbure de lithium donne de l'acétylène (C_2H_2), de l'hydroxyde de lithium, . Il faut utiliser de l'eau non tritiée et sans radon.

(5) La trimérisation de l'acétylène sur catalyseur à base d'alumine recouvert de chrome-vanadium à 185°C environ donne le benzène (C_6H_6).

7.2 Mode Opératoire

Le dioxyde de carbone (CO_2) obtenu soit après brûlage, combustion ou attaque acide d'un échantillon, est conservé dans une colonne de stockage. On place une quantité de lithium (lithium = catalyseur permettant une transformation chimique) nécessaire dans une coupelle en nickel et on place le tout au fond d'un réacteur de chauffe. On fait le vide dans ce réacteur et on chauffe sa partie inférieure tout en refroidissant sa partie supérieure au niveau des parois grâce à une poche de circulation d'eau.

7.2.1 Carburation.

Après une heure de chauffe environ, la température atteint 650 °C. On peut alors mettre le CO_2 en présence du lithium fondu. La quantité de lithium est toujours en excès par rapport à la quantité de carbone de l'échantillon. L'excès de lithium à utiliser par rapport aux conditions **stoechiométriques** varie selon les auteurs de 20% à 100%.

La réaction chimique (carburation ou "capture") est quasi instantanée et ce sont les premières minutes de la capture qui sont déterminantes dans le processus de carburation.

Cette réaction est **exothermique** (un gain de 200 °C). La carburation est assez rapide et elle est considérée à l'état carburé dès les premières 20 minutes, mais le chauffage reste permanent durant 45 à 50 minutes de façon à éliminer les traces de **radon** (fils de l'uranium) qui peuvent éventuellement se trouver mêlées au dioxyde de carbone.

7.2.2 Refroidissement.
Une fois le temps de traitement (chauffage) terminé, on laisse les réacteurs refroidir jusqu'à obtenir une température ambiante (25-30 °C).

7.2.3 Hydrolyse du Carbure de Lithium.

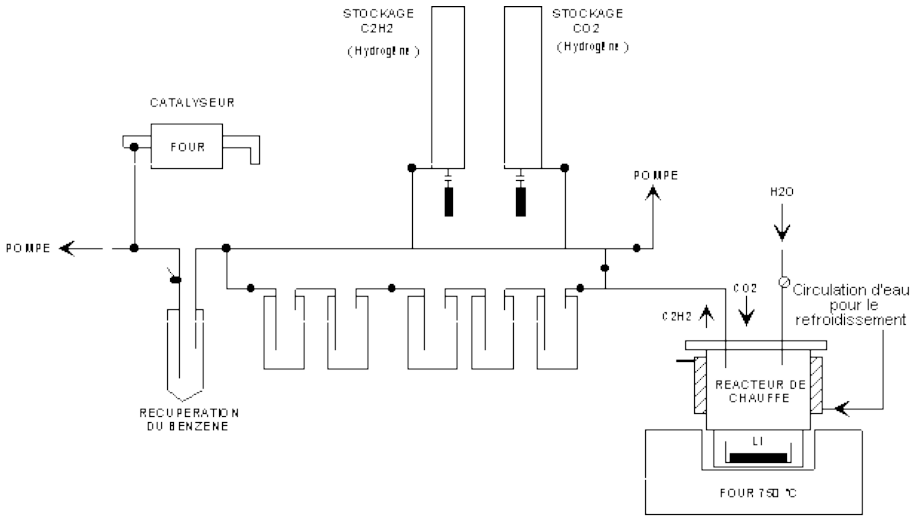
On introduit de l'eau dans le réacteur, en quantité largement supérieure aux besoins de la réaction (1,5 L). La réaction chimique est instantanée et le dégagement de **l'acétylène** se produit dans le même temps. Cette réaction est également exothermique (gain en température de +80°C à +100°C).

L'acétylène produit est ensuite ramené à l'état gazeux (sublimation) pour être capté sur le catalyseur alumine au vanadium-chrome Cr^{3+}. Celui-ci est préalablement déshydraté pendant trois heures minimum à l'air puis ensuite deux heures sous vide primaire avec un chauffage à +380 °C. La déshydratation est capitale pour évacuer toute l'eau résidente sur les billes du catalyseur.

7.2.4 Trimérisation - Polymérisation de l'acétylène en benzène par catalyse.

Avant la trimérisation, la température du catalyseur doit être retombée entre +60 et +70 °C, cette réaction étant exothermique également, il y aura auto-entretien de cette température. Puis le catalyseur est à nouveau chauffé à +180 °C pendant 1h30 et **le benzène** vaporisé est désorbé pour être piégé dans un doigt entouré d'azote liquide. Cette désorbtion se déroule sous vide dynamique. A la fin de la manipulation, on laisse le benzène cristallisé se réchauffer jusqu'à température ambiante pour qu'il trouve sa forme liquide avant d'être utilisé pour le comptage.

7.3 Banc de chimie pour la synthèse du Benzène



7.4 Solution chimique de référence pour le comptage.

On utilise comme référence pour les comptages en scintillation liquide, un volume établi à **4 mL de solution**.
Cette solution comprend une base idéale de 3,52g de benzène de l'échantillon (solvant) + le liquide scintillant (soluté) composé de 2 scintillants, un primaire et un secondaire.
Sachant que la masse volumique du benzène est 0.88 g/litre,
donc **0,88 x 4mL = 3,52 g**.

Liquide Scintillant Primaire	**Butyl-PBD**
Composition chimique	(2-(4-Biphénylyl)-5-(4-tertbutyl-phényl)-1,3,4-oxadiazole)
Fluorescence maximale en longueur d'onde	367 nanomètres
Liquide Scintillant Secondaire	**bis-MSB**
Composition chimique	1,4-Di-(2-Méthylstyryl)-Benzène
Fluorescence maximale en longueur d'onde	415 nanomètres
Propriétés optiques d'absorption et d'émission du couplage des deux scintillants :	
Longueur d'onde de l'absorption maxi	409 nanomètres
Longueur d'onde de l'émission maxi	412 nanomètres

7.5 Correction delta 13C pour le fractionnement Isotopique.

La mesure implique une correction pour le fractionnement isotopique au travers de la procédure de normalisation avec un standard ^{13}C PDB d'une valeur de – 25 ‰

8. CARACTERISTIQUES DE LA METHODE

8.1 Mise en oeuvre

Un échantillon d'acide tartrique d'origine vinicole et un échantillon d'acide tartrique de synthèse ont été utilisés pour préparer des solutions tests d'acide tartrique à 500 g/L.

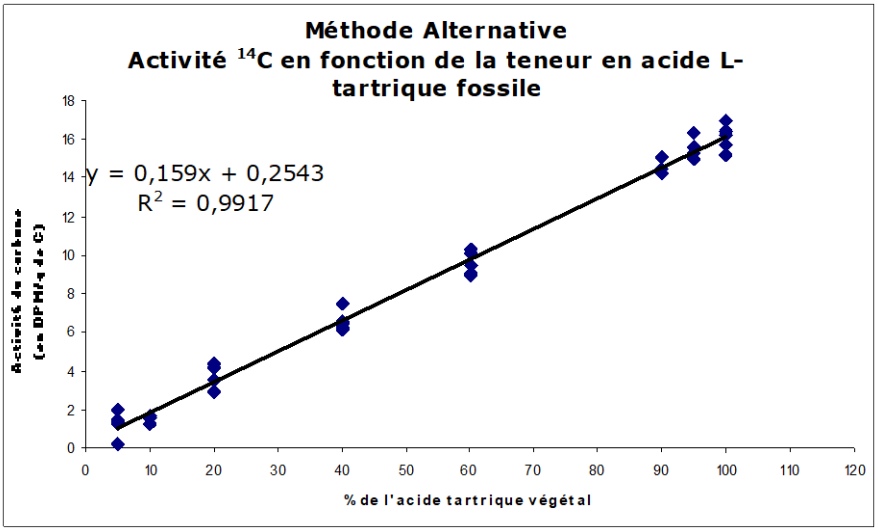
Les teneurs en acide tartrique d'origine vinicole des solutions tests variaient entre 0% et 100%.

L'origine et la pureté des deux échantillons de départ ont été préalablement vérifiées à l'aide de la méthode de référence.

8.2 Résultats:

Les résultats sont donnés dans le tableau et la figure suivant :

% D'ACIDE TARTRIQUE D'ORIGINE VINICOLE		
TENEURS REELLES	RESULTATS DE LA METHODE ALTERNATIVE	RESULTATS DE LA METHODE DE REFERENCE
0	0 et 0	0
10	3,5 et 6,0	12
20	11,4 et 12	22
30	24,6 et 25,4	31
40	34,7 et 38	40
50	41,4 et 50,6	50
60	57,8 et 58,8	63
70	60 et 63,3	70
80	81	81
85	84	86
90	88	91
95	94	96
100	100	100



8.3 Justesse, Fidélité

La justesse est de 6,9%
L'écart type de répétabilité de la méthode alternative est de : 2,86 % d'acide tartrique végétal.

9. BIBLIOGRAPHIE

Recueil des méthodes internationales d'analyse des boissons spiritueuses, des alcools et de la fraction aromatiques des boissons, Office Internationale de la Vigne et du Vin, Edition officielle, juin 1994, page 201, 204, 210 et 307.

Méthodes d'analyses communautaires de l'alcool neutre applicables dans le secteur du vin, règlement C.E.E n°625/2003, 2 avril 2003, Journal Officiel des communautés européennes du 15 mai 1992, n°L130, p18. (Journal officiel du 8 avril 2003, N° L90, p4.)

J. GUERAIN et S. TOURLIERE , Radioactivité carbone et tritium dans les alcools, Industries Alimentaires et Agricoles – 92e année juillet - août 1975, N° 7-8

S. COHEN, B. CRESTO, S. NACHAMPASSAK, T. PAYOT, B. MEDINA, S. CHAUVET, Détermination de l'origine de l'acide tartrique L(+): naturelle ou fossile par la détermination de son activité C14 - Document OIV FV 1238, 2006

Méthode OIV-MA-AS313-24 Méthode Type IV

Dosage de l'éthanal total dans les vins par chromatographie liquide à haute performance

(Résolution OIV-OENO 595-2018)

DOMAINE D'APPLICATION

La méthode décrite est appropriée au dosage de l'éthanal total (libre et lié au dioxyde de soufre) dans les vins pour des concentrations comprises entre 0,2 et 80 mg/L.

1. PRINCIPE

L'identification de l'analyte est établie par l'intermédiaire d'une dérivatisation de la molécule avec la 2,4-dinitrophénylhydrazine (DNPH) suivie d'une élution par la technique CLHP. La détection est évaluée par le temps de rétention à la longueur d'onde de 365 nm.

2. RÉACTIFS ET PRODUITS

2.1. 2,4-dinitrophénylhydrazine (DNPH), CAS n° 119-26-6, pureté ≥ 99,0 % (CLHP)
2.2. Dioxyde de soufre (SO_2), en tant que $K_2S_2O_5$, CAS n° 16731-55-8, pureté ≥ 98 %
2.3. Acide sulfurique (H_2S0_4), CAS n° 7664-93-9, pureté 95,0 - 98,0 %
2.4. Acide formique (CH_20_2), CAS n° 64-18-6, pureté ≈ 98 %
2.5. Acétonitrile (C_2H_3N), CAS n° 75-05-8, pureté ≥ 99,9 %
2.6. Éthanal (CH_3CHO), CAS n° 75-07-0, pureté ≥ 99,5 %
2.7. Eau ultra-pure pour CLHP, CAS n° 7732-18-5 de type I selon les normes ASTM D1193 et ISO 3696
2.8. Acide perchlorique ($HClO_4$), CAS n° 7601-90-3, pureté 70 %

Préparation des solutions de réactifs

2.9. Solution fraîchement préparée de dioxyde de soufre à une concentration de 1120 mg/L de SO_2, obtenue en élaborant une solution de $K_2S_2O_5$ (2.2) à 2 g/L.
2.10. Solution d'acide sulfurique à 25 % v/v préparée par dilution de l'acide sulfurique concentré (2.3) avec de l'eau ultra-pure pour CLHP.
2.11. Solution d'acétonitrile acidifié à l'acide perchlorique à 2,8 % obtenue par dilution de l'acide perchlorique (2.8) dans de l'acétonitrile (2.5).

2.12. Solution fraîchement préparée de 2,4-dinitrophénylhydrazine (2.1) dans de l'acétonitrile acidifié (2.11) à une concentration de 2 g/L de DNPH.

2.13. Préparation des solutions d'étalonnage

La solution mère est préparée par dilution d'une quantité appropriée d'éthanal (densité = 0,785 g/mL) dans de l'eau ultra-pure pour CLHP afin d'obtenir une concentration située entre 300 et 400 mg/L. Étant donné que l'éthanal pur est très volatil, il convient de préparer la solution mère en prélevant des volumes constants d'éthanal en utilisant des fioles jaugées (3.1). Pour préparer la solution mère, mesurer 10 mL d'éthanal pur dans une fiole jaugée, transférer l'éthanal pur dans une autre fiole jaugée de 20 mL et compléter avec de l'eau ultra-pure pour CLHP. Les solutions diluées sont préparées en complétant avec de l'eau ultra-pure pour CLHP dans des fioles jaugées de plus grande contenance. Les solutions d'étalonnage, qui présentent des concentrations de 10 mg/L, 30 mg/L, 50 mg/L, 70 mg/L et 100 mg/L, sont obtenues par dilution de la solution mère dans des fioles jaugées de 50 mL. Prélever par exemple les volumes nécessaires de solution mère à l'aide d'une micropipette de précision (3.2) dans des fioles jaugées (3.1) et compléter avec de l'eau ultra-pure pour CLHP.

Préparation de la phase mobile A pour l'analyse par CLHP

2.14. Solution d'acide formique à 0,5 % (v/v) obtenue par dilution de l'acide formique concentré (2.4) dans de l'eau ultra-pure pour CLHP (2.7).

3. APPAREILLAGE

3.1. Verrerie courante de laboratoire, dont fioles jaugées de 10, 20 et 50 mL de classe A, flacons de 2 mL et récipients d'un litre pour les solvants et les pipettes Pasteur

3.2. Micropipettes de précision

3.3. Agitateur de type vortex

3.4. Filtres à membrane de 0,45 µm pour la préparation des échantillons, certifiés pour une utilisation en CLHP

3.5. Fiole à vide de 1 L (dans le cas où le dégazeur automatique des solvants n'est pas fourni avec l'appareil de CLHP)

3.6. Pompe à vide (dans le cas où le dégazeur automatique des solvants n'est pas fourni avec l'appareil de CLHP)

3.7. Balance analytique avec une précision de ± 0,0001 g

3.8. Étuve à convection naturelle d'une précision de ± 1 °C à + 65 °C

3.9. Appareil de CLHP avec détecteur UV, équipé de deux pompes à gradient et d'un four pour le chauffage de la colonne

3.10. Colonne C18 (250 x 4,6 mm, diamètre des particules : 4 µm)

Note : Tout autre système peut être utilisé à condition que l'éthanal soit bien séparé des autres composés carbonylés dérivatisés. La résolution chromatographique entre le pic de l'éthanal et le plus grand pic voisin dans le chromatogramme doit être supérieure à 1.

4. ÉCHANTILLONNAGE

Le vin doit être prélevé et conservé dans un récipient en verre fermé avec un bouchon en Téflon et sous atmosphère inerte (azote ou argon).

5. MODE OPÉRATOIRE

Dérivatisation

La dérivatisation se déroule dans des flacons de 2 mL en verre fermés avec un bouchon en Téflon, à l'intérieur duquel sont additionnés successivement : 100 µL de vin ou de solution étalon, filtré à 0,45 µm, 20 µL d'une solution fraîchement préparée de dioxyde de soufre (2.2) à une concentration de 1120 mg/L de SO_2, 20 µL d'acide sulfurique à 25 % (2.3) et 140 µL d'une solution fraîchement préparée de 2,4-dinitrophénylhydrazine dans de l'acétonitrile à une concentration de 2 g/L de DNPH (2.12).

Après ces additions, la solution est immédiatement agitée par vortex, mise en étuve à 65 °C pendant 15 minutes puis refroidie à température ambiante.

Une fois la réaction terminée, la solution est refroidie à température ambiante pendant 15 minutes avant d'être injectée dans l'appareil de CLHP. Les échantillons doivent être injectés moins de 10 heures à compter de la fin de la réaction de dérivatisation.

Analyse CLHP

Les paramètres spécifiques de l'analyse CLHP sont fournis ci-dessous à titre d'exemple.

Conditions habituelles de fonctionnement :

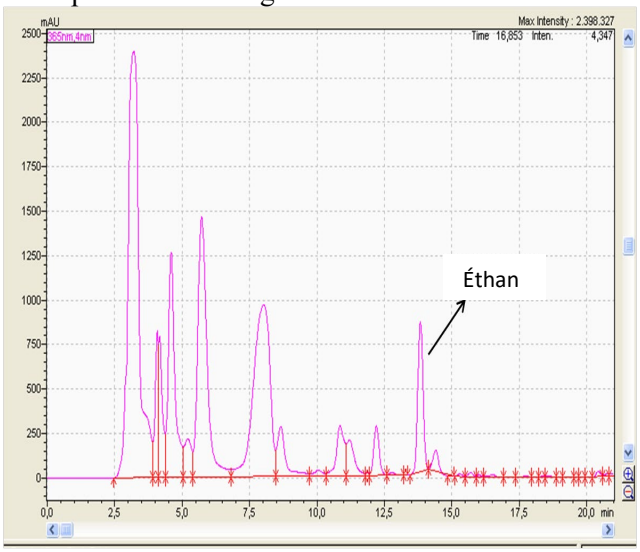
- Volume d'injection : 15 µL
- Débit : 0,75 mL/min
- Colonne C18 (5.10)
- Solvant de nettoyage de l'injecteur : acétonitrile
- Température de la colonne : 35 °C
- Solvant de phase mobile A : 0,5 % d'acide formique dans de l'eau ultra-pure pour CLHP
- Solvant de phase mobile B : acétonitrile
- Détection à 365 nm

Gradient d'élution

Le programme d'élution prévoit :

35 % d'éluant B (0,1 s)	65 % d'éluant A (0,1 s)
60 % d'éluant B (8 min)	40 % d'éluant A (8 min)
90 % d'éluant B (13 min)	10 % d'éluant A (13 min)
95 % d'éluant B (15 min)	5 % d'éluant A (15 min)
95 % d'éluant B (17 min)	5 % d'éluant A (17 min)
35 % d'éluant B (21 min)	65 % d'éluant A (21 min)
35 % d'éluant B (25 min)	65 % d'éluant A (25 min)

Exemple de chromatogramme



6. CALCUL

La concentration en éthanal est calculée sur la base de l'équation de la droite d'étalonnage obtenue après injection des solutions d'étalonnage (2.13).

7. FIDÉLITÉ ET PARAMÈTRES DE VALIDATION

Le coefficient de variation pour des analyses répétées au sein d'un même laboratoire est inférieur à 6 % (dans une plage de concentration comprise entre 10 mg/L et 100 mg/L). L'écart type de répétabilité est de 2,7 % pour une concentration de 14 mg/L, de 2,98 % pour une concentration de 18 mg/L, de 4,8 % pour une concentration de 22 mg/L, et de 1,3 % pour une concentration de 60 mg/L. La plage de linéarité est située entre 0,2 et 80,0 mg/L. La limite de détection est de 0,1 mg/L. Le taux de recouvrement dans le vin est compris entre 92 % et 102 % (m/m).

8. RÉSULTATS

Les résultats sont exprimés en mg d'éthanal total /L et avec 1 décimale.

9. BIBLIOGRAPHIE

Behforouz, M., Bolan, J. L., et Flynt, M. S., « 2, 4-Dinitrophenylhydrazones: a modified method for the preparation of these derivatives and an explanation of previous conflicting results », *The Journal of Organic Chemistry*, 50 (8), 1985, p. 1186-1189.

Elias, R. J., Laurie, V. F., Ebeler, S. E., Wong, J. W., et Waterhouse, A. L., « Analysis of selected carbonyl oxidation products in wine by liquid chromatography with diode array detection », *Analytica chimica acta*, 626 (1), 2008, p. 104-110.

Han, G., Wang, H., Webb, M. R., et Waterhouse, A. L., « A rapid, one step preparation for measuring selected free plus SO 2-bound wine carbonyls by HPLC-DAD/MS », *Talanta*, 134, 2015, p. 596-602.

Méthode OIV-MA-AS313-25 **Méthode Type III**

Dosage de l'acide L-lactique dans les vins par méthode enzymatique automatisée

(Résolution OIV-OENO 598-2018)

1. Domaine d'application

Cette méthode permet le dosage de l'acide L-lactique dans les vins par analyse enzymatique spécifique en utilisant un analyseur automatique séquentiel.
Dans le présent document l'étude collaborative a permis de caractériser la méthode sur une échelle de mesure de 0,06 à 1,43 g/L.

Note : Le cas échéant, il appartient à chaque laboratoire utilisant cette méthode de redéfinir, éventuellement en l'élargissant, ce domaine par un travail de validation.

2. Références normatives

- Recueil des méthodes internationales d'analyses – OIV : Acide lactique - méthode enzymatique OIV-MA-AS313-07
- ISO 78-2 : Chimie – Plans de normes

3. Principes réactionnels

En présence de nicotinamide adénine dinucléotide (NAD), l'acide L-lactique est oxydé en pyruvate par une réaction catalysée par la L-lactate déshydrogénase (L-LDH). L'équilibre de la réaction étant en faveur du lactate, il convient d'éliminer le pyruvate formé qui est transformé en L-alanine en présence de L-glutamate. Cette réaction est catalysée par la glutamate pyruvate transaminase (GPT)

$$L-lactate + NAD^+ \overset{L-LDH}{\longleftrightarrow} pyruvate + NADH + H^+$$

$$pyruvate + L-glutamate \overset{GPT}{\leftrightarrow} L-alanine + \propto -cétoglutarate$$

La nicotinamide adénine dinucléotide réduite produite (NADH) est mesurée grâce à son absorption à 340 nm. Elle est proportionnelle à la quantité d'acide L-lactique.

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 (norme ISO 3696) qualité I ou II.

4.1.2. Glycylglycine ; (CAS 556-50-3)

4.1.3. Acide glutamique ; (CAS 56-86-0)

4.1.4. NAD (nicotinamide–adénine dinucléotide) ; (CAS 53-84-9)

4.1.5. L-LDH (L-lactate déshydrogénase) ; (CAS 9001-60-9)

4.1.6. GPT (glutamate pyruvate transaminase ; (CAS 9000-86-6)

4.1.7. Acide L-lactique de pureté ≥ 98% ; (CAS 79-33-4)

4.1.8. Polyvinylpyrrolidone (PVP) ; (CAS 9003-39-8)

4.1.9. Hydroxyde de sodium ; (CAS 1310-73-2)

Remarque 1 : Il existe des kits commerciaux pour la détermination de l'acide L-lactique. L'utilisateur se doit d'en vérifier la composition pour s'assurer que ceux-ci comprennent bien les réactifs indiqués ci-dessus.

Remarque 2 : 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 effective, le laboratoire doit s'assurer de l'absence d'interférence des tanins du vin sur les enzymes.

4.2. Solutions de travail

4.2.1. Tampon pH 10 (Glycylglycine 0,60 M, acide L-glutamique 0,1 M)

La préparation peut être la suivante :
- Glycylglycine (4.1.2) : 4,75 g
- Acide glutamique (4.1.3) : 0,88 g
- PVP (4.1.8) : 1 g
- Eau pour usage analytique (4.1.1) : 50 mL

Le mélange est ajusté à pH 10 avec une solution d'hydroxyde de sodium 10 M puis complété à 60 mL avec de l'eau pour usage analytique. Le tampon se conserve au moins 4 semaines à 2 - 8° C (environ).

4.2.2. Solution de travail R1 (exemple) :

- Eau pour usage analytique (4.1.1) : 12 mL
- NAD (4.1.4) : 420 mg

La solution se conserve au moins 4 semaines à 2 - 8° C (environ).

4.2.3. Solution de travail R2 (exemple) :

- Eau pour usage analytique (4.1.1) : 1,2 mL
- L-LDH (4.1.5) : 7600 U
- GPT (4.1.6) : 2200 U

La solution se conserve au moins 4 semaines à 2 - 8° C (environ).

4.3. Solutions d'étalonnage

Afin d'assurer le raccordement au plus près au Système International d'Unité (S.I.) la gamme d'étalonnage doit être réalisée avec des solutions pures d'acide L-lactique préparées par pesée et couvrant la gamme de mesure.

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 précisément régulée (en général 37°C). Les cuvettes de réaction sont en verre, en méthacrylate ou en quartz. L'équipement 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 d'une 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). Il est préférable de ne pas utiliser les valeurs d'absorbance supérieures à 2.0.

5.1.3. Précision des volumes prélevés

La précision des volumes de réactifs et d'échantillons prélevés par les pipettes de l'analyseur a une influence sur le résultat de mesure. Un contrôle qualité des résultats par des stratégies adaptées (par exemple selon les guides publiés à l'OIV) est recommandé.

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. Longueur d'onde

La longueur d'onde d'absorption maximale du NADH formé par la réaction est de 340 nm.

5.2. Balance

Celle-ci doit être raccordée au Système international d'unités et avoir une précision de 1 mg.

5.3. pH-mètre

5.4. Verrerie de mesure

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

6. Echantillonnage

6.1. Préparation des échantillons pour les moûts et les vins tranquilles

Dans la majorité des cas, les échantillons de vins et de moûts peuvent être analysés sans préparation. Dans certains cas une préparation peut être introduite :

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

6.2. Préparation des échantillons de vins chargés en CO_2

Les échantillons de vins chargés en CO_2, peuvent produire des effets de bullage. Ils 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 de 1 à 5 mn, 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 : 2,5 µL
- Tampon (80%) et R1 (20%) : 120 µL
- R2 : 15 µL

L'appareil effectue des mesures régulières qui permettent d'obtenir une courbe de réaction dont un exemple est donné en figure 1 :

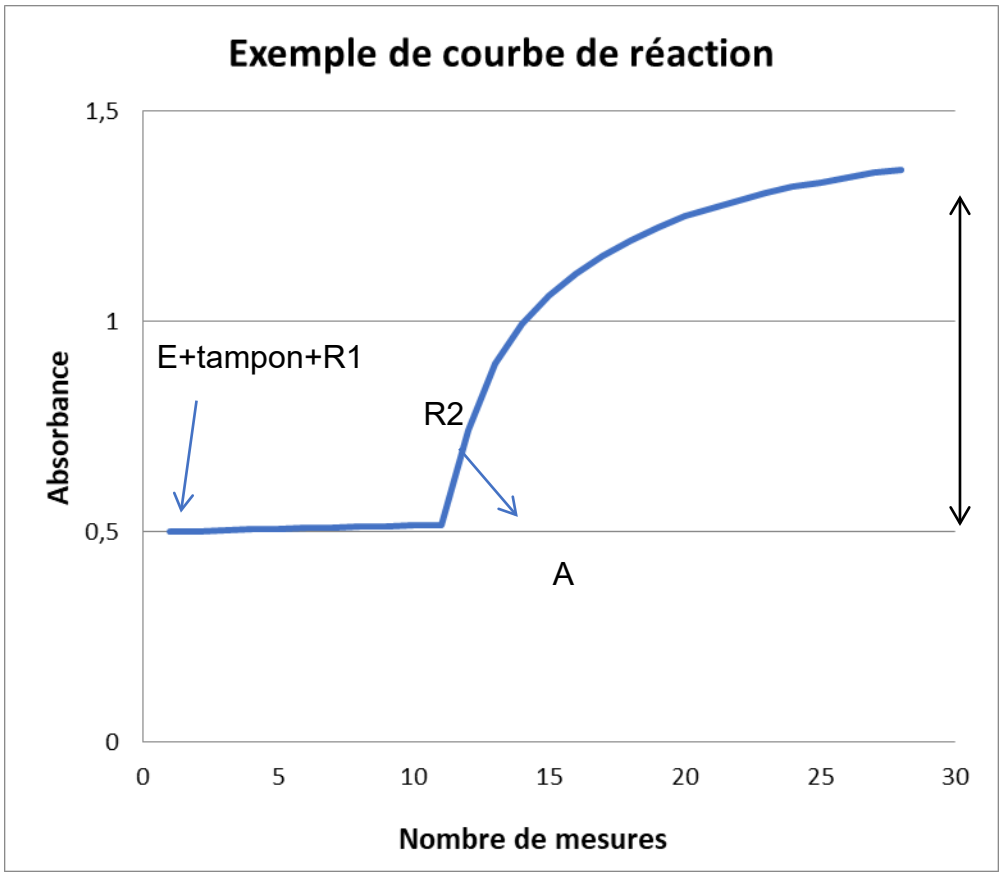


Figure 1 : Courbe de réaction

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

8. Calculs des résultats

La mesure utilisée pour la détermination du résultat est :

$$\Delta DO = (\text{Absorbance } B - \text{Absorbance } A)$$

Afin de corréler cette valeur ΔDO à la concentration en acide L-lactique recherchée, un étalonnage régulier de l'appareil est effectué en utilisant les

solutions d'étalonnage en 3 points minimum recouvrant la gamme de mesure utilisée. Dans l'exemple donné en figure 2, la courbe d'étalonnage obtenue est une droite pour des valeurs allant de 0 à 1,22 g/L d'acide L-lactique. Dans ce cas, pour des valeurs plus élevées, il est préférable de procéder à une dilution. Par ailleurs, un blanc réactif est mis en œuvre comportant tous les réactifs, mais pas d'échantillon (point 0 de l'étalonnage).

