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

VOLUME 2

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

ORGANISATION INTERNATIONALE
DE LA VIGNE ET DU VIN

www.oiv.int

Recueil

des méthodes internationales d'analyse
des vins et des moûts

VOLUME 2

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

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 Juillet 2026
ISBN 978-2-85038-138-6

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

Méthode OIV-MA-AS315-01 Méthode Type IV

Éthanal

(A37, révision par OIV/OENO 377/2009)

1. Principe de la méthode

L'éthanal est dosé dans le vin, décoloré au charbon, grâce à la coloration allant du vert au violet qu'il donne avec le nitro pentacyanoferrate II de sodium et la pipéridine et dont l'intensité est mesurée à 570 nm.

2. Appareillage

Spectrophotomètre permettant les mesures d'absorbance à la longueur d'onde de 570 nm avec des cuves de 1 cm de trajet optique.

3. Réactifs

3.1 *Solution de pipéridine ($C_5H_{11}N$) 10 p. 100 (v/v).*

A préparer extemporanément avant chaque dosage en mélangeant 2 ml de pipéridine avec 18 ml d'eau distillée.

3.2 *Solution nitroprussiate de sodium à 0,4 p. 100.*

Dans une fiole jaugée de 250 ml, faire dissoudre 1 g de nitroprussiate de sodium, Na_2 $[Fe(CN)_5$ $NO].2H_2O$, pulvérisé. Compléter au trait avec de l'eau distillée.

3.3 *Charbon actif*

3.4 *Acide chlorhydrique dilué à 25 p. 100 (v/v), (environ 102 g/l)*

3.5 *Solution alcaline*

Faire dissoudre 8,75 g d'acide borique dans 400 ml de solution M d'hydroxyde de sodium. Compléter à A l de l'eau distillée.

4. Mode opératoire

4.1 *Dosage*

A 25 ml environ de vin placés dans une fiole conique de 100 ml, ajouter 2 g de charbon actif. Agiter énergiquement pendant quelques secondes, laisser reposer 2 min. et filtrer sur un filtre plissé "lent" pour obtenir un filtrat limpide.

A 2 ml de filtrat incolore placés dans une fiole conique de 100 ml, ajouter en agitant 5 ml de solution de nitroprussiate de sodium et 5 ml de solution de pipéridine, mélanger et placer immédiatement le mélange dans la cuve de 1 cm de trajet optique d'un spectrophotomètre. La coloration produite, qui varie du vert au violet, est mesurée par rapport à la couche d'air équivalente sur la longueur d'onde 570 nm. Cette coloration augmente pour diminuer ensuite rapidement; choisir comme valeur définitive la valeur maximale de l'absorbance qui est obtenue après environ 50 secondes.

La teneur en éthanal contenue dans le liquide analysé est déduite d'une courbe d'étalonnage.

Remarque : Si, à titre exceptionnel, le liquide à analyser contenait de l'éthanal libre non combiné, il serait nécessaire, avant d'entreprendre la détermination de l'éthanal total, de le faire passer préalablement à l'état de combinaison avec le dioxyde de soufre. Pour ce faire, additionner une partie du liquide à analyser d'un petit excès de dioxyde de soufre libre et l'abandonner pendant quelques heures avant de procéder au dosage.

4.2. *Etablissement de la courbe d'étalonnage*

4.2.1 Solution mère d'éthanal combiné au dioxyde de soufre

Préparer une solution titrant 5 à 6 p. 100 (m/v) en dioxyde de soufre et déterminer son titre exact au moyen d'une solution titrée d'iode 0,05 M.

Dans une fiole jaugée de 1 l, placer le volume de cette solution qui correspond à 1500 mg de dioxyde de soufre. Introduire dans la fiole, au moyen d'un entonnoir, 1 ml environ d'éthanal fraîchement distillé et recueilli dans un mélange réfrigérant. Porter au litre avec de l'eau distillée. Mélanger et abandonner pendant une nuit.

La teneur exacte de cette solution mère en éthanal combiné doit être déterminée comme suit :

Placer dans une fiole conique de 500 ml de la solution mère et y ajouter 20 ml d'acide chlorhydrique dilué et 100 ml d'eau. Oxyder le dioxyde de soufre libre par la solution 0,05 M d'iode en présence d'empois d'amidon, en arrêtant le virage au bleu faible.

Ajouter 100 ml de la solution alcaline, la coloration bleue disparaît. Titrer le dioxyde de soufre combiné à l'éthanal par l'iode 0,05 M jusqu'à coloration bleue faible : soit *n* ml le volume versé.

La solution mère d'éthanal combiné à SO_2 contient donc 44,05 *n* mg d'éthanal par litre.

4.2.2 Préparation de la gamme

Dans les fioles jaugées de 100 ml placer successivement 5-10-15-20 et 25 ml de la solution mère. Porter au trait de jauge avec de l'eau distillée. Ces solutions correspondent à des teneurs en éthanal voisines de 40-60-120-160 et 200 mg/l. La teneur exacte des dilutions doit être calculée à partir de la teneur en éthanal de la solution mère déterminée précédemment.

Procéder au dosage de l'éthanal sur 2 ml de chacune de ces dilutions comme il est indiqué plus haut. La représentation graphique des absorbances de ces solutions en fonction de la teneur en éthanal est une droite qui ne passe pas par l'origine.

BIBLIOGRAPHIE

REBELEIN H., *Deutsche. Lebensmittel. Rundschau.,* 1970, **66,** 5-6.

Méthode OIV-MA-AS315-02A Méthode Type IV

Acétate d'éthyle

(Recueil OIV ed. 1990, révision par OIV/OENO 377/2009)

1. Principe des méthodes

L'acétate d'éthyle est déterminé par chromatographie en phase gazeuse sur le distillat du vin en présence d'un étalon interne.

2. Méthode de référence

2.1 *Appareillage* (voir chapitre *Méthanol*).

2.2.*Mode opératoire*

Préparer une solution hydroalcoolique à 1 g par litre de l'étalon interne (4–méthylpentan–2–ol), dans l'éthanol à 10% vol.

Préparer la solution à doser en ajoutant 5 ml de cette solution à 50 ml de distillat de vin obtenu comme il est indiqué au chapitre *Titre alcoométrique*.

Préparer une solution de référence d'acétate d'éthyle à 50 mg/l dans l'éthanol à 10% vol. Ajouter 5 ml de solution de l'étalon interne à 50 ml de cette solution.

Injecter dans le chromatographe 2 µl de la solution à doser et de la solution de référence, additionnées de l'étalon interne.

La température du four est de 90 °C et le débit du gaz vecteur de 25 ml par minute.

2.3 *Calculs*

S = la surface du pic de l'acétate d'éthyle dans la solution de référence.
S_x = la surface du pic de l'acétate d'éthyle dans la solution à doser.
i = la surface du pic de l'étalon interne dans la solution à doser.
I = la surface du pic de l'étalon interne dans la solution de référence.

La teneur en acétate d'éthyle, exprimée en milligrammes par litre, est donnée par la relation :

$$50 \times \frac{I}{i} \times \frac{S_x}{S}$$

Méthode OIV-MA-AS315-02B Méthode Type IV

Acétate d'éthyle

(Révision par OIV/OENO 377/2009)

1. Principe des méthodes

L'acétate d'éthyle est séparé par distillation à partir du vin amené à pH 6,5. Après saponification et concentration convenable en milieu alcalin, le distillat est acidifié et soumis à l'entraînement à la vapeur d'eau pour séparer l'acide acétique libéré par la saponification; cet acide est dosé par une solution alcaline titrée.

2. Méthode

2.1 *Réactifs*

2.1.1 Solution M d'hydroxyde de sodium

2.1.2 Solution tampon de pH 6,5

Dihydrogénophosphate de potassium, KH_2PO_4 ..... 25 g
Solution M d'hydroxyde de sodium ..... 50 ml
Eau q.s.p. ..... 1 litre

2.1.3 Acide tartrique cristallisé.

2.1.4 Solution 0,02 M d'hydroxyde de sodium.

2.1.5. Solution de phénolphthaleïne, 1 p. 100 dans l'alcool neutre à 96% vol.

2.2 *Mode opératoire*

Dans un ballon de 500 ml, introduire 100 ml de vin non décarboniqué et le neutraliser à l'aide de *n* ml de solution M d'hydroxyde de sodium, *n* étant le volume de solution 0,1 M d'hydroxyde de sodium utilisé pour le dosage de l'acidité totale de 10 ml de vin. Ajouter 50 ml de solution tampon de pH 6,5 et distiller. Le distillat doit être amené à l'aide d'un tube effilé dans 5 ml de solution M d'hydroxyde de sodium placés dans un ballon à fond rond de 500 ml sur lequel on a tracé un cercle délimitant approximativement le volume de 35 ml. Recueillir 30 ml de distillat.

Boucher le ballon et laisser une heure au repos. Concentrer ensuite le contenu du ballon à 10 ml environ en le plaçant sur un bain d'eau bouillante et en injectant un vif courant d'air du ballon. Laisser refroidir. Ajouter 3 g d'acide tartrique. Eliminer le dioxyde de carbone par agitation sous vide. Transvaser le liquide dans le barboteur d'un appareil à entraînement à la vapeur d'eau en rinçant le ballon deux fois avec 5 ml d'eau. Recueillir au moins 250 ml de distillat.

Titrer par la solution 0,02 M d'hydroxyde de sodium en présence de phénolphtaléine.

2.3 *Calcul*

Soit *n* le nombre de millilitres de solution 0,02 M d'hydroxyde de sodium versés. 1 ml correspond à 1,76 mg d'acétate d'éthyle.

Acétate d'éthyle en milligrammes par litre : 17,6 x *n*

BIBLIOGRAPHIE

PEYNAUD E., *Analyse et contrôle des vins,* Librairie Polytechnique Ch.-Béranger, 1958, 272.

Méthode OIV-MA-AS315-03 Méthode Type IV

Diglucoside du malvidol

(A18, révision par OIV/OENO 377/2009)

1. Principe

Le diglucoside du malvidol, oxydé par l'acide nitreux, est transformé en une substance présentant en milieu ammoniacal, en lumière ultraviolette, une vive fluorescence verte.

L'intensité de la fluorescence du composé formé est mesurée par comparaison avec la fluorescence d'une solution titrée de sulfate de quinine dont l'intensité de fluorescence a été étalonnée une fois pour toutes avec du diglucoside du malvidol de référence.

Le dioxyde de soufre libre atténuant la fluorescence, doit être préalablement combiné à de l'éthanal en excès.

2. Recherche qualitative

2.1 *Appareillage*

2.1.1 Lampe à lumière ultraviolette permettant des mesures à 365 nm.

2.2 *Réactifs*

2.2.1 Solution d'éthanal :

Paraldéhyde cristallisable	10 g
Alcool éthylique à 96% vol.	100 ml

2.2.2 Acide chlorhydrique M

2.2.3 Solution de nitrite de sodium à 10 g/l.

2.2.4 Alcool à 96% vol. contenant 5 p. 100 d'ammoniaque concentré (r_{20} = 0,92 g/ml).

2.2.5 Vin témoin contenant 15 mg de diglucoside du malvidol par litre.

2.2.6 Vin exempt de diglucoside du malvidol..

2.3 *Mode opératoire*

Dans un tube à essai, introduire :

- 10 ml de vin,
- 1,5 ml de solution d'éthanal.

Attendre 20 min.

Dans un tube à centriFugation de 20 ml de capacité, placer :

- 1 ml de vin traité à l'éthanal,
- 1 goutte d'acide chlorhydrique M,

- 1 ml de solution de nitrite de sodium.

Agiter; attendre 2 min. (5 min. au maximum); ajouter :

- 10 ml d'alcool ammoniacal.

Traiter dans les mêmes conditions 10 ml de vin témoin contenant 15 mg/l de diglucoside du malvidol. Agiter. Attendre 10 min. et centrifuger.

Décanter les liquides clairs surnageant dans des tubes à essais calibrés. Observer comparativement la fluorescence verte en lumière ultraviolette à 365 nm du vin à analyser et du vin témoin.

Pour les vins rosés, on peut augmenter la sensibilité en prenant :

- 5 ml de vin traité à l'éthanal,
- 0,2 ml d'acide chlorhydrique M,
- 1 ml de solution de nitrite de sodium,
- 5,8 ml d'alcool ammoniacal.

Traiter parallèlement le vin témoin.

2.4 *Interprétation*

Les vins ne donnant pas de fluorescence ou seulement une fluorescence nettement inférieure à celle du témoin, sont considérés comme ne contenant pas de diglucoside du malvidol; dans le cas de fluorescence légèrement inférieure, égale ou supérieure à celle du témoin, une détermination quantitative doit être effectuée.

3. Détermination quantitative

3.1. *Appareillage*

3.1.1. Appareil pour la mesure de la fluorescence :

- longueur d'onde d'excitation 365 nm,
- longueur d'onde du rayonnement fluorescent 490 nm.

3.1.2. Cuves en quartz de 1 cm de trajet optique.

3.2 *Réactifs*

3.2.1. Voire recherche qualitative

3.2.2. Solution de sulfate de quinine à 2 mg/l.

Préparer une solution contenant 10 mg de sulfate de quinine très pur dans 100 ml d'acide sulfurique 0,1 M. Diluer 20 ml de cette solution à 1 litre avec la solution 0,1 M d'acide sulfurique.

3.3 *Mode opératoire*

Traiter le vin suivant la méthode décrite à *Recherche qualitative,* la prise d'essai de vin traité à l'éthanal étant dans tous les cas (vins rouges et rosés) de 1 ml.

Placer la solution de sulfate de quinine à 2 mg/l dans la cuve de mesure et régler le fluorescimètre sur la pleine déviation (transmission T, égale à 100%) en agissant sur la largeur de fente ou la sensibilité.
Puis remplacer cette cuve par celle contenant le vin étudié : soit T_1 la valeur lue.

Si le pourcentage de transmission, T_1 est supérieur à 35, diluer le vin avec un vin exempt de diglucoside du malvidol dont la fluorescence doit être inférieure à 6 p. 100 (s'en assurer par un essai préalable).

Remarques :

1. L'acide salicylique (ou le salicylate de sodium) ajouté éventuellement au vin en vue de sa stabilisation préalablement à l'analyse, apporte une fluorescence parasite qui peut être éliminée par une extraction à l'éther.
2. Une fluorescence parasite est apportée dans le cas de l'addition de caramel.

3.4 *Calcul*

Une intensité de fluorescence de 1 correspond, pour un vin exempt de SO_2, dans les conditions opératoires ci-dessus mais traitement à l'éthanal excepté, à 0,426 mg de diglucoside du malvidol par litre de vin.

D'autre part, les vins rouges et rosés, ne contenant pas de diglucoside du malvidol, peuvent présenter une légère fluorescence correspondant à une valeur T de l'ordre de 6 p. 100.

La teneur du vin en milligrammes du diglucoside du malvidol par litre est donc de :

$$(T_1 - 6)\ 0{,}426 \times \frac{11{,}5}{10} = (T_1 - 6) \times 0{,}49$$

Si le vin a été dilué, multiplier le résultat par le facteur de dilution.

3.5 *Expression des résultats*

La teneur en diglucoside du malvidol est exprimée en milligrammes par litre de vin sans décimale.

BIBLIOGRAPHIE

DORIER P., VERELLE L., *Ann. Fals. Exp. Chim.,* 1966, **59,** 1.
GAROGLIO P.G., *Rivista Vitic. Enol.,* 1968, **21,** 11.
BIEBER H., *Deutsche Lebensmittel Rundschau,* 1967, 44-46.
CLERMONT Mlle S., SUDRAUD P., *F.V., O.I.V.,* 1976 n° 586.

Méthode OIV-MA-AS315-04 Méthode Type II

Carbamate d'éthyle

(Résolution OENO 8/98, révision par OIV/OENO 377/2009)

Dosage du carbamate d'éthyle dans les boissons alcoolisées : méthode de détection sélective par chromatographie en phase gazeuse/spectrométrie de masse.

(Applicable à la détermination du carbamate d'éthyle pour des concentrations comprises entre 10 et 200 µg/l).

(Attention : Respecter les consignes de sécurité pour les manipulations des produits chimiques, pour l'éthanol, l'acétone et les produits carcinogènes : carbamate d'éthyle et dichlorométhane. Se débarrasser des solvants usés de manière appropriée compatible avec les règles et les règlements écologiques applicables).

1. Principe de la méthode :

Le Carbamate de propyle est ajouté à un échantillon comme étalon interne, la solution est diluée avec de l'eau et est placée dans une colonne d'extraction en phase solide de 50 ml. Le carbamate d'éthyle et le carbamate de propyle sont élués avec du dichlorométhane.

L'éluat est concentré à l'aide d'un évaporateur rotatif sous vide. Le concentré est analysé par chromatographie en phase gazeuse (CG) la détection est effectuée par spectrométrie de masse par fragmentométrie en mode SIM (Selected ions monitoring).

2. Appareillage et conditions chromatographiques (donnés à titre d'exemple) :

2.1 *Chromatogramme en phase gazeuse/spectromètre de masse (CG/SM)* et éventuellement un passeur d'échantillons et système de traitement de données ou équivalent.

Colonne capillaire en silice greffée 30 m * x 0,25 mm ∅ int., 0,25 µm de film de type Carbowax 20M.

Mode opératoire : injecteur 180 °C, gaz vecteur hélium à 1 ml/min. et à 25 °C, injection selon la méthode « Splitless / split ».

Programme de température : 40 °C pendant 0,75 min., puis programmation à 10 °C/min. jusqu'à 60 °C, puis 3 °C/min. jusqu'à 150 °C **, aller jusqu'à 220 °C puis maintenir pendant 4,25 min. à 220 °C. Le temps de rétention

* Pour certains vins particulièrement riches, il peut s'avérer souhaitable d'utiliser une colonne capillaire de 50 m de long.

* * Pour certains vins particulièrement riches, il peut s'avérer souhaitable d'effectuer une programmation de température de 2 °C par minute.

spécifique du carbamate d'éthyle est de 23-27 min., celui du carbamate de propyle est de 27–31 min.
Chromatographe en phase gazeuse/spectromètre (CG/SM) interface : ligne de transfert 220 °C. Paramètres du spectromètre de masse mis au point manuellement avec de la perfluorotributylamine et optimisé pour une sensibilité de masse plus basse, mode acquisition SIM, délai solvant et temps de commencement de l'acquisition 22 min., temps de maintien/ion 100 ms.

2.2 *Evaporateur rotatif sous vide ou système de concentration de type Kuderna Danish.* (N.B. le taux de récupération du carbamate d'éthyle de l'échantillon test, C(g) doit être compris entre 90-110% pendant le processus).

2.3 *Fiole* - en forme de poire, 300 ml, col unique à rodage.

2.4 *Tube de concentration* - 4 ml, gradué, avec un joint à pellicule de téflon et bouchon.

3. Réactifs

3.1 *Acétone* - qualité LC. NB : Vérifier chaque lot avant usage par CG/SM concernant l'absence de réponse pour les ions de m/z 62, 74 et 89.

3.2 *Dichlorométhane* – NB : Analyser chaque lot avant usage par CG/SM après concentration 200 fois, concentration pour vérifier l'absence de réponse pour les ions de m/z 62, 74 et 89.

3.3 *Ethanol* - anhydre.

3.4 *Carbamate d'éthyle* (CE) solutions standards :

- (1) Solution « mère » - 1,00 mg/ml. Peser 100 mg CE (≥ 99% pureté) dans une fiole volumétrique de 100 ml et diluer avec de l'acétone.
- (2) Solution standard de travail - 10,0 µg/ml. Transférer 1 ml de la solution « mère » CE dans une fiole volumétrique de 100 ml et diluer avec de l'acétone jusqu'au trait de jauge.

3.5 *Carbamate de propyle* (CP), solutions standards :

- (1) Solution « mère » - 1,00 mg/ml. Peser 100 mg CP (qualité réactif) dans une fiole volumétrique de 100 ml et diluer avec de l'acétone jusqu'au trait de jauge.
- (2) Solution standard de travail 10,0 µg/ml. Transférer 1ml de la solution « mère » CP dans une fiole volumétrique de 100 ml et diluer avec de l'acétone jusqu'au trait de jauge.
- (3) Solution standard interne CP - 400 ng/ml. Transférer 4 ml de solution standard de travail CP dans une fiole volumétrique de 100 ml et diluer avec de l'eau jusqu'au trait de jauge.

3.6 *Solutions standards calibrées* CE - CP - Diluer les solutions standards de travail de CE, (d) (2), et CP (e) (2), avec du dichlorométhane pour obtenir :

(1) (100 ng CE et 400 ng CP)/ml,

(2) (200 ng CE et 400 ng CP)/ml,
(3) (400 ng CE et 400 ng CP)/ml,
(4) (800 ng CE et 400 ng CP)/ml,
(5) (1.600 ng CE et 400 ng CP)/ml.

3.7 *Echantillon test* - 100 ng CE/ml dans 40 % d'éthanol. Transférer 1 ml des solutions standards de travail CE, (d) (2) dans une fiole volumétrique de 100 ml et diluer avec 40 % d'éthanol jusqu'au trait de jauge.

3.8 *Colonne d'extraction en phase solide* - Matériel jetable, préemballé contenant de la terre de diatomées, capacité 50 ml.

NB : Avant analyse, vérifier chaque lot de colonnes d'extraction pour la récupération du CE et CP et l'absence de réponses pour les ions de m/z 62, 74 et 89. Préparer 100 ng CE/ml d'échantillon test (g).

Analyser 5,00 ml de l'échantillon test comme décrit dans D(a), E et F. La récupération de 90-110 ng de CE/ml est satisfaisante. Des absorbants dont le diamètre des particules est irrégulier peuvent entraîner des débits très lents qui affectent la récupération du CE et du CP.

Si, après plusieurs essais, 90-110 % de la valeur de l'échantillon test n'est pas obtenue, changer la colonne ou utiliser une courbe de calibration de récupération corrigée pour quantifier le CE.

Pour obtenir la courbe de calibration corrigée, préparer des solutions standards comme décrites dans (f) en utilisant 40 % d'éthanol au lieu du dichlorométhane.

Analyser 1 ml de la solution standard de calibration comme décrit en D, E et F.

Construire une nouvelle courbe d'étalonnage en utilisant le rapport CE/CP des standards extraits.

4. Préparation de l'échantillon test :

Placer le matériel test dans 2 bechers séparés de 100 ml en utilisant les quantités suivantes :

4.1. Vins contenant plus de 14 % vol. d'alcool : 5,00 ml ± 0,01 ml.

4.2. Vins contenant au plus 14% vol. d'alcool : 20,00 ml ± 0,01 ml.
Dans chaque becher, ajouter 1 ml de solution CP d'étalon interne, C(e) (3) et de l'eau, afin d'obtenir un volume total de 40 ml (ou 40 g).

5. Extraction :

Exécuter l'extraction sous la « hotte aspirante » avec une ventilation adéquate.

Transférer la préparation réalisée en D dans la colonne d'extraction.

Rincer le becher avec 10 ml de l'eau et transférer l'eau de rinçage dans la colonne.

Laisser le liquide s'absorber dans la colonne pendant 4 minutes - Eluer par 2 x 80 ml de dichlorométhane.

Recueillir l'éluat dans une fiole conique de 300 ml.

Evaporer l'éluat jusqu'à 2 à 3 ml à l'aide de l'évaporateur rotatif au bain-marie à 30 °C. (N.B. = ne pas laisser évaporer à sec).
Transférer le résidu concentré dans un tube gradué de 4 ml, à l'aide d'une pipette Pasteur.
Rincer la fiole avec 1 ml de dichlorométhane et transférer le liquide de rinçage dans le tube.
Concentrer l'échantillon à 1 ml sous un faible courant d'azote.
Transférer éventuellement le concentré dans une fiole du passeur d'échantillon pour l'analyse CG/SM.

6. Analyse CG/SM :

6.1 *Courbe de calibration* - injecter 1µl de chacune des solutions standards d'étalonnage C (f), en CG/SM.
Faire le graphique du rapport des aires CE-CP pour la réponse de l'ion m/z 62 sur l'axe des ordonnées et porter en abscisses la quantité de CE en ng/ml (soit 100,200, 400, 800, 1600 ng/ml).

6.2 CE *quantification* - injecter 1µl d'extrait concentré de E dans le système CG/SM et calculer le rapport des aires CE-CP pour l'ion m/z 62. Déterminer la concen-tration CE (ng/ml) dans l'extrait, en utilisant la courbe d'étalonnage standard interne. Calculer la concentration CE dans l'échantillon test (ng/ml) en divisant la quantité de CE (ng/ml) dans l'extrait par le volume de l'échantillon test (g).

6.3 *Vérification de la pureté du CE.*
Déterminer si les réponses pour les ions de m/z 62, 74 et 89 apparaissent au temps de rétention du CE. Ces réponses sont les caractéristiques respectivement des principaux fragments $(M - C_2H_2)^+$ et $(M - CH_3)^+$ et de l'ion moléculaire (M). La présence de CE est confirmée si les proportions relatives de ces ions ne dépassent pas 20% des proportions pour le standard en CE. L'extrait peut avoir besoin d'être reconcentré pour obtenir une réponse suffisante pour l'ion de m/z 89.

7. Analyse collaborative :

Le tableau ci-après montre les résultats individuels pour l'échantillon d'entraînement pratique et pour les deux types de vins.
L'application du test de Cochran a eu pour conséquence l'élimination d'un seul couple de résultats, tant pour le vin dont le titre alcoométrique est supérieur à 14% vol. que pour le vin dont le titre alcoométrique est inférieur ou égal à 14% vol., chacun venant d'un laboratoire différent.
La reproductibilité relative tend à décroître avec l'accroissement de la concentration en carbamate d'éthyle.

TABLEAU 1

Performance de la méthode pour la détermination de carbamate d'éthyle CE dans les boissons alcooliques par CG/SM.

Echantillon	Moyenne de CE trouvé ng/g	Récupération de CE ajouté %	S_r	S_R	RSD_r %	RSD_R%
Vin de plus de 14% vol.	40		1,59	4,77	4,01	12,02
	80	89	3,32	7,00	4,14	8,74
	162	90	8,20	11,11	5,05	6,84
Vin de moins de 14% vol	11		0,43	2,03	3,94	18,47
	25	93	1,67	2,67	6,73	10,73
	48	93	1,97	4,25	4,10	8,86

Méthode OIV-MA-AS315-05A Méthode Type IV

5–Hydroxyméthyl-furfural

(A19, révision par OIV/OENO 377/2009)

1. Principe des méthodes

1.1 *Méthode colorimétrique*

Les aldéhydes dérivés du furanne, dont le principal est le 5–hydroxyméthyl-furfural, réagissent avec l'acide barbiturique et la *p*–toluidine pour donner un composé rouge qui est dosé par colorimétrie à 550 nm.

L'acide sulfureux libre perturbe le dosage; lorsque sa teneur dépasse 10 mg/l, il faut l'éliminer au préalable en le combinant à l'éthanal dont un excès ne perturbe pas la réaction.

2. Méthode

2.1. *Appareillage*

2.1.1. Spectrophotomètre permettant des mesures entre 300 et 700 nm.
2.1.2. Cuves de verre, de trajet optique égal à 1 cm.

2.2. *Réactifs*

2.2.1. Acide barbiturique en solution à 0,5 p. 100 (m/v).

Dissoudre 500 mg d'acide barbiturique, $C_4O_3N_2H_4$ dans de l'eau distillée en chauffant légèrement sur bain d'eau à 100 °C; porter à 100 ml avec de l'eau distillée. La solution se conserve environ 1 semaine.

2.2.2. *p*–toluidine en solution à 10 p. 100 (m/v).

10 g de *p*–toluidine, $C_6H_4(CH_3)NH_2$ sont placés dans une fiole jaugée de 100 ml ; ajouter 50 ml d'isopropanol et 10 ml d'acide acétique glacial, (ρ_{20} = 1,05 g/ml); compléter à 100 ml avec de l'isopropanol. Cette solution doit être renouvelée tous les jours.

2.2.3. Éthanal en solution aqueuse à 1 p. 100 (m/v).

À préparer extemporanément.

2.2.4. 5–Hydroxyméthyl–furfural, $C_6O_3H_6$ en solution aqueuse à 1 g/l.

Préparer par dilutions successives des solutions titrant 5, 10, 20, 30 et 40 mg/l. La solution à 1 g/l et ses dilutions doivent être fraîchement préparées.

2.3. *Mode opératoire*

2.3.1.Préparation de l'échantillon

- Dioxyde de soufre libre inférieur à 10 mg/l.

Opérer le dosage directement sur 2 ml de vin ou de moût, filtré si nécessaire.

- Dioxyde de soufre libre supérieur à 10 mg/l.
  15 ml d'échantillon à analyser sont placés dans un ballon jaugé de 25 ml avec 2 ml de solution d'éthanal. Mélanger. Attendre 15 min. Porter au trait de jauge avec de l'eau distillée. Filtrer si nécessaire. Opérer le dosage sur 2 ml de la solution.

2.3.2. Dosage colorimétrique

Dans 2 flacons *a* et *b* de 25 ml bouchant émeri, placer 2 ml d'échantillon préparé comme il est indiqué en 2.3.1. Placer dans chaque flacon 5 ml de solution de *p*–toluidine ; mélanger. Ajouter dans le flacon *b* (témoin) 1 ml d'eau distillée, et dans le flacon *a* 1 ml de solution d'acide barbiturique. Agiter pour homogénéiser. Transvaser le contenu des flacons dans les cuves de 1 cm de trajet optique du spectrophotomètre. Le zéro de l'échelle des absorbances étant réglé sur le contenu du flacon *b* pour la longueur d'onde 550 nm, suivre la variation de l'absorbance du contenu du flacon *a*; relever sa valeur maximale A qui est atteinte entre 2 et 5 min.

Les échantillons dont la teneur en 5–hydroxyméthyl–furfural est supérieure à 30 mg/l doivent être dilués avant l'analyse.

2.3.3. Établissement de la courbe d'étalonnage

Dans 2 flacons *a* et *b* de 25 ml, placer 2 ml de chacune des solutions de 5–hydroxyméthyl–furfural à 5, 10, 20, 30 et 40 mg/l et les traiter comme il a été décrit en 2.3.2.

La représentation graphique des absorbances en fonction des teneurs en mg/l en 5–hydroxyméthyl–furfural des solutions-étalons est une droite passant par l'origine.

2.4. *Calculs*

La teneur en 5–hydroxyméthyl–furfural est obtenue en reportant sur la courbe d'étalonnage l'absorbance déterminée sur cet échantillon à analyser en tenant compte des dilutions éventuellement effectuées.

Elle est donnée en milligrammes par litre (mg/l) avec une décimale.

Méthode OIV-MA-AS315-05B Méthode Type IV

5–Hydroxyméthyl-furfural

(A19, révision par OIV/OENO 377/2009)

1. Principe des méthodes

Méthode par chromatographie liquide haute performance

Séparation sur colonne en phases inversées et détermination à 280 nm.
Les conditions opératoires décrites ci-dessous sont données à titre d'exemple.

2. Méthode par chromatographie liquide haute performance

2.1.*Appareillage*

2.1.1. Chromatographie en phase liquide haute performance équipée :

- d'un injecteur à boucle de 5 ou 10 µl,
- d'un détecteur, spectrophotomètre permettant des mesures à 280 nm,
- d'une colonne de silice sphérique greffée octadécyl,
- d'un enregistreur, éventuellement d'un intégrateur.
- Débit de la phase mobile : 1,5 ml/min.

2.1.2. Dispositif de filtration sur membrane (0,45 µm).

2.2. *Réactifs*

2.2.1. Eau bidistillée.

2.2.2. Méthanol distillé ou de qualité HPLC.

2.2.3. Acide acétique (ρ_{20} = 1,05 g/ml).

2.2.4. Phase mobile : eau-méthanol-acide acétique préalablement filtrés sur membrane (0,45 µm), (40 - 9 - 1 v/v).

Cette phase mobile doit être préparée chaque jour et dégazée avant utilisation.

2.2.5. Solution de référence de 5–hydroxyméthyl–furfural à 25 mg/l (m/v).

Placer, dans une fiole jaugée de 100 ml, 25 mg exactement pesés de 5–hydroxyméthyl–furfural et compléter au volume avec du méthanol. Diluer cette solution au 1/10e avec du méthanol et la filtrer sur membrane (0,45 µm).

Cette solution, placée au réfrigérateur en flacon de verre brun, hermétiquement fermé, se conserve 2 à 3 mois.

2.3. *Mode opératoire*

Injecter dans le chromatographe 5 (ou 10) µl de l'échantillon à analyser et 5 (ou 10) µl de solution de référence de 5–hydroxyméthyl–furfural. Enregistrer le chromatogramme.

Le temps de rétention du 5–hydroxyméthyl–furfural est voisin de 6-7 minutes.

2.4. *Expression des résultats*

La teneur en 5–hydroxyméthyl–furfural est exprimée en milligrammes par litre (mg/l) avec une décimale.

Méthode OIV-MA-AS315-06 Méthode Type II

Dérives cyanés

(Résolution OENO 4/94, OIV/OENO 377/2009)

1. Principe

L'acide cyanhydrique libre et total du vin est libéré par hydrolyse acide et séparé par distillation. Après réaction avec la chloramine T et la pyridine, le dialdéhyde glutaconique formé est dosé par colorimétrie grâce à la coloration bleue qu'il donne avec l'acide diméthyl–1,3 barbiturique.

2. Appareillage

2.1. Appareille de distillation.
Utiliser l'appareil de distillation décrit pour la détermination de l'alcool du vin.

2.2. Ballon de 500 ml à rodage normalisé.

2.3. Bain d'eau, thermostaté à 20°C.

2.4. Spectrophotomètre permettant les mesures d'absorbance à la longueur d'onde de 590 nm.

2.5. Cuves de verre ou cuves à usage unique de 20 mm de trajet optique.

3. Réactifs

3.1. Acide phosphorique (H_3PO_4) à 25 p. 1000 (m/v).

3.2. Solution de chloramine T($C_7H_7ClNNa\ O_2S, 3H_2O$) 3 p. 100 (m/v)

3.3. Solution d'acide 1,3-diméthylbarbiturique : dissoudre 3,658 g de l'acide 1,3-diméthylbarbiturique ($C_6H_8N_2O_3$) dans 15 ml de pyridine et 3 ml d'acide chlorhydrique (020 = 1,19 g/ml) et compléter à 50 ml avec de l'eau distillée.

3.4. Cyanure de potassium (KCN).

3.5. Solution d'iodure de potassium (KI) 10 p. 100 (m/v).

3.6. Solution de nitrate d'argent ($AgNO_3$), 0,1 M.

4. Mode opératoire

4.1. Distillation :

Dans le ballon de 500 ml (2.2.) placer 25 ml de vin, 50 ml d'eau distillée, 1 ml d'acide phosphorique (3.1.) et quelques perles de verre.

Mettre immédiatement en place le ballon sur l'appareil à distiller.

Amener le distillat au moyen d'un tube effilé dans une fiole jaugée de 50 ml contenant 10 ml d'eau. La file jaugée est immergée dans de l'eau glacée. Recueillir 30-35 ml de distillat (soit environ 45 ml de liquide total dans la fiole jaugée).

Laver le tube effilé du réfrigérant avec quelques millilitres d'eau distillée, porter à 20°C le distillat et amener au trait de jauge avec de l'eau distillée.

4.2. Mesure :

Placer 25 ml de distillat dans une fiole conique de 50 ml munie d'un bouchon rodé, ajouter 1 ml de solution de chloramine T (3.2.) et boucher hermétiquement.

Après 60 secondes exactement ajouter 3 ml de solution d'acide diméthyl–1,3 barbiturique (3.3.), boucher hermétiquement et laisser au repos pendant 10 minutes.

Ensuite mesurer l'absorbance par rapport au témoin (25 ml d'eau distillée au lieu de 25 ml de distillat) à la longueur d'onde 590 nm dans les cuves de 20 mm de trajet optique.

5. Etablissement de la courbe d'étalonnage

5.1. Titrage argentimétrique du cyanure de potassium.

Dans une fiole jaugée de 300 ml dissoudre environ 0,2 g de KCN (3.4.) exactement pesé dans 100 ml d'eau distillée.

Ajouter 0,2 ml de solution d'iodure de potassium (3.5.) et tirer avec la solution de nitrate d'argent 0,1 M (3.6.) jusqu'à obtention d'une coloration jaunâtre stable.

1 ml de solution 0,1 M de nitrate d'argent correspondant à 13,2 mg de KCN, calculer le titre de' l'échantillon de KCN.

5.2. Courbe d'étalon.

5.2.1. Préparation des solutions étalons :

Connaissant le titre déterminé selon 5.1. du KCN, préparer une solution étalon contenant 30 mg/l d'acide cyanhydrique (30 mg HCN – 72,3 mg KCN).

Diluer cette solution au $^1/_{10}$.

Introduire 1,0- 2,0- 3,0- 4,0 et 5,0 ml de la solution étalon diluée dans des fioles jaugées de 100 ml et amener au trait de jauge avec de l'eau distillée.

Les solutions préparées titrent respectivement 30-60-90-120 et 150 µg/l d'acide cyanhydrique.

5.2.2. Dosage :

Prélever 25 ml des solutions ainsi obtenues et continuer comme il est indiqué ci-dessus en 4.1 et 4.2.

Les valeurs obtenues pour les absorbances avec ces solutions étalons reportées en fonction des teneurs en acide cyanhydrique correspondantes, s'alignent sur une droite passant par l'origine.

6. Expression des résultats

L'acide cyanhydrique est exprimé en microgrammes par litre (µg/l) sans décimale.

6.1. Calcul

Lire la teneur en acide cyanhydrique sur la courbe d'étalonnage.

Si une dilution a été effectuée, multiplier le résultat par le facteur de dilution.

Répétabilité (r) et reproductibilité (R)

Vin blanc = r 3,1 µg/l soit environ 6% • x_i

= R 12 µg/l soit environ 25% • x_i

Vin rouge = r 6,4 µg/l soit environ 8% • x_i

= R 23 µg/l soit environ 29% • x_i

x_i = concentration moyenne de HCN dans le vin.

BIBLIOGRAPIE

1) JUNGE C., Feuillet Vert N° 877 (1990)
2) ASMUS E., Garschlagen H., Z. Anal. Chem. 138, 413-422 (1953)
3) WÜRDIG G., MÜLLER Th., Die Weinwissenschaft 43, 29-37 (1988)

Méthode OIV-MA-AS315-07A Méthode Type IV

Recherche des édulcorants de synthèse

(A36, révision par OIV/OENO 377/2009)

1. Principe des méthodes

Recherche de la saccharine (sulfimide benzoïque), de la dulcine (*p*–éthoxyphénylurée), du cyclamate (cyclohexylsulfamate) et du P-4000 (2N propoxy-2-amino-4-nitrobenzène).

Après concentration du vin, la saccharine, la dulcine et le P-4000 sont extraits en milieu acide par le benzène; le cyclamate est extrait du vin après cette extraction benzénique par l'acétate d'éthyle (il est nécessaire de respecter l'ordre de ces extractions). Les résidus d'évaporation des solvants sont soumis à la chromatographie en couche mince.

La saccharine et le cyclamate sont caractérisés par chromatographie sur plaque de cellulose (solvant : acétone-acétate d'éthyle-ammoniaque), la première dans l'extrait benzénique, le second dans l'extrait par l'acétate d'éthyle après purification par un lavage à l'éther.

Ces édulcorants, décelés par pulvérisation d'une solution de benzidine-aniline-acétate cuivrique, se séparent avec les Rf suivants : 0,29 pour le cyclamate, 0,46 pour la saccharine.

Le P-4000 et la dulcine sont caractérisés par chromatographie sur couche de polyamide, dans l'extrait benzénique (solvant : toluène-méthanol-acide acétique glacial). Ces édulcorants, mis en évidence par pulvérisation d'une solution de *p*-diméthylaminobenzaldéhyde, se séparent avec les Rf suivants : 0,60 pour la dulcine, 0,80 pour le P-4000.

2. Méthode

Recherche de la saccharine, du cyclamate, de la dulcine et du P-4000.

2.1 *Appareillage*

2.1.1 Cuve à chromatographie

2.1.2 Seringues Micrométriques ou micropipettes

2.1.3 Tube séparateur de 15 mm de diamètre et 180 mm de longueur, muni d'un robinet

2.1.4 Bain d'eau à 100 °C

2.1.5 Étuve à température réglable, pouvant atteindre 125 °C

2.2 *Réactifs*

2.2.1 Solvants d'extraction :

- benzène
- acétate d'éthyle.

2.2.2 Solvants pour chromatographie :

No.1, mélanger :

acétone	60 parties
acétate d'éthyle	30 parties
ammoniaque concentré (ρ_{20}= 0,92 g/ml)	10 parties

No 2, mélanger :

toluène	90 parties
méthanol	10 parties
acide acétique glacial (ρ_{20}= 1,05 g/ml)	10 parties

2.2.3. Plaques pour la chromatographie (20 x 20 cm) :

- avec couche de poudre de cellulose (par ex., Whatman CC 41 ou Macherey-Nagel MN300),
- avec couche de poudre de polyamide (par ex., Merck).

2.2.4 Réactif de révélation pour la saccharine et le cyclamate

Préparer :

- solution alcoolique de benzidine à 250 mg dans 100 ml d'éthanol,
- solution saturée d'acétate cuivrique $Cu(C_2H_3O_2)_2.H_2O$,
- aniline fraîchement distillée.

Mélanger : 15 ml de solution de benzidine, 1 ml d'aniline et 0,75 ml de solution saturée d'acétate cuivrique.

Cette solution doit être préparée extemporanément. Elle correspond au volume nécessaire pour la révélation d'une plaque 20 x 20 cm.

2.2.5 Acide chlorhydrique dilué au ½ (*v*/*v*),

2.2.6 Acide nitrique en solution 25 p. 100 (*v*/*v*),

2.2.7 Réactif de révélation pour le P-4000 et la dulcine : dissoudre 1 g de 1,4–*p*–diméthylaminobenzaldéhyde dans 50 ml de méthanol; ajouter 10 ml 25% d'acide nitrique à 25 p. 100; porter à 100 ml avec du méthanol. Utiliser 15 ml de ce réactif pour la révélation d'une plaque 20 x 20 cm.

2.2.8 Solution hydroalcoolique de cyclamate à 0,10 g p.100

Dissoudre 100 mg de sel de sodium ou de sel de calcium de l'acide cyclohéxylsulfamique dans 100 ml d'un mélange à parties égales d'eau et d'éthanol.

2.2.9 Solution aqueuse de saccharine à 0,05 g p. 100 (m/v)

2.2.10 Solution de dulcine à 0,05 g p/ 100 ml de méthanol.

2.2.11 Solution de P-4000 à 0,05 g dans 100 ml de méthanol.

2.3 *Mode opératoire*

2.3.1 Extraction

100 ml de vin, placés dans un vase cylindrique, sont évaporés rapidement à l'ébullition jusqu'à réduction du volume à 30 ml, tout en dirigeant un jet d'air froid à la surface du récipient. Laisser refroidir. Aciduler avec 3 ml d'acide chlorhydrique dilué au ½. Transvaser dans une fiole conique de 500 ml munie d'un bouchon rodé, ajouter 40 ml de benzène et agiter avec un agitateur mécanique pendant 30 min. Transvaser dans une ampoule à décantation pour séparer la phase organique qui sera centrifugée en cas d'émulsion. Placer la phase organique dans une fiole conique à bouchon rodé.

Verser le vin déjà extrait par le benzène, et qui correspond à la couche inférieure dans l'ampoule à décantation, dans une fiole conique de 500 ml à bouchon rodé, avec 40 ml d'acétate d'éthyle. Agiter 30 min. et séparer la phase organique comme précédemment en prenant soin de récupérer uniquement la fraction organique et de ne pas entraîner de vin.

Sur un bain d'eau à 100 °C, évaporer chaque solvant d'extraction dans des capsules de 50-60 mm de diamètre, par petites portions et en projetant un courant d'air froid sur la surface des capsules. Continuer l'évaporation jusqu'à ce que le résidu ait une consistance sirupeuse, en s'arrêtant avant l'évaporation complète.

Reprendre le résidu de la capsule où l'on a évaporé l'extrait benzénique avec 0,5 ml de solution d'éthanol-eau (1:1) (il convient de reprendre le résidu une première fois avec 0,25 ml de solution hydroalcoolique et ensuite de laver la capsule avec une autre portion de 0,25 ml de la même solution). Réunir l'extrait hydroalcoolique dans un petit tube à bouchon rodé (extrait B).

Le résidu de la capsule dans laquelle l'acétate d'éthyle (qui contient le cyclamate) a été évaporé, est repris par 0,5 ml d'eau que l'on verse dans un petit tube séparateur. Laver la capsule avec 10 ml d'éther éthylique et ajouter l'éther au contenu du tube séparateur. Agiter énergiquement pendant 2 min. et séparer la couche inférieure dans un petit tube à essai dans lequel aura été préalablement placé 0,5 ml d'éthanol. On obtient au total 1 ml de solution hydroalcoolique qui contient éventuellement le cyclamate (extrait A).

2.3.2 Chromatographie

2.3.2.1 *Saccharine et cyclamate*

Pour la recherche de la saccharine et du cyclamate, utiliser une plaque de cellulose, la moitié de la plaque pour la recherche du cyclamate et l'autre moitié pour celle de la saccharine.

Pour cela, déposer 5 à 10 µl de l'extrait A et 5µl de la solution étalon de cyclamate. Déposer ensuite sur la 2ème partie de la plaque 5 à 10 µl de l'extrait

B et 5 µl de la solution étalon de saccharine. Placer la plaque ainsi préparée dans la cuve à chromatographie contenant le solvant n° 1 (acétone-acétate d'éthyle-ammoniaque); laisser migrer jusqu'à une hauteur de 10 à 12 cm.

Retirer la plaque de la cuve et sécher avec de l'air chaud. Pulvériser régulièrement et doucement la plaque avec le réactif à la benzidine (17-18 ml pour chaque plaque). Sécher la plaque à l'air froid. Placer ensuite la plaque dans une étuve maintenue à 120-125 °C pendant 3 min. Les spots apparaissent en gris foncé sur fond marron clair; ils brunissent avec le temps.

2.3.2.2 *P-4000 et dulcine*

Déposer 5 µl de l'extrait B et 5 µl des solutions étalons de dulcine et de P-4000 sur une plaque de polyamide. Placer la plaque ainsi préparée dans la cuve à chromatographie qui contient le solvant n° 2 (toulène-méthanol acide acétique). Laisser migrer jusqu'à une hauteur de 10 à 12 cm.

Retirer la plaque de la cuve; sécher à l'air froid. Ensuite, pulvériser avec 15 ml de réactif à la *p*diméthylaminobenzaldéhyde, puis sécher à l'air froid jusqu'à ce qu'apparaissent les spots de couleur jaune orangée qui correspondent à la dulcine et au P-4000.

2.3.2.3 *Sensibilité*

Le réactif à la benzidine permet de mettre en évidence des spots correspondant à 2 µg de saccharine et 5 µg de cyclamate. Le réactif au *p*-diméthylaminobenzaldéhyde décèle 0,3 µg de dulcine et 0,5 µg de P-4000.

Cette méthode permet de déceler (compte tenu du rendement de certaines extractions) :

saccharine	2-3 mg/l
cyclamate	40-50 mg/l
dulcine	1 mg/l
P-4000	1 à 1,5 mg/l

BIBLIOGRAPHIE

TERCERO C., *F.V., O.I.V.,* 1968, n° 277 et *F.V., O.I.V.,* 1970, n° 352.
Commission d'analyse des vins du Service fédéral de la Santé d'Allemagne, 1969, *F.V., O.I.V.,* n° 316.
Fédération internationale des producteurs de jus de fruits, 1972, *F.V., O.I.V.,* n° 40.
SALO T., ALRO E. et SALMINEN K., *Z. Lebensmittel Unters. u. Forschung,* 1964, **125,** 20.

Méthode OIV-MA-AS315-07B Méthode Type IV

Recherche des édulcorants de synthèse

(A36 ; révision par OIV/OENO 377/2009)

1. Principe des méthodes

Recherche de la saccharine, de la dulcine et du cyclamate.

Ces édulcorants, extraits du vin par un échangeur d'ions liquide, puis réextraits par l'ammoniaque dilué, sont caractérisés par chromatographique sur couche mince d'un mélange de poudre de cellulose et de poudre de polyamide (solvant : xylène-propanol; *n*-acide acétique cristallisable-acide formique). Ils sont mis en évidence grâce à leur fluorescence bleue sur fond jaune que l'on observe en lumière ultraviolette après pulvérisation d'une solution de 2,7−dichlorofluorescéine.

Une pulvérisation ultérieure de solution de 1,4-dimeéhylaminobenzaldéhyde permet de différencier la dulcine, qui donne seule un spot orange, d'avec la vanilline et les esters de l'acide *p*hydroxybenzoïque qui migrent avec le même Rf.

3. Méthode

Recherche de la saccharine, du cyclamate et de la dulcine.

3.1 *Appareillage*

3.1.1 Dispositif pour l'étalement en coche mince,

3.1.2 Plaque de verre 20 x 20 cm

Préparation des plaques : mélanger intimement à sec 9 g de poudre de cellulose et 6 g de poudre de polyamide. Ajouter en agitant 60 ml de méthanol. Etaler sur plaques sur une épaisseur de 0,25 mm. Sécher pendant 10 min. à 70 °C. Les quantités mises en œuvre suffisent pour la préparation de 5 plaques.

3.1.3 Bain-marie à température réglable ou évaporateur rotatif,

3.1.4 Lampe à rayonnement U.V. pour examen des plaques à chromatographie.

3.2 *Réactifs*

3.2.1 Éther de pétrole (40-60°)

3.2.2 Échangeur d'ions liquide par exemple Amberlite LA-2

3.2.3 Acide acétique dilué au 1/5 (*v*/*v*)

3.2.4 Solution d'échangeur d'ions : 5 ml d'échangeur d'ions sont vigoureusement agités avec 95 ml d'éther de pétrole et 20 ml d'acide acétique dilué au 1/5 (v/v). On emploie la phase supérieure.

3.2.5 Acide nitrique en solution 1 M

3.2.6 Acide sulfurique à 10 p. 100 (*v/v*)

3.2.7 Ammoniaque diluée au ¼ (*v/v*)

3.2.8 Poudre de polyamide, par exemple : Macherey-Nagel ou Merck

3.2.9 Poudre de cellulose, par exemple : Macherey-Nagel MN 300 AC.

3.2.10 Solvant pour chromatographie :

xylène	45 parties
Propan–1–ol	6 parties
Acide acétique cristallisable (ρ_{20}= 1,05 g/ml)	7 parties
Acide formique 98-100%	2 parties

3.2.11 Révélateurs :

- solution à 0,2 g.p. 100 de 2,7-dichlorofluorescéine dans l'éthanol (*m/v*),
- solution de *p*–diméthylaminobenzaldéhyde : dissoudre 1 g de *p*–diméthylaminobenzaldéhyde placé dans une fiole jaugée de 100 ml avec environ 50 ml d'éthanol. Ajouter 10 ml d'acide nitrique dilué à 25 p. 100 (*v/v*), et porter au trait avec de l'éthanol.

3.2.12 Solution étalons :

- solution de dulcine, à 0,1 g p. 100ml dans le méthanol,
- solution de saccharine à 0,1 g p. 100 ml dans un mélange de méthanol et d'eau à parties égales,
- solution de cyclamate : solution contenant 1 g du sel de sodium ou du sel de calcium de l'acide cyclohexylsulfamique dans 100 ml d'un mélange de méthanol et d'eau à parties égales,
- solution de vanilline à 1 g p. 100 ml dans un mélange de méthanol et d'eau à parties égales,
- solution d'ester de l'acide *p*-hydroxybenzoïque à 1 g p. 100 ml dans le méthanol.

3.3 *Mode opératoire :*

50 ml de vin sont placés dans une ampoule à décanter, acidifiés par 10 ml d'acide sulfurique dilué et extraits à deux reprises par 25 ml, à chaque fois, de la solution d'échangeur d'ions. Les 50 ml de solution d'échangeur d'ions sont lavés à trois reprises avec, à chaque fois, 50 ml d'eau distillée que l'on rejette, puis à trois reprises avec, à chaque fois, 15 ml d'ammoniaque dilué. Les solutions ammoniacales réunies sont ensuite évaporées prudemment

à 50 °C jusqu'à sec sur un bain-marie ou dans un évaporateur rotatif. Le résidu est repris par 5 ml d'acétone et 2 gouttes d'acide nitrique en solution M, filtré et de nouveau évaporé à sec à 70 °C sur un bain-marie. Il faut éviter de chauffer trop longtemps et au-dessus de 70 °C. Le résidu est repris par 1 ml de méthanol.

5 à 10 µl de cette solution et 2 µl des solutions étalons sont déposés sur la plaque. On laisse migrer le solvant (xylène-propanol-acide acétique-acide formique) sur une hauteur de 15 cm environ, ce qui demande environ 1 heure.

Après séchage à l'air, la solution de dichlorofluorescéine est pulvérisée, en insistant, sur la plaque. L a saccharine et le cyclamate apparaissent aussitôt sous forme de taches claires sur fond couleur saumon. Par examen en lumière ultraviolette (254 ou 360 nm), les trois édulcorants apparaissent fluorescents en bleu sur fond jaune.

Les édulcorants se séparent, de bas en haut de la plaque, dans l'ordre suivant : cyclamate, saccharine, dulcine.

La vanilline et les esters de l'acide *p*-hydroxybenzoïque migrent avec le même rf que la dulcine. Pour identifier la dulcine en présence de ces substances, la plaque doit être ensuite pulvérisée avec une solution de *p*–diméthylaminobenzaldéhyde. La dulcine apparaît sous forme d'une tache orange, tandis que les autres substances ne réagissent pas.

Sensibilité – La quantité limite décelée sur la plaque à chromatographie est de 5 µg pour les trois substances.

Cette méthode permet de déceler :

- saccharine ..... 10 mg/l
- cyclamate ..... 50 mg/l
- dulcine ..... 10 mg/l

BIBLIOGRAPHIE

TERCERO C., *F.V., O.I.V.,* 1968, n° 277 et *F.V., O.I.V.,* 1970, n° 352.
Commission d'analyse des vins du Service fédéral de la Santé d'Allemagne, 1969, *F.V., O.I.V.,* n° 316.
Fédération internationale des producteurs de jus de fruits, 1972, *F.V., O.I.V.,* n° 40.
SALO T., ALRO E. et SALMINEN K., *Z. Lebensmittel Unters. u. Forschung,* 1964, **125,** 20.

Méthode OIV-MA-AS315-08 Méthode Type IV

Recherche des colorants de synthèse

(A43, révision par OIV/OENO 377/2009)

1. Principe

Le vin concentré au $^1/_3$ de son volume est alcalinisé par de l'hydroxyde de sodium en solution diluée et extrait par l'éther. La phase éthérée, lavée à l'eau, est extraite par une solution diluée d'acide acétique ; cette solution acétique, alcalinisée par l'ammoniaque, est portée à l'ébullition, en présence d'un fragment de laine mordancée par le sulfate d'aluminium et le tartrate acide de potassium. Le colorant éventuellement présent se fixe sur la laine. Il est remis en solution par traitement de la laine par l'acide acétique dilué. Après l'évaporation de la solution acétique, le résidu repris par une solution hydroalcoolique est analysé par chromatographie sur couche mince pour caractériser le colorant.

La phase aqueuse restant après l'extraction par l'éther renferme les colorants à caractère acide éventuellement présents. On les extrait en mettant à profit leur affinité pour les fibres animales qu'ils teignent d'une façon énergique : on passe en milieu acide minéral et on les fixe sur un mouchet de laine.

Pour concentrer la matière colorante, on effectue une double fixation ou même plusieurs fixations successives sur des mouchets de laine de plus en plus petits.