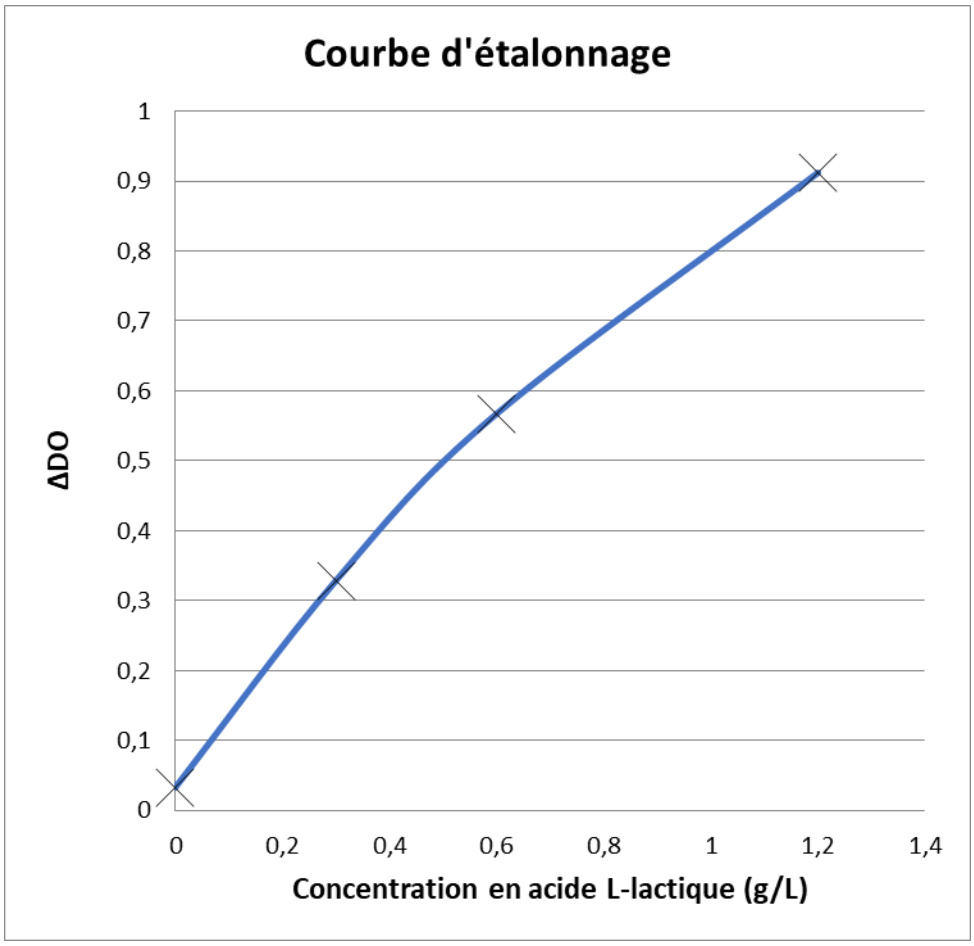


Figure 2 : Courbe d'étalonnage

La courbe d'étalonnage peut être d'ordre 1 (*Concentration* = $a.\Delta DO + b$) mais dans cette méthode elle est plus généralement d'ordre 2 (*Concentration* =

$a.\Delta DO^2 + b.\Delta DO + c$). Dans le cas d'utilisation d'une courbe d'étalonnage d'ordre 2, le laboratoire devra veiller à limiter le domaine d'étalonnage afin de maintenir une sensibilité suffisante de la méthode (risque d'écrasement de la courbe avec l'élévation des concentrations).

La valeur finale obtenue doit être multipliée par l'éventuel coefficient de la dilution utilisée.

9. Expression des résultats

Les résultats sont exprimés en g/L d'acide L-lactique, avec deux décimales.

10. Précision

Reproductibilité interlaboratoire

RSD_R = 7% (à partir de 0,5 g/L)
CV_R% (k=2) = 2.RSD_R= 14%, (à partir de 0,5 g/L)

Répétabilité

RSD_r= 2% (à partir de 0,5 g/L)
CV_r% (k=2) = 2.RSD_r = 4 % (à partir de 0,5 g/L)

Limite de quantification

LQ validée = 0,06 g/L
(Concentration où CV_R% (k=2) = 60%)

ANNEXE
Résultats de l'étude interlaboratoire

Etude collaborative

16 Laboratoires de différents pays ont participé à l'étude collaborative organisée en 2016.

Labo	Pays
Miguel Torres S.A.- Finca Mas La Plana	ESPAGNE
Estación Enológica de Castilla y León	ESPAGNE
INGACAL -Consellería do Medio Rural Estación de Viticultura e Enoloxía de Galicia	ESPAGNE
Estación Enológica de Haro	ESPAGNE
Comissão de Viticultura da Região dos Vinhos Verdes	PORTUGAL
Laboratoires Dubernet	FRANCE
Laboratoire Diœnos Rhône	FRANCE
Laboratoire Natoli	FRANCE
SCL Montpellier	FRANCE
Agricultural institute of Slovenia	SLOVENIE
Fachbereich: Wein, Weinüberwachung - Chemisches und Veterinärunterchungsamt Karlsruhe	ALLEMAGNE
HBLAuBA Wein - und Obstbau	AUTRICHE
Landesuntersuchungsamt Mainz	ALLEMAGNE
Hochschule GEISENHEIM University Institut Weinanalytik und	ALLEMAGNE

Getränkeforschung	
Unità Chimica Vitienologica e Agroalimentare - Centro Trasferimento Tecnologicio - Fondazione Edmund Mach	ITALIE
Unione Italiana Vini soc. Coop.	ITALIE

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

Echantillon		A (vin de liqueur)		B (vin sec)		C (vin sec)		D (vin sec)		E (vin sec)		F (vin sec)		G (vin sec)		H (vin édulcoré)		I (vin édulcoré)		J (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	0,17	0,14	0,04	0,04	**0,49**	**0,49**	0,68	0,73	**1,03**	**1,06**	*1,03*	*1,09*	1,34	1,31			**0,12**	**0,12**	1,36	1,34
	rep#2	0,18	0,17	0,01	0,02	**0,43**	**0,50**	0,68	0,68	**1,01**	**1,04**	*1,05*	*1,07*	1,28	1,26			**0,12**	**0,11**	1,24	1,32
Labo 6	rep#1	0,19	0,19			**0,55**	**0,55**	0,77	0,73	**1,15**	**1,11**	*1,09*	*1,09*	1,42	1,39	0,04	0,03	0,14	0,13	**1,47**	**1,43**
	rep#2	0,14	0,14			**0,52**	**0,52**	0,75	0,71	**1,16**	**1,11**	*1,09*	*1,10*	1,44	1,41	0,03	0,03	0,08	0,07	**1,50**	**1,45**
Labo7	rep#1	0,16	0,17	0,04	0,04	0,51	0,52	0,72	0,73	1,09	1,05	*1,01*	*1,07*	1,33	1,36	0,03	0,03	0,12	0,13	1,42	1,42
	rep#2	0,17	0,17	0,03	0,04	0,50	0,50	0,72	0,72	1,05	1,09	*1,04*	*1,08*	1,34	1,32	0,02	0,03	0,12	0,12	1,44	1,43
Labo9	rep#1	0,1	0,1			0,5	0,5	0,7	0,7	1,0	1,1	*1,0*	*1,0*	1,3	1,2			0,1	0,0	1,4	1,4

		5	4			0	4	0	0	9	0	*6*	*6*	1	7			1	7	1	3
	rep#2	0,14	0,15			0,50	0,52	0,69	0,74	1,10	1,08	*1,01*	*1,01*	1,29	1,27		0,01	0,10	0,12	1,37	1,33
Labo12	rep#1	0,17	0,18	0,08	0,08	**0,51**	**0,51**	0,74	0,75	1,06	1,04	*1,04*	*1,02*	1,34	1,34			0,16	0,16	1,40	1,40
	rep#2	0,17	0,18	0,08	0,08	**0,51**	**0,51**	0,74	0,76	1,04	1,00	*1,03*	*1,00*	1,34	1,36			0,17	0,18	1,40	1,42
Labo13	rep#1	0,16	0,16	0,05	0,05	0,49	0,48	0,71	0,72	**1,00**	**1,08**	*1,01*	*1,01*	1,30	1,42	0,03	0,03	0,12	0,12	1,39	1,41
	rep#2	0,16	0,17	0,05	0,05	0,49	0,50	0,71	0,73	**1,03**	**1,05**	*1,01*	*1,05*	1,29	1,33	0,02	0,02	0,13	0,12	1,37	1,37
Labo 14	rep#1	0,15	0,14	0,02	0,02	0,61	0,61	0,79	0,79	1,20	1,21	*1,23*	*1,24*	1,53	1,49	0,01	0,01	0,10	0,10	1,59	1,58
	rep#2	0,14	0,14	0,02	0,02	0,60	0,61	0,79	0,79	1,22	1,21	*1,24*	*1,24*	1,53	1,52	0,01	0,01	0,10	0,10	1,59	1,59
Labo 15	rep#1	**0,40**	**0,43**	0,09	0,08	1,00	0,98	1,03	1,07	1,69	1,68	*1,60*	*1,60*	2,04	2,10	0,06	0,07	0,24	0,19	2,07	2,06
	rep#2	**0,43**	**0,36**	0,03	0,03	0,95	0,99	1,05	1,09	1,64	1,68	*1,62*	*1,63*	2,04	2,03	0,04	0,01	0,16	0,19	2,17	2,01
Labo16	rep#1	**0,1**	**0,1**	0,0	0,0	0,5	0,5	0,7	0,7	1,1	1,1	*1,0*	*1,0*	1,3	1,3	**0,0**	**0,0**	0,1	0,1	**1,5**	**1,4**

		7	**7**	3	3	3	3	3	5	4	2	*8*	*9*	7	8	**3**	**2**	2	3	**0**	**4**
	rep#2	**0,17**	**0,17**	0,03	0,05	0,55	0,53	0,74	0,74	1,15	1,13	*1,06*	*1,08*	1,40	1,37	**0,04**	**0,02**	0,12	0,12	**1,46**	**1,45**
Labo17	rep#1	0,12	0,13	0,02	0,02	0,46	0,45	0,65	0,71	1,01	1,01	*1,03*	*1,07*	1,20	1,18	0,01	0,01	0,10	0,09	1,36	1,36
	rep#2	0,12	0,13	0,03	0,03	0,46	0,48	0,69	0,70	1,05	1,07	*1,04*	*1,03*	1,29	1,32	0,01	0,01	0,08	0,10	1,37	1,37
Labo18	rep#1	0,16	0,15	0,04	0,04	0,44	0,43	0,64	0,63	0,95	0,95	***0,92***	***0,92***	1,19	1,17	0,03	0,03	0,11	0,11	1,23	1,25
	rep#2	0,14	0,15	0,04	0,04	0,44	0,45	0,63	0,63	0,94	0,95	***0,92***	***0,91***	1,18	1,17	0,03	0,03	0,11	0,11	1,26	1,26
Labo19	rep#1	0,16	0,16	0,04	0,04	0,55	0,58	0,79	0,80	1,18	1,21	***1,12***	***1,14***	1,42	1,45	0,02	0,02	0,13	0,13	1,49	1,50
	rep#2	0,16	0,16	0,04	0,04	0,56	0,56	0,78	0,74	1,13	1,15	***1,13***	***1,14***	1,43	1,46	0,03	0,02	0,13	0,13	1,51	1,51
Labo20	rep#1	0,17	0,18	0,04	0,04	0,53	0,53	0,74	0,75	1,11	1,09	*1,06*	*1,07*	1,30	1,32	0,03	0,03	0,13	0,13	1,39	1,42
	rep#2	0,17	0,18	0,04	0,04	0,53	0,53	0,74	0,75	1,11	1,09	*1,06*	*1,07*	1,30	1,32	0,03	0,03	0,13	0,13	1,39	1,42
Labo21	rep#1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,5	0,5	0,7	0,8	1,1	1,2	*1,1*	*1,2*	1,4	1,5	0,0	0,0	0,1	0,1	1,5	1,5

		8	8	5	5	6	6	9	0	7	2	*9*	*0*	6	0	5	5	3	3	4	8
	rep#2	0,17	0,18	0,05	0,05	0,56	0,56	0,79	0,81	1,19	1,21	*1,20*	*1,23*	1,47	1,48	0,05	0,05	0,13	0,13	1,55	1,57
Labo22	rep#1	0,24	0,23	0,05	0,06	0,53	0,51	0,70	0,72	1,04	1,10	*1,01*	*1,00*	1,29	1,28	0,05	0,04	**0,13**	**0,16**	**1,38**	**1,40**
	rep#2	0,24	0,22	0,05	0,05	0,52	0,52	0,70	0,74	1,04	1,06	*1,06*	*1,03*	1,29	1,29	0,05	0,04	**0,15**	**0,14**	**1,43**	**1,41**

Tableau des données obtenues. 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).

Note : Les valeurs absentes n'ont pas été renseignées par le laboratoire concerné.

Echantillon	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Nb de laboratoires retenus	12	12	13	14	14	14	12	12	12	12
Nb de répétitions	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Mini	0,13	0,02	0,44	0,63	0,95	0,92	1,18	0,01	0,09	1,25
Maxi	0,18	0,08	0,61	0,80	1,21	1,24	1,52	0,05	0,17	1,59
Moyenne globale	0,16	0,04	0,52	0,73	1,09	1,07	1,36	0,03	0,12	1,43
Variance de répétabilité	0,00005	0,00003	0,00011	0,00028	0,00053	0,00035	0,00032	0,00002	0,00004	0,00028
Ecartype interlaboratoire	0,02	0,02	0,04	0,04	0,07	0,08	0,10	0,01	0,02	0,09
Variance de reproductibilité	0,0003	0,0003	0,0020	0,0021	0,0057	0,0067	0,0093	0,0002	0,0004	0,0083
Ecartype de répétabilité	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02	0,02	0,02	0,00	0,01	0,02
Limite r	0,02	0,02	0,03	0,05	0,06	0,05	0,05	0,01	0,02	0,05
RSD_r répétabilité	4,3%	14,1%	2,0%	2,3%	2,1%	1,8%	1,3%	16,9%	5,0%	1,2%
Ecartype de reproductibilité	0,02	0,02	0,04	0,05	0,08	0,08	0,10	0,01	0,02	0,09
Limite R	0,05	0,05	0,13	0,13	0,21	0,23	0,27	0,04	0,06	0,26

RSD_R reproductibilité	10,5%	40,0%	8,5%	6,4%	7,0%	7,6%	7,1%	50,8%	16,5%	6,4%
Horwitz RSD_r	4,92	6,03	4,12	3,92	3,69	3,70	3,57	6,46	5,11	3,54
Horrat r	0,87	2,33	0,49	0,59	0,57	0,48	0,37	2,62	0,98	0,33
Horwitz RSD_R	7,46	9,13	6,24	5,93	5,58	5,60	5,40	9,79	7,74	5,36
Horrat R	1,41	4,38	1,36	1,07	1,25	1,36	1,32	5,19	2,13	1,19

Tableau des résultats obtenus

Note : Les résultats des échantillons B et H sont à prendre avec réserve, en raison des niveaux très faibles de concentration, en dessous de la limite de quantification des laboratoires.

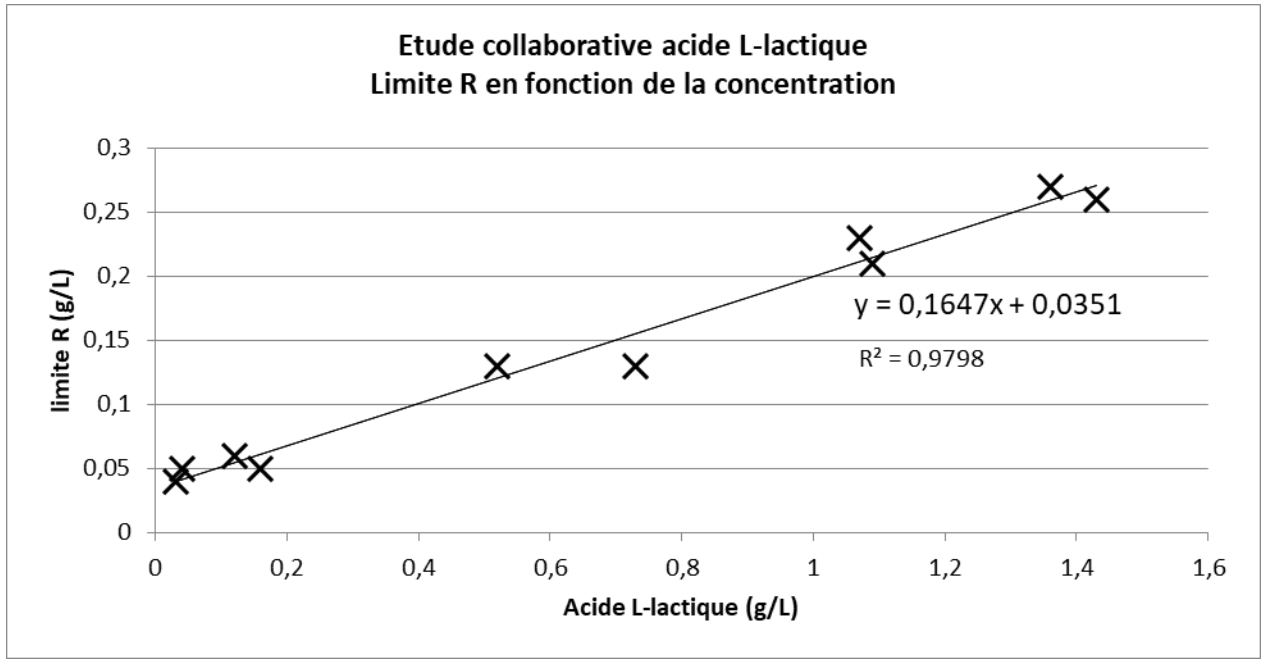


Figure 3 : Limite R en fonction de la concentration

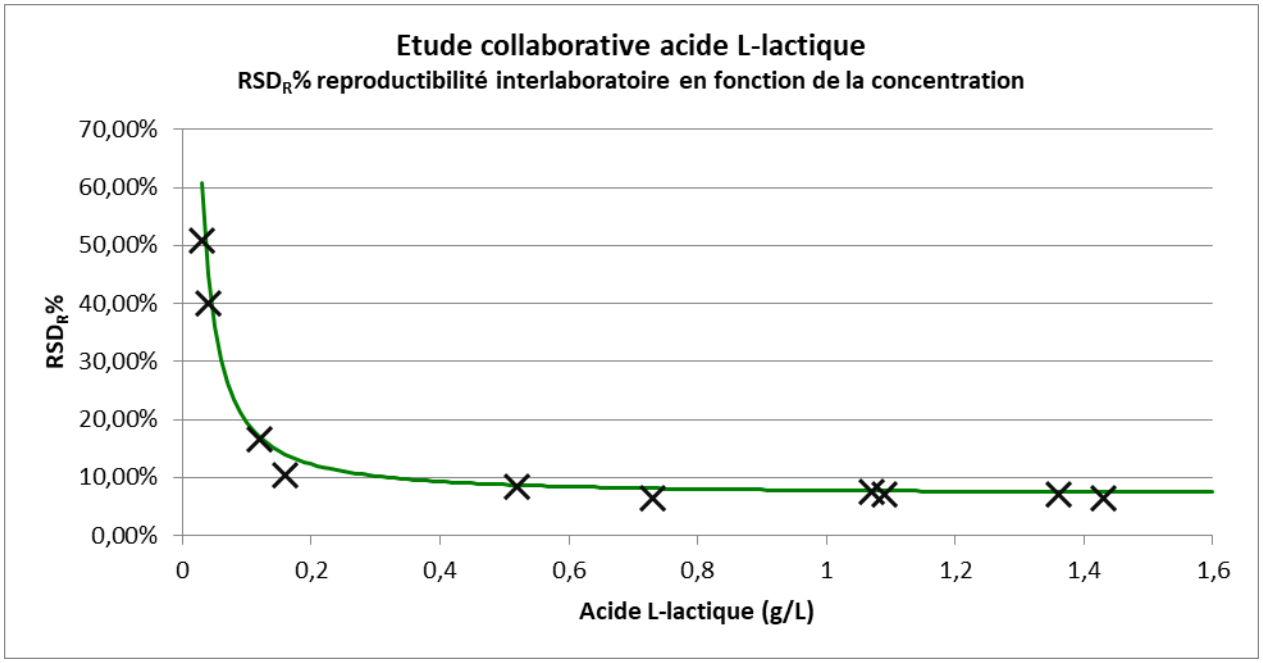


Figure 4 : RSD_R % interlaboratoire en fonction de la concentration.
Modélisation : $\mathbf{RSD_R\% = 0{,}758.C^{(-1{,}216)} + 7}$

Méthode OIV-MA-AS313-26 **Méthode Type III**

Dosage de l'acide L-malique dans les vins par méthode enzymatique automatisée

(Résolution OIV-OENO 599-2018)

1. Domaine d'application

Cette méthode permet le dosage de l'acide L-malique dans les vins par analyse enzymatique spécifique en utilisant un analyseur automatique séquentiel.
Dans le présent document l'étude collaborative a permis de caractériser la méthode sur une échelle de mesure de 0,12 à 2,30 g/L.

Note : Le cas échéant, il appartient à chaque laboratoire utilisant cette méthode de redéfinir, éventuellement en l'élargissant, ce domaine par un travail de validation.

2. Références normatives

- Recueil des méthodes internationales d'analyses – OIV: Acide L-malique – méthode enzymatique OIV-MA-AS313-11
- ISO 78-2 : Chimie – Plans de normes

3. Principes réactionnels

En présence de nicotinamide adénine dinucléotide (NAD), l'acide L-malique est oxydé en oxaloacétate par une réaction catalysée par la L-malate déshydrogénase (L-MDH). L'équilibre de la réaction étant en faveur du malate, il convient d'éliminer l'oxaloacétate formé qui est transformé en L-aspartate en présence de L-glutamate. Cette réaction est catalysée par la glutamate oxaloacétate transaminase (GOT)

$$L-malate + NAD^+ \overset{L-MDH}{\longleftrightarrow} oxaloacétate + NADH + H^+$$

$$oxaloacétate + L-glutamate \overset{GOT}{\longleftrightarrow} L-aspartate + \propto -cétoglutarate$$

La nicotinamide adénine dinucléotide réduite produite (NADH) est mesurée grâce à son absorption à 340 nm. Elle est proportionnelle à la quantité d'acide L-malique.

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 (norme ISO 3696) qualité I ou II.

4.1.2. Glycylglycine ; (CAS 556-50-3)

4.1.3. Acide glutamique ; (CAS 56-86-0)

4.1.4. NAD (nicotinamide–adénine dinucléotide) ; (CAS 53-84-9)

4.1.5. LMDH (L-malate déshydrogénase) ; (CAS 9001-64-3)

4.1.6. GOT (glutamate oxaloacétate transaminase) ; (CAS 9000-97-9)

4.1.7. Acide L-malique pureté ≥ 95%; (CAS 97-67-6)

4.1.8. Optionnel : Polyvinylpyrrolidone (PVP) ; (CAS 9003-39-8) (ou éventuellement PVPP (CAS 25249-54-1))

4.1.9. Hydroxyde de sodium ; (CAS 1310-73-2)

Remarque 1 : Il existe des kits commerciaux pour la détermination de l'acide L-malique. L'utilisateur se doit d'en vérifier la composition pour s'assurer que ceux-ci comprennent bien les réactifs indiqués ci-dessus.

Remarque 2 : 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 effective, le laboratoire doit s'assurer de l'absence d'interférence des tanins du vin sur les enzymes.

4.2. Solutions de travail

4.2.1. Tampon pH 10 (Glycylglycine 0,60 M, acide L-glutamique 0,1 M)

La préparation peut être la suivante :

- Glycylglycine (4.1.2) : 4,75 g
- Acide glutamique (4.1.3) : 0,88 g
- PVP (4.1.8) : 1 g
- Eau pour usage analytique (4.1.1) : 50 mL

Le mélange est ajusté à pH 10 avec une solution d'hydroxyde de sodium 10 M puis complété à 60 mL avec de l'eau pour usage analytique. Le tampon se conserve au moins 4 semaines à 2 - 8° C (environ).

4.2.2. Solution de travail R1 (exemple) :

- Eau pour usage analytique (4.1.1) : 12 mL
- NAD (4.1.4) : 420 mg

La solution se conserve au moins 4 semaines à 2 - 8° C (environ).

4.2.3. Solution de travail R2 (exemple) :

- Eau pour usage analytique (4.1.1) : 1,2 mL
- L-MDH (4.1.5) : 4800 U
- GOT (4.1.6) : 320 U

La solution se conserve au moins 4 semaines à 2 - 8° C (environ).

4.3. Solutions d'étalonnage

Afin d'assurer le raccordement au plus près au Système International d'Unité (S.I.) la gamme d'étalonnage doit être réalisée avec des solutions pures d'acide L-malique préparées par pesée et couvrant la gamme de mesure.

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 précisément régulée (en général 37°C). Les cuvettes de réaction sont en verre, en méthacrylate ou en quartz. L'équipement 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 d'une 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). Il est préférable de ne pas utiliser les valeurs d'absorbance supérieures à 2.0.

5.1.3. Précision des volumes prélevés

La précision des volumes de réactifs et d'échantillons prélevés par les pipettes de l'analyseur ont une influence sur le résultat de mesure. Un contrôle qualité des résultats par des stratégies adaptées (par exemple selon les guides publiés à l'OIV) est recommandé.

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 réactif

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 réactif).

5.1.6. Longueur d'onde

La longueur d'onde d'absorption maximale du NADH formé par la réaction est de 340 nm.

5.2. Balance

Celle-ci doit être raccordée au Système international d'unités et avoir une précision de 1 mg.

5.3. pH-mètre

5.4. Verrerie de mesure

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

6. Echantillonnage

6.1. Préparation des échantillons pour les moûts et les vins tranquilles

Dans la majorité des cas, les échantillons de vins et de moûts peuvent être analysés sans préparation. Dans certains cas une préparation peut être introduite :

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

6.2. Préparation des échantillons de vins chargés en CO_2

Les échantillons de vins chargés en CO2, peuvent produire des effets de bullage. Ils 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 de 1 à 5 mn, 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 : 2,5 µL
- Mélange de tampon (3.2.1) à 80% et R1 (3.2.2) à 20% : 120 µL
- R2 (3.2.3) : 15 µL

L'appareil effectue des mesures régulières qui permettent d'obtenir une courbe de réaction dont un exemple est donné dans la figure 1 :

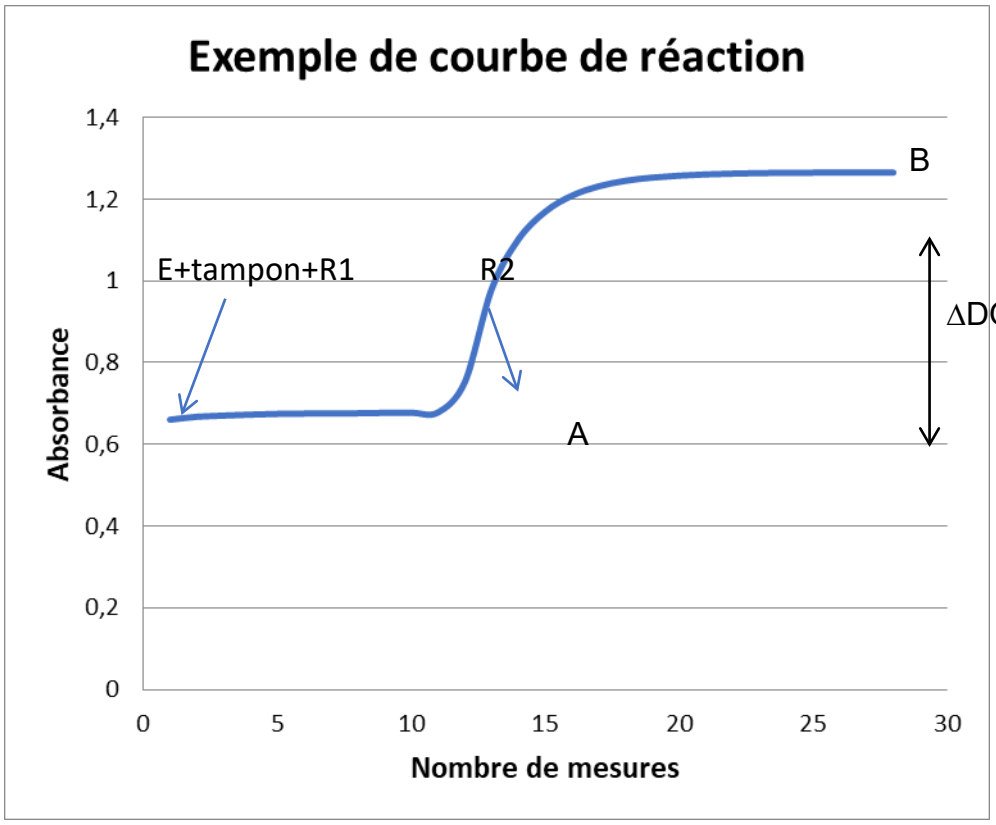


Figure 1 : Courbe de réaction

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

8. Calculs des résultats

La mesure utilisée pour la détermination du résultat est :

$$\Delta DO = (\text{Absorbance } B - \text{Absorbance } A)$$

Afin de corréler cette valeur ΔDO à la concentration en acide L-malique recherchée, un étalonnage régulier de l'appareil est effectué en utilisant les solutions d'étalonnage (§4.3) en 3 points minimum recouvrant la gamme de mesure. Dans l'exemple donné en figure 2, la courbe d'étalonnage obtenue est une

droite pour des valeurs allant de 0 à 2 g/L d'acide L-malique. Dans ce cas, pour des valeurs plus élevées, il est préférable de procéder à une dilution de l'échantillon. Par ailleurs, un blanc réactif est mis en œuvre comportant tous les réactifs, mais pas d'échantillon (point 0 de l'étalonnage).

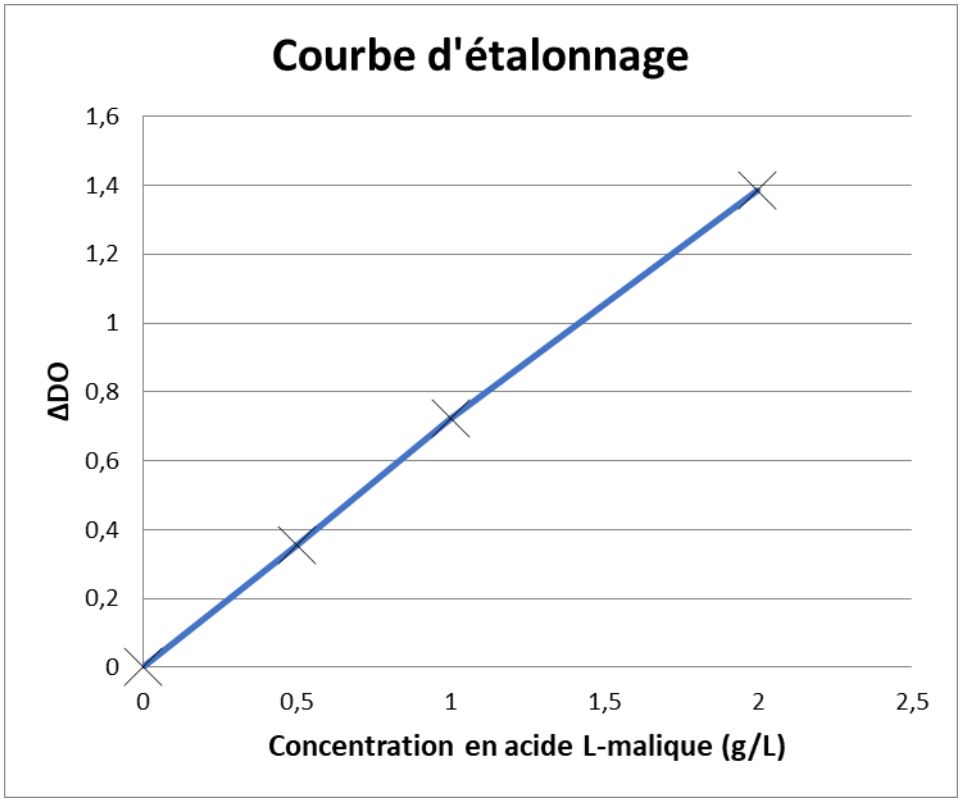


Figure 2 : Courbe d'étalonnage

La courbe d'étalonnage peut être d'ordre 1 (*Concentration* = $a.\Delta DO + b$) voire d'ordre 2 (*Concentration* = $a.\Delta DO^2 + b.\Delta DO + c$). Dans le cas d'utilisation d'une courbe d'étalonnage d'ordre 2, le laboratoire devra veiller à limiter le domaine d'étalonnage afin de maintenir une sensibilité suffisante de la méthode (risque d'écrasement de la courbe avec l'élévation de la concentration).

La valeur finale obtenue doit être multipliée par l'éventuel coefficient de la dilution utilisée.

9. Expression des résultats

Les résultats sont exprimés en g/L d'acide L-malique, avec deux décimales.

10. Précision

Reproductibilité interlaboratoire

RSD_R = 5% (à partir de 1 g/L)
CV_R% (k=2) = 2.RSD_R= 10%, (à partir de 1 g/L)

Répétabilité

RSD_r= 2% (à partir de 1 g/L)
CV_r% (k=2) = 2.RSD_r = 4 % (à partir de 1 g/L)

Limite de quantification

LQ validée = 0,12 g/L
(Concentration où CV_R% (k=2) = 60%)

ANNEXE

Résultats de l'étude interlaboratorie

Etude collaborative

16 Laboratoires de différents pays ont participé à l'étude collaborative organisée en 2016.

Labo	Pays
Miguel Torres S.A.- Finca Mas La Plana	ESPAGNE
Estación Enológica de Castilla y León	ESPAGNE
INGACAL -Consellería do Medio Rural Estación de Viticultura e Enoloxía de Galicia	ESPAGNE
Estación Enológica de Haro	ESPAGNE
Comissão de Viticultura da Região dos Vinhos Verdes	PORTUGAL
Laboratoires Dubernet	FRANCE
Laboratoire Dicœnos Rhône	FRANCE
Laboratoire Natoli	FRANCE
SCL Montpellier	FRANCE
Agricultural institute of Slovenia	SLOVENIE
Fachbereich: Wein, Weinüberwachung - Chemisches und Veterinärunterchungsamt Karlsruhe	ALLEMAGNE
HBLAuBA Wein - und Obstbau	AUTRICHE
Landesuntersuchungsamt Mainz	ALLEMAGNE
Hochschule GEISENHEIM University Institut Weinanalytik und Getränkeforschung	ALLEMAGNE

Unità Chimica Vitienologica e Agroalimentare - Centro Trasferimento Tecnologicio - Fondazione Edmund Mach	ITALIE
Unione Italiana Vini soc. Coop.	ITALIE

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

Echantillon		A		B		C		D		E		F		G		H		I		J	
position		1	9	2	13	3	4	5	15	6	10	16	20	7	11	12	17	8	19	14	18
Labo3	rep#1	1,12	1,09	2,16	2,21	**0,08**	**0,08**	1,38	1,39	**0,16**	**0,16**	*0,05*	*0,04*	0,07	0,06	1,31	1,35	**1,24**	**1,27**	0,07	0,07
	rep#2	1,15	1,11	2,18	2,11	**0,08**	**0,09**	1,35	1,41	**0,16**	**0,16**	*0,05*	*0,04*	0,06	0,06	1,32	1,30	**1,23**	**1,24**	0,07	0,07
Labo 6	rep#1	0,99	0,95	2,28	2,31	**0,04**	**0,02**	1,44	1,47	**0,05**	**0,08**	*0,04*	*0,04*	0,06	0,04	1,38	1,46	1,34	1,19	**0,04**	**0,03**
	rep#2	0,93	0,93	2,15	2,16	**0,05**	**0,03**	1,23	1,37	**0,08**	**0,09**	*0,03*	*0,05*	0,03	0,04	1,28	1,30	1,20	1,28	**0,03**	**0,03**
Labo7	rep#1	1,10	1,10	2,28	2,33	0,01		1,44	1,52	0,12	0,10		*0,01*			1,38	1,41	1,33	1,30	0,01	0,02
	rep#2	1,13	1,13	2,35	2,33	0,03	0,04	1,47	1,49	0,14	0,13				0,02	1,40	1,43	1,32	1,33	0,02	0,03
Labo9	rep#1	1,14	1,10	2,27	2,21	0,06	0,10	1,43	1,48	0,19	0,19	*0,02*	*0,02*	0,05	0,06	1,35	1,38	1,27	1,28	0,05	0,08
	rep#2	1,15	1,20	2,20	2,23	0,10	0,06	1,50	1,51	0,15	0,14	*0,03*	*0,01*	0,09	0,11	1,31	1,37	1,22	1,28	0,04	0,06
Labo12	rep#1	1,12	1,12	2,34	2,32	**0,06**	**0,02**	1,47	1,54	0,14	0,14	*0,04*	*0,03*	0,03	0,03	1,37	1,37	1,29	1,31	0,06	0,04
	rep#2	1,12	1,12	2,38	2,34	**0,07**	**0,01**	1,46	1,46	0,16	0,19	*0,04*	*0,05*	0,03	0,04	1,32	1,33	1,28	1,30	0,06	0,04
Labo13	rep#1	1,11	1,09	2,12	2,26	0,04	0,02	1,44	1,45	**0,12**	**0,14**	*0,01*	*0,01*	0,03	0,03	1,45	1,33	1,29	1,29	0,02	0,02
	rep#2	1,18	1,17	2,20	2,29	0,03	0,01	1,47	1,50	**0,11**	**0,12**			0,02	0,03	1,39	1,38	1,32	1,33		0,01
Labo 14	rep#1	1,32	1,30	2,66	2,68			1,69	1,67	0,08	0,08					1,65	1,60	1,51	1,52		
	rep#2	1,30	1,30	2,63	2,68			1,67	1,67	0,08	0,08					1,61	1,60	1,51	1,53		
Labo 15	rep#1	**1,18**	**1,19**	2,29	2,42	0,06	0,05	1,41	1,50	0,16	0,16	*0,04*	*0,04*	0,08	0,08	1,33	1,39	1,26	1,30	0,07	0,07
	rep#2	**1,13**	**1,20**	2,21	2,42	0,05	0,05	1,49	1,52	0,16	0,16	*0,04*	*0,04*	0,08	0,08	1,38	1,39	1,27	1,28	0,07	0,07

Labo16	rep#1	**1,22**	**1,22**	2,52	2,48			1,63	1,62	0,09	0,09					**1,50**	**1,53**	1,47	1,45		
	rep#2	**1,21**	**1,20**	2,45	2,55			1,62	1,61	0,09	0,09		*0,03*			**1,52**	**1,51**	1,44	1,45		
Labo17	rep#1	1,14	1,14	2,22	2,22	0,07	0,08	1,51	1,50	0,17	0,17	*0,07*	*0,07*	0,11	0,11	1,34	1,35	1,28	1,27	0,09	0,09
	rep#2	1,13	1,15	2,17	2,20	0,08	0,08	1,46	1,47	0,18	0,17	*0,08*	*0,07*	0,12	0,12	1,31	1,34	1,28	1,29	0,09	0,09
Labo18	rep#1	1,10	1,11	2,14	2,13	0,18	0,18	1,42	1,52	0,28	0,28	***0,16***	***0,16***	0,19	0,19	1,33	1,38	1,27	1,31	0,17	0,18
	rep#2	1,10	1,13	2,19	2,16	0,18	0,18	1,44	1,51	0,27	0,27	***0,16***	***0,16***	0,19	0,19	1,33	1,38	1,29	1,33	0,17	0,18
Labo19	rep#1	1,13	1,19	2,20	2,23	0,08	0,08	1,47	1,44	0,17	0,19	***0,07***	***0,08***	0,11	0,11	1,36	1,30	1,27	1,26	0,10	0,10
	rep#2	1,15	1,22	2,21	2,23	0,08	0,09	1,48	1,45	0,18	0,19	***0,07***	***0,08***	0,12	0,11	1,33	1,30	1,28	1,24	0,09	0,10
Labo20	rep#1	1,17	1,20	2,27	2,27	0,04	0,05	1,50	1,48	0,17	0,17	*0,04*	*0,03*	0,07	0,07	1,33	1,34	1,28	1,29	0,07	0,06
	rep#2	1,17	1,20	2,27	2,27	0,04	0,05	1,50	1,48	0,17	0,17	*0,04*	*0,03*	0,07	0,07	1,34	1,34	1,28	1,29	0,07	0,06
Labo21	rep#1	1,10	1,12	2,30	2,47	0,05	0,05	1,45	1,49	0,11	0,10	*0,05*	*0,05*	0,05	0,05	1,46	1,44	1,33	1,41	0,05	0,05
	rep#2	1,09	1,16	2,28	2,50	0,05	0,05	1,49	1,51	0,09	0,11	*0,05*	*0,05*	0,05	0,05	1,43	1,46	1,34	1,37	0,05	0,05
Labo22	rep#1	1,08	1,07	2,35	2,31	0,04	0,03	1,46	1,45	0,11	0,12	*0,01*	*0,02*	0,03	0,03	1,35	1,35	**1,26**	**1,31**	**0,03**	**0,02**
	rep#2	1,06	1,08	2,30	2,31	0,04	0,04	1,51	1,46	0,12	0,12	*0,01*	*0,03*	0,04	0,03	1,35	1,34	**1,28**	**1,25**	**0,01**	**0,01**

Tableau des données obtenues. 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).

Note : Les valeurs absentes n'ont pas été renseignées par le laboratoire concerné.

Echantillon	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Nb de laboratoires retenus	15	15	12	14	13	13	12	12	12	12
Nb de répétitions	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Mini	0,95	2,15	0,03	1,38	0,08	0,01	0,02	1,32	1,25	0,02
Maxi	1,31	2,66	0,08	1,68	0,28	0,08	0,19	1,45	1,36	0,10
Moyenne globale	1,14	2,30	0,05	1,49	0,14	0,04	0,07	1,36	1,29	0,05
Variance de répétabilité	0,001	0,003	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000
Ecartype interlaboratoire	0,08	0,14	0,02	0,07	0,05	0,02	0,05	0,04	0,03	0,03
Variance de reproductibilité	0,006	0,021	0,001	0,006	0,003	0,000	0,002	0,002	0,001	0,001
Ecartype de répétabilité	0,03	0,05	0,01	0,03	0,01	0,01	0,01	0,03	0,02	0,01
Limite r	0,07	0,15	0,04	0,08	0,02	0,02	0,01	0,07	0,06	0,02
RSD_r répétabilité	2,2%	2,4%	25,0%	2,0%	6,2%	15,4%	7,4%	1,9%	1,6%	14,5%
Ecartype de reproductibilité	0,08	0,14	0,02	0,08	0,05	0,02	0,05	0,04	0,04	0,03
Limite R	0,22	0,41	0,07	0,21	0,16	0,06	0,14	0,12	0,10	0,08
RSD_R reproductibilité	6,9%	6,2%	46,9%	5,0%	39,1%	57,5%	71,2%	3,2%	2,8%	53,1%
Horwitz RSD_r	3,66	3,29	5,81	3,51	5,02	6,13	5,57	3,56	3,59	5,81

Horrat r	0,61	0,72	4,30	0,57	1,24	2,52	1,33	0,53	0,45	2,49
Horwitz RSD_R	5,55	4,99	8,80	5,32	7,60	9,29	8,44	5,40	5,44	8,81
Horrat R	1,25	1,25	5,33	0,95	5,14	6,19	8,43	0,59	0,51	6,02

Tableau des résultats obtenus

Note : Les résultats des échantillons C,F, G, et J sont à prendre avec réserve, en raison des niveaux très faibles de concentration, en dessous de la limite de quantification des laboratoires.

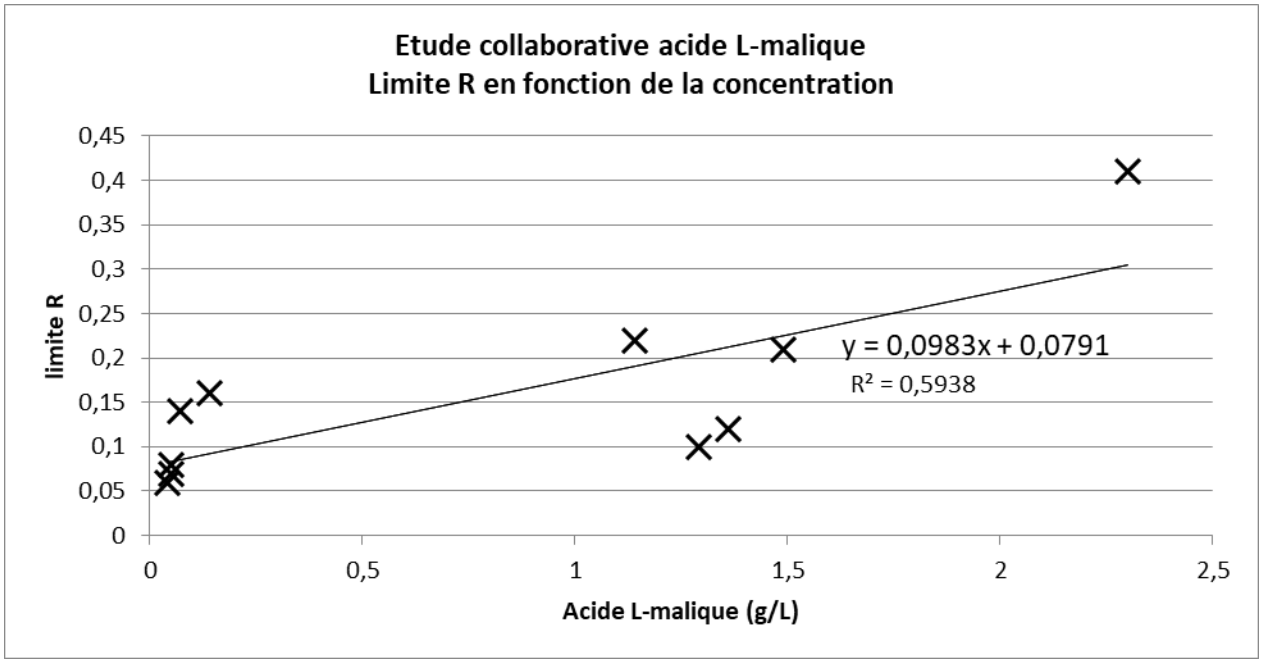


Figure 3 : Limite R en fonction de la concentration

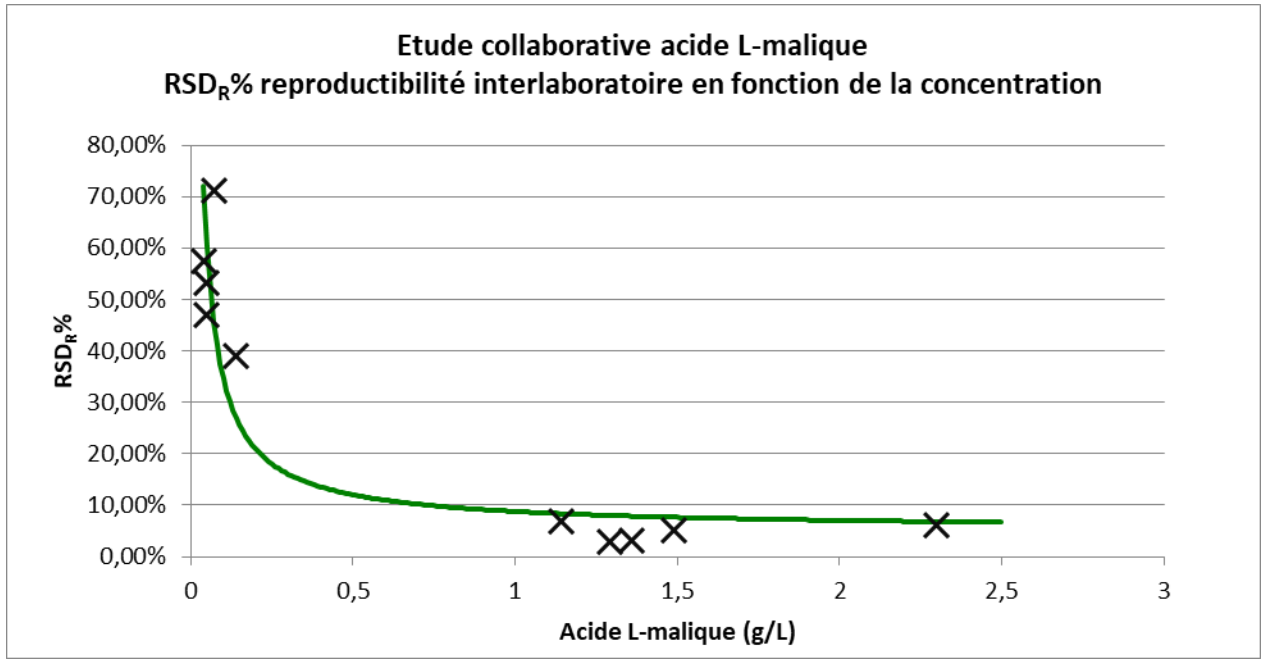


Figure 4 : RSD_R% en fonction de la concentration.
Modélisation : **$CV\% = 3{,}763.C^{(-0{,}895)} + 5$**

Méthode OIV-MA-AS313-27 Méthode Type II

Dosage de l'acide acétique dans les vins par méthode enzymatique automatisée

(Résolution OIV-OENO 621-2019)

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. REFERENCES NORMATIVES

- ISO 78-2 : Chimie – Plans de normes

3. PRINCIPES REACTIONNELS

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

(1) Acétate + ATP —Acétate Kinase→ Acétyl-phosphate + ADP

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

(2) ADP + Phosphoénolpyruvate —Pyruvate Kinase→ Pyruvate + ATP

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

(3) Pyruvate + NADH + H+ —Lactate déshydrogénase→ Lactate + NAD+ + H_2O

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.

(4) Acétyl-phosphate + CoA —Phosphotransacétylase→ Acétyl-CoA + Phosphate inorganique

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. REACTIFS 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. REACTIFS

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 H_2O ; (n° CAS 7791-18-6)
4.1.4. Chlorure de potassium ; (n° CAS 7447-40-7)
4.1.5. ß 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, $6H_2O$ (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'ETALONNAGE

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-METRE

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 OPERATOIRE

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_0 (début de la séquence)
- R2 : 60 µL, à T_0 + 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.

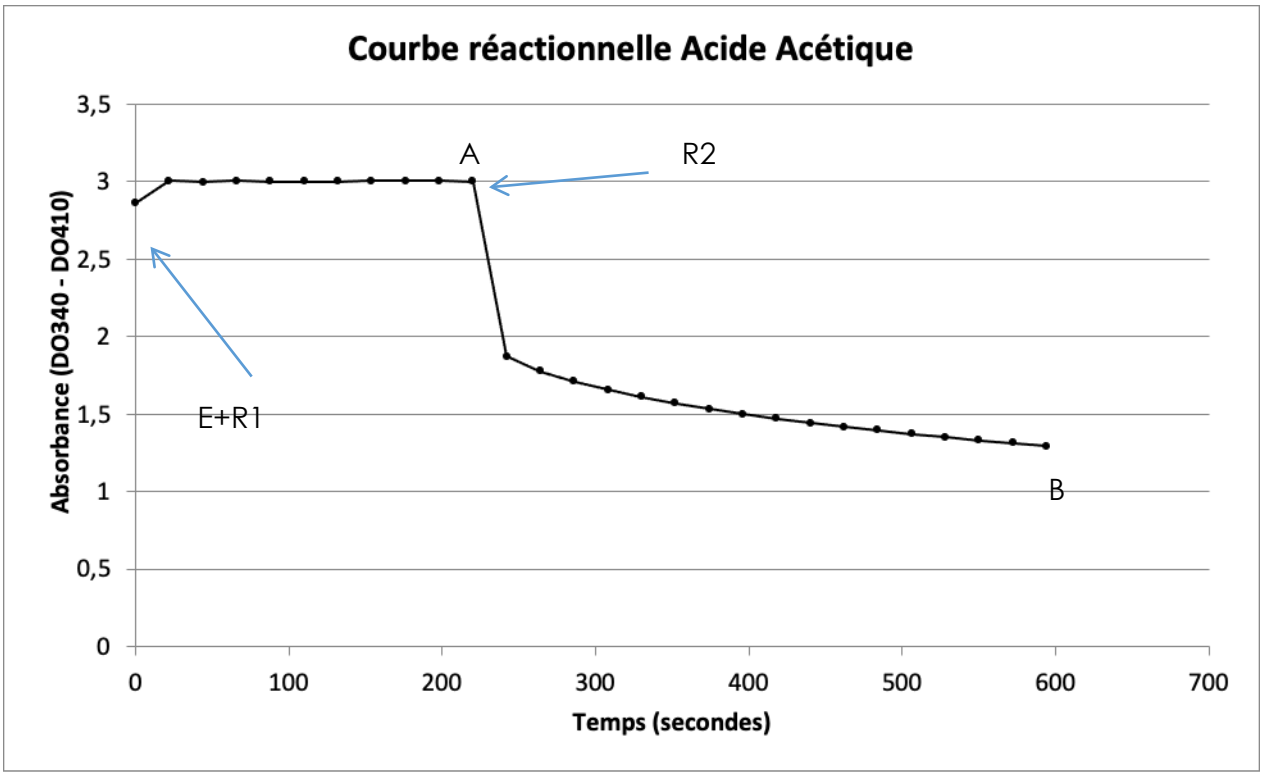


Figure 1 : Courbe de réaction

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 corréler 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).

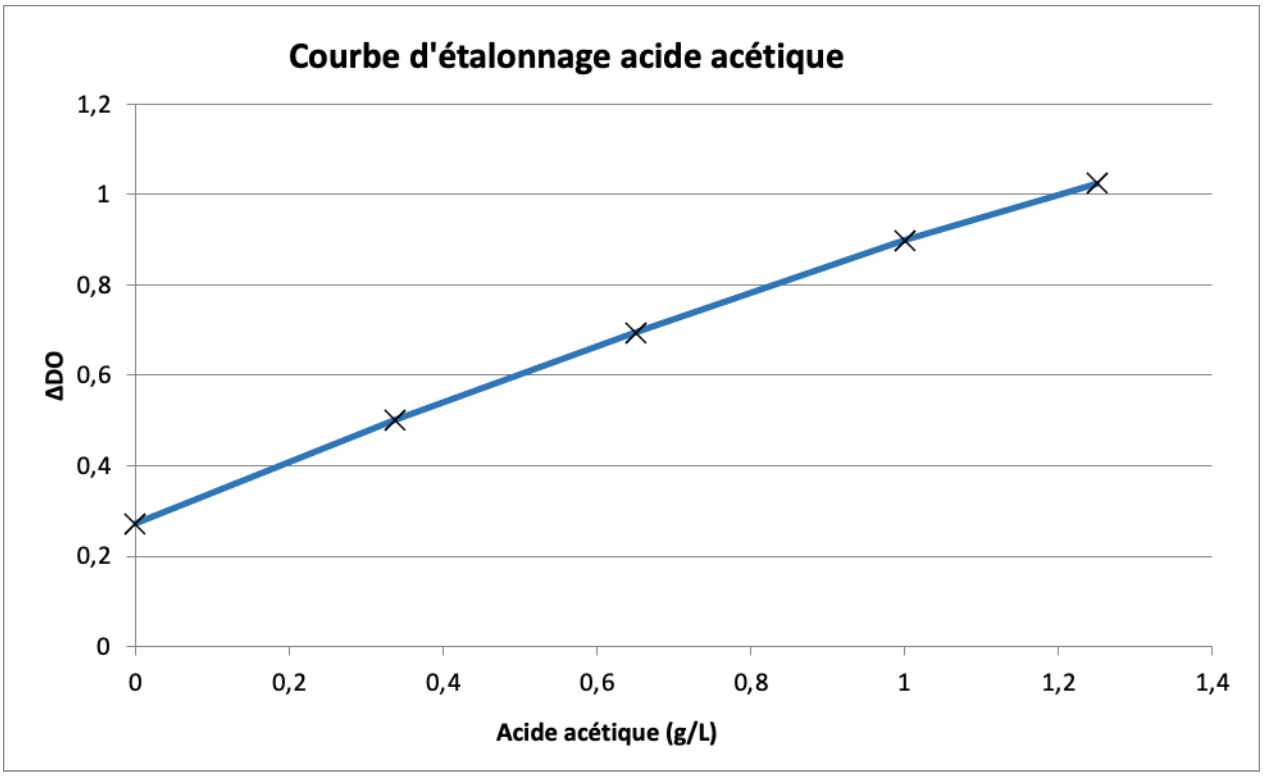


Figure 2 : Courbe d'étalonnage

8. CALCULS DES RESULTATS

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 RESULTATS

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. CARACTERISTIQUES DE LA METHODE ENZYMATIQUE AUTOMATISEE

Reproductibilité interlaboratoire

$RSD_R = 10\%$
$CV_R\%$ (k=2) = 2xRSD_R= 20%,

Répétabilité

RSD_r= 4%
$CV_r\%$ (k=2) = 2xRSD_r = 8%

Limite de quantification

LQ validée < 0,2 g/L
Non déterminée dans l'étude collaborative

11. BIBIOLOGRAPHIE

- 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 Dicœnos Rhône	France
Laboratoire Natoli	France
SCL Montpellier	France
Fachbereich: Wein, Weinüberwachung - Chemisches und Veterinärunterchungsamt 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

OIV-MA-AS313-27 : R2019

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

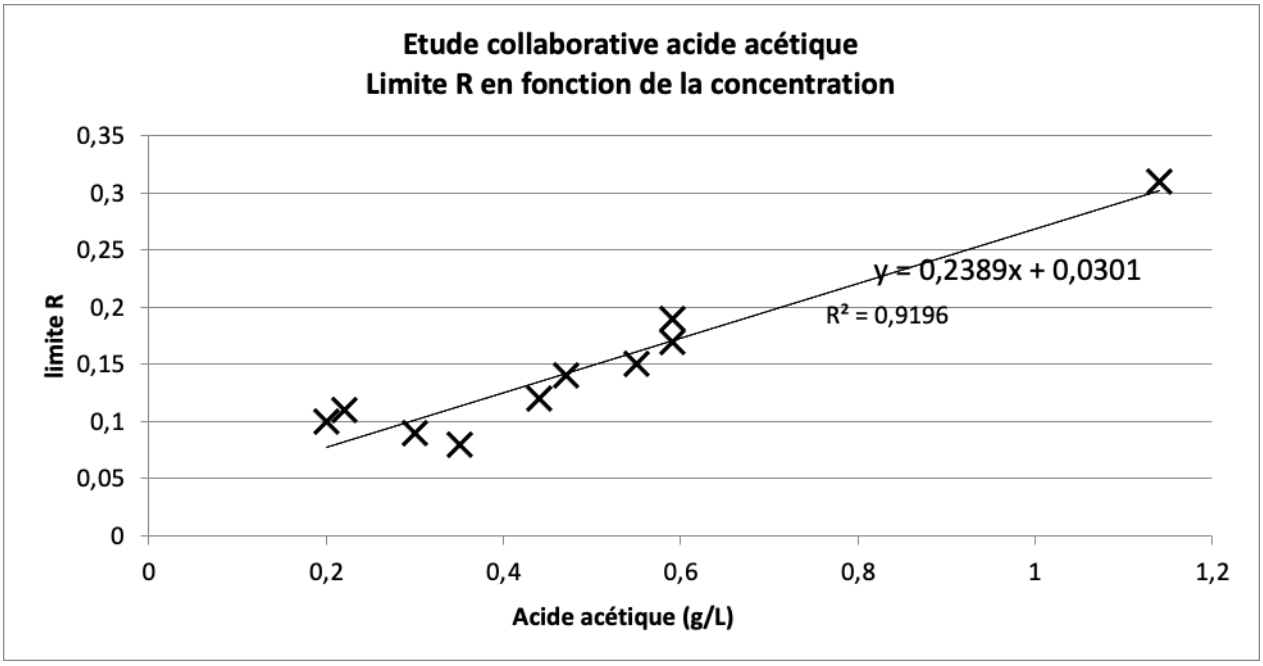


Figure 3 : Limite R en fonction de la concentration

Méthode OIV-MA-AS313-28 Méthode Type II

Dosage de l'acide D-gluconique dans les vins et les moûts par méthode enzymatique automatisée

(Résolution OIV-OENO 622-2019)

1. Domaine d'application

Cette méthode permet de doser l'acide D-gluconique dans les vins et les moûts par l'intermédiaire d'une analyse enzymatique spécifique réalisée dans un analyseur automatique séquentiel, avec des concentrations de l'analyte situées entre 0,06 g/L et 5,28 g/L (en tenant compte du fait que l'échantillon peut être dilué).