Si le mouchet de laine est coloré, le vin a été additionné d'un colorant synthétique que l'on caractérise par chromatographie sur couche mince.

2. Appareillage

2.1 Plaque de verre 20 x 20 recouvertes de poudre de cellulose,

2.2 Cuve à chromatographie

3. Réactifs

3.1 Ether sulfurique

3.2 Hydroxyde de sodium en solution à 5 p. 100 (*m/v*)

3.3 Acide acétique cristallisable (ρ_{20} = 1,05 g/ml)

3.4 Acide acétique dilué, contenant une partie d'acide acétique pur cristallisable pour 18 parties d'eau,

3.5 Acide chlorhydrique dilué : à une partie d'acide chlorhydrique pour analyse (ρ_{20} = 1,19 g/ml), ajouter 10 parties d'eau distillée,

3.6 Ammoniaque (ρ_{20} = 0,92 g/ml)

3.7 Fils de laine blanche, préalablement lavés, dégraissés à l'éther et séchés,

3.8 Fils de laine blanche, préalablement lavés, dégraissés à l'éther, séchés et mordancés.

Mordançage : Dissoudre 1 g de sulfate d'aluminium cristallisé $Al_2(SO_4).18H_2O$ et 1,2 g de tartrate acide de potassium dans 500 ml d'eau. Placer 10 g de fils de laine blanche, préalablement lavés, dégraissés à l'éther et séchés dans ce bain et agiter pendant 1 h. Laisser reposer 2 à 3 h ; égoutter, laisser sécher à température ambiante.

3.9 Solvant No.1 pour la chromatographie des colorants à caractère basique :

butan–1–ol ..... 50 ml
éthanol ..... 25 ml
acide acétique (ρ_{20} = 1,05 g/ml) ..... 10 ml
eau distillée ..... 25 ml

3.10 Solvant No.2 pour chromatographie des colorants à caractère acide :

butan–1–ol ..... 50 ml
éthanol ..... 25 ml
ammoniaque (ρ_{20} = 1,05 g/ml) ..... 10 ml
eau distillée ..... 25 ml

4. Mode opératoire

4.1 *Recherche des colorants à caractère basique*.

4.1.1 Extraction des matières colorantes.

200 ml de vin places dans une fiole conique de 500 ml sont portés à l'ébullition que l'on maintient jusqu'à réduction au 1/3 du volume.

Après refroidissement, neutraliser avec la solution d'hydroxyde de sodium 5 p. 100 jusqu'à virage franc de la couleur naturelle du vin.

Extraire à deux reprises avec 30 ml d'éther. Les phases éthérées sont réunies ; elles renferment les colorants basiques éventuellement présents ; le résidu d'extraction doit être conservé en vue de la recherche des colorants acides.

L'éther d'extraction est lavé deux fois avec 5 ml d'eau dans le but d'éliminer l'hydroxyde de sodium ; il est agité avec 5 ml d'acide acétique dilué. La phase aqueuse acide obtenue est colorée si l'on est en présence de colorant basique.

La présence de ce colorant peut être confirmée par sa fixation sur la laine mordancée. La phase aqueuse acide obtenue ci-dessus est alcalinisée par l'ammoniaque à 5 p. 100. Ajouter 0,5 g de laine mordancée ; porter à l'ébullition pendant 5 min. Rincer la laine sous un courant d'eau. Si la laine est colorée, le vin contient un colorant basique.

4.1.2 Caractérisation par chromatographie sur couche mince.

La phase aqueuse acétique contenant le colorant basique est concentrée jusqu'à 0,5 ml.

Si le colorant a été fixé sur un mouchet de laine, celui-ci est traité à l'ébullition par 10 ml d'eau distillée et 10 gouttes d'acide acétique (ρ_{20} = 1,05 g/ml). Retirer le fragment de laine après l'avoir essoré. Concentrer la solution jusqu'à 0,5 ml.

Déposer sur la plaque de cellulose 20 µl de cette solution concentrée à 3 cm du bord latéral et à 2 cm du bord inférieur de la plaque.

Mettre la plaque en place dans la cuve contenant le solvant n° 1 de façon à ce que son bord inférieur soit immergé dans le solvant sur une hauteur de 1 cm.

Lorsque le front du solvant a migré sur un hauteur de 15 à 20 cm, retirer la plaque de la cuve. La laisser sécher à l'air.

Identifier le colorant au moyen de solutions de colorants de synthèse à caractère basique déposées simultanément sur le chromatogramme.

4.2 *Recherche des colorants à caractère acide*

4.2.1 Extraction des matières colorantes.

Utiliser le résidu du vin concentré au 1/3 et neutralisé après son extraction par l'éther en vue de la recherche des colorants à caractère basique.

Si cette recherche ne s'impose pas, partir de 200 ml de vin, les placer dans une fiole conique, porter à l'ébullition jusqu'à réduction au 1/3.

Dans l'un ou l'autre cas, ajouter 3 ml d'acide chlorhydrique dilué et 0,5 g de laine blanche : faire bouillir durant 5 min., décanter le liquide et laver la laine à l'eau courante.

Dans la fiole conique, qui contient la laine, ajouter 100 ml d'eau et 2 ml d'acide chlorhydrique dilué; faire bouillir durant 5 min., décanter le liquide acide et répéter ce traitement jusqu'à ce que le liquide de lavage soit incolore.

Après avoir bien lavé la laine pour éliminer complètement le liquide acide, la remettre dans la fiole conique avec 50 ml d'eau distillée et 10 gouttes d'ammoniaque (ρ_{20} = 0,92 g/ml) : porter à une douce ébullition pendant 10 min. afin de dissoudre la matière colorante artificielle qui s'est éventuellement fixée sur la laine.

Retirer la laine de la fiole, porter le volume de liquide à 10 ml et faire bouillir jusqu'à évaporation complète de l'ammoniaque. Aciduler avec 2 ml d'acide chlorhydrique dilué (vérifier que la réaction du liquide soit franchement acide en portant 1 goutte de ce liquide sur du papier indicateur).

Mettre dans la fiole 60 mg (20 cm environ de fil courant) de laine blanche et faire bouillir durant 5 min.; retirer la laine et la rincer dans de l'eau courante.

Si, après cette opération, la laine est colorée en rouge, lorsqu'il s'agit de vin rouge, ou en jaune s'il s'agit de vin blanc, la présence de matière colorante organique artificielle, de nature acide, est prouvée.

Si la coloration est faible ou douteuse, répéter le traitement à l'ammoniaque et faire une seconde fixation sur un fil de laine de 30 mg.

Si au cours de cette seconde fixation, une coloration rosée, même faible mais nette, est obtenue, conclure à la présence d'un colorant acide.

Si nécessaire pour une plus complète analyse, procéder à de nouvelles fixations-élutions (jusqu'à 4 ou 5) en opérant toujours de façon identique à celle employée pour la seconde fixation jusqu'à ce qu'une coloration rosée, même pâle mais nette, soit obtenue.

4.2.2 Caractérisation par chromatographie sur couche mince.

Le mouchet de laine coloré est traité à l'ébullition par 10 ml d'eau distillée et 10 gouttes d'ammoniaque (ρ_{20} = 0,92 g/ml). Retirer le fragment de laine après avoir l'avoir essoré. Concentrer la solution ammoniacale jusqu'à 0,5 ml.

Déposer sur une plaque de cellulose 20 µl de cette solution à 3 cm du bord latéral et 2 cm du bord intérieur de la plaque.

Mettre la plaque en place dans la cuve de façon, à ce que son bord inférieur soit immergé dans le solvant sur une hauteur de 1 cm.

Lorsque le front du solvant a migré sur une hauteur de 15 à 20 cm, retirer le plaque de la cuve; la laisser sécher à l'air.

Identifier le colorant au moyen de solutions de colorants de synthèse déposées simultanément sur le chromatogramme.

BIBLIOGRAPHIE

TERCERO C., *F.V., O.I.V.,* 1970, n° 356.
ARATA P., SAENZ-LASCANO-RUIZ, Mme I., *F.V., O.I.V.,* 1967, n° 229.

Méthode OIV-MA-AS315-09 Méthode Type IV

Diéthylèneglycol

(2–hydroxy-éthoxyéthanol)
(Recueil OIV ed.1990, révision par OIV/OENO 377/2009)

1 Objectif

Déceler le diéthylèneglycol, $HOCH_2CH_2OCH_2CH_2OH$, dans les vins à une teneur égale ou supérieure à 10 mg/l.

2 Principe de la méthode

Séparation du diéthylèneglycol des autres constituants du vin par chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire, après extraction par l'éther.

Remarque : Les conditions opératoires décrites ci-dessous sont données à titre d'exemple.

3 Appareillage

3.1 Chromatographe en phase gazeuse équipé :

- d'un injecteur split-splitless,
- d'un détecteur à ionisation de flamme,
- d'une colonne de séparation : colonne capillaire revêtue d'un film de polyéthylèneglycol (Carbowax 20 M), de longueur 50 m et de diamètre intérieur 0,32 mm.

Conditions opératoires :

Température de l'injecteur : 280 °C.
Température du détecteur : 270 °C.
Gaz vecteur : hydrogène
Débit du gaz vecteur : 2 ml/min.
Fuite : 30 ml/min.
Injection : "splitless".
Volume injecté : 2 µl.
Injection à 35 °C – fuite fermée pendant 40 s.
Programmation de température : 120 °C à 170 °C à 3 °C/min.

3.2 Centrifugeuse

4 Réactifs

4.1 Solution de propane−1,3−diol, à 1 g/l, dans l'alcool, 20% vol. (étalon interne).

4.2 Solution aqueuse de diéthylèneglycol à 20 mg/l.

5. Mode opératoire

Dans un flacon de 50 ml, placer :

- 10 ml de vin
- 1 ml de solution de propane−1,3−diol
- 25 ml d'éther.

Agiter et ajouter une quantité suffisante de carbonate neutre de potassium pour saturer le mélange. Agiter.

Séparer les deux phases par centrifugation.

Procéder à une deuxième extraction.

Eliminer l'éther par évaporation et reprendre le résidu par 5 ml d'éthanol.

Le rendement de l'extraction doit être au moins de 90 p. 100.

Procéder à la chromatographie en phase gazeuse selon les conditions données en 3.1.

6 . Résultats

L'identification du diéthylèneglycol se fait à l'aide de son temps de rétention comparativement à la solution de référence, analysée dans les mêmes conditions que le vin.

Le dosage se fait comparativement à la solution de référence selon le principe de la méthode par étalonnage interne.

Il est recommandé, en présence de teneurs égales ou inférieures à 20 mg/l, de confirmer leur présence par spectrométrie de masse.

BIBLIOGRAPHIE

BANDION F., VALENTA M. & KOHLMANN H., *Mitt. Klosterneuburg, Rebe und Wein,* 1985, **35,** 89.

BERTRAND A., *Conn. vigne vin*, 1985, **19,** 191.

Laboratoire de la répression des fraudes et du contrôle de la qualité de Montpellier, *F.V., O.I.V.,* 1986, n° 807.

Méthode OIV-MA-AS315-10 Méthode Type II

Dosage de l'ochratoxine A dans le vin après passage sur colonne d'immunoaffinité et CLHP avec détection fluorimétrique

(Résolution OENO 16/2001, révision per OIV-OENO 349-2011)

1. DOMAINE D'APPLICATION

Ce document décrit une méthode qui s'applique à la détermination de l'ochratoxine A (OTA) dans les vins rouges, rosés et blancs (y compris vins spéciaux) à des concentrations allant jusqu'à 10 µg/l en utilisant une colonne d'immunoaffinité et la chromatographie liquide haute performance (CLHP) [1].

Cette méthode a été validée lors d'une étude en collaboration internationale qui a consisté à doser l'OTA dans les vins blancs et rouges lors de l'analyse de vins naturellement contaminés et de vins additionnés de toxine à des concentrations allant de 0,01 µg/l à 3,00 µg/l.

La méthode peut s'appliquer aux vins mousseux et vins pétillants, à condition que les échantillons soient préalablement dégazés (par sonication par exemple).

2. PRINCIPE

Les échantillons de vins sont dilués avec une solution contenant du polyéthylène glycol et de l'hydrogénocarbonate de sodium puis ils sont filtrés et purifiés sur colonne d'immunoaffinité. L'OTA est éluée avec du méthanol et quantifiée par CLHP en phase inverse avec une détection fluorimétrique.

3. REACTIFS

3.1 Réactifs pour la séparation de l'OTA sur colonne d'immunoaffinité

Les réactifs indiqués ci-dessous **le sont à titre d'exemple**. En effet, les fournisseurs des colonnes d'immunoaffinité peuvent proposer des solutions de dilution et des éluants adaptés à leurs produits. Il est alors souhaitable de se conformer à leurs prescriptions.

3.1.1 Hydrogénophosphate de disodium dihydraté ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$) CAS [10028-24-7]

3.1.2 Dihydrogénophosphate de sodium monohydraté ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$) CAS [10049-21-5]

3.1.3 Chlorure de sodium (NaCl) CAS [7647-14-5]
3.1.4 Eau purifiée pour laboratoire, par exemple de qualité EN ISO 3696 (eau pour utilisation en laboratoire de chimie analytique - spécification et méthode d'essai [ISO 3696 :1987]).
3.1.5 Tampon PB (solution de dilution)
Dissoudre 60 g de $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ (3.1.1) et 8.8 g de $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ (3.1.2) dans 950 ml d'eau et compléter à 1 litre avec de l'eau.
3.1.6 Tampon PBS (solution de lavage)
Dissoudre 2.85 g de $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ (3.1.1), 0.55 g de $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ (3.1.2) et 8.7 g de NaCl (3.1.3) dans 950 ml d'eau et compléter à 1 litre avec de l'eau.
3.1.7 Méthanol (CH_3OH) CAS [67-56-1]

3.2 Réactifs pour HPLC
3.2.1 Acétonitrile qualité HPLC (CH_3CN) CAS [75-05-8]
3.2.2 Acide acétique glacial (CH_3COOH) CAS [64-19-7]
3.2.3 Phase mobile HPLC : eau : acétonitrile : acide acétique glacial, 99:99:2, v/v/v
Mélanger 990 ml d'eau avec 990 ml d'acétonitrile (3.2.2) et 20 ml d'acide acétique glacial (3.2.3). En cas de présence de composés non solubilisés, filtrer sur filtre 0.45 µm. Dégazer (par exemple avec hélium) sauf si le matériel HPLC utilisé comporte un étage de dégazage.

3.3 Réactifs pour la préparation de la solution mère d'OTA
3.3.1 Toluène ($C_6H_5CH_3$) CAS [108-88-3]
3.3.2 Mélange de solvants (Toluène: acide acétique glacial, 99:1, v/v).
Mélanger 99 parties en volume de toluène (3.3.1) avec une partie en volume d'acide acétique glacial (3.2.2).

3.4 Solution mère d'OTA

Dissoudre 1 mg d'OTA ou le contenu d'une ampoule (si l'OTA a été obtenue sous forme d'une pellicule après évaporation) dans le mélange de solvant (3.12) pour obtenir une solution contenant approximativement 20 à 30 µg/ml d'OTA.

Pour déterminer la concentration exacte, enregistrer le spectre d'absorption de la solution entre 300 et 370 nm dans une cuve en quartz de 1 cm de chemin optique en se servant du mélange du solvant (3.12) comme blanc. Identifier le maximum d'absorption et calculer la concentration d'OTA (*c*) en µg/ml en utilisant l'équation suivante:

$$c = A_{max} \times M \times 100 / \varepsilon \times \delta$$

Dans laquelle:

A_{max} = Absorption déterminée à la longueur d'onde maximale (à environ 333 nm)

M = masse moléculaire de l'OTA = 403,8 g/mole

ε = coefficient d'extinction molaire de l'OTA dans le mélange de solvant (3.12)

(ε = 544/mole)

δ = chemin optique (cm)

Cette solution est stable à -18°C pour au moins 4 ans.

3.5 Solution standard d'OTA (2 µg/ml dans le toluène:acide acétique, 99:1, v/v)

Diluer la solution mère (3.13) avec le mélange de solvants (3.12) pour obtenir une solution standard à la concentration d'OTA de 2 µg/ml.

Cette solution peut être conservée à + 4 °C au réfrigérateur. La stabilité devrait être testée régulièrement..

4. APPAREILLAGE

Equipement usuel de laboratoire et en particulier le matériel suivant :

4.1 Flacons de verre (4 ml)

4.2 Pompe à vide pour préparer les colonnes d'immunoaffinité.

4.3 Réservoir et tube d'écoulement adaptés aux colonnes d'immunoaffinité.

4.4 Filtres en fibre de verre (par exemple Whatman GF/A).

4.5 Colonne d'immunoaffinité spécifique pour l'OTA.

La colonne devrait avoir une capacité de liaison totale au moins égale à 100 ng d'OTA et permettre un rendement de purification au moins égal à 85% quand on y fait passer une solution diluée de vin contenant 100 ng d'OTA.

4.6. Evaporateur rotatif

4.7 Chromatographe liquide, avec pour la phase mobile, une pompe capable d'atteindre un débit constant de 1ml/mn en isocratique.

4.8 Système d'injection, doit être équipé d'une boucle de 100 µl.

4.9 Colonne de CLHP analytique en acier 150 × 4,6 mm (d.i.) remplie avec une phase stationnaire C_{18} (5 µm) précédée d'une pré-colonne ou pré-filtre (0,5 µm) contenant une phase convenable. Des colonnes de dimensions différentes peuvent être utilisées pourvu qu'elles assurent une bonne ligne de base et un bruit de fond permettant de détecter le pic d'OTA parmi les autres pics.

4.10 Détecteur de fluorescence relié à la colonne et dont la longueur d'onde d'excitation est fixée à 333 nm et la longueur d'onde d'émission à 460 nm.

4.11 Système d'acquisition des données

4.12 Spectromètre U.V.

5. MODE OPERATOIRE

5.1 Préparation des échantillons

Verser 10 ml de vin dans un flacon conique de 100 ml. Ajouter 10 ml de la solution de dilution (3.8). Mélanger vigoureusement. Filtrer sur filtre en fibre de verre (4.4) (la filtration est nécessaire pour les solutions troubles ou quand il y a un précipité, après dilution).

5.2 Purification par colonne d'immunoaffinité

Monter la colonne d'immunoaffinité (4.5) à la pompe à vide (4.2), y fixer le réservoir (4.3).

Ajouter 10 ml (équivalent de 5 ml de vin) de la solution diluée dans le réservoir et faire passer dans la colonne d'immunoaffinité avec un débit d'environ 1 goutte par seconde. Il faut éviter que la colonne d'immunoaffinité soit à sec. Laver la colonne d'immunoaffinité avec 5 ml de la solution de lavage (3.9) puis avec 5 ml d'eau toujours au débit de 1 à 2 gouttes par seconde.

Sécher la colonne en y faisant passer de l'air. Eluer l'OTA dans le flacon de verre (4.1) avec 2 ml de méthanol (3.4) à la vitesse de 1 goutte par seconde. Evaporer l'éluat à sec à 50° C sous azote. Redissoudre immédiatement dans 250 µl de la phase mobile CLHP (3.10) et stocker à 4° C jusqu'à l'analyse par CLHP.

5.3 Analyse CLHP

Injecter 100 µl de l'extrait reconstitué (équivalent à 2 ml de vin) dans le chromatographe par la boucle d'injection.

Conditions opératoires :

Débit: 1 ml /min.

Phase mobile: acétonitrile:eau:acide acétique glacial (99:99:2, v/v/v)

Détection fluorimétrique: longueur d'onde d'excitation = 333 nm

longueur d'onde d'émission = 460 nm

Volume d'injection: 100 µl

6. QUANTIFICATION DE L'OCHRATOXINE A (OTA)

La quantification de l'OTA devrait être réalisée en mesurant les aires sous courbe (ou à défaut les hauteurs de pics) au temps de rétention de l'OTA par comparaison avec la courbe de calibration.

6.1 Courbe de calibration

Préparer une courbe de calibration chaque jour d'analyse et chaque fois que les conditions chromatographiques changent. Mesurer 0,5 ml de la solution standard d'OTA (3.14) à 2 µg/ml dans un flacon en verre et évaporer le solvant sous azote.

Redissoudre dans 10 ml de phase mobile CLHP (3.10) qui a été filtrée

préalablement sur filtre 0,45 µm. Ceci donne une solution d'OTA à 100 ng/ml.

Préparer 5 solutions de calibration CLHP dans 5 flacons de 5 ml jaugés suivant le tableau 1.

Compléter chaque standard à 5 ml avec la phase mobile CLHP (3.10).

Injecter 100 µl de chaque solution dans le CLHP.

Tableau 1

	Std 1	Std 2	Std 3	Std 4	Std 5
µl de phase mobile CLHP filtrée (3.10)	4970	4900	4700	4000	2000
µl de solution d'OTA à 100 ng/ml:	30	100	300	1000	3000
Concentration en OTA (ng/ml)	0,6	2,0	6,0	20	60
OTA injectée (ng)	0,06	0,20	0,60	2,00	6,00

NOTE:

1. *Si la quantité d'OTA dans les échantillons se situe en dehors de la gamme de calibration,*

une dilution appropriée sera réalisée ou bien des volumes inférieurs devront être injectés.

Dans ces cas, le calcul final (7) doit être reconsidéré au cas par cas,

2. Du fait de la grande variabilité des concentrations, il est recommandé de faire passer la

droite de calibration par zéro de façon à avoir une quantification exacte pour les faibles

concentrations d'OTA (inférieures à 0,1 µg/l).

7. CALCULS

Calculer à partir des courbes de calibration la quantité d'OTA dans la partie aliquote de la solution testée injectée dans la colonne de CLHP.

Calculer la concentration d'OTA (C_{OTA}) en ng/ml (équivalent à µg/l) en utilisant la formule:

$$C_{OTA} = M_A \times F/V_1 \times V_3/V_2$$

Où:

M_A est la masse d'ochratoxine A (en ng) dans la partie aliquote de matrice injectée sur la colonne et déterminée à partir de la courbe de calibration.

F est le facteur de dilution

V_1 est le volume d'échantillon à analyser (10 ml)

V_2 est le volume de la solution testée, injectée dans la colonne (100 µl)

V_3 est le volume de solution utilisée pour redissoudre l'éluat sec (250 µl)

8. PERFORMANCES DE LA METHODE DANS LE LABORATOIRE

Le tableau 2 regroupe les performances de la méthode appliquée aux vins blancs,

rosés, et rouges dans les laboratoires ayant participé à la validation de la méthode.

Tableau 2. Rendement d'extraction à partir de vins surchargés en ochratoxine A à différentes concentrations

	Vin rouge		Vin rosé		Vin blanc	
Surcharge (µg/l)	Rendement ± SD* (%)	RSD# (%)	Rendement ± SD* (%)	RSD# (%)	Rendement ± SD* (%)	RSD# (%)
0,04	96,7 ± 2,2	2,3	94,1 ± 6,1	6,5	91,6 ± 8,9	9,7
0,1	90,8 ± 2,6	2,9	89,9 ± 1,0	1,1	88,4 ± 0,2	0,2
0,2	91,3 ± 0,6	0,7	88,9 ± 2,1	2,4	95,1 ± 2,4	2,5
0,5	92,3 ± 0,4	0,5	91,6 ± 0,4	0,4	93,0 ± 0,2	0,2
1,0	97,8 ± 2,6	2,6	103,6 ± 2,5	2,5	100,7 ± 1,0	1,0
2,0	96,5 ± 1,6	1,7	98,6 ± 1,8	1,8	98,0 ± 1,5	1,5
5,0	88,1 ± 1,3	1,5	-	-	-	-
10,0	88,9 ± 0,6	0,7	-	-	-	-
Moyenne des moyennes	92,8 ± 3,5	3,8	94,5 ± 5,2	5,5	94,5 ± 4,1	4,3

* SD = Ecart-type (Standard déviation) (n = 3 replicats) ;

RSD = Ecart-type relatif (Coefficient de variation).

9. TRAVAIL DE COLLABORATION

La méthode a été validée par une étude collaborative avec la participation de 16 laboratoires répartis dans 8 pays, suivant les recommandations du protocole harmonisé pour la validation des méthodes d'analyse **[2]**. Chaque participant a analysé 10 vins

blancs, 10 vins rouges, représentant 5 vins dupliqués en aveugle naturellement contaminés ou surchargés. Les performances de la méthode qui résultent de ce travail sont rapportées dans les annexes I et II.

10. LABORATOIRES PARTICIPANTS

Unione Italiana Vini, Verona	ITALIE
Istituto Sperimentale per l'Enologia, Asti	ITALIE
Istituto Tecnico Agraria, S. Michele all'Adige (TN)	ITALIE
Università Cattolica, Piacenza	ITALIE
Institute for Health and Consumer Protection, JRC – Ispra	ITALIE
Neotron s.r.l., S. Maria di Mugnano (MO)	ITALIE
Chemical Control s.r.l., Madonna dell'Olmo (CN)	ITALIE
Laboratoire Toxicologie Hygiène Appliquée, Université V. Segalen, Bordeaux	FRANCE
Laboratoire de la D.G.C.C.R.F. de Bordeaux, Talence	FRANCE
National Food Administration, Uppsala	SUEDE
Systembolagets Laboratorium, Haninge	SUEDE
Chemisches Untersuchungsamt, Trier	ALLEMAGNE
State General Laboratory, Nicosia	CHYPRE
Finnish Customs Laboratory, Espoo	FINLANDE
Central Science Laboratory, York	ROYAUME-UNI
E.T.S. Laboratories, St. Helena, CA	ETATS-UNIS

11. References

[1] A. Visconti, M. Pascale, G. Centonze. *Determination of ochratoxin A in wine by means of immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography.* Journal of Chromatography A, 864 (1999) 89-101.

[2] AOAC International 1995, AOAC Official Methods Program, p. 23-51.

ANNEXE I

Les données suivantes sont obtenues dans un test interlaboratoires selon les recommandations du protocole harmonisé pour les études collaboratives en vue de valider une méthode d'analyse.

VIN BLANC		Surcharge en OTA (µg/l)			
Echantillon	Blanc	0,100	1,100	2,000	n.c.
Année du test interlaboratoires	1999	1999	1999	1999	1999
Nombre de laboratoires	16	16	16	16	16
Nombre de laboratoires retenus après élimination des valeurs aberrantes	14*	13*	14	14	15
Nombre de laboratoires éliminés	-	1	2	2	1
Nombre de résultats acceptés	28	26	28	28	30
Valeur moyenne (µg/l)	<0,01	0,102	1,000	1,768	0,283
Ecart-type/Répétabilité s_r (µg/l)	-	0,01	0,07	0,15	0,03
Ecart-type relatif (Coefficient de variation) /Répétabilité RSD_r (%)	-	10,0	6,6	8,5	10,6
Limite de répétabilité r (µg/l)	-	0,028	0,196	0,420	0,084
Ecart-type/Reproductibilité s_R (µg/l)	-	0,01	0,14	0,23	0,04
Ecart-type relatif (Coefficient de variation) /Reproductibilité RSD_R (%)	-	14,0	13,6	13,3	14,9
Limite de Reproductibilité R (µg/l)	-	0,028	0,392	0,644	0,112
Rendement d'extraction %	-	101,7	90,9	88,4	-

** 2 laboratoires ont été exclus de l'évaluation statistique à cause de la limite de détection élevée (= 0,2 µg/l).*

n.c. = échantillon naturellement contaminé

ANNEXE II

Les données suivantes sont obtenues dans un test interlaboratoires selon les recommandations du protocole harmonisé pour les études collaboratives en vue de valider une méthode d'analyse.

VIN ROUGE		Surcharge en OTA (µg/l)			
Echantillons	Blanc	0,200	0,900	3,000	n.c.
Année du test interlaboratoires	1999	1999	1999	1999	1999
Nombre de laboratoires	15	15	15	15	15
Nombre de laboratoires retenus après élimination des valeurs aberrantes	14*	12*	14	15	14
Nombre de laboratoires éliminés	-	2	1	-	1
Nombre de résultats acceptés	28	24	28	30	28
Valeurs moyennes (µg/l)	<0,01	0,187	0,814	2,537	1,693
Ecart-type/Répétabilité s_r (µg/l)	-	0,01	0,08	0,23	0,19
Ecart-type relatif (Coefficient de variation) /Répétabilité RSD_r (%)	-	5,5	9,9	8,9	10,9
Limite de Répétabilité r (µg/l)	-	0,028	0,224	0,644	0,532
Ecart-type/Reproductibilité s_R (µg/l)	-	0,02	0,10	0,34	0,23
Ecart-type relatif (Coefficient de variation) /Reproductibilité RSD_R (%)	-	9,9	12,5	13,4	13,4
Limite de Reproductibilité R (µg/l)	-	0,056	0,280	0,952	0,644
Rendement d'extraction %	-	93,4	90,4	84,6	-

** 1 laboratoire a été exclu de l'évaluation statistique à cause de la limite de détection élevée (= 0,2 µg/l).*

n.c. = échantillon naturellement contaminé

ANNEXE III

Guide concernant les points critiques de la méthode de détermination de l'Ochratoxine A par colonne d'immuno-affinité 16/2001, de type II.

Les points critiques a prendre en considération sont listés ci-après à titre indicatif et constituent un guide d'application de la méthode. La numérotation se rapporte aux paragraphes de la résolution originale.

1. Domaine d'application

A titre indicatif la méthode peut s'appliquer aux moûts de raisins, moûts de raisin partiellement fermentés et aux vins nouveaux encore en fermentation. Les paramètres de validation ne concernent que les vins.

2. Principe

La méthode se décompose en deux étapes distinctes. La première est une étape de purification et de concentration de l'OTA présente dans le vin ou le moût par fixation sur colonne d'immunoaffinité puis élution. La seconde est une étape de quantification pratiquée sur l'éluat par HPLC avec détection fluorimétrique.

3. Réactifs

3.13 Solution mère d'OTA
L'utilisation d'OTA sous forme solide est déconseillée; utiliser de préférence une solution standard d'OTA (point 3.14)

3.14 Solution standard d'OTA
Utilisation de solution du commerce dont la concentration (env 50 µg/ml) est raccordée et fait l'objet d'un certificat d'analyse mentionnant valeur de référence et incertitude sur la concentration
En principe ces solutions ne sont pas certifiées en volumétrie, et doivent être prélevées avec du matériel de pipetage raccordé, pour constituer des solutions mères allant de 0.25 à 1 mg/L dans l'éthanol pur ou dans la phase mobile de la méthode HPLC (3.2.3).

Cette solution est stable à -18°C pour au moins 4 ans.]

4. Appareillage

4.13 RECOMMANDATIONS POUR L'EVALUATION DE LA PERFORMANCE DES COLONNES D'IMMUNOAFFINITE (optionnel)

L'étape de concentration sur colonne d'immunoaffinité constitue une source d'incertitude importante dans la méthode d'analyse. L'expérience a montré que les différentes colonnes proposées sur le marché pouvaient avoir des taux de récupération variant de 70 à 100 %.
Il est donc conseillé de vérifier la performance d'un lot de colonne avant son utilisation. Cette démarche est conseillée en cas de changement de fournisseurs ou de références de colonnes.

4.13.1 Caractérisation du lot de colonnes (mesure du taux de récupération) :
Sélectionner environ 10 colonnes représentatives des types de colonnes utilisées en routine dans le laboratoire, issues de différents numéros de lots. Préparer un même nombre de vins, représentant des matrices différentes, et dont la concentration en OTA est nulle, en effectuant des ajouts dosés x_i variables entre 0.5 et 2 $\mu g \cdot kg^{-1}$. Analyser rapidement après ajouts dosés ces n échantillons avec le lot de colonnes sélectionnées, soit y_i les valeurs trouvées.
On calcule les données concernant le taux de recouvrement qui est la quantité mesurée par rapport à la quantité apportée.

$$t_i = \frac{y_i}{x_i} \quad \textit{(taux de recouvrement avec la colonne i)}$$

$$T = \frac{\sum t_i}{n} \quad \textit{(taux de recouvrement moyen)}$$

$$S_t = \sqrt{\frac{\sum (t_i - T)^2}{n-1}} \quad \textit{(écart type du taux de recouvrement)}$$

L'écart type du taux

récupération des colonnes, mais inclut également l'incertitude type du système de mesure utilisé en aval des colonnes (HPLC). Il est cependant possible de réaliser une estimation raisonnable de l'écart type du taux de

récupération des colonnes seul, en retranchant l'incertitude type du système HPLC à l'erreur de recouvrement calculée:

- Estimer l'incertitude-type S_v (exprimée sous la forme d'un écart type) du système de mesure stricto sensu (sans prendre en compte l'étape du passage sur colonne d'immunoaffinité).
Pour cela il est possible d'utiliser une étude de fidélité sur des solutions d'OTA.

L'écart type du taux de récupération S_p est estimé de la façon suivante :

$$S_P = \sqrt{S_t^{\,2} - S_v^{\,2}}$$

Pour un domaine de concentration assez large, il est préférable d'exprimer cette grandeur en coefficient de variation de l'écart type (RSDR).

CV% = $S_p \cdot 100$/ concentration de l'ajout

5. Mode opératoire

Le mode opératoire donné dans le point 5 est **indicatif**. La composition des solutions de dilution et de lavage peut être différente en fonction des données du fabricant des colonnes. De même, la concentration de l'échantillon de vin dilué peut être ajustée selon les besoins.

6. Quantification de l'ochratoxine a (ota)

6.1 Courbe de calibration
Préparer, à partir de solutions issues de la dilution de la solution mère avec la phase mobile (3.2.3), une courbe de calibration chaque jour d'analyse ou chaque fois que les conditions chromatographiques changent. Les valeurs choisies doivent encadrer la gamme de travail en prenant en compte le facteur de concentration du vin.

Méthode OIV-MA-AS315-11 Méthode Type II

Détermination par CLHP de neuf anthocyanes principales dans le vin rouge et rosé

(Résolution OENO 22/2003 modifiée par OENO 12/2007, OIV/OENO 377/2009)

1. CHAMPS D'APPLICATION

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

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

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

2. PRINCIPE

Séparation des cinq anthocyanes non acylées les plus importantes (voir Figure 1, pics 1-5) et des quatre anthocyanes acylées principales (voir Figure 1 pics 6-9).
Analyse du vin rouge et rosé par séparation directe en CLHP en utilisant une colonne de phase inverse et une élution avec un gradient eau/acide formique/acetonitrile avec une détection à 518 nm [1.2]

3. REACTIFS ET MATERIEL

Acide formique (p.a. 98%) (CAS 64-18-6)
Eau, pureté CLHP
Acétonitrile, pureté CLHP (CAS 75-08-8)
Solvants CLHP
Solvant A : Eau/acide formique/acétonitrile 87:10:3 (v/v/v)
Solvant B : Eau/acide formique/acetonitrile 40:10:50 (v/v/v)

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

Produits de référence pour l'identification des pics.
Le dosage CLHP des anthocyanes du vin est difficilement réalisable en raison de l'absence de produits purs disponibles dans le commerce. De plus, les anthocyanes sont extrêmement instables en solution.
Les pigments anthocyaniques suivants sont disponibles à la vente :
Cyanidol-3-glucoside (également Couromanin chloride);
M=484,84 g/mol
Peonidol-3-glucoside ; M=498,84 g/mol
Malvidol-3-glucoside (également Oeninchloride); M = 528,84 g/mol
Malvidol-3,5-diglucoside (également malvinchloride);
M = 691,04 g/mol.

4. APPAREILS

Un système de CLHP avec :

- une pompe binaire à gradient, un système d'injection pour des volumes d'échantillon de 10 à 200 µl
- Un détecteur à barrettes de diodes ou un détecteur UV avec une gamme visible,
- Un intégrateur ou un ordinateur avec logiciel d'acquisition de données
- Un four permettant le chauffage des colonnes à 40 °C
- Un système de dégazage de solvant
- Une colonne analytique, par exemple :
LiChrospher 100 RP 18 (5 µm) en LiChroCart 250-4
Une colonne de garde: par exemple RP18 (30-40 mm) en cartouche de 2 mm de diamètre x 20 mm de long

5. PROCEDURE

5.1 Préparation des échantillons

Les vins limpides sont placés directement sans préparation dans les flacons du passeur automatique d'échantillons. Les échantillons troubles sont filtrés à l'aide d'un filtre à membrane de 0,45 µm pour la préparation d'échantillon CLHP. La première partie du filtrat doit être rejetée.
La gamme de linéarité de l'absorption en fonction de la concentration des anthocyanes étant étendue, il est possible de moduler les volumes d'injection entre 10 et 200 µl en fonction de l'intensité de la couleur du vin.

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

5.2 Analyse

Conditions CLHP
L'analyse CLHP se déroule dans les conditions suivantes:

Volume d'injection :	50 µl (vin rouge) jusqu'à 200 µl (vin rosé)
Débit:	0,8 ml/minute
Température :	40°C
Temps de passage :	45 minutes
Temps de retour aux conditions initiales :	5 minutes
Détection :	518 nm

Gradient d'élution:

Temps (min)	Solvant A % (v/v)	Solvant B % (v/v)
0	94	6
15	70	30
30	50	50
35	40	60
41	94	6

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

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

		Pic-N°
Groupe 1:	Delphinidol-3-glucoside	1

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

6. EXPRESSION DES RESULTATS

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

7. LIMITE DE DETECTION ET LIMITE DE QUANTIFICATION

La limite de détection (LD) et la limite de quantification (LQ) sont fixées conformément aux instructions de la résolution de l'O.I.V. OENO 7-2000 (Estimation de la limite de détection et de quantification d'une méthode d'analyse). Conformément au schéma décisionnel (No 3) il conviendra d'appliquer le procédé graphique visé au numéro 4.2.2.

Pour ce faire, un extrait du chromatogramme sera agrandi et analysé sur un domaine qui correspond à 10 fois la largeur à mi-hauteur (w½) d'un pic d'anthocyane dans le domaine d'intérêt. A cet effet, on trace 2 droites parallèles de manière à englober les déviations maximales du bruit thermique. La distance entre les deux droites équivaut à hmax, exprimée en mAU (milliunités d'absorption).

La limite de détection (LD) et la limite de quantification (LQ) dépendent des conditions individuelles à chaque appareil et doivent être établies par l'utilisateur. Un exemple est mentionné en annexe, avec le résultat suivant :

h_{max} = 0,208 [mAU]; LD = 3 x 0,208 [mAU] = 0,62 [mAU].
LQ = 10 x 0, 208 [mAu] = 2,08 [mAU].

Recommandation :

En ce qui concerne les valeurs calculées, somme des anthocyanes acylés et rapport entre les anthocyanes acétylés et coumarylés, il est recommandé de ne pas calculer ces grandeurs dans le cas où la valeur d'un anthocyane isolé est inférieure au seuil de détermination.

Il est à remarquer que les valeurs inférieures à la limite de quantification (LQ) ne sont pas dépourvues de contenu informatif **[1].**

Référence :

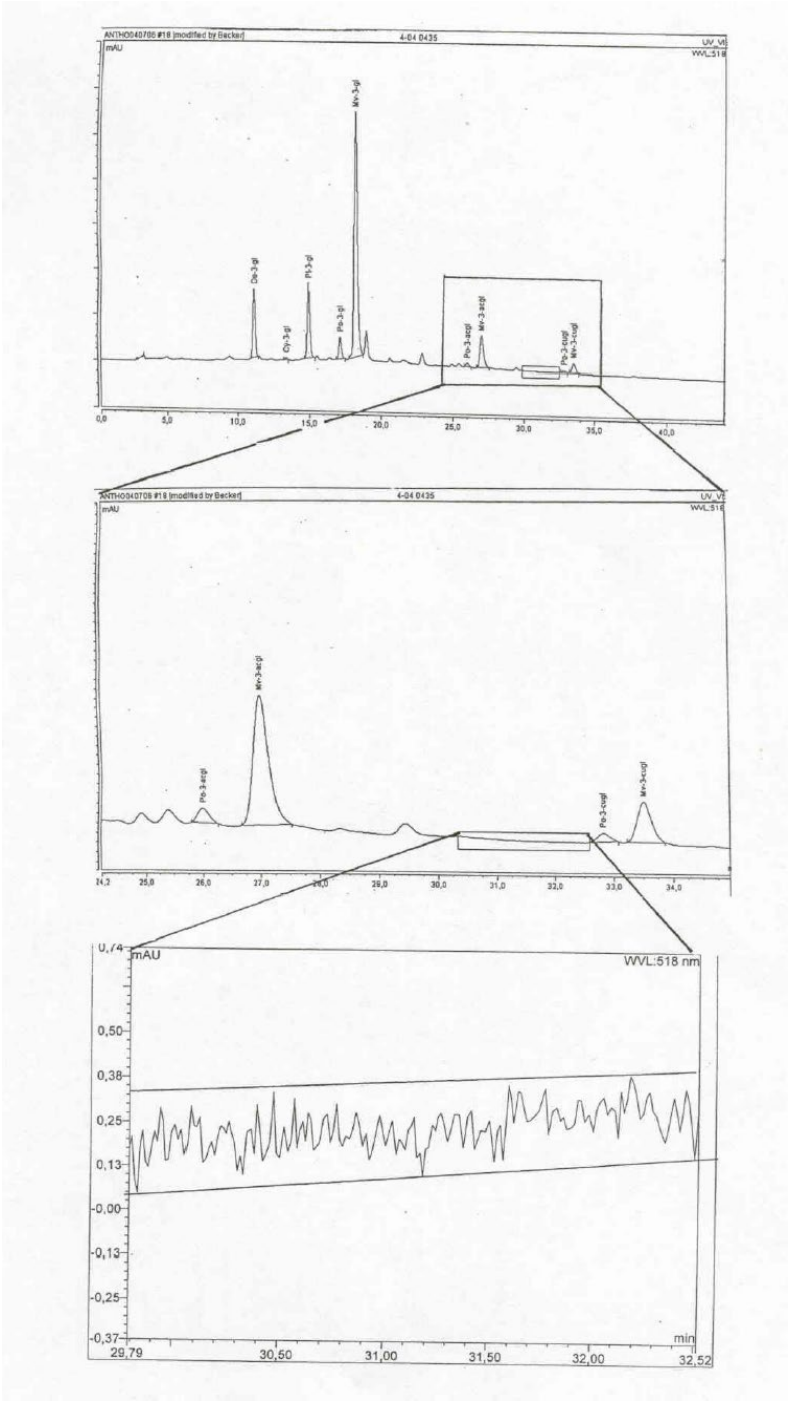
[1] Thompson, M.; Ellison, S.L.R. ; Wood, R., Harmonized Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis, Pure Appl. Chem. (2002) 74: 835- 855

8. PARAMETRES DE LA FIDELITE

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

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

ANNEXE


mAU
WVL:518 nm
0,50
0,38
0,25
0,13
-0,00
-0,13
-0,25
-0,37
29,79
30,50
31,00
31,50
32,00
32,52
min

Annexe A

Bibliographie

[1] Marx, R., B. Holbach, H. Otteneder; Determination of nine characteristic Anthocyanins in Wine by HPLC; OIV, F.V.N° 1104 2713/100200

[2] Holbach, B., R. Marx, M. Ackermann; Bestimmung der Anthocyanzusammensetzung von Rotwein mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC). Lebensmittelchemie (**1997**) 51: 78 - 80

[3] Eder, R., S. Wendelin, J. Barna; Auftrennung der monomeren Rotweinanthocyane mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC).Methodenvergleich und Vorstellung einer neuen Methode. Mitt. Klosterneuburg (**1990**) 40: 68-75

[4] ISO-5725-2: **1994** "Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility"

[5] Otteneder, H., Marx, R., Olschimke, D.; Method-performance study on the determination of nine characteristic anthocyanins in wine by HPLC. O.I.V. F.V.N° 1130 (**2001**)

[6] Mattivi F.; Scienza, A.; Failla, O.; Vika, P.; Anzani, R.; Redesco, G.; Gianazza, E.; Righetti; P. Vitis vinifera - a chemotaxonomic approach: Anthocyanins in the skin. *Vitis (special issue)* **1990***,* 119-133

[7] Roggero, I.P.; Larice, I.L.; Rocheville-Divorne, C.; Archier, P.; Coen, V. Composition Antocyanique des cepages. *Revue Francaise d'Oenologie* **1998***, 112,* 41-48

[8] Eder, R.; Wendelin, S; Barna, J. Classification of red wine cultivars by means of anthocyanin analysis. *Mitt. Klosterneuburg* **1994***, 44,* 201-212

[9] Arozarena, I.; Casp, A.; Marin, R.; Navarro, M. Differentiation of some Spanish wines according to variety and region based on their anthocyanin composition. *Eur. Food Res. Technol.* **2000***, 212,* 108-112

[10] Garcia-Beneytez, E.; Revilla, E.; Cabello, F. Anthocyanin pattern of

several red grape cultivars and wines made from them. *Eur. Food Res. Technol.* **2002**, *215*, 32-37

[11] Arozarena, I.; Ayestarán, B.; Cantalejo, M.J.; Navarro, M.; Vera, M.; Abril, K.; Casp, A. *Eur. Food Res. Technol.* **2002**, *214*, 313-309

[12] Revilla, E.; Garcia-Beneytez, E.; Cabello, F.; Martin-Ortega, G.; Ryan, J-M. Value of high-performance liquid chromatographic analysis of anthocyanins in the differentiation of red grape cultivars and red wines made from them. *J. Chromatogr A* **2001**, *915*, 53-60

[13] Heier, A.; Blaas, W.; Droß, A.; Wittkowski, R.; Anthocyanin Analysis by HPLC/ESI-MS, Am.J.Enol.Vitic, **2002**, 53, 78-86

[14] Arozarena, I.; Casp, A.; Marin, R.; Navarro, M. Multivariate differentiation of Spanish red wines according to region and variety. *J. Sci. Food Agric*, **2000**, *80*, 1909-1917

[15] Anonymous. Bekanntmachung des Bundesinstituts für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin. *Bundesgesundheitsbl. Gesundheitsforsch. Gesundheitsschutz,* **2001**, *44*, 748

[16] Burns, I.; Mullen, W.; Landrault, N.; Teissedre, P.-L.; Lean, M.E.I.; Crozier, A. Variations in the Profile and Content of Anthocyanins in Wines made from Cabernet Sauvignon and hybrid grapes. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 4096-4102

[17] Otteneder, H.; Holbach, B.; Marx, R.; Zimmer, M. Rebsortenbestimmung in Rotwein mittels Anthocyanspektrum. *Mitt. Klosterneuburg*, **2002**, *52*, 187-194

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

Annexe B

Résultats statistiques

ETUDE ET EVALUATION DE LA PERFORMANCE DE LA METHODE

17 laboratoires et 5 états européens ont participé à l'étude de validation de la méthode sous la coordination du laboratoire d'état officiel allemand pour la chimie alimentaire de Trier. Les participants figurent dans le Tableau 3. Un exemple de chromatogramme est présenté à la figure 1 et les résultats détaillés figurent dans le Tableau 2.
L'évaluation statistique a été effectuée selon la Résolution Oeno 6/99, et la Norme ISO 5725-1994 (4,5).

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

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

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

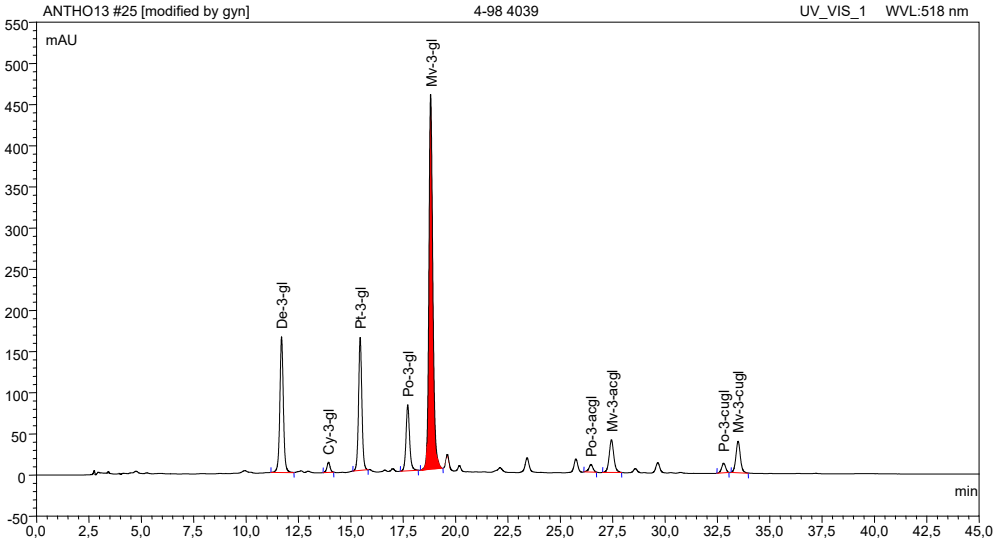
Tableau 1 : Résumé des résultats des performances de la méthode

GAMME DE LA SURFACE DU PIC RELATIVE* [%]	Gamme de RSDr [%]	Gamme de RSDR [%]
>0,4 – 1,0	6,8 - 22,4	20,6 - 50,9
>1,1 – 1,5	4,2 - 18,1	11,8 - 28,1
>1,5 – 3,5	2,1 - 7,7	10,6 - 15,6
>3,5 – 5,5	2,7 - 5,7	18,7 – 7,5
>5,5 – 7,5	2,4 - 3,9	6,5 - 10,0
>10 – 14	1,1 - 2,9	3,7 - 9,2
>14 – 17	1,0 - 3,9	3,2 - 5,4
>50 – 76	0,3 - 1,0	2,1 - 3,1
* indépendant de l'anthocyane		

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

Figure 1

Séparation de 9 anthocyanes dans un vin rouge



R	1,29	0,99	0,60	0,50	0,44
Petunidol-3-glucoside					
n	15	17	16	14	15
moyenne	10,24	14,29	5,75	12,21	6,19
s_r	0,233	0,596	0,157	0,097	0,196
RSD_r(%)	2,3	4,2	2,7	0,8	3,2
r	0,65	1,67	0,44	0,27	0,55
s_R	0,431	0,996	0,495	0,469	0,404
RSD_R(%)	4,2	7,0	8,6	3,8	6,5
R	1,21	2,79	1,39	1,31	1,13
Peonidol-3-glucoside					
n	16	15	17	17	16
moyenne	11,88	6,23	13,75	7,44	4,12
s_r	0,241	0,166	0,144	0,232	0,174
RSD_r(%)	2,0	2,7	1,0	3,1	4,2
r	0,68	0,47	0,40	0,65	0,49
s_R	0,981	0,560	1,227	0,602	0,532
RSD_R(%)	8,3	9,0	8,9	8,1	12,9
R	2,75	1,57	3,44	1,69	1,49
Malvidol-3-glucoside					
n	16	15	17	16	16
moyenne	55,90	55,04	76,11	52,60	61,04
s_r	0,545	0,272	0,251	0,298	0,377
RSD_r(%)	1,0	0,5	0,3	0,6	0,6
r	1,53	0,76	0,70	0,83	1,06
s_R	2,026	2,649	2,291	1,606	1,986
RSD_R(%)	3,6	4,8	3,0	3,1	3,3
R	5,67	7,42	6,41	4,50	5,56

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

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

Anthocyannes	échantillon 1	échantillon 2	échantillon 3	échantillon 4	échantillon 5
Peonidol-3-acetylglucoside					
n	14	16		14	16
Moyenne	1,16	1,44		0,59	3,74
s_r	0,064	0,062		0,059	0,215
RSD_r(%)	5,5	4,3		10,1	5,8
	0,18	0,17		0,17	0,60
s_R	0,511	0,392		0,272	0,374
RSD_R(%)	43,9	27,2		46,4	10,0
R	1,43	1,10		0,76	1,05
Malvidol-3-acetylglucoside					
n	16	17		17	16
Moyenne	5,51	4,84		3,11	15,07
s_r	0,176	0,167		0,088	0,213
RSD_r(%)	3,2	3,4		2,8	1,4
r	0,49	0,47		0,25	0,60
s_R	0,395	0,366		0,496	0,617
RSD_R(%)	7,2	7,6		16,0	4,1
R	1,11	1,02		1,39	1,73
Peonidol-3-coumarylglucoside					
n	16	14		17	16
Moyenne	1,26	0,90		0,89	1,32
s_r	0,130	0,046		0,060	0,058
RSD_r(%)	10,3	5,1		6,8	4,4
r	0,36	0,13		0,17	0,16
s_R	0,309	0,109		0,204	0,156
RSD_R(%)	24,5	12,2		23,0	11,8
R	0,86	0,31		0,57	0,44
Malvidol-3-coumarylglucoside					
n	17	17		17	16
moyenne	4,62	2,66		4,54	4,45
s_r	0,159	0,055		0,124	0,048
RSD_r(%)	3,4	2,1		2,7	1,1
r	0,45	0,15		0,35	0,13
s_R	0,865	0,392		0,574	0,364
RSD_R(%)	18,7	14,7		12,6	8,2
R	2,42	1,10		1,61	1,02

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

Tableau 3: Liste des participants

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

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

Méthode OIV-MA-AS315-12 Méthode Type IV

Recherche des matières protéiques d'origine végétale dans les vins et les moûts

(Résolution OENO 24/2004 ; OIV/OENO 377/2009)

La technique développée ci-après permet de déterminer la quantité de protéines d'origine végétale éventuellement restantes dans les moûts et les vins traités, après soutirage.

1 PRINCIPE

Les protéines du moût ou du vin sont précipitées par l'acide trichloroacétique, puis elles sont séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS). L'ajout de bleu de Coomassie colore les protéines. L'intensité de la coloration permet de déterminer la teneur en protéine à l'aide d'une courbe étalon réalisée au préalable avec des solutions de protéine de concentration connue. Le pouvoir antigénique des moûts et des vins traités est recherché par un test d'immunoblotting.

2 PROTOCOLE

2.1 Concentration des protéines par précipitation à l'acide trichloroacétique (TCA)

2.1.1 Réactifs

2.1.1.1 Acide trichloroacétique pur

2.1.1.2 TCA à 0,1 %: préparé à partir de 2.1.1.1 : 0,1 g dans 100 ml d'eau

2.1.1.3 TCA à 100 % préparé à partir de 2.1.1.1 : 100 g dans 100 ml d'eau

2.1.1.4 Hydroxyde de sodium 0,5 M

2.1.1.5 Tampon Tris/HCl 0,25 M pH=6,8

30,27 g de Tris-(hydroxyméthyl)aminométhane sont dissous dans 300 ml d'eau distillée. Le pH est ajusté à 6,8 avec de l'acide chlorhydrique concentré pour analyses. Le volume est complété à 1 l avec de l'eau distillée. Le tampon est conservé à 4°C.

2.1.1.6 Glycérol pur

2.1.1.7 Dodécylsulfate de sodium (SDS) pur

2.1.1.8 2-Mercaptoéthanol pur

2.1.1.9 Solution tampon pour les échantillons

Elle est composée de tampon Tris/HCl 0,25 M, pH=6,8 (2.1.1.5); de 7,5 % de glycérol pur (2.1.1.6); de 2 % de dodécylsulfate de sodium (SDS) (2.1.1.7) et de 5 % de 2-mercaptoéthanol pur (2.1.1.8). Les pourcentage et molarité des différents réactifs correspondent à la concentration finale dans la solution tampon.

2.1.2 Mode opératoire

3 ml d'acide trichloroacétique à 100 % (2.1.1.3) et 24 ml de vin ou de moût (traité ou non traité) sont successivement mis dans des tubes à centrifuger de 50 ml. La concentration finale en TCA ainsi obtenue est de 11 %.

Après 30 minutes à 4°C, les échantillons sont centrifugés à 10 000 rpm pendant 30 minutes à 4°C. Les culots sont lavés avec une solution aqueuse de TCA à 0,1 % (2.1.1.2), recentrifugés et remis en suspension dans 0,24 ml d'un mélange (1:1, v/v) d'hydroxyde de sodium 0,5 M (2.1.1.4) et de solution tampon pour les échantillons (2.1.1.9). Les échantillons sont chauffés à 100°C au bain d'eau pendant 10 minutes.

2.2 Electrophorèse en Gel de Polyacrylamide en présence de SDS

2.2.1 Réactifs

2.2.1.1 Tampon Tris/HCl 1,5 M pH=8,8

181,6 g de Tris-(hydroxyméthyl)aminométhane sont dissous dans 300 ml d'eau distillée. Le pH est ajusté à 8,8 avec de l'acide chlorhydrique concentré pour analyses. Le volume est complété à 1 l avec de l'eau distillée. Le tampon est conservé à 4°C.

2.2.1.2 Mélange acrylamide (30 %)–bis-acrylamide (0,8 %)–glycérol (75 %)

Ajouter doucement 300 g d'acrylamide et 8 g de bis-acrylamide à 600 ml d'une solution de glycérol à 75 %. Après dissolution, ajuster le volume à 1 l avec du glycérol à 75 %. Le mélange est conservé à l'obscurité et à température ambiante.

2.2.1.3 SDS à 10 %

10 g de SDS sont dissous dans 100 ml d'eau distillée. Conserver à la température ambiante.

2.2.1.4 N,N,N',N' tétraméthylènediamine (TEMED) pour électrophorèse

2.2.1.5 Persulfate d'ammonium à 10 %

1 g de persulfate d'ammonium sont dissous dans 10 ml d'eau distillée. Conserver à 4°C.

2.2.1.6 Solution de bleu de bromophénol

10 mg de bleu de bromophénol pour électrophorèse sont dissous dans 10 ml d'eau distillée.

2.2.1.7 Solution pour le gel de séparation (15 % d'acrylamide)

Elle est préparée juste avant utilisation :

- 1,5 ml de Tris/HCl 1,5 M, pH=8,8 (2.2.1.1),
- 1,5 ml d'eau distillée,
- 3 ml du mélange acrylamide glycérol (2.2.1.2),
- 50 µl de SDS 10 % (2.2.1.3),
- 10 µl de N,N,N',N'-tétraméthylènediamine (TEMED) pour électrophorèse (2.1.1.4),
- 20 µl de persulfate d'ammonium (2.2.1.5),
- 1 goutte de bleu de bromophénol (2.2.1.6).

2.2.1.8 Tampon Tris/HCl 0,5 M pH=6,8

60,4 g de Tris-(hydroxyméthyl)aminométhane sont dissous dans 400 ml d'eau distillée. Le pH est ajusté à 6,8 avec de l'acide chlorhydrique concentré pour analyses. Le volume est complété à 1 l avec de l'eau distillée. Le tampon est conservé à 4°C.

2.2.1.9 Mélange acrylamide (30 %)–bis-acrylamide (0,8 %)–eau

Ajouter doucement 300 g d'acrylamide et 8 g de bis-acrylamide à 300 ml d'eau. Après dissolution, ajuster le volume à 1 l avec de l'eau distillée. Le mélange est conservé à l'obscurité et à température ambiante.

2.2.1.10 Gel de concentration à 3,5% d'acrylamide

Il est préparé juste avant utilisation :

- 0,5 ml de Tris/HCl 0,5 M pH=6,8 (2.2.1.8),
-1,27 ml d'eau distillée,
- 0,23 ml du mélange acrylamide-eau (2.2.1.9),
- 20 µl de SDS 10 % (2.2.1.3),
- 5 µl de N,N,N',N'-tétraméthylènediamine (TEMED) pour électrophorèse (2.2.1.4),
- 25 µl de persulfate d'ammonium (2.2.1.5),
- 1 goutte de bleu de bromophénol (2.2.1.6).

2.2.1.11 Tampon de migration

30,27 g de Tris-(hydroxyméthyl)aminométhane, 144 g de glycine et 10 g de SDS sont dissous dans 600 ml d'eau distillée. Le pH doit être de 8,8. Si nécessaire, il est ajusté avec de l'acide chlorhydrique concentré pour analyses. Le volume est complété à 1 l avec de l'eau distillée. Le tampon est conservé à 4°C. Au moment de l'utilisation, la solution est diluée au 1/10 dans de l'eau distillée.

2.2.1.12 Solution de coloration

Sont successivement mélangés :

- 16 ml de bleu de Coomassie Brillant G-250 ultrapur à 5 % (5 g dans 100 ml d'eau distillée),
- 784 ml provenant de 1 l d'une solution dans laquelle ont été dissous 100 g de sulfate d'ammonium et 13,8 ml d'acide orthophosphorique à 85 % pour analyses,
- 200 ml d'éthanol absolu pour analyses.

2.2.1.13 Solution de décoloration

Sont successivement mélangés :

- 100 ml d'acide acétique glacial 100 % pour analyses,
- 200 ml d'éthanol absolu pour analyses,
- 700 ml d'eau distillée.

2.2.2 Mode opératoire

La solution pour le gel de séparation (2.2.1.7) est coulée entre deux plaques de verre d'une taille de 7 x 10 cm. La surface supérieure du gel est nivelée par l'ajout de 2 gouttes d'eau distillée.

Après polymérisation du gel de séparation et élimination de l'eau, 1 ml de gel de concentration (2.2.1.10) est déposé sur le gel de séparation à l'aide d'une pipette de 1 ml. Puis on met en place le peigne dont les empreintes créeront les puits de dépôts.

Les échantillons nécessaires à la gamme étalon sont préparés dans un mélange (1:1, v/v), d'hydroxyde de sodium 0,5 M (2.1.1.4) et de solution tampon (2.1.1.9) de façon à ce que la gamme soit comprise entre 5 µg/ml et 50 µg/ml.

20 à 30 µl d'échantillons de vins et d'étalons sont déposés dans les puits

Après la migration (sous une tension constante de 90 V) à la température ambiante pendant 3-4 heures environ, les gels sont démoulés. Ils sont aussitôt plongés dans 50 ml d'une solution aqueuse de TCA 20 % pendant 30 minutes puis dans 50 ml de solution de coloration (2.2.1.12).

Les protéines apparaissent sous forme de bandes colorées en bleu. Le gel est ensuite décoloré avec 50 ml de solution de décoloration (2.2.1.13). Quand le fond du gel est transparent, il est placé dans de l'eau distillée pour conservation.

3 ANALYSE QUANTITATIVE

L'intensité de chaque tache est évaluée à l'aide d'un scanner pour gel équipé d'un logiciel d'analyseur d'image. La quantité de protéine présente sur le gel est déterminée par le calcul de la densité moyenne des pixels de la bande et par intégration de la largeur de la bande. La teneur en protéine de chaque échantillon est obtenue à l'aide d'une courbe étalon. Les points de cette courbe sont obtenus en traçant les valeurs de concentrations connues de protéine végétale déposée sur le gel en fonction de la surface d'intégration correspondante.

La limite de quantification se situe à 0,030 ppm pour le pois et à 0,36 ppm pour le gluten, dans un milieu concentré 100 fois. Le coefficient de variation est toujours inférieur à 5%.

4 RECHERCHE PAR IMMUNOBLOTTING DU POUVOIR ANTIGENIQUE DES VINS ET DES MOUTS TRAITES

La capacité antigénique des protéines d'origine végétale éventuellement restantes dans les moûts et les vins traités, après soutirage, est ensuite évaluée.

4.1 PRINCIPE

Après l'électrophorèse, les gels sont soumis à la technique d'immunoblotting. Les protéines sont transférées sur une membrane où elles seront adsorbées. Un complexe antigène–anticorps est formé par l'ajout d'anticorps anti-protéine végétale (par exemple des anticorps anti–gliadines si la protéine végétale est du gluten). Le système est révélé par l'ajout d'anticorps dirigés contre les anticorps anti-protéine végétale couplés à la phosphatase. En présence du substrat chromogène de l'enzyme, une coloration dont l'intensité sera proportionnelle à la quantité d'immunocomplexes va se développer. Cette immunoréactivité sera quantifiée à l'aide d'une courbe étalon réalisée avec des solutions de protéine végétale de concentration connue.

4.2 PROTOCOLE

4.2.1 : Réactifs

4.2.1.1 Tampon de transfert

3,03 g de Tris, 14,4 g de glycine (R) et 200 ml de méthanol (R) sont mélangés et complétés à 1 l avec de l'eau distillée.

4.2.1.2 Gélatine 1 %

8,77 g de chlorure de sodium (R), 18,6 g d'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) pour analyses, 6,06 g de Tris et 0,5 ml de Triton X sont dissous dans 800 ml d'eau distillée. Le pH est ajusté à 7,5 avec de l'acide chlorhydrique concentré pour analyses. 10 g de gélatine sont ajoutés et le volume est complété à 1 l.

4.2.1.3 Gélatine 0,25 %

8,77 g de chlorure de sodium (R), 18,6 g d'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) pour analyses, 6,06 g de Tris et 0,5 ml de Triton X sont dissous dans 800 ml d'eau distillée. Le pH est ajusté à 7,5 avec de l'acide chlorhydrique concentré pour analyses. 2,5 g de gélatine sont ajoutés et le volume est complété à 1 l.

4.2.1.4 Solution d'anticorps polyclonaux (du commerce ou décrits en annexe)

10 µl d'anticorps polyclonaux anti-protéine végétale q.s.p. 10 ml avec la gélatine 0,25 % (4.2.1.3).

4.2.1.5 Tampon TBS

29,22 g de chlorure de sodium pour analyse et 2,42 g de Tris sont dissous dans 1 l d'eau distillée.

4.2.1.6 Tampon phosphatase alcaline

5,84 g de chlorure de sodium (R), 1,02 g de chlorure de magnésium (R) et 12,11 g de Tris sont dissous dans 800 ml d'eau distillée. Le pH est ajusté à 9,5 avec de l'acide chlorhydrique concentré et le volume est complété à 1 l.

4.2.1.7 Révélateur

15 g de phosphate de bromochloroindol phosphate (BICP), 30 g de bleu de nitrotétrazolium (NBT) sont dissous dans 100 ml de tampon phosphatase alcaline (4.2.1.6).

4.2.2 Mode opératoire

Après l'électrophorèse, les protéines sont transférées du gel vers une membrane de difluorure de polyvinylidène par élution électrophorétique: 16 heures à 4°C sous 30 V dans le tampon de transfert (4.2.1.1). Les membranes sont saturées avec de la gélatine à 1 % (4.2.1.2) et lavées 3 fois avec la gélatine 0,25 % (4.2.1.3). La gélatine se fixe sur les sites libres et empêche l'adsorption non spécifique des réactifs immunologiques. La membrane est ensuite plongée dans 10 ml de la solution d'anticorps polyclonaux anti-protéine végétale (4.2.1.4). Dans le cas du gluten, les anticorps anti-gliadines proviennent du commerce. Les autres types d'anticorps sont préparés selon la méthode figurant en annexe. Le complexe antigène-IgG est détecté par l'ajout de 10 µl d'anticorps anti-IgG de lapin marqués à la phosphatase alcaline. Les membranes sont lavées deux fois avec la gélatine 0,25 % (4.2.1.3) et une fois avec le tampon TBS (4.2.1.5). Après incubation dans le révélateur (4.2.1.7), un précipité de couleur violet foncé se forme à l'endroit où l'enzyme s'est fixé.

4.3 ANALYSE QUANTITATIVE

Pour calculer la quantité d'immunoréactivité résiduelle d'un vin commercialisé, une courbe étalon est tracée : concentrations connues de protéine végétale déposée sur le gel (et transférée sur membrane) en fonction des surfaces obtenues par intégration de l'intensité des spots correspondant à la formation des immun-complexes. L'analyse se fait avec le même équipement que celui utilisé pour analyser les gels d'électrophorèse.

ANNEXE

Production des anticorps polyclonaux anti-pois

Les anticorps polyclonaux anti-pois nécessaires à la détermination de la capacité antigénique des protéines de pois dans les vins et les moûts traités se préparent chez l'animal.

1 Principe

Les sérums contenant les anticorps polyclonaux sont obtenus chez le lapin New Zealand après injection intradermique de l'antigène.

2 Protocole

2.1 Réactifs

2.1.1 Tampon phosphate PBS pH=7.4 : 8 g de NaCl, 200 mg de KCl, 1,73 de Na_2HPO_4 H_2O et 200 mg de KH_2PO_4 sont dissous dans 300 ml d'eau distillée. Le pH est ajusté à 7,4 avec de la soude 1 M. Le volume est complété à 1 l avec de l'eau distillée.

2.1.2 Antigènes :

10 mg de protéine de pois sont dissous dans 5 ml de tampon phosphate PBS (2.1.1). La solution est ensuite filtrée stérilement sur 0,2 µm et conservée à –20°C jusqu'au jour de l'immunisation.

2.2 Mode opératoire

1 ml de solution 2.1.2 est mélangé à 1 ml d'adjuvant complet de Freund. 1 ml de ce mélange est injecté en intradermique chez un lapin New Zealand d'un poids de 3 kg environ. Cette injection est répétée au 15ème, 30ème et 45ème jour.

60 jours après la première injection, 100 µl de sang sont prélevés au niveau de la veine auriculaire et sont testés pour leur capacité à réagir avec les antigènes. Cette évaluation est réalisée par immunoblotting comme décrit dans le chapitre 4.2 de la méthode d'analyse à partir d'un gel sur lequel la protéine de pois a migré.

Après vérification de la formation d'un complexe antigène-anticorps, 15 ml de sang sont prélevés au niveau de la veine auriculaire. Le sang est placé à 37°C pendant 30 minutes. Le sérum contenant les anticorps polyclonaux anti-pois est prélevé après centrifugation du sang à 3000 rpm pendant 5 minutes.

Méthode OIV-MA-AS315-13 Méthode Type IV

Recherche et dosage des polychlorophenols et des polychloroanisoles dans les vins, les bouchons, les bois et les bentonites utilisées comme pieges d'atmosphère

(Résolution OENO 8/2006)

SUPPRIMÉE
(Remplacée par méthode OIV-MA-AS315-17)

Méthode OIV-MA-AS315-14 Méthode Type IV

Dosage du lysozyme dans le vin par HPLC

(OENO 8/2007; OIV/OENO 377/2009)

1. Introduction

Il est préférable d'utiliser pour le lysozyme une méthode analytique non basée sur l'activité enzymatique.

2. Champ d'application

Cette méthode permet la quantification du lysozyme (mg de protéine/L) présent dans les vins blancs et rouges indépendamment de l'activité enzymatique (qui pourrait être compromise par une dénaturation partielle ou par des phénomènes de complexation et de coprécipitations) de la matrice.

3. Définition

La chromatographie liquide à haute performance (CLHP) offre une approche analytique basée sur l'interaction de type stérique, polaire ou d'adsorption entre la phase stationnaire et l'analyte et, par conséquent, non liée à l'activité enzymatique réelle de la protéine.

4. Principe

L'analyse s'effectue par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) en associant un détecteur spectrophotométrique et un détecteur spectrofluorimétrique. Le contenu inconnu de l'échantillon de vin est calculé en fonction de la surface du pic chromatographique en utilisant la méthodologie de l'étalonnage externe.

5. Réactifs

5.1. Solvants et solutions

Acétonitrile (CH_3CN) pour analyse CLHP
Acide trifluoroacétique (TFA) pur
Eau désionisée pour analyse CLHP
Solution standard : acide tartrique 1g/L, Alcool éthylique 10% v/v ajusté à pH 3,2 avec du tartrate de potassium neutre

5.2. Éluants

A : CH_3CN 1%, TFA 0,2 %, H_2O= 98,8%

B : CH_3CN 70%, TFA 0,2 %, H_2O= 29,8%

5.3. Solutions de référence

De 1 à 250 mg/L de lysozyme standard dissous dans la solution modèle par agitation continue durant un minimum de 12 heures.

6. Matériel

6.1. Appareil HPLC avec système de pompage prévu pour effectuer un gradient d'élution

6.2. Logement pour colonne thermostatée (four)

6.3. Détecteur spectrophotométrique associé à un détecteur spectrofluorimétrique

6.4. Boucle d'injection , 20 µL

6.5. Colonne polymère à phase inverse avec des groupes fonctionnels phényl (diamètre des pores = 1 000 Å, limite d'exclusion = 1 000 000 Da), Tosoh Bioscience TSK-gel Phényl 5PW RP 7,5 cm x 4,6 mm ID, à titre d'exemple

6.6. Précolonne dans le même matériau que la colonne, Tosoh Bioscience TSK-gel Phényl 5PW RP Guardgel 1,5 cm x 3,2mm ID, à titre d'exemple

7. Préparation de l'échantillon

Les échantillons de vin sont acidifiés avec du HCl (10 M) dilué au 1/10ème et filtrés avec un filtre en polyamide dont les pores ont un diamètre de 0,22 µm, 5 minutes après l'ajout. L'analyse chromatographique est effectuée immédiatement après la filtration.

8. Conditions opératoires

8.1. Débit d'éluant : 1mL/min

8.2. Température de la colonne : 30°C

8.3. Détection spectrophotométrique : 280 nm

8.4. Détection spectrofluorimétrique : λ ex = 276 nm ; λ em = 345 nm ; Gain = 10

8.5. Programme du gradient d'élution

Temps (min)	Sol A%	Sol B%	gradient
0	100	0	
			isocratique
3	100	0	
			linéaire
10	65	35	
			isocratique
15	65	35	
			linéaire
27	40.5	59.5	
			linéaire
29	0	100	
			isocratique
34	0	100	
			linéaire
36	100	0	
			isocratique
40	100	0	

8.6. Temps de rétention moyen du lysozyme : 25,50 minutes

9. Calcul

Les solutions de référence contenant les concentrations suivantes de lysozyme sont analysées en triple : 1 ; 5 ; 10 ; 50 ; 100 ; 200 ; 250 mg/L. Sur chaque chromatogramme, les aires du pic correspondant au lysozyme sont reportées sur un diagramme en fonction de leurs concentrations respectives afin d'obtenir les droites de régression linéaire exprimées par la formule $Y= ax+b$. Le coefficient de détermination r^2 devra être > 0,999.

10. Caractéristiques de la méthode

Dans l'objectif d'évaluer l'aptitude de la méthode pour l'objectif formulé, une étude de validation a été réalisée en tenant compte de la linéarité, des limites de détection et de quantification, et de la précision de la méthode. Ce dernier paramètre a été déterminé en définissant le niveau de précision et d'exactitude de la méthode.

	Plage de linéarité (mg/L)	Pente de la droite	Coefficient de détermination (r^2)	LD (mg/L)	LQ (mg/L)	Répétabilité (n=5) RSD%			Reproductibilité (n=5) RSD%
						Std[1]	V.R.[2]	V.B.[3]	Std[1]
UV	5-250	3 786	0,9993	1,86	6,20	4,67	5,54	0,62	1,93
FLD	1-250	52 03 7	0,9990	0,18	0,59	2,61	2,37	0,68	2,30

Tableau 1 : Données relatives aux caractéristiques de la méthode : [1] solution standard ; [2] vin rouge ; [3] vin blanc

10.1. Linéarité de la méthode

Sur la base des résultats obtenus grâce à l'analyse de régression linéaire, la méthode s'est révélée linéaire pour les plages indiquées dans le tableau 1.

10.2. Limite de détection et de quantification

La limite de détection (LD) et la limite de quantification (LQ) ont été calculées comme le signal équivalant à respectivement 3 fois et 10 fois le bruit de fond chromatographique en conditions de travail sur matrice réelle (tableau 1).

10.3. Précision de la méthode

Les paramètres pris en considération sont la répétabilité et la reproductibilité. Le tableau 1 indique les valeurs de ces paramètres (exprimées comme % d'écart standard de mesures répétées avec différentes concentrations) relevées sur la solution standard, sur vin blanc et sur vin rouge.

10.4. Exactitude de la méthode

Le pourcentage de récupération a été calculé sur les solutions standard contenant 5 et 50 mg/L de lysozyme, additionnées d'une quantité donnée de lysozyme, comme indiqué dans le tableau suivant.

	[C] initial nominal (mg/L)	Ajout (mg/L)	[C] théorique (mg/L)	[C] trouvée (mg/L)	Écart standard	Récupération %
UV 280 nm	50	13,1	63,1	62,3	3,86	99
FD	50	13,1	63,1	64,5	5,36	102
UV 280 nm	5	14,4	19,4	17,9	1,49	92,1
FD	5	14,4	19,4	19,0	1,61	97,7

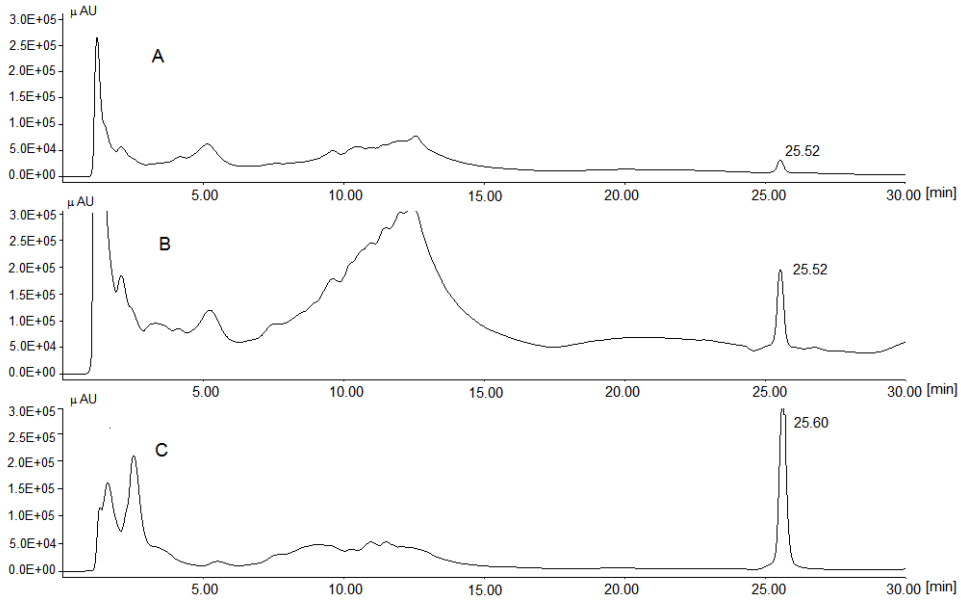


Fig.1 Chromatogramme de vin rouge contenant du Lysozyme pur (une solution standard contenant 1 000 mg/L de Lysozyme a été ajouté au vin pour obtenir une concentration finale de 125 mg/L de Lysozyme). A: détecteur UV à 280 nm; B: détecteur UV à 225 nm; C: détecteur FLD (λ ex 276 nm; λ em 345 nm).

11. Bibliographie

Claudio Riponi; Nadia Natali; Fabio Chinnici. Quantitation of hen's egg white lysozyme in wines by an improved HPLC-FLD analytical method. Am. J. Enol. Vit., in press.

Méthode OIV-MA-AS315-15 Méthode Type II

Détermination du 3-methoxypropane-1,2-diol et des diglycérols cycliques (dérivés de glycérol technique) dans le vin par CG-SM – description de la méthode et de l'étude collaborative –

(OENO 11/2007; OIV/OENO 377/2009)

1. Introduction

C'est une méthode validée à l'échelon international pour la détermination du 3-méthoxypropane-1,2-diol (3-MPD) et des diglycérols cycliques (DC) – ces deux produits étant reconnus comme des impuretés du glycérol technique – dans différents types de vin. Il est avéré que le glycérol produit par la transestérification de triglycérides végétaux et animaux avec du méthanol contient une quantité importantee de 3-MPD. La synthèse de glycérol à partir de produits pétrochimiques génère des impuretés de DC. L'une des méthodes publiées [1, 2, 3[i]] a été adoptée, modifiée et testée dans le cadre d'une étude collaborative. Cette méthode optimisée a fait l'objet d'une étude collaborative [2] dont la conception et l'évaluation sont inspirées de la Résolution 8/2000 O.I.V. « Protocole de validation de méthodes analytiques ».

2. Champ d'application

La méthode décrite convient à la détermination de 3-MPD et de 6 diglycérols cycliques (cis-, trans-2,6-bis(hydroxyméthyl)-1,4-dioxane ; cis-, trans-2,5-bis(hydroxyméthyl)-1,4-dioxane ; cis-, trans-2-hydroxyméthyl-6-hydroxy-1,4-dioxépane) dans des vins blancs, rouges, doux et secs. L'étude décrite couvre des plages de concentration respectives de 0,1 à 0,8 mg/L pour le 3-MPD et de 0,5 à 1,5 mg/L pour les DC.

3. Définitions

3-MPD	3-méthoxypropane-1,2-diol
ANVA	Analyse de variance
C	Concentration
DC	Diglycérols cycliques
CG-SM	Chromatographie en phase gazeuse – Spectrométrie de masse
H_2	Hydrogène
EI	Étalon interne

m/z	Rapport masse/charge
NM	Niveau de calibrage matriciel
S0	Dilution standard 1 000 ng/µL
S1	Dilution standard 100 ng/µL
S2	Dilution standard 10 ng/µL

4. Principe

Les analytes et l'étalon interne sont relargués par ajout de K_2CO_3, puis extraits à l'aide d'éther diéthylique. Les extraits sont analysés directement par CG-SM sur une colonne polaire. La détection est ensuite effectuée en mode fragmentométrique.

5. Réactifs et appareillages

5.1 Produits chimiques

5.1.1 K_2CO_3 p.A.
5.1.2 Éther diéthylique Uvasol pour spectroscopie
5.1.3 Tamis moléculaire (diam. : 2 mm, dim. pore : 0,5 nm)
5.1.4 Ethanol (absolu)

5.2 Produits

5.2.1 Mélange diglycérol cyclique (6 composants) - Solvay Alkali GmbH [1], 89,3 % cis-, trans-2,6-bis(hydroxyméthyl) 1,4-dioxane ; cis-, trans-2,5-bis(hydroxyméthyl) 1,4-dioxane ; cis-, trans-2,-hydroxyméthyl-6-hydroxy-1,4-dioxépane
5.2.2 3-méthoxypropane-1,2-diol (3-MPD) 98 % (CAS 623-39-2)
5.2.3 butane-1,4-diol-1,1,2,2,3,3,4,4-$(^2H)_8$ 98 % (CAS 74829-49-5)

5.3 Préparation des solutions standard

5.3.1 Solutions mères S0

Peser précisément 10,0 mg ± 0,05 mg de chaque substance standard (11,2 mg pour les DC, correspondant à une pureté de 89,3 %) et transvaser chaque volume dans une fiole jaugée de 10 mL (une pour chaque substance). Ajouter exactement 10 mL d'éthanol et mélanger vigoureusement. La concentration de cette solution est de 1 000 ng/µL.

[1] Solvay Alkali GmbH ne commercialise plus de mélanges standard ; des solutions de ce mélange peuvent être obtenues auprès de BfR. Federal Institute for Risk Assessment, Thielallee 88-92, D-14195 Berlin. www.bfr.bund.de. poststelle@bfr.bund.de

5.3.2 Solutions préparées S1

Transvaser volumétriquement 1 000 µL de la solution mère S0 (5.3.1) dans une fiole jaugée de 10 mL, diluer avec de l'éthanol, boucher hermétiquement la fiole et la renverser pour mélanger. La concentration de cette solution est de 100 ng/µL.

5.3.3 Solutions préparées S2

Transvaser volumétriquement 100 µL de la solution mère S0 (5.3.1) dans une fiole jaugée de 10 mL, diluer avec de l'éthanol, boucher hermétiquement la fiole et la renverser pour mélanger. La concentration de cette solution est de 10 ng/µL.

Présentation des solutions standard requises :
Mélange CD (6 composants)

Solution	Concentration	
S0	1 000	ng/µL
S1	100	ng/µL

3-méthoxypropane-1,2-diol (3-MPD)

Solution	Concentration	
S0	1 000	ng/µL
S1	100	ng/µL
S2	10	ng/µL

butane-1,4-diol-$(^2H)_8$ (étalon interne EI)

Solution	Concentration	
S0	1 000	ng/µL
S1	100	ng/µL

5.4 Préparation de la courbe de calibrage matriciel

Des solutions de calibrage sont préparées, par rapport à la matrice, dans un vin non contaminé. Il faut d'abord analyser ce vin afin de s'assurer qu'il n'est pas contaminé par du 3-MPD ou des DC. Si les concentrations d'analytes dans l'échantillon sont hors du champ de la courbe de calibrage, des doses supplémentaires doivent être préparées. Un blanc doit en outre être inséré de manière à vérifier que l'étalon interne n'interfère pas avec l'un ou l'autre des composants du vin.

Tableau 1. Plan de pipetage pour le calibrage matriciel

Niveau de calibrage matriciel		Ajout µl		Volume de vin ml	C vin µg/L	C vin mg/L
Blanc	EI	-		10	0	0
	3-MPD	-				
	DC	-				
NM0	EI	100	S1	10	1 000	1,00
	3-MPD	-				
	DC	-				
NM1	EI	100	S1	10	1 000	1,00
	3-MPD	100	S2		100	0,10
	DC	50	S1		500	0,50
NM2	EI	100	S1	10	1 000	1,00
	3-MPD	25	S1		250	0,25
	DC	100	S1		1 000	1,00
NM3	EI	100	S1	10	1 000	1,00
	3-MPD	50	S1		500	0,50
	DC	20	S0		2 000	2,00
NM4	EI	100	S1	10	1 000	1,00
	3-MPD	100	S1		1 000	1,00
	DC	30	S0		3 000	3,00
NM5	EI	100	S1	10	1 000	1,00
	3-MPD	200	S1		2 000	2,00
	DC	40	S0		4 000	4,00

6. Appareillage

6.1 Balance d'analyses. Précision ±0,0001 g.
6.2 Centrifugeuse de laboratoire (minimum 4 000 tr/mn).
6.3 Chromatographe en phase gazeuse. Avec détecteur à spectrométrie de masse, injecteur split-splitless.

6.4 Diverses pipettes de précision et fioles jaugées.
6.5 Pipettes Pasteur.
6.6 Flacons de centrifugation 40 mL.
6.7 Flacons CG (1,5 –2,0 mL).
6.8 Thermostat.
6.9 Agitateur secoueur.

7. Échantillonnage

Prévoir des échantillons de vin de taille suffisante pour l'analyse. Le volume requis pour un échantillon d'essai est de 10 mL. Le vin employé pour la préparation du calibrage matriciel (5.4) doit être exempt d'analytes.

8. Procédure

8.1 Extraction

Ajouter 100 µL de solution standard S1 (5.3.2) à 10 mL de vin dans un flacon de centrifugation adapté – ex. : 40 mL (cela correspond à une concentration de 1 mg/L de butane-1,4-diol-($^2H)_8$). Ajouter précautionneusement 10 g de K_2CO_3 et mélanger. Il convient d'observer une grande prudence durant cet ajout, car le dégagement du CO_2 produit de la chaleur. Refroidir la solution dans un bain-marie à environ 20 °C, puis ajouter 1 mL d'éther diéthylique. Homogénéiser le mélange pendant 5 minutes au moyen d'un agitateur secoueur vertical. Centrifuger les flacons à 4 000 tr/mn pendant 5 minutes. Pour une élimination optimale de la phase organique, l'extrait peut être partiellement transvasé dans un flacon de diamètre plus petit. À l'aide d'une pipette Pasteur, transvaser la phase organique supérieure, composée d'éther diéthylique et d'éthanol, dans un flacon CG. Ajouter environ 120 mg de tamis moléculaire dans le flacon. Boucher le flacon, laisser reposer pendant environ 2 heures et secouer énergiquement de temps en temps. Le surnageant incolore est transvasé dans un second flacon CG pour l'analyse CG-SM.

8.2 Analyse CG-SM

Les paramètres spécifiques de l'analyse CG-SM sont donnés ci-dessous. D'autres systèmes peuvent toutefois être employés dans la mesure où ils sont en mesure de produire une performance chromatographique analogue et une sensibilité adéquate. Le système chromatographique doit être capable de séparer l'étalon interne du phényléthanol, susceptible de provoquer des interférences.

Conditions CG typiques

Chromatographe en phase gazeuse : HP 5890 ou équivalent.

Colonne DBwax (J&W) 60 m, diamètre interne 0,32 mm, épaisseur de film 0,25 µm, précolonne de rétention capillaire 2 m – dimensions identiques ou équivalentes.
Gaz vecteur : H_2.
Flux – Pression de 60 kPa en tête de colonne
Programme de température :
90° C, 2 mn, rampe à 10°C/mn jusqu'à 165° C, maintien pendant 6 mn, rampe à 4° C/mn jusqu'à 250°C, maintien pendant 5 mn.

Température d'injection : 250° C ; volume injecté ; 2 µl, mode splitless durant 90 s.

Conditions SM spécifiques

Spectromètre de masse : Finnigan SSQ 710 ou équivalent.
Ligne de transfert : 280° C.
Source : 150° C.
Détection SM :

fenêtre 1 :	0-25 mn :	
14,3 mn	3-MPD :	m/z 75, m/z 61
16,7 mn	EI :	m/z 78, m/z 61

Le temps d'acquisition pour chaque masse est de 250 µs (temps de maintien).
Vérifier pour m/z 91 la séparation du pic de l'étalon interne (EI) de celui du phényléthanol, qui produit aussi un fragment m/z 78.

fenêtre 2 :	25-40 mn :	
32-34,5 mn	DC :	m/z 57, m/z 117

Le temps d'acquisition pour chaque masse est de 250 µs (temps de maintien).

Il a été observé que l'analyte pouvait dégrader la colonne chromatographique. En particulier, l'injection du mélange de DC à haut point d'ébullition est suspecté de provoquer des dommages irréversibles. Il convient d'éviter les injections de solutions standard de référence ; l'analyse doit être limitée aux solutions relarguées, avec de faibles concentrations d'analytes. De plus, il est recommandé de prévoir une précolonne de 1-2 m afin de protéger la colonne d'analyse. Quoi qu'il en soit, la colonne d'analyse doit être considérée comme un consommable et, de ce fait, remplacée régulièrement.

9. Évaluation

9.1. Identification

Noter le temps de rétention relatif de chaque analyte par rapport à l'EI. Calculer le temps de rétention relatif moyen des analytes dans les solutions standard de calibrage. Le temps de rétention relatif de l'analyte doit être identique à celui de l'étalon, avec une marge de ± 0,5 %. Comme critère de confirmation, un rapport ionique peut être calculé pour chaque analyte en mode fragmentométrique. Ce rapport est de 117/57 pour les DC, de 75/61 pour 3-MPD et de 78/61 pour l'EI. Le rapport doit se situer à ± 20 % de celui observé pour l'échantillon enrichi. Il est également possible d'obtenir confirmation de l'identité des substances en effectuant le balayage complet des ions.(scan).

9.2. Quantification

La quantification se fait au moyen de la courbe de calibrage matriciel dûment préparée selon la section appropriée. Les surfaces analyte/EI sont corrélées par régression linéaire par rapport à la concentration de l'analyte. La quantification des DC se fait en additionnant les surfaces des 6 pics et en calculant la teneur totale, de manière à autoriser des distributions des six CD caractéristiques autres que dans la solution standard. Les valeurs m/z suivantes sont utilisées pour la quantification :

3-MPD :	m/z 75
EI :	m/z 78
DC :	m/z 117

9.3. Expression des résultats

Les résultats doivent être exprimés en mg/L pour 3-MPD et DC, avec deux décimales (ex. : 0,85 mg/L).

9.4. Limite de détection et limite de quantification

La limite de détection (LD) et la limite de quantification (LQ) dépendent des conditions de mesure individuelles des analyses chimiques qui sont à déterminer par les utilisateurs de la méthode.

La limite de détection (LD) et la limite de quantification (LQ) ont été évaluées à l'aide des instruments et des conditions mentionnés ci dessus (§. 8) en suivant les instructions mentionnées dans la résolution OENO 7-2000 (AS1-10-LIMDET) "Estimation de la Limite de Détection et de la limite de Quantification d'une Méthode d'Analyse". A partir du modèle de "Schéma logique pour la prise de décisions" numéro 3, l'approche graphique doit être appliquée en suivant les conditions stipulées au paragraphe 4.2.2. Pour ceci, on choisit une partie du chromatogramme encadrant le pic et correspondant à 10 fois la largeur du pic à mi-

hauteur ($w_{½}$). Deux lignes parallèles sont tracées encadrant l'amplitude maximale de la fenêtre du signal (bruit de fond). La distance entre ces deux lignes (h_{max}), multipliée par 3 pour la LD, et par 10 pour la LQ et finalement convertie en unités de concentration en utilisant le facteur de réponse de la substance donne les valeurs recherchées (LD et LQ).

3-MPD:
LD: 0,02 mg/l
LQ: 0,06 mg/l

DC (sum):
LD: 0,08 mg/l
LQ: 0,25 mg/l

(Note: Etant donné que DC correspond à un mélange de 6 composés isolés avec le même facteur réponse - du fait de leur similitude chimique – et avec un h_{max} constant dans la partie correspondante du chromatogramme, la LD et la LQ pour chaque composé isolé représentent un sixième des valeurs citées ci-dessus.)

10. Fidélité (validation interlaboratoire)

Onze laboratoires ont participé à l'étude collaborative. Ces laboratoires participants possèdent tous une expérience avérée dans l'analyse des dérivés. Ils ont tous pris part à l'essai préparatoire.
Il est apparu que la répétabilité (r) et la reproductibilité (R), ainsi que les écarts-types respectifs (S_r et S_R), étaient fortement corrélés, sur le plan statistique, avec la concentration des analytes (ANNEXE : Schémas 1 et 2), r avec une probabilité supérieure à 95 % et R avec une probabilité supérieure à 99 % pour chacun des analytes en utilisant le modèle de régression linéaire.
Les paramètres de performance peuvent se calculer ainsi :

3-MPD

$S_r = 0{,}060\ x$ x = concentration de 3-MPD [mg/L]
$S_R = 0{,}257\ x$

$r = 0{,}169\ x$
$R = 0{,}720\ x$

DC

$S_r = 0{,}082\ x$ x = concentration de DC [mg/L]

$S_R = 0{,}092\ x + 0{,}070$

$r = 0{,}230\ x$
$R = 0{,}257\ x + 0{,}197$

11. ANNEXE (Étude interlaboratoire)

11.1. Participants

Onze laboratoires internationaux ont participé à l'étude collaborative (5). Ces laboratoires participants possèdent tous une expérience avérée dans l'analyse des dérivés. Ils ont tous pris part à l'essai préparatoire :

CSL, York, Royaume-Uni

Unione Italiana Vini, Vérone, Italie

BfR, Berlin, Allemagne

BLGL, Würzburg, Allemagne

Istituto Sperimentale per l'enologia, Asti, Italie

LUA, Speyer, Allemagne

Labor Dr. Haase-Aschoff, Bad Kreuznach, Allemagne

CLUA, Münster, Germany

Kantonales Laboratorium, Füllinsdorf, Suisse

LUA, Coblence, Allemagne

ISMAA, S. Michele all Adige, Italie

11.2. Échantillons

En novembre 2002, les laboratoires participants se sont vu remettre onze échantillons de vin, consistant en cinq jeux d'échantillons en double aveugle et en un autre matériau d'essai. Des vins blancs secs, des vins rouges secs et un vin rouge doux faisaient fonction de matériau d'essai. Les échantillons ont préalablement été soumis à des essais d'homogénéité ([ii]).

11.3. Analyse des données

Une analyse statistique a été conduite conformément au « Protocole de conception, de conduite et d'interprétation des études de performance-méthode » ([iii]) sur un modèle en double aveugle.

1. La détermination des valeurs aberrantes a été effectuée à l'aide des tests de Cochran, Grubbs unilatéral et Grubbs bilatéral.
2. L'analyse statistique a été conduite afin d'obtenir des données de répétabilité et de reproductibilité.
3. Les valeurs de Horrat ont été calculées.

Tableau 2. Résultats pour 3-MPD

	ÉCHANTILLON A Vin blanc	**ÉCHANTILLON B Vin rouge[a]**	**ÉCHANTILLON C Vin blanc**	**ÉCHANTILLON F Vin rouge doux**	**ÉCHANTILLON G Vin blanc**
Moyenne mg/L	**0,30**	**0,145**	**0,25**	**0,48**	**0,73**
mg/L enrichi	0,30	0,12	-	-	0,80
Récupération %	100	121	-	-	91
n	10	10[a]	10	10	10
nc	1	1[a]	1	1	1
Résultats aberrants	2	0	0	1	1
n1	7	9 [a]	9	8	8
r	0,03	-	0,05	0,08	0,13
sr	0,01	-	0,02	0,03	0,05
RSDr %	3,20	-	7,20	5,80	6,57
Hor	**0,30**	**-**	**0,60**	**0,50**	**0,59**
R	0,13	0,13	0,15	0,31	0,59
sR	0,05	0,05	0,05	0,11	0,21
RSDr %	15,50	32,67	21,20	22,70	28,91
HoR	**0,80**	**1,53**	**1,10**	**1,30**	**1,72**

[a] Échantillon d'essai simple ; n, nc et n1 sont des résultats simples.

moyenne moyenne arithmétique des données employées dans l'analyse statistique

n nombre total de groupes de données soumis

nc nombre de résultats (laboratoires) exclus pour non conformité

r. aberrants nombre de résultats (laboratoires) exclus après avoir été déterminés aberrants en vertu des essais Cochran ou Grubbs

n1 nombre de résultats (laboratoires) retenus dans l'analyse statistique

S_r écart-type de la répétabilité

RSD_r écart-type relatif de la répétabilité (S_r x 100/moyenne)

r répétabilité (2,8 x S_r)

Ho_r la valeur Horrat de répétabilité est la valeur RSD_r observée, divisée par la valeur RSD_r estimée par l'équation Horwitz sur l'hypothèse r = 0,66R

R reproductibilité (entre l'écart laboratoire) (2,8 x S_R)

S_R écart-type de la reproductibilité

RSD_R écart-type relatif de la reproductibilité (S_R x 100/moyenne)

Ho_R la valeur Horrat de reproductibilité est la valeur RSD_R observée, divisée par la valeur RSD_R calculée par l'équation Horwitz

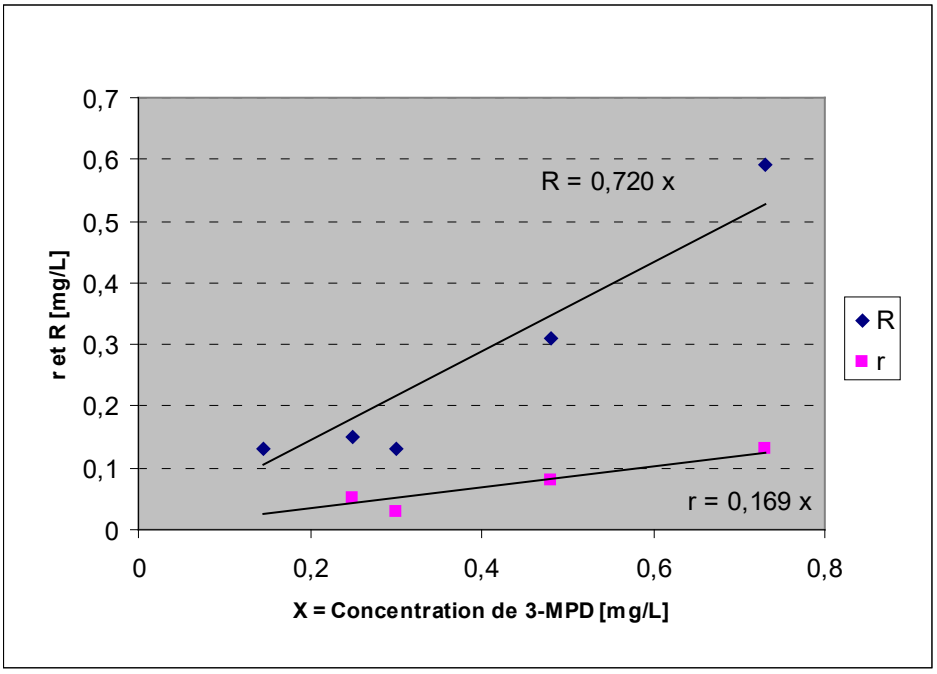


Schéma 1. Corrélation entre la concentration de 3-MPD et r et R.

Tableau 3. Résultats pour les diglycérols cycliques

	ÉCHANTILLON A Vin blanc	ÉCHANTILLON B Vin rouge[a]	ÉCHANTILLON D Vin rouge	ÉCHANTILLON F Vin rouge doux	ÉCHANTILLON G Vin blanc
Moyenne mg/L	**1,55**	**0,593**	**0,80**	**0,96**	**0,56**
mg/L enrichi	1,50	0,53			0,50
Récupération %	103	113			112
n	11	11[a]	11	11	11
nc	0	0	0	0	0
Résultats aberrants	2	0	1	2	1
n1	9	11[a]	10	9	10
r	0,37	-	0,19	0,18	0,15
sr	0,13	-	0,07	0,07	0,05
RSDr %	8,50	-	8,60	6,70	9,30
Hor	**0,90**	**-**	**0,80**	**0,60**	**0,80**
R	0,61	0,379	0,39	0,41	0,34
sR	0,22	0,135	0,13	0,15	0,12
RSDR %	14,00	22,827	17,30	15,20	21,50
HoR	**0,90**	**1,319**	**1,00**	**0,90**	**1,20**

[a] Échantillon d'essai simple ; n et nc sont des résultats simples.

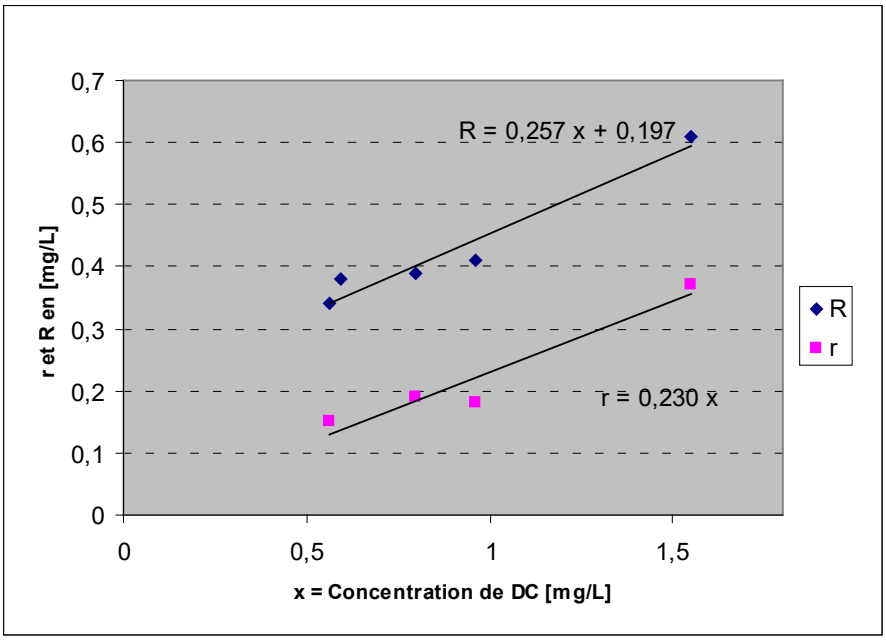


Schéma 2. Corrélation entre la concentration de DC et r et R.

[i](1) Lampe, U., Kreisel, A., Burkhard, A., Bebiolka, H., Brzezina, T., Dunkel, K. (1997)
Zum Nachweis eines Glycerinzusatzes zu Wein
Deutsche Lebensmittelrundschau 93(4), 103-110

(2) Otteneder, H., Zimmer, M., Schaab, J. (1999)
Nachweis des Glycerinzusatzes
Deutsche Lebensmittel Rundschau 95, 172-175

(3) Bononi, M., Favale, C., Lubian, E., Tateo F. (2001)
A new method for the identification of cyclic diglycerols in wine
J. Int. Sci. Vigne Vin. 35, 225-229

(4) Fauhl C, Wittkowski R, Lofthouse J, Hird S, Brereton P, Versini G, Lees M, Guillou C (2004),

Gas Chromatographic/Mass Spectrometric Determination of 3-Methoxy-1,2-Propanediol and Cyclic Diglycerols, By-Products of Technical Glycerol, in Wine: Interlaboratory Study,
Journal of AOAC International 87: 1179-1188

(5) Thompson, M. and Wood, R. (1993)
International Harmonised Protocol for the Proficiency Testing of (Chemical) Analytical Laboratories
J AOAC Int 76, 926-940

(6) Horwitz ,W. (1995)
Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies
Pure and Applied Chemistry 67, 331-343

ii

iii

Méthode OIV-MA-AS315-16 Méthode Type IV

Dosage du 2,4,6-trichloroanisole relargable dans le vin par les bouchons de liège

OIV-OENO 296-2009
OIV-OENO 623/2018

1 DOMAINE D'APPLICATION :

Contrôle de qualité des bouchons de liège destinés à fermer les bouteilles de vin.
La méthode pour la détermination du 2,4,6-trichloroanisole (TCA) relargable par les bouchons mesure le TCA libéré par un échantillon de bouchons macéré dans une solution hydroalcoolique. L'objectif de cette méthode est d'évaluer le risque de libération par le lot de bouchons analysés et de fournir une méthode visant le contrôle de qualité des bouchons de liège.

2 PRINCIPE

La méthode vise à simuler les phénomènes de migration du 2,4,6-trichloroanisole (TCA) susceptibles de se produire entre le bouchon de liège et le vin en bouteilles. Les bouchons de liège sont mis à macérer dans un vin ou une solution hydroalcoolique jusqu'à l'obtention d'un équilibre. Le TCA de l'espace de tête d'une partie aliquote du macérât est prélevé par la technique de microextraction en phase solide (SPME), puis analysé par chromatographie en phase gazeuse, avec détection par spectrométrie de masse (GC/MS) ou par capture d'électrons (GC/ECD).

3 REACTIFS ET PRODUITS

3.1 Vin blanc de titre alcoométrique compris entre 10 et 12% vol. Peut être remplacé par une solution hydroalcoolique de titre alcoométrique de 12 % vol. Le vin et/ou la solution hydroalcoolique doivent être exempts de TCA.
3.2 Chlorure de sodium, pureté ≥ 99,5%.
3.3 Étalon interne pour l'analyse GC/MS : 2,4,6-trichloroanisole (TCA)-d5, pureté ≥ 98%, ou 2,3,6-trichloroanisole, pureté ≥ 99%.

Étalon interne pour l'analyse GC/ECD : 2,6-dibromoanisole, pureté ≥ 99%, ou 2,3,6-trichloroanisole, pureté ≥ 99%.

3.4 2,4,6-trichloroanisole (TCA) pureté ≥ 99,0%

3.5 Ethanol absolu

3.6 Eau désionisée pure, exempte de TCA, type II selon la Norme ISO EN 3696.

3.7 Solution hydroalcoolique à 12% vol.

Préparée à partir d'éthanol absolu (3.5) et d'eau désionisée pure exempte de TCA (3.6). 3.8 Solution mère d'étalon interne (500 mg/L). Ajouter 0.050 g soit de 2,4,6-trichloroanisole d5 soit de 2,6-dibromoanisole ou de 2,3,6 trichloroanisole (3.3) à environ 60 mL d'éthanol absolu (3.5). Après dissolution, ajuster le volume à 100 mL avec de l'éthanol absolu (3.5). Se conserve en bouteille de verre pourvue d'un opercule métallique ou en verre. 3.9 Solution intermédiaire d'étalon interne (5,0 mg/L)

Ajouter 1 mL d'une solution soit de 2,4,6-trichloroanisole d5 soit de 2,6-dibromoanisole ou 2,3,6 trichloroanisole à 500 mg/L (3.8) à environ 60 mL d'éthanol absolu (3.5). Après dissolution, ajuster le volume à 100 mL avec de l'éthanol absolu (3.5). Se conserve en bouteille de verre pourvue d'un opercule métallique métallique ou en verre. 3.10 Solution d'étalon interne (2,0 µg/L)

Ajouter 40 µl d'une solution soit de 2,4,6-trichloroanisole d5 soit de 2,6-dibromoanisole ou 2,3,6 trichloroanisole à 5.0 mg/L (3.9) à environ 60 mL d'éthanol absolu (3.5). Après dissolution, ajuster le volume à 100 mL avec de l'éthanol absolu (3.5). Se conserve en bouteille de verre pourvue d'un opercule métallique–métallique *ou en verre.* 3.11 Solution mère d'étalon TCA (40 mg/L)

Ajouter 0,020g de 2,4,6-trichloroanisole à environ 400 ml d'éthanol absolu (3.5). Après dissolution, ajuster le volume à 500 ml avec d'éthanol absolu (3.5).

3.12 Solution intermédiaire d'étalon TCA (80 µg/L)

Ajouter 1 ml d'une solution de 2,4,6-trichloroanisole à 40 mg/L (3.11) à environ 400 ml d'éthanol absolu (3.5). Après dissolution, ajuster le volume à 500 ml avec d'éthanol absolu (3.5).

3.13 Solution intermédiaire d'étalon TCA (160 ng/L)

Ajouter 1 ml d'une solution de 2,4,6-trichloroanisole à 80 µg/L (3.12) à environ 400 ml d'eau désionisée pure (3.6). Après dissolution, ajuster le volume à 500 ml avec d'eau désionisée pure (3.6)

3.14 Utiliser la technique des ajouts dosés pour construire la gamme étalon pour le TCA. On peut utiliser pour cela les solutions d'étalonnage dans une gamme de 0,5 ng/L à 50 ng/L. Ainsi, faire les ajouts dosés d'une solution de 2,4,6-trichloroanisole à 160 ng/L (3.13) à 6 ml d'éthanol absolu (3.5). Après dissolution, ajuster le volume à 50 ml avec d'eau désionisée pure (3.6). Réévaluer périodiquement la courbe de calibration ainsi obtenue ; la

réévaluer également lors de chaque changement majeur au niveau du GC/MS ou GC/ECD.

3.15 : Gaz vecteur Hélium, de pureté chromatographique (≥ 99,9990%).

4. MATERIEL

4.1 Verrerie de laboratoire
4.1.1 Fiole jaugée de 100 ml
4.1.2 Microseringue de 100 µl
4.1.3 Flacon de verre, à large col, avec une capacité adaptée à la taille de l'échantillon et fermant avec un bouchon en verre, métallique ou en matériau qui ne fixe pas le TCA.
4.1.4 Flacon de verre de 20 mL fermant avec une capsule perforée et un opercule à face téflonée.
4.2 Système de microextraction en phase solide (SPME) avec fibre revêtue d'un film de polydiméthylsiloxane de 100 µm d'épaisseur
4.3 Système de chauffage pour flacon (4.1.4)
4.4 Système d'agitation pour flacon (4.1.4)
4.5 Chromatographe en phase gazeuse équipé d'un injecteur "split splitless" et d'un détecteur à spectromètre de masse (SM) ou à capture d'électrons (CE)
4.6 Système d'acquisition des données informatisé
4.7 Eventuellement, système pour prélèvement et injection automatique fonctionnant avec un système SPME.
4.8 Colonne capillaire de phase stationnaire apolaire, type phénylmethylpolysiloxane (ex : Poly 5% phenyl methyl polysiloxane, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm de film) ou équivalent.

5. PREPARATION DE L'ECHANTILLON

Les bouchons sont placés entiers dans un flacon en verre fermé. La capacité du flacon (4.1.3), de même que la quantité de vin ou solution hydroalcoolique (3.1 ou 3.7), doivent être choisi en fonction de la taille de l'échantillon, en assurant que les bouchons soient totalement contenus et immergés dans le flacon de macération.
Exemple 1 : 20 bouchons (45x24) mm, dans un flacon de 1 L ;
Exemple 2 : 50 bouchons (45x24) mm, dans un flacon de 2 L .