2. Principe

Le D-gluconate présent dans l'échantillon est phosphorylé par l'adénosine triphosphate (ATP) au cours d'une réaction enzymatique catalysée par la gluconate kinase (GK), produisant du D-gluconate-6-phosphate et de l'adénosine diphosphate (ADP)

$$\text{D-gluconate} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{GK}} \text{D-gluconate-6-P} + \text{ADP}$$

En présence de nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate (NADP), le D-gluconate-6-phosphate est oxydé en ribulose-5-phosphate au cours d'une réaction enzymatique catalysée par la 6-phosphogluconate déshydrogénase (6-PGDH). La quantité de nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate réduite (NADPH) obtenue correspond à la quantité de D-gluconate-6-phosphate, et donc à celle de l'acide D-gluconique.

$$\text{D-gluconate-6-P} + \text{NADP}^+ \xrightarrow{\text{6-PGDH}} \text{ribulose-5-P} + \text{NADPH} + \text{CO}_2 + \text{H}^+$$

Le nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate réduit (NADPH) est dosé par spectrophotométrie à 340 nm (maximum d'absorption du NADPH). La concentration en NADPH est proportionnelle à la concentration en acide D-gluconique.

3. Réactifs et solutions

3.1. Réactifs :

3.1.1. Eau distillée pour laboratoire à usage analytique selon EN ISO 3696

3.1.2. PIPES (acide 1,4-pipérazinediéthanesulfonique) (n° CAS 5625-37-6)

3.1.3. β-NADP-Na_2 (β-nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate, sel disodique) (n° CAS 24292-60-2)

3.1.4. $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (chlorure de magnésium hexahydraté) (n° CAS 7791-18-6)

3.1.5. ATP-Na_2 (adénosine 5'-triphosphate, sel disodique) (n° CAS 987-65-5)

3.1.6. Gluconate kinase (GK) (EC 2.7.1.12)

3.1.7. 6-phosphogluconate déshydrogénase (6-PGDH) (EC 1.1.1.44)

3.1.8. Sel sodique d'acide D-gluconique (n° CAS 527-07-1), pureté ≥ 99 %

3.1.9. NaOH (hydroxyde de sodium) (n° CAS 1310-73-2)

3.1.10. PVP K-90 (polyvinylpyrrolidone K-90) (n° CAS 9003-39-8)

3.2. Solutions de travail

3.2.1. Réactif 1 : dissoudre 30,2 g de PIPES (3.1.2) (100 mmol/L), 1 g de β-NADP-Na_2 (3.1.3) (1,3 mmol/L), 5,28 g de NaOH (3.1.9) et 5 g de PVP K-90 (3.1.10) dans 1 L d'eau distillée (3.1.1). Le pH doit être compris entre 6,3 et 6,4. La solution reste stable pendant au moins 4 semaines à 2-8 °C.

3.2.2. Réactif 2 : dissoudre 30,2 g de PIPES (3.1.2) (100 mmol/L), 1 g de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (3.1.4), 4,84 g d'ATP-Na_2 (3.1.5) et 7,6 g de NaOH (3.1.9) dans 1 L d'eau distillée (3.1.1). Le pH doit être compris entre 7,0 et 7,2. Ajouter 10 KU de gluconate kinase (3.1.6) et 10 KU de 6-phosphogluconate déshydrogénase (3.1.7). La solution reste stable pendant au moins 4 semaines à 2-8 °C.

3.3. Solutions d'étalonnage

Les solutions d'étalonnage sont préparées à partir du sel sodique d'acide D-gluconique (3.1.8), par pesée, à des concentrations qui couvrent la gamme linéaire de la méthode (0,01-2 g/L).

Remarque 1 : Les préparations décrites précédemment permettent d'obtenir 1 L de réactif. Il est possible de préparer d'autres volumes en fonction des besoins du laboratoire.
Remarque 2 : Il existe des kits commerciaux pour le dosage de l'acide D-gluconique. L'utilisateur devra vérifier que le kit inclut les réactifs susmentionnés.

4. Appareillage

4.1. Analyseur automatique séquentiel à température contrôlée (environ 37 °C) réglé pour mesurer l'absorbance à 340 nm. L'appareil doit disposer d'un logiciel facilitant l'obtention des données et réalisant les calculs nécessaires.
4.2. Spectrophotomètre ou photomètre permettant une mesure de l'absorbance à 340 nm
4.3. Cuves en verre, quartz ou polyméthacrylate de méthyle
4.4. Verrerie courante de laboratoire (fioles, pipettes, etc.) de classe A
4.5. Micropipettes
4.6. Balance analytique d'une précision de ± 0,0001g
4.7. pH-mètre

5. Préparation des échantillons

Si nécessaire, suivre la procédure de préparation de l'échantillon correspondant.
5.1. Filtrer ou centrifuger les échantillons en cas de présence de particules en suspension.
5.2. Procéder au dégazage des échantillons qui contiennent du dioxyde de carbone au moyen d'une agitation sous vide, d'un bain à ultrasons ou tout autre moyen permettant d'atteindre le degré de dégazage requis.
5.3. Diluer avec de l'eau distillée (3.1.1) les échantillons dont la concentration est supérieure à la limite de linéarité spécifiée (2 g/L). Multiplier la concentration obtenue par le facteur de dilution.

6. Mode opératoire

Étant donné qu'il est possible d'utiliser divers types d'analyseurs, il est recommandé de suivre rigoureusement les instructions du fabricant. Il en va de même pour les kits enzymatiques commerciaux.
Les procédures à suivre sont celles indiquées ci-après (les volumes ne sont fournis qu'à titre d'exemple).

6.1. Procédure manuelle

6.1.1. Préchauffer les réactifs et le photomètre à 37 °C.
6.1.2. Transférer dans une cuve à l'aide d'une pipette :

	Blanc de réaction (BR)	Étalon/échantillon
Étalon/échantillon	-	33 µL
Eau distillée	33 µL	-
Réactif 1	800 µL	800 µL

6.1.3. Mélanger et incuber pendant 1 minute à 37 °C. Lire l'absorbance (A1) à 340 nm.
6.1.4. Transférer dans la cuve à l'aide d'une pipette :

Réactif 2	200 µL	200 µL

6.1.5. Mélanger et incuber pendant 10 minutes à 37 °C. Lire l'absorbance (A2) du blanc de réaction, de l'étalon et de l'échantillon à 340 nm.

6.2. Procédure automatisée

6.2.1 Introduire les paramètres suivants dans un analyseur automatique conforme aux exigences indiquées au point 4.1 :

Longueur d'onde : 340 nm
Température : 37 °C
Mode d'analyse : 2 points (différentiel)
Volume de l'échantillon : 10 □L
Volume du réactif 1 : 240 □L
Volume du réactif 2 : 60 □L

6.2.2 Programmer l'analyseur afin qu'il réalise la séquence suivante :

	Blanc de réaction (BR)	Étalon/échantillon
Étalon/échantillon	-	10 µL
Eau distillée	10 µL	-
Réactif 1	240 µL	240 µL

Mélanger, incuber 1-5 minutes et lire l'absorbance (A1). Puis additionner :

Réactif 2	60 µL	60 µL

Mélanger, incuber 10 minutes et lire l'absorbance (A2).
L'appareil réalise des mesures à intervalles réguliers, ce qui permet d'obtenir une cinétique de réaction (fig. 1).

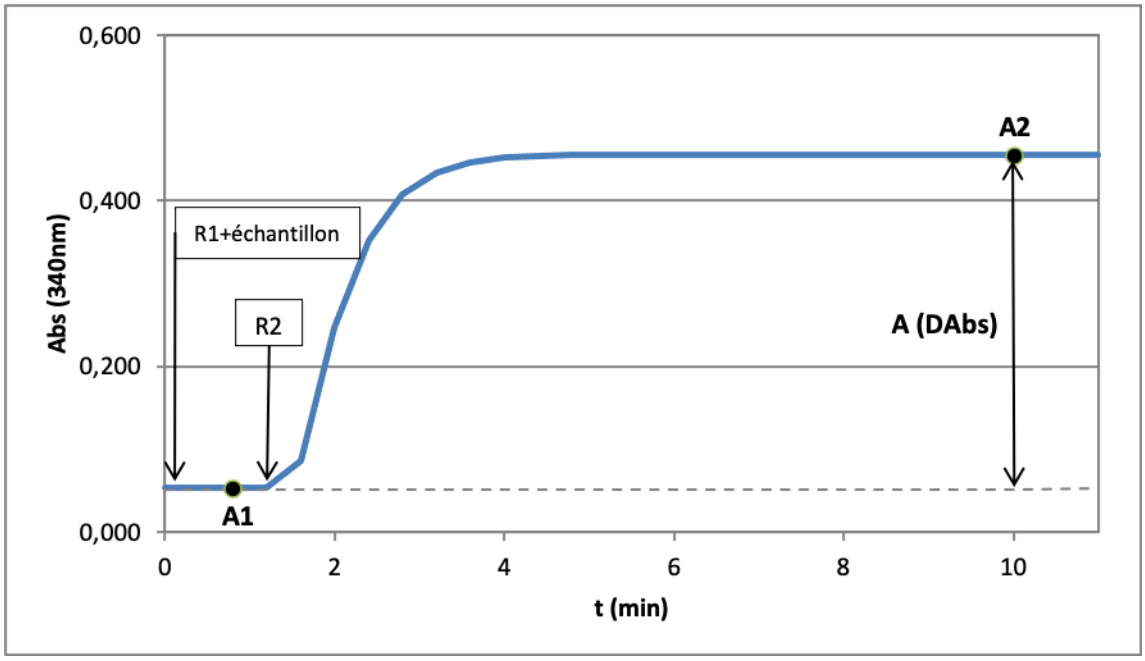


Figure 1 : exemple de cinétique de réaction

6.2.3 Il est recommandé de vérifier l'étalonnage en effectuant trois contrôles répartis dans la

plage de mesure. Chaque laboratoire doit établir son propre programme de contrôle de qualité interne, ainsi que des procédures correctives dans l'éventualité où les contrôles ne s'avèrent pas conformes aux tolérances admises.

7. Calculs

Calculer la concentration en acide-D-gluconique au moyen de la formule suivante :

- Si l'étalonnage est réalisé avec un point (étalon) et le blanc de réaction :

$$\frac{(A2 - 0{,}81 \times A1)_{\text{échantillon}} - (A2 - 0{,}81 \times A1)_{BR}}{(A2 - 0{,}81 \times A1)_{\text{étalon}} - (A2 - 0{,}81 \times A1)_{BR}} \times F \times g/L_{\text{ étalon}} = g/L_{\text{ échantillon}}$$

- Si l'étalonnage est réalisé avec une droite d'étalonnage :

$$A = (A2 - 0{,}81 \times A1)_{\text{échantillon}} - (A2 - 0{,}81 \times A1)_{BR}$$

L'absorbance calculée (A) est interpolée dans la droite d'étalonnage (fig. 2) afin d'obtenir la concentration en acide D-gluconique. Multiplier la concentration obtenue par le facteur de dilution (F).

A1 : absorbance du blanc/de l'étalon/de l'échantillon + réactif 1

A2 : absorbance du blanc/de l'étalon/de l'échantillon + réactif 1 + réactif 2

BR : Blanc de réaction

0,81 : facteur de correction de la dilution du réactif 1 (il est susceptible de varier en fonction des volumes utilisés selon la formule [vol. échantillon + réactif 1] / [vol. échantillon + réactif 1 + réactif 2]).

F : facteur de dilution de l'échantillon (à appliquer le cas échéant)

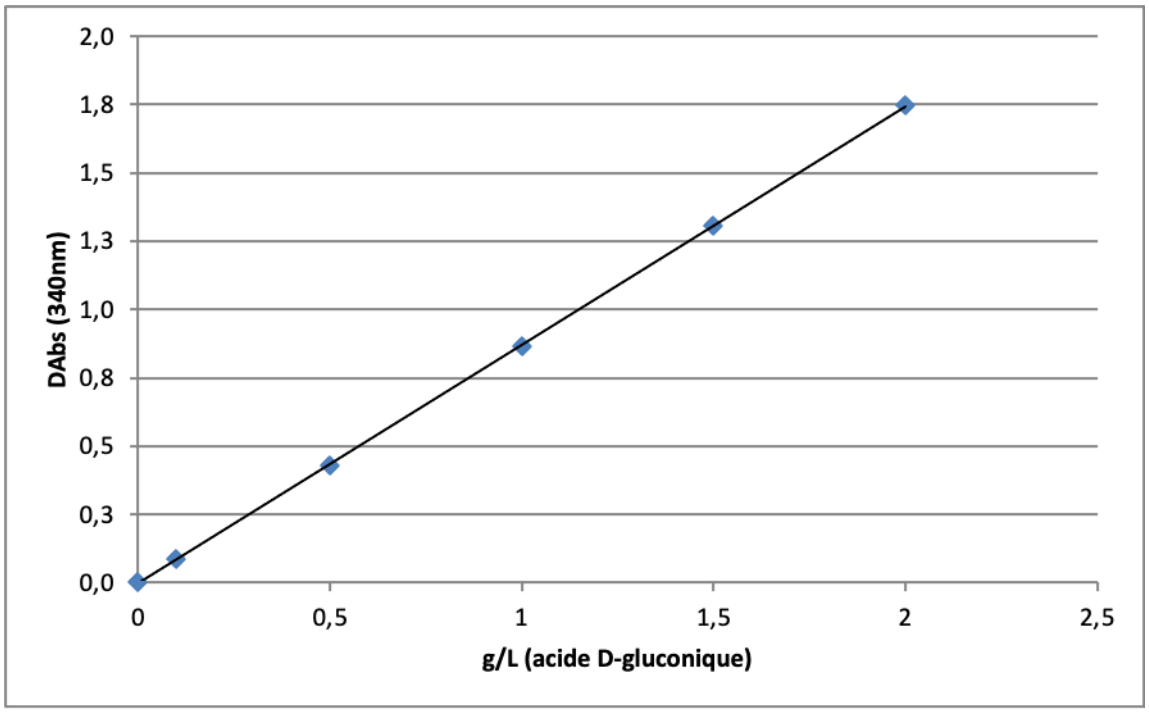


Figure 2 : exemple de droite d'étalonnage

8. Expression des résultats

Les résultats sont exprimés en g/L, avec 2 décimales ou en conformité avec l'incertitude.

9. Caractéristiques de la méthode enzymatique automatisée

9.1. Répétabilité

$r = 0{,}0396x + 0{,}0098$
où x est la concentration en acide gluconique en g/L

9.2 Reproductibilité

$R = 0,1226x + 0,0237$
où x est la concentration en acide gluconique en g/L

9.3 Limite de quantification

LQ	validée	=	0,06 g/L

ANNEXE
Résultats de l'étude interlaboratoires

1. Étude collaborative

1.1 Laboratoires participants : 19 laboratoires de 6 différents pays.

Laboratoire	Pays
Agroscope	Suisse
Biosystems S.A	Espagne
Bundesamt für Weinbau	Autriche
Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR)	Allemagne
Centrolab 2006, S.L	Espagne
Comité Champagne (Comité Interprofessionnel du vin de Champagne, CIVC)	France
Estación de Viticultura y Enología de Navarra (EVENA)	Espagne
Estación de Viticultura y Enología Alcázar de San Juan	Espagne
Estación Enológica de Castilla y León (ITACyL)	Espagne
Estación Enológica de Haro	Espagne
Federal College and Research Institute for Viticulture and Pomology (HBLA)	Autriche
Freixenet S.A	Espagne
Institut Català de la Vinya i el Vi (INCAVI)	Espagne
Instituto dos Vinhos do Douro e do Porto (IVDP)	Portugal
Laboratoires Dicœnos Rhône	France
Laboratoires Dubernet	France
Laboratorio Arbitral Agroalimentario	Espagne
Landesuntersuchungsamt, Institut für Lebensmittelchemie und Arzneimittelprüfung	Allemagne
Miguel Torres, SA	Espagne

Ont été utilisés pour l'analyse 2 × 10 échantillons en double aveugle, avec 1 répétition.

1.2 Échantillons

Échantillon	Flacon	Type d'échantillon
A	1 / 12	Moscatel
B	2 / 11	Moût concentré
C	3 / 13	Moût sulfité
D	4 / 15	Vin blanc
E	5 / 14	Vin blanc
F	6 / 16	Vin rosé
G	7 / 10	Vin rouge
H	8 / 19	Vin rouge
I	9 / 18	Vin rouge
J	17 / 20	Matrice synthétique

1.3 Résultats méthode automatisée

		A		B		C		D		E		F		G		H		I		J	
		1	12	2	11	3	13	4	15	5	14	6	16	7	10	8	19	9	18	17	20
1	Rép. #1	2,10	2,00	1,00	1,00	0,23	0,23	0,29	0,28	0,10	0,11	2,72	2,72	5,20	5,25	0,15	0,15	0,49	0,48	0,06	0,06
	Rép. #2	2,01	2,02	0,99	1,00	0,22	0,23	0,30	0,29	0,11	0,10	2,70	2,68	5,13	5,18	0,14	0,14	0,48	0,49	0,05	0,06
	$\overline{X}_{(1)}$	**2,06**	**2,01**	**1,00**	**1,00**	**0,23**	**0,23**	**0,30**	**0,29**	**0,11**	**0,11**	**2,71**	**2,70**	**5,17**	**5,22**	**0,15**	**0,15**	**0,49**	**0,49**	**0,06**	**0,06**
	Rép. #1	1,95	2,02	1,02	0,99	0,23	0,23	0,29	0,30	0,10	0,09	2,79	2,72	5,27	5,24	0,13	0,13	0,47	0,46	0,05	0,05
2	Rép. #2	2,00	2,10	1,03	1,01	0,23	0,23	0,29	0,30	0,11	0,10	2,75	2,80	5,30	5,20	0,13	0,13	0,47	0,45	0,05	0,05
	$\overline{X}_{(2)}$	**1,97**	**2,06**	**1,03**	**1,00**	**0,23**	**0,23**	**0,29**	**0,30**	**0,11**	**0,10**	**2,77**	**2,76**	**5,28**	**5,22**	**0,13**	**0,13**	**0,47**	**0,45**	**0,05**	**0,05**
	Rép. #1	2,19	2,19	1,06	1,07	0,27	0,28	0,34	0,33	*0,13*	*0,13*	2,95	3,06	5,54	5,63	0,08	0,08	0,51	0,50	0,06	0,06
3	Rép. #2	2,21	2,30	1,09	1,07	0,27	0,28	0,34	0,34	*0,13*	*0,13*	2,95	2,99	5,51	5,68	0,07	0,08	0,49	0,50	0,06	0,06
	$\overline{X}_{(3)}$	**2,20**	**2,24**	**1,07**	**1,07**	**0,27**	**0,28**	**0,34**	**0,34**	***0,13***	***0,13***	**2,95**	**3,02**	**5,53**	**5,66**	**0,07**	**0,08**	**0,50**	**0,50**	**0,06**	**0,06**
	Rép. #1	2,10	2,10	1,02	1,05	0,23	0,24	0,28	0,29	0,10	0,10	2,70	2,80	*3,78*	*3,94*	0,13	0,12	0,45	0,46	*0,10*	*0,10*
4	Rép. #2	2,08	2,12	1,03	1,04	0,24	0,25	0,29	0,29	0,10	0,11	2,72	2,82	*3,80*	*3,98*	0,13	0,13	0,45	0,45	*0,10*	*0,10*
	$\overline{X}_{(4)}$	**2,09**	**2,11**	**1,03**	**1,05**	**0,24**	**0,25**	**0,29**	**0,29**	**0,10**	**0,11**	**2,71**	**2,81**	***3,79***	***3,96***	**0,13**	**0,13**	**0,45**	**0,46**	***0,10***	***0,10***
	Rép. #1	1,88	1,94	0,98	0,96	*0,22*	*0,33*	0,27	0,26	0,10	0,09	2,68	2,58	4,95	4,90	0,11	0,08	0,43	0,42	0,04	0,05
5	Rép. #2	2,06	2,12	0,99	1,00	*0,24*	*0,23*	0,29	0,29	0,11	0,09	3,08	2,84	5,40	5,30	0,12	0,15	0,47	0,48	0,07	0,06
	$\overline{X}_{(5)}$	**1,97**	**2,03**	**0,99**	**0,98**	***0,23***	***0,28***	**0,28**	**0,28**	**0,11**	**0,09**	**2,88**	**2,71**	**5,18**	**5,10**	**0,12**	**0,12**	**0,45**	**0,45**	**0,06**	**0,06**
	Rép. #1	2,06	2,02	1,00	1,01	0,22	0,23	0,28	0,29	0,10	0,10	2,80	2,78	5,22	5,22	0,12	0,12	0,46	0,46	0,05	0,05
6	Rép. #2	1,98	2,01	0,99	1,00	0,22	0,22	0,27	0,28	0,09	0,10	2,75	2,75	5,22	5,22	0,12	0,11	0,45	0,46	0,05	0,05
	$\overline{X}_{(6)}$	**2,02**	**2,02**	**0,99**	**1,00**	**0,22**	**0,23**	**0,28**	**0,29**	**0,09**	**0,10**	**2,78**	**2,77**	**5,22**	**5,22**	**0,12**	**0,12**	**0,45**	**0,46**	**0,05**	**0,05**
	Rép. #1	2,02	2,02	0,98	0,99	0,23	0,23	0,29	0,29	0,11	0,11	2,74	2,75	5,28	5,16	0,13	0,13	0,46	0,47	0,05	0,06
7	Rép. #2	2,01	2,01	0,98	0,99	0,23	0,23	0,30	0,29	0,11	0,12	2,75	2,74	5,28	5,22	0,14	0,14	0,46	0,47	0,05	0,05
	$\overline{X}_{(7)}$	**2,02**	**2,02**	**0,98**	**0,99**	**0,23**	**0,23**	**0,30**	**0,29**	**0,11**	**0,12**	**2,75**	**2,75**	**5,28**	**5,19**	**0,14**	**0,14**	**0,46**	**0,47**	**0,05**	**0,06**
	Rép. #1	2,09	2,11	1,02	1,01	0,24	0,24	0,29	0,29	0,10	0,09	2,83	2,84	5,20	5,25	0,10	0,10	0,47	0,46	0,05	0,05
8	Rép. #2	2,10	2,09	1,00	1,01	0,24	0,23	0,29	0,29	0,10	0,10	2,80	2,78	5,18	5,18	0,10	0,08	0,47	0,47	0,05	0,05
	$\overline{X}_{(8)}$	**2,10**	**2,10**	**1,01**	**1,01**	**0,24**	**0,24**	**0,29**	**0,29**	**0,10**	**0,10**	**2,82**	**2,81**	**5,19**	**5,22**	**0,10**	**0,09**	**0,47**	**0,47**	**0,05**	**0,05**
	Rép. #1	1,94	2,02	1,00	1,00	0,24	0,24	0,29	0,29	0,11	0,11	2,74	2,74	5,15	5,25	0,15	0,15	0,47	0,48	0,06	0,06
9	Rép. #2	1,94	2,00	1,00	1,00	0,24	0,24	0,29	0,29	0,11	0,11	2,76	2,74	5,10	5,10	0,14	0,15	0,47	0,47	0,06	0,06
	$\overline{X}_{(9)}$	**1,94**	**2,01**	**1,00**	**1,00**	**0,24**	**0,24**	**0,29**	**0,29**	**0,11**	**0,11**	**2,75**	**2,74**	**5,13**	**5,18**	**0,15**	**0,15**	**0,47**	**0,48**	**0,06**	**0,06**
	Rép. #1	1,95	2,05	1,00	1,00	0,23	0,23	0,29	0,29	0,11	0,10	2,70	2,65	5,20	5,30	0,14	0,14	0,48	0,45	0,05	0,05
10	Rép. #2	2,00	2,00	0,99	1,00	0,23	0,25	0,28	0,29	0,10	0,11	2,70	2,75	5,40	5,30	0,13	0,13	0,48	0,46	0,05	0,05
	$\overline{X}_{(10)}$	**1,98**	**2,03**	**1,00**	**1,00**	**0,23**	**0,24**	**0,29**	**0,29**	**0,11**	**0,11**	**2,70**	**2,70**	**5,30**	**5,30**	**0,14**	**0,14**	**0,48**	**0,46**	**0,05**	**0,05**
	Rép. #1	*0,10*	*<0,05*	*<0,05*	*<0,05*	0,23	0,25	0,29	0,33	0,08	0,10	*0,13*	*0,26*	*<0,05*	*<0,05*	*<0,05*	*<0,05*	*<0,05*	*<0,05*	0,06	0,05
11	Rép. #2	*0,10*	*<0,05*	*<0,05*	*<0,05*	0,25	0,24	0,28	0,27	0,08	0,10	*0,13*	*0,26*	*<0,05*	*<0,05*	*<0,05*	*<0,05*	*<0,05*	*<0,05*	0,05	0,05
	$\overline{X}_{(11)}$	***0,10***	-	-	-	**0,24**	**0,25**	**0,29**	**0,30**	**0,08**	**0,10**	***0,13***	***0,26***	-	-	-	-	-	-	**0,06**	**0,05**
	Rép. #1	*2,49*	*2,47*	*1,17*	*1,16*	0,29	0,27	*0,38*	*0,38*	*0,14*	*0,13*	*3,51*	*3,42*	*6,37*	*6,12*	0,18	0,18	*0,61*	*0,60*	0,06	0,05
12	Rép. #2	*2,56*	*2,53*	*1,16*	*1,20*	0,30	0,28	*0,38*	*0,37*	*0,14*	*0,13*	*3,43*	*3,32*	*6,28*	*6,24*	0,18	0,18	*0,61*	*0,60*	0,06	0,05
	$\overline{X}_{(12)}$	***2,53***	***2,50***	***1,17***	***1,18***	**0,30**	**0,28**	***0,38***	***0,38***	***0,14***	***0,13***	***3,47***	***3,37***	***6,33***	***6,18***	**0,18**	**0,18**	***0,61***	***0,60***	**0,06**	**0,05**
	13a	2,05	2,06	0,98	0,98	0,22	0,22	0,28	0,27	0,10	0,10	2,76	2,74	5,27	5,18	0,13	0,15	0,46	0,45	0,05	0,05
13	13b	2,05	2,06	0,98	0,98	0,22	0,22	0,28	0,27	0,10	0,10	2,76	2,74	5,27	5,18	0,13	0,15	0,46	0,45	0,05	0,05
	$\overline{X}_{(13)}$	**2,05**	**2,06**	**0,98**	**0,98**	**0,22**	**0,22**	**0,28**	**0,27**	**0,10**	**0,10**	**2,76**	**2,74**	**5,27**	**5,18**	**0,13**	**0,15**	**0,46**	**0,45**	**0,05**	**0,05**
	Rép. #1	1,86	1,86	0,96	0,96	0,23	0,24	*0,29*	*0,32*	0,11	0,10	2,57	2,64	4,99	5,19	*0,17*	*0,11*	*0,50*	*0,39*	0,05	0,09
14	Rép. #2	1,88	1,86	0,95	0,97	0,23	0,23	*0,29*	*0,32*	0,15	0,1	2,56	2,65	5,00	5,10	*0,15*	*0,11*	*0,45*	*0,34*	0,06	0,05
	$\overline{X}_{(14)}$	**1,87**	**1,86**	**0,96**	**0,97**	**0,23**	**0,24**	***0,29***	***0,32***	**0,13**	**0,10**	**2,57**	**2,65**	**5,00**	**5,15**	***0,16***	***0,11***	***0,48***	***0,37***	**0,06**	**0,07**
	Rép. #1	1,91	1,98	1,11	1,12	0,30	0,31	0,32	0,33	0,10	0,11	3,23	3,13	5,88	6,01	*0,13*	*0,16*	0,50	0,52	*0,02*	*0,04*
15	Rép. #2	1,93	1,99	1,12	1,13	0,31	0,32	0,32	0,34	0,09	0,12	3,24	3,14	5,90	6,08	*0,12*	*0,17*	0,51	0,53	*0,02*	*0,04*
	$\overline{X}_{(15)}$	**1,92**	**1,99**	**1,12**	**1,13**	**0,31**	**0,32**	**0,32**	**0,34**	**0,10**	**0,12**	**3,24**	**3,14**	**5,89**	**6,05**	***0,13***	***0,17***	**0,51**	**0,53**	***0,02***	***0,04***
	Rép. #1	1,98	1,99	1,00	1,00	0,23	0,23	0,28	0,28	0,10	0,10	2,78	2,82	5,27	5,34	0,13	0,13	0,47	0,47	0,05	0,05
16	Rép. #2	2,04	2,08	0,99	1,00	0,23	0,23	0,28	0,28	0,10	0,10	2,79	2,81	5,30	5,28	0,14	0,14	0,47	0,47	0,05	0,05
	$\overline{X}_{(16)}$	**2,01**	**2,04**	**1,00**	**1,00**	**0,23**	**0,23**	**0,28**	**0,28**	**0,10**	**0,10**	**2,79**	**2,82**	**5,29**	**5,31**	**0,14**	**0,14**	**0,47**	**0,47**	**0,05**	**0,05**
	Rép. #1	2,27	2,22	*1,17*	*1,20*	0,27	0,27	0,30	0,29	0,12	0,10	2,75	2,72	5,20	4,95	0,16	0,17	0,46	0,47	0,07	0,07
17	Rép. #2	2,24	2,21	*1,19*	*1,19*	0,29	0,29	0,29	0,28	0,12	0,11	2,77	2,79	5,05	4,90	0,16	0,12	0,46	0,42	0,08	0,06
	$\overline{X}_{(17)}$	**2,26**	**2,22**	***1,18***	***1,20***	**0,28**	**0,28**	**0,30**	**0,29**	**0,12**	**0,11**	**2,76**	**2,76**	**5,13**	**4,93**	**0,16**	**0,15**	**0,46**	**0,45**	**0,08**	**0,07**
	Rép. #1	2,08	2,08	1,02	1,00	0,24	0,23	0,29	0,28	0,11	0,10	2,80	2,82	5,40	5,37	0,14	0,15	0,48	0,49	0,06	0,05
19	Rép. #2	2,08	2,08	1,01	1,00	0,23	0,24	0,28	0,29	0,10	0,11	2,82	2,80	5,28	5,40	0,14	0,14	0,47	0,47	0,05	0,05
	$\overline{X}_{(19)}$	**2,08**	**2,08**	**1,02**	**1,00**	**0,24**	**0,24**	**0,29**	**0,29**	**0,11**	**0,11**	**2,81**	**2,81**	**5,34**	**5,39**	**0,14**	**0,15**	**0,48**	**0,48**	**0,06**	**0,05**