L'essentiel du TCA libéré en macération de groupes de bouchons l'est généralement par un pourcentage très faible de ces bouchons. Afin d'obtenir la meilleure représentativité possible d'un lot de bouchon, il convient d'effectuer un nombre d'analyses approprié selon les règles d'échantillonnage et du risque encouru vis-à-vis de la contamination du vin.

6. MODE OPERATOIRE

6.1 Extraction

Après macération durant (24 ± 2) heures dans les conditions de température ambiante du laboratoire, le macérât est homogénéisé par retournement du récipient. Une partie aliquote de 10 ml de solution de macération (5) est transférée en flacon de verre (4.1.4).

Pour augmenter l'efficacité de l'extraction et la conséquente sensibilité de la méthode, il peut être ajouté du chlorure de sodium (3.2). La quantité de chlorure de sodium peut être ajustée / optimisée par les utilisateurs de cette méthode, en fonction du niveau de sensibilité souhaité et des éventuels effets de matrice pouvant survenir. A titre d'exemple, une quantité de chlorure de sodium d'environ 3 g est suggérée. 50 µl de solution d'étalon interne à 2,0 µg/L (3.10) sont immédiatement ajoutés, puis le flacon est fermé à l'aide d'une capsule métallique percée muni d'un opercule silicone/téflonné. La capsule est sertie.
Le contenu du flacon est homogénéisé 10 minutes par agitation à l'aide d'un système d'agitation (4.4) ou par le système automatique (4.7).

Le flacon contenant l'échantillon est placé dans le système de chauffage (4.3) réglé à 35 °C ± 2 °C et maintenu sous agitation (4.4). L'extraction de l'espace de tête est réalisée par le système SPME (4.2) pendant au moins 15 minutes.

6.2 Analyse

La fibre est ensuite désorbée à 260ºC pendant au moins 2 minutes dans l'injecteur d'un chromatographe en phase gazeuse, mode splitless (4.5). La séparation s'effectue à l'aide d'une colonne capillaire de phase stationnaire apolaire (type phénylmethylpolysiloxane ou équivalent). Le gaz vecteur est l'hélium à débit constant de 1 mL/min. Gradient de température 35ºC (3 min) à 265ºC (15ºC/min) donné à titre d'exemple.

6.3 Détection et quantification

La détection et quantification par spectrométrie de masse s'effectuent au moyen d'une sélection d'ions spécifiques. A titre d'exemple, le rapport d'ions suivant est suggéré :

	Analyte	*Ions d'intérêt pour la détection (m/z):*	*Quantification sur l'ion (m/z) :*
Analyse en mode SIM	*2,4,6-TCA*	*195, 210, 212*	*195*
	(2,4,6-TCA)-d_5	*199, 215, 217*	*215*
	2,3,6-TCA	*195, 210, 212*	*212*

	Analyte	*Ions parents (m/z):*	*Ions fils (m/z) :*
Analyse en mode tandem (MS/MS)	*2,4,6-TCA*	*212*	*169, 197*
		196	*167, 169*
	(2,4,6-TCA)-d_5	*217*	*171, 199*

Pour la détermination par ECD, identifier l'analyte et l'étalon interne (2,6-dibromoanisole ou 2,3,6 trichloroanisole) dans le chromatogramme, en comparant les temps de rétention des pics correspondants de l'échantillon à ceux des pics des solutions d'étalon.

7. CALCULS

La surface du pic chromatographique obtenu pour le 2,4,6-trichloroanisole est corrigée par la surface obtenue pour le pic chromatographique de l'étalon interne. La teneur en 2,4,6- trichloroanisole de chaque échantillon est obtenue à l'aide d'une courbe étalon. Les points de cette courbe sont obtenus en traçant les réponses relatives de 2,4,6-trichloroanisole/étalon interne, obtenues pour des solutions hydroalcooliques (3.7) contenant des concentrations connues de 2,4,6-trichloroanisole, en fonction des concentrations de ces solutions *(3.14)*.
Les résultats sont donnés en ng/L de TCA présent dans la solution de macération, arrondis à 0,1 ng/L

8. CARACTERISTIQUE DE LA METHODE

À titre indicatif, le seuil de détection de l'analyse des macérations doit être inférieur à 0,5 ng/L, et le seuil de quantification proche de 1 ng/L. Le coefficient de variation est inférieur à 5% pour 5 ng/L, lorsque l'étalon interne choisi est l'analogue deutéré TCA d5 .
Un essai interlaboratoire a été réalisé afin de valider la méthode.
Cet essai interlaboratoire n'a pas été conduit selon le protocole OIV et les paramètres de validation sont mentionnés dans le FV 1224.

9. BIBLIOGRAPHIE

HERVÉ E., PRICE S., BURNS G., Chemical analysis of TCA as a quality control tool for natural
corks. *ASEV Annual Meeting*. 1999.

Norme ISO 20752:2007. Bouchons de liège – Dosage du 2,4,6-trichloroanisole (TCA) relargable.

FV OIV 1224 : Résultats de l'analyse collaborative Ring test 3-TCA SPME

Méthode OIV-MA-AS315-17 Méthode Type IV

Recherche et dosage des polychlorophenols et des polychloroanisoles, dans les vins, les bouchons, les bois et les bentonites utilisees comme pièges d'atmosphère

(OIV/OENO 374/2009)

1. DOMAINE D'APPLICATION

Tous les vins, les bouchons en liège, bentonites (pièges d'atmosphère) et bois.

2. PRINCIPE

Dosage du 2,4,6-trichloroanisole, du 2,4,6-trichlorophénol, du 2,3,4,6-tétrachloroanisole, du 2,3,4,6-tétrachlorophénol, du pentachloroanisole et du pentachlorophénol en chromatographie en phase gazeuse par injection d'un extrait à l'hexane du vin et à l'éther/hexane des échantillons solides à analyser et étalonnage interne.

3. REACTIFS

Note préalable : tous les réactifs et solvants doivent être exempts des composés à doser listés en 2 au seuil de détection.

3.1 Hexane de pureté ≥ 99 %

3.2 Ether éthylique de pureté ≥ 99 %

3.3 Mélange éther/hexane (50/50 ; v/v)

3.4 Étalon interne : 2,5-Dibromophénol, de pureté ≥ 99 %

3.5 Ethanol absolu

3.6 Eau désionisée pure, exempte de TCA, type II selon la Norme ISO EN 3696.

3.7 Solution hydroalcoolique à 50 % vol. placer 100 ml d'éthanol absolu (3.<5) dans une fiole jaugée de 200 ml (4.9.9) et compléter à 200 ml avec de l'eau désionisée (3.6), homogénéiser.

3.8 Etalon interne :

3.8.1 Solution mère à 200 mg/L. Placer 20 mg de étalon interne (3.4) dans une fiole jaugée de 100 ml (4.9.8) compléter avec la solution hydroalcoolique à 50 % vol. (3.7) et homogénéiser.

3.8.2 Solution d'étalon interne (2 mg/L). Placer 1 ml de la solution mère d'étalon interne (3.8.1) dans une fiole jaugée de 100 ml (4.9.8), compléter avec la solution hydroalcoolique à 50 % vol. (3.7) et homogénéiser.

3.8.3 Solution d'étalon interne (20 µg/L). Placer 1 ml de la solution mère d'étalon interne (3.8.2) dans une fiole jaugée de 100 ml (4.9.8), compléter avec la solution hydroalcoolique à 50 % vol. (3.7) et homogénéiser.

3.9 Produits purs

3.9.1 2,4,6-trichloroanisole : ≥ 99 %, cas : 87-40-1

3.9.2 2,4,6-trichlorophénol : ≥ 99 %, cas : 88-06-2

3.9.3 2,3,5,6-tétrachloroanisole : ≥ 99 %, cas : 6936-40-9 (remarque : le produit recherché dans les échantillons est le 2,3,4,6-tétrachloroanisole mais il n'existe pas dans le commerce)

3.9.4 2,3,4,6-tétrachlorophénol : ≥ 99 %, cas : 58-90-2

3.9.5 pentachloroanisole : ≥ 99 %, cas : 1825-21-1

3.9.6 pentachlorophénol : ≥ 99 %, cas : 87-86-5

3.10 Réactifs pour la derivatisation - Pyridine:anhydride acétique (1:0,4) vol.

3.10.1 Pyridine: ≥ 99 %

3.10.2 Anhydride acétique: ≥ 98 %

3.11 Solution mère de calibrage à 200 mg/l
Dans une fiole jaugée de 100 ml (4.9.8), placer 20 mg environ des produits purs (3.9.1 à 3.9.6) de poids exactement connu (4.7), compléter avec de l'éthanol absolu (3.5). Homogénéiser.

3.12 Solution intermédiaire de calibrage à 200 µg/l
Dans une fiole jaugée de 100 ml (4.9.8) remplie d'éthanol absolu (3.5), ajouter 100 µl de la solution mère de calibrage à 200 mg/l (3.11) à l'aide de la micro-seringue de 100 µl (4.9.1) et homogénéiser.

3.13 Solution fille de calibrage à 4 µg/l
Dans une fiole jaugée de 50 ml (4.9.7) contenant de solution hydroalcoolique à 50 % vol. (3.7) ajouter 1 ml de la solution intermédiaire de calibrage à 200 µg/l (3.12) à l'aide d'une pipette de 1 ml (4.9.6). Compléter à 50 ml avec la solution hydroalcoolique à 50 % vol. (3.7) et homogénéiser.

3.14 Solutions de calibrage. Il est possible de préparer diverses solutions de calibrage à diverses concentrations en rajoutant, à l'aide de la micro-seringue de 100 µl (4.9.1), par exemple 50 µl de la solution fille de calibrage à 4 µg/l (3.13)

dans 50 ml de solution hydroalcoolique à 50 % vol. (3.7) pour obtenir un enrichissement de celui ci de 4 ng/l en substances à doser.
Le même raisonnement peut permettre de préparer des solutions de calibrage de diverses concentrations soit dans des solutions hydroalcooliques ou du vin ou encore d'enrichir un milieu d'extraction avec une quantité parfaitement connue de produits purs.

3.15 Bentonite du commerce.

4. MATERIEL

4.1 Chromatographe en phase gazeuse avec injecteur split-splitless couplé à un détecteur à capture d'électrons. (Il est également possible d'utiliser un spectromètre de masse)

4.2 Colonne capillaire de phase stationnaire apolaire, type phénylmethylpolysiloxane (0,32 mm x 50 m, épaisseur de film 0,12 µm), ou équivalent.

4.3 Conditions chromatographiques, à titre d'exemple:

4.3.1 Injection en mode "split-splitless" (temps de fermeture des vannes 30 secondes)

4.3.2 Débit gaz vecteur : 30 ml/min dont 1 ml dans la colonne – Hydrogène, de pureté chromatographique (≥ 99,9990%). Il est également possible d'utiliser de l'hélium ou de l'azote.

4.3.3 Débit gaz auxiliaire : 60 ml/min – Azote, de pureté chromatographique (≥ 99,9990%). Il est également possible d'utiliser argon-méthane.

4.3.4 Gradient de température du four, donné à titre d'exemple:

- de 40 °C à 160 °C à raison de 2 °C/min

- de 160 °C à 200 °C à raison de 5 °C/min

- palier à 220 °C pendant 10 min

4.3.5 Température injecteur : 250 °C

4.3.6 Température détecteur : 250 °C

4.4 Acquisition et intégration : l'acquisition se fait sur un ordinateur. Les pics des différents composés identifiés par comparaison avec la référence, sont ensuite intégrés.

4.5 Agitateur.

4.6 Vortex avec adaptation pour flacon de 30 ml (4.9.3)

4.7 Balance de précision à 0,1 mg

4.8 Râpe de ménage pour rémoulade manuelle ou électrique

4.9 Matériel de laboratoire :

4.9.1 Micro Seringue de 100 µl

4.9.2 Micro Seringue de 10 µl

4.9.3 Flacon de 30 ml fermant avec un bouchon à vis et opercule à face téflonée

4.9.4 Pipette de 10 ml graduée au 1/10 de ml

4.9.5 Pipette de 5 ml graduée au 1/10 de ml

4.9.6 Pipette de précision de 1 ml

4.9.7 Fiole jaugée de 50 ml

4.9.8 Fiole jaugée de 100 ml

4.9.9 Fiole jaugée de 200 ml

4.9.10 Ampoule à décanter de 100 ml

4.9.11 Pipettes Pasteur et poire propipette adaptée

4.9.12 Feuille d'aluminium de ménage en rouleau.

4.9.13 Centrifugeuse

5. PREPARATION DE L'ECHANTILLON

5.1 Le bouchon est râpé (4.8) ou coupé en morceaux (dimension < 3 mm)

5.2 Le bois est débité avec une tenaille pour obtenir des morceaux (dimension < 3 mm)

5.3 La bentonite (3.15) (30 g par exemple) est étalée sur une feuille d'aluminium (4.9.12) d'environ 30 cm x 20 cm et exposée dans l'atmosphère à analyser pendant, au minimum, 5 jours.

6. MODE OPERATOIRE

6.1 Processus d'extraction pour les échantillons solides :

6.1.1 Bouchon : dans un flacon de 30 ml (4.9.3), placer 1 g environ de bouchon râpé (5.1) de poids exactement connu (4.7)

6.1.2 Bois : dans un flacon de 30 ml (4.9.3), placer 2 g environ de morceaux de bois (5.2) de poids exactement connu (4.7)

6.1.3 Bentonite contrôle : dans un flacon de 30 ml (4.9.3), placer 5 g environ de bentonite

(3.15) de poids exactement connu (4.7)

6.1.4 Bentonite échantillon : dans un flacon de 30 ml (4.9.3), placer 5 g environ de

bentonite (5.3) de poids exactement connu (4.7)

6.1.5 Ajouter 10 ml (4.9.4) de mélange éther/hexane (3.3)

6.1.7 Ajouter à la micro-seringue (4.9.1) 50 µl de la solution d'étalon interne (3.8.3)

6.1.8 Agiter au vortex (4.6) pendant 3 min

6.1.9 Récupérer la phase liquide d'éther/hexane dans un flacon de 30 ml (4.9.3)

6.1.10 Recommencer l'opération d'extraction sur l'échantillon, avec 2 fois 5 ml de mélange éther/hexane (3.3)

6.1.11 Extrait final : mélanger les 3 phases d'éther/hexane.

6.2 Extraction du vin et des solutions de calibrage.

6.2.1 Prélever 50 ml de vin ou de solution de calibrage (3.14) à l'aide de la fiole jaugée (4.9.7)

6.2.2 Les placer dans la fiole jaugée de 100 ml (4.9.8)

6.2.3 Ajouter à la microseringue (4.9.1) 50 µl d'étalon interne (3.8.3)

6.2.4 Ajouter 4 ml (4.9.5) d'hexane (3.1)

6.2.5 Effectuer l'extraction à l'aide de l'agitateur magnétique (4.5) durant 5 min.

6.2.6 Décanter en ampoule (4.9.10)

6.2.7 Récupérer la phase organique avec l'émulsion dans un flacon de 30 ml (4.9.3) et la phase aqueuse dans la fiole jaugée de 100 ml (4.9.8)

6.2.8 Recommencer l'extraction du vin ou de solution de calibrage par 2 ml d'hexane (3.1)

6.2.9 Effectuer l'extraction à l'aide de l'agitateur magnétique (4.5) durant 5 min.

6.2.10 Décanter en ampoule (4.9.10)

6.2.11 Récupérer la phase organique avec l'émulsion dans le même flacon de 30 ml mentionné à 6.2.7 (contenant la phase organique obtenue au terme de la première extraction).

6.2.12 Casser l'émulsion de la phase organique par centrifugation (4.9.13), en éliminant la phase aqueuse inférieure à l'aide d'une pipette Pasteur (4.9.11) munie d'une poire propipette.

6.2.13 Extrait final du vin et des solutions de calibrage : il s'agit de l'extrait organique résiduel.

6.3 Analyse

6.3.1 Ajouter au extrait final (6.1.11 ou 6.2.13) 100 µl (4.9.1) de mélange réactif piridine:anydride acétique (3.10) pour la dérivatisation.

6.3.2 Agiter à l'aide de l'agitateur magnétique (4.5) durant 10 min.

6.3.3 Injecter 2 µl de l'extrait final dérivatisé (6.3.2) dans le chromatographe.

7. CALCUL :

$$\text{concentration du produit} = \frac{\text{Aire du pic du produit}}{\text{Aire du pic de l'étalon interne}} \times \text{Coefficient de réponse}$$

Coefficient de réponse = concentration dans la solution de calibrage (3.14) *(Aire du pic de l'étalon interne/ Aire du pic du produit pur dans la solution de calibrage). Vérification de l'étalonnage, en assurant des coefficients de réponse +/- 10 %.

8. RESULTATS

Les résultats sont exprimés en ng/l pour le vin et en ng/g pour les bouchons en liège, les bentonites et les bois.

9. CARACTERISTIQUES DE LA METHODE

9.1 Taux de recouvrement,
Le taux de recouvrement calculé par rapport à des quantités rajoutées dans des bois, de
polychloroanisoles et de polychlorophénols de 115 ng/g est de :
- 2,4,6-trichloroanisole : 96 %
- 2,4,6-trichlorophénol : 96 %
- 2,3,4,6-tétrachloroanisole : 96 %
- 2,3,4,6-tétrachlorophénol : 97 %
- pentachloroanisole : 96 %
- pentachlorophénol : 97 %

9.2 Répétabilité des mesures,

Calculées pour chaque produit, les valeurs de répétabilité sont les suivantes :

Dans un bouchon ng/g	Moyenne	Ecart type	répétabilité
2,4,6-trichloroanisole	1,2	0,1	0,3
2,4,6-trichlorophénol	26	3,3	9,2
2,3,4,6-tétrachloroanisole	1,8	0,4	1,2
2,3,4,6-tétrachlorophénol	2,6	0,3	0,9
pentachloroanisole	23,3	2,9	8,1
pentachlorophénol	7,4	1,9	5,4

Dans un bois à 23 ng/g	Ecart type	répétabilité
2,4,6-trichloroanisole	1,9	5,3
2,4,6-trichlorophénol	1,9	5,3
2,3,4,6-tétrachloroanisole	2,6	7,4
2,3,4,6-tétrachlorophénol	3,3	9,3
pentachloroanisole	2,7	7,5
pentachlorophénol	3,6	10,1

Dans un vin à 10 ng/l	Ecart type	répétabilité
2,4,6-trichloroanisole	0,4	1,1
2,4,6-trichlorophénol	2,1	5,9
2,3,4,6-tétrachloroanisole	0,6	1,7
2,3,4,6-tétrachlorophénol	4	11,2
pentachloroanisole	1,2	3,4
pentachlorophénol	6,5	18,2

Dans une bentonite à 15 ng/g	Ecart type	répétabilité
2,4,6-trichloroanisole	0,9	2,5
2,4,6-trichlorophénol	4	11,2
2,3,4,6-tétrachloroanisole	1,2	3,4
2,3,4,6-tétrachlorophénol	5,2	14,6
pentachloroanisole	4,3	12,0
pentachlorophénol	12,1	33,9

9.3 Limites de détection (L.D) et de quantification (L.Q) calculées selon la méthode OIV :

9.3.1 Bois

	L.D en ng/g	L.Q en ng/g
2,4,6-trichloroanisole	0,7	2,4
2,4,6-trichlorophénol	0,6	2,0
2,3,4,6-tétrachloroanisole	0,6	2,0
2,3,4,6-tétrachlorophénol	1,1	3,7
pentachloroanisole	0,4	1,4
pentachlorophénol	0,9	3,1

9.3.2 Bentonite

	L.D en ng/g	L.Q en ng/g
2,4,6-trichloroanisole	0,5	1
2,4,6-trichlorophénol	1	3
2,3,4,6-tétrachloroanisole	0,5	1
2,3,4,6-tétrachlorophénol	1	3
pentachloroanisole	0,5	1
pentachlorophénol	Non det.	Non det.

9.3.3 Bouchon

	L.D en ng/g	L.Q en ng/g
2,4,6-trichloroanisole	0,5	1,5
2,4,6-trichlorophénol	1	2
2,3,4,6-tétrachloroanisole	0,5	1,5
2,3,4,6-tétrachlorophénol	1	2
pentachloroanisole	0,5	1,5
pentachlorophénol	1	2

9.3.4 Vin

	L.D en ng/l	L.Q en ng/l
2,4,6-trichloroanisole	0,3	1
2,4,6-trichlorophénol	1	3
2,3,4,6-tétrachloroanisole	0,3	1
2,3,4,6-tétrachlorophénol	0,3	1
pentachloroanisole	0,5	3
pentachlorophénol	1	3

®[2] Air liquide

Méthode OIV-MA-AS315-18 Méthode Type II

Analyse des amines biogènes des moûts et des vins par HPLC

(OIV/OENO 346/2009)

1. DOMAINE D'APPLICATION

Cette méthode est applicable à l'analyse des amines biogènes dans les moûts et les vins :
Ethanolamine : jusqu'à 20 mg/L ;
Histamine : jusqu'à 15 mg/L ;
Méthylamine : jusqu'à 10 mg/L ;
Sérotonine : jusqu'à 20 mg/L ;
Ethylamine : jusqu'à 20 mg/L ;
Tyramine : jusqu'à 20 mg/L ;
Isopropylamine : jusqu'à 20 mg/L ;
Propylamine : normalement absente ;
Isobutylamine : jusqu'à 15 mg/L ;
Butylamine : jusqu'à 10 mg/L ;
Tryptamine : jusqu'à 20 mg/L ;
Phenyléthylamine : jusqu'à20 mg/L ;
Putrescine ou 1,4-diaminobutane : jusqu'à 40 mg/L ;
2-Méthylbutylamine : jusqu'à 20 mg/L ;
3-Méthylbutylamine : jusqu'à 20 mg/L ;
Cadavérine ou 1,5-diaminopentane : jusqu'à 20 mg/L ;
Hexylamine : jusqu'à 10 mg/L.

2. DEFINITION

Les amines biogènes dosées sont :
Ethanolamine : C_2H_7NO – CAS [141 – 43 – 5]
Histamine : $C_5H_9N_3$ - CAS [51 – 45 – 6]
Méthylamine : CH_5N – CAS [74 – 89 – 5]
Sérotonine : $C_{10}H_{12}N_2O$ – CAS [153 – 98 – 0]
Ethylamine : C_2H_7N – CAS [557 – 66 – 4]
Tyramine : $C_8H_{11}NO$ - CAS [60 – 19 – 5]
Isopropylamine : C_3H_9N - CAS [75 – 31 – 0]
Propylamine : C_3H_9N – CAS [107 – 10 – 8]
Isobutylamine : $C_4H_{11}N$ – CAS [78 – 81 – 9]
Butylamine : $C_4H_{11}N$ – CAS [109 – 73 – 9]

Tryptamine : $C_{10}H_{12}N_2$ – CAS [61 – 54 – 1]
Phenyléthylamine : $C_8H_{11}N$ – CAS [64 – 04 – 0]
Putrescine ou 1,4-diaminobutane : $C_4H_{12}N_2$ – CAS [333 – 93 – 7]
2-Méthylbutylamine : $C_5H_{13}N$ - CAS [96 – 15 – 1]
3-Méthylbutylamine : $C_5H_{13}N$ - CAS [107 – 85 – 7]
Cadavérine ou 1,5-diaminopentane : $C_5H_{14}N_2$ – CAS [1476 – 39 – 7]
1,6-Diaminohexane : $C_6H_{16}N_2$ – CAS [124 – 09 – 4]
Hexylamine : $C_6H_{15}N$ – CAS [111 – 26 – 2]

3. PRINCIPE

Les amines biogènes sont directement dosées par HPLC à l'aide d'une colonne C_{18} après dérivation à l' O-phtaldialdéhyde (OPA) et détectés par fluorimétrie.

4. REACTIFS ET PRODUITS

4.1 Eau ultra pure de résistivité ≥ 18MΩcm ;
4.2 Di-sodium hydrogénophosphate dihydrate - pureté ≥ 99 % ;
4.3 Acétonitrile - Minimum de transmission à 200 nm - pureté ≥ 99 % ;
4.4 O-phtaldialdéhyde (OPA) - Application pour fluorescence - pureté ≥ 99 % ;
4.5 Di-sodium tétraborate décahydrate - pureté ≥ 99 % ;
4.6 Méthanol - pureté ≥ 99 % ;
4.7 Acide chlorhydrique 32 % ;
4.8 Hydroxyde de sodium en pastilles - pureté ≥ 99 % ;
4.9 Ethanolamine - Pureté ≥ 99 % ;
4.10 Histamine dichlorhydrate - Pureté ≥ 99 % ;
4.11 Ethylamine chlorhydrate - Pureté ≥ 99 % ;
4.12 Sérotonine - Pureté ≥ 99 % ;
4.13 Méthylamine chlorhydrate – Pureté ≥ 98 % ;
4.14 Tyramine chlorhydrate - Pureté ≥ 99 % ;
4.15 Isopropylamine pureté ≥99 % ;
4.16 Butylamine - Pureté ≥ 99 % ;
4.17 Tryptamine chlorhydrate - pureté ≥ 98 % ;
4.18 Phénylélthylamine - Pureté ≥ 99 % ;
4.19 Putrescine dichlorhydrate - Pureté ≥ 99 % ;
4.20 2-Méthylbutylamine - Pureté ≥ 98 % ;
4.21 3-Méthylbutylamine - Pureté ≥ 98 % ;
4.22 Cadavérine dichlorhydrate - Pureté ≥ 99 % ;

4.23 1-6-Diaminohexane - Pureté ≥ 97 % ;
4.24 Héxylamine - Pureté ≥ 99 % ;
4.25 Azote (impuretés maximales : H_2O≤3 mg/L ; O_2≤2 mg/L ; C_nH_m≤0.5 mg/L) ;
4.26 Hélium (impuretés maximales : H_2O≤3 mg/L ; O_2≤2 mg/L ; C_nH_m≤0.5 mg/L).

Préparation des solutions réactives :

4.27 Préparation des éluants

Solution A phosphate : sur une balance (5.27), dans un bécher de 50 mL (5.5), peser 11,12 g ± 0,01 g de phosphate disodique (4.2). Transvaser dans une fiole jaugée de 2 litres (5.9), ajuster à 2 litres avec de l'eau déminéralisée (4.1). Homogénéiser à l'aide d'un agitateur magnétique (5.30), filtrer sur membrane 0,45 µm (5.17). Mettre dans la bouteille de 2 litres (5.12)

Solution B : l'acétonitrile (4.3) est directement utilisé.

4.28 Solution d'OPA - Préparation journalière
Peser dans une fiole de 50 mL (5.7) sur la balance de précision (5.27), 20 mg ± 0,1 mg d'OPA (4.4). Ajuster à 50 mL avec du méthanol (4.6). Homogénéiser.

4.29 Préparation du tampon borate (4.29) - Préparation hebdomadaire
Peser 3,81 g ± 0,01 g de $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ (4.5) dans un bécher de 25 mL (5.6), sur la balance de précision (5.27). Transvaser dans une fiole jaugée de 100 mL (5.8), ajuster à 100 mL avec de l'eau déminéralisée (4.1). Homogénéiser à l'aide d'un agitateur magnétique (5.30), transvaser dans un bécher de 150 mL (5.4), ajuster à pH 10,5 à l'aide du pHmètre (5.28 et 5.29) avec de la soude 10N (4.8).

4.30 Solution d'acide chlorhydrique à 0,1M : dans une fiole jaugée de 2 L (5.9), mettre un peu d'eau déminéralisée (4.1). Ajouter 20 mL d'acide chlorhydrique (4.7) à l'aide d'une pipette automatique de 10 mL (5.24 et 5.25)

4.31 Solution de calibration dans l'acide chlorhydrique 0.1 N
Concentration indicative de la solution de calibration, peser à ± 0.1 mg

			concentration indicative finale dans le mélange étalon en mg/L
Ethanolamine			5
Histamine			5
Méthylamine			1
Sérotonine			20
Ethylamine			2
Tyramine			7
Isopropylamine			4
Propylamine			2.5
Isobutylamine			5
Butylamine			5
Tryptamine			10
Phényléthylamine			2
Putrescine			12
2-Méthylbutylamine			5
3-Méthylbutylamine			6
Cadavérine			13
1.6-Diaminohexane			8
Hexylamine			5

La concentration réelle de la solution de calibration est consignée avec le numéro de lot des produits utilisés.
Certains amines biogènes sont sous forme de sel, il faut tenir compte du poids du sel pour déterminer le poids réel de l'amine biogène.
La solution mère est faite dans une fiole jaugée de 100 mL (5.8).
La solution fille est faite dans une fiole jaugée de 250 mL (5.10).

4.32 Standard interne 1,6 Diaminohexane

Peser exactement 119 mg dans un erlenmeyer de 25 mL (5.1) sur une balance (5.27). Transvaser dans une fiole jaugée de 100 mL (5.8). Ajuster au trait de jauge avec l'acide chlorhydrique 0.1 N (4.30) ;

4.33 2-Mercaptoéthanol - Pureté ≥ 99 %.

5. APPAREILLAGE

5.1 Erlenmeyers de 25 mL ;
5.2 Erlenmeyers de 250 mL ;
5.3 Béchers de 100 mL ;
5.4 Béchers de 150 mL ;
5.5 Bécher de 50 mL ;
5.6 Bécher de 25 mL;
5.7 Fioles jaugées de 50 mL;
5.8 Fioles jaugées de 100 mL;
5.9 Fioles jaugées de 2 000 mL;
5.10 Fiole jaugée de 250 mL;
5.11 Bouteilles de 1 litre;
5.12 Bouteille de 2 litres;
5.13 Flacons de 2 mL à vis adaptés au passeur d'échantillons;
5.14 Seringue de 50 mL;
5.15 Aiguille;
5.16 Porte filtre;
5.17 Membrane de 0,45 µm en cellulose;
5.18 Membrane de 0,8 µm en cellulose;
5.19 Membrane de 1,2 µm en cellulose;
5.20 Membrane de 5 µm en cellulose;
5.21 Préfiltre en cellulose;
5.22 Pipette automatique de 1 mL;
5.23 Pipette automatique de 5 mL;
5.24 Pipette automatique de 10 mL
5.25 Cônes pour pipette automatique de 10 mL, 5 mL et 1 mL;
5.26 Système de filtration;
5.27 Balances pour des pesées de 0 à 205 g à ± 0,01 mg;
5.28 pHmètre;
5.29 Electrode;
5.30 Agitateur magnétique
5.31 Pompe HPLC;
5.32 Passeur-préparateur équipé d'un four

Note : le four est indispensable, si un passeur–préparateur est utilisé pour injecter plusieurs échantillons à la suite, cette opération peut aussi se faire manuellement mais les résultats risquent d'être moins précis ;

5.33 Boucle d'injection;
5.34 Colonne C_{18} de 5 µm, 250 mm × 4 (qui doit conduire à un chromatogramme proche de celui présenté en annexe B);
5.35 Détecteur fluorimétrique;
5.36 Intégrateur;
5.37 Tube en verre borosilicaté de 15 mL avec bouchon et obturateur recouvert de PTFE.

6. PREPARATION DES ECHANTILLONS

Les échantillons sont préalablement dégazés à l'azote (4.25).

6.1 Filtration
Filtrer environ 120 mL d'échantillon sur membrane:
- pour un vin : 0.45µm (5.17),
- pour un moût ou un vin non clarifié, empiler les filtres dans l'ordre suivant, l'échantillon étant poussé par le dessus : 0,45µm (5.17) + 0,8 µm (5.18) +1,2 µm (5.19) +5 µm (5.20) + préfiltre (5.21) +.

6.2 Préparation de l'échantillon
Mettre 100 mL d'échantillon (6.1) dans une fiole de 100 mL (5.8) ;
Ajouter 0.5 mL de 1-6-diaminohexane (4.32) à 119 mg/100 mL à l'aide d'une pipette automatique de 1 mL (5.21 et 25) ;
Prélever 5 mL d'échantillon à l'aide de la pipette (5.23 et 5.25) ; les verser dans un erlenmeyer de 25 mL (5.1) ;
Y ajouter 5 mL de méthanol (4.6) à l'aide de la pipette (5.23 et 5.25) ;
Homogénéiser par agitation ;
Transférer dans des flacons (5.13) ;
Lancer la pompe HPLC (5.31) puis l'injection 1 µL (5.32 et 5.33).

6.3 Dérivatisation
Dans un tube en verre borosilicaté (5.37), verser 2 mL de solution d'OPA (4.28), 2 mL de tampon borate (4.29), 0,6 mL de 2-mercaptoéthanol (4.33). Boucher, agiter (5.30). Ouvrir et verser 0,4 mL d'échantillon. Boucher, agiter (5.30). **Injecter immédiatement, le derivé n'étant pas stable.** Rincer immédiatement la vaisselle après injection, à cause de l'odeur.

Note : la dérivatisation peut être réalisée par un préparateur/injecteur automatique. Dans ce cas, il sera programmé pour s'approcher des proportions de la dérivatisation manuelle.

6.4 Nettoyage courant
Seringue (5.13) et aiguille (5.14) rincées à l'eau déminéralisée (4.1) après chaque échantillon ;

Porte-filtre (5.16) rincé à l'eau chaude, puis MeOH (4.6). Laisser sécher à l'air.

7. MODE OPERATOIRE

Phase mobile (5.31)
- A : tampon phosphate (4.2) ;
- B : acétonitrile (4.3).

Gradient d'élution :

temps (en min)	% A	% B
0	80	20
15	70	30
23	60	40
42	50	50
55	35	65
60	35	65
70	80	20
95	80	20

Note : le gradient peut être ajusté pour obtenir un chromatogramme proche de celui présenté en annexe B

Débit : 1 mL/min ;
Température de colonne 35°C (5.32) ;

Détecteur (5.35) : Exc = 356 nm, Em = 445 nm (5.30);

Etalonnage interne
La solution de calibration est injectée à chaque série ;
Calibration par standard interne ;

Calcul des facteurs de réponse :
RF = Ccis × surface i / surface is × Cci
Cci = concentration du composant dans la solution de calibration et
Ccis = concentration du standard interne dans la solution de calibration (1-6-diaminohexane).
Surface i = surface du pic du produit présent dans l'échantillon
Surface is = surface du pic du standard interne dans l'échantillon

Calcul des concentrations :
Cci = (XF × surface i)/ (surface is × RF)
Surface i = surface du pic du produit présent dans l'échantillon
Surface is = surface du pic du standard interne dans l'échantillon
XF = quantité d'étalon interne ajoutée aux échantillons à analyser
XF = 119 × 0.5/100 = 5.95.

8. EXPRESSION DES RESULTATS

Les résultats sont exprimés en mg/L avec un chiffre significatif après la virgule.

9. FIDELITE

	r (mg/L)	R (mg/L)
Histamine	0.07x + 0.23	0.50x + 0.36
Méthylamine	0.11x + 0.09	0.40x + 0.25
Ethylamine	0.34x - 0.08	0.33x + 0.18
Tyramine	0.06x + 0.15	0.54x + 0.13
Phényléthylamine	0.06x + 0.09	0.34x + 0.03
Diaminobutane	0.03x + 0.71	0.31x + 0.23
2-méthylbutylamine et 3-méthylbutylamine	0.38x + 0.03	0.38x + 0.03
Diaminopentane	0.14x + 0.09	0.36x + 0.12

Les détails de l'essai interlaboratoires portant sur la fidélité de la méthode sont résumés dans l'annexe A.

10. AUTRES CARACTERISTIQUES DE L'ANALYSE

Influence de certains composants du vin : les acides aminés sortent au début de l'analyse et ne gênent pas la détection des amines biogènes.

Limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) selon une étude intralaboratoire :

	LOD (en mg/L)	LOQ (en mg/L)
Histamine	0,01	0,03
Méthylamine	0,01	0,02
Ethylamine	0,01	0,03
Tyramine	0,01	0,04
Phényléthylamine	0,02	0,06
Diaminobutane	0,02	0,06
2-méthylbutylamine	0,01	0,03
3-méthylbutylamine	0,03	0,10
Diaminopentane	0,01	0,03

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

Données statistiques obtenues à partir des résultats des essais interlaboratoire

Les paramètres suivants ont été définis au cours d'un essai interlaboratoire. Cet essai a été conduit par l'Institut d'Œnologie de Bordeaux (France) sous la supervision de l'Office National Interprofessionnel des Vins (ONIVINS – France)

Année de l'essai interlaboratoire : 1994
Nombre de laboratoires : 7
Nombre d'échantillons :9 en double aveugle

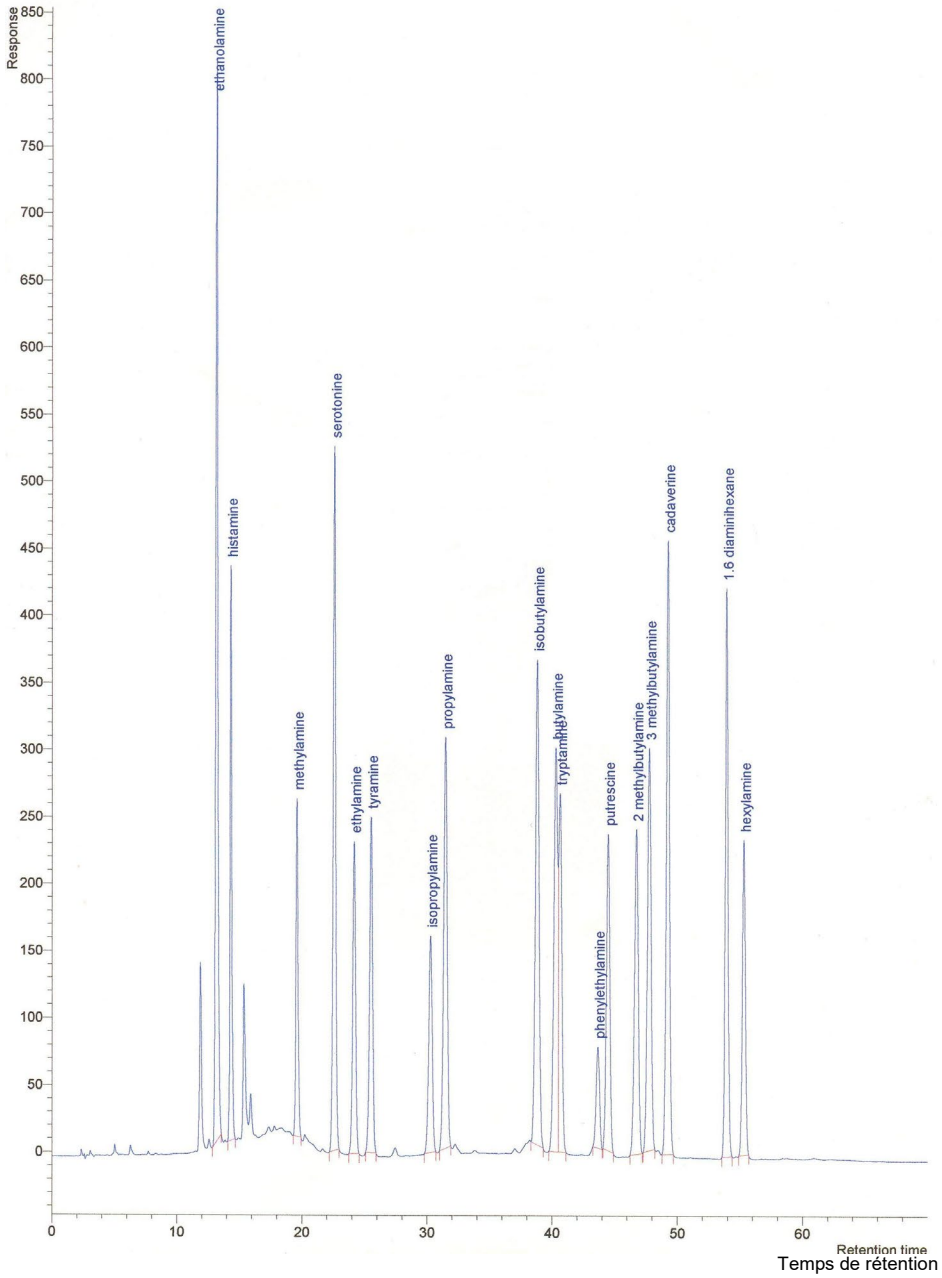
(Bulletin de l'O.I.V. novembre-décembre 1994, 765-766, p.916 à 962) valeurs recalculées conformément à l'ISO 5725-2:1994.

Types d'échantillons : vin blanc (BT), vin blanc (BT) surchargé = B1, vin blanc (BT) surchargé = B2, vin rouge n°1 (RT), vin rouge surchargé = R1, vin rouge (RT) surchargé = R2, vin rouge n°2 (CT), vin rouge (CT) surchargé = C1 et vin rouge (CT) surchargé = C2. Surcharges en mg/L.

	HistN	MétN	EthN	TyrN	PhEtN	DiNbut	IsoamN	DiNpen
vin B1	vin BT + 0,5	vine BT + 0,12	vinBT + 0,13	vin BT + 0,36	vine BT + 0,15	vin BT + 0,5	vine BT + 0,28	vinBT + 0,25
vin B2	vin BT + 2	vin BT + 0,40	vin BT + 0,50	vin BT + 1,44	vin BT + 0,60	vin BT + 2	vin BT + 0,1,74	vin BT + 1,04
vin C1	vin CT + 2	vin CT + 0,1	vin CT + 0,18	vin CT + 0,72	vin CT + 0,15	vin CT + 2	vin CT + 0,29	vin CT + 0,26
vinC2	vin CT + 4	vin CT + 0,41	vin CT + 0,50	vin CT + 2,90	vin CT + 0,58	vin CT + 8	vin CT + 1,14	vin CT + 1,04
vin R1	vin RT + 2	vin RT + 0,14	vin RT + 0,13	vin RT + 1,45	vin RT + 0,19	vin RT + 3	vin RT + 0,0,57	vin RT + 0,51
vin R2	vin RT + 5	vin RT + 0,41	vin RT + 0,50	vin RT + 2,88	vin RT + 0,59	vin RT + 10	vin RT + 2,28	vin RT + 2,08

HistN : histamine, MetN : méthylamine, EthN : éthylamine, TyrN : tyramine, PhEtN : phényléthylamine, DiNbut : diaminobutane, IsoamN : isoamylamine et DiNpen : diaminopentane.

Annexe B



Modèle de chromatogramme obtenu avec cette méthode

BIBLIOGRAPHIE

TRICARD C., CAZABEIL J.-M., SALAGOÏTI M.H. (1991) : dosage des amines biogènes dans les vins par HPLC, Analusis, 19, M53-M55.

PEREIRA MONTEIRO M.-J. et BERTRAND A. (1994) : validation d'une méthode de dosage – Application à l'analyse des amines biogènes du vin. Bull. O.I.V., (765-766), 916-962.

Méthode OIV-MA-AS315-19 Méthode Type IV

Dosage du glutathion dans les moûts et les vins par électrophorèse capillaire

(OIV/OENO 345/2009)

1. Domaine d'application

Cette méthode permet le dosage du glutathion dans les moûts et les vins dans une gamme de concentration de 0 à 40 mg/L. Elle utilise l'électrophorèse capillaire (EC) couplée à une détection fluorimétrique (LIF).

2. Principe

La méthode utilisée, qui procède par électrophorèse capillaire, est adaptée de celle mise au point par Noctor et Foyer (1998) pour doser les thiols non volatils dans les feuilles de peuplier par HPLC couplée à une détection fluorimétrique.
La séparation des solutés d'un mélange par électrophorèse capillaire est obtenue par migration différentielle dans un électrolyte. Le capillaire est rempli avec cet électrolyte.
L'échantillon à séparer est injecté à l'une des extrémités du capillaire. Sous l'action du champ électrique généré par les électrodes plongées dans l'électrolyte, les solutés se séparent par différence de vitesse de migration et sont détectés à proximité de l'autre extrémité du capillaire sous forme de pics. Dans des conditions opératoires données, les temps de migration constituent un critère d'identification des espèces chimiques et la surface du pic est proportionnelle à la quantité injectée.

3. Produits et réactifs

3.1 Liste des produits

3.1.1 glutathion (GSH, > 98 %),
3.1.2 dithiothréitol (DTT, >99 %),
3.1.3 phosphate de sodium monobasique anhydre (NaH_2PO_4, >99 %)
3.1.4 phosphate de sodium dibasique anhydre (Na_2HPO_4, >99 %)
3.1.5 acide 2-(N-cyclohexylamino)éthanesulfonic (CHES, >98 %),
3.1.6 monobromobimane (MBB, 97 %)
3.1.7 sel de sodium d'acide d'éthylènediaminetétraacétique (EDTA, >99 %)
3.1.8 hydroxyde de sodium

3.1.9 acide chlorhydrique (35 %)
3.1.10 acétonitrile (99,5 %)
3.1.11 eau ultrapure de résistivité >18 MΩ.cm.

3.2 Liste des solutions
Chacune des solutions est homogénéisée avant toute utilisation

3.2.1 Tampon électrophorétique : tampon phosphate, 50 mM, pH 7
Ce tampon est préparé à partir de deux solutions A et B
3.2.1.1 Solution A : 3 mg de phosphate monobasique anhydre (3.1.3) repris dans 250 mL d'eau ultra pure (3.1.11)
3.2.1.2 Solution B : 3,55 mg de phosphate dibasique anhydre (3.1.4) repris dans 250 mL d'eau ultra pure (3.1.11)
Le tampon phosphate est obtenu par addition de 40 ml de la solution A (3.2.1.1) et 210 mL de la solution B (3.2.1.2), complété à 500 mL par de l'eau ultra pure (3.1.11). Le pH du tampon est alors ajusté à 7 par de l'acide chlorhydrique (3.1.9).

3.2.2 Solution de monobromobimane (MBB), 50 mM
25 mg de monobromobimane (MBB) (3.1.6) sont repris par 1850 µL d'acétonitrile (3.1.10).
Conservé à - 20 °C à l'abri de la lumière, le réactif est stable durant trois mois.

3.2.3 Solution d'hydroxyde de sodium 0,1 M.
0,4 g d'hydroxyde de sodium (3.1.8) sont placés dans une fiole jaugée de 100 ml et repris par
100 mL d'eau ultra pure (3.1.11).

3.2.4 Solution d'hydroxyde de sodium 5 M.
20 g d'hydroxyde de sodium (3.1.8) sont placés dans une fiole jaugée de 100 ml et repris par
100 mL d'eau ultra pure (3.1.11).

3.2.5 Tampon CHES : 0,5 M, pH 9,3
2,58 g d'acide 2-(N-cyclohexylamino)éthanesulfonic (CHES) (3.1.5) sont dissous dans environ 20 ml d'eau ultra pure (3.1.11). Le pH du tampon est ajusté à 9,3 par addition d'hydroxyde de sodium 5 M (3.2.4) puis le volume est ajusté à 25 ml par de l'eau ultra pure (3.1.11). Ce tampon est réparti dans des tubes de 1,5 mL (type Eppendorf) à raison de 1 ml par tube.
La solution aqueuse de CHES, placée à - 20°C, peut être conservée durant plusieurs mois.

3.2.6 Solution de dithiothréitol (DTT), 10 mM
15,4 mg de dithiothréiol (3.1. 2) sont dissous dans 10 mL d'eau ultra pure (3.1.11) puis cette solution est répartie dans des tubes de 1,5 mL (type Eppendorf) à raison de 1 ml par tube.
La solution aqueuse de DTT, placée à - 20°C, peut être conservée durant plusieurs mois.

4. Appareillage

4.1 L'électrophorèse capillaire

L'électrophorèse capillaire munie d'un injecteur de type hydrostatique est couplée à un détecteur de fluorescence induite par laser ayant une longueur d'onde d'excitation proche de la longueur d'onde d'absorption de l'adduit MBB-GSH : ex = 390 nm (par exemple, détecteur Zetalif).

4.2 Le capillaire

La longueur totale du capillaire en silice non greffée est de 120 cm, la longueur efficace est de
105 cm, le diamètre interne est de 30 µm.

5. Préparation des échantillons

La méthode de dosage utilisée met en jeu la dérivatisation des fonctions SH par le monobromobimane (MBB) (Radkowsky et Kosower, 1986). Les échantillons de moûts ou de vins bruts sont clarifiés par centrifugation avant d'être analysés. Les vins en bouteille sont analysés sans clarification préalable.

Préparation des échantillons :
Dans un tube de 1,5 mL (type Eppendorf) placer successivement :
- 200 µl d'échantillon,
- 10 µl de la solution de DTT (3.2.4) ; concentration finale 0,25 mM.
- 145 µl de CHES (3.2.5) ; concentration finale 179 mM.
- 50 µl de MBB (3.2.2) ; concentration finale 6,2 mM.

Après agitation du mélange réactionnel, la dérivatisation des fonctions thiols par le MBB nécessite 20 min d'incubation à l'abri de la lumière et à température ambiante. Dans ces conditions analytiques, les dérivés MBB-SR ainsi formés sont peu stables ; le dosage par EC-LIF doit être effectué immédiatement après la période d'incubation.

6. Mode opératoire

6.1 Conditionnement du capillaire

Avant sa première utilisation et dès que les temps de migration augmentent, le capillaire (4.2) doit être conditionné de la façon suivante :
6.1.1. rinçage à l'hydroxyde de sodium 0,1 M (3.2.5) pendant 3 min,
6.1.2. rinçage à l'eau ultra pure (3.1.12) pendant 3 min,
6.1.3. rinçage par le tampon phosphate électrophorétique (3.2.1) pendant 3 min.

6.2 Conditions de migration

6.2.1 L'injection de l'échantillon est de type hydrostatique ; 3 s à 5 kPa.
Elle est suivie d'une injection de tampon électrophorétique (3.2.1) 50 mb afin d'améliorer la résolution des pics (Staking).
6.2.2 Analyse.
La tension de + 30 kV, appliquée tout au long de la séparation, génère un courant de 47 µA. Ces conditions sont atteintes en 20 s. La séparation est effectuée à une température constante de 21°C.
6.2.3 Rinçage du capillaire
Le capillaire doit être rincé après chaque analyse successivement par :
- l'hydroxyde de sodium 0,1 M (3.2.3) pendant 3 min,
- l'eau ultra pure (3.1.12) pendant 3 min,
- le tampon phosphate électrophorétique (3.2.1) pendant 3 min.

7. Résultats

A la concentration finale utilisée dans l'échantillon, la présence de DTT durant la dérivatisation permet de stabiliser les fonctions thiols instables à pH alcalin et très facilement oxydables par les quinones, produits de l'auto-oxydation des composés phénoliques, mais ne rompt pas les ponts disulfures. En effet, dans ces conditions analytiques, la teneur en glutathion réduit (GSH) retrouvée dans un vin additionné ou non de glutathion oxydé (GSSG) à raison de 10 mg/L est strictement comparable (Figure 1). Cette méthode permet par conséquent de doser le glutathion sous sa seule forme réduite.

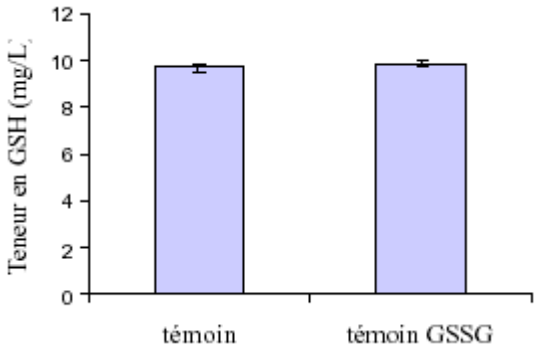


Figure 1 : Mise en évidence de la stabilité des ponts disulfures dans les conditions de dérivatisation décrites. (DTT, 0,25 mM final).

La figure 2 présente le profil électrophorétique d'un échantillon de moût de raisin blanc, cépage Sauvignon, dans lequel sont identifiés la cystéine, le glutathion, la N-acétyl-cystéine et le dioxyde de soufre. Le premier pic correspond aux réactifs en excès (DTT, MBB). La séparation des thiols non volatils est effectuée en moins de 20 minutes. Parmi tous les pics, seuls certains ont pu être identifiés (figure 2, A) (Newton et al., 1981). Ces thiols, hormis le dioxyde de soufre, sont généralement présents en quantités variables dans les baies de raisins (Cheynier et al., 1989), les fruits et les légumes (Mills et al., 2000).

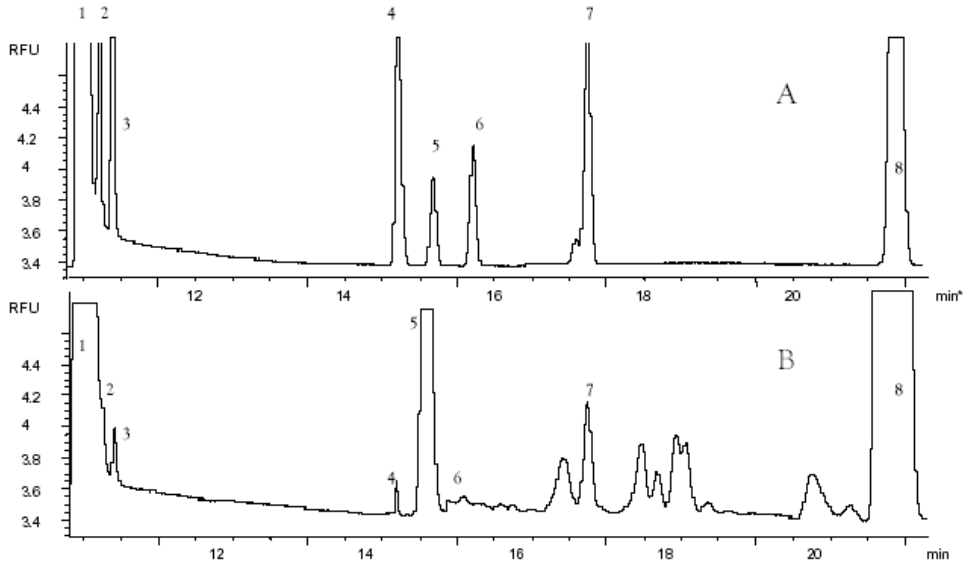


Figure 2: Exemple de séparation des thiols non volatils connus dans une solution HCl/EDTA (A) 1 et dans un moût de raisin (B): DTT ; 2 : homocystéine ; 3 : cystéine ; 4 : Cys-Gly ; 5 : GSH ; 6 : g Glu-Cys ; ,7 : NAC ; 8 : SO_2.

Dans ces conditions analytiques, les temps de rétention des adduits MBB-RS sont les suivants : MBB-homocystéine 10,40 min; MBB-cystéine 10,65 min, MBB-GSH 14,14 min ; MBB-NAC 15,41min ; MBB-SO2 18,58min.

8. Caractéristiques de la méthode

Certains éléments de validation internes ont été déterminés mais il ne s'agit pas d'une validation formelle selon le protocole pour la planification, la conduite et l'interprétation des études de performances des méthodes d'analyse (OIV 6/2000)

Le vin est utilisé comme matrice pour réaliser les courbes d'étalonnage et les tests de répétabilité de chaque composé.
Chaque concentration est calculée à partir de la moyenne de trois déterminations obtenues en utilisant la droite de régression de la courbe d'étalonnage.
Les résultats sont exprimés en mg/L.
Les régressions linéaires et les coefficients de corrélation sont calculés selon la méthode des moindres carrés. Les solutions mères des différents thiols sont réalisées à partir d'une solution d'HCl/EDTA permettant de les conserver sans perte plusieurs jours à + 6°C. Des dilutions successives de ces solutions permettent d'estimer le seuil limite de détection dans le vin, pour un rapport signal sur bruit supérieur ou égal à trois.

La gamme de linéarité est variable selon les thiols (Tableau 1).

Tableau 1 : gamme de linéarité, propriétés des régressions linéaires propres à chaque thiol en solutions préparées de façon identique à celle du glutathion

	Gamme de linéarité	Régression linéaire	Coefficient de corrélation
Homocystéine	0 - 15 mg/l	Y= 0.459X – 0.231	0,9987
Cystéine	0 - 15 mg/l	Y = 0.374X – 0.131	0,9979
Glutathion	0 - 40 mg/l	Y = 0.583X – 0.948	0,9966
N-acétyl-cystéine	0 - 10 mg/l	Y = 0.256X – 0.085	0,9982

Les conditions d'analyses permettent d'éliminer les interférences provoquées par les produits d'hydrolyse du MBB, contrairement à ce qui est signalé dans d'autres travaux (Ivanov et al., 2000).

La répétabilité de la méthode est calculée à partir de dix analyses d'un même échantillon de vin. Pour une concentration en thiols de 10 mg/l, le coefficient de variation est de 6,0 % pour le glutathion ; par ailleurs, il est de 3,2 % pour l'homocystéine, 4,8 % pour la cystéine, et 6,4 % pour la N-acétyl-cystéine.

La limite de détection du glutathion est de 20 µg/l, la limite de quantification est de 60 µg/l.

9. BIBLIOGRAPHIE

- Noctor, G. and C. Foyer, 1998. Simultaneous measurement of foliar glutathione, gamma-glutamylcysteine, and amino acids by high-performance liquid chromatography: comparison with two other assay methods for glutathione, *Analytical Biochemistry*, **264**, 98-110.
- Kosower, N.S., Kosower E. M., Newton G. L.,and Ranney H. M., 1979. Bimane fluorescent labels: Labeling of normal human red cells under physiological conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **76** (7), 3382-3386.
- Newton, G.L., R. Dorian, and R.C. Fahey, *Analysis of biological thiols: derivatisation with monobromobimane and separation by reverse-phase high-performance liquid chromatography.* Anal. Biochem., 1981. **114**: p. 383-387.
- Cheynier, V., J.M. Souquet, and M. Moutounet, 1989. Glutathione content and glutathione to
- hydroxycinnamique acid ration in Vitis vinifera grapes and musts. *Am. J.Enol.Vitic*,. **40** (4), 320-324.
- Mills, B.J., Stinson C. T., Liu M. C. and Lang C. A., 1997. Glutathione and cyst(e)ine profiles of vegetables using high performance liquid chromatography with dual electrochemical detection. *Journal of food composition and analysis,* **10**, 90-101.
- Ivanov, A.R., I.V. Nazimov, and L. Baratova, 2000. Determination of biologically active low molecular mass thiols in human blood. *Journal of Chromatogr. A*,. **895**, 167-171.

Méthode OIV-MA-AS315-20 Méthode Type IV

Méthode de détermination des composes α-dicarbonylés du vin par HPLC après dérivation par le 1,2-diaminobenzene

OIV/OENO 386A-2010

1. Introduction

Les principaux composés α-dicarbonylés du vin (Figue 1) sont : glyoxal, méthylglyoxal, diacétyle et pentane-2,3-dione, seules les α-dicétones sont assez abondantes dans le vin. Les composés carbonylés existent dans tous les types de vins et particulièrement après la fermentation malolactique et dans les vins rouges. De plus, des vins blancs doux produits à partir de raisins botrytisés peuvent contenir des niveaux de glyoxal et de méthylglyoxal élevés.

Glyoxal : OCH−CHO (éthanedial)
Méthylglyoxal : CH_3−CO−CHO (2-oxopropanal)
Diacétyle : CH_3−CO−CO−CH_3 (butane-2,3-dione)
Pentane-2,3-dione : CH_3−CH_2−CO−CO−CH_3
Hexane-2,3-dione : CH_3−CH_2−CH_2−CO−CO−CH_3

Figure 1. Les principaux composés α-dicarbonylés du vin, (l'hexane-2,3-dione n'est pas naturellement présente dans le vin mais elle est utilisée comme étalon interne).

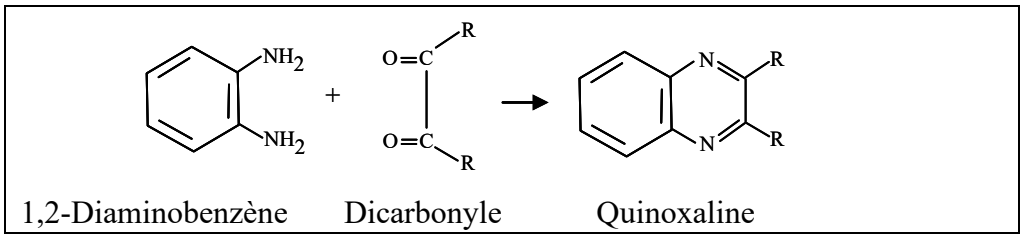
Les composés dicarbonylés sont importants dans le vin pour des raisons différentes : impact sensoriel, réactivité avec d'autres composants du vin ou possibles effets microbiologiques.

2. Domaine d'application

Cette méthode s'applique à tous types de vins (blancs, rouges, sucrés ou fortifiés),.pour des composés dicarbonylés dont la teneur est comprise entre 0,05 mg/L et 20 mg/L

3. Principe

La méthode est basée sur la formation de dérivés de type quinoxaline à partir des composés α-dicarbonylés du vin avec le 1,2-Diaminobenzène (figure 2).



1,2-Diaminobenzène Dicarbonyle Quinoxaline

Figure 2 Formation des dérivés.

La réaction a lieu directement dans le vin à pH 8 et après une durée de réaction de 3 h à 60 °C. L'analyse des dérivés est ensuite effectuée directement par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) et détection par absorptiométrie UV à 313 nm.

4. Réactifs et produits

4.1 Composés dicarbonylés

- 4.1.1 Glyoxal (N° CAS 107-22-3) en solution à 40 %
- 4.1.2 Méthylglyoxal (N° CAS 78-98-8) en solution à 40 %
- 4.1.3 Diacétyle (N° CAS 431-03-8) de pureté > 99 %
- 4.1.4 Pentane-2,3-dione (N° CAS 600-14-6) de pureté > 97 %
- 4.1.5 Hexane-2,3-dione (N° CAS 3848-24-6) de pureté > 90 %

4.2 1,2-Diaminobenzène (N° CAS 95-54-5) sous forme de poudre, de pureté > 97 %

4.3 Eau pour HPLC (par exemple microfiltrée et de résistivité de 18,2 MΩ)

4.4 Ethanol (N° CAS 64-17-5) pur pour HPLC

4.5 Hydroxyde de sodium (N° CAS 1310-73-2) en solution M

4.6 Acide acétique (N° CAS 64-19-7) pur cristallisable

4.7 Solvant A pour l'analyse par HPLC

Dans 1 L d'eau pour HPLC (4.3) rajouter 0,5 ml d'acide acétique (4.6), mélanger, dégazer (par exemple par ultrasons)

4.8 Solvant B pour HPLC

Méthanol (N° CAS 67-56-1) pur HPLC

4.9 Solution hydroalcoolique à 50 % vol.

Mélanger 50 ml d'éthanol pur pour HPLC (4.4) avec 50 ml d'eau (4.3)

4.10 Solution d'étalon interne hexane-2,3-dione à 2,0 g/L

Placer 40 mg d'hexane-2,3-dione (4.2) dans un flacon de 30 ml, diluer dans 20 ml de solution hydroalcoolique à 50 % vol (4.9) agiter jusqu'à dissolution complète.

5. Appareillage

5.1 Chromatographie en phase liquide à haute performance avec détection par absorptiométrie UV (313 nm).

5.1.1 Colonne analytique remplie de silice greffée par des radicaux octadécyle de 5 µm dont les dimensions sont par exemple 250 mm x 4,6 mm.

5.1.2 Système d'acquisition des données.

5.2 Appareil de mesure du pH

5.3 Agitateur magnétique

5.4 Balance de précision à 0,1 mg.

5.5 Système de dégazage des solvants pour HPLC (par exemple appareil à ultrasons)

5.6 Four pouvant être réglé à 60 °C

5.7 Verrerie courante de laboratoire dont pipettes, flacons à vis de 30 ml et microseringues.

6. Préparation de l'échantillon

Aucune préparation spécifique n'est requise

7. Mode opératoire

Placer 10 ml de vin dans un flacon de 30 ml (5.7.)
Amener à pH 8 sous agitation, avec de l'hydroxyde de sodium M (4.5)
Ajouter 5 mg de 1,2-diaminobenzène (4.2)
Ajouter 10 µl d'hexane-2,3-dione (étalon interne) à 2,0 g/L (4.10)
Fermer le flacon à l'aide d'un bouchon à vis muni d'un joint à face téflonée
Agiter jusqu'à disparition complète du réactif (5.3)
Placer dans le four à 60 °C pendant 3 h (5.6)

Refroidir.

7.1 Optimisation et conditions analytiques

Le rendement de la réaction des composés dicarbonylés avec le 1,2-diaminobenzène est optimal à pH 8. Des solutions de composés dicarbonylés ont été dérivés à 25, 40 ou 60 °C puis analysés par HPLC selon le protocole décrit au point 7.2 à des moments différents (tableau 1). Les dicétones nécessitent beaucoup plus de temps de réaction et une température de réaction plus élevée. La réaction est plus lente avec les molécules à plus longue chaîne (la pentane-2,3-dione et l'hexane-2,3-dione).

Par ailleurs, aucune interférence du SO_2 avec la formation des quinoxalines n'a été notée lors de l'étude de la méthode.

Tableau 1. Effet du temps de réaction et de la température sur le rendement de dérivés par le 1,2-diaminobenzène du glyoxal, du diacétyle et de l'hexane-2,3-dione

		Temps de réaction		
		1h	2h	3h
	Température (°C)	Taux de récupération (%)		
Glyoxal	25	92	93	94
	40	95	97	98
	60	96	98	100
Diacétyle	25	23	77	87
	40	64	89	94
	60	85	100	100
Hexane-2,3-dione	25	17	67	79
	40	55	79	88
	60	69	93	100

7.2 Analyse par HPLC

- *Injection*. Après refroidissement, le milieu réactionnel contenant les quinoxalines est directement injecté à raison de 20 µl dans le système HPLC.
- *Programme d'élution*. Pour la séparation, le programme d'élution est présenté dans le tableau Tableau 2

Tableau 2. Programme d'élution de l'analyse par HPLC

Temps en minutes	solvant A	solvant B
0	80	20
8	50	50
26	25	75
30	0	100
32	0	100
40	100	0
45	80	20
50	80	20

Le débit étant de 0,6 ml/min

- *Séparation.* Le chromatogramme obtenu par HPLC est indiqué dans la Figure 3.
- *Détection***.** Le maximum d'absorption a été étudié pour tous les composés dicarbonylés dérivés et fixé à 313 nm comme étant optimal.
- *Identification des dérivés.* L'identification des dérivés a été réalisée par comparaison des temps de rétention avec des solutions de référence étalons. Les conditions chromatographiques permettent une bonne séparation des pics dans tous les vins.

7.2.1Caractéristiques de la méthode par HPLC

Certains éléments de validation interne ont été déterminés mais il ne s'agit pas d'une validation formelle selon le protocole pour la planification, la conduite et l'interprétation des études de performances des méthodes d'analyse (OIV 6/2000)

- *Répétabilité.* La répétabilité de la méthode a été calculée à partir de 10 analyses du même vin (tableau 3).

Tableau 3. Étude de répétabilité et performance de la méthode

	Moyenne*	écart type	CV (%)
Vin blanc			
Glyoxal	4,379	0,101	2,31
Méthylglyoxal	2,619	0,089	3,43
Diacétyle	5,014	0,181	3,62
Pentane-2,3-dione	2,307	0,097	4,21
Vin rouge			
Glyoxal	2,211	0,227	10,30
Méthylglyoxal	1,034	0,102	9,91
Diacétyle	1,854	0,046	2,49
Pentane-2,3-dione	0,698	0,091	13,09

*Résultats en mg/l à partir de 10 analyses du même vin.

- *Linéarité*. La linéarité de la méthode a été testée en utilisant des solutions standards (solution hydroalcoolique à 12 % vol. comme matrice) (Tableau 4). L'analyse quantitative des ajouts de composés dicarbonylés a montré que la méthode est linéaire pour les quatre composés avec une précision satisfaisante.

Tableau 4. Étude de la linéarité et essais de récupération avec des solutions standard (eau-éthanol 12 % v/v) valeur du coefficient de corrélation

Glyoxal	Méthylglyoxal	Diacétyle	Pentane-2,3dione
R = 0,992	R = 0,997	R = 0,999	R = 0,999

- *Le taux de récupération* des ajouts effectués en vins rouges et blancs ont démontré la bonne performance de la méthode Compris entre 92 % et 116 % pour les valeur extrêmes

- *La limite de quantification* des composés dicarbonylés est très basse, les meilleurs résultats étant obtenus avec le diacétyle dont la limite de détection est 10 fois plus faible que celle des autres composés (tableau 5).

Tableau 5**.** Performance de la méthode par HPLC pour la quantification des composés dicarbonylés

	Limites quantification[a]	détection[a]	détermination[a]
Glyoxal	0,015	0,020	0,028
Méthylglyoxal	0,015	0,020	0,027
Diacétyle	0,002	0,002	0,003
Pentane-2,3-dione	0,003	0,004	0,006

a : résultats en mg/l, en solution hydroalcoolique (10 % vol).

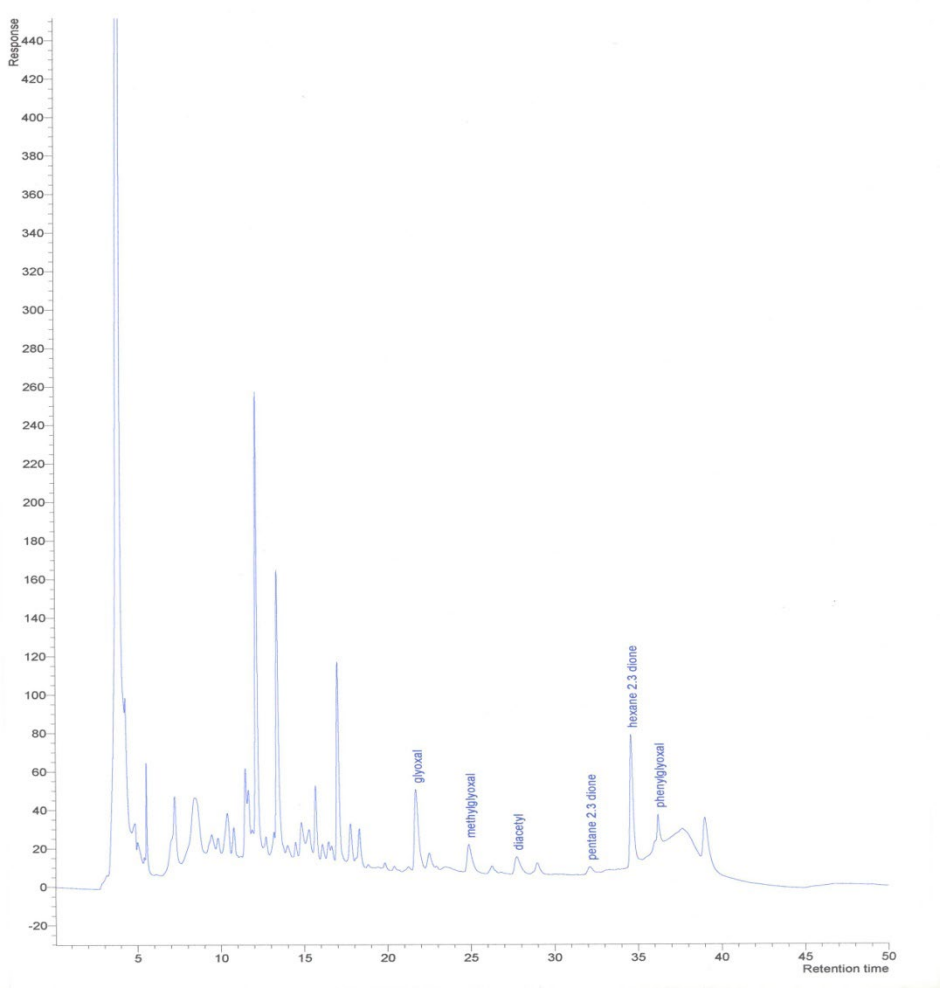


Figure 3. Chromatogramme en phase liquide à haute performance des composés dicarbonylés dérivés par le 1,2-diaminobenzène d'un vin blanc, détectés en UV à 313 nm Colonne Sperisorb ODS 250 mm x 4,6 mm x 5 µm.

Bibliographie

Bartowski E.J.and Henschke P.A. The buttery attribute of wine – diacetyl – desirability spoilage and beyond. Int. j.food microbial. 96 : 235-252 (2004).

Bednarski W, Jedrychowski L, Hammond E and Nikolov L, A method for determination of α-dicarbonyl compounds. J Dairy Sci 72:2474-2477 (1989).

Leppannen O, Ronkainen P, Koivisto T and Denslow J, A semiautomatic method for the gas chromatographic determination of vicinal diketones in alcoholic beverages. J Inst Brew 85:278- 281 (1979).

Martineau B, Acree TE and Henick-Kling T, Effect of wine type on the detection threshold for diacetyl. Food Res Int 28:139-143 (1995).

Moree-Testa P and Saint-Jalm Y, Determination of α-dicarbonyl compounds in cigarette smoke. J Chromatogr 217:197-208 (1981).

de Revel G Pripis-Nicolau L. Barbe J.-C; and Bertrand A, The detection of α-dicarbonyl compounds in wine:by ,formation of quinoxaline derivatives. J Sci. Food Agric.80:102-108 (2000).

de Revel G and Bertrand A, Dicarbonyl compounds and their reduction products in wine. Identi®cation of wine aldehydes. Proc 7th Weurman Flavour Research Symp, Zeist, June, pp 353-361 (1994).

de Revel G and Bertrand A, A method for the detection of carbonyl compounds in wine: glyoxal and methylglyoxal. J Sci. Food Agric 61:267-272 (1993).

Voulgaropoulos A, Soilis T and Andricopoulos N, Fluorimetric determination of diacetyl in wines after condensation with 3,4-diaminoanisole. Am J Enol Vitic 42:73-75 (1991).

Gilles de Revel et Alain Bertrand analyse des composes α-dicarbonyles du vin après dérivation par le 1,2-diaminobenzene OIV FV 1275

Méthode OIV-MA-AS315-21 Méthode Type IV

Méthode de détermination des composes α-dicarbonylés du vin par chromatographie en phase gazeuse aprés dérivation par le 1,2-diaminobenzene

(OIV/OENO 386B/2010)

1. Introduction

Les principaux composés α-dicarbonylés du vin (Figue 1) sont : glyoxal, méthylglyoxal, diacétyle et pentane-2,3-dione, seules les α-dicétones sont assez abondantes dans le vin. Les composés carbonylés existent dans tous les types de vins et particulièrement après la fermentation malolactique et dans les vins rouges. De plus, des vins blancs doux produits à partir de raisins botrytisés peuvent contenir des niveaux de glyoxal et de méthylglyoxal élevés.

Glyoxal : OCH−CHO (éthanedial)
Méthylglyoxal : CH_3−CO−CHO (2-oxopropanal)
Diacétyle : CH_3−CO−CO−CH_3 (butane-2,3-dione)
Pentane-2,3-dione : CH_3−CH_2−CO−CO−CH_3
Hexane-2,3-dione : CH_3−CH_2−CH_2−CO−CO−CH_3

Figure 1. Les principaux composés α-dicarbonylés du vin, (l'hexane-2,3-dione n'est pas naturellement présente dans le vin mais elle est utilisée comme étalon interne).

Les composés dicarbonylés sont importants dans le vin pour des raisons différentes : impact sensoriel, réactivité avec d'autres composants du vin ou possibles effets microbiologiques.

2. Domaine d'application

Cette méthode s'applique à tous types de vins (blancs, rouges, sucrés ou fortifiés), pour des teneurs en dérivés carbonylés comprises entre 0,05 mg/L et 20 mg/L.

3. Principe

La méthode est basée sur la formation de dérivés de type quinoxaline à partir des composés α-dicarbonylés du vin avec le 1,2-Diaminobenzène (figure 2).

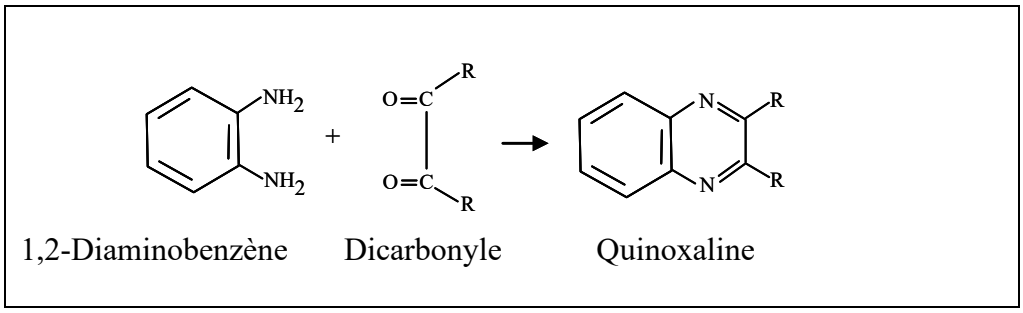


Figure 2 Formation des dérivés.

La réaction a lieu directement dans le vin à pH 8 et après une durée de réaction de 3 h à 60 °C. L'analyse des dérivés est ensuite effectuée après extraction des dérivés par le dichlorométhane et analyse par chromatographie en phase gazeuse avec une détection par spectrométrie de masse (GC-MS) ou à l'aide d'un détecteur spécifique des composés azotés.

4. Réactifs et produits

4.1 Composés dicarbonylés

- 4.1.1 Glyoxal (n° cas 107-22-3) en solution à 40 %
- 4.1.2 Méthylglyoxal (n° cas78-98-8) en solution à 40 %
- 4.1.3 Diacétyle (n° cas 431-03-8) de pureté > 99 %
- 4.1.4 Pentane-2,3-dione (n° cas 600-14-6) de pureté > 97 %
- 4.1.5 Hexane-2,3-dione (n° cas 3848-24-6) de pureté > 90 %

4.2 1,2-Diaminobenzène (n° cas 95-54-5) sous forme de poudre, de pureté > 97 %

4.3 Eau pour HPLC (par exemple microfiltrée et de résistivité de 18,2 MΩ)

4.4 Ethanol (n° cas 64-17-5) pur pour HPLC

4.5 Hydroxyde de sodium (n° cas 1310-73-2) en solution M
4.6 Acide sulfurique (n° cas 7664-93-9) en solution 2M
4.7 Dichlorométhane (n° cas 75-09-2)
4.8 Sulfate de sodium anhydre (n°cas 7757-82-6)
4.9 Solution hydroalcoolique à 50 % vol.
Mélanger 50 ml d'éthanol pur pour HPLC (4.4) avec 50 ml d'eau (4.3)
4.10 Solution d'étalon interne hexane-2,3-dione à 2,0 g/L
Placer 40 mg d'hexane-2,3-dione (4.2) dans un flacon de 30 ml, diluer dans 20 ml de solution hydroalcoolique à 50 % vol (4.9) agiter jusqu'à dissolution complète.
4.11 Sulfate de sodium anhydre (n°cas 7757-82-6)

5. Appareillage
5.1 Chromatographie en phase gazeuse avec une détection par spectrométrie de masse (GC-MS) ou à l'aide d'un détecteur spécifique des composés azotés.
5.1.1 Colonne analytique capillaire polyéthylène glycol moyennement polaire (C 20M, BP21…) avec les caractéristiques suivantes (à titre d'exemple) 50 m x 0,32 mm x 0,25 µm.
5.1.2 Système d'acquisition des données.
5.2 Appareil de mesure du pH
5.3 Agitateur magnétique
5.4 Balance de précision à 0,1 mg.
5.5 Four pouvant être réglé à 60 °C
5.6 Verrerie courante de laboratoire dont pipettes, flacons à vis et microseringues.

6. Préparation de l'échantillon
Aucune préparation spécifique n'est requise

7. Mode opératoire
Placer 50 ml de vin dans un flacon (5.6)
Amener à pH 8 sous agitation, avec de l'hydroxyde de sodium M (4.5)
Ajouter 25 mg de 1,2-diaminobenzène (4.2)
Ajouter 50 µl d'hexane-2,3-dione (étalon interne) à 2,0 g/L (4.10)
Fermer le flacon à l'aide d'un bouchon à vis muni d'un joint à face téflonée.
Agiter jusqu'à disparition complète du réactif (5.3)
Placer dans le four à 60 °C pendant 3 h (5.5)
Refroidir.

7.1 Optimisation et conditions analytiques (cette étude a été effectuée avec analyse par HPLC, voir cette méthode)
Le rendement de formation des dérivés des composés dicarbonylés avec le 1,2-diaminobenzène est optimal à pH 8, à 60 °C, après 3 heures de réaction.
Par ailleurs, aucune interférence du SO_2 avec la formation des quinoxalines n'a été notée lors de l'étude de la méthode.

7.2 Analyse par GC
7.2.1 Extraction des quinoxalines
- Le milieu réactionnel préparé en 7, est amené à pH 2 à l'aide de H_2SO_4 2M (4.6) ;
- Extraire à 2 reprises par 5 ml de dichlorométhane (4.7) par agitation magnétique durant 5 minutes ;
- Décanter la phase inférieure à chaque reprise ;
- Mélanger les deux phases de solvant ;
- Sécher sur 1 g environ de sulfate de sodium anhydre (4.11) ;
- Décanter.
7.2.2 Analyse chromatographique (donnée à titre d'exemple)
- *Détection.* Pour l'analyse par GC-MS un chromatographe en phase gazeuse Hewlett Packard HP 5890 a été couplé avec une chemstation et un spectromètre de masse HP 5970 (impact électronique 70 eV, 2,7 kV),
Remarque Il est également possible d'utiliser un détecteur spécifique des composés azotés.
- *Colonne.* La colonne est une BP21 (SGE, 50 m x 0,32 mm x 0,25 µm).
- *Températures.* Les température de l'injecteur et du détecteur sont respectivement de 250 °C et 280 °C ; celle du four est maintenue à 60 °C pendant 1min, puis programmée à raison de 2 °C/min jusqu'à 220 °C et l'isotherme final dure 20 min.
- *Injection.* Le volume injecté est de 2 µl et le temps de fermeture des vannes de l'injecteur (splitless) est de 30 s.
7.2.3 Analyse des quinoxalines formées
- *Séparation.* Le chromatogramme des dérivés par 1,2-diaminobenzène d'un vin selon la méthode de sélection d'ions (SIM) est montré à la Figure 3. De bonnes séparations ont été obtenues avec tous les types de vins (blancs, rouges, sucrés ou fortifiés) et même de moûts en fermentation.
- *Identification des pics*. L'utilisation de la GC-MS a permis d'identifier les composés dicarbonylés dérivés du vin en utilisant la méthode du courant ionique total (scan) qui permet d'obtenir les spectres de masse des dérivés quinoxalines et de les comparer à ceux en mémoire dans la bibliothèque de

spectres ; par ailleurs les temps de rétention ont été comparés avec ceux de composés purs traités de la même manière. Le tableau 1 montre les ions principaux des spectres de masse des composés dicarbonylés dérivés obtenus.
- *Dosage*. La détermination quantitative des composés dicarbonylés est effectuée avec le mode SIM, en sélectionnant des ions M / Z = 76, 77, 103, 117, 130, 144, 158 et 171. Les ions M/Z = 76 et 77 sont utilisés pour la quantification et les autres comme qualifieurs, c'est-à-dire glyoxal : ions M/Z =103 et 130, méthylglyoxal : ions M/Z =117 et 144, diacétyle : ions M/Z = 117 et 158, pentan-2,3-dione : ions M/Z = 171 et hexane-2,3-dione : ions M/Z = 158 et 171.

7.2.4 Caractéristiques de la méthode.

Certains éléments de validation interne ont été déterminés mais il ne s'agit pas d'une validation formelle selon le protocole pour la planification, la conduite et l'interprétation des études de performances des méthodes d'analyse (OIV 6/2000)

- *Répétabilité*. La répétabilité de la méthode par GC-MS-SIM. montre des coefficients de variation compris entre 2 et 5 % pour les quatre composés dicarbonylés ;

- *Taux de récupération*. Les quantités ajoutées à un vin ont été retrouvées avec un taux de récupération variant de 92 à 117 %
- *Linéarité*. Des corrélations linéaires ont été obtenues dans des domaines de concentration compris entre 0,05 à 20 mg/l.
- *Limite de détection*. La limite de détection de la plupart des produits dicarbonylés dérivés en utilisant le vin comme matrice est de 0,05 mg/l

Tableau 1. Spectres de masse [ion m/z (intensité de l'ion moléculaire relative à celle du pic de base)] des dérivés de composés dicarbonylés par le 1,2-diaminobenzène

Composé dicarbonylé	Dérivé	Spectre de masse (principaux ions et abondance)
Glyoxal	Quinoxaline	130 (100), 103 (56.2), 76(46.8), 50 (20.2), 75 (10.4), 131 (9.4)
Méthylglyoxal	2-Méthylquinoxaline	144 (100), 117 (77.8), 76 (40.5), 77 (23.3), 50 (21.9), 75 (11.3), 145(10.3)
Diacétyle	2,3-Diméthylquinoxaline	117 (100), 158 (75.6), 76 (32.3), 77 (23.1), 50 (18.3), 75 (10.4)
Pentane-2,3-dione 130	2-Ethyl-3-méthylquinoxaline	171 (100), 172 (98), (34.1), 75 (33.3), 77 (21), 50 (19.4), 144 (19), 143 (14.1), 103 (14)
Hexane-2,3-dione	2,3-Diéthylquinoxaline	158 (100), 171 (20.1), 76 (13.7), 77 (12.8), 159 (11.4), 157 (10.8), 50 (8.1)

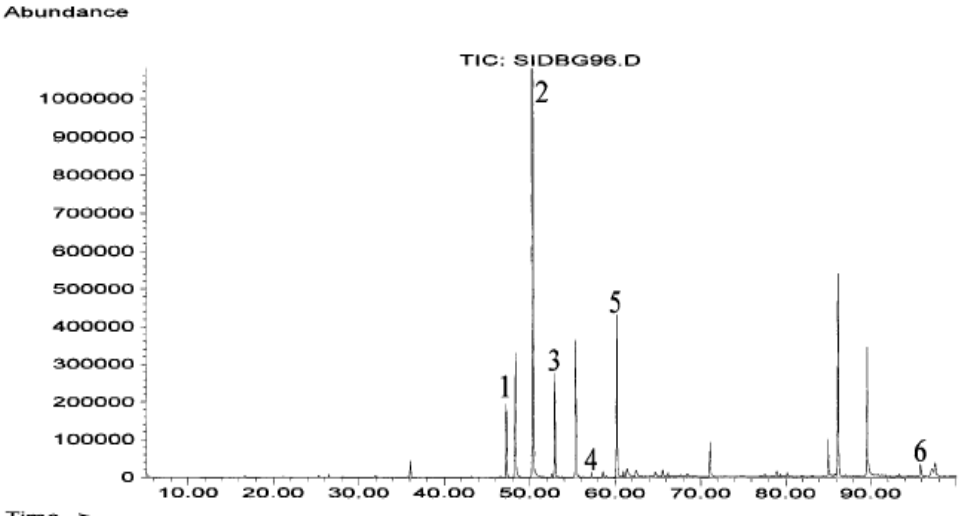


Figure 3. Chromatogramme en phase gazeuse de l'extrait des composés dicarbonylés dérivés par le 1,2-diaminobenzène d'un vin blanc, détectés en spectrométrie de masse en choisissant les ions m/z =76, 77, 103, 117, 130, 131, 144, 158, 160 et 171. Colonne BP21, 50 m , 0,32 mm, 0,25 µm température de four 60 °C pendant 1min, puis programmation à 2 °C/min jusqu' à 220 °C. température de l'injecteur : 250 °C.
1. glyoxal ; 2. méthylglyoxal ; 3. diacétyle ; 4. pentane-2,3-dione ; 5. hexane-2,3-dione (étalon interne) ; 6. phénylglyoxal (non étudié dans cette méthode).

Bibliographie

Bartowski E.J.and Henschke P.A. The buttery attribute of wine – diacetyl – desirability spoilage and beyond. Int. j.food microbial. 96 : 235-252 (2004).

Bednarski W, Jedrychowski L, Hammond E and Nikolov L, A method for determination of α-dicarbonyl compounds. J Dairy Sci 72:2474-2477 (1989).

Leppannen O, Ronkainen P, Koivisto T and Denslow J, A semiautomatic method for the gas chromatographic determination of vicinal diketones in alcoholic beverages. J Inst Brew 85:278- 281 (1979).

Martineau B, Acree TE and Henick-Kling T, Effect of wine type on the detection threshold for diacetyl. Food Res Int 28:139-143 (1995).

Moree-Testa P and Saint-Jalm Y, Determination of α-dicarbonyl compounds in cigarette smoke. J Chromatogr 217:197-208 (1981).

de Revel G Pripis-Nicolau L. Barbe J.-C; and Bertrand A, The detection of α-dicarbonyl compounds in wine:by ,formation of quinoxaline derivatives. J Sci. Food Agric.80:102-108 (2000).

de Revel G and Bertrand A, Dicarbonyl compounds and their reduction products in wine. Identi®cation of wine aldehydes. Proc 7th Weurman Flavour Research Symp, Zeist, June, pp 353-361 (1994).

de Revel G and Bertrand A, A method for the detection of carbonyl compounds in wine: glyoxal and methylglyoxal. J Sci. Food Agric 61:267-272 (1993).

Voulgaropoulos A, Soilis T and Andricopoulos N, Fluorimetric determination of diacetyl in wines after condensation with 3,4-diaminoanisole. Am J Enol Vitic 42:73-75 (1991).

Gilles de Revel et Alain Bertrand analyse des composés α-dicarbonylés du vinaprès dérivation par le 1,2-diaminobenzène OIV FV 1275

Méthode OIV- -MA-AS315-22 Type de méthode : IV

Dosage de la carboxymethylcellulose (gomme de cellulose, CMC) dans les vins blancs

(OIV/OENO 404/2010)

1. Introduction

La carboxyméthylcellulose (CMC, gomme de cellulose) est un polymère dérivé de la cellulose naturelle, utilisé couramment depuis de nombreuses années en tant qu'additif alimentaire (INS 466) dans des produits tels que les crèmes glacées ou les plats cuisinés [1], pour leur donner de l'onctuosité. L'utilisation de CMC dans les vins blancs et les vins mousseux en vue de participer à leur stabilisation tartrique [2] a été récemment admise par l'OIV dans la résolution Oeno 2/2008 sous réserve que la dose additionnée au vin soit inférieure à 100 mg/l. Une méthode de dosage spécifique de la CMC dans le vin blanc a donc été développée à partir de la méthode de H.D Graham publiée en 1971 [3].

2. Domaine d'application

La méthode s'applique aux vins blancs (tranquilles et mousseux).

3. Principe

Une fois la CMC isolée du vin par dialyse, elle est hydrolysée en milieu acide pour former de l'acide glycolique qui est ensuite dégradé pour former du formaldéhyde. Le 2,7-Dihydroxynaphtaléne (DHN) est ajouté pour former le 2,2,7,7-tetrahydroxydinaphtylmethane en présence de formaldéhyde. Le complexe formé développe une couleur violacée sous l'action de l'acide sulfurique concentré, à 100°C, permettant une mesure colorimétrique à 540nm. (figure 1)

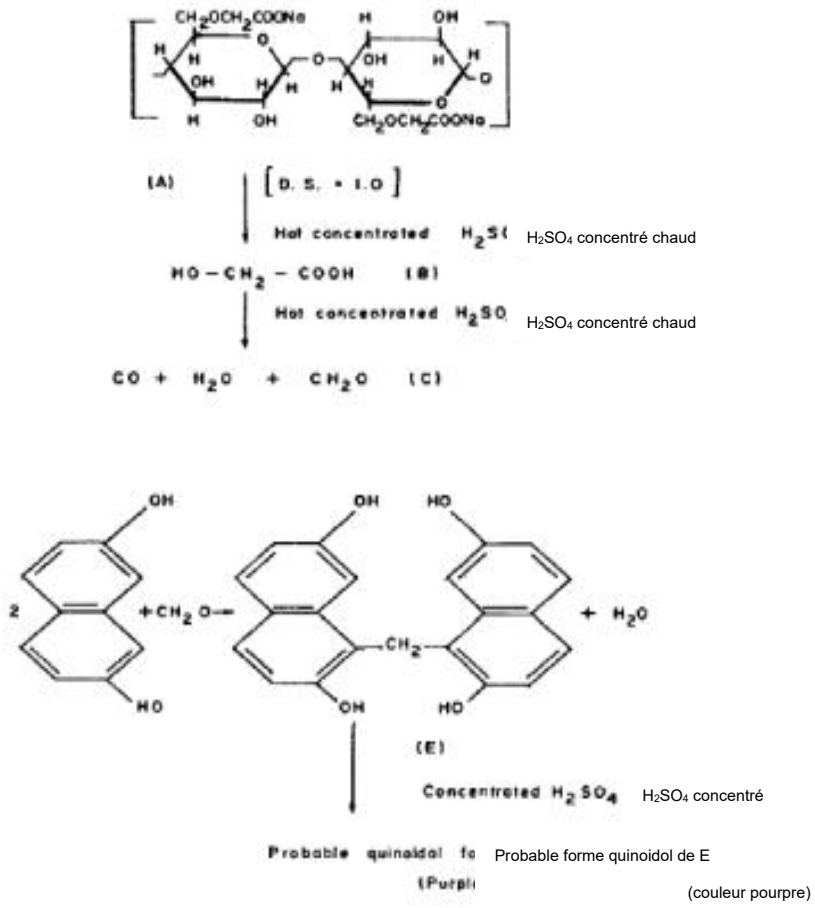


Figure1 : Mécanisme de réaction de la CMC avec le DHN dans l'acide sulfurique concentré chaud

(Feigl, 1966)

4. Réactifs

– Carboxyméthylcellulose sodique [N° CAS:9004-32-4] - viscosité moyenne 400-1000 mPa.s, degré de substitution 0,60-0,95)
– 2,7-Dihydroxynaphtalène [N° CAS 582-17-2] (pureté > 98,0% - CLHP)
– Acide sulfurique concentré à 95%
– Eau purifiée pour laboratoire, (par exemple de qualité EN ISO 3696)

5. Matériel

– Verrerie de laboratoire
– Membrane de dialyse (6000 à 8000 Da)
– Bain Thermostaté
– Spectrophotomètre UV-Visible double faisceau

6. Mode opératoire

6.1 Préparation du réactif

– Mettre 50 mg DHN pesé au mg prés dans une fiole jaugée de 100mL
– Ajouter l'acide sulfurique concentré jusqu'au trait de jauge
– Placer la fiole jaugée au bain thermostaté à 28°C pendant 4h (sans agiter)
– Transvaser le réactif, après chauffage, dans un flacon brun et le stocker au réfrigérateur à 4°C

6.2 Préparation des échantillons de vin

– Introduire 20mL de vin préalablement dégazé dans la membrane de dialyse
– Placer la membrane de dialyse contenant le vin dans un ballon de 6 litres rempli d'eau distillée
– Laisser dialyser 24h en effectuant 2 changements d'eau de dialyse

6.3 Réaction colorée

– Mettre 1mL de vin dialysé dans un tube à essais
– Ajouter 9mL de réactif
– Placer le tube à essais au bain thermostaté à 100°C pendant 2h

– Analyser la solution colorée au spectrophotomètre UV-Visible à 540nm et lire la valeur de l'absorbance
– 6.4 Calcul de la teneur en CMC du vin
– Reporter la valeur de l'absorbance lue en 6.3 sur une droite d'étalonnage obtenue à partir d'un vin (figure 2).

7. Caractéristiques de la méthode

Certains éléments de validation interne ont été déterminés mais il ne s'agit pas d'une validation formelle selon le protocole pour la planification, la conduite et l'interprétation des études de performances des méthodes d'analyse (OIV 6/2000)

7.1 Linéarité de la réponse

Un vin blanc a été additionné de quantités croissantes de CMC comprises entre 0 et 100 mg/L, puis dialysé et traité dans les conditions définies dans le mode opératoire ci-dessus. La réponse est linéaire dans le domaine de concentrations étudié (figure 2).

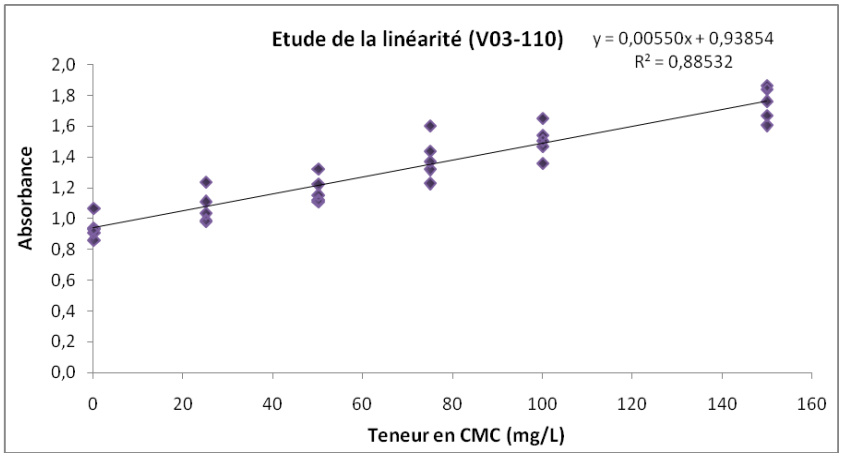


Figure 2 : Linéarité du dosage de la CMC dans un vin blanc

7.2 Répétabilité

La répétabilité du dosage de la CMC dans les vins blancs a été déterminée à partir des résultats obtenus sur 22 échantillons de vins analysés 2 fois de suite, de façon à être dans des conditions identiques. Les résultats sont donnés dans le tableau 1.

	valeurs calculées
répétabilité	
écart-type	0,075
CV en %	7,2 %
limite r	0,21
limite r en %	**20 %**

Tableau 1: Répétabilité du dosage de la CMC dans les vins blancs

7.3 Reproductibilité

La reproductibilité du dosage de la CMC dans les vins blancs a été déterminée en analysant le même vin blanc traité à la CMC 12 fois à différentes dates. Les résultats sont donnés dans le tableau 2.

	valeurs calculées
réproductibilité	
écart-type	0,082
CV en %	9,6 %
limite R	0,23
limite R en %	**27 %**

Tableau 2 : Reproductibilité du dosage de la CMC dans les vinsblancs

7.4 Spécificité

La spécificité du dosage de la CMC a été vérifiée en ajoutant dans des vins blancs des quantités connues de CMC. Les taux de récupération mesurés sont donnés dant le tableau 3.

Echantillon	Teneur ajoutée (mg/l)	Teneur retrouvée (mg/l)	Taux de récupération
Vin 1	50	33	66 %
Vin 1	50	51	102 %
Vin 1	50	24	77 %
Vin 2	75	78	104 %
Vin 2	75	90	121 %
Vin 2	75	69	92 %
Vin 3	100	109	109 %
Vin 3	100	97	97 %
Vin 3	100	103	103 %
Vin 4	150	163	109 %
Vin 4	150	149	100 %
Vin 4	150	159	106 %

Tableau 3 : Spécificité du dosage de la CMC dans les vins blancs

7.4 Limites de détection et de quantification

Les limites de détection (LD) et de quantification (LQ) ont été calculées à partir du vin non traité analysé 10 fois. La limite de détection ainsi déterminée est de 14 mg/l et la limite de quantification est de 61 mg/l.
La méthode permet donc de détecter une addition de CMC dans un vin blanc à partir de 20 mg/l et de quantifier cet ajout au-delà de 60 mg/l, ce qui n'est pas très satisfaisant mais reste compatible avec la dose maximale autorisée de 100 mg/l.

7.5 Incertitude

L'incertitude a été calculée à 3 niveaux de concentration (25, 75 et 150 mg/l) à partir des résultats d'analyse de vins traités par la CMC, en utilisant l'écart-type de reproductibilité. L'incertitude obtenue est de 40 mg/l quelle que soit la teneur en CMC.

8. Bibliographie

[1] Règlement (CE) N° 1333/2008 du 16 décembre 2008 sur les additifs alimentaires.

[2] Stabilisation tartrique des vins par la carboxyméthylcellulose - Bulletin de l'OIV 2001, vol 74, n°841-842, p151-159.

[3] Determination of carboxymethycellulose in food products - H.D Graham, Journal of food science 1971, p 1052-1055

Méthode OIV- -MA-AS315-23 Type de méthode : IV

Critères pour les méthodes de quantification des résidus potentiellement allergéniques de protéines de collage dans le vin

OIV/OENO 427/2010
OIV-COMEX 502-2012

1 Définitions des critères des méthodes

Justesse	Étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une grande série de résultats d'essais et la valeur de référence acceptée
r =	Limite de répétabilité : valeur en dessous de laquelle on peut estimer que se situe la différence absolue entre deux résultats d'essais uniques, obtenus dans des conditions de répétabilité (c.-à-d. même échantillon, même opérateur, même appareillage, même laboratoire, et court intervalle de temps) avec une probabilité spécifique (en général 95%), d'où $r = 2{,}8 \times s_r$.
S_r =	Écart type calculé à partir des résultats produits dans des conditions de répétabilité.
RSD_r=	Écart type relatif calculé à partir des résultats produits dans des conditions de répétabilité [$(S_r/\overline{x}) \times 100$], où $\overline{x}$ est la moyenne des résultats de tous les laboratoires et échantillons.
R =	Limite de reproductibilité : valeur en dessous de laquelle on peut estimer que se situe la différence absolue entre des résultats d'essais uniques obtenus dans des conditions de reproductibilité (c.-à-d. sur un matériel identique, par des opérateurs travaillant dans des laboratoires différents et utilisant la méthode d'essai

normalisée) avec une certaine probabilité (en général 95%) ; $R = 2,8 \times s_R$.

S_R = Écart type calculé à partir des résultats produits dans des conditions de reproductibilité.

RSD_R = Écart type relatif calculé à partir des résultats produits dans des conditions de reproductibilité [$(S_R/\bar{x} \times 100$]

Ho_R = Valeur HORRAT : valeur RSD_R observée, divisée par la valeur RSD_R calculée à l'aide de l'équation de Horwitz [1].

B_0 = Moyenne du Blanc

LOD = Limite de detection, calculée en tant que LOD = $B_0 + 3*S_r(B_0)$

LOQ = Limite de quantification, calculée en tant que LOD = $B_0 + 10*S_r(B_0)$

2. Aspects généraux

Exigences
La méthode d'analyse doit être associée aux pratiques œnologiques spécifiques

Additifs ou auxiliaires technologiques contenant des protéines allergéniques
Chaque produit doit être caractérisé du point de vue chimique et le contrôle qualité est strictement nécessaire

Classe des méthodes analytiques
D'une manière générale, les méthodes immunoenzymatiques sont considérées comme les plus appropriées et les plus faciles à mettre en œuvre pour le contrôle de routine des allergènes.

La détermination des résidus de protéines de collage allergéniques dans les vins peut utiliser des méthodes ELISA sandwich, Compétitives, Directes ou Indirectes.

Si aucun anticorps enzymatique n'est disponible, un mélange d'anticorps biotinylés et un conjugué avidine-HRP peut être utilisé pour la détection

Anticorps

- Caractérisation des anticorps (évaluation de la détection des allergènes reconnus à forte ou faible affinité)
- Spécificité élevée pour les auxiliaires technologiques du commerce (caractérisés comme indiqué ci-dessus)
- Caractérisation de l'activité croisée en tenant compte des protéines généralement utilisées dans les pratiques œnologiques
- Capacité de détecter des dérivés d'allergènes résultant de traitements œnologiques (protéolyse ou molécules modifiées)

Méthode

- Les anticorps doivent avoir des propriétés de liaison optimales dans des échantillons de vin
- Les méthodes doivent avoir des performances optimales dans des échantillons de vin ayant des caractéristiques chimiques différentes (pH et extrait sec, vin rouge et vin blanc, etc.)
- Les résultats avec des vins provenant de zones géographiques différentes (même en cas d'application de pratiques œnologiques différentes) doivent être comparables
- Les propriétés de liaison des anticorps doivent être optimales par rapport à différentes conditions de maturation du vin (temps, températures, changements de couleur, etc.)

3. Type de méthodes

Il n'est pas encore prescrit de méthodes spécifiques de détermination des protéines de collage dans le vin. Plusieurs méthodes ELISA sont déjà disponibles et peuvent être appliquées.

Les laboratoires devront utiliser une méthode validée en fonction des exigences de l'OIV et répondant aux critères de performance énoncés dans le tableau 1. Dans la mesure du possible, la validation comprendra un matériau de référence certifié parmi les matériaux de l'essai collaboratif.

Dans le cas contraire, une évaluation alternative de la justesse devra être effectuée.

PROTOCOLE GENERAL DE LA METHODE ELISA DIRECTE ET INDIRECTE

La méthode directe, en une étape, utilise uniquement un anticorps conjugué qui est soumis à incubation avec l'antigène contenu dans l'échantillon/la référence et lié à la surface,

La méthode indirecte en deux étapes utilise un anticorps secondaire conjugué pour la détection. En premier lieu, l'anticorps primaire est incubé avec l'antigène contenu dans l'échantillon/la référence et lié au puits. Cette opération est suivie d'une incubation avec l'anticorps secondaire conjugué qui reconnaît l'anticorps primaire.

Direct

1. Préparer une surface sur laquelle est lié l'antigène de l'échantillon
2. Bloquer tous les sites de liaison non spécifiques sur la surface.
3. Appliquer les anticorps liés à des enzymes qui se lient spécifiquement à l'antigène.
4. Rincer la plaque de façon à éliminer les anticorps en excès (non liés à l'antigène).
5. Ajouter une substance chimique qui sera convertie par l'enzyme en couleur, fluorescence ou en signal électrochimique
6. Mesurer l'absorbance, la fluorescence ou le signal électrochimique (le courant) des puits de la plaque, afin de déterminer la présence et la quantité d'antigène

Avant l'analyse, les préparations d'anticorps doivent être purifiées et conjuguées.

Indirect

1. Préparer une surface sur laquelle est lié l'antigène de l'échantillon
2. Bloquer tous les sites de liaison non spécifiques sur la surface.
3. Appliquer les anticorps primaires liés à des enzymes qui se lient spécifiquement à l'antigène.
4. Rincer la plaque de façon à éliminer les anticorps primaires en excès (non liés à l'antigène).
5. Appliquer les anticorps secondaires liés à l'enzyme qui sont spécifiques des anticorps primaires.
6. Rincer la plaque, de façon à éliminer les anticorps conjugués à l'enzyme en excès (non liés).
7. Ajouter une substance chimique qui sera convertie par l'enzyme en couleur, fluorescence ou en signal électrochimique
8. Mesurer l'absorbance, la fluorescence ou le signal électrochimique (le courant) des puits de la plaque, afin de déterminer la présence et la quantité d'antigène

Avant l'analyse, les deux préparations d'anticorps doivent être purifiées et l'une d'elle conjuguée.

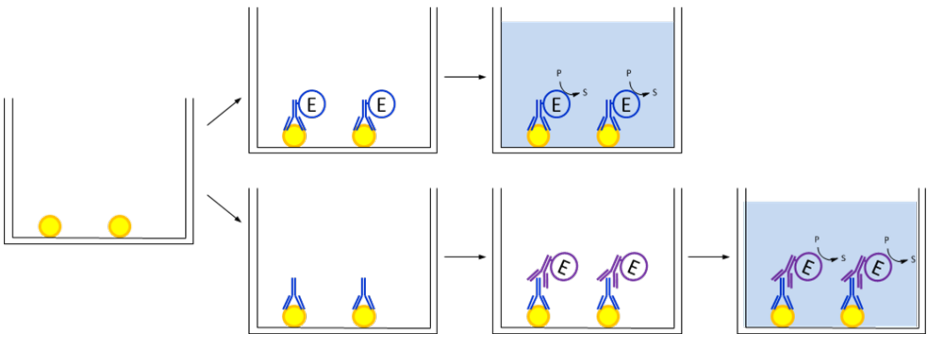


Figure 1: ELISA direct et indirect

Pour la plupart des applications, une plaque microtitre en polystyrène à hautes capacités de liaison convient parfaitement ; consulter cependant les instructions du fabricant pour déterminer le type de plaque le plus approprié pour la liaison de l'antigène donné.

Le principal avantage de la méthode ELISA directe et indirecte est sa grande sensibilité obtenue par la mise en place par un procédé relativement simple avec des chances réduites de liaisons non-spécifiques. Toutefois, elle ne s'applique que dans les cas de figures qui contiennent des niveaux peu élevés de protéine non-antigène.

PROTOCOLE GENERAL DE LA METHODE ELISA COMPETITIVE

Le terme compétitif décrit des essais où la mesure implique la quantification d'une substance selon sa capacité à interférer avec un système établi. La détection peut se faire directement, selon la méthode en une étape, ou indirectement, selon la méthode en deux étapes.

Direct

1. Préparer une surface à laquelle est liée une quantité connue de l'antigène voulu
2. Bloquer tous les sites de liaison non spécifiques sur la surface
3. Appliquer l'échantillon (antigène) ou la référence et les anticorps liés à des enzymes qui se lient spécifiquement à l'antigène sur une microplaque revêtue. Les antigènes immobilisés à la surface et les antigènes en solution entrent en compétition pour les anticorps. Ainsi, plus il y aura d'antigène dans l'échantillon, moins l'anticorps pourra se lier à l'antigène immobilisé
4. Rincer la plaque de façon à éliminer les anticorps en excès (non liés) et les complexes anticorps-antigènes non liés

5. Ajouter une substance chimique qui sera convertie par l'enzyme en couleur, fluorescence ou en signal électrochimique
6. Mesurer l'absorbance, la fluorescence ou le signal électrochimique (le courant) des puits de la plaque, afin de déterminer la présence et la quantité d'antigène

Avant l'analyse, les préparations d'anticorps doivent être purifiées et doivent être conjuguées.

Indirect

1. Préparer une surface à laquelle est liée une quantité connue d'antigène
2. Bloquer tous les sites de liaison non spécifiques sur la surface
3. Appliquer l'échantillon (antigène) ou la référence et les anticorps liés à des enzymes qui se lient spécifiquement à l'antigène sur une microplaque revêtue. Les antigènes immobilisés à la surface et les antigènes en solution entrent en compétition pour les anticorps. Ainsi plus il y aura d'antigène dans l'échantillon, moins l'anticorps pourra se lier à l'antigène immobilisé.
4. Rincer la plaque de façon à éliminer les anticorps en excès (non liés) et les complexes anticorps-antigènes non liés
5. Ajouter un anticorps secondaire, spécifique à l'anticorps primaire, conjugué avec une enzyme
6. Rincer la plaque de façon à éliminer les anticorps conjugués en excès (non liés)
7. Ajouter une substance chimique qui sera convertie par l'enzyme en couleur, fluorescence ou en signal électrochimique
8. Mesurer l'absorbance, la fluorescence ou le signal électrochimique (le courant) des puits de la plaque, afin de déterminer la présence et la quantité d'antigène

Avant l'analyse, les deux préparations d'anticorps doivent être purifiées et l'une d'elle doit être conjuguée..

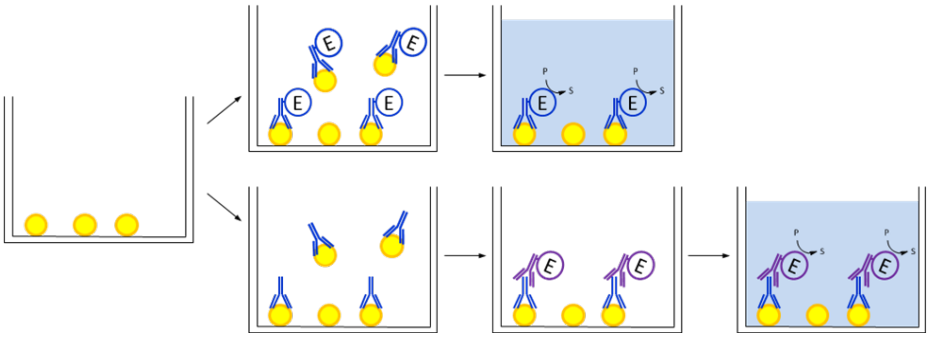


Figure 2: ELISA Competitive direct et indirect

Pour l'ELISA compétitive, plus la concentration initiale d'antigène est élevée, plus le signal éventuel est faible.