Tableau des données obtenues. Les valeurs en italique correspondent à des résultats éliminés car aberrants selon le test de Grubbs simple bilatéral appliqué aux valeurs individuelles et le test de Grubbs double (bilatéral, P = 2,5 %) et selon le test de Cochran (unilatéral, P = 2,5 %).

Échantillon	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Lab. acceptés	16	15	17	16	16	16	15	15	15	16
Répétitions	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Valeur minimale	1,87	0,96	0,22	0,28	0,09	2,61	5,03	0,07	0,45	0,05
Valeur maximale	2,24	1,12	0,31	0,34	0,12	2,81	5,97	0,18	0,52	0,07
Valeur moyenne (g/L)	**2,04**	**1,01**	**0,25**	**0,29**	**0,10**	**2,79**	**5,28**	**0,13**	**0,47**	**0,06**
S_r	0,03	0,01	0,01	0,01	0,01	0,05	0,08	0,01	0,01	0,01
Limite r = 2□2* S_r	0,09	0,02	0,02	0,02	0,03	0,13	0,22	0,02	0,02	0,02
RSD_r	1,48 %	0,76 %	2,13 %	1,93 %	8,53 %	1,70 %	1,50 %	3,99 %	1,70 %	9,86 %
S reproductibilité (S_R)	0,09	0,04	0,03	0,02	0,01	0,13	0,24	0,03	0,02	0,01
Limite R = 2□2* S_R	0,28	0,11	0,07	0,05	0,06	0,38	0,67	0,07	0,05	0,02
RSD_R	4,63 %	3,96 %	10,57 %	5,89 %	8,91 %	4,81 %	4,50 %	19,21 %	4,09 %	12,49 %
Horwitz RSD_r (%)	3,39 %	3,77 %	4,66 %	4,54 %	5,31 %	3,23 %	2,94 %	5,12 %	4,22 %	5,84 %
$HorRat_r$	0,44	0,20	0,46	0,43	1,61	0,53	0,51	0,78	0,40	1,69
Horwitz RSD_R (%)	5,08 %	5,65 %	6,99 %	6,81 %	7,96 %	4,85 %	4,40 %	7,68 %	6,34 %	8,75 %
$HorRat_R$	0,91	0,70	1,51	0,86	1,12	0,99	1,02	2,50	0,65	1,43

S : écart-type / RSD : écart-type relatif / r : limite de répétabilité / R : limite de reproductibilité.

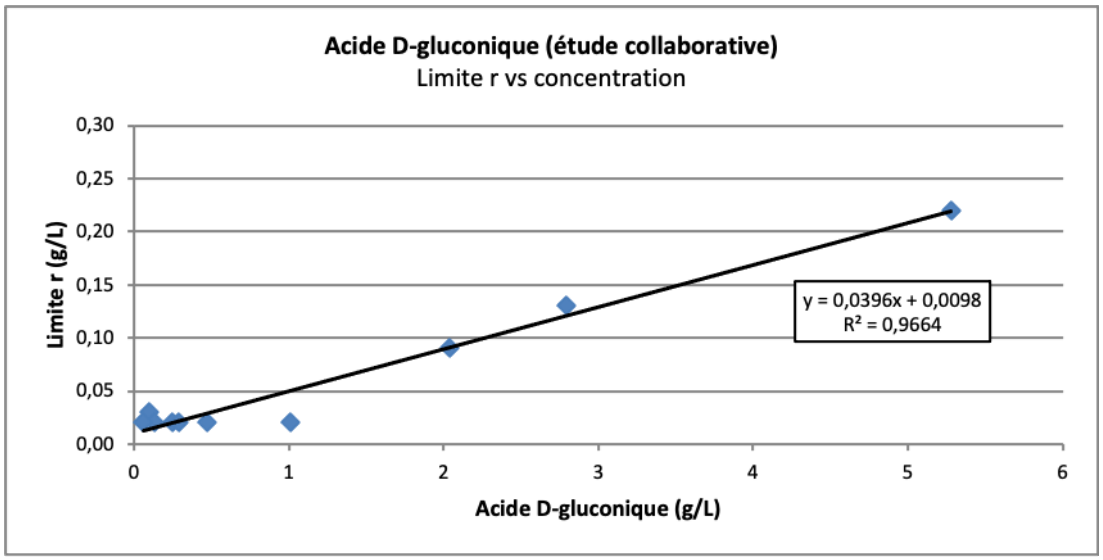


Figure 3 : limite de répétabilité en fonction de la concentration

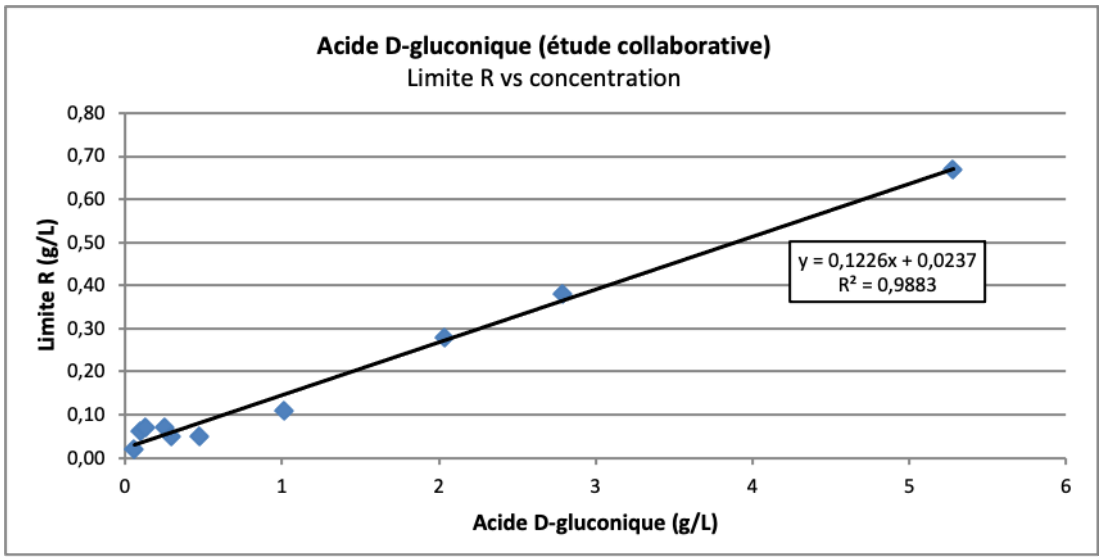


Figure 4 : limite de reproductibilité en fonction de la concentration

1.4 Résultats méthode manuelle

		A		B		C		D		E		F		G		H		I		J	
		1	**12**	**2**	**11**	**3**	**13**	**4**	**15**	**5**	**14**	**6**	**16**	**7**	**10**	**8**	**19**	**9**	**18**	**17**	**20**
	Rép. #1	2,05	2,09	1,06	0,99	0,25	0,25	0,34	0,33	*0,10*	*0,12*	2,85	2,84	5,32	5,34	0,14	0,13	0,45	0,46	0,05	0,05
2	Rép. #2	2,08	2,10	1,03	1,02	0,23	0,26	0,35	0,32	*0,09*	*0,10*	2,83	2,86	5,34	5,36	0,15	0,13	0,44	0,45	0,05	0,05
	$\overline{X}_{(2)}$	**2,07**	**2,10**	**1,05**	**1,01**	**0,24**	**0,26**	**0,35**	**0,33**	**0,10**	**0,11**	**2,84**	**2,85**	**5,33**	**5,35**	**0,15**	**0,13**	**0,45**	**0,46**	**0,05**	**0,05**
	Rép. #1	2,24	2,11	1,01	1,04	0,26	0,26	0,34	0,33	0,11	0,11	3,05	3,19	5,64	5,68	0,14	0,16	0,34	0,41	0,05	0,05
10	Rep #2	2,37	2,24	1,01	1,06	0,25	0,26	0,35	0,34	0,12	0,11	3,10	3,02	5,65	5,78	0,14	0,15	0,33	0,42	0,05	0,05
	$\overline{X}_{(10)}$	**2,31**	**2,18**	**1,01**	**1,05**	**0,26**	**0,26**	**0,35**	**0,34**	**0,12**	**0,11**	**3,08**	**3,11**	**5,65**	**5,73**	**0,14**	**0,16**	**0,34**	**0,42**	**0,05**	**0,05**
	Rép. #1	2,61	2,54	1,04	0,99	0,27	0,28	0,34	0,34	0,13	0,12	3,44	3,38	5,97	6,22	0,21	0,23	0,44	0,47	0,05	0,05
18	Rép. #2	2,57	2,54	0,97	1,01	0,28	0,28	0,35	0,35	0,12	0,12	3,32	3,42	6,04	6,31	0,21	0,21	0,51	0,53	0,05	0,05
	$\overline{X}_{(18)}$	**2,59**	**2,54**	**1,00**	**1,00**	**0,28**	**0,28**	**0,34**	**0,34**	**0,12**	**0,12**	**3,38**	**3,40**	**6,00**	**6,26**	**0,21**	**0,22**	**0,48**	**0,50**	**0,05**	**0,05**

Tableau des données obtenues. Les valeurs en italique correspondent à des résultats éliminés car aberrants selon le test de Grubbs simple bilatéral appliqué aux valeurs individuelles et le test de Grubbs double (bilatéral, P = 2,5 %) et selon le test de Cochran (unilatéral, P = 2,5 %

Échantillon	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Lab. acceptés	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Répétitions	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Valeur minimale	2,05	0,97	0,23	0,32	0,09	2,83	5,32	0,13	0,33	0,05
Valeur maximale	2,61	1,06	0,28	0,35	0,13	3,44	6,31	0,23	0,53	0,05
Valeur moyenne (g/L)	**2,29**	**1,02**	**0,26**	**0,34**	**0,11**	**3,11**	**5,72**	**0,17**	**0,44**	**0,05**
S_r	0,06	0,02	0,01	0,01	0,01	0,02	0,11	0,01	0,03	-
Limite r = 2□2* S_r	0,16	0,07	0,02	0,03	0,02	0,04	0,31	0,03	0,10	-
RSD_r	0,03 %	0,02 %	0,03 %	0,03 %	0,06 %	0,01 %	0,02 %	0,06 %	0,08 %	-
S reproductibilité (S_R)	0,25	0,02	0,02	0,01	0,01	0,27	0,41	0,04	0,06	-
Limite R = 2□2* S_R	0,70	0,07	0,05	0,03	0,03	0,77	1,14	0,12	0,17	-
RSD_R	0,11 %	0,02 %	0,06 %	0,03 %	0,10 %	0,09 %	0,07 %	0,26 %	0,14 %	-
Horwitz RSD_r (%)	3,33 %	3,76 %	4,62 %	4,44 %	5,24 %	3,18 %	2,90 %	4,94 %	4,27 %	-
$HorRat_r$	0,77	0,60	0,55	0,61	1,09	0,16	0,67	1,21	1,82	-
Horwitz RSD_R (%)	4,99 %	5,64 %	6,92 %	6,66 %	7,86 %	4,77 %	4,35 %	7,41 %	6,41 %	-
$HorRat_R$	2,18	0,42	0,93	0,47	1,30	1,85	1,63	3,46	2,22	-

S : écart-type / RSD : écart-type relatif / r : limite de répétabilité / R : limite de reproductibilité. Les paramètres statistiques ont été calculés en prenant en compte les résultats des trois laboratoires.

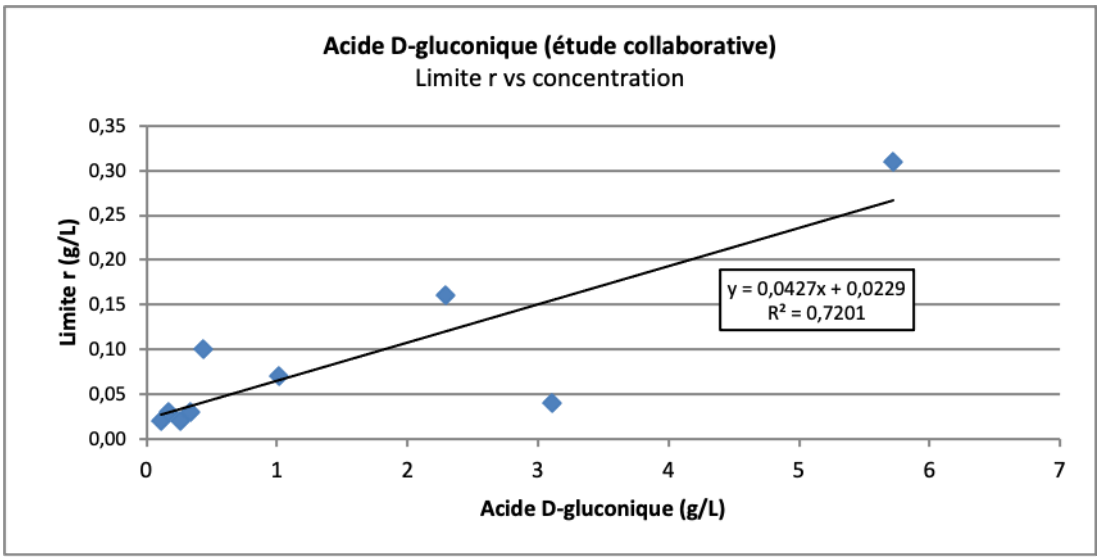


Figure 5 : limite de répétabilité en fonction de la concentration

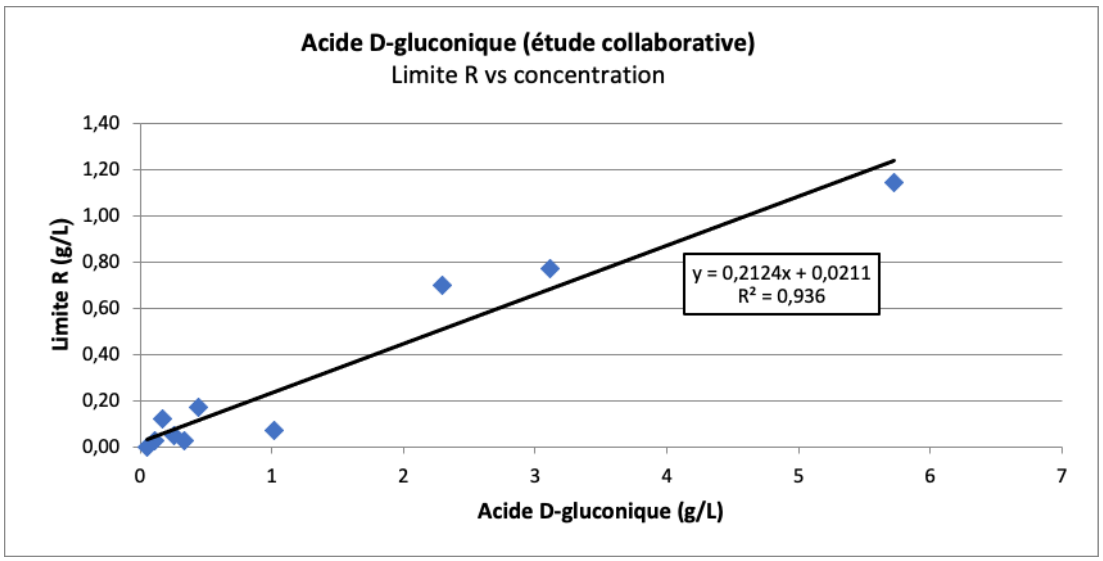


Figure 6 : limite de reproductibilité en fonction de la concentration

2. Bibliographie

Organisation internationale de la vigne et du vin (OIV), *Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts*. Vol. 1 et 2, 2019.

Organisation internationale de la vigne et du vin (OIV), « Étude collaborative », *Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts*, OIV-MA-AS1-07 : R2000.

Organisation internationale de la vigne et du vin (OIV), « Protocole pour la planification, la conduite et l'interprétation des études de performance des méthodes d'analyse », *Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts*, OIV-MA-AS1-09 : R2000.

ISO 13528:2015 (E), Protocol for the design, conducts and interpretation of collaborative studies, deuxième édition.

Zoecklein, B. W., Fugelsang, K. C., Gump, B. H., et Nury, F. S. *Wine analysis and production*, Van Nostrand Reinhold, 1ère édition, 31 décembre 1990.

Méthode OIV-MA-AS314-01 Méthode Type II

Dioxyde de carbone

avec une gamme de concentrationjusqu'à 1,5 g/L

(A39 modifiée par OENO 21/2003 et complété par la résolution OENO 3/2006 ; OIV/OENO 377/2009)

1. Principe de la méthode

1.1. Cas des vins tranquilles (surpression de CO_2 $\leq 0{,}5 \times 10^5$ Pa) [6]

Le volume de vin prélevé sur l'échantillon amené au voisinage de 0 °C est versé dans un excès suffisant de solution titrée d'hydroxyde de sodium pour avoir un pH de 10 - 11. On titre avec une solution acide en présence d'anhydrase carbonique. La teneur en dioxyde de carbone est déduite du volume versé pour passer de pH 8,6 (forme carbonate acide) à 4,0 (acide carbonique). Un titrage témoin effectué dans les mêmes conditions sur le vin décarboniqué permet de tenir compte du volume de solution d'hydroxyde de sodium consommé par les acides du vin.

1.2. Cas des vins pétillants et des vins mousseux

L'échantillon de vin à analyser est amené au voisinage de son point de congélation. Après soutirage d'un certain volume destiné à servir de témoin après décarbonication, on alcalinise le reste de la bouteille pour fixer tout le CO_2 sous forme de carbonate neutre. On titre avec une solution acide en présence d'anhydrase carbonique. La teneur en dioxyde de carbone est déduite du volume de solution acide versée pour passer de pH 8,6 (forme carbonate acide) à pH 4,0 (acide carbonique). Un titrage témoin effectué dans les mêmes conditions sur le vin décarboniqué permet de tenir compte du volume de solution d'hydroxyde de sodium consommé par les acides du vin.

2. Description de la méthode

2.1. *Cas des vins tranquilles*

(surpression de dioxyde de carbone $\leq 0{,}5 \times 10^5$ Pa).

[6] 1 bar = 10^5 Pascal (Pa)

2.1.1. Appareillage

- Agitateur magnétique
- pH mètre.

2.1.2. Réactifs

- Solution d'hydroxyde de sodium 0,1 M.
- Solution d'acide sulfurique 0,05 M.
- Solution d'anhydrase carbonique à 1 gramme par litre.

2.1.3. Mode opératoire

Refroidir l'échantillon de vin aux environs de 0 °C ainsi que la pipette de 10 ml servant à son prélèvement.

Prélever dans un vase cylindrique de 100 ml, 25 ml de solution 0,1 M d'hydroxyde de sodium ; ajouter 2 gouttes de solution aqueuse d'anhydrase carbonique à 1 g par litre. Y introduire 10 ml de vin au moyen de la pipette refroidie à 0 °C.

Placer le vase cylindrique sur l'agitateur magnétique, mettre en place l'électrode et le barreau magnétique et procéder à une agitation modérée.

Lorsque le liquide est revenu à la température ambiante, verser par affusion lente la solution 0,05 M d'acide sulfurique jusqu'à pH 8,6.

Continuer les affusions d'acide sulfurique 0,05 M jusqu'à pH 4,0. Soit n ml le volume utilisé entre pH 8,6 et 4,0.

Procéder par ailleurs à l'élimination du CO_2 sur 50 ml environ de l'échantillon de vin par agitation sous vide pendant 3 minutes, en réchauffant la fiole dans un bain d'eau à 25 °C environ.

Appliquer sur 10 ml de vin décarboniqué le mode opératoire ci-dessus : soit n' ml le volume utilisé.

2.1.4. Expression des résultats

1 ml de solution titrée d'acide sulfurique 0,05 M correspond à 4,4 mg de dioxyde de carbone.

La quantité de dioxyde de carbone, en grammes par litre de vin, est donnée par :

$$0{,}44\ (n - n').$$

Elle est exprimée avec 2 décimales.

Remarque : Dans le cas des vins peu chargés en CO_2 ($CO_2 < 1$ g/l), l'addition d'anhydrase carbonique pour catalyser l'hydratation du CO_2 n'est pas nécessaire.

2.2. *Cas des vins pétillants et des vins mousseux*

2.2.1. Appareillage

- Agitateur magnétique.
- pH mètre.

2.2.2. Réactifs

- Solution d'hydroxyde de sodium à 50 p. 100 (m/m).
- Solution d'acide sulfurique 0,05 M.
- Solution d'anhydrase carbonique à 1 gramme par litre.

2.2.3. Mode opératoire

Sur la bouteille de vin à analyser, tracer un repère au niveau du remplissage et la refroidir jusqu'à début de congélation.

Laisser la bouteille se réchauffer légèrement, tout en l'agitant, jusqu'à disparition des cristaux de glace.

Déboucher rapidement et mettre de côté, dans une éprouvette graduée, 45 à 50 ml de vin qui serviront au dosage témoin. Le volume exact de ce prélèvement, *v* ml, sera déterminé par lecture sur l'éprouvette après son retour à la température ambiante.

Ajouter, sitôt le prélèvement effectué, 20 ml de solution d'hydroxyde de sodium à 50 p. 1000 dans la bouteille pour une contenance de 750 ml.

Attendre que le vin soit revenu à la température ambiante.

Placer dans un vase cylindrique de 100 ml, 30 ml d'eau distillée bouillie et 2 gouttes de la solution d'anhydrase carbonique à 1 g/l. Y ajouter 10 ml de vin alcalinisé.

Placer le vase sur l'agitation magnétique, mettre en place l'électrode et le barreau magnétique et procéder à une agitation modérée.

Verser par affusion lente la solution d'acide sulfurique 0,05 M jusqu'à pH 8,6.

Continuer les affusions d'acide sulfurique 0,05 M jusqu'à pH 4,0. Soit *n* ml le volume utilisé entre pH 8,6 et 4,0.

Procéder par ailleurs à l'élimination du CO_2 sur les *v* ml de vin, mis à côté pour le dosage témoin, par agitation sous vide pendant 3 minutes, en réchauffant la fiole dans un bain d'eau à 25 °C environ. Prélever 10 ml de vin décarboniqué dans 30 ml d'eau distillée bouillie, ajouter 2 à 3 gouttes de solution d'hydroxyde de sodium 50 p. 100 pour amener le pH à 10-11. Appliquer ensuite le mode opératoire ci-dessus. Soit *n'* ml, le volume d'acide sulfurique 0,05 M versé.

2.2.4. Expression des résultats

1 ml de solution d'acide sulfurique 0,05 M correspond à 4,4 mg de dioxyde de carbone.
Vider la bouteille de son vin alcalinisé et déterminer à 1 ml près le volume initial du vin en la remplissant avec de l'eau jusqu'au trait de repère, soit V ml.
La quantité de dioxyde de carbone en grammes par litre de vin est donnée par :

$$0{,}44\ (n - n')\ \text{x}\ \frac{V - v + 20}{V - v}$$

Elle est exprimée avec 2 décimales.

2.3. *Calcul de la surpression théorique*

La surpression à 20 °C, $Paph_{20}$, exprimée en Pascals, est donnée par la formule :

$$Paph_{20} = \frac{Q}{1{,}951 \times 10^{-5}\,(0{,}86 - 0{,}01A)\,(1 - 0{,}00144\,S)} - Patm$$

avec :
Q = Teneur en grammes de CO_2 par litre de vin
A = Titre alcoométrique du vin à 20 °C
S = Teneur en sucres du vin en grammes par litre
Patm = Pression atmosphérique, exprimée en Pascals

2.4 *Remarque*

Le mode opératoire ci-dessous peut être employé *à titre usuel* pour des vins contenant moins de 4 g par litre de dioxyde de carbone.
Il est nécessaire de disposer de deux échantillons du vin à analyser.