Pour la plupart des applications, une microplaque à haute capacité de liaison est ce qu'il y a de mieux, toutefois, consulter les directives du fabricant pour déterminer quel type de plaque convient le mieux pour lier l'antigène considéré

Protocole général pour la méthode ELISA Sandwich

La méthode ELISA sandwich mesure la quantité d'antigènes entre deux couches d'anticorps (c'est-à-dire les anticorps de capture et de détection). L'antigène à mesurer doit contenir au moins deux sites antigéniques (épitopes) différents pour lier deux anticorps différents. Les anticorps monoclonaux et polyclonaux peuvent être utilisés.

Direct

1. Préparer une surface sur laquelle est liée l'anticorps de capture
2. Bloquer tous les sites de liaison non spécifiques sur la surface
3. Appliquer le standard ou l'échantillon contenant l'antigène
4. Laver la plaque afin d'éliminer les molécules non reconnues par l'anticorps de capture

5. Ajouter des anticorps liés à l'enzyme (anticorps de détection) qui se lient spécifiquement à l'antigène
6. Rincer la plaque de façon à éliminer les anticorps liés à l'enzyme en excès (non liés)
7. Ajouter une substance chimique qui sera convertie par l'enzyme en couleur, fluorescence ou en signal électrochimique
8. Mesurer l'absorbance, la fluorescence ou le signal électrochimique (le courant) des puits de la plaque, afin de déterminer la présence et la quantité d'antigène

Avant l'analyse, les deux préparations d'anticorps doivent être purifiées et l'une d'elle doit être conjuguée.

Indirect

1. Préparer une surface à laquelle est liée l'anticorps de capture
2. Bloquer tous les sites de liaison non spécifiques sur la surface
3. Appliquer l'échantillon contenant l'antigène
4. Laver la plaque afin d'éliminer les molécules non reconnues par l'anticorps de capture

5. Ajouter les anticorps primaires qui se lient spécifiquement à l'antigène
6. Rincer la plaque de façon à éliminer les anticorps primaires en excès (non liés)
7. Ajouter des anticorps liés à l'enzyme (anticorps secondaires) qui se lient spécifiquement à l'anticorps primaire.
8. Rincer la plaque de façon à éliminer les anticorps liés à l'enzyme en excès (non liés)
9. Ajouter une substance chimique qui sera convertie par l'enzyme en couleur, fluorescence ou en signal électrochimique
10. Mesurer l'absorbance, la fluorescence ou le signal électrochimique (le courant) des puits de la plaque, afin de déterminer la présence et la quantité d'antigène

Avant l'analyse, les deux préparations d'anticorps doivent être purifiées et l'une d'elle doit être conjuguée..

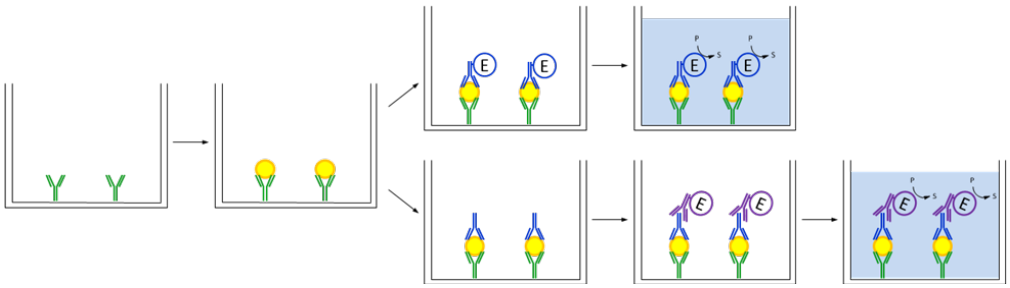


Figure 3: ELISA Sandwich direct et indirect

Pour la méthode ELISA Sandwich indirecte, il est nécessaire que les anticorps de capture et de détection soient cultivées au sein d'espèces différentes (par exemple souris et lapin) pour que les anticorps secondaires attachés à des enzymes spécifiques à la détection d'anticorps ne se lient pas également aux anticorps de capture.

Pour la plupart des applications, une microplaque à haute capacité de liaison est ce qu'il y a de mieux, toutefois, consulter les directives du fabricant pour déterminer quel type de plaque convient le mieux pour lier l'antigène considéré

Pour la méthode ELISA Sandwich, la mesure est proportionnelle à la quantité d'antigènes contenue dans les échantillons.

L'avantage de la méthode ELISA Sandwich est que les échantillons d'origine n'ont pas besoin d'être purifiés avant l'analyse, et la méthode peut être très sensible.

Tableau 1 : Critères de performance des méthodes d'analyse relatives aux résidus potentiellement allergénique de protéines de collage du vin

Paramètre	**Valeur/Commentaire**
Applicabilité	Convient pour déterminer les agents de collage dans le vin à des fins officielles.
Limite de détection	(exprimée en mg/L) ≤ 0,25
Limite de quantification	(exprimée en mg/L) ≤ 0,5
Fidélité	Valeurs HORRAT inférieures ou égales à 2 dans l'essai collaboratif de validation
Recouvrement	80% - 105% (comme indiqué dans l'essai collaboratif)
Spécificité	Pas d'interférences de la matrice
Justesse	$\left\|\overline{x} - m\right\| < 1{,}96 * \sqrt{S_{R(lab)^2} - S_{r(lab)^2} * \left(1 - 1/n\right)}$ où m est la valeur certifiée du matériau de référence vin et $\overline{x}$ est la moyenne de *n* mesures de la concentration en protéines de ce vin, dans le même laboratoire. $S_r(lab)$ représentent les écarts-types calculés à partir des résultats obtenus dans un même laboratoire dans des conditions de répétabilité $S_R(lab)$ représentent les écarts-types calculés à partir des résultats obtenus dans différents laboratoires dans des conditions de reproductibilité.

Méthode OIV-MA-AS315-24 Méthode Type IV

Dosage du lysozyme dans le vin par électrophorèse capillaire haute performance

(OIV-OENO 385-2012)

1. Introduction

Le dosage du lysozyme résiduel dans des vins traités est effectué par électrophorèse capillaire haute performance (ECHP).

2. Domaine d'application

Cette méthode permet de détecter une addition du lysozyme dans le vin mais n'est pas apte à la détection ou la détermination du lysozyme en tant que composé allergénique. Cette méthode s'applique au dosage du lysozyme dans les vins blancs dans une gamme de concentration de 9 mg/L à 100 mg/L et par dilution au delà.

3. Principe

Les échantillons de vin sont directement injectés dans l'appareil d'électrophorèse capillaire après filtration et dilution si nécessaire. La quantification du lysozyme est effectuée par rapport à un étalon externe.

4. Réactifs

Lysozyme extrait de blanc d'œuf de poule [N°CAS 12650-88-3]
Acide phosphorique 85% [N°CAS 7664-38-2]
Hydroxy-Propyl-Méthyl-Cellulose (HPMC) [N°CAS 9004-65-3]Eau purifiée pour laboratoire, par exemple de qualité EN ISO 3696 (eau pour

utilisation en laboratoire de chimie analytique - spécification et méthode d'essai [ISO 3696 :1987]).

5. Matériel

Matériel courant de laboratoire
Appareil d'électrophorèse capillaire muni d'un détecteur spectrophotométrique UV

6. Préparation des échantillons

Le vin à analyser est dilué au quart dans de l'eau distillée pour l'analyse en électrophorèse capillaire de façon à se situer dans le domaine de linéarité de la méthode (teneur en lysozyme inférieure à 100 mg/L).

7. Conditions analytiques(données à titre d'exemple)

Capillaire : silice fondue (longueur 37 cm, diamètre 75 µm)
Tampon : Acide Phosphorique (75 mM) HPMC (0,1 %), pH 1,68
Temps d'Injection : 15 sec
Mode d'injection : procédé hydrostatique (pression 3447,38 Pa)
Température : 25°C
Voltage appliqué : 7 kV
Détection : UV 214 nm

8. Calcul

Une courbe d'étalonnage est établie à partir de solutions de lysozyme dans l'eau à 10, 20, 50, et 100 mg/L. Selon la méthode de l'étalonnage externe, la quantification du lysozyme est réalisée en mesurant la surface du pic de lysozyme dans le vin et la comparant à la concentration correspondante sur la courbe d'étalonnage.

9. Caractéristiques de la méthode

Linéarité de la réponse

L'ajout maximal de lysozyme autorisé dans les vins étant de 500 mg/L, une gamme étalon contenant de 5 à 500 mg/L de lysozyme en solution aqueuse a été préparée. Chaque solution a été analysée cinq fois.

Au-delà de 100 mg/L, la réponse n'est plus linéaire. Le domaine de linéarité de la méthode est compris entre 5 et 100 mg/L comme le montre la droite d'étalonnage de la figure 1.

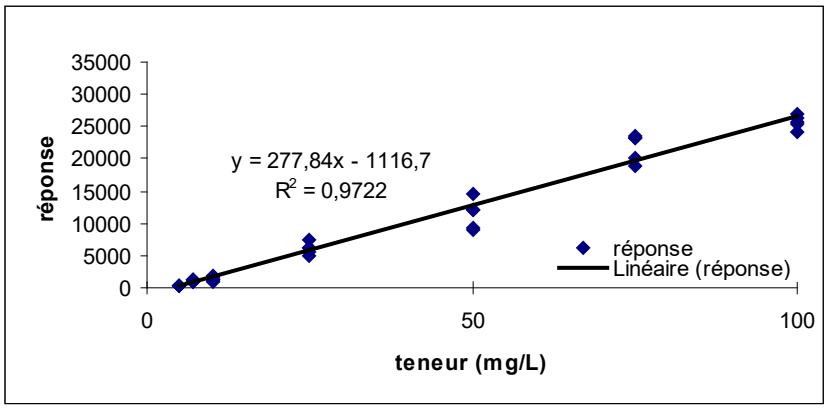


Figure 1 : Linéarité du dosage du lysozyme par ECHP

Répétabilité

La répétabilité du dosage du lysozyme dans les vins blancs a été déterminée à partir des résultats obtenus sur 20 échantillons de vins additionnés de lysozyme analysés 2 fois de suite de façon à être dans des conditions identiques. Les résultats sont donnés dans le tableau 1 :

Tableau 1 : Répétabilité du dosage du lysozyme par ECHP

	valeurs calculées
répétabilité	
écart-type en mg/L	**2,63**
CV en %	**1,4%**
limite r en mg/L	**7,35**
limite r en %	**4%**

Reproductibilité

La reproductibilité du dosage du lysozyme dans les vins blancs a été déterminée en analysant le même vin blanc additionné 8 fois de lysozyme à 200 mg/L, à différentes dates. Les résultats sont donnés dans le tableau 2.

Tableau 2 - Reproductibilité du dosage du lysozyme par ECHP

	valeurs calculées
reproductibilité	
écart-type en mg/L	**11,75**
CV en %	**5,8%**
limite R en mg/L	**32,90**
limite R en %	**16%**

Limites de détection et de quantification

Les limites de détection (LD) et de quantification (LQ) sont déterminées à partir du bruit de fond mesuré à proximité du pic du lysozyme correspondant au premier point d'étalonnage, à savoir 5 mg/L. Les résultats obtenus sont les suivants :

LD = 3 x bruit de fond (en mg/L) = 3 mg/L
LQ = 10 x bruit de fond (en mg/L) = 9 mg/L

Incertitude

L'incertitude a été évaluée à partir de l'ecart-type de reproductibilité intralaboratoire, elle est de 12%.

10. Bibliographie

S. Chauvet, C. Lagrèze, A. Domec, M-H Salagoïty, B. Médina : Dosage du lysozyme dans le vin par électrophorèse capillaire haute performance OIV FV 1274

ME. Barbeito, C Coria, C.Chiconofri : Influencia del filtrado de vinos para la determinacion de lisozima segun oeno 8/2007 OIV FV1306

Méthode OIV-MA-AS315-25 Méthode Type IV

Dosage du lysozyme dans le vin par chromatographie liquide à haute performance

(OIV-OENO 458/2014)

1. Introduction

Cette méthode décrit la procédure analytique pour le dosage du lysozyme dans les vins blancs et rouges. Pour les vins blancs, le dosage se réalise directement à partir de l'échantillon, tandis que pour les vins rouges, il est nécessaire de procéder à la dissociation de l'enzyme des macromolécules polyphénoliques, au moyen d'une alcalinisation brusque, en utilisant comme principe le caractère amphotère de la protéine.

2. Domaine d'application

Cette méthode permet la quantification du lysozyme (en mg de protéine·L^{-1}) présent dans les vins blancs et rouges, indépendamment de l'activité enzymatique. Il convient de préciser que cette méthode permet de détecter un ajout de lysozyme dans le vin mais que la limite de détection n'exclue aucune allergénicité associée à la présence de faibles doses de lysozyme.

3. Principe

L'analyse se réalise par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) avec un détecteur spectrofluorimétrique. La teneur inconnue dans l'échantillon de vin est calculée en fonction de l'aire du pic chromatographique, en utilisant la méthodologie de l'étalon externe.

4. Matériel et réactifs

4.1. Solvants et solutions de travail

4.1.1. Acétonitrile (CH_3CN) « qualité CLHP » (CAS nº 75-05-8)
4.1.2. Acide trifluoroacétique (TFA) (CAS nº 76-05-1)
4.1.3. Eau distillée « qualité CLHP » (CAS nº 7732-18-5)
4.1.4. Étalon de lysozyme (CAS nº 9001-63-2)
4.1.5. Acide tartrique (CAS nº 87-69-4)
4.1.6. Alcool éthylique (CAS nº 64-17-5)

4.1.7. Tartrate neutre de potassium (CAS nº 921-53-9)
4.1.8. Hydroxyde d'ammonium 28 % p/p (CAS nº 1336-21-6)
4.1.9. Filtres en acétate de cellulose de 0,65 µm

4.2. Matrice : acide tartrique 1 $g \cdot L^{-1}$, alcool éthylique 10 % v/v ajusté à pH 3,2 avec du tartrate de potassium neutre.

4.3. Éluants
A : CH_3CN 1 %, TFA 0,2 %, H_2O 98,8 %
B : CH_3CN 70 %, TFA 0,2 %, H_2O 29,8 %

4.4. Solution de référence
Solution de 250 $mg \cdot L^{-1}$ de lysozyme étalon dissous dans la matrice par agitation continue durant une heure. Peut être conservée en conditions réfrigérées 4 semaines au maximum.

4.5. Préparation des solutions de travail
Les solutions de travail sont obtenues par dilution de la solution de référence jusqu'à obtention des concentrations souhaitées avec la matrice. Ces solutions se préparent quotidiennement.

5. Appareillage

5.1. Appareil CLHP avec système de pompage prévu pour effectuer un gradient d'élution
5.2. Logement pour colonne thermostatée (four)
5.3. Détecteur spectrofluorimétrique
5.4. Boucle d'injection, 20 µL
5.5. Colonne polymérique à phase inverse avec des groupes fonctionnels phényle (diamètre des pores = 1 000 Å, limite d'exclusion = 1 000 000 Da), Tosoh Bioscience TSK-gel Phenyl 5PW RP 7,5 cm x 4,6 mm ID, à titre d'exemple
5.6. Pré-colonne dans le même matériau que la colonne, Tosoh Bioscience TSK-gel Phenyl 5PW RP Guardgel 1,5 cm x 3,2 mm ID, à titre d'exemple

6. Conditions opératoires (à titre d'exemple)

6.1. Débit d'éluant : 1 $mL.min^{-1}$
6.2. Température d'élution : 40 °C
6.3. Détection spectrofluorimétrique : λ ex = 276 nm ; λ em = 345 nm ; Gain = 4
6.4. Temps de rétention moyen du lysozyme : 7,9 minutes

Temps (min)	Phase mobile A (%)	Phase mobile B (%)
0	60	40
10,00	0	100
10,20	60	40
12,00	Controller	Arrêt

7. Préparation de l'échantillon

7.1 Vins blancs

Les échantillons de vin blanc sont filtrés avec des filtres en acétate de cellulose de 0,65 µm, et l'analyse chromatographique est effectuée a posteriori (en cas d'utilisation de filtres en nylon de 0,45 µm, le taux de récupération obtenu est moindre).

7.2 Vins rouges

Les échantillons de vin rouge (50 mL) sont portés à pH 11,5. Ils sont alcalinisés avec du NH_4OH (prendre en compte son volume pour le calcul final) et filtrés immédiatement (5 min) avec des filtres en acétate de cellulose de 0,65 µm puis injectés dans le dispositif de chromatographie liquide. En cas d'utilisation de filtres en nylon de 0,45 µm, le taux de récupération obtenu est moindre.

8. Préparation de l'échantillon de contrôle

L'échantillon subit un ajout de solution étalon de référence (4.4) et est préparé conformément au point 7. Le pourcentage de récupération est déterminé.

9. Expression des résultats

Le profil chromatographique de l'étalon de lysozyme a mis en évidence une résolution adéquate de l'analyte objet de l'étude avec les conditions chromatographiques stipulées (Fig. 1 et Fig. 4). L'analyse de l'échantillon sans lysozyme a permis d'observer le profil du vin sans présence d'interférences au niveau de la zone de détection de l'enzyme (Fig. 2 et Fig. 5).

Pour les vins blancs, la récupération de l'enzyme dépasse les 95 % (Fig. 3), tandis que la méthode suivie pour les vins rouges a mis en évidence une récupération qui varie entre 70 % et 95 % de l'enzyme, ce facteur étant fonction de la concentration en polyphénols présente dans l'échantillon de vin (Fig. 6). Le résultat est exprimé en milligrammes par litre ($mg \cdot L^{-1}$).



Fig. 1 Chromatogramme de l'étalon de lysozyme de 10 $mg \cdot L^{-1}$.



Fig. 2 Chromatogramme d'un vin blanc sans lysozyme.



Fig. 3 Chromatogramme d'un vin blanc avec 10 mg·L^{-1} de lysozyme.

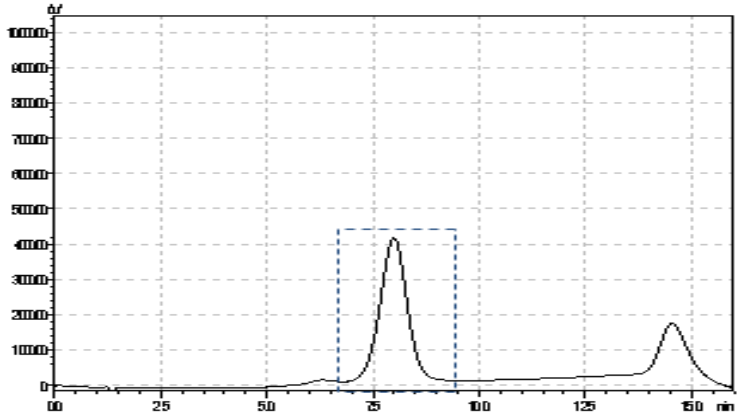


Fig. 4 Chromatogramme de l'étalon de lysozyme de 50 mg·L^{-1}.

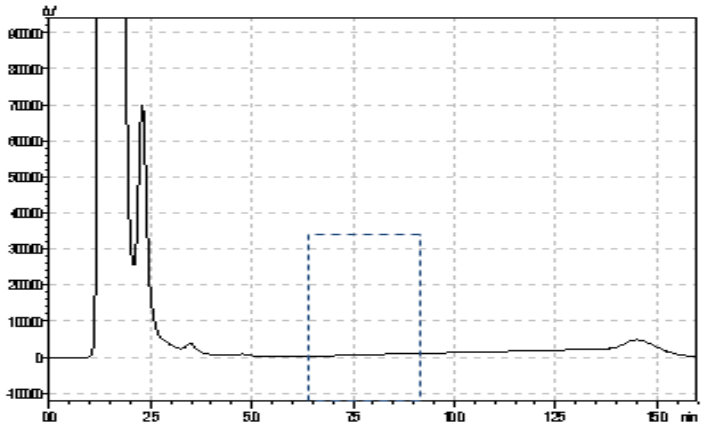


Fig. 5 Chromatogramme d'un vin rouge sans lysozyme.

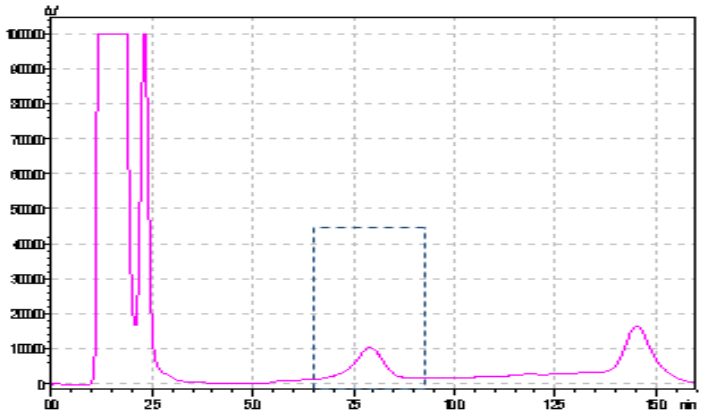


Fig. 6 Chromatogramme d'un vin rouge avec 50 $mg \cdot L^{-1}$ de lysozyme.

10. Procédure analytique pour les vins blancs

10.1 Paramètres de validation en interne

10.1.1 Répétabilité

La répétabilité de la méthode a été étudiée dans l'intervalle compris 2 $mg \cdot L^{-1}$ et 25 $mg \cdot L^{-1}$ pour les vins blancs. 17 échantillons de vin blanc ayant été enrichis avec différentes concentrations de lysozyme ont été analysés en double.

Les résultats obtenus pour la répétabilité à un niveau de probabilité 95 % sont les suivants :

Concentration mesurée en $mg \cdot L^{-1}$	**Sr $mg \cdot L^{-1}$**	**r (2,8xSr) $mg \cdot L^{-1}$**
2	0,25	0,7
5	0,30	0,82
10	0,42	1,1
15	0,61	1,7
25	0,40	1,12

La limite de répétabilité (r) moyenne est de 1,2 $mg \cdot L^{-1}$

10.1.2 Linéarité

Pour le calcul de la linéarité, 30 mesures des aires du pic de 6 concentrations différentes de lysozyme dans du vin blanc ont été réalisées, en l'occurrence blanc de vin sans lysozyme 2 $mg \cdot L^{-1}$, 5 $mg \cdot L^{-1}$, 10 $mg \cdot L^{1}$, 15 $mg \cdot L^{-1}$ et 25 $mg \cdot L^{-1}$, avec lesquelles ont été calculés l'ordonné à l'origine, la pente et le coefficient de corrélation.

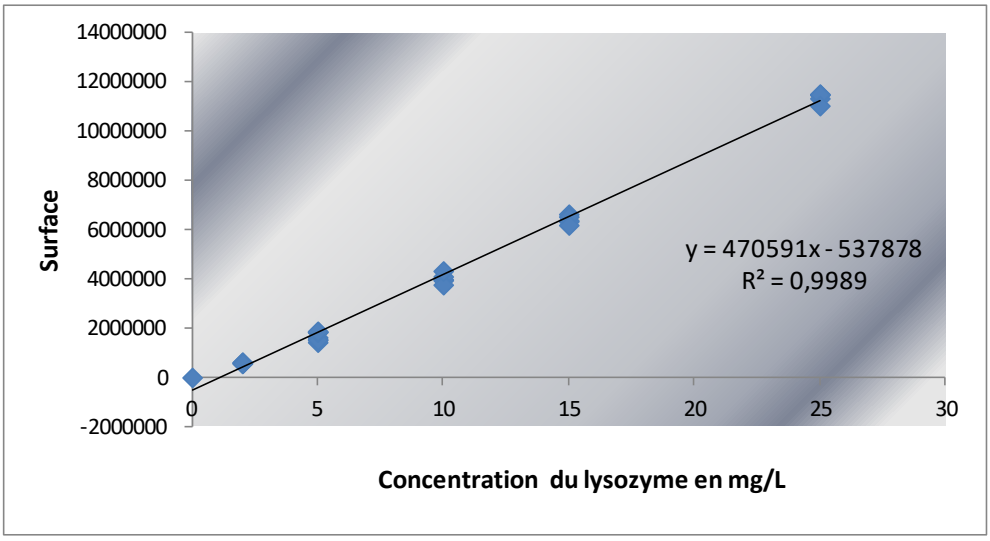


Fig. 7 Plage dynamique du lysozyme dans les vins blancs jusqu'à 25 mg·L^{-1}.

10.1.3 Limite de détection et limite de quantification

La limite de détection obtenue pour cette méthode a été calculée par l'intermédiaire d'une approche graphique issue du bruit de fond de l'enregistrement.
Les valeurs obtenues sont les suivantes :

LD : 0,49 mg·L^{-1}
LQ : 1,62 mg·L^{-1}

10.1.4 Reproductibilité intralaboratoire

La reproductibilité intralaboratoire de la méthode a été étudiée dans un intervalle compris entre 2 mg·L^{-1} à 25 mg·L^{-1} pour un échantillon de vin blanc durant une période de 30 jours. Il convient de signaler que du fait de l'instabilité de l'analyte, l'échantillon de vin est dosé avec une solution de lysozyme de référence (4.4) le jour même de son analyse. 16 mesures ont été réalisées à intervalles réguliers.

Les résultats sont les suivants :

Concentration mesurée en mg·L^{-1}	**SR mg·L^{-1}**	**R (2,8xSR) mg·L^{-1}**
2	0,19	0,53
5	0,36	1,0
10	0,48	1,3
15	0,64	1,8
25	0,93	2,6

La limite de reproductibilité (R) moyenne est de 1,45 mg·L^{-1}

11. Procédure analytique pour les vins rouges

11.1 Paramètres de validation en interne

11.1.1 Répétabilité

La répétabilité de la méthode a été étudiée dans l'intervalle compris entre 5 mg·L^{-1} et 25 mg·L^{-1} pour les vins rouges. 21 échantillons de vin rouge ayant été enrichis avec différentes concentrations de lysozyme ont été analysés en double.

Les résultats obtenus pour la répétabilité à un niveau de probabilité 95 % sont les suivants :

Concentration mesurée en mg·L^{-1}	**Sr mg·L^{-1}**	**r (2,8xSr) mg·L^{-1}**
5	0,38	1,06
10	0,64	1,79
15	0,59	1,65
25	0,30	0,8

La limite de répétabilité (r) moyenne est de 1,4 mg·L^{-1}

11.1.2 Linéarité

Pour le calcul de la linéarité, 25 mesures des aires du pic de 5 concentrations différentes de lysozyme dans du vin rouge ont été réalisées, en l'occurrence blanc

de vin sans lysozyme5 mg·L^{-1}, 10 mg·L^{-1}, 15 mg·L^{-1} et 25 mg·L^{-1}, avec lesquelles ont été calculés l'ordonné à l'origine, la pente et le coefficient de corrélation.

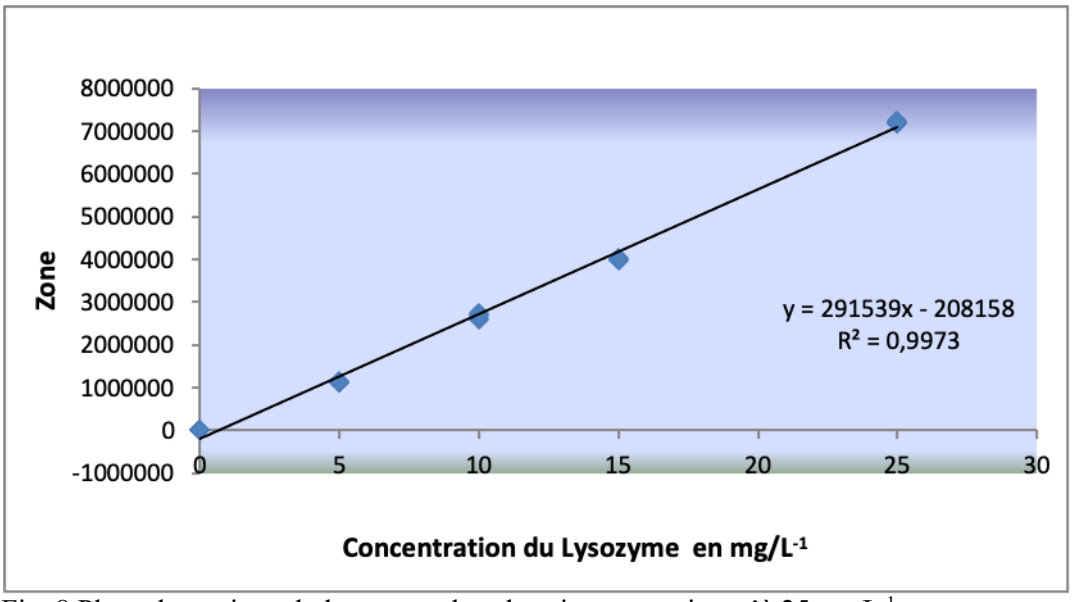


Fig. 8 Plage dynamique du lysozyme dans les vins rouges jusqu'à 25 mg·L^{-1}.

11.1.3 Limite de détection et limite de quantification

La limite de détection a été calculée par l'intermédiaire d'une approche graphique issue du bruit de fond de l'enregistrement.
Les valeurs obtenues sont les suivantes :

LD : 0,88 mg·L^{-1}
LQ : 2,90 mg·L^{-1}

11.1.4 Reproductibilité intralaboratoire

La reproductibilité intralaboratoire de la méthode a été étudiée dans un intervalle compris entre 5 mg·L^{-1} à 25 mg·L^{-1} pour un échantillon de vin rouge durant une période de 30 jours. Il convient de signaler que du fait de l'instabilité de l'analyte, l'échantillon de vin est dosé avec une solution de lysozyme de référence (4.4) le jour même de son analyse. 16 mesures ont été réalisées à intervalles réguliers.

Les résultats sont les suivants :

Concentration mesurée en mg·L^{-1}	**SR mg·L^{-1}**	**R (2,8xSR) mg·L^{-1}**
5	0,4	1,12
10	0,91	2,54
15	0,54	1,5
25	0,53	1,5

La limite de reproductibilité (R) moyenne est de 1,7 mg·L^{-1}

12. Bibliographie

1. Résolution OENO 8-2007, « Dosage du lysozyme dans le vin par chromatographie liquide à haute performance » (2007).

2. Résolution OENO 10-2005, « Guide pratique pour la validation, le contrôle qualité et l'estimation de l'incertitude d'une méthode d'analyse œnologique alternative ».

Méthode OIV-MA-AS315-26 Méthode Type IV

Méthode de dosage des amines biogènes dans les vins par chromatographie liquide à haute performance avec détecteur à barrette de photodiodes

(OIV-OENO 457-2014)

1. Domaine d'application

Cette méthode est applicable à l'analyse des amines biogènes dans les vins :

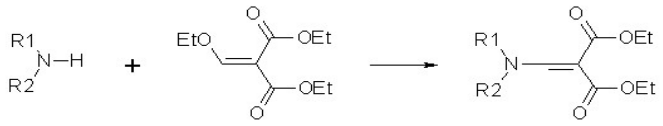
Amines	Domaine d'application
Histamine	0,500 à 20 mg/L
Méthylamine	0,250 à 20 mg/L
Ethylamine	0,450 à 20 mg/L
Tyramine	0,235 à 20 mg/L
Putrescine	0,098 à 20 mg/L
Cadavérine	0,480 à 20 mg/L
Phénéthylamine (ou Phényléthylamine)	0,096 à 20 mg/L
Isoamylamine	0,020 à 20 mg/L

2. Définition

Le mot biogène signifie « engendré par la vie ». L'appellation « amines biogènes » est donc donnée pour toutes les amines provenant du métabolisme de cellules vivantes, animales, végétales ou microbiennes. Les amines biogènes du vin sont majoritairement d'origine microbienne. Les principales sont l'histamine, la putrescine, la cadavérine, la tyramine.

3. Principe

Les amines biogènes étudiées ici sont des amines primaires, secondaires ou tertiaires, aliphatiques ou aromatiques. Or, seules les amines aromatiques absorbent en UV. En effet, la détection des molécules par UV nécessite la présence d'un chromophore dans la molécule, généralement une séquence de doubles liaisons conjuguées.
Pour pouvoir utiliser l'HPLC/DAD, il faut donc coupler un chromophore aux amines biogènes. Pour cela, on utilise le 2-(éthoxyméthylène)malonate de diéthyle (DEEMM) qui par une alkylation, aussi appelée dérivation, nous permet d'obtenir des amines biogènes visibles par le détecteur à barrette de diodes [1].



Réaction de dérivation

NB : Le rendement de la dérivation est calculé grâce à l'ajout d'un étalon interne (chlorydrate de 2,4,6–Triméthylphénéthylamine ou 2,4,6 TPA). La quantification de chacune des amines biogènes est réalisée contre une gamme étalon.

4. Réactifs et produits

4.1 Liste des réactifs

Références des produits :

	Produit	CAS	Pureté
4.1.1	Histamine	51–45–6	≥99%
4.1.2	Méthylamine	74–89–5	>99,5%
4.1.3	Ethylamine	557–66–	97%
4.1.4	Tyramine	60–19–5	≥98%
4.1.5	Putrescine (diaminobutane)	333–93–	≥98%
4.1.6	Cadavérine (diaminopentane)	1476–	≥99%
4.1.7	Phénéthylamine	64–04–0	≥99%
4.1.8	Isoamylamine	107-85-7	99%
4.1.9	Acide Borique	10043-	≥98.5%
4.1.10	Hydroxyde de Sodium	1310-73-	≥98%
4.1.11	Azide de Sodium	26628-	≥99.5%
4.1.12	Chlorhydrate de 2,4,6-Triméthylphénéthylamine	3167-10-0	97%
4.1.13	DEEMM (2-(éthoxyméthylène)malonate de diéthyle)	87-13-8	97%
4.1.14	Acide acétique glacial	64-19-7	≥99.7%
4.1.15	Méthanol HPLC	67-56-1	≥99.9%
4.1.16	Acétonitrile HPLC	75-05-8	≥99.93%
4.1.17	Acide chlorhydrique	7647-01-	≥37%
4.1.18	Eau Ultrapure (18 MΩ)		

5. Solution d'étalon interne

Préparation d'une solution à 2 g/L :

Peser 20 mg de Chlorydrate de 2,4,6–Triméthylphénéthylamine (4.1.12)
Dissoudre dans 10 mL d'HCl 0,1 M (5.1)

Conservation

La solution est conservée à température ambiante.

5.1. Solution HCL 0,1 M

Préparation d'une solution d'HCl à 0,1 M :

Prélever environ 900 ml d'eau ultrapure (4.1.18) à l'aide d'une éprouvette (6.13)
Verser environ 500 mL d'eau ultrapure (4.1.18) dans une fiole jaugée de 1 L (6.9)
Prélever 100 mL d'HCl 1 M (préparé à partir du produit commercial 4.1.17) à l'aide d'une éprouvette (6.11)
Verser les 100 mL d'HCl 1 M (4.1.17) dans la fiole jaugée (6.9)
Compléter à 1 L avec l'eau milli Q restante

Conservation

La solution est conservée à température ambiante.

5.2. Tampon borate 1M

Pour 100 mL de solution :

Peser 6,183 g d'acide borique (4.1.9)
Dissoudre dans un Bécher (6.2) en ajoutant 80 mL d'eau ultrapure (mesuré à l'éprouvette graduée)(6.11)
Ajuster le pH à 9 avec une solution de NaOH 4M (préparée à partir du produit commercial 4.1.10)

Ajuster à 100 mL dans une fiole jaugée (6.7)

Remarque : Afin d'obtenir une solution optimale, il convient que les cristaux d'acide borique se dissolvent au pH le plus bas possible. Pour ce faire ; l'ajout de NaOH devra être effectué par petites doses (10 gouttes de pipette pasteur)(6.30) sur une durée de 3 heures environ.

Conservation

La solution est conservée à température ambiante.

5.3. Phase mobile HPLC

Phase mobile A : tampon acétate 25 mM + 0,02% d'azide de sodium pH 5,8 :

Prélever 1,8 L d'eau ultrapure dans un Bécher de 2 L (6.3)
Ajouter 2.86 mL d'acide acétique glacial (4.1.14) (bien rincer le cône dans le bécher)
Puis 0,4 g d'azide de sodium (4.1.11)
Agiter avec l'agitateur magnétique (6.24)
Ajuster le pH à 5,80 avec NaOH à 4M à l'aide d'une pipette pasteur (6.30) (environ 6,5 mL)
Ajuster à 2000 mL dans une fiole jaugée 2000 mL (6.10)

Phase mobile B : Acétonitrile/Méthanol (80/20) :

Pour 2 L de phase mobile
Prélever 400 mL de méthanol (4.1.15) à l'aide d'une éprouvette graduée (6.12) et les transvaser dans un flacon de 2L (6.20) et ajouter dans le même flacon1600 mL d'acétonitrile (4.1.16) mesuré à l'aide d'une éprouvette graduée (6.14).

Conservation

Les solutions sont conservées à température ambiante.

5.4. Gamme étalon amines biogènes

Préparation des solutions A :

Solution mère A à 500 mg/L

Peser environ 50 mg (poids précisément connu) d'histamine (4.1.1), méthylamine (4.1.2), éthylamine (4.1.3), tyramine (4.1.4) et putrescine (4.1.5) et les dissoudre dans une même fiole de 100 mL (6.7) avec de l'HCl 0,1 M (5.1)

Solution fille A à 50 mg/L

Prélever 25 mL de la solution A à 500 mg/L et verser dans une fiole de 250 mL (6.8)
Compléter à 250 mL avec HCl 0,1 M (5.1)

Solution fille A à 40 mg/L

Prélever 50 mL d'HCl à 0,1 M (5.1) et verser dans une fiole de 250 mL (6.8)
Compléter à 250 mL avec la solution fille A à 50 mg/L

Préparation des solutions B

Solution mère B à 500 mg/L

Peser environ 50 mg (poids précisément connu) de cadavérine (4.1.6), phénéthylamine (4.1.7) et isoamylamine (4.1.8) et les dissoudre dans une même fiole de 100 mL (6.7) avec de l'HCl 0,1 M (5.1)

Solution fille B à 50 mg/L

Prélever 25 mL de la solution B à 500 mg/L et verser dans une fiole de 250 mL (6.8)
Compléter à 250 mL avec HCl 0,1 M (5.1)

Solution fille B à 10 mg/L

Prélever 50 mL de la solution fille B à 50 mg/L et verser dans une fiole de 250 mL (6.8)
Compléter à 250 mL avec HCl à 0,1 M (5.1)

Fusion des solutions A et B – Gamme étalon

Dans une fiole de 100 mL (6.7) ajouter 50 mL de la solution A à 40 mg/L à l'aide d'une fiole jaugée 50 mL (6.6)
Compléter à 100 mL avec la solution B à 10 mg/L afin d'obtenir la **solution à 20 (A) / 5 (B) mg/L**

Le tableau suivant explique comment préparer les points de concentration pour la gamme étalon :

Concentration de la solution initiale	Volume prélevé de solution initiale	Ajuster à 100 mL avec une solution	Concentration de la solution finale
20(A) / 5 (B)	50	50	10(A) / 2,5 (B)
10(A) / 2.5 (B)	50	50	5(A) / 1,25 (B)
5(A) / 1.25 (B)	20	80	1(A) / 0,25 (B)

De cette manière sont obtenues quatre concentrations pour les amines biogènes contenues dans la solution A (20, 10, 5 et 1 mg/L), et quatre concentrations pour les amines biogènes contenues dans la solution B (5, 2,5, 1,25 et 0,25 mg/L).

Conservation

Les solutions sont conservées à -20 °C.

6. Matériel et Appareillage

- 6.1 Béchers 25 mL
- 6.2 Béchers 250 mL
- 6.3 Béchers 2000 mL
- 6.4 Fioles jaugées 10 mL
- 6.5 Fioles jaugées 25 mL
- 6.6 Fioles jaugées 50 mL
- 6.7 Fioles jaugées 100 mL
- 6.8 Fioles jaugées 250 mL
- 6.9 Fioles jaugées 1000 mL
- 6.10 Fioles jaugées 2000 mL
- 6.11 Eprouvettes 100 mL
- 6.12 Eprouvettes 500 mL
- 6.13 Eprouvettes 1000 mL
- 6.14 Eprouvettes 2000 mL

- 6.15 Pipette automatique de 200 µL
- 6.16 Pipette automatique de 1 mL
- 6.17 Pipette automatique de 5 mL
- 6.18 Pipette automatique de 10 mL
- 6.19 Pointes pour pipette automatique de 1 mL, 5 mL et 10 mL
- 6.20 Flacons de 2 litres
- 6.21 tubes à hydrolyse Pyrex 10 mL à bouchon à vis
- 6.22 Flacons de 2 mL à vis adaptés au passeur d'échantillons
- 6.23 Balance pour des pesées de 0 à 205 g
- 6.24 Agitateur magnétique
- 6.25 Chromatographe en phase liquide Haute Performance (HPLC)
- 6.26 Logiciel d'acquisition des données
- 6.27 Détecteur DAD (barette de diodes ou UV)
- 6.28 Colonne de type octadécyle (par exemple HP® C_{18} - HL, 250 mm x 4,6 mm, 5 µm).
- 6.29 Bain sec à 70 °C
- 6.30 Pipette pasteur
- 6.31 Bain à ultra-sons
-

7. Échantillonnage (Préparation de l'échantillon)

Cette méthode ne nécessite pas d'échantillonnage particulier dans la mesure où 1 mL de vin à analyser est prélevé et directement déposé dans un tube à hydrolyse Pyrex de 10 mL à bouchon à vis (6.21) (voir mode opératoire).
Cependant, il est préconisé de réaliser la réaction de dérivation au DEEMM à réception de l'échantillon car la concentration en histamine peut diminuer dans le vin au cours du temps.

8. Mode opératoire

8.1. Prise d'essai

La manipulation doit impérativement s'effectuer sous hotte en raison de la toxicité de certains réactifs.

Si le tampon borate contient des cristaux, le faire chauffer à 50 °C tout en agitant (faiblement au départ, le temps que la solution se réchauffe).

Afin d'éviter tout risque d'adsorption sur les pointes de pipettes automatiques, il est conseillé d'utiliser la micropipette comme il suit :

- Pré-mouiller une fois le cône avec la solution à prélever

- Ajouter la solution dans le récipient sans rincer le cône avec le contenu du récipient sauf indication contraire

Bien agiter les solutions avant utilisation (en particulier le vin congelé)
Dans un tube à hydrolyse Pyrex 10 mL à bouchon à vis (6.21), introduire à l'aide de micropipettes adéquates :

- 1,75 mL de tampon borate (5.2)
- 750 µL de méthanol (4.1.15)
- 1 mL d'échantillon à dériver (pipette automatique de 1 mL) (6.16)
- 40 µL d'étalon interne (2, 4, 6 TPA à 2 g/L) (5.)
- 30 µL de DEEMM (4.1.13)

Fermer le tube (serrer bien fort afin d'éviter toute évaporation) et agiter manuellement.
Allumer le bain sec (6.29) à 70 °C.
Mettre le tube au bain à ultrasons (6.31) pendant 30 minutes (2 fois 15 minutes en agitant toutes les 5 minutes). Utiliser impérativement un portoir en plastique adapté au bain d'eau car la dérivation se fait mal lorsque l'on utilise un portoir métallique.
Chauffer le mélange réactionnel à 70 °C pendant 1h dans le bain sec (6.29) pour dégrader le DEEMM en excès.
Éteindre le bain sec.

Après retour à température ambiante, remplir les flacons de 2 mL à l'aide de pipette pasteur (6.30) (changer de pipette pasteur à chaque tube). Agiter les tubes manuellement avant de prélever.

8.2. Conditions opératoires

Les conditions opératoires ci-dessous sont données à titre d'exemple.

Phase mobile :

- A : tampon acétate 25 mM + 0,02 % d'azide de sodium pH 5,8 :
- B : Acétonitrile/Méthanol (80/20) :

Gradient d'élution suivant avec un débit de 0,9 mL/min :

Temps	% A	% B
0	90	10
5	90	10
10	83	17
35	60	40
43	28	72
48	18	82
52	0	100
57	0	100

Température de la colonne : 15 °C
Longueur d'onde de détection : 280 nm
Débit : 0,9 mL/min
Volume injecté : 50 µL
Durée d'analyse : 57 minutes

Identification des amines biogènes :
Les amines biogènes sont identifiées en fonction de leur temps de rétention. Pour cela, chacune d'elles a été analysée individuellement afin de déterminer son temps de rétention (Tr).

Amines		Tr moyen (min)
Histamine	HI	25,46
Méthylamine	ME	33,11
Ethylamine	ET	39,00
Tyramine	TY	41,50
Putrescine	PU	46,00
Cadavérine	CA	48,00
Phénéthylamine	PH	48,75
Isoamylamine	IS	50,25
Etalon Interne	2,4,6 TPA	54,75

9. Calculs (Résultats)

Les biais causés par l'incertitude sur le rendement de dérivation et sur le volume d'injection peuvent être corrigés par l'utilisation de l'étalon interne.
Une fois la valeur du pic corrigée, la concentration en amine biogène est calculée à partir de la valeur de la pente de la gamme étalon de l'amine biogène correspondante. Pour cela, pour chaque série d'analyse une gamme étalon est aussi dérivée puis injectée.

Les résultats sont exprimés en mg/L avec un chiffre significatif après la virgule.

10. Contrôle Qualité

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 sur lesquels des ajouts dosés ont été réalisés régulièrement dans les séries analytiques et en suivant les cartes de contrôle afférentes.

11. Caractéristiques de la méthode : paramètres de validation intralaboratoires

Les paramètres de validation ont été déterminés selon [4].

11.1. Linéarité

L'approche adoptée pour l'étude de la linéarité consiste à comparer les écarts-types résiduels à partir d'un modèle de régression linéaire et d'un modèle de régression polynomiale de degré 2.
L'étude a été conduite sur deux vins différents dopés avec des amines biogènes à des concentrations de 0, 1, 5 10 et 20 mg/L (solution A) et 0, 0,25, 1,25, 2,5 et 5 mg/L (solution B).

Synthèse des résultats des amines biogènes :

Amines Biogènes	S_{res} Linéaire	S'_{res} Ordre 2	DS^2	PG	F(5%)	Conclusion
Méthylamine	0,766	0,606	3,218	8,757	4,75	Linéaire
Ethylamine	0,371	0,371	0,140	1,014		Linéaire
Tyramine	1,065	1,065	1,135	1,000		Linéaire
Putrescine	0,524	0,523	0,286	1,043		Linéaire
Cadavérine	0,276	0,267	0,134	1,881		Linéaire
Phénéthylamine	0,251	0,248	0,082	1,328		Linéaire
Isaoamylamine	0,216	0,215	0,055	1,199		Linéaire
Histamine	0,591	0,589	0,316	1,084		Linéaire

11.2. Spécificité

Le principe de la mesure de la spécificité consiste à étudier la droite de régression $r = a + bv$ et vérifier que la pente b est équivalente à 1 (Tobs < Tcritique) et que l'ordonnée à l'origine a est équivalente à 0 (T'obs < Tcritique). Les hypothèses sont testées à l'aide d'un test de Student associé au risque d'erreur de 1 %.
La valeur de Tcritique, bilatérale [p−2; 1%] associé au risque d'erreur de 1 % pour 3 degré de liberté est de 4,541.

Synthèse des résultats des amines biogènes

Amines Biogènes	vin A		vin B		vin C		vin D	
	T_{obs}	T'_{obs}	T_{obs}	T'_{obs}	T_{obs}	T'_{obs}	T_{obs}	T'_{obs}
Méthylamine	4,482	2,321	2,933	0,013	1,563	0,007	5,199	2,864
Ethylamine	0,411	0,002	0,081	0,010	0,546	10,556	0,169	2,537
Tyramine	1,834	0,005	0,636	0,005	2,151	4,485	3,420	37,419
Putrescine	7,605	0,041	0,604	0,000	3,257	0,064	2,135	0,011
Cadavérine	5,499	0,033	1,719	1,314	10,929	0,049	8,466	0,026
Phénéthylamine	3,348	0,016	1,265	0,001	10,238	0,034	5,925	0,009
Isaoamylamine	12,980	0,016	2,297	0,004	12,996	0,020	11,121	0,000
Histamine	4,978	0,250	1,222	0,006	3,128	0,014	1,229	0,004

11.3. Répétabilité

Pour cette étude de répétabilité, sept vins rouges différents ont été sélectionnés, et trois répétitions différentes ont été réalisées pour chacun d'eux. Les concentrations ont été comprises entre 0,5 et 15 mg/L en fonction de l'amine biogène et du vin.

Amine biogène	S_r (mg/L)	r (mg/L)	Plage de validation (mg/L)
Méthylamine	0,335	0,937	3 - 16
Ethylamine	0,173	0,486	2 - 7
Tyramine	0,276	0,773	2 - 20
Putrescine	0,500	1,400	7 - 26
Cadavérine	0,025	0,069	0,2 - 0,8
Phénéthylamine	0,028	0,079	0,3 - 1,1
Isoamylamine	0,017	0,048	0,1 - 0,8
Histamine	0,108	0,303	5 - 16

11.4. Reproductibilité

Pour cette étude de reproductibilité, trois vins rouges différents ont été sélectionnés, et deux répétitions différentes ont été réalisées pour chacun d'eux.

Amine biogène	S_r (mg/L)	R (mg/L)	Plage de

			validation (mg/L)
Méthylamine	0,533	1,492	3 - 16
Ethylamine	0,884	2,475	2 - 7
Tyramine	0,341	0,955	2 - 20
Putrescine	0,419	1,172	7 - 26
Cadavérine	0,172	0,482	0,2 - 0,8
Phénéthylamine	0,053	0,150	0,3 - 1,1
Isoamylamine	0,056	0,157	0,1 - 0,8
Histamine	1,333	3,732	5 - 16

11.5. Limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ)

Selon une étude intralaboratoire utilisant la méthode des dilutions successives à partir d'une solution à 0,05 mg/L diluée successivement jusqu'à 0,01 mg/L :

Amines		**LD (mg/L)**	**LQ (mg/L)**
Histamine	HI	0,167	0,500
Méthylamine	ME	0,083	0,250
Ethylamine	ET	0,150	0,450
Tyramine	TY	0,078	0,235
Putrescine	PU	0,033	0,098
Cadavérine	CA	0,160	0,480
Phénéthylamine	PH	0,032	0,096
Isoamylamine	IS	0,007	0,020

12. Bibliographie

[1] Gomez-Alonzo S., Hermosin-Gutierrez I., Garcia-Romero E., 2007. Simultaneous HPLC analysis of biogenic amines, amino acids, and ammonium Ion as Aminoenone derivatives in wine and beer samples. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55, 608-613.

[2] Tricard C., Cazabeil J.-M., Salagoïti M.H. (1991) : dosage des amines biogènes dans les vins par HPLC, Analusis, 19, M53-M55.

[3] RECUEIL DES MÉTHODES INTERNATIONALES D'ANALYSES – OIV, Amines biogènes par HPLC, Méthode OIV-MA-AS315-18, Analyse des amines biogènes des moûts et des vins par HPLC (Résolution OIV-Oeno 346-2009).

[4] « Guide pratique pour la validation, le contrôle qualité et l'estimation de l'incertitude d'une méthode d'analyse œnologique alternative ». Résolution Oeno 10/2005. OIV. Octobre 2005. www.oiv.int

Méthode OIV-MA-AS315-27 **Méthode Type IV**[2]

Analyse des composes volatils des vins par chromatographie en phase gazeuse

OIV-OENO 553/2016 ;
OIV-OENO 606/2018

1 - Portée

Cette méthode est applicable à l'analyse des composés volatils des vins contenant moins de 20 g/L de sucre.
Pour les vins contenant plus de 20 g/L de sucre et les mistelles, une distillation préalable (identique à celle pratiquée pour l'obtention du TAV) est nécessaire, toutefois la distillation entraîne une partie parfois importante des composés.

2 - Champ d'application

La présente méthode peut être appliquée pour la quantification des éléments suivants (liste non exhaustive):

- Ethanal ;
- Acétate d'éthyle ;
- Méthanol ;
- Butan-2-ol ;
- Propan-1-ol ;
- 2-Méthylpropan-1-ol ;
- Acétate d'isoamyle ;

[2] Type II pour l'acétate d'éthyle, le propanol-1, le 2-méthylpropan-1-ol, le butan-1-ol, le 2-méthylbutan-1-ol, le 3-méthylbutan-1-ol, l'acétoïne, le lactate d'éthyle, l'hexan-1-ol, le 3-éthoxypropanol, l'octanoate d'éthyle, la butyrolactone, le succinate de diéthyle et le 2-phényl éthanol.
Type III pour le méthanol.
Type IV pour les autres produits (éthanal, butan-2-ol, butane-2,3-diol (levo + meso), propane-1,2-diol, diéthyl malate).

- Butan-1-ol;
- 2-Méthylbutan-1-ol ;
- 3-Méthylbutan-1-ol ;
- Pentan-1-ol ;
- Acétoïne ;
- Lactate d'éthyle ;
- Hexan-1-ol ;
- 3-Ethoxypropanol ;
- Octanoate d'éthyle ;
- Furfuraldéhyde ;
- Butane-2,3-diol (2R,3R) ;
- Butane-2,3-diol (2R,3S) ;
- Propane-1,2-diol ;
- Butyrolactone ;
- Succinate de diéthyle ;
- Acide hexanoïque (semi-quantitatif) ;
- 2-Phényléthanol ;
- Malate de diéthyle ;
- Acide octanoïque (semi-quantitatif) ;
- Acide décanoïque (semi-quantitatif).

Note : le diacétyle et l'acide acétique ne peuvent pas être quantifiés par cette méthode mais ils apparaissent dans les chromatogrammes.