Ouvrir l'un des échantillons après l'avoir refroidi aux environs de 5 °C et ajouter immédiatement 5 ml d'une solution d'hydroxyde de sodium à 50% (m/m), pour 275 ml d'échantillon. Boucher aussitôt et mélanger. Prélever 10 ml de vin ainsi traité dans un vase cylindrique contenant 40 ml d'eau et ajouter 3 gouttes de solution d'anhydrase carbonique à 0,1 g/l. Titrer avec une solution d'acide sulfurique 0,02275 M jusqu'à pH 8,6, puis jusqu'à pH 4,0 et relever le volume versé entre pH 8,6 et 4,0, soit *n* ml.
Procéder par ailleurs à l'élimination du dioxyde de carbone sur 25 ml environ de vin, prélevés sur le deuxième échantillon, par agitation sous vide durant 1 min. dans un flacon de 500 ml contenant III gouttes de solution d'anhydrase carbonique. Ajouter 0,33 ml de solution d'hydroxyde de sodium à 50% (m/m). Appliquer sur 10 ml de vin décarboniqué le mode opératoire ci-dessus. Soit *n'* ml le volume utilisé, 1 ml H_2SO_4 0,02275 M correspond à 200 mg de dioxyde de carbone par litre.

Teneur du vin analysé en dioxyde de carbone, en milligrammes par litre :

$$(n - n') \times 200 \times 1{,}013$$

BIBLIOGRAPHIE

Méthode de référence :

CAPUTI A, UEDA M., WALTER P, & BROWN T., *Amer, J, Enol, Vitic.,* 1970, **21,** 140-144,
SUDRAUD P., *F., O.I.V.,* 1973, n° 350,
GORANOV N., *F.V., O.I.V.,* 1983, n° 758,
BRUN S, & TEP Y., *F.V., O.I.V.,* 1981, n° 736 & 1982, n° 736 (bis),

- Etude collaborative -

Titrage du dioxyde de carbone dans les vins pétillants et mousseux
- Rapport sur les résultats obtenus-

Objectif de l'étude

L'objectif de l'étude est de déterminer les caractéristiques de répétabilité et de reproductibilité de la méthode de référence (MA-F-AS314-01-DIOCAR) pour le titrage du CO_2 dans les vins pétillants et mousseux.
Les définitions de l'OIV et les limites de CO_2 sont disponible dans la résolution OENO 1/2002.

Besoins et objectifs de l'étude

La méthode de référence pour le titrage du CO_2 n'incluant pas des données de précision, c'est à cette fin que ces essais collaboratifs ont été menés.
En raison de la particularité analytique de cette méthode, le protocole de validation conventionnel n'a pas pu être complètement respecté. Sur une bouteille d'échantillon, on n'a pu effectuer qu'une seule détermination indépendante. Chaque bouteille a dû être considérée comme individuelle. Il n'a donc pas été possible de procéder aux essais d'homogénéité prévus d'ordinaire dans le cadre des enquêtes préliminaires d'une étude collaborative. Il a donc fallu travailler en étroite collaboration avec les producteurs afin d'avoir un matériau d'essai homogène.
Les échantillons ont été prélevés dans un lot au cours du remplissage des bouteilles, directement sur la ligne de remplissage dans un court intervalle de temps, en supposant donc que le CO_2 avait été distribué de manière homogène dans toutes les bouteilles.
L'étude a été conçue comme une série de répétitions en aveugle . L'anonymat complet des échantillons n'a pas pu être garanti car les partenaires/producteurs impliqués dans l'étude utilisaient différents types de bouteilles et/ou d'obturateurs pour les différents échantillons. Il a donc fallu se fier à l'honnêteté des laboratoires participant à l'étude à qui on a demandé de réaliser une analyse indépendante des données, sans modification de ces données.

Objet et domaine d'application

1. La méthode est quantitative.

2. la méthode est applicable pour le titrage alcoométrique du CO_2 dans les vins pétillants et mousseux pour vérifier le respect des normes.

Matériaux et matrices

L'étude collaborative a porté sur 6 échantillons différents. Ceux-ci ont tous été envoyés en répliques en aveugle. Au total 12 bouteilles ont donc été distribuées aux participants.

Tableau 1 : Echantillons et codes

Echantillon	Code bouteille	Type
Echant. A	(Code 1 + 9)	Vin mousseux
Echant. B	(Code 2 + 5)	Vin pétillant
Echant. C	(Code 3 + 4)	Vin mousseux
Echant. D	(Code 6 + 10)	Vin pétillant
Echant.E	(Code 7 + 11)	Vin pétillant
Echant. F	(Code 8 + 12)	Vin mousseux (rouge)

Mesures de contrôle

La méthode étudiée dans le présent document est déjà approuvée dans la pratique. Seules les données de précision manquantes devaient être déterminées par l'étude collaborative. Il n'a pas été nécessaire d'effectuer d'essai préliminaire car la plupart des laboratoires utilisaient déjà la méthode de référence pour leurs analyses usuelles.

Méthode à suivre et pièces justificatives

Toutes les pièces justificatives nécessaires ont été fournies aux participants (lettre d'accompagnement, référence de la méthode d'analyse, formulaire de réception de l'échantillon et fiche de résultats). La détermination de la teneur de CO_2 devait être exprimée en g/l.

Analyse des données

1. La détermination des valeurs aberrantes a été évaluée par le test de Cochran, le test de Grubbs unilatéral et le test de Grubbs bilatéral.
2. Une analyse statistique a été effectuée pour obtenir les données de répétabilité et reproductibilité
3. Les valeurs de HORRAT ont été calculées.

Participants

13 laboratoires appartenant à plusieurs pays ont participé à l'étude collaborative. On a attribué un code à chaque laboratoire. Les laboratoires participants ont une expérience reconnue dans l'analyse du CO_2 dans les vins mousseux.

Tableau 2 : Liste des participants.

Landesuntersuchungsamt D-56068 Koblenz (Coblence) ALLEMAGNE	Institut für Lebensmittelchemie und Arzneimittelprüfung D-55129 Mainz (Mayence) ALLEMAGNE
Landesuntersuchungsamt D-67346 Speyer ALLEMAGNE	Institut für Lebensmittel, Arzneimittel und Tierseuchen D-10557 BERLIN ALLEMAGNE
Servicio Central de Viticultura y Enologia E-08720 Villafranca Del Pendes ESPAGNE	Landesuntersuchungsamt D-54295 Trier (Trèves) ALLEMAGNE
Landesuntersuchungsamt D-85764 Oberschleißheim ALLEMAGNE	Instituto Agrario di S. Michele I-38010 S. Michele all Adig ITALIE
Chemisches Landes- u. Staatl. Veterinäruntersuchungsamt D-48151 Münster ALLEMAGNE	Ispettorato Centrale Repressione Frodi I-31015 Conegliano (Treviso) ITALIE
Bundesamt für Weinbau A-7000 Eisenstadt AUTRICHE	BgVV D-14195 Berlin ALLEMAGNE
Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt D-70736 Fellbach ALLEMAGNE	

9. Résultats

Pour la détermination du CO_2 les valeurs d'incertitude sont calculées directement à partir des résultats soumis. Aux fins de l'évaluation de l'étude collaborative, le calcul de la valeur Horrat est pertinent. Pour tous les échantillons on a obtenu une valeur Horrat < 2 pour la reproductibilité et la répétabilité, ce qui est convaincant pour une étude collaborative. Le Tableau 3 donne les résultats du titrage de CO_2 par échantillon.

Tableau 3 : Résumé des résultats du titrage de CO_2.

CO_2	ECHANT. A	ECHANT. B	ECHANT. C	ECHANT. D	ECHANT. E	ECHANT. F
Moyenne[g/l]	9,401	3,344	9,328	4,382	4,645	8,642
r [g/l]	0,626	0,180	0,560	0,407	0,365	0,327
sr [g/l]	0,224	0,064	0,200	0,145	0,130	0,117
RSDr %	2,379	1,921	2,145	3,314	2,803	1,352
Hor	0,893	0,617	0,804	1,109	0,946	0,501
R [g/l]	1,323	0,588	0,768	0,888	0,999	0,718
sR [g/l]	0,473	0,210	0,274	0,317	0,357	0,256
RSDR %	5,028	6,276	2,942	7,239	7,680	2,967
HoR	1,245	1,331	0,728	1,599	1,711	0,726

Méthode OIV-MA-AS314-02 Méthode Type I

Methode de mesure de la surpression des vins effervescents

(OENO 21/2003 ; OIV/OENO 377/2009)

1. PRINCIPE

Après stabilisation thermique et agitation de la bouteille, la surpression est mesurée à l'aide d'un aphromètre (jauge de pression). Elle est exprimée en Pascals (Pa) (méthode de type I).

2. APPAREILLAGE

L'appareil permettant la mesure de la surpression dans les bouteilles de vins mousseux et pétillants s'appelle un aphromètre. Il se présente différemment suivant le bouchage de la bouteille (capsule métallique, couronne, bouchon liège ou plastique).

2.1 Pour les bouteilles munies d'une capsule

Il est constitué de trois parties (figure 1):

- La partie supérieure (ou vis porte-aiguille) est composée du manomètre, d'une bague de serrage manuel, d'une vis sans fin qui coulisse dans la partie moyenne, et d'une aiguille qui traverse la capsule. L'aiguille possède un trou latéral qui communique la pression au manomètre. Un joint assure l'étanchéité de l'ensemble sur la capsule de la bouteille.
- La partie moyenne (ou écrou) sert à centrer la partie supérieure. Elle se visse dans la partie inférieure de manière à maintenir fortement l'ensemble sur la bouteille.
- La partie inférieure (ou étrier) est munie d'un ergot qui se glisse sous la bague de la bouteille, de manière à retenir l'ensemble. Il existe des bagues adaptées à chaque type de bouteille.

2.2 Pour les bouteilles munies d'un bouchon

Il est constitué de deux parties (figure 2):

- La partie supérieure est identique à l'appareil précédent ; toutefois, l'aiguille est plus longue. Cette dernière est formée d'un long tube creux au bout duquel est placée une pointe qui aidera à traverser le bouchon. Cette pointe est amovible, elle tombe dans le vin une fois le bouchon traversé.
- la partie inférieure est formée par l'écrou et d'une base venant reposer sur le bouchon. Celle-ci est munie de quatre vis de serrage servant à maintenir l'ensemble sur le bouchon.

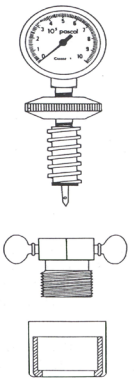


Figure1
Aphromètre
pour capsules

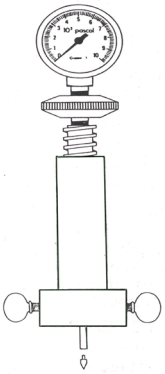


Figure 2
Aphromètre
pour bouchons

Remarques concernant les manomètres équipant ces deux types d'appareil :

- *Ils peuvent être soit mécaniques à tube de Bourdon, soit numériques à capteur piézoélectrique. Dans le premier cas, le tube de Bourdon sera obligatoirement en acier inoxydable.*
- *Ils sont gradués en pascals (abréviation Pa). Pour les vins mousseux, il est plus pratique d'utiliser le 10^5 pascals (10^5 Pa) ou le kilopascal (kPa) comme unité.*
- *Ils peuvent être de différentes classes. La classe d'un manomètre est la précision de la lecture par rapport à la pleine échelle exprimée en pourcentage (ex. manomètre 1000 kPa classe 1, signifie pression d'utilisation maximale 1000 kPa, lecture à ± 10 kPa). La classe 1 est recommandée pour des mesures précises.*

3. MODE OPERATOIRE

La mesure doit s'effectuer sur des bouteilles dont la température est stabilisée depuis au moins 24 heures.
Après avoir percé la couronne, le bouchon de liège ou de plastique, la bouteille doit alors être fortement agitée jusqu'à pression constante, pour effectuer la lecture.

3.1 Cas des bouteilles capsulées

Glisser l'ergot de l'étrier sous la bague de la bouteille. Visser l'écrou jusqu'à ce que l'ensemble soit serré sur la bouteille.
La partie supérieure est alors vissée dans l'écrou. Pour éviter des pertes de gaz le percement de la capsule doit s'effectuer le plus rapidement possible, pour amener le joint au contact de la capsule. La bouteille doit être ensuite fortement agitée jusqu'à pression constante pour effectuer la lecture.

3.2 Cas des bouteilles bouchées

Mettre une pointe en place au bout de l'aiguille. Positionner l'ensemble du montage sur le bouchon. Serrer les quatre vis sur le bouchon.
Visser la partie supérieure (l'aiguille traverse alors le bouchon). La pointe doit tomber dans la bouteille pour que la pression puisse se transmettre au manomètre. Effectuer la lecture après agitation de la bouteille jusqu'à pression constante. Récupérer la pointe après lecture.

4. EXPRESSION DES RESULTATS

La surpression à 20 °C ($Paph_{20}$) est exprimée en pascals (Pa) ou en kilopascals (kPa).
Elle doit être en concordance avec la précision du manomètre (par exemple: $6{,}3\ 10^5$ Pa ou 630 kPa et non $6{,}33\ 10^5$ Pa ou 633 kPa pour un manomètre 1000 kPa pleine échelle, de classe 1).
Quand la température de mesure est différente de 20 °C, il convient d'apporter une correction en multipliant la pression mesurée par le coefficient approprié (voir tableau 1).

0	1,85	13	1,24
1	1,80	14	1,20
2	1,74	15	1,16
3	1,68	16	1,13
4	1,64	17	1,09
5	1,59	18	1,06
6	1,54	19	1,03
7	1,50	20	1,00
8	1,45	21	0,97
9	1,40	22	0,95
10	1,36	23	0,93
11	1,32	24	0,91
12	1,28	25	0,88

TABLEAU 1 : Rapport de la surpression $Paph_{20}$ d'un vin pétillant ou mousseux à 20 °C à la surpression $Paph_t$ à une température *t*

5. CONTRÔLE DES RESULTATS

Méthode de détermination directe de paramètres physiques (méthode critère de type I)

Vérification des aphromètres

Les aphromètres doivent être vérifiés régulièrement (au moins une fois par an).
La vérification se fait à l'aide d'un banc d'étalonnage. Il permet de comparer le manomètre à tester à un manomètre de référence, de classe supérieure, raccordé aux étalons nationaux, monté en parallèle. Le contrôle est utilisé pour confronter les valeurs indiquées par les deux appareils pour des pressions croissantes puis décroissantes. S'il y a une différence entre les deux, une vis de réglage permet d'effectuer les corrections nécessaires.
Les laboratoires et les organismes autorisés sont tous équipés de tels bancs d'étalonnage; ils sont également disponibles auprès des constructeurs de manomètres.

Méthode OIV-MA-AS314-03 Méthode Type II

Détermination du rapport isotopique $^{13}C/^{12}C$ du CO_2 dans les vins mousseux
Méthode employant la spectrométrie de masse de rapport isotopique (SMRI)

(Résolution OENO 7/2005
OIV/OENO 377/2009
OIV-OENO 512-2014)

Avant-propos

La méthode standard décrite ci-après a été élaborée avec le consentement de tous les laboratoires participant à l'étude collective de l'OIV : Analyses ^{13}C-SMRI du CO_2 dans le vin mousseux (2003-2004).

Introduction

Le vide, dans une bouteille de vin mousseux, contient une phase gazeuse riche en CO_2, équilibrée avec le CO_2 dissous en phase liquide. Ce gaz évolue durant la seconde fermentation, sous l'effet de l'ajout du sucre provenant de raisin, de betterave, de canne à sucre ou de maïs. Mais la teneur en CO_2 des vins mousseux peut aussi être augmentée artificiellement au moyen de CO_2 industriel.

En 1997, une méthode autonome de détermination du rapport isotopique $^{13}C/^{12}C$ du CO_2 de vins mousseux par spectrométrie de masse des isotopes (SMRI) a été présentée à l'OIV. Cette méthode a par la suite généré de nouvelles procédures fondées sur des techniques automatisées en ligne, conçues dans certains laboratoires européens. Une de ces procédures a été présentée à l'OIV en 2001. Ces prochaines années, les progrès techniques pourraient fort bien conduire à de nouvelles procédures permettant de déterminer, de façon fiable et rapide, le rapport isotopique $^{13}C/^{12}C$ de nombreux échantillons de CO_2. Une description exhaustive de toutes les procédures applicables aux différentes techniques risque de faire tomber rapidement la méthode en désuétude. La méthode suivante tient compte de ce fait : elle décrit les principes de base pour une bonne mesure de la teneur en carbone 13 du CO_2 procédant de vin mousseux et fournit un bref aperçu des procédures utilisées aujourd'hui, accompagné d'une description exhaustive, à base d'exemples, des procédures fondées sur des techniques hors-ligne et en ligne.

1. Champ d'application

Cette méthode détermine, par la spectrométrie de masse des isotopes (SMRI), le rapport isotopique stable du carbone ($^{13}C/^{12}C$) du CO_2 dans les vins mousseux. Cette méthode couvre une vaste gamme de procédures, dont l'application est fonction des instruments disponibles.

2. Références normatives

ISO 5725-2:1994 « Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure. Partie 2 : méthode de base pour la détermination de la répétabilité et la reproductibilité d'une méthode de mesure standard ».

ISO 78-2:1999 « Chimie – Plans de normes. Partie 2 : méthodes d'analyse chimique ».

3. Définitions

$^{13}C/^{12}C$: Rapport des isotopes du carbone 13 et du carbone 12 pour un échantillon donné.

$\delta^{13}C$: Teneur en carbone 13 (^{13}C) exprimée en parties pour mille (‰).

V-PDB : Vienna-Pee-Dee Belemnite. Le standard PDB est un carbonate de calcium fossile de la Caroline du sud, aux États-Unis d'Amérique, présentant le rapport isotopique ($^{13}C/^{12}C$ ou R_{PDB}) = 0,0112372. Cette valeur sert de point de référence à l'échelle PDB internationale commune pour les valeurs $\delta^{13}C$ exprimées en parties pour mille (‰).

m/z : Rapport masse sur charge.

S_r : Écart-type de répétabilité. Écart-type observé dans les résultats d'essais conduits sous des conditions de répétabilité (conditions permettant d'obtenir des résultats d'essais conduits indépendamment avec la même méthode à partir d'échantillons identiques, dans le même laboratoire et avec le même opérateur utilisant le même matériel à de brefs intervalles de temps).

r : Limite de répétabilité. Valeur inférieure ou égale à la différence absolue entre deux résultats d'essais obtenus sous des conditions de répétabilité, avec une probabilité de 95 % ; $r=2,8 \cdot S_r$.

S_R : Écart-type de reproductibilité. Écart-type observé dans les résultats d'essais conduits sous des conditions de reproductibilité (conditions permettant d'obtenir des résultats d'essais conduits avec la même méthode à partir d'échantillons identiques, dans des laboratoires différents et avec des opérateurs différents utilisant un matériel différent).

R : Limite de reproductibilité. Valeur inférieure ou égale à la différence absolue entre deux résultats d'essais obtenus sous des conditions de reproductibilité, avec une probabilité de 95 % ; $r=2,8 \cdot S_R$.

4. Principe

Les plantes sont classées C3 ou C4 en fonction de l'itinéraire suivi par la synthèse du sucre. Le sucre des plantes C3, telles le raisin et la betterave, présente une teneur en ^{13}C inférieure à celle du sucre de plantes comme la canne à sucre et le maïs. Cette différence est préservée dans la teneur en ^{13}C des produits de fermentation de sucres, tels l'éthanol et le CO_2. En outre, le CO_2 industriel employé dans l'industrie alimentaire, qui procède de la combustion de combustibles fossiles ou du traitement thermique de carbonate, présente une teneur en ^{13}C différente de celle des produits issus de plantes C3 et C4. En conséquence, le rapport isotopique $^{13}C/^{12}C$ du CO_2 des vins mousseux est régi par le type de sucre employé durant la seconde fermentation (C3 ou C4) ou par la composition isotopique du CO_2 industriel ajouté.

Les études conduites à ce jour sur la teneur en ^{13}C du CO_2 des vins mousseux ont révélé que le CO_2 obtenu par fermentation du sucre de plantes C3 présentait une $\delta^{13}C$ de -17 ‰ à -26 ‰, alors que le CO_2 obtenu par fermentation du sucre de plantes C4 avait une $\delta^{13}C$ de l'ordre de -7 ‰ à -10 ‰. Les vins gazéifiés ont un rapport isotopique $^{13}C/^{12}C$ inférieur à -29 ‰ ou supérieur à -10 ‰, en fonction de la source de bioxyde de carbone[1-4]. En conséquence, la mesure du rapport isotopique stable du carbone ($^{13}C/^{12}C$) de CO_2 dans les vins mousseux peut constituer une bonne méthode pour détecter l'origine du gaz.

La teneur en ^{13}C est déterminée à partir du bioxyde de carbone obtenu d'un vin mousseux. Les différentes combinaisons possibles des isotopes ^{18}O, ^{17}O, ^{16}O et ^{13}C, ^{12}C génèrent le nombre de masse 44 correspondant à l'isotopomère $^{12}C^{16}O_2$, le nombre de masse 45 correspondant aux espèces $^{13}C^{16}O_2$ et $^{12}C^{17}O^{16}O$ et le nombre de masse 46 correspondant à l'isotopomère $^{12}C^{16}O^{18}O$ ($^{13}C^{17}O^{16}O$ et $^{12}C^{17}O_2$ peuvent être ignorés en raison de leur très faible abondance). Les courants ioniques correspondants sont déterminés sur les trois différents collecteurs. Le courant ionique m/z 45 est corrigé de la contribution de $^{12}C^{17}O^{16}O$, calculée en fonction de l'intensité du courant mesurée pour m/z 46, en considérant les abondances relatives

de ^{18}O et de ^{17}O (correction de Craig). La comparaison avec une référence calibrée contre la référence internationale V-PDB autorise alors le calcul de la teneur en ^{13}C sur l'échelle relative $\delta^{13}C$ ‰.

5. Réactifs

Les matériaux et consommables sont fonction de l'appareillage employé dans le laboratoire.

Lorsque la séparation et la purification des échantillons de CO_2 sont exécutées par cryopiégeage dans une ligne de vide, les réactifs suivants sont employés :

- Azote liquide
- Éthanol
- CO_2 solide

En général, les consommables suivants sont employés pour l'analyse avec un système à flux continu (EA-SMRI ou GC-C-SMRI). D'autres matériaux de qualité analogue peuvent remplacer l'un ou l'autre des produits recensés :

- Hélium pour analyse (CAS 07440-59-7).
- Oxygène pour analyse (CAS 07782-44-7).
- Bioxyde de carbone pour analyse, utilisé comme gaz de référence secondaire pour la teneur en carbone 13 (CAS 00124-38-9).
- Réactif d'oxydation pour le four du système de combustion – ex. : oxyde de cuivre pour micro-analyse (CAS 1317-38-0).
- Desséchant pour l'élimination de l'eau produite par la combustion – ex. : perchlorate de magnésium pour micro-analyse (CAS 10034-81-4). Inutile lorsque le système EA-SMRI ou GC-C-SMRI élimine l'eau par cryopiégeage.
- Colonne capillaire et membrane Naphion pour l'élimination de l'eau produite par la combustion dans les systèmes GC-C-SMRI.

Le gaz de référence employé dans les mesures peut être un gaz certifié ou un gaz de travail calibré par rapport aux références internationales avec des valeurs delta connues (gaz certifiés ou matériaux de référence). Ci-après figure une liste de quelques-uns des matériaux de référence internationaux pouvant être employés pour le réglage d'étalons gazométriques et le contrôle des étalons gazométriques :

Code échantillon	Matériau	$\delta^{13}C_{PDB}$	
IMEP-8-A	CO_2	-6,40 ‰	Messer Griesheim
ISO-TOP	CO_2	-25,7 ‰	Messer Griesheim
BCR-656	Éthanol	-20,91 ‰	IRMM
BCR-657	Glucose	-10,76 ‰	IRMM
SAI-692C	CO_2	-10,96 ‰	Oztech Trading Corporation (USA)
NBS-22	Huile	-29,7 ‰	IAEA
IAEA-CH-6 (ANU)	Sucrose	-10,4 ‰	IAEA
NBS-18	Calcite	-5,1 ‰	IAEA
NBS-19	Calcaire sec	+1,95 ‰	IAEA
FID-Mix Varian	mélange de n-alcanes dans de l'isooctanol		
	C14	-29,61 ‰	
	C15	-25,51 ‰	
	C16	-33,39 ‰	

6. Appareillage

L'appareillage de laboratoire pour la mesure du rapport isotopique du carbone consiste généralement en ce qui suit :

– Spectromètre de masse de rapport isotopique (SMRI), capable de déterminer la teneur en ^{13}C du CO_2 en abondance naturelle, à un degré de précision interne d'au moins 0,05 ‰ (exprimé en valeur relative δ). La précision interne se définit ici comme étant la différence entre deux mesures du même échantillon de CO_2.

  Le spectromètre de masse est généralement équipé d'un triple collecteur permettant de mesurer simultanément les intensités de courant de m/z 44, 45 et 46. Le spectromètre de masse doit en outre, soit être équipé d'un système d'introduction double, autorisant la mesure en alternance de l'échantillon inconnu et d'un échantillon de référence, soit appliquer une technique à flux continu (CF-SMRI).

– Systèmes à flux continu (CF-SMRI). Des systèmes à flux continu appliquant un système automatisé d'échantillonnage de gaz peuvent être employés. Ci-dessous figure une liste de quelques techniques CF-SMRI adaptées à la présente méthode et disponibles dans le commerce :

- GC-C-SMRI (Chromatographie en phase gazeuse – combustion – SMRI).
- EA-SMRI (Analyseur élémentaire équipé pour les injections liquides ou solides).

Ces systèmes séparent et purifient le CO_2, puis éluent le bioxyde de carbone vers la chambre d'ionisation du spectromètre.

- Gaz Sampler-IRMS. Un dispositif périphérique peut être utilisé pour la préparation de gaz en ligne, l'isolement du CO_2 et l'introduction de CO_2 dans le spectromètre de masse de rapport isotopique.
- Ligne de vide en verre ou en acier, avec des cryopièges, reliée à une pompe capable d'atteindre une pression inférieure à $5{,}10^{-3}$ mbar.
- Dispositifs d'échantillonnage de gaz, disponibles dans le commerce (ex. : seringue pour échantillons gazeux) ou conçus en interne, capables d'extraire une aliquote de CO_2 d'un vin mousseux sans fractionnement isotopique.
- Flacons scellés pour les échantillons gazeux, adaptés au passeur automatique d'échantillons vers les systèmes à flux continu.
- Flacons scellés pour les aliquotes de vin mousseux, adaptés à la ligne de vide et/ou au passeur automatique d'échantillons vers les systèmes à flux continu.

7. Procédure

La méthode proposée compte trois étapes : échantillonnage du CO_2, purification et séparation du CO_2 et mesure du rapport $^{13}C/^{12}C$. Ces étapes peuvent être totalement indépendantes (système autonome) ou intégralement ou partiellement interconnectées (système continu). Toute procédure permettant d'éviter le fractionnement isotopique de l'échantillon de CO_2 durant les trois étapes de la méthode pourra être appliquée. Des informations complémentaires sur les procédures fondées sur des systèmes autonomes et continus sont fournies aux Annexes A, B et C.

La description ci-après renvoie aux procédures appliquées par les laboratoires participant à l'essai inter-laboratoires.

7.1. Procédures d'échantillonnage de CO_2

a. Échantillonnage du CO_2 à température ambiante dans le vide de la bouteille, par insertion d'un dispositif spécial à travers le bouchon.

b. Échantillonnage du CO_2 dans le vide de la bouteille après extraction du bouchon et étanchéification de la bouteille au moyen d'un mécanisme de fermeture de précision, imperméable au gaz, relié au dispositif d'échantillonnage. La bouteille de vin mousseux doit être refroidie en-deçà de 0° C avant l'installation du mécanisme de fermeture, puis réchauffée à température ambiante . Une aliquote de gaz collectée dans le dispositif d'échantillonnage est prélevée au moyen d'une seringue étanche au gaz et injectée dans un flacon CG scellé.

c. Échantillonnage du CO_2 dans une aliquote de vin mousseux. La bouteille de vin mousseux doit être refroidie à 4º-5º C avant l'extraction du bouchon. Les aliquotes de vin sont disposées dans une bouteille spéciale, adaptée à la ligne de vide en verre ou au passeur automatique d'échantillons.

d. L'échantillon est réfrigéré à 4-5 °C, le liquide est ensuite rapidement transféré dans un flacon et scellé avec un bouchon à septum téflon-silicone. Puis 50 □L de liquide est transféré dans un flacon de 10 ml et analysé. Si nécessaire, le flacon doit être rempli avec de l'hélium afin d'éliminer le CO_2 atmosphérique.

e. Après réfrigération de l'échantillon, la bouteille est ouverte à température ambiante et 200 µL de liquide sont prélevés à l'aide d'une pipette et placés dans les flacons adaptés. Les flacons sont immédiatement refermés puis passés 10 min dans un bain à ultra son avant l'analyse.

Les résultats statistiques de l'essai inter-laboratoires pour les procédures d'échantillonnage 7.1.d et 7.1.e sont donnés en ANNEXE E

7.2. Procédures de purification et de séparation du CO_2

a. Les gaz non condensés et l'eau présents dans l'échantillon gazeux sont éliminés dans une ligne de vide au moyen de cryopièges.

b. Les échantillons gazeux sont purifiés et le CO_2 est séparé par différents systèmes continus reliés au SMRI au moyen d'un système à flux continu ou d'un cryopiège. Les systèmes continus pouvant être utilisés sont, entre autres, les suivants :

- cryopiège à eau autonome, relié à un système à flux continu,
- piège à eau (perchlorate de magnésium), suivi d'un chromatographe en phase gazeuse,
- chromatographe en phase gazeuse, relié directement ou indirectement au SMRI ou via une interface de combustion.

7.3. Mesure du ratio $^{13}C/^{12}C$

Le rapport isotopique du carbone du CO_2 obtenu dans du vin se mesure au moyen d'un spectromètre de masse des rapports isotopiques.

8. Calcul

Rapport isotopique $^{13}C/^{12}C$ du CO_2 dans du vin mousseux exprimé par déviation à partir d'un étalon de travail ($\delta^{13}C$) préalablement étalonné par rapport à la référence internationale PDB (Pee Dee Belemnite). Ce paramètre est défini comme étant la différence relative pour mille entre les rapports ^{13}C et ^{12}C d'un échantillon par rapport à la référence PDB. La référence PDB consiste en un carbonate de calcium fossile de la Caroline du sud, aux États-Unis, présentant un rapport isotopique (R_{PDB}) = 0,0112372. Cette valeur sert de point de référence à l'échelle PDB internationale commune pour les valeurs $\delta^{13}C$ exprimées en parties pour mille (‰).

Les valeurs $\delta^{13}C$ exprimées par rapport à l'étalon de travail sont calculées au moyen de l'équation suivante :

$$\delta^{13}C_{éch/réf}\,(‰) = 1\,000 \times (R_{éch} - R_{réf}) / R_{réf}$$

où

$R_{éch}$ est le rapport isotopique $^{13}C/^{12}C$ de la prise d'essai ;

$R_{réf}$ est le rapport isotopique $^{13}C/^{12}C$ de l'étalon de travail.

Les valeurs $\delta^{13}C$ exprimées par rapport à la référence PDB sont calculées au moyen de l'équation suivante :

$$\delta^{13}C_{éch/V\text{-}PDB}\ (‰) = \delta_{éch/réf} + \delta^{13}C_{réf/V\text{-}PDB} + (\delta^{13}C_{éch/réf} \times \delta^{13}C_{réf/V\text{-}PDB}) / 1000$$

où

$\delta^{13}C_{réf/V\text{-}PDB}$ est la déviation isotopique de l'étalon de travail préalablement déterminé contre le PDB, exprimée en parties pour mille (‰).

Les résultats sont exprimés avec deux décimales.

9. Précision

L'essai inter-laboratoires sur la précision de la méthode est spécifié à l'Annexe D et E

9.1. Répétabilité

La différence absolue entre deux résultats individuels obtenus sur un même échantillon d'essai par un opérateur utilisant le même appareil dans le plus bref intervalle de temps possible excédera la limite de répétabilité *r* dans 5 % des cas au maximum.
Les valeurs moyennes admises pour l'écart type de la limite de répétabilité (S_r) et de répétabilité (r) sont égales à :

S_r = 0,21 ‰
r = 0,58 ‰
pour la procédure d'échantillonnage 7.1a-c

S_r = 0,21 ‰
r = 0,56 ‰
pour la procédure d'échantillonnage 7.1d et 7.1e

9.2. Reproductibilité

La différence absolue entre deux résultats individuels obtenus sur un même échantillon d'essai par deux laboratoires excédera la limite de reproductibilité *R* dans 5 % des cas au maximum.
Les valeurs moyennes admises pour l'écart type de la limite de reproductibilité (S_R) et de reproductibilité (R) sont égales à :

S_R = 0,47 ‰
R = 1,33 ‰
pour la procédure d'échantillonnage 7.1a-c

S_R = 0,68 ‰
R = 1,91 ‰
pour la procédure d'échantillonnage 7.1d et 7.1e

10. Procès-verbal d'essai

Le procès-verbal d'essai doit spécifier les données suivantes :

- toutes les informations nécessaires à l'identification de l'échantillon testé

- mention de la Méthode standard internationale
- la méthode employée, avec mention de la procédure d'échantillonnage et de mesurage et recensement des instruments employés
- les résultats de l'essai et les unités, avec les résultats des déterminations individuelles et leur moyenne, calculés comme indiqué à la Section 8 (« Calcul »)
- toute variance par rapport à la procédure spécifiée
- toute caractéristique inhabituelle observée durant l'essai
- la date de l'essai
- si la répétabilité a été vérifiée
- une description de la procédure de calibrage du gaz de référence appliquée pour la mesure des prises d'essai.

Annexes (A,B,C,D,E)

11. Bibliographie

1. *« Mesure du rapport isotopique $^{13}C/^{12}C$ du gaz carbonique des vins mousseux et des vins gazéifiés », J. Merin et S. Mínguez. Office International de la Vigne et du Vin. Paris. F.V. 1039, 2426/200297 (1997).*

2. *« Examination of the $^{13}C/^{12}C$ isotopes in sparkling and semi-sparkling wine with the aid of simple on-line sampling », M. Boner et H. Förstel. Office International de la Vigne et du Vin. Paris. F.V. 1152. (2001).*

3. *« Use of $^{13}C/^{12}C$ ratios for studying the origin of CO_2 in sparkling wine », J.Dunbar. Fresenius Z. Anal. Chem., 311, 578-580 (1982).*

4. *« Contribution to the study of the origin of CO_2 in sparkling wines by determination of the $^{13}C/^{12}C$ isotope ratio », I. González-Martin, C. González-Pérez et E. Marqués-Macías. J. Agric. Food Chem. 45, 1149-1151 (1997).*

5. *« Protocol for Design, Conduct and Interpretation of Method-Performance studies ». Pure Appl. Chem., 1995, 67, 331-343.*

ANNEXE A

Procédure expérimentale fondée sur des systèmes autonomes pour l'échantillonnage et le mesurage (dispositif d'échantillonnage conçu en interne, ligne de vide autonome et SMRI à double système d'entrée)

1. Matériel

- Dispositif d'échantillonnage. Le dispositif employé pour extraire les aliquotes gazeuses de la bouteille consiste en une pince (aiguille d'acier) dotée de trois orifices latéraux, par lesquels pénètre le gaz. Il est relié à un système de clapets composé de deux clapets reliés en séquence, d'une capacité d'environ 1 mL. Un clapet est fixé à la pince (Clapet 1) et l'autre à un tube d'acier (Clapet 2), qui relie le dispositif à une ligne de vide. Si la ligne de vide est en verre, un adaptateur à tube d'acier flexible doit être installé. Le Schéma ci-après représente le dispositif de captation des gaz.
- Ligne de vide autonome avec deux cryopièges ($P < 0,05$ mbar). Deux types de ligne de vide peuvent être employés : verre ou acier.
- Spectromètre de masse des rapports isotopiques – double système d'entrée, capable de déterminer la teneur en ^{13}C du CO_2 en abondance naturelle, à un degré de précision interne d'au moins 0,05 ‰ (exprimé en valeur relative δ). La précision interne se définit ici comme étant la différence entre deux mesures du même échantillon de CO_2.

2. Procédure (voir le Schéma)

2.1. Échantillonnage du CO_2

1. Relier le dispositif d'échantillonnage à la ligne de vide et tester sa capacité d'étanchéité.
2. Insérer le dispositif d'échantillonnage avec les clapets fermés dans le bouchon en effectuant un mouvement circulaire tout en maintenant le dispositif à la verticale.
3. Relier l'ensemble dispositif d'échantillonnage–bouteille de vin à la ligne de vide et vidanger la ligne et le réservoir délimités par les deux clapets (Clapet 2 ouvert, Clapet 1 fermé).
4. Une fois que le vide est créé dans le réservoir, fermer le clapet 2, ouvrir le

clapet 1 et maintenir cette configuration pendant 1 minute. Après le temps d'équilibre, fermer le clapet 1. Le gaz enfermé dans le réservoir est alors purifié.

2.2. Purification et séparation du CO_2

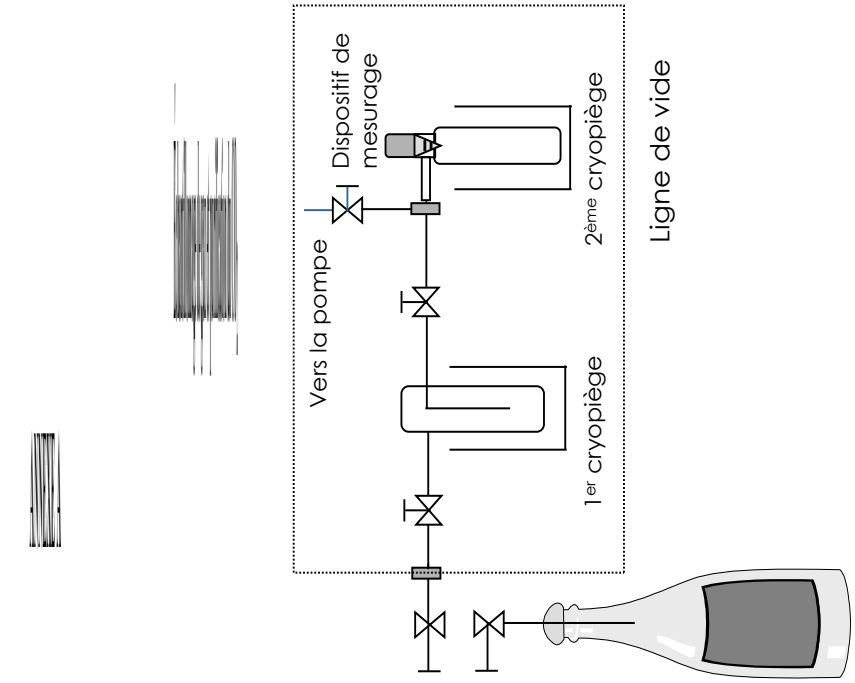
1. Transférer le CO_2 collecté dans le réservoir vers le premier cryopiège avec de l'azote liquide pendant au moins 1 minute, puis pomper le gaz non condensé jusqu'à obtention d'une pression inférieure à 0,05 mbar.
2. Transférer l'échantillon de CO_2 vers le dispositif de mesurage en employant de l'azote liquide dans le second cryopiège et en échangeant l'azote liquide dans le premier cryopiège contre un piège à eau de –80 ± 5 ºC. Maintenir cette configuration pendant au moins 1 minute.
3. Pomper le gaz non condensé (jusqu'à obtention d'une pression inférieure à 0,05 mbar) avant de fermer le dispositif de mesurage.

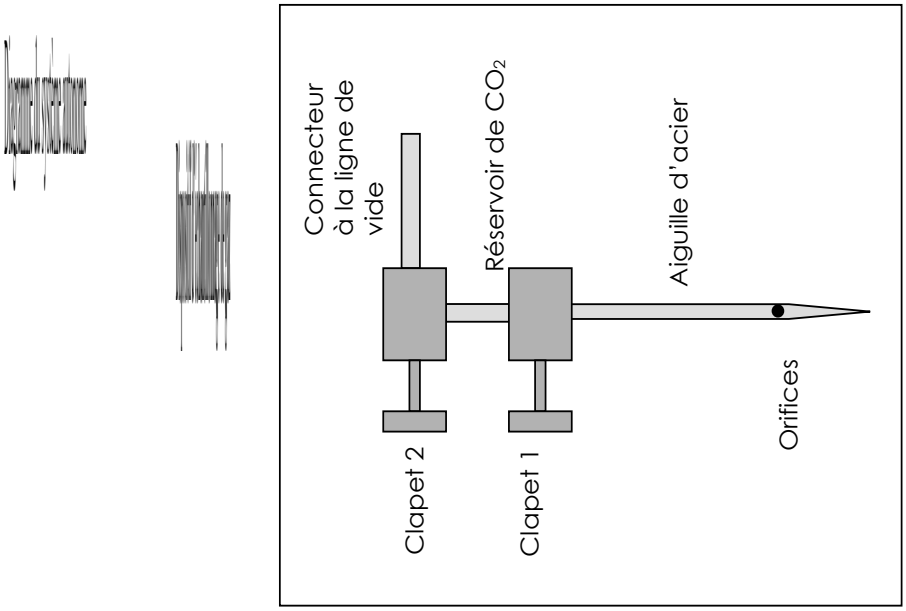
2.3. Mesure du rapport $^{13}C/^{12}C$

Le rapport isotopique du carbone du CO_2 obtenu se mesure au moyen d'un SMRI à double système d'entrée.

3. Référence

« Mesure du rapport isotopique $^{13}C/^{12}C$ du gaz carbonique des vins mousseux et des vins gazéifiés », J. Merín et S. Mínguez. Office International de la Vigne et du Vin, F.V. 1039, 2426/200297.


Ligne de vide
Dispositif de mesurage
2ème cryopiège
Vers la pompe
1er cryopiège


Connecteur à la ligne de vide
Réservoir de CO_2
Aiguille d'acier
Orifices
Clapet 2
Clapet 1

ANNEXE B

Procédure expérimentale fondée sur des systèmes continus pour l'échantillonnage et le mesurage (CF-SMRI)

1. ÉCHANTILLONNAGE TECHNIQUE

En premier lieu, le système d'échantillonnage est vidangé, le bioxyde de carbone est extrait de la bouteille au moyen d'un « dispositif d'échantillonnage » et une quantité spécifique est transférée vers la cuve de stockage. Après application d'une surpression, une petite quantité de gaz est introduite dans le flux continu d'hélium au moyen d'un restricteur. Le système d'échantillonnage est représenté au Schéma 2.

Un flux continu de dioxyde de carbone est maintenant présent dans le flux d'hélium (flux d'échantillonnage). Le flux résiduel d'hélium est exempt de dioxyde de carbone et fait fonction de débit nul. Des « pics de commutation » artificiels sont générés par commutation provisoire entre le débit nul et le flux d'échantillonnage (temps de commutation : 2 secondes), dont les rapports isotopiques sont mesurés par le spectromètre de masse.

2. Procédure (voir Schéma)

2.1. Vidange du système d'échantillonnage

Le système d'échantillonnage est intégralement vidangé jusqu'à obtention d'une pression négative de 1 mbar (V3 fermé).

2.2. Échantillonnage

Le bouchon est transpercé par un « dispositif d'échantillonnage » et l'atmosphère de la bouteille est transférée vers la cuve de stockage de gaz (GV) par pression négative (hausse de pression après 50 mbars environ). Le clapet de réglage fin (VF) autorise l'écoulement maîtrisé et lent du gaz. Le gaz est purifié dans le cryopiège à l'issue du transfert.

2.3. Alimentation

Après l'échantillonnage (V3 et V2 fermés, V4 ouvert), une surpression de 1,5 bar est constituée à l'aide d'hélium. Le gaz à mesurer est conduit au CF-SMRI par l'ouverture de V3. Le mesurage peut être effectué après une première mise en condition de 150 secondes. Un capillaire est intégré comme restricteur, n'autorisant le passage que d'une très faible quantité de gaz porteur (10 mL/mn).

2.4. Mesurage

Un flux continu de bioxyde de carbone est maintenant présent dans le flux d'échantillonnage d'hélium (PRO). La commutation entre le flux d'échantillonnage (PRO) le flux d'hélium pur (NUL) permet de générer des pics de commutation artificiels.
Commutation sur le flux d'échantillonnage : 2 secondes
(débit nul : 10-30 secondes).

3. Référence

« Examination of the $^{13}C/^{12}C$ isotopes in sparkling and semi-sparkling wine with the aid of simple on-line sampling », M. Boner et H. Förstel. Office International de la Vigne et du Vin, FV 1152.

Diagramme du système continu



V1-V4 clapet de non retour
VP pompe à vide
VF clapet de réglage fin
SK dispositif d'échantillonnage
PRO flux d'échantillonnage d'hélium (50 ml/min)
NUL flux d'hélium (débit nul) (60 ml/min)
KF propan-1-ol du piège à eau à – 90ºC
GV cuve de stockage de gaz 250 ml
DM manomètre
KA capillaire restricteur (10 cm, 150 µm)
VM clapet 2/4 voies

ANNEXE C

Procédure expérimentale fondée sur la technique GC-C-SMRI

1. Caractéristiques des instruments

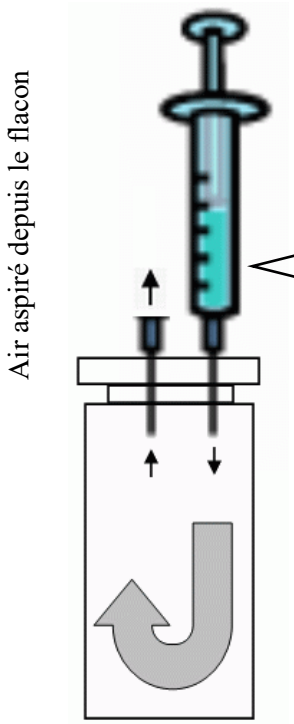
- Chromatographe en phase gazeuse : GC Varian 3400.
- Colonne capillaire : HP-INNOWax (glycol polyéthylénique réticulé), 30 m x 0,25 mm ID, épaisseur du film : 0,5 µm.
- Interface de combustion ThermoFinnigan-MAT, avec four à oxydation réglé à 940° C ou à l'arrêt ; four de réduction à 640° C ou à l'arrêt.
- Spectromètre de masse : DeltaPlus ThermoFinnigan-MAT.

2. Procédure

2.1. Échantillonnage du CO_2

1. Des aliquotes de gaz ont été collectées au moyen d'une seringue de 25 cm^3, avec insertion d'une longue aiguille d'acier au travers du bouchon. La pression du CO_2 a spontanément rempli la seringue avec le gaz du vide de la bouteille.
2. Le gaz est transféré dans des flacons pré-obturés aux fins de l'analyse. Les flacons employés pour stocker le gaz sont préalablement obturés au moyen de capsules à septum de Téflon-silicone. Pour évacuer l'air situé à l'intérieur – et ainsi le CO_2 atmosphérique –, une seconde aiguille est plantée dans le septum, de manière à garantir que le gaz du vide de la bouteille pousse bien l'air dans le flacon. Voir le schéma ci-dessous.

REMARQUE : une seringue de plus grande capacité est employée, en fonction du volume du flacon, pour garantir une parfaite propreté du flacon. Dans le cas présent, une seringue de 25 cm3 (ou de capacité plus grande) est employée avec un flacon de 2 ml.

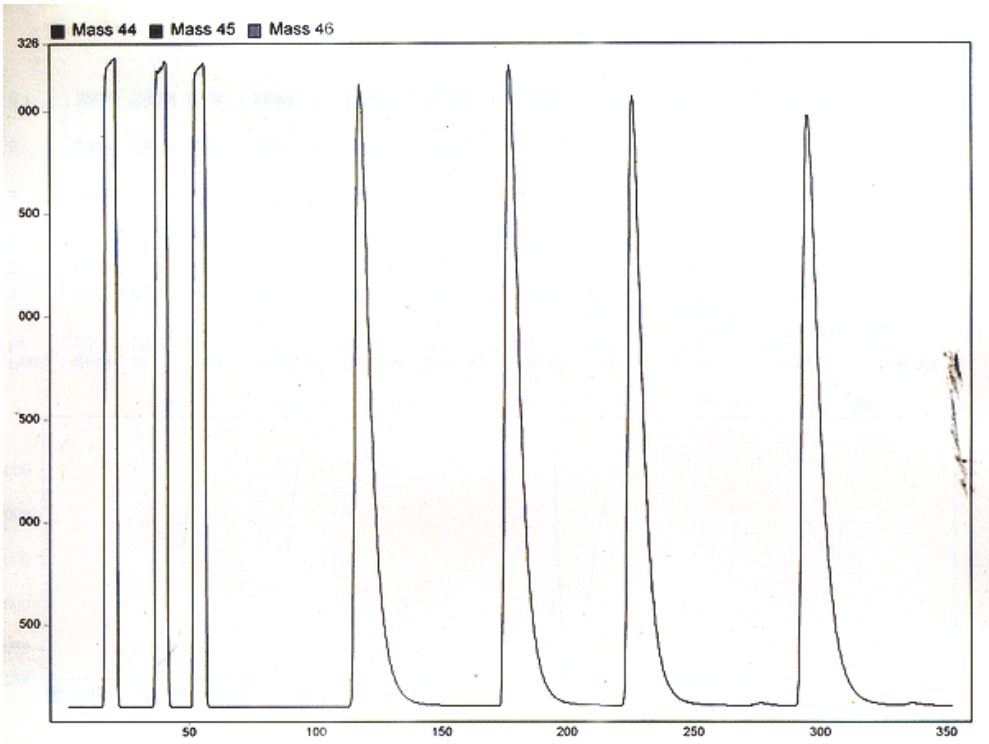


* Attention : le format du flacon n'est pas à échelle avec celui de la seringue .

2.2. Analyses GC-SMRI : injection du CO_2 et mesure du rapport $^{13}C/^{12}C$

Une très faible quantité µl de gaz a été directement injectée dans la colonne au moyen d'une seringue Hamilton de 10 µl à aiguille en acier cémenté. Des conditions de dédoublement de haut débit étaient définies. L'hélium porteur était à 20 PSI.

Quatre injections ont été effectuées lors de chaque mise en condition de chacun des échantillons. Le temps total d'exécution pour l'analyse a été de 6 minutes. Voir le chromatogramme ci-dessous.



2.3. Traitement des résultats

Le logiciel employé pour l'enregistrement et la confection des signaux du spectromètre de masse est la version 1.50 d'Isodat NT, de ThermoFinnigan-Bremen, sous le système d'exploitation MS-Windows NT.

Pour chaque échantillon, la valeur $\delta^{13}C$ moyenne est calculée comme étant la valeur moyenne des 3 dernières injections. La valeur $\delta^{13}C$ de la première injection est systématiquement rejetée.

ANNEXE D
(à titre d'information)

Résultats statistiques de l'essai inter-laboratoires essais de champagne comemcial à supprimer 2 ;2

Conformément à ISO 5725:1994, les paramètres suivants ont été définis dans le cadre d'un essai inter-laboratoires conduit par 11 laboratoires européens et 1 laboratoire mexicain.

Année de l'essai inter-laboratoires	2003-2004
Nombre de laboratoires	12
Nombre d'échantillons	5, en double aveugle
Paramètre $\delta^{13}C$ de CO_2	

Identification de l'échantillon	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**
Nombre de laboratoires participants	12	12	12	12	12
Nombre de laboratoires retenus après éliminat des résultats aberrants	12	11	12	12	12
Nombre d'expériences menées en parallèle pa laboratoire	2	2	2	2	2
Nombre de résultats acceptés	24	22	24	24	24
Moyenne ($\delta^{13}C$) ‰	-9,92	-20,84	-23,66	-34,80	-36,43
s_r^2	0,057	0,031	0,119	0,006	0,044
Écart-type de répétabilité (S_r) ‰	0,24	0,18	0,35	0,08	0,21
Valeur de répétabilité, r (2,8 x S_r) ‰	0,67	0,49	0,97	0,21	0,58
S_R^2	0,284	0,301	0,256	0,140	0,172
Écart-type de reproductibilité (S_R) ‰	0,53	0,55	0,51	0,37	0,41
Valeur de reproductibilité, R (2,8 x S_R) ‰	1,49	1,54	1,42	1,05	1,16

Types d'échantillons :
- A Vin mousseux – Sucre C_4
- B Vin mousseux – Sucre C_3
- C Vin mousseux – Sucre C_3
- D Vin gazéifié

E Vin gazéifié

ANNEXE E

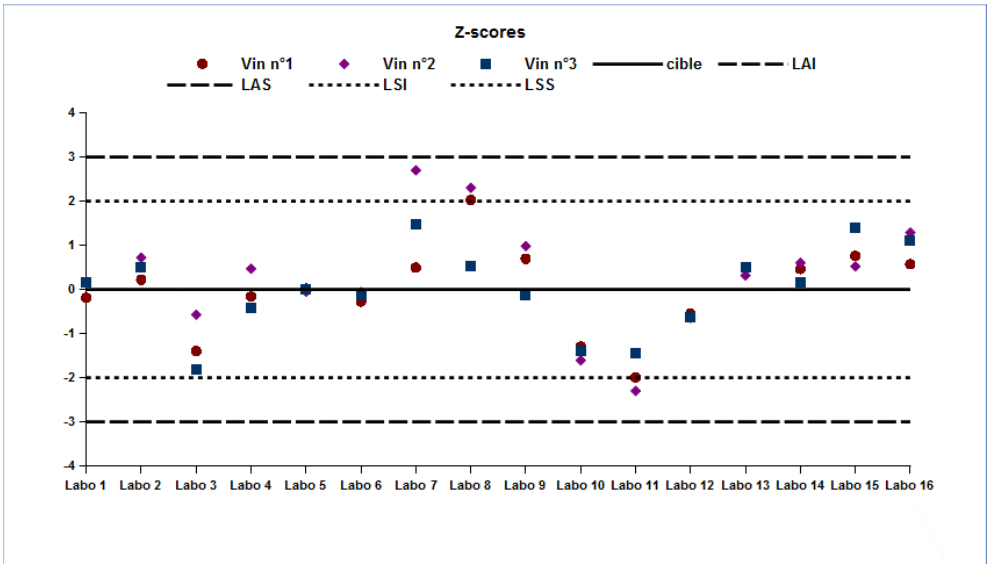
Résultats statistiques de l'essai inter-laboratoires des vins mousseux et gazéifiés
Procédure d'échantillonnage 7.1.d et 7.1.e

Conformément à **OIV-MA-AS1-09 : R2000** les paramètres suivants ont été définis dans le cadre d'un essai inter-laboratoires conduit avec 16 laboratoires.

Année de l'essai inter-laboratoires : 2013-2014
Nombre de laboratoires : 16
Type d'échantillons : Vins mousseux et gazéifiés
Nombre d'échantillons : 3, en double aveugle
Paramètre mesuré : $\delta^{13}C$

INDICATEURS	**VIN N°1**	**VIN N°2**	**VIN N°3**
Nombre de laboratories	16	14	16
Nombre de répétitions	2	2	2
Minimum	-32,90	-33,10	-23,64
Maximum	-29,83	-30,97	-20,57
Variance de répétabilité s_r^2	0,0467	0,0118	0,0648
Variance intergroupe s_L^2	0,43853	0,29762	0,51616
Variance de réproductibilité s_R^2	0,4852	0,3094	0,5810
Moyenne générale	-31,42	-31,83	-22,15
Ecart-type de repetabilité	0,22	0,11	0,25
Limite r	0,612	0,307	0,720
Ecart-type de réproductibilité	0,70	0,56	0,76
Limite R	1,971	1,574	2,157

	Vin N°1		Vin N°2		Vin N°3		Z-score	Z-score	Z-score
Code du Laboratoire	A	B	A	B	A	B	Vin N°1	Vin N°2	Vin N°3
Labo 1	-31,40	-31,69	-31,56	-31,88	-21,93	-22,12	-0,18	-0,19	0,16
Labo 2	-31,23	-31,29	-31,43	-31,41	-21,46	-22,04	0,23	-0,73	0,52
Labo 3	-32,65	-32,12	-32,15	-32,13	-23,41	-23,64	-1,39	-0,56	-1,81
Labo 4	-31,55	-31,50	-31,46	-31,66	-22,40	-22,54	-0,15	0,48	-0,42
Labo 5	-31,50	-31,30	-31,80	-31,90	-22,00	-22,30	0,03	-0,04	0,00
Labo 6	-31,46	-31,75	-31,96	-31,75	-22,39	-22,10	-0,27	-0,05	-0,13
Labo 7	-31,48	-30,66	-31,29	-29,35	-21,47	-20,57	0,50	2,71	1,48
Labo 8	-29,83	-30,17	-29,73	-31,35	-21,50	-21,96	2,04	2,31	0,55
Labo 9	-30,96	-30,90	-31,34	-31,21	-22,22	-22,27	0,70	0,99	-0,13
Labo 10	-32,34	-32,29	-32,68	-32,75	-23,25	-23,14	-1,29	-1,60	-1,37
Labo 11	-32,90	-32,70	-33,10	-33,10	-23,00	-23,50	-1,98	-2,29	-1,45
Labo 12	-31,91	-31,68	-32,22	-32,14	-22,58	-22,66	-0,54	-0,63	-0,62
Labo 13	-31,03	-31,10	-31,61	-31,68	-21,78	-21,74	0,51	0,33	0,51
Labo 14	-31,25	-30,93	-31,43	-31,54	-22,01	-22,02	0,57	0,62	0,17
Labo 15	-30,89	-30,88	-31,59	-31,47	-21,08	-21,07	0,76	0,53	1,41
Labo 16	-31,05	-30,98	-31,24	-30,97	-21,090	-21,490	0,58	1,30	1,13



Bibliographie.

1. Ana I. Cabañero, Tamar San-Hipólito and Mercedes Rupérez, GasBench/isotope ratio mass spectrometry: a carbon isotope approach to detect exogenous CO_2 in sparkling drinks Rapid Commun. Mass Spectrom. 2007; 21: 3323–3328.