3 - Principe

Les composés volatils sont quantifiés par chromatographie en phase gazeuse après injection directe de l'échantillon, additionné du standard interne, dans une colonne capillaire revêtue d'une phase polaire greffée et détection par ionisation de flamme**.**

4 - Réactifs et produits

Les quantités et mode de préparation sont données à titre d'exemple et peuvent être adaptées en tant que de besoin aux types de vins

4.1 - Eau déminéralisée - (par exemple ISO 3696 type II ou résistivité ≥ 18 MΩ.cm) ;

4.2 - Ethanol [CAS 64-17-5], pureté ≥ 96% ;

4.3 - Hydrogène de haute pureté pour la GC (par exemple $H_2O \leq 4$ ppm; $O_2 \leq 2$ ppm; $C_nH_m \leq 0,5$ ppm ; $N_2 \leq 4$ppm) ;

4.4 - Hélium de haute pureté pour la GC (par exemple $H_2O \leq 3$ ppm ; $O_2 \leq 2$ ppm ; $C_nH_m \leq 1$ ppm ; $N_2 \leq 5$ ppm) ;
4.5 - Air comprimé de haute pureté pour la GC ;
4.6 - Ethanal [CAS 75-07-0], pureté ≥ 99% ;
4.7 - Acétate d'éthyle [CAS 141-78-6], pureté ≥ 99,5% ;
4.8 - Méthanol [CAS 67-56-1] pureté ≥ 99,8% ;
4.9 - Diacétyle [CAS 431-03-08], pureté ≥ 99% ;
4.10 - Butan-2-ol [CAS 15892-23-6], pureté ≥ 99,5% ;
4.11 - Propan-1-ol [CAS 71-23-8], pureté ≥ 99,5% ;
4.12 - 2-Méthylpropan-1-ol [CAS 78-83-1], pureté ≥ 99,5% ;
4.13 - Acétate d'isoamyle [CAS 123-92-2], pureté ≥ 97% ;
4.14 - Butan-1-ol [CAS 71-36-3], pureté 99,5% ;
4.15 - 4-Méthylpentan-2-ol (standard interne) [CAS 108-11-2], pureté ≥ 99% ;
4.16 - 2-Méthylbutan-1-ol [CAS 137-32-6], pureté ≥ 99% ;
4.17 - 3-Méthylbutan-1-ol [CAS 125-51-3], pureté ≥ 99.5% ;
4.18 - Pentan-1-ol [CAS 71-41-0], pureté ≥ 99% ;
4.19 - Acétoïne [CAS 513-86-0], pureté ≥ 96% ;
4.20 - Lactate d'éthyle [CAS 687-47-8], pureté ≥ 98% ;
4.21 - Hexan-1-ol [CAS 111-27-3], pureté ≥ 99.0% ;
4.22 - 3-Ethoxypropanol [CAS 111-35-3], pureté ≥ 97% ;
4.23 - Octanoate d'éthyle [CAS 106-32-1], pureté ≥ 99% ;
4.24 - Furfuraldéhyde [CAS 98-01-1], pureté ≥ 99.0% ;
4.25 - Acide acétique [CAS 64-19-7], pureté ≥ 99% ;
4.26 - Butane-2,3-diol (2R,3R) et (2R,3S) [CAS 513-85-9], pureté ≥ 98% ;
4.27 - Propane-1,2-diol [CAS 57-556], pureté ≥ 99,5% ;
4.28 - Butyrolactone [CAS 96-48-0], pureté ≥ 99% ;
4.29 - Succinate de diéthyle [CAS 123-25-1], pureté 99% ;
4.30 - Acide hexanoïque [CAS 142-62-1], pureté ≥ 99,5% ;
4.31 - 2-Phényléthanol [CAS 60-12-8], pureté 99% ;
4.32 - Malate de diéthyle [CAS 7554-12-3], pureté ≥ 97% ;
4.33 - Acide octanoïque [CAS 124-07-2], pureté ≥ 99,5% ;
4.34 - Acide décanoïque [CAS 334-48-5], pureté ≥ 99,5%.
Note : le diacétyle et l'acide acétique ne peuvent pas être quantifiée par cette méthode mais ils apparaissent dans les chromatogrammes."

<u>Préparation des solutions réactives</u> (les quantités sont données à titre d'exemple et peuvent être adaptées en tant que de besoin aux types de matrices à analyser)

4.35 - Mélange hydro alcoolique à 10 % réaliser avec l'éthanol (4.2) et l'eau (4.1).
4.36 - Solution d'étalon interne : verser 1 mL de 4-méthylpentan-2-ol (4.15) dans une fiole de 100 mL (5.2). Compléter au trait de jauge avec de l'éthanol (4.2).

Répartir dans des flacons sur lesquels est notée la date de fabrication. Conserver au réfrigérateur.

4.37 - Vin de référence interne ou externe (par exemple un MRC (matériau de référence certifié) de vin ou un vin utilisé comme matériau de référence provenant d'un programme d'intercomparaison entre laboratoires).

4.38 - Solution mère d'étalonnage

Les composés sont pesés individuellement à ± 1 mg (pesées nominales, voir tableau ci-dessous) à l'aide d'une balance de précision (5.4). Afin d'éviter les pertes par évaporation, ajouter rapidement un peu d'éthanol (4.2). Agiter, verser dans une fiole de 1L (5.3). Rincer avec de l'éthanol. Ajouter 2,5 mL de 4-méthylpentan-2-ol (4.15). Compléter avec de l'éthanol (4.2) qsp 1L et homogénéiser. Répartir dans des flacons et stocker au congélateur. Noter les poids exacts.

composé	**pesée nominale (en mg)**	**concentration finale dans le mélange étalon fille d'étalonnage 4.39 (mg/L)**	**composé**	**pesée nominale (en mg)**	**concentration finale dans le mélange étalon fille d'étalonnage 4.39 (mg/L)**
éthanal (4.6)	500	50	hexan-1-ol (4.21)	300	30
acétate d'éthyle (4.7)	1500	150	3-éthoxypropanol (4.22)	160	16
méthanol (4.8)	650	65	furfuraldéhyde (4.24)	50	5
diacétyle (4.9)	50	5	octanoate d'éthyle (4.23)	120	12
butan-2-ol (4.10)	160	16	acide acétique (4.25)	5000	500
propan-1-ol (4.11)	350	35	butane-2,3-diol (4.26)	4000	400
2-méthylpropan-1-ol (4.12)	240	24	propane-1,2-diol (4.27)	1000	100
acétate d'isoamyle (4.13)	250	25	butyrolactone (4.28)	50	5
butan-1-ol (4.14)	160	16	succinate de diéthyle (4.29)	500	50
2-méthylbutan-1-ol (4.16)	160	16	acide hexanoïque (4.30)	250	25
3-méthylbutan-1-ol (4.17)	1000	100	2-phényléthanol (4.31)	500	50

pentan-1-ol (4.18)	160	16	malate de diéthyle (4.32)	1000	100
acétoïne (4.19)	250	25	acide octanoïque (4.33)	500	50
lactate d'éthyle (4.20)	1500	150	acide décanoïque (4.34)	750	75

4.39 – Solution fille d'étalonnage
Juste avant utilisation, diluer dix fois la solution mère d'étalonnage (4.38).

5 - Appareillage
5.1 - Fioles jaugées (classe A) de 20 mL ;
5.2 - Fioles jaugées (classe A) de 100 mL ;
5.3 - Fioles jaugées (classe A) de 1 L ;
5.4 - Balance de précision permettant des pesées à ± 1mg;
5.5 - Chromatographe en phase gazeuse équipé de
Injecteur "split-splitless" ;
et éventuellement d'un passeur pour injection automatique ;
Détecteur : ionisation de flamme (FID) ;
5.6 - Colonne capillaire en silice fondue :
- phase polaire de type Carbowax 20M greffée,
- longueur 50 m,
- diamètre interne de 0,32 mm,

épaisseur du film de 0,45 µm.

Note : d'autres systèmes peuvent être utilisés à condition qu'ils permettent de séparer de manière satisfaisante les différents composés.

6 - Préparation des échantillons
Les échantillons de vins effervescents sont préalablement dégazés (par exemple en prélevant l'échantillon une première fois à l'aide d'une pipette automatique et en récupérant dans un tube.
Les vins contenant plus de 20 g/L de sucre et les mistelles sont distillés avant préparation.
Introduire l'échantillon dans une fiole de 20 mL (5.1). Ajouter 0,5 mL de la solution de standard interne (4.36) et compléter au trait de jauge avec le vin.

7 - Mode opératoire

Analyser à l'aide du chromatographe en phase gazeuse (5.5) équipé de la colonne capillaire (5.6).

Conditions analytiques données à titre d'exemple

Gaz vecteur colonne (4.4) : $P_{hélium}$ = 90 kPa ;
Note : un autre gaz vecteur comme l'hydrogène peut être utilisé, mais il vaut mieux éviter l'azote ;
Débit fuite septum : 2,5 mL/min ;
Débit fuite colonne : 40 mL/min ;
Injection en mode split ;
Volume injecté : 1 µL ;
Température de l'injecteur : 200 °C ;
Détecteur : FID (ionisation de flamme)
température détecteur à 250 °C
flamme : $P_{hydrogène\ (4.3)}$ = 50 kPa et $P_{air\ (4.5)}$ = 130 kPa.
Programmation de température :
. temp. 1 = 32 °C à 2.5 °C/min, jusqu'à 80 °C - t_1 = 0 min
. temp. 2 = 80 °C à 4 °C/min, jusqu'à 170 °C - t_2 = 20 min
. temp. 3 = 170 °C à 10 °C/min, jusqu'à 220 °C - t_3 = 20 min

Etalonnage

Injecter la solution de calibration fille (4.39) avant chaque série d'analyses.
Calcul des facteurs de réponse :

$RF_i = (surface_i \times Cc_{IS}) / (Cc_i \times surface_{IS})$
Cc_i = concentration du composant de la solution de calibration
$Surface_i$ = surface du composant de la solution de calibration
Cc_{IS} = concentration du standard interne de la solution étalon
$Surface_{IS}$ = surface du standard interne de la solution étalon

Il est également possible d'utiliser une courbe d'étalonnage.

A titre d'exemple, des chromatogrammes d'une solution étalon et d'un vin sont donnés dans les Annexes

8 - Calculs

Dans le cas de l'utilisation du facteur de réponse :
calcul des concentrations : $Cci = (surface_i \times Cc_{IS}) / (RFi \times surface_{is})$.

9 - Fidélité
Voir annexe C.

10 - Assurance et maîtrise de la qualité
Le raccordement aux étalons internationaux se fait par la masse, le volume et la température
Des mélanges synthétiques ou des échantillons provenant, par exemple, de circuit d'aptitude sont utilisés comme contrôle qualité interne. Des cartes de contrôle peuvent être tracées.

11 - Résultats
Les concentrations sont exprimées en mg/L avec les chiffres significatifs indiqués ci-dessous.

Paramètres analytiques	chiffre significatif après la virgule	Paramètres analytiques	chiffre significatif après la virgule
Ethanal	0	Lactate d'éthyle	0
Acétate d'éthyle	0	Hexan-1-ol	1
Méthanol	0	3-Ethoxypropanol	0
Butan-2-ol	1	Octanoate d'éthyle	0
Propan-1-ol	0	Furfuraldéhyde	1
2-Méthylpropan-1-ol	0	Butane-2,3-diol (2R.3R)	0
Acétate d'isoamyle	1	Butane-2,3-diol (méso)	0
Butan-1-ol	1	Propane-1,2-diol	0
2-Méthylbutan-1-ol	0	Butyrolactone	0
3-Méthylbutan-1-ol	0	Succinate de diéthyle	0
Pentan-1-ol	1	2-Phényléthanol	0
Acétoïne	0	Malate de diéthyle	0

Annexe A

Bibliographie

📖 BERTRAND A., GUEDES DE PINHO P. et ANOCIBAR BELOQUI A. (1994) : Les constituants majoritaires du vin, FV 971, OIV, 15 pages.

Annexe B

Exemple de chromatogrammes

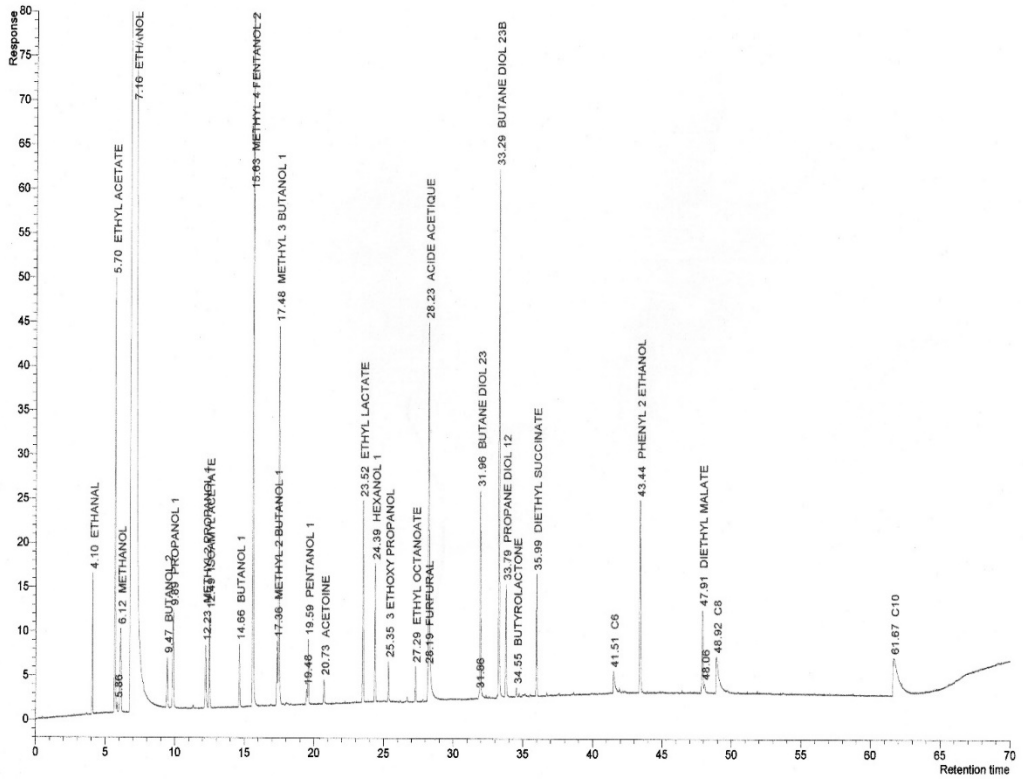


Figure 1 : chromatogramme d'une solution étalon de composés volatils

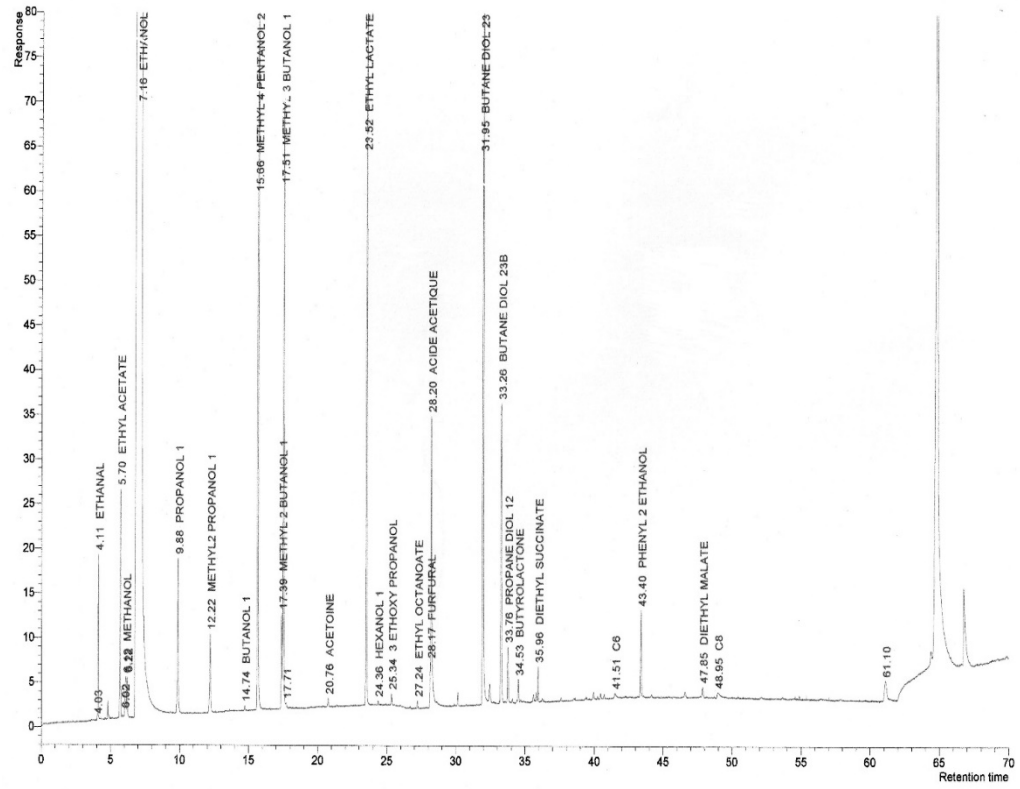


Figure 2 : chromatogramme des composés volatils d'un vin blanc (sucre < 15g/L).

Annexe C

C1 – Organisation de l'étude - Echantillons

Cette étude a été conduite par le Comité Interprofessionnel du Vin de Champagne à Epernay. Une pré-validation a été réalisée en octobre/décembre 2015, et l'analyse inter laboratoire proprement dite en mars/avril 2016.
L'essai a porté sur 11 échantillons : deux vins blancs identifiés B et E, deux vins rouges identifiés C et F et un vin rosé identifié A (répliqués en double aveugle) + un des échantillons surchargé en butan-2-ol, butan-1-ol, acétoïne, hexan-1-ol et diéthyl malate (identifié D).

C2 - Fidélité

Treize laboratoires ont participé à l'étude inter laboratoire:
Autoridade de Segurança Alimentar e Económica, Lisbonne, Portugal ;
Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin, Allemagne ;
Bureau National Interprofessionnel du Cognac, Cognac, France ;
Comité Interprofessionnel du vin de Champagne, Epernay, France ;
Czech Agriculture and Food Inspection Authority, Brno, République Tchèque ;
Instituto dos Vinhos do Douro e do Porto, Porto, Portugal ;
Laboratoire DUBERNET, Montredon Corbières, France ;
Laboratorio Arbitral Agroalimentario, Madrid, Espagne ;
Landesuntersuchungsamt, Mainz, Allemagne ;
Miguel Torres S.A.- Finca, Barcelone, Espagne ;
Service Commun des Laboratoires Bordeaux-Pessac (SCL MINEFI), Pessac, France ;
Service Commun des Laboratoires Montpellier (SCL MINEFI), Montpellier, France ;
Union Nationale de Groupements des Distillateurs d'alcool (UNGDA), Malakoff, France ;

Les résultats ont été exploités selon le protocole OIV (Etude collaborative OIV-MA-AS1-07:R2000)).

L'ISO 5725-2 §7.5, recommande de rechercher une relation fonctionnelle entre les valeurs de fidélité et la teneur qui est traduite par les graphiques se trouvant sous les tableaux de données de chaque produit (sauf le butanol-2-ol).

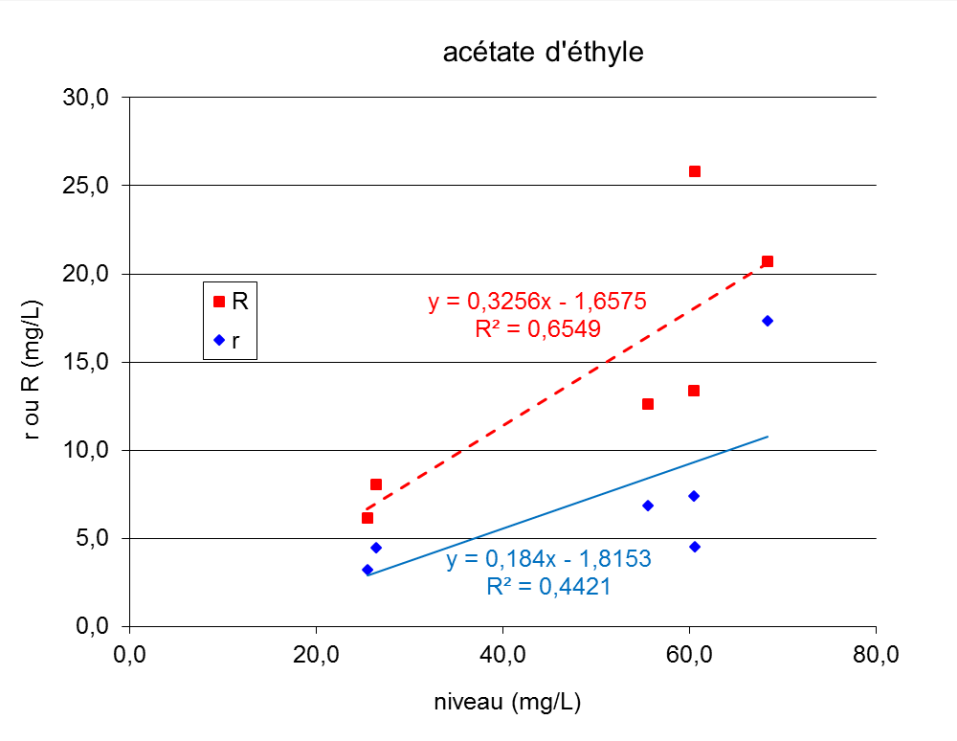
C3 – Tableaux de résultats

composé	r	R
acétate d'éthyle	0,18x – 1,8	0,33x – 1,7
méthanol	0,22x – 4,3	0,28x – 3,2
propan-1-ol	4 mg/l	7 mg/L
2-méthylpropan-1-ol	0,20x – 1,4	0,36x – 0,7
butan-1-ol	0,07x + 0,2	0,14x + 0,3
2-méthylbutan-1-ol	0,23x – 2,7	0,40x – 5,0
3-méthylbutan-1-ol	0,35x – 35,7	0,45x – 41,8
acétoïne	0,14x + 1,2	0,33x + 2,1
éthyl lactate	0,23x – 1,6	0,29x + 4,2
hexanol	0,07x + 0,3	0,10x + 0,8
3-éthoxypropanol	0,59x – 0,4	0,46x + 0,4
octanoate d'éthyle	0,5 mg/l	0,7 mg/l
butyrolactone	0,25x + 0,8	0,20x + 4,1
succinate de diéthyle	0,31x + 0,8	0,55x + 0,4
2-phényléthanol	0,24x + 0,3	0,50x – 2,6

où x est la concentration mesurée

Acétate d'éthyle - Fidélité
répétabilité et reproductibilité

	vin A	vin B	vin C	vin D	vin E	vin F
Méthode	ISO 5725-2	ISO 5725-2	ISO 5725-2	ISO 5725-2	ISO 5725-2	ISO 5725-2
Nombre de laboratoires ayant répondu	13	13	13	13	13	13
Nombre de laboratoires ayant donné une réponse quantitative	13	13	13	13	13	13
Nombre de laboratoires après élimination des valeurs aberrantes	12	12	12	13	12	13
Nombre de mesures sans valeurs aberrantes	42	42	42	23	42	46
Moyenne en mg/L	26,4	60,5	55,5	60,6	25,5	68,4
Ecart type de répétabilité Sr	1,6	2,6	2,4	1,4	1,1	6,0
RSDr %	5,9	4,2	4,3	2,4	4,3	8,8
Limite de répétabilité r	4,5	7,4	6,9	4,5	3,2	17,3
Limite relative de répétabilité r%	16,9%	12,2%	12,3%	7,4%	12,5%	25,3%
Ecart type de reproductibilité SR	2,8	4,7	4,4	8,8	2,2	7,3
RSDR %	10,7	7,7	8,0	14,5	8,5	10,6
Limite de reproductibilité R	8,1	13,4	12,6	25,8	6,2	20,7
Limite relative de reproductibilité R%	30,5%	22,1%	22,7%	42,6%	24,2%	30,3%
HORRAT R	1,1	0,9	0,9	1,7	0,9	1,2

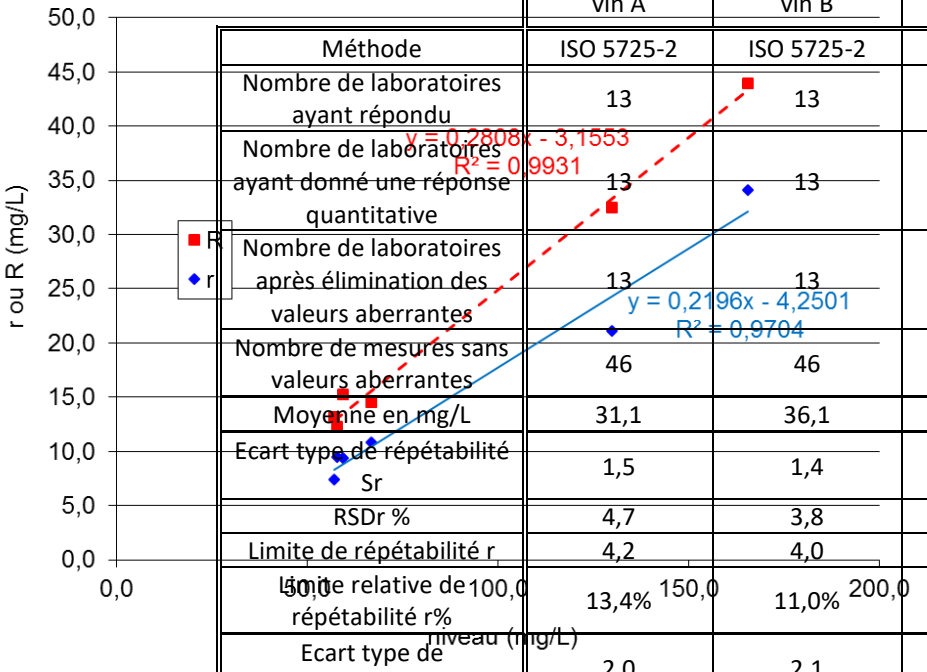

acétate d'éthyle
30,0
25,0
20,0
15,0
10,0
5,0
0,0
r ou R (mg/L)
R
r
y = 0,3256x - 1,6575
R² = 0,6549
y = 0,184x - 1,8153
R² = 0,4421
0,0
20,0
40,0
60,0
80,0
niveau (mg/L)

Méthanol - Fidélité
répétabilité et reproductibilité

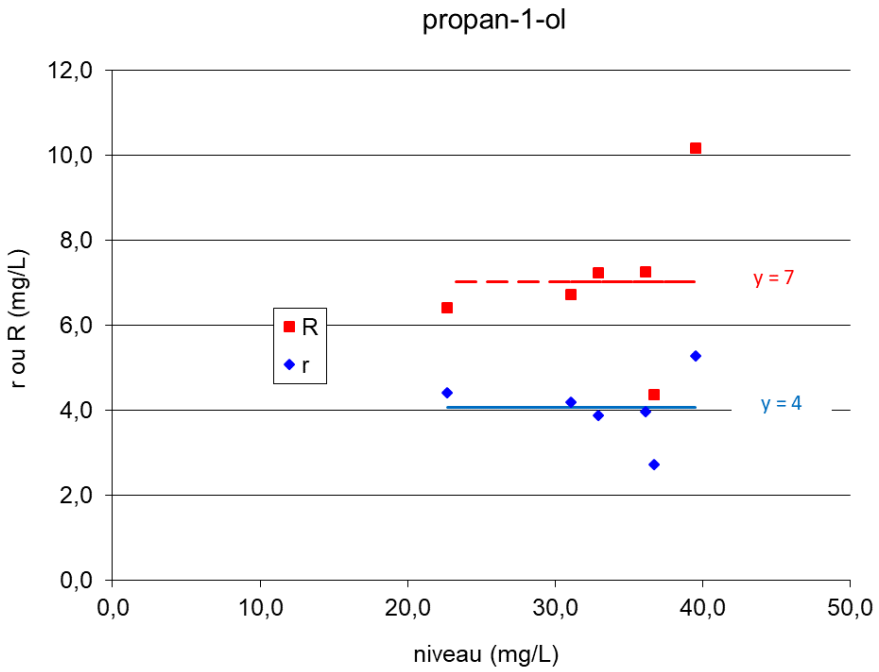
	vin A	vin B	vin C	vin D	vin E	vin F
Méthode	ISO 5725-2	ISO 5725-2	ISO 5725-2	ISO 5725-2	ISO 5725-2	ISO 5725-2
Nombre de laboratoires ayant répondu	13	13	13	13	13	13
Nombre de laboratoires ayant donné une réponse quantitative	13	13	13	13	13	13
Nombre de laboratoires après élimination des valeurs aberrantes	13	13	13	13	13	13
Nombre de mesures sans valeurs aberrantes	46	46	46	23	46	46
Moyenne en mg/L	66,8	57,2	129,8	57,8	59,4	165,6
Ecart type de répétabilité Sr	3,8	2,6	7,4	3,0	3,3	11,9
RSDr %	5,6	4,5	5,7	5,2	5,5	7,2
Limite de répétabilité r	10,8	7,4	21,2	9,5	9,4	34,1
Limite relative de répétabilité r%	16,2%	12,9%	16,3%	16,3%	15,8%	20,6%
Ecart type de reproductibilité SR	5,1	4,6	11,4	4,2	5,4	15,4
RSDR %	7,6	8,1	8,8	7,3	9,0	9,3
Limite de reproductibilité R	14,5	13,2	32,5	12,3	15,3	43,9
Limite relative de reproductibilité R%	21,7%	23,1%	25,0%	21,3%	25,7%	26,5%
HORRAT R	0,9	0,9	1,1	0,8	1,0	1,3

Propan-1-ol - Fidélité
répétabilité et reproductibilité

méthanol



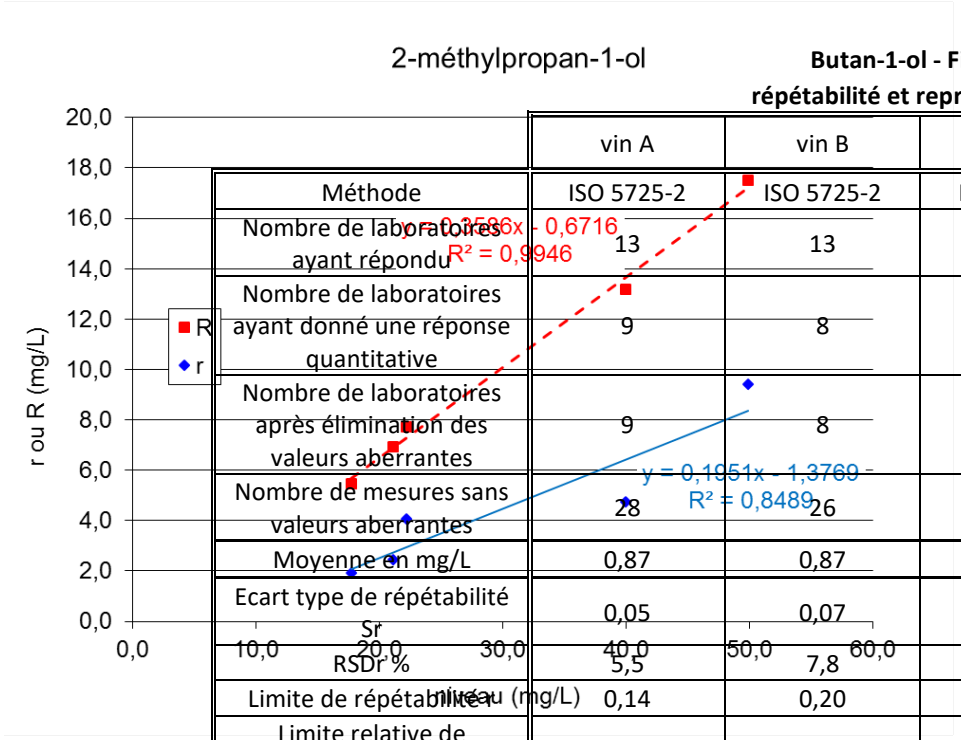
	vin A	vin B	vin C	vin D	vin E	vin F
Méthode	ISO 5725-2	ISO 5725-2	ISO 5725-2	ISO 5725-2	ISO 5725-2	ISO 5725-2
Nombre de laboratoires ayant répondu	13	13	13	13	13	13
Nombre de laboratoires ayant donné une réponse quantitative	13	13	13	13	13	13
Nombre de laboratoires après élimination des valeurs aberrantes	13	13	13	13	13	13
Nombre de mesures sans valeurs aberrantes	46	46	46	23	46	46
Moyenne en mg/L	31,1	36,1	39,5	36,7	32,9	22,7
Ecart type de répétabilité Sr	1,5	1,4	1,8	0,8	1,4	1,5
RSDr %	4,7	3,8	4,6	2,4	4,1	6,8
Limite de répétabilité r	4,2	4,0	5,3	2,7	3,9	4,4
Limite relative de répétabilité r%	13,4%	11,0%	13,4%	7,4%	11,8%	19,4%
Ecart type de reproductibilité SR	2,0	2,1	3,0	1,5	2,1	1,9
RSDR %	6,3	5,9	7,5	4,1	6,4	8,3
Limite de reproductibilité R	6,7	7,3	10,2	4,4	7,2	6,4
Limite relative de reproductibilité R%	21,6%	20,1%	25,7%	11,9%	22,0%	28,3%
HORRAT R	0,7	0,6	0,8	0,4	0,7	0,8


propan-1-ol
12,0
10,0
8,0
6,0
4,0
2,0
0,0
r ou R (mg/L)
R
r
y = 7
y = 4
0,0
10,0
20,0
30,0
40,0
50,0
niveau (mg/L)

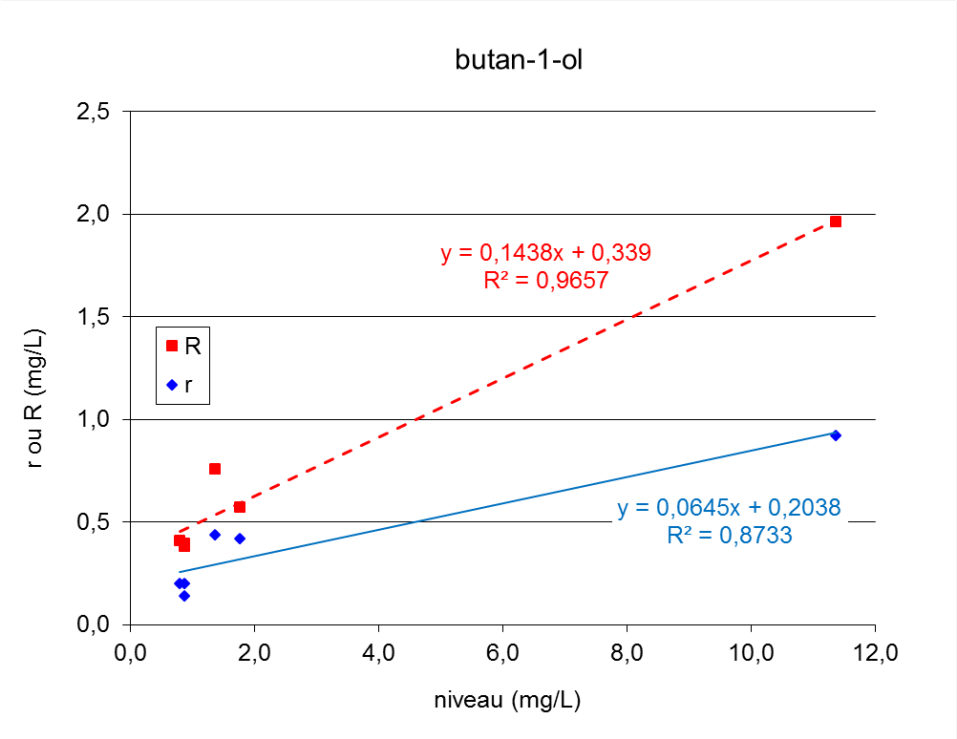
2-méthylpropan-1-ol - Fidélité
répétabilité et reproductibilité

	vin A	vin B	vin C	vin D	vin E	vin F
Méthode	ISO 5725-2	ISO 5725-2	ISO 5725-2	ISO 5725-2	ISO 5725-2	ISO 5725-2
Nombre de laboratoires ayant répondu	13	13	13	13	13	13
Nombre de laboratoires ayant donné une réponse quantitative	13	13	13	13	13	13
Nombre de laboratoires après élimination des valeurs aberrantes	13	13	13	12	13	13
Nombre de mesures sans valeurs aberrantes	46	46	46	21	46	46
Moyenne en mg/L	21,2	22,2	40,0	30,8	17,7	49,9
Ecart type de répétabilité Sr	0,9	1,4	1,6	3,0	0,7	3,3
RSDr %	4,0	6,4	4,1	9,6	3,7	6,5
Limite de répétabilité r	2,5	4,1	4,7	9,5	1,9	9,4
Limite relative de répétabilité r%	11,6%	18,3%	11,8%	30,8%	10,8%	18,9%
Ecart type de reproductibilité SR	2,4	2,7	4,6	7,5	1,9	6,1
RSDR %	11,5	12,2	11,5	24,2	10,8	12,3
Limite de reproductibilité R	6,9	7,7	13,2	22,0	5,5	17,5
Limite relative de reproductibilité R%	32,8%	34,7%	33,0%	71,5%	30,8%	35,1%
HORRAT R	1,1	1,2	1,3	2,5*	1,0	1,4

*considéré comme aberrant, non pris en compte pour l'expression de la fidélité



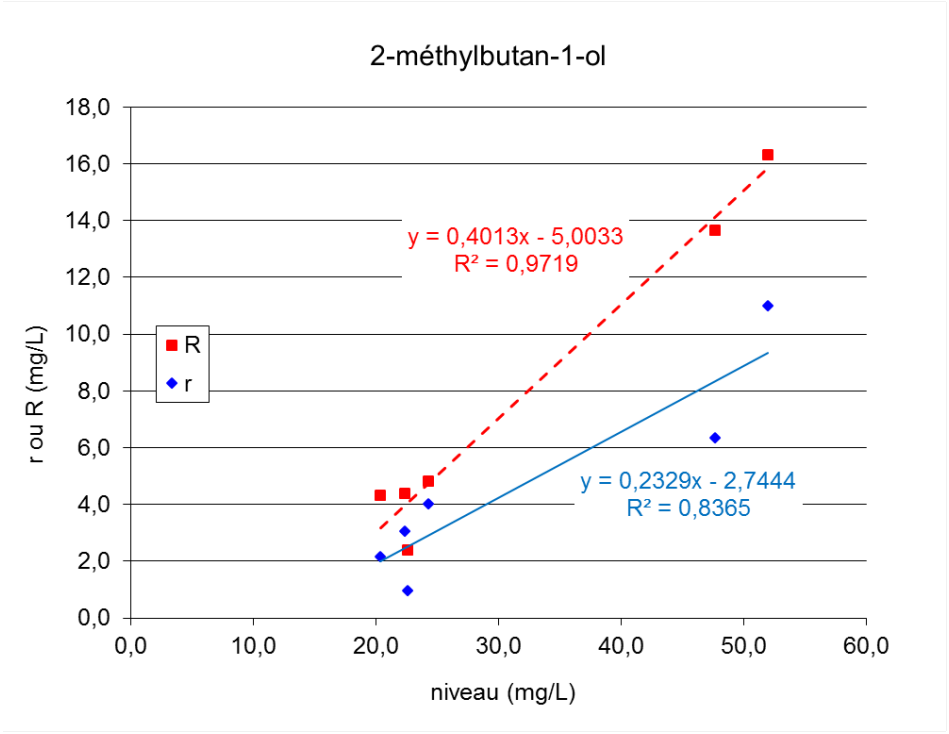
	vin A	vin B	vin C	vin D	vin E	vin F
Méthode	ISO 5725-2	ISO 5725-2	ISO 5725-2	ISO 5725-2	ISO 5725-2	ISO 5725-2
Nombre de laboratoires ayant répondu	13	13	13	13	13	13
Nombre de laboratoires ayant donné une réponse quantitative	9	8	10	13	9	10
Nombre de laboratoires après élimination des valeurs aberrantes	9	8	10	13	9	10
Nombre de mesures sans valeurs aberrantes	28	26	34	23	28	32
Moyenne en mg/L	0,87	0,87	1,77	11,36	0,81	1,36
Ecart type de répétabilité Sr	0,05	0,07	0,14	0,29	0,07	0,15
RSDr %	5,5	7,8	8,2	2,6	8,4	11,0
Limite de répétabilité r	0,14	0,20	0,42	0,92	0,20	0,44
Limite relative de répétabilité r%	16,2%	23,1%	23,9%	8,1%	24,8%	32,1%
RSDR %	15,6	15,0	11,3	5,9	17,5	19,3
Ecart type de reproductibilité SR	0,14	0,13	0,20	0,67	0,14	0,26
Limite de reproductibilité R	0,39	0,38	0,58	1,96	0,41	0,76
Limite relative de reproductibilité R%	45,2%	43,9%	32,5%	17,3%	50,9%	55,7%
HORRAT R	1,0	0,9	0,8	0,5	1,1	1,3


butan-1-ol
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
r ou R (mg/L)
R
r
y = 0,1438x + 0,339
R² = 0,9657
y = 0,0645x + 0,2038
R² = 0,8733
0,0
2,0
4,0
6,0
8,0
10,0
12,0
niveau (mg/L)

2-méthylbutan-1-ol - Fidélité
répétabilité et reproductibilité

	vin A	vin B	vin C	vin D	vin E	vin F
Méthode	ISO 5725-2	ISO 5725-2	ISO 5725-2	ISO 5725-2	ISO 5725-2	ISO 5725-2
Nombre de laboratoires ayant répondu	13	13	13	13	13	13
Nombre de laboratoires ayant donné une réponse quantitative	9	9	9	9	9	9
Nombre de laboratoires après élimination des valeurs aberrantes	9	9	9	9	9	9
Nombre de mesures sans valeurs aberrantes	32	32	32	16	32	32
Moyenne en mg/L	24,3	22,4	47,6	22,6	20,4	52,0
Ecart type de répétabilité Sr	1,4	1,1	2,2	0,3	0,7	3,8
RSDr %	5,7	4,7	4,6	1,3	3,6	7,3
Limite de répétabilité r	4,0	3,1	6,4	1,0	2,2	11,0
Limite relative de répétabilité r%	16,6%	13,7%	13,3%	4,3%	10,6%	21,2%
Ecart type de reproductibilité SR	1,7	1,5	4,7	0,8	1,5	5,7
RSDR %	6,9	6,8	9,9	3,5	7,3	10,9
Limite de reproductibilité R	4,8	4,4	13,7	2,4	4,3	16,3
Limite relative de reproductibilité R%	19,9%	19,6%	28,6%	10,6%	21,2%	31,4%
HORRAT R	0,7	0,7	1,1	0,4	0,7	1,2

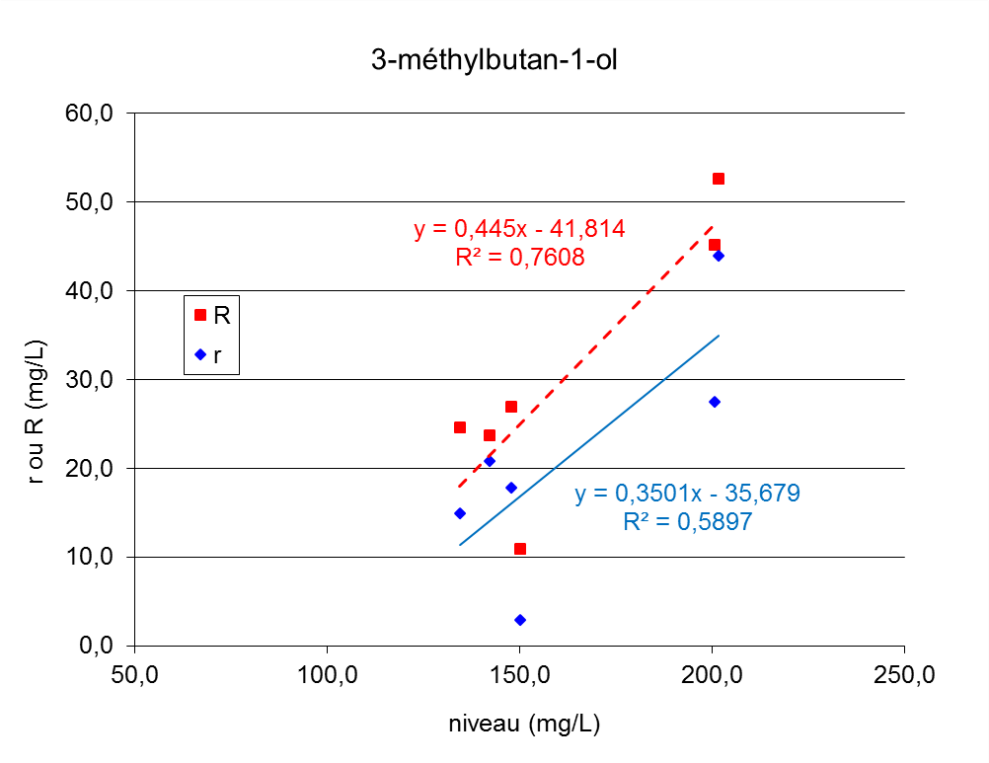
Sont exclus les laboratoires ayant sommé les pics du 2-méthylbutan-1-ol et du 3-méthylbutan-1-ol


2-méthylbutan-1-ol
18,0
16,0
14,0
12,0
10,0
8,0
6,0
4,0
2,0
0,0
r ou R (mg/L)
R
r
y = 0,4013x - 5,0033
R² = 0,9719
y = 0,2329x - 2,7444
R² = 0,8365
0,0
10,0
20,0
30,0
40,0
50,0
60,0
niveau (mg/L)

3-méthylbutan-1-ol - Fidélité
répétabilité et reproductibilité

	vin A	vin B	vin C	vin D	vin E	vin F
Méthode	ISO 5725-2	ISO 5725-2	ISO 5725-2	ISO 5725-2	ISO 5725-2	ISO 5725-2
Nombre de laboratoires ayant répondu	13	13	13	13	13	13
Nombre de laboratoires ayant donné une réponse quantitative	9	9	9	9	9	9
Nombre de laboratoires après élimination des valeurs aberrantes	9	9	9	9	9	9
Nombre de mesures sans valeurs aberrantes	32	32	32	16	32	32
Moyenne en mg/L	142,2	147,8	200,5	150,2	134,4	201,7
Ecart type de répétabilité Sr	7,1	6,1	9,4	0,9	5,1	15,0
RSDr %	5,0	4,1	4,7	0,6	3,8	7,5
Limite de répétabilité r	20,8	17,8	27,5	2,9	14,9	44,0
Limite relative de répétabilité r%	14,6%	12,1%	13,7%	1,9%	11,1%	21,8%
Ecart type de reproductibilité SR	8,2	9,3	15,7	3,6	8,5	18,2
RSDR %	5,8	6,3	7,8	2,4	6,3	9,0
Limite de reproductibilité R	23,7	26,9	45,2	10,9	24,6	52,6
Limite relative de reproductibilité R%	16,6%	18,2%	22,5%	7,3%	18,3%	26,1%
HORRAT R	0,8	0,8	1,1	0,3	0,8	1,3

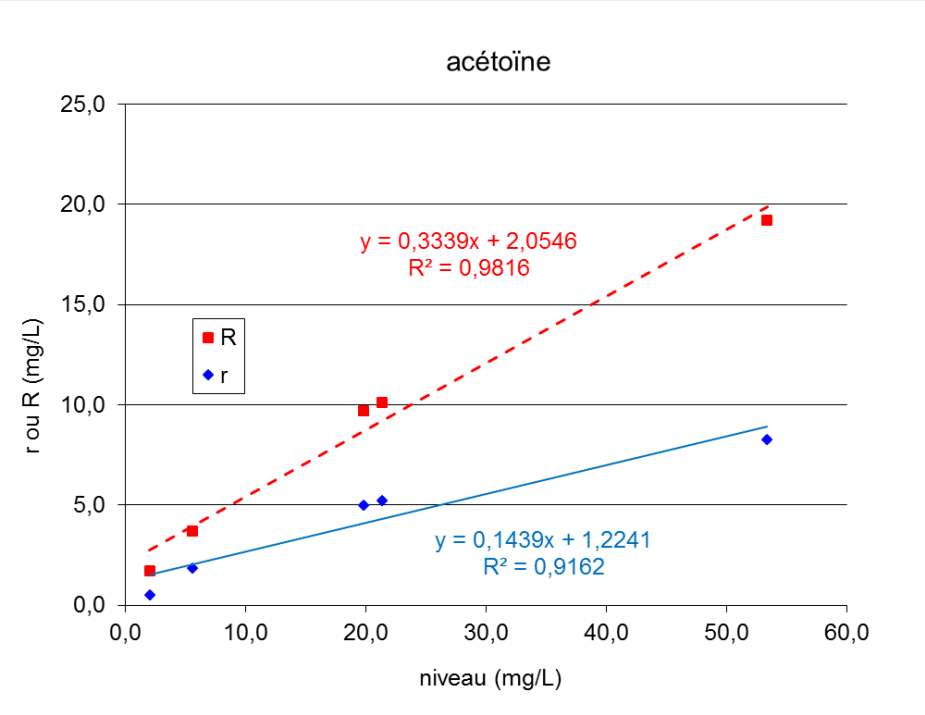
Sont exclus les laboratoires ayant sommé les pics du 2-méthylbutan-1-ol et du 3-méthylbutan-1-ol


3-méthylbutan-1-ol
60,0
50,0
40,0
30,0
20,0
10,0
0,0
r ou R (mg/L)
50,0
100,0
150,0
200,0
250,0
niveau (mg/L)
R
r
y = 0,445x - 41,814
R² = 0,7608
y = 0,3501x - 35,679
R² = 0,5897

Acétoïne - Fidélité
répétabilité et reproductibilité

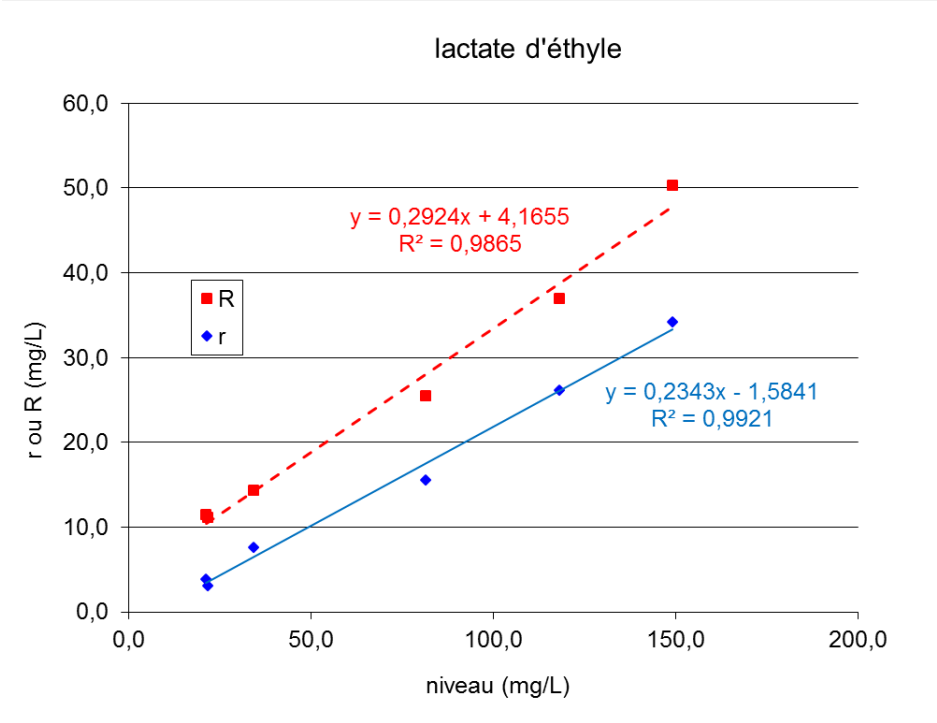
	vin A	vin B	vin C	vin D	vin E	vin F
Méthode	ISO 5725-2	ISO 5725-2	ISO 5725-2	ISO 5725-2	ISO 5725-2	ISO 5725-2
Nombre de laboratoires ayant répondu	13	12	13	13	12	13
Nombre de laboratoires ayant donné une réponse quantitative	12	9	13	13	10	13
Nombre de laboratoires après élimination des valeurs aberrantes	11	7	13	13	9	13
Nombre de mesures sans valeurs aberrantes	38	24	46	23	30	46
Moyenne en mg/L	5,6	2,1	19,8	53,4	2,4	21,4
Ecart type de répétabilité Sr	0,7	0,2	1,7	2,6	0,5	1,8
RSDr %	11,5	8,3	8,8	4,9	19,7	8,5
Limite de répétabilité r	1,9	0,5	5,0	8,3	1,4	5,2
Limite relative de répétabilité r%	33,4%	24,7%	25,2%	15,5%	58,0%	24,3%
Ecart type de reproductibilité SR	1,3	0,6	3,4	6,5	0,7	3,5
RSDR %	23,1	28,3	17,2	12,2	30,2	16,6
Limite de reproductibilité R	3,7	1,7	9,7	19,2	2,1	10,1
Limite relative de reproductibilité R%	66,2%	82,8%	48,9%	36,0%	87,3%	47,3%
HORRAT R	1,9	2,0	1,7	1,4	2,2*	1,6

*considéré comme aberrant, non pris en compte pour le calcul de la fidélité.


acétoïne
25,0
20,0
15,0
10,0
5,0
0,0
r ou R (mg/L)
y = 0,3339x + 2,0546
R² = 0,9816
R
r
y = 0,1439x + 1,2241
R² = 0,9162
0,0
10,0
20,0
30,0
40,0
50,0
60,0
niveau (mg/L)

Lactate d'éthyle - Fidélité
répétabilité et reproductibilité

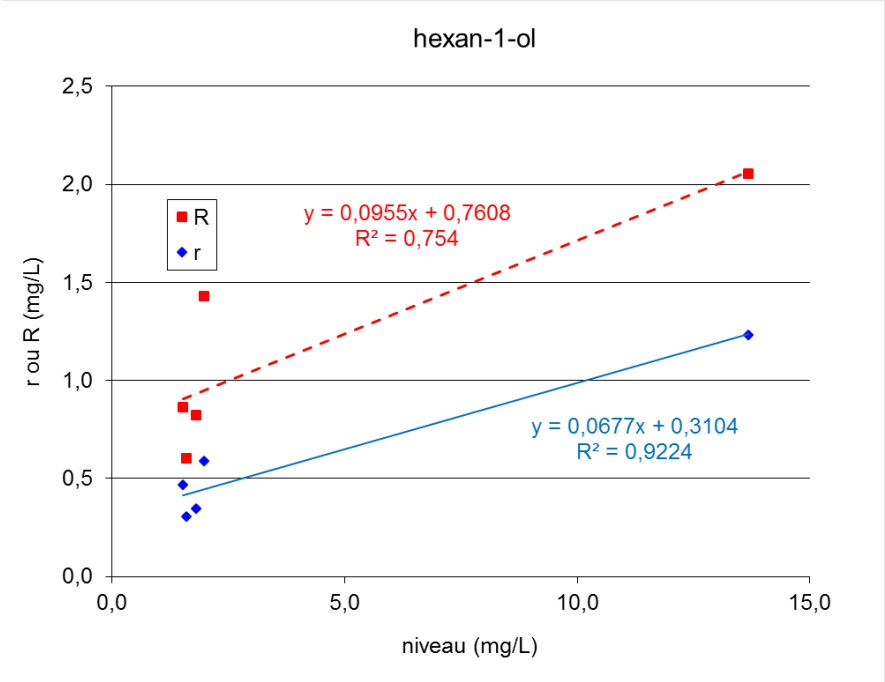
	vin A	vin B	vin C	vin D	vin E	vin F
Méthode	ISO 5725-2	ISO 5725-2	ISO 5725-2	ISO 5725-2	ISO 5725-2	ISO 5725-2
Nombre de laboratoires ayant répondu	13	13	13	13	13	13
Nombre de laboratoires ayant donné une réponse quantitative	13	13	13	13	13	13
Nombre de laboratoires après élimination des valeurs aberrantes	13	13	13	13	13	13
Nombre de mesures sans valeurs aberrantes	46	46	46	23	46	46
Moyenne en mg/L	81,5	21,4	149,2	21,8	34,3	118,2
Ecart type de répétabilité Sr	5,4	1,3	11,9	1,0	2,7	9,1
RSDr %	6,6	6,3	8,0	4,6	7,7	7,7
Limite de répétabilité r	15,5	3,9	34,2	3,1	7,6	26,1
Limite relative de répétabilité r%	19,0%	18,0%	22,9%	14,2%	22,2%	22,1%
Ecart type de reproductibilité SR	8,9	4,0	17,7	3,8	5,0	13,0
RSDR %	11,0	18,9	11,8	17,4	14,7	11,0
Limite de reproductibilité R	25,5	11,5	50,3	11,1	14,3	37,0
Limite relative de reproductibilité R%	31,3%	53,8%	33,7%	51,0%	41,7%	31,3%
HORRAT R	1,3	1,9	1,6	1,7	1,5	1,4


lactate d'éthyle
60,0
50,0
40,0
30,0
20,0
10,0
0,0
r ou R (mg/L)
0,0
50,0
100,0
150,0
200,0
niveau (mg/L)
y = 0,2924x + 4,1655
R² = 0,9865
y = 0,2343x - 1,5841
R² = 0,9921
R
r

Hexan-1-ol - Fidélité
répétabilité et reproductibilité

	vin A	vin B	vin C	vin D	vin E	vin F
Méthode	ISO 5725-2	ISO 5725-2	ISO 5725-2	ISO 5725-2	ISO 5725-2	ISO 5725-2
Nombre de laboratoires ayant répondu	13	13	13	13	13	13
Nombre de laboratoires ayant donné une réponse quantitative	11	12	11	13	11	10
Nombre de laboratoires après élimination des valeurs aberrantes	11	12	11	13	10	10
Nombre de mesures sans valeurs aberrantes	36	38	38	23	34	34
Moyenne en mg/L	1,81	1,53	1,99	13,68	1,60	1,22
Ecart type de répétabilité Sr	0,12	0,16	0,20	0,39	0,10	0,32
RSDr %	6,6	10,6	10,2	2,9	6,6	26,1
Limite de répétabilité r	0,35	0,47	0,59	1,23	0,31	0,93
Limite relative de répétabilité r%	19,2%	30,7%	29,7%	9,0%	19,2%	76,2%
Ecart type de reproductibilité SR	0,29	0,30	0,50	0,70	0,21	0,65
RSDR %	15,8	19,8	25,1	5,1	13,1	53,2
Limite de reproductibilité R	0,82	0,87	1,43	2,05	0,60	1,87
Limite relative de reproductibilité R%	45,4%	56,7%	71,9%	15,0%	37,7%	152,9%
HORRAT R	1,1	1,3	1,7	0,5	0,9	3,4*

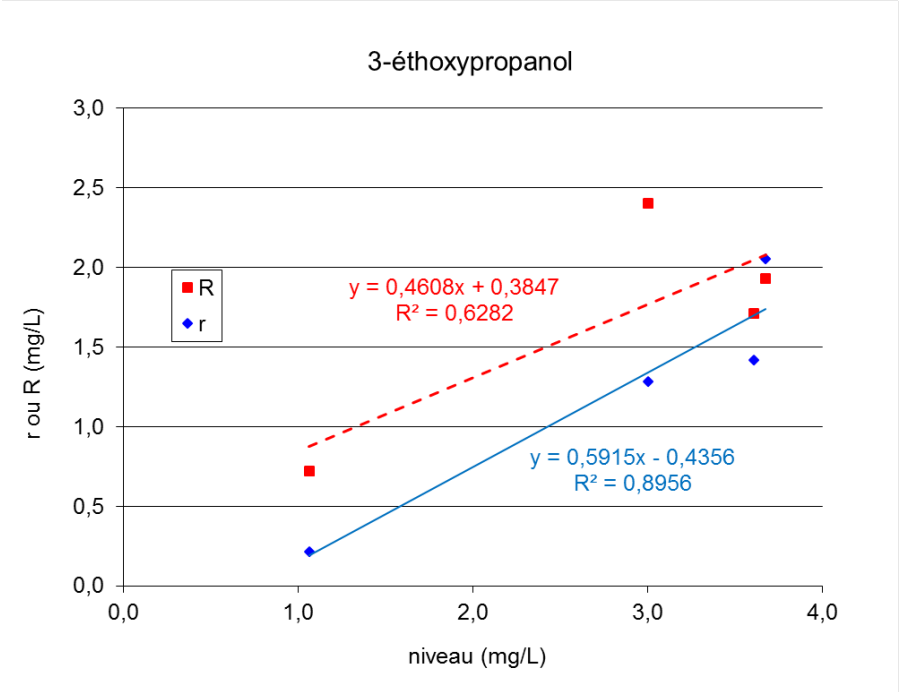
*considéré comme aberrant, non pris en compte pour le calcul de la fidélité.


hexan-1-ol
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
r ou R (mg/L)
R
r
y = 0,0955x + 0,7608
R² = 0,754
y = 0,0677x + 0,3104
R² = 0,9224
0,0
5,0
10,0
15,0
niveau (mg/L)

3-éthoxypropanol - Fidélité
répétabilité et reproductibilité

	vin A	vin B	vin C	vin D	vin E	vin F
Méthode	ISO 5725-2	ISO 5725-2	ISO 5725-2	ISO 5725-2	ISO 5725-2	ISO 5725-2
Nombre de laboratoires ayant répondu	12	12	12	12	12	11
Nombre de laboratoires ayant donné une réponse quantitative	7	11	8	11	11	6
Nombre de laboratoires après élimination des valeurs aberrantes	7	11	8	10	11	6
Nombre de mesures sans valeurs aberrantes	21	37	23	17	30	17
Moyenne en mg/L	1,7	3,6	1,4	3,7	3,0	1,1
Ecart type de répétabilité Sr	1,0	0,4	0,1	0,4	0,4	0,1
RSDr %	62,4	10,9	7,5	11,3	14,4	6,5
Limite de répétabilité r	3,2	1,4	0,3	2,1	1,3	0,2
Limite relative de répétabilité r%	189,2%	39,3%	22,7%	55,9%	42,7%	20,2%
Ecart type de reproductibilité SR	1,4	0,6	0,5	0,7	0,8	0,2
RSDR %	81,3	16,5	33,3	17,6	27,7	22,6
Limite de reproductibilité R	4,0	1,7	1,4	1,9	2,4	0,7
Limite relative de reproductibilité R%	239,8%	47,5%	97,7%	52,6%	80,1%	67,7%
HORRAT R	5,5*	1,3	2,2*	1,3	2,0	1,4

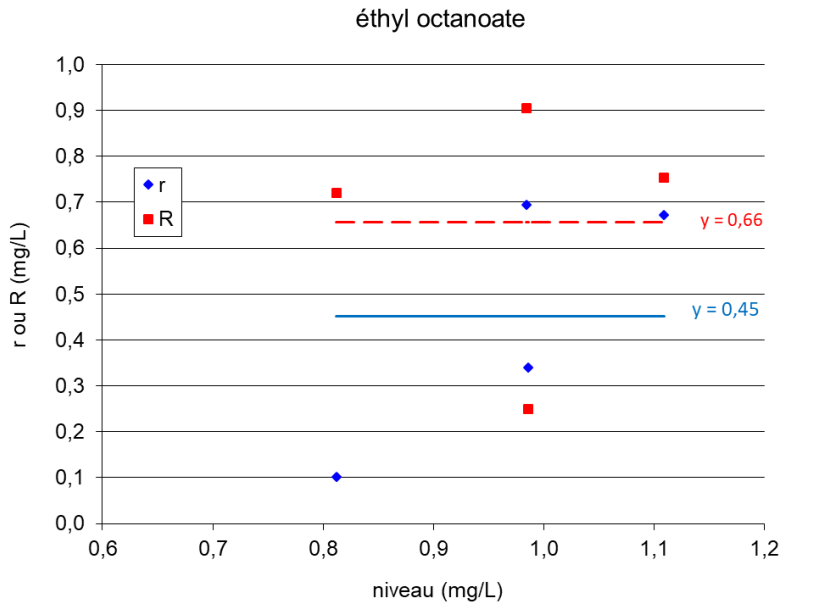
*considéré comme aberrant, non pris en compte pour le calcul de la fidélité.