2. Laetitia Gaillard, Francois Guyon ⁄, Marie-Hélène Salagoïty, Bernard Médina, Authenticity of carbon dioxide bubbles in French ciders through multiflow-isotope ratio mass spectrometry measurements. Food Chemistry. 2013, 141: 2103–2107

Méthode OIV-MA-AS314-04 Méthode Type II

Dosage du dioxyde de carbone dans le vin par methode manometrique

pour une échelle de concentration allant de 0,5 g/l à 7 g/
(Résolution OENO 2/2006 ; OIV/OENO 377/2009)

1. PRINCIPE

Le dioxyde de carbone de l'échantillon est fixé par de la soude 10M. Il est ensuite libéré par de l'acide sulfurique dans une fiole à vide connectée à un manomètre. L'augmentation de pression qui en résulte permet de calculer la quantité de dioxyde carbone contenu dans l'échantillon.

2. REACTIFS

2.1. Eau fraîchement distillée ou désionisée ;
2.2. Hydroxyde de sodium (pureté >98%) ;
2.3. Acide sulfurique (pureté >95-97%) ;
2.4. Carbonate de sodium anhydre (pureté >99%).

Préparation des solutions réactives

2.5. Hydroxyde de sodium 10 M : Dissoudre 100 g d'hydroxyde de sodium (2.2) dans 200 ml d'eau (2.1) et ajuster à 250 ml dans une fiole jaugée.

2.6. Acide sulfurique à environ 50 % (v/v) : Ajouter avec précaution, de l'acide sulfurique (2.3) à un volume égal d'eau (2.1). Bien mélanger par agitation. Laisser refroidir jusqu'à température ambiante.

2.7. Mélange étalon de dioxyde de carbone à 10 g/l : sécher le carbonate de sodium une nuit (2.4) dans un four à 260-270°C, laisser revenir à température ambiante dans un dessiccateur. Dissoudre 6,02 ± 0, 01 g de carbonate de sodium séché dans de l'eau (2.1) et ajuster à 250 ml dans une fiole jaugée.

2.8. Mélanges étalons de dioxyde de carbone à 0,4 ; 1 ; 2 ; 4 and 6 g/l : à l'aide de pipettes verser 2, 5, 10, 20 et 30 ml de la solution étalon (2.7) dans des fioles jaugées de 50 ml et ajuster avec de l'eau (2.1).

3. APPAREILLAGE

3.1. Fioles jaugées de 250 ml et 50 ml ;
3.2. Four ;
3.3. Dessiccateur ;

3.4. Balance d'une exactitude de ± 0.1 mg ;
3.5. Réfrigérateur ou bain réfrigérant à - 4ºC ;
3.6. Densimètre électronique (ou pycnomètre) et bain thermostaté à 20 °C;
3.7. Pipettes de 0,5, 2, 3, 5, 10, 20 et 30 ml ;
3.8. flacons côniques de 100 ml, à large ouverture ;
3.9. Manomètre numérique (permettant de mesurer des écarts de pression de l'ordre de 200 kPa avec une exactitude de 0,1 kPa) ;
3.10. Fiole à vide de 25 ml équipé d'un flacon de réaction de 3 ml et d'une vanne trois voies (voir la figure 1) ;
3.11. Générateur de vide (par exemple une trompe à eau).
3.12 Ampoule à décanter

4. MODE OPERATOIRE

4.1. Préparation de l'échantillon

Préparer les échantillons en double. Refroidir l'échantillon en le laissant une nuit dans un réfrigérateur ou 40 minutes dans un bain réfrigérant à – 4°C (3.5). Verser 3 ml d'hydroxyde de sodium 10M (2.5) dans un flacon cônique de 100 ml (3.8). Peser le flacon et son contenu à 0,1 mg près. Verser approximativement 75 ml de l'échantillon refroidi dans le flacon cônique contenant l'hydroxyde de sodium. Peser à 0,1 mg près. Mélanger et laisser revenir à température ambiante.

4.2. Dosage du dioxyde de carbone contenu par méthode manométrique

Transférer 2 ml de l'échantillon préparé (4.1) dans la fiole à vide (3.10). La connecter au manomètre (3.9) via la vanne à trois voies en position ouverte. A l'aide d'une pipette (3.7) déposer 0,5 ml d'acide sulfurique à 50 % (2.6) dans le flacon de réaction. Le raccorder à la fiole à vide. Fixer et sécuriser l'ensemble à l'aide de clips. Noter la pression. Fermer la vanne trois voies. Mélanger l'acide et l'échantillon en inclinant l'ensemble et en le secouant vigoureusement. Noter la pression. L'échantillon peut être dilué si nécessaire.

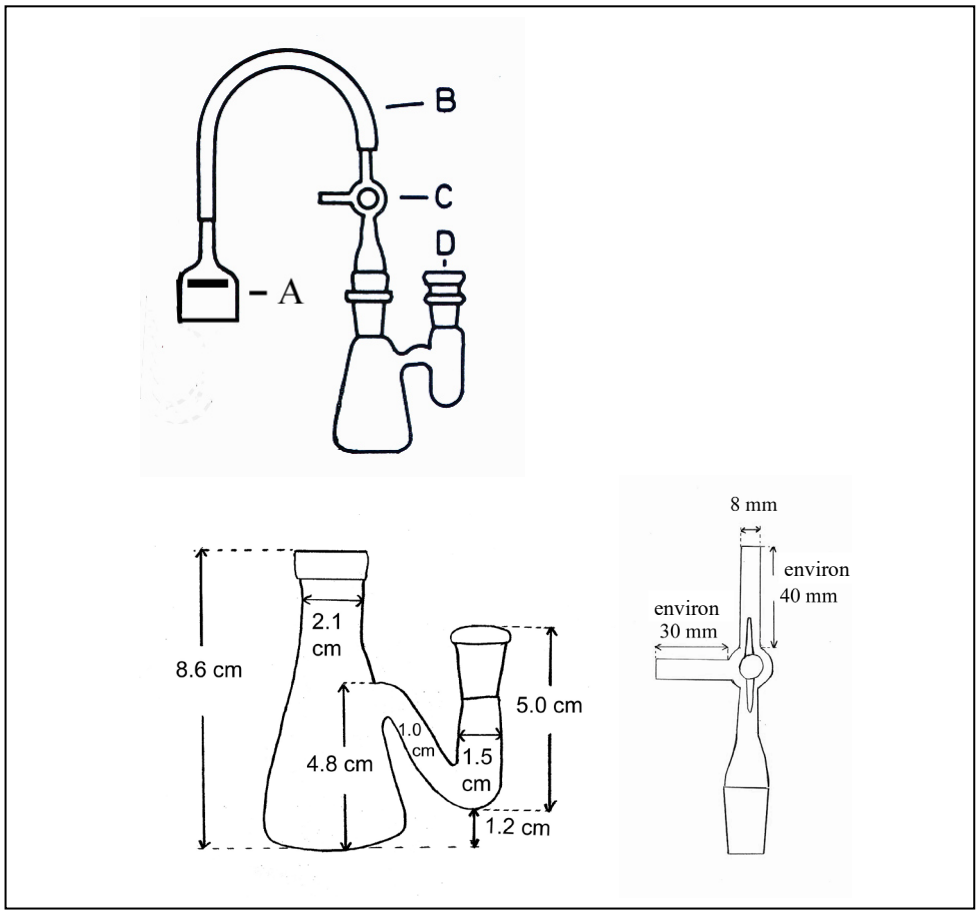


Fig. 1. Appareillage. A manomètre, B tuyau en caoutchouc, C valve à trois voies, D ballon à réaction (gauche) et caractéristiques approximatifs de la verrerie (centre et à droite)

4.3. Etalonnage

Evaluer le contenu de dioxyde de carbone dans les solutions d'étalonnage (4.2). Déterminer trois solutions d'étalonnage qui encadrent la valeur de l'échantillon. Ces points d'étalonnage sont répétés deux fois.

4.4. Mesure de la densité de l'échantillon.

Enlever le contenu de dioxyde de carbone des solutions d'étalonnage par agitation dans une ampoule à décanter puis sous un vide généré par une trompe à eau pendant trois minutes. Mesurer la masse volumique à l'aide d'un densimètre électronique ou d'un pycnomètre.

5. CALCUL

Calculer l'augmentation de pression due au dioxyde carbone libéré par chaque solution étalon et tracer le graphique.

Calculer la pente (a) et l'ordonnée à l'origine (b).

Le volume V de l'échantillon est donné par la formule :

$$V = [(m2-m1) \times 1000]/d \qquad (1)$$

où
m1 (g)= poids de (fiole à vide + 3 ml NaOH) ;
m2 (g) = poids de (fiole à vide + 3 ml NaOH + échantillon) ;

d (kg/m^3) = masse volumique de l'échantillon.

L'augmentation de pression p_i provoquée par le dioxyde de carbone libéré de l'échantillon est donnée par la formule:

$$pi = ps - pap \qquad (2)$$

où
p_s = lecture de la pression après action de dioxyde de carbone de l'échantillon
p_{ap} = lecture de la pression avant addition de H_2SO_4 (par exemple la pression atmosphérique)

La concentration (C) du dioxyde de carbone dans l'échantillon (en g/L) est donnée par :

$$C = [(pi - b) / a] \times [(V + 3)/V] \times L \qquad (3)$$

où
p_i = augmentation de pression (équation 2)
a = pente de la droite d'étalonnage
b = ordonnée à l'origine de la droite d'étalonnage
V = volume d'échantillon (équation 1)
L = facteur de dilution en cas de dilution de l'échantillon

La teneur en % de masse de dioxyde de carbone est donnée par :

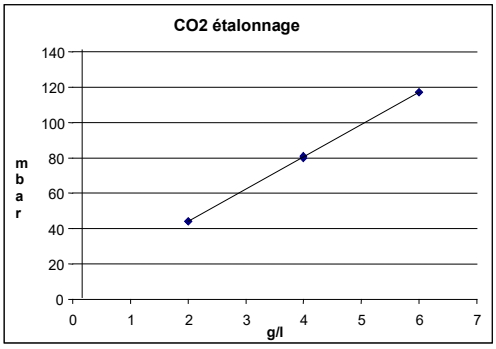
$$CO_2 \text{ \% (m/m)} = C \times 100/d \qquad (4)$$

Exemple de calcul de la teneur en dioxyde carbone :

Etalonnage

Conc de l'étalon g/l	pression initiale mbar	pression finale mbar	augmentation de pression mbar
2	1021	1065	44
2	1021	1065	44
4	1021	1101	80
4	1021	1102	81
6	1021	1138	117
6	1021	1138	117

pente	18.25000
ordonnée à l'or.	7.50000
correlation	0.99995



Echantillon	masse volumique d (en kg/m^3)	poids (fiole + soude) m1 (g)	Poids (fiole + soude +échant.) m1 (g)	pression initiale p_{ap} (mbar)	Pression finale p_s (mbar)	p_s - p_{ap} (2)	volume de l'échantillon V (mL) (1)	**CO_2 (g/L) (3)**	**valeur moyenne de CO_2 (g/L)**
vin mousseux 1	1027,2	84,6287	156,1620	1021	1112	91	69,64	**4,77**	**4,80**
vin mousseux 1	1027,2	84,6287	156,1620	1021	1113	92	69,64	**4,83**	
vin mousseux 2	1025,3	86,1066	153,4407	1021	1118	97	65,67	**5,13**	**5,13**
vin mousseux 2	1025,3	86,1066	153,4407	1021	1118	97	65,67	**5,13**	

6. VALIDATION

6.1 Performances de la méthode

- Ecart type moyen estimé d'après les répétitions, s_o = 0,07 g/l
- Ecart-type relatif, RSD = 1,9%
- Répétabilité, r = 5,6 %
- Incertitude élargie (k=2), U = 3,8%
- Gamme d'étalonnage 0,4-6 g/L
- Gamme de détermination 0,3 -12 g/L (échantillons avec concentration au dessus de 6 g/L à diluer 1 :2 avec l'eau conformément à la gamme de calibration
- Limite de détection 0,14 g/L
- Limite de quantification 0,48 g/L

Annexe A

Référence

European Brewery Convention Analytica-EBC, Fourth edition, 1987, 9.15 Carbon dioxide.

Ali-Mattila E et Lehtonen P.(2002), OIV, FV 1153.

OIV, SCMA 2002, FV N° 1153, determination of carbon dioxide in alcoholic beverages by a modified EBC method

OIV, SCMA 2004, FV N° 1192, determination of carbon dioxide in alcoholic Beverages by a modified EBC method, Statistical results of the collaborative study

OIV, SCMA 2005, FV N° 1222, comparison of the titrimetric method and the modified EBC method for the determination of carbon dioxide in alcoholic beverages

Ali-Mattila, E. and Lehtonen, P., Determination of carbon dioxide in alcoholic beverages by a modified EBC method, Mitteilungen Klosterneuburg 52 (2002): 233-236

Annexe B

Résultats statistiques de l'étude collaborative

DÉTERMINATION DE LA TENEUR EN DIOXYDE DE CARBONE DES BOISSONS ALCOOLISÉES SELON UNE MÉTHODE EBC MODIFIÉE

1. But de l'étude

L'étude avait pour objectif de déterminer la répétabilité et la reproductibilité de la méthode EBC modifiée de détermination de la teneur en dioxyde de carbone des vins, vins mousseux, cidres et bières.

2. Besoins et finalité de l'étude

La fermentation produit du dioxyde de carbone dans les boissons alcoolisées. Dans la production de vins mousseux, le dioxyde de carbone est l'un des produits les plus essentiels et peut également être ajouté à certaines boissons alcoolisées. Le dioxyde de carbone modifie le goût et l'arôme et est un agent de conservation des boissons alcoolisées.

Conformément aux définitions du Code international des pratiques œnologiques, les vins mousseux devront présenter une surpression minimale de 3 bars, due au dioxyde de carbone en solution, lorsqu'ils sont conservés à la température de 20°C dans des récipients fermés. De même les vins pétillants devront présenter une surpression minimale de 1 bar et maximale de 2,5 bars. Des surpressions de 3 bars, 2,5 bars et 1 bar correspondent respectivement à 20°C à environ 5,83 g/L, 5,17 g/L et 3,08 g/L de dioxyde de carbone en solution.

A l'heure actuelle, il n'existe aucune méthode pratique et fiable permettant de doser le dioxyde de carbone dans les boissons alcoolisées. La grande variabilité des teneurs dioxyde de carbone obtenues lors d'essais d'aptitude internationaux indique clairement la nécessité de disposer d'une méthode fiable.

3. Portée et applicabilité

La méthode proposée est quantitative et applicable à la détermination de la teneur en dioxyde de carbone des boissons alcoolisées. Cette méthode a été validée dans le cadre d'une étude collaborative de détermination de la teneur en dioxyde de carbone de vins, bières, cidres et vins mousseux au moyen d'analyses pratiquées à des niveaux compris approximativement entre 0,4 g/L et 12 g/L (Remarque : le niveau d'étalonnage actuel est compris entre 0,4 g/L et 6 g/L. Les échantillons

doivent être dilués avec de l'eau jusqu'à ce niveau, lorsque la teneur en dioxyde de carbone est supérieure à 6 g/L).

4. Matériaux et matrices

L'étude collaborative a porté sur 6 échantillons différents. Tous les échantillons, à l'exception des échantillons de bière, ont été envoyés en double aveugle, ce qui fait qu'au total 12 bouteilles ont été distribuées aux participants : deux de bière, deux de cidre, deux de vin rouge, deux de vin blanc, deux de vin pétillant et deux de vin mousseux. Chaque bouteille a reçu un code individuel pour chaque participant. Tous les échantillons ont été présentés dans leurs bouteilles d'origine, et les étiquettes ont été enlevées sur tous les échantillons à l'exception des échantillons de vin mousseux. La mesure de la quantité de dioxyde de carbone dans 10 bouteilles du même lot a permis d'évaluer l'homogénéité des échantillons.

5. Échantillons d'apprentissage

Quatre échantillons témoins ont été remis aux participants pour qu'ils se familiarisent avec la méthode. Ces échantillons comprenaient un échantillon de bière, un de vin, un de vin pétillant et un de vin mousseux.

6. Mode opératoire et documents de support

Le mode opératoire et un tableau Excel pour le calcul des résultats ont été remis aux participants.

Des documents de support ont également été fournis, parmi lesquels la lettre d'accompagnement, un formulaire de prise en charge d'échantillons et des fiches de résultat.

7. Analyse des données

7.1. La détermination des valeurs aberrantes a été évaluée en utilisant les tests de Cochran et de Grubbs ainsi que le test de Grubbs bilatéral.

7.2. Une analyse statistique a été effectuée pour obtenir les données de répétabilité et de reproductibilité.

8. Participants

Neuf laboratoires de différents pays ont participé à l'étude collaborative. Des codes ont été attribués à ces laboratoires. Les laboratoires participants avaient une expérience établie en matière d'analyse de boissons alcoolisées.

Alcohol Control Laboratory
Alko Inc.
P.O.Box 279
FIN-01301 Vantaa
Finlande

Altia Ltd
Valta-akseli
Rajamäki
Finlande

Arcus AS
Haslevangen 16
P.O.Box 6764 Rodeløkka
0503 Oslo
Norvège

ARETO Ltd
Mere pst 8a
10111 Tallinn
Estonie

Bundesamt für Weinbau

Gölbeszeile 1
A-7000 Eisenstadt
Autriche

Comité Interprofessionnel du Vin de Champagne
5, rue Henri MARTIN
BP 135
51204 EPERNAY CEDEX
France

High-Tec Foods Ltd

Ruomelantie 12 B
02210 Espoo
Finlande

Institut für Radioagronomie
Forschungszentrum
Jülich GMBH
Postfach 1913
52425 JÜLICH
Allemagne

Systembolagets laboratorioum
Armaturvägen 4,
S-136 50 HANINGE
Suède

9. Résultats

L'homogénéité des échantillons a été déterminée par l' « Alcohol Control Laboratory » (Finlande), en mesurant la teneur en dioxyde de carbone de 10 bouteilles du même lot. Des échantillons portant les numéros de lots correspondants ont été envoyés aux participants :

CO_2 g/L	Bière 1	Bière 2	Cidre	Vin blanc	Vin rouge	Vin pétill.	Vin mouss.
Moy.	5,191	5,14	4,817	1,337	0,595	5,254	7,463
s	0,020	0,027	0,025	0,036	0,038	0,022	0,046

Selon l'essai d'homogénéité, la teneur en CO_2 des deux bières était la même, elles furent donc
considérées comme doubles aveugles.

Les résultats individuels pour l'ensemble des échantillons et laboratoires de l'étude collaborative sont donnés ci-dessous.

Code Lab	Bière 1	Bière 2	Cidre 1	Cidre 2	Vin blanc 1	Vin blanc 2	Vin rouge 1	Vin rouge 2	Vin pétill. 1	Vin pétill. 2	Vin mouss. 1	Vin mouss 2
A	5,39	5,08	4,75	4,91	1,25	1,11	0,54	0,54	5,15	5,22	6,93	6,91
B	4,76	5,53	4,71	4,70	1,90[3]	1,78[3]	0,73[2]	1,19[2]	5,85[3]	5,93[3]	7,66[3]	7,72[3]
C	5,15	5,14	4,93	4,94	1,36	1,41	0,51	0,48	5,23	5,33	7,33	7,36
D	3,13[1]	3,95[1]	4,36[1]	0,38[1]	1,11[1]	1,11[1]	0,43[1]	0,38[1]	4,47[1]	4,29[1]	5,54[1]	5,52[1]
E	4,87	4,73	4,96	4,78	1,52	1,52	0,78[3]	0,80[3]	4,98	4,94	5,83	6,17
F	5,34	4,91	4,71	5,01	1,33	1,40	0,46	0,57	5,22	4,95	6,52	6,67
G	5,18	5,15	4,82	4,86	1,37	1,36	0,56	0,59	5,22	5,27	7,54	7,47
H	5,42	5,40	5,05	5,12	1,15	1,30	0,52	0,53	5,12	5,10	7,25	7,34
I	5,14	5,13	4,65	4,76	1,16	1,19	0,47	0,61	5,16	5,06	6,88	6,48

1. Enlevé en raison d'une erreur systématique importante, manifestement due à un mauvais étalonnage
2. Valeur aberrante selon le test de Cochran
3. Valeur aberrante selon le test de Grubbs

Les résultats statistiques de l'essai interlaboratoire sont récapitulés ci-dessous.

	Bière	Cidre	Vin blanc	Vin rouge	Vin pétillant	Vin mousseux
Moyenne (g/L)	5,145	4,859	1,316	0,532	5,139	6,906
Moyenne (Rép.1) (g/L)	5,156	4,833	1,306	0,510	5,154	6,897
Moyenne (Rép.2) (g/L)	5,134	4,885	1,327	0,553	5,124	6,914
Ecart type de répétabilité (s_r) (g/L)	0,237	0,089	0,060	0,053	0,086	0,149
Ecart type de reproductibilité (s_R) (g/L)	0,237	0,139	0,135	0,059	0,124	0,538
Ecart type relatif de répétabilité (SDR_r) (%)	4,597	1,821	4,562	9,953	1,663	2,163
Ecart type relatif de reproductibilité (RSD_R) (%)	4,611	2,855	10,22	11,07	2,407	7,795
Limite de répétabilité r ($2,8*s_r$) (g/L)	0,662	0,248	0,168	0,148	0,239	0,418
Limite de reproductibilité R ($2,8*s_R$) (g/L)	0,664	0,388	0,377	0,165	0,346	1,507
Cf xValeur de HORRAT	1,043	0,640	1,883	1,779	0,544	1,843

Conclusion

Les valeurs de Horrat sont inférieures à 2, ce qui signifie que la méthode est acceptable. Les valeurs de Horrat sont cependant légèrement élevées. Dans cinq des neuf laboratoires participants ces essais ont été réalisés pratiquement sans expérience préalable. Les résultats peuvent par conséquent être considérés comme pour le moins très satisfaisants.

La méthode donne les résultats en g/L mais ces résultats peuvent être convertis en unités de pression. [7]

[7] Troost, G. and Haushofer, H., Sekt, Schaum- und Perlwein, Eugen Ulmer Gmbh & Co., 1980, Klosterneuburg am Rhein, ISBN 3-8001-5804-3, diagramme 1 en page 13.

Annexe C

Validation à des niveaux bas de dioxyde de carbone

1. Limite de détection et limite de détermination

Un échantillon de vin blanc a été analysé dix fois en double. Les donnés statistiques sont les suivantes:

Résidus	10	
Moyenne CO_2 (g/L)		0.41
Ecart standard de la moyenne, s (g/L)	0.048	
Limite de détection 3 x s		0.14
Limite de détermination 10 x s	0.48	

2. Ajouts d'étalons

Des solutions étalons de 5 concentrations différentes, réalisées en double, ont été ajoutés au même vin qui a été utilisé pour déterminer les limites de détection et de détermination. Les concentrations correspondantes en CO_2 ont été également ajoutées à de l'eau. Les régressions linéaires de ces deux essais ont été comparées.

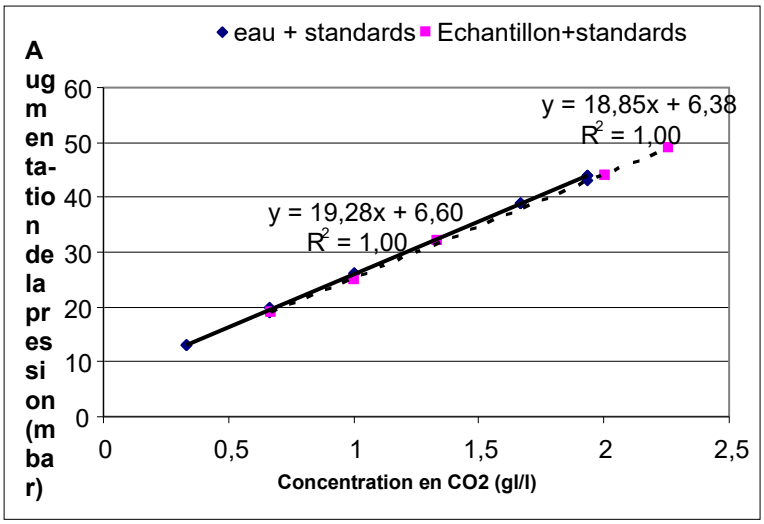


Fig. 1 Ajouts d'étalons à l'échantillon et à l'eau

Données statistiques des essais:

	Eau+ étalons	**Echantillon+Etalons**
Pente	19,3	18,9
Incertitude de la pente	0,3	0,3
Intersection	6,6	6,4
Incertitude de l'intersection	0,4	0,5
Ecart résiduel standard	0,4	0,3
Nombre d'échantillons	15	10

Selon les données statistiques les deux droits de régression sont similaires.

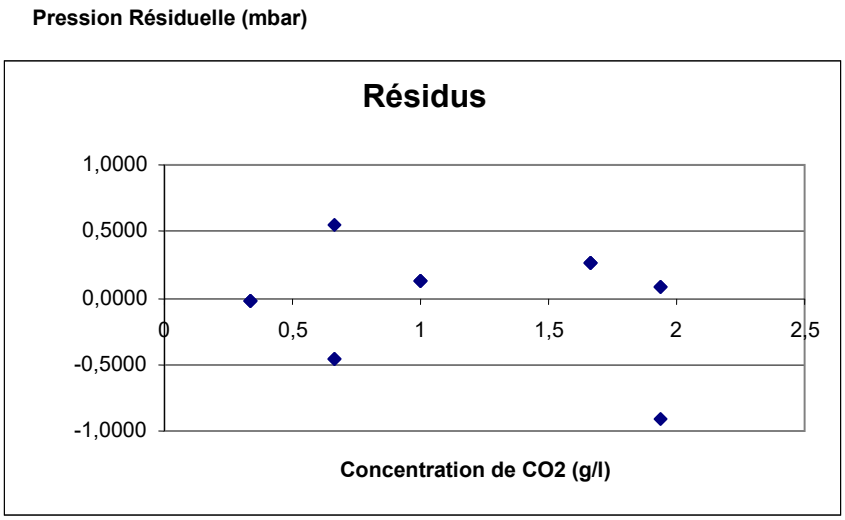


Fig. 2. Les résidus de l'équation "eau+standards"

Les résidus se répartissent des deux côtés du zéro ce qui montre que la régression est linéaire.

Annexe D

Comparaison avec d'autres techniques et laboratoires

1. Comparaison de la méthode EBC modifiée avec l'appareil commercial Anton Paar CarboQC

Echantillon	**Méthode EBC modifiée** (g/l)	**Anton Paar CarboQC** (g/l)	**Différence**
Vin mousseux	9,14	9,35	-0,21
Cidre	4,20	4,10	0,1
Vin blanc	1,18	1,10	0,08
Vin rouge	1,08	0,83	0,25
Bière 1	5,26	5,15	0,11
Bière 2	4,89	4,82	0,07
Bière 3	4,90	4,92	-0,02
Bière sans alcool 1	5,41	5,33	0,08
Bière sans alcool 2	5,39	5,36	0,03
		Moyenne	**0,06**

Selon le t-test il n'existe pas de différence systématique dans les mesures.

2. Comparaison entre Bfr, Allemagne et ACL, Finlande

Bfr a envoyé quatre échantillons à ACL et ACL a envoyé cinq échantillons à Bfr. Ces neuf échantillons ont été analysés d'une manière indépendante par ACL utilisant la méthode présentée dans ce document et en Allemagne chez Bfr utilisant la méthode titrimétrique. Les résultats statistiques sont les suivants:

Différence moyenne	0,14 g/l
Différence standard	0,13 g/l
Z-score	1,04

La méthode présentée ici et la méthode titrimétrique ont été comparées également par le Bundesamt für Weinbau en Autriche en utilisant 21 de ses propres échantillons.
Les données statistiques sont les suivantes:

Différence moyenne	-0,01 g/l
Différence standard	0,26 g/l
Z-score	-0,03

Conclusion

Selon ce document et les essais effectués précédemment cette méthode est universelle.
Elle convient pour la détermination de la teneur en dioxyde de carbone dans tous les types de boissons alcooliques comme les bières, les vins, les vins de fruits, les cidres, les vins pétillants et les vins mousseux présentant un niveau de concentration de 0,3 g/l et plus.

(Tous droits réservés) Conformément à la jurisprudence, l'OIV décline toute responsabilité pouvant résulter des erreurs ou des omissions involontaires qui, malgré les soins apportés à la rédaction de l'ouvrage, auraient pu se produire. La reproduction des textes publiés dans cet ouvrage est interdite. Ils sont la propriété de l'OIV qui se réserve le droit de reproduction et de traduction dans le monde entier. La loi interdit les copies ou reproductions destinées à une utilisation collective. Toute représentation ou reproduction intégrale ou partielle faite par quelque procédé que ce soit sans le consentement de l'OIV est illicite et constitue une contrefaçon.

© OIV - 2026

ISBN: 978-2-85038-137-9

ORGANISATION INTERNATIONALE DE LA VIGNE ET DU VIN

1, rue Monge
21000 Dijon – France
Tél. +33 (0)1 44 94 80 80
Courriel : contact@oiv.int – www.oiv.int