3-éthoxypropanol
3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
r ou R (mg/L)
R
r
y = 0,4608x + 0,3847
R² = 0,6282
y = 0,5915x - 0,4356
R² = 0,8956
0,0
1,0
2,0
3,0
4,0
niveau (mg/L)

Ethyl octanoate - Fidélité
Répétabilité et reproductibilité

	vin A	vin B	vin C	vin D	vin E	vin F
Méthode	ISO 5725-2	ISO 5725-2	ISO 5725-2	ISO 5725-2	ISO 5725-2	ISO 5725-2
Nombre de laboratoires ayant répondu	12	12	12	12	12	12
Nombre de laboratoires ayant donné une réponse quantitative	7	9	5	9	9	4
Nombre de laboratoires après élimination des valeurs aberrantes	7	9	5	8	9	4
Nombre de mesures sans valeurs aberrantes	19	30	10	13	30	10
Moyenne en mg/L	0,8	1,1	0,7	1,0	1,0	0,8
Ecart type de répétabilité Sr	0,03	0,2	0,3	0,1	0,2	0,4
RSDr %	4,1	20,6	47,0	10,3	24,0	49,5
Limite de répétabilité r	0,1	0,7	1,2	0,3	0,7	1,4
Limite relative de répétabilité r%	12,5%	60,7%	171,1%	34,4%	70,6%	171,3%
Ecart type de reproductibilité SR	0,2	0,3	0,6	0,1	0,3	0,8
RSDR %	29,9	23,5	91,4	8,2	31,8	90,3
Limite de reproductibilité R	0,7	0,8	2,0	0,3	0,9	2,4
Limite relative de reproductibilité R%	88,8%	67,9%	292,8%	25,3%	92,0%	288,8%
HORRAT R	1,8	1,5	5,4*	0,5	2,0	5,5*

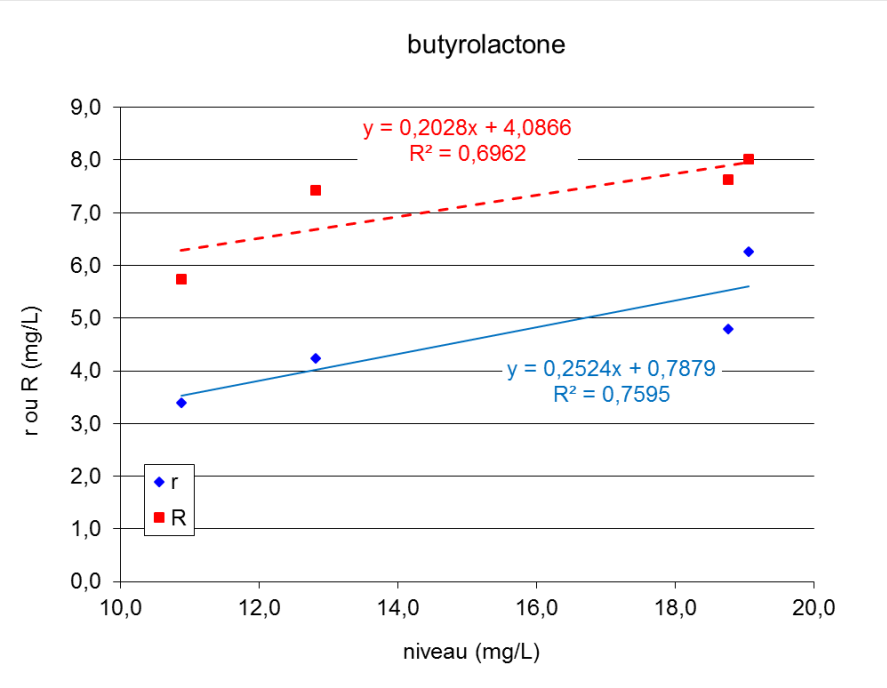
*considéré comme aberrant, non pris en compte pour le calcul de la fidélité.


éthyl octanoate
1,0
0,9
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0,0
r ou R (mg/L)
r
R
y = 0,66
y = 0,45
0,6
0,7
0,8
0,9
1,0
1,1
1,2
niveau (mg/L)

Butyrolactone - Fidélité
répétabilité et reproductibilité

	vin A	vin B	vin C	vin D	vin E	vin F
Méthode	ISO 5725-2	ISO 5725-2	ISO 5725-2	ISO 5725-2	ISO 5725-2	ISO 5725-2
Nombre de laboratoires ayant répondu	10	10	10	10	10	10
Nombre de laboratoires ayant donné une réponse quantitative	10	10	10	10	10	10
Nombre de laboratoires après élimination des valeurs aberrantes	8	8	7	10	9	8
Nombre de mesures sans valeurs aberrantes	26	28	24	17	30	28
Moyenne en mg/L	12,8	10,9	18,8	11,3	8,2	19,1
Ecart type de répétabilité Sr	1,4	1,2	1,6	1,2	2,9	2,1
RSDr %	11,1	10,6	8,6	10,3	34,9	11,1
Limite de répétabilité r	4,2	3,4	4,8	3,9	8,5	6,3
Limite relative de répétabilité r%	33,1%	31,2%	25,5%	34,3%	102,7%	32,8%
Ecart type de reproductibilité SR	2,6	2,0	2,6	3,9	2,9	2,8
RSDR %	19,9	18,2	13,9	34,4	35,6	14,5
Limite de reproductibilité R	7,4	5,7	7,6	11,6	8,5	8,0
Limite relative de reproductibilité R%	57,9%	52,7%	40,7%	103,1%	102,9%	42,1%
HORRAT R	1,8	1,6	1,4	3,1*	3,1*	1,4

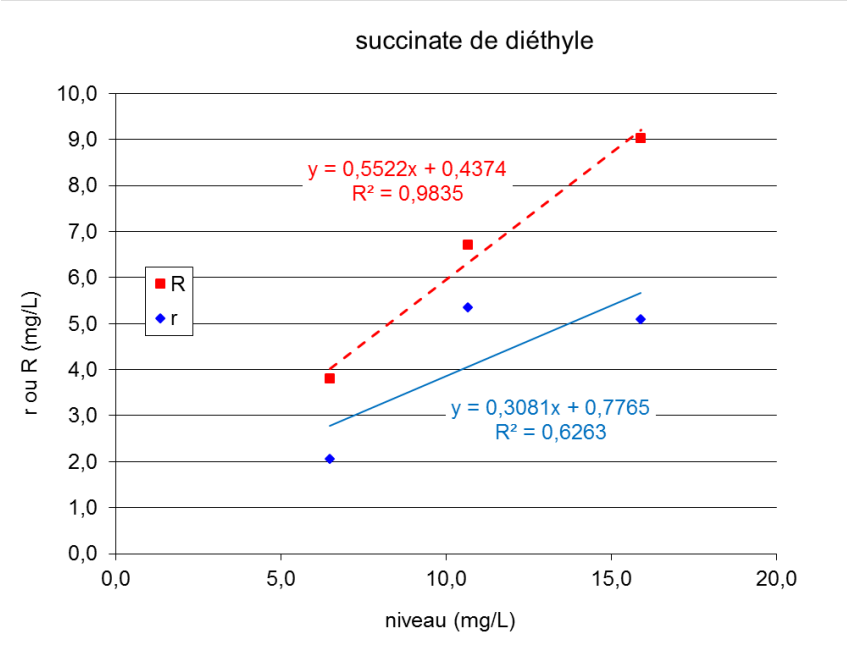
*considéré comme aberrant, non pris en compte pour le calcul de la fidélité.


butyrolactone
y = 0,2028x + 4,0866
R² = 0,6962
y = 0,2524x + 0,7879
R² = 0,7595
r
R
r ou R (mg/L)
niveau (mg/L)
9,0
8,0
7,0
6,0
5,0
4,0
3,0
2,0
1,0
0,0
10,0
12,0
14,0
16,0
18,0
20,0

Succinate de diéthyle - Fidélité
répétabilité et reproductibilité

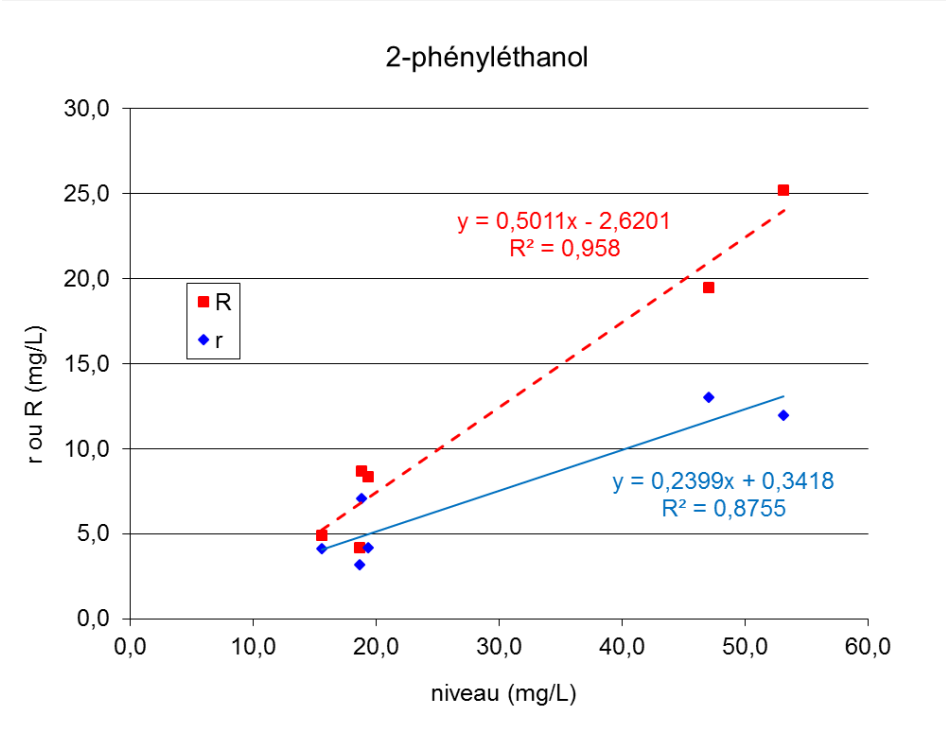
	vin A	vin B	vin C	vin D	vin E	vin F
Méthode	ISO 5725-2	ISO 5725-2	ISO 5725-2	ISO 5725-2	ISO 5725-2	ISO 5725-2
Nombre de laboratoires ayant répondu	13	13	13	13	13	13
Nombre de laboratoires ayant donné une réponse quantitative	13	10	13	10	12	13
Nombre de laboratoires après élimination des valeurs aberrantes	11	10	13	10	12	12
Nombre de mesures sans valeurs aberrantes	40	34	46	17	35	42
Moyenne en mg/L	6,5	3,3	15, 9	4,0	3,7	10,7
Ecart type de répétabilité Sr	0,7	0,4	1,8	1,5	0,6	1,9
RSDr %	11,0	11,2	11,2	37,8	16,1	17,4
Limite de répétabilité r	2,1	1,1	5,1	5,0	1,7	5,4
Limite relative de répétabilité r%	31,7%	32,6%	32,1%	126,4%	47,1%	50,2%
Ecart type de reproductibilité SR	1,3	1,5	3,2	1,9	1,3	2,4
RSDR %	20,5	44,9	20,0	48,6	35,4	22,0
Limite de reproductibilité R	3,8	4,3	9,0	5,8	3,7	6,7
Limite relative de reproductibilité R%	58,6%	129,2%	56,9%	145,6%	101,7%	63,0%
HORRAT R	1,7	3,4*	1,9	3,7*	2,7*	2,0

*considéré comme aberrant, non pris en compte pour le calcul de la fidélité.


succinate de diéthyle
10,0
9,0
8,0
7,0
6,0
5,0
4,0
3,0
2,0
1,0
0,0
r ou R (mg/L)
R
r
y = 0,5522x + 0,4374
R² = 0,9835
y = 0,3081x + 0,7765
R² = 0,6263
0,0
5,0
10,0
15,0
20,0
niveau (mg/L)

2-phényléthanol - Fidélité
répétabilité et reproductibilité

	vin A	vin B	vin C	vin D	vin E	vin F
Méthode	ISO 5725-2	ISO 5725-2	ISO 5725-2	ISO 5725-2	ISO 5725-2	ISO 5725-2
Nombre de laboratoires ayant répondu	13	13	13	13	13	13
Nombre de laboratoires ayant donné une réponse quantitative	13	13	13	13	13	13
Nombre de laboratoires après élimination des valeurs aberrantes	12	12	12	12	12	13
Nombre de mesures sans valeurs aberrantes	42	42	42	21	42	46
Moyenne en mg/L	19,4	18,8	47,0	18,7	15,6	53,1
Ecart type de répétabilité Sr	1,4	2,4	4,5	1,0	1,4	4,2
RSDr %	7,4	13,0	9,6	5,3	9,1	7,8
Limite de répétabilité r	4,2	7,0	13,0	3,2	4,1	11,9
Limite relative de répétabilité r%	21,5%	37,4%	27,7%	17,1%	26,3%	22,5%
Ecart type de reproductibilité SR	2,9	3,0	6,8	1,4	1,7	8,8
RSDR %	15,1	16,2	14,5	7,6	11,0	16,6
Limite de reproductibilité R	8,4	8,7	19,5	4,2	4,9	25,2
Limite relative de reproductibilité R%	43,1%	46,2%	41,4%	22,4%	31,5%	47,4%
HORRAT R	1,5	1,6	1,6	0,7	1,0	1,9


2-phényléthanol
30,0
25,0
20,0
15,0
10,0
5,0
0,0
r ou R (mg/L)
R
r
y = 0,5011x - 2,6201
R² = 0,958
y = 0,2399x + 0,3418
R² = 0,8755
0,0
10,0
20,0
30,0
40,0
50,0
60,0
niveau (mg/L)

Méthode OIV-MA-AS315-28 Méthode Type IV

Méthode de dosage du propane-1,2-diol et du butane-2,3-diol

(Résolution OIV-OENO 589-2017)

1. INTRODUCTION

Des quantités mesurables de propane-1,2-diol et de butane-2,3-diol se forment suite aux processus de fermentation. Ces composés sont pratiquement absents dans les moûts non fermentés, mais présents dans les vins dans certaines limites.

2. PRINCIPE

Les analytes et l'étalon interne sont extraits par l'utilisation d'éther éthylique. Leur transfert en phase organique est favorisé par l'augmentation de la force ionique dans la matrice vin ou moût de départ. C'est pour cette raison qu'une grande quantité de K_2CO_3 (« relargage ») est additionnée aux échantillons. Les extraits sont directement analysés par CG-SM sur colonne polaire. La détection est effectuée selon le temps de rétention et le spectromètre de masse.

3. CHAMP D'APPLICATION

La méthode est adaptée au dosage du propane-1,2-diol et du butane-2,3-diol dans les moûts et les vins dont la teneur en sucres est supérieure à 20 g/L et dont les concentrations en analytes sont comprises entre environ 1 mg/L et 500 mg/L.

4. ABREVIATIONS

C	Concentration
PG	Propane-1,2-diol
CG-SM	Chromatographe couplé à un détecteur à spectrométrie de masse
H_2	Hydrogène
EI	Étalon interne butane-1,3-diol
m/z	Rapport masse/charge

RF	Facteur de réponse
ML	Niveau d'étalonnage de la matrice
SM	Solution mère
SE	Solution étalon
TR	Temps de rétention
SE	Solutions étalons pour la chromatographie en phase gazeuse
BG	Butane-2,3-diol
D	Vin avec une teneur en sucres > 20 g/L
M	Moût

5. RÉACTIFS

5.1. K_2CO_3 (CAS 584-08-7)
5.2. Éther éthylique (CAS 60-29-7)
5.3. Éthanol absolu (CAS 64-17-5)
5.4. Fructose (CAS 57-48-7)
5.5. Glucose (CAS 50-99-7)
5.6. Glycérol (CAS 56-81-5)
5.7. Propane-1,2-diol, pureté > 99 % (CAS 57-55-6)
5.8. Butane-2,3-diol, pureté > 99 %, mélange d'isomères (R,R) et (R,S) (CAS 513-85-9) Estimer la quantité relative des formes (R,R) et (R,S) de la manière suivante :
  5.8.1. Préparer une solution à 100 mg/L en suivant les instructions des points 7.2.1 et 7.3 et en diluant le mélange d'isomères du butane-2,3-diol (5.8) dans de l'eau (5.10) plutôt que dans la solution modèle de la matrice ;
  5.8.2. Injecter dans le CG, selon les conditions décrites au point 7.6, et calculer le pourcentage de formes (R,R) et (R,S) à partir du pourcentage des aires des deux pics ;
  5.8.3. Prendre en compte la quantité relative de chacune des deux formes pour calculer la concentration des solutions étalon $C_{SE,i}$ utilisées dans le paragraphe 8.2.1 pour le calcul des RFi relatifs aux formes (R,R) et (R,S) ;
5.9. Butane-1,3-diol, pureté > 99 %, anhydre (ou déshydraté avec du sulfate de

sodium pendant 24 heures) (CAS 107-88-0)

5.10. Eau purifiée pour laboratoire, de qualité certifiée EN ISO 3696

5.11. Azote

6. APPAREILLAGE

6.1. Matériel courant de laboratoire, dont fioles jaugées de 1000 mL, 200 mL, 100 mL de classe A

6.2. Balance analytique avec une résolution de ± 0,0001 g

6.3. Centrifugeuse de laboratoire (au moins 4000 tours/min ou 2000 xg)

Note 1. « xg » désigne l'accélération subie par les particules qui se trouvent dans la centrifugeuse, alors que « tours/min » représente le nombre de tours réalisés par le rotor de la centrifugeuse en une minute. Il existe une relation entre ces deux unités de mesure : $xg = 1{,}1178 \cdot 10^{-3} \cdot n^2 \cdot r$. Dans le laboratoire qui a développé cette méthode, $r = 0{,}115$ m.

6.4. Chromatographe couplé à un détecteur à spectrométrie de masse avec injecteur split-splitless

6.5. Micropipettes de précision et pipettes Pasteur

6.6. Tubes à centrifuger de 30 mL résistants à l'éther et munis de bouchons

6.7. Bain thermostaté

6.8. Agitateur vertical de type vortex

7. MODE OPÉRATOIRE

7.1. Préparation des solutions modèle qui simulent la matrice

Pour obtenir une meilleure réponse au CG-SM au cours de la quantification, il convient de préparer différentes solutions qui simulent le plus possible la matrice de l'échantillon considéré, étant donné que la réponse à l'analyse des glycols est variable en fonction de la matrice dans laquelle ils ont été solubilisés.

Tab.1. : Préparation des solutions modèle dans des fioles jaugées de 1000 mL :

	Solution modèle	
	M	D
Fructose	100 g/L	50 g/L
Glucose	100 g/L	50 g/L
Glycérol	1 g/L	4 g/L
Éthanol absolu	1 % v/v	5 % v/v

7.2. Préparation des solutions de référence

7.2.1.SM : Solution mère de PG et BG

Avec une exactitude de 0,1 mg, peser environ 0,10 g de propane-1,2-diol (PG) et environ 0,10 g de butane-2,3-diol (BG) dans une fiole jaugée de 10 mL et compléter au trait de jauge avec de l'eau (5.10). Noter les poids. Fermer soigneusement la fiole et agiter.
La concentration de cette solution est d'environ de 10 mg/mL de PG et de 10 mg/mL de BG.
Si les quantités de PG et de BG diffèrent de 0,1 g, calculer les concentrations exactes en se basant sur les poids notés.

7.2.2.EI : Solution EI

Avec une exactitude de 0,1 mg, peser environ 0,10 g de butane-1,3-diol (EI) dans une fiole jaugée de 10 mL et compléter au trait de jauge avec de l'eau. Noter le poids. Fermer soigneusement la fiole et agiter.
La concentration de cette solution est de 10 mg/mL. Si la quantité d'EI diffère de 0,1 g, calculer la concentration exacte en se basant sur le poids noté.

7.3. Préparation de la solution étalon dans la matrice

Les solutions étalons se préparent de la manière suivante, en diluant la solution SM dans une solution modèle dont la composition se rapproche le plus possible de celle de l'échantillon à analyser (pour le vin doux, la solution modèle D ; pour le moût, la solution modèle M) :

Tab.2. : Préparation des solutions étalons (SE) dans des fioles jaugées de 100 mL :

	SE-M	SE-D
Solution SM	1 mL	1 mL
Pour atteindre un volume final de 100 mL, compléter avec :	Solution modèle M	Solution modèle D

Chaque solution étalon SE contient la matrice choisie et la concentration de PG et de BG est de 100 mg/L. L'étalon interne sera additionné avant l'extraction, comme décrit au paragraphe 7.5.

7.4. Préparation des échantillons

Si la concentration de l'analyte dans l'échantillon est supérieure à la concentration maximale prévue dans le champ d'application, diluer l'échantillon avec la solution modèle (7.1).
Homogénéiser l'échantillon avant d'en prélever une fraction de 10 mL à soumettre à l'extraction.
Dans le cas de moûts ou de vins troubles, prélever le vin limpide après filtration.
Dans le cas de vins mousseux ou pétillants, effectuer un dégazage, comme décrit dans la méthode OIV « Acidité totale » (OIV-MA-AS313-01, paragraphe 5.1).
Procéder à l'intégralité de la préparation et effectuer les essais en double.

7.5. Extraction

7.5.1. Addition de l'étalon interne EI à l'échantillon

Dans une fiole jaugée de 100 mL, préparer une solution contenant 5 mL de la solution étalon EI (7.2.2) et compléter au trait de jauge avec l'échantillon à analyser, puis bien agiter.
Cette solution contient 500 mg/L d'EI.

7.5.2. Moûts et vins avec une teneur en sucres > 20 g/L

7.5.2.1. Addition du K_2CO_3

Dans le tube à centrifuger (6.6), introduire 10 mL de la solution

fraîchement préparée composée de l'échantillon à analyser et de la solution d'EI, puis additionner 10 g de K_2CO_3 (5.1) et attendre le refroidissement. Pour accélérer le refroidissement, il est possible d'utiliser un bain thermostaté à 20 °C (6.7).

7.5.2.2. Extraction avec de l'éther

Une fois refroidie, additionner 10 mL d'éther éthylique (5.2) et agiter le tout avec l'agitateur vertical de type vortex, puis centrifuger (6.3) à environ 3500 tours/min (ou 1500 xg) pendant 10 minutes.

7.5.3. Purification pour l'analyse CG-SM

Le liquide surnageant est recueilli avec une pipette Pasteur, transféré dans un ballon adapté et déshydraté sous flux d'azote. Le résidu est récupéré avec 1 mL environ d'éther éthylique et mis dans un flacon de CG fermé hermétiquement, prêt pour l'analyse en CG-SM.

7.5.4. Extraction des solutions étalon SE

Ce protocole doit être également effectué pour la solution étalon SE choisie (7.3). Les solutions SE doivent être considérées comme des échantillons en tous points, et donc traitées de façon analogue à l'échantillon à partir de l'addition de l'EI (7.5.1).

7.6. Analyse par CG-SM

À titre d'exemple, les paramètres spécifiques de l'analyse CG-SM sont fournis ci-dessous. Il est possible d'utiliser des systèmes alternatifs, s'ils présentent des prestations chromatographiques adaptées et permettant de séparer les pics chromatographiques avec une précision supérieure à 2.

7.6.1. Conditions type de CG

Colonne : DB-WAX 60 m x 0,25 mm x 0,25 µm
Gaz vecteur : He
Débit du gaz vecteur : 1,0 mL/min
Température de l'injecteur : 250 °C
Volume d'injection : 1 µL

Courant ionisant : 70 eV
Programmation de la température :

	Augmentation (°C/min)	Température (°C)	Temps (min)
Début		50	8.00
Rampe 1	4.0	220	
Rampe 2		220	40

7.6.2. Conditions spécifiques de la SM

Source : 230 °C
Détecteur SM : 150 °C scan 35,00 – 350,00 a.m.u.
Temps de départ : 10 min
Le temps d'acquisition pour chacune des masses est de 250 µs
Modalité d'acquisition : Full Scan

8. ÉVALUATION

8.1. Identification

L'identification est assurée par la comparaison du temps de rétention des étalons prévus à cet effet et du spectre de masse présent dans la librairie associée au CG-SM.

8.2. Calculs

Pour la quantification, la m/z = 45 est utilisée aussi bien pour l'EI que pour le PG ou les deux formes de BG.

8.2.1. Détermination des facteurs de réponse

La quantification est effectuée à partir du facteur de réponse RF obtenu par l'analyse de la solution de référence :

$$RF_i = \frac{A_{EI}/C_{EI}}{A_{SE,i}/C_{SE,i}}$$

où :
A_{EI} est l'aire du pic de l'étalon interne et C_{EI} sa concentration ;
$A_{SE,i}$ est l'aire du pic du PG et de chacune des formes isomères du BG dans la solution étalon et $C_{SE,i}$ sa concentration.

8.2.2. Calcul des concentrations dans les échantillons

Une fois la valeur de RF calculée, il peut alors être procédé au calcul de la concentration en PG et de chacune des formes isomères du BG dans les échantillons selon cette formule :

$$C_i = RF_i \cdot C_{EI} \cdot \frac{A_i}{A_{EI}}$$

$$Ci = Rfi \cdot C_{SE} \cdot \frac{Ai}{A_{EI}}$$

où :
A_i est l'aire du pic de PG ou de l'isomère de BG dans l'échantillon et C_i sa concentration.

8.3. Expression des résultats

Les résultats sont exprimés en mg/L sans décimale.
Exprimer le butane-2,3-diol comme étant la somme du butane-2,3-diol (R,R) et du butane-2,3-diol (R,S).

9. BIBLIOGRAPHIE

Carsten Fauhl, Reiner Wittkowski, Janice Lofthouse, Simon Hird, Paul Brereton, Giuseppe Versini, Michele Lees et Claude Guillou, « Gas Chromatographic/Mass Spectrometric Determination of 3-Methoxy-1,2-Propanediol and Cyclic Diglycerols, By-Products of Technical Glycerol, in Wine: Interlaboratory Study » *JOURNAL OF AOAC INTERNATIONAL*, VOL. 87, NO. 5, 2004.

Di Stefano, R., García Moruno, E. et Borsa, D., « Proposta di un metodo di

preparazione del campione per la determinazione dei glicoli dei vini » *VINI D'ITALIA*, 4, 1992, p. 61-64.

García Moruno, E. et Di Stefano, R., « La determinazione del glicerolo, del 2,3-butandiolo e dei glicoli nei vini », *VINI D'ITALIA*, 5, 1989, p. 41-46.

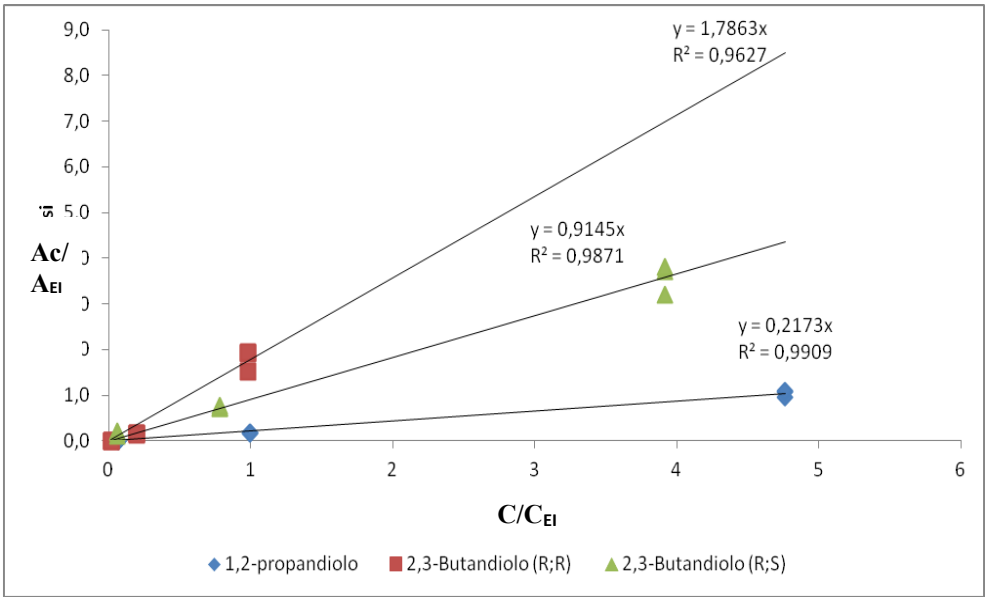
Di Stefano, R., Borsa, D. et García Moruno, E., « Glicoli naturalmente presenti nei vini », *VINI D'ITALIA*, 5, 1988, p. 39-44.

ANNEXE 1

PERFORMANCES DE LA MÉTHODE

1. Linéarité

Vérification de la linéarité de la réponse sur une solution sucrée à 200 g/L (de 100 g/L de glucose et 100 g/L de fructose). Chaque analyte a été additionné à des concentrations de 10, 100 et 500 mg/L, tandis que l'EI a été additionné à une concentration d'environ 100 mg/L. Les mesures ont été répétées à trois reprises.



Le facteur de réponse moyen est de :

propane-1,2-diol RF = $(C/C_{EI})/(A/A_{EI})$ = 1/0,2173 = 4,60

butane-2,3-diol (R,R) RF = $(C/C_{EI})/(A/A_{EI})$ = 1/1,7863 = 0,56

butane-2,3-diol (R,S) RF = $(C/C_{EI})/(A/A_{EI})$ = 1/0,9145 = 1,09

2. Répétabilité

La répétabilité a été évaluée sur deux échantillons de moût.

L'un a été analysé tel quel (Moût n° 1) et l'autre a été obtenu par addition à ce dernier de 100 mg/L de solution mère SM (Moût n° 2).

Le tableau suivant fait référence à 10 analyses répétées, et la répétabilité (r) est calculée selon la formule r = 2,8*Sr. (Sr = écart type de répétabilité, RSDr = écart type relatif de répétabilité).

Composé	Moût n° 1				Moût n° 2			
	Moyenne (mg/L)	Sr (mg/L)	RSDr (%)	r (mg/L)	Moyenne (mg/L)	Sr (mg/L)	RSDr (%)	r (mg/L)
Propane-1,2-diol	1,5	0,5	36	1,5	107	9	9	30
Butane-2,3-diol (R,R)	3,2	1,6	52	4,6	30	3	9	9,0
Butane-2,3-diol (R,S)	5,4	1,7	33	4,9	104	11	10	34

Évaluation de la fidélité de la limite de répétabilité selon l'équation d'Horwitz et du paramètre d'Horrat (r) :

Moût n° 1

	Moyenne (mg/L)	$C \cdot 10^6$ (m/m)	PRSD (R)	R Horwitz	Horrat (r)	r min H	r max H
Propane-1,2-diol	1,5	1,5	15	0,6	2,40	0,2	0,8
Butane-2,3-diol (R,R)	3,2	3,2	13	1,2	3,87	0,3	1,6
Butane-2,3-diol (R,S)	5,4	5,4	12	1,9	2,64	0,5	2,5

La limite de répétabilité « r » n'est pas contenue dans la plage de validation prévue par l'équation d'Horwitz (r min H < r < r max H) à cause de la plus grande

volatilité des mesures à basse concentration, proches de la limite de quantification établie au paragraphe 5 de l'annexe 1.

Moût n° 2

	Moyenne (mg/L)	**C·10^5 (m/m)**	**PRSD (R)**	**R Horwitz**	**Horrat (r)**	**r min H**	**r max H**
Propane-1,2-diol	107	11	7,9	24	1,09	5,9	31,8
Butane-2,3-diol (R,R)	30	3	9,5	8	0,98	2,0	10,7
Butane-2,3-diol (R,S)	104	10	7,9	23	1,29	5,7	30,8

La limite de répétabilité « r » n'est pas contenue dans la plage de validation prévue par l'équation d'Horwitz (r min H < r < r max H).

3. Taux de recouvrement

Le taux de recouvrement a été évalué sur le moût n°2 avant et après l'addition de la solution de mère SM, comme décrit au paragraphe 7.3 de la méthode.

Composé	**C. dans le moût (mg/L)**	**C. Ajout (mg/L)**	**C. théorique (mg/L)**	**C. mesurée (mg/L)**	**Taux de recouvrement (%)**
Propane-1,2-diol	0,7	99,5	100,2	107,5	107
Butane-2,3-diol (R,R)	12,6	21,7	34,3	29,9	87
Butane-2,3-diol (R,S)	11,4	86,8	98,2	103,7	106
Butane-2,3-diol (R,R) + (R,S)	*24,0*	*108,5*	*132,5*	*133,6*	*101*

Le taux de recouvrement est satisfaisant pour le propane-1,2-diol et pour le butane-2,3-diol évalué globalement comme la somme des deux formes.

4. Effet de la matrice sucrée sur les facteurs de réponse

Les RF obtenus dans des solutions sucrées équimolaires en glucose et fructose aux concentrations de 200 g/L et 2 g/L en sucres totaux ont été confrontés.

	Propane-1,2-diol		Butane-2,3-diol (R,R)		Butane-2,3-diol (R,S)	
Sucres	200 g/L	2 g/L	200 g/L	2 g/L	200 g/L	2 g/L
RF	4,60	5,90	0,55	0,56	1,08	1,09
|ΔRF| %	22,0 %		1,8 %		0,9 %	

L'effet de la matrice sur le propane-1,2-diol est très marqué alors qu'il est négligeable pour les deux formes du butane-2,3-diol.

5. Limite de détection et limite de quantification

La limite de détection (LD) et la limite de quantification (LQ) dépendent de conditions de mesure particulières de l'analyse chimique et doivent être déterminées par tous ceux qui utilisent la méthode.

La limite de détection (LD) et la limite de quantification (LQ) ont été évaluées en utilisant le matériel et les conditions mentionnés précédemment (point 8) et en suivant les instructions de la résolution OENO 7-2000 (OIV-MA-AS1-10) « Estimation de la limite de détection et de quantification d'une méthode d'analyse » décrites dans le paragraphe 4.2 au sujet de l'approche graphique.

	Propane-1,2-diol	Butane-2,3-diol (R,R)	Butane-2,3-diol (R,S)
LD (mg/L)	0,2	0,2	0,2
LQ (mg/L)	0,6	0,7	0,8

Annexe 2

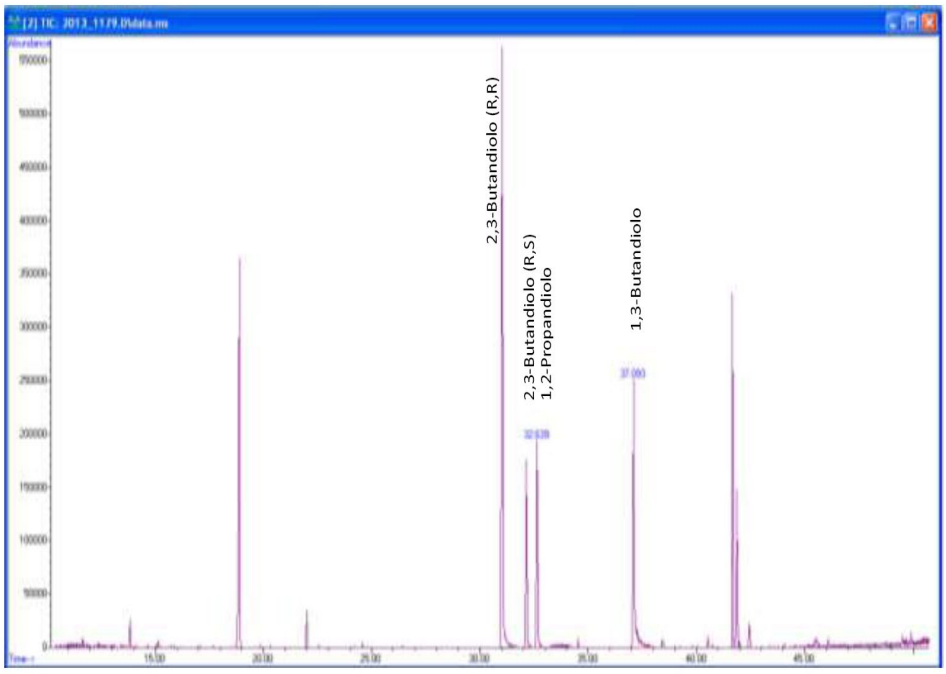


FIG. 1 Chromatogramme d'un vin.

Méthode OIV-MA-AS315-29 Méthode Type IV

Mise en évidence des protéines chitinase et thaumatin-like dans les vins blancs

(Résolution OIV-OENO 529-2017)

1. Introduction

Pour mettre en évidence les protéines instables et les risques de casse protéique dans les vins blancs, de nombreux tests sont basés sur la chaleur ou la précipitation par un agent chimique. Ils donnent des résultats très différents peu fiables voire contradictoires. Cette méthode immunologique d'immunoempreinte semi-quantitative permet d'obtenir un résultat de présence ou d'absence des protéines instables dans les vins. Elle permet de détecter la thaumatin-like et la Chitinase à partir d'une concentration globale de 1 mg/l dans les vins. Cette valeur résulte de la comparaison des résultats avec la méthode d'électrophorèse SDS décrite dans le Recueil des méthodes d'analyse (OIV-MA-AS315-12) dont le seuil limite de détection est de 1 mg/l

2. Domaine d'application

Cette méthode immunologique d'immunoempreinte s'applique aux vins blancs.

3. Principe

La méthode immunologique d'immunoempreinte se déroule en 3 étapes :

3.1 Dépôt de l'échantillon de vin sur une membrane de nitrocellulose
3.2 Détection des protéines instables
3.3 Révélation de la présence des protéines instables

L'intensité des spots colorés observés sur la membrane est proportionnelle à la quantité de protéines instables et au risque de casse protéique du vin.

4. Réactifs et produits

4.1 Liste des réactifs et produits

Sans indication contraire, les produits sont utilisés tels qu'ils sont commercialisés.

- 4.1.1 Eau ultra-pure : résistivité ≥ 18 MΩ.cm à 25°C
- 4.1.2 Vin très riche en protéines et vin ne contenant pas de protéine suite à un traitement à la bentonite. Ces vins sont utilisés respectivement pour les témoins Positif et Négatif : la vérification et la quantification des protéines présentes dans ces vins peuvent être réalisées par électrophorèse SDS-PAGE (Méthode OIV-MA-AS315-12)
- 4.1.3 Anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre les protéines instables du vin : voir Protocole en Annexe
- 4.1.4 Anticorps polyclonaux de Chèvre dirigé contre les anticorps IgA de lapin couplés à la peroxydase de raifort (noté par la suite : anticorps Goat anti-Rabbit-HRP)
- 4.1.5 Chlorure de sodium anhydre (NaCl) : N° CAS 7647-14-5
- 4.1.6 Tris-HCl anhydre : N° CAS 1185-53-1
- 4.1.7 HCl concentré en solution; pureté ≥ 36,5% : N° CAS 7647-01-0
- 4.1.8 Tween 20 : N° CAS 9005-64-5
- 4.1.9 Sérum Albumine Bovine (BSA) poudre lyophilisée; pureté ≥ 96% : N° CAS 9048-46-8
- 4.1.10 4-Chloro-1-naphthol; pureté ≥ 99% : N° CAS 604-44-4
- 4.1.11 Méthanol; pureté ≥ 99.8% : N° CAS 67-56-1
- 4.1.12 Eau Oxygénée en solution (H_2O_2); pureté ≥ 30% : N° CAS 7722-84-1

4.2 Préparation des solutions de travail

Toutes les solutions peuvent être conservées 1 an à 4°C.

4.2.1 Tampon TBS (Tris Buffered Saline)

Dissoudre 29,22 g de chlorure de sodium (4.1.5) et 2,42 g de Tris-HCl anhydre (4.1.6) dans 1 litre d'eau ultra-pure (4.1.1). Ajuster le pH à 7,5 avec une solution d'HCl concentré (4.1.7).

4.2.2 Tampon TBS-Tween 20

Dans le tampon TBS (4.2.1), ajouter 0,05% de Tween 20 (4.1.8).

4.2.3 Solution de blocage

Dans le tampon TBS (4.2.1), ajouter 4% de BSA (4.1.9).

4.2.4 Solution d'anticorps polyclonaux (du commerce ou selon le protocole décrit en annexe)
4.2.4.1 Diluer les anticorps polyclonaux anti-protéines instables (primaires) en fonction des recommandations commerciales ou de leurs titres dans un tampon TBS (4.2.1).
4.2.4.2 diluer les anticorps polyclonaux Goat anti-Rabbit-HRP (secondaires) en fonction des recommandations commerciales ou de leurs titres dans un tampon TBS (4.2.1)

4.2.5 Solutions pour révéler les protéines instables

4.2.5.1 Dissoudre 30 mg de 4-Chloro-1-naphthol (4.1.10) dans 10 mL de méthanol (4.1.11). Placer cette solution à -20 °C et à l'obscurité jusqu'à utilisation.
4.2.5.2 Mettre 30 µL d'H_2O_2 (4.1.12) dans 50 mL de TBS (4.2.1) extemporanément.

5. Matériel

5.1 Liste du matériel pour la réaction d'immunoempreinte :

5.1.1 Membrane de nitrocellulose avec des pores de 0,2 µm pour la réalisation de l'immunoempreinte

5.1.2 Pipettes automatiques de 0,5 – 10 µL et 100 – 1000 µL, cônes correspondants

5.1.3 Tubes, portoir à tubes pour les dilutions des anticorps

5.1.4 Éprouvettes graduées de classe A

5.1.5 Papier absorbant

5.1.6 Pince brucelles

5.1.7 Verrerie de laboratoire pour effectuer la réaction : petit cristallisoir, boite de Petri, tubes, bouchons, etc.

5.1.8 Agitateur plateforme (pour réaction en boite) ou rotatif (pour réaction en tube) de vitesse maximale 20 RPM.

5.2. Matériel nécessaire pour préparer les solutions:

5.2.1 Fioles jaugées classe A

5.2.2 pHmètre

5.2.3 Balance de précision au 0,1 mg

5.2.4 Centrifugeuse à 3000 g et tubes pour centrifugeuse.

6. Echantillonnage

Les échantillons doivent être prélevés et conservés à 4°C pour ne pas modifier les protéines naturellement présentes dans le vin.

6.1 Préparation de l'échantillon

Les échantillons (ou échantillons pour laboratoire) de vins sont déposés directement sur la membrane de nitrocellulose (5.1.1) à l'aide de la pipette (5.1.2), sans préparation préalable.

7. Mode opératoire

L'analyse peut être réalisée sur des vins non filtrés à la seule condition que ces vins ne contiennent pas de bentonite en suspension. Si tel est le cas, réaliser une centrifugation à 3000 g (5.2.4) pendant 10 min à température ambiante.
Comme indiqué au (3), la méthode immunologique d'immunoempreinte se déroule en 3 étapes, les réactions se font à une température ambiante comprise entre 18°C et 25°C.

7.1 Dépôt de l'échantillon de vin

Déposer 5 µL (5.1.2) de prise d'essai des échantillons et solutions témoins sur la membrane de nitrocellulose (5.1.1).
Laisser sécher 15-20 min à température ambiante.

7.2 Ajout des anticorps monoclonaux

7.2.1 Placer la membrane dans la boite ou le tube (5.1.7). Le volume des solutions sera fonction du contenant et de la taille de la membrane. Celle-ci doit être recouverte.
Les volumes ci-dessous sont pour un contenant de type petite boite de Petri (5.1.7).
Ajouter la solution de blocage (4.2.3). Agiter pendant au moins 30 minutes (5.1.8)

7.2.2 Le lavage s'effectue ainsi : Eliminer la solution en bloquant la membrane si besoin avec une pince. Ajouter 20 mL de TBS (4.2.1), agiter pendant quelques minutes (5.1.8).
Laver une seconde fois comme décrit ci-dessus et éliminer la solution.

7.2.3 Ajouter 20 mL de solution d'anticorps primaires (4.2.4.1).
Agiter pendant une heure (5.1.8).
Laver 3 fois avec la solution de TBS-Tween 20 (4.2.2).

7.2.4 Ajouter 20 mL de solution l'anticorps secondaires Goat anti-Rabbit-HRP (4.2.4.2)
Agiter pendant une heure.

7.2.5 Laver avec la solution de TBS-Tween 20 (4.2.2) comme ci-dessus pendant 5 min.
Laver 2 fois pendant 15 min avec la solution de TBS (4.2.1) comme décrit ci-dessus.
Eliminer la solution.

7.3 Révélation de la présence des protéines instables

7.3.1 Mélanger les 2 solutions pour révéler les protéines instables (4.2.5.1 et 4.2.5.2) et mettre en contact avec la membrane (5.1.1) ayant reçu le dépôt de vin et préparée selon le protocole 7.1 et 7.2 et agiter.
Un précipité de couleur noir - violet foncé à mauve apparaît sur la membrane à l'endroit où les protéines instables sont présentes.
L'intensité de la coloration est fonction de la concentration en protéines instables et donc du risque de casse protéique.
Après 20-30 min lorsque le spot correspondant au dépôt de la solution témoin positif (4.1.2) est très intense, stopper la coloration par lavage de la membrane de nitrocellulose (5.1.1) dans de l'eau.
Mettre la membrane à sécher entre 2 feuilles de papier absorbant (5.1.5).
Les résultats peuvent être interprétés lorsque la membrane est sèche.

8. Résultats

Pour que les résultats de la réaction soient interprétables :

- L'endroit du dépôt de la solution témoin colorimétrique positif doit présenter un spot d'intensité très intense (violet foncé-noir).
- L'endroit du dépôt de la solution témoin colorimétrique négatif ne doit présenter aucun spot.

- Le bruit de fond (endroit de la membrane ou aucun dépôt d'échantillon n'a été effectué) doit être très clair, voire blanc.

Un résultat semi-quantitatif peut être obtenu par réalisation d'une courbe étalon à partir d'un vin naturellement riche en protéine dont on réalisera une gamme de dilution. Cette courbe étalon sera fonction des surfaces obtenues par intégration de l'intensité des spots correspondant à la formation des immuno-complexes. L'analyse peut se faire avec le même équipement que celui utilisé pour analyser les gels d'électrophorèse décrits dans la Méthode OIV-MA-AS315-12.

L'interprétation des résultats peut également être réalisée visuellement.

8.1 Pour un contrôle direct sur le vin de la présence ou absence de protéines instables

Il y a présence de protéines dans l'échantillon pour le laboratoire si l'intensité du spot obtenu est plus intense que le spot de la solution témoin négatif.
L'intensité du spot obtenu après la réaction est proportionnelle à la quantité de protéines instables et de ce fait proportionnelle au risque de casse protéique dans ce vin.

8.2 Pour vérifier l'absence de protéines après un traitement (notamment à la bentonite)

Il y a présence de protéines dans l'échantillon si l'intensité du spot obtenu pour l'essai sans traitement bentonite est plus intense que le spot de la solution témoin colorimétrique négatif.

Dans le cas de l'application d'une « gamme de produits de traitement (bentonite) » en test de laboratoire, l'intensité des spots de chaque essai doit décroître parallèlement à l'augmentation de la concentration en produit de traitement. Lorsque pour un spot, cette intensité est nulle ou minimale mais constante vis-à-vis des autres points de gamme, on appliquera la dose de produit de traitement correspondante à ce spot pour obtenir la stabilité protéique du vin testé.

9. Annexes

Production des anticorps polyclonaux dirigés contre les protéines instables

Les anticorps dirigés contre les protéines instables des vins blancs et rosés peuvent être préparés chez le lapin. C'est leur spécificité qui rend la méthode fiable et précise.

9.1 Réalisation de la purification des Chitinase et Thaumatin-like

9.1.1 Liste des produits et du matériel

9.1.1.1 Eau ultra-pure : résistivité ≥ 18 MΩ.cm
9.1.1.2 Raisin de cuve récolté à maturité technologique (cépage Chardonnay ou Sauvignon blanc par exemple)
9.1.1.3 Acétate de sodium anhydre : N° CAS 127-09-3
9.1.1.4 Triton X-100 : N° CAS 9002-93-1
9.1.1.5 Sulfate d'ammonium anhydre : N° CAS 127-09-3
9.1.1.6 Chlorure de sodium anhydre (NaCl) : N° CAS 7647-14-5
9.1.1.7 Tris-HCl anhydre : N° CAS 1185-53-1
9.1.1.8 Acide chlohydrique pur 37% (N°Cas 7647-01-0)
9.1.1.9 solution d'hydroxyde de sodium NaoH 1M (N°Cas 1310-73-2)
9.1.1.10 Verrerie de laboratoire dont fioles jaugées et pipettes de classe A
9.1.1.11 Pince brucelles
9.1.1.12 Centrifugeuse à 10 000 g
9.1.1.13 Balance de laboratoire à 0,1 mg
9.1.1.14 pHmètre
9.1.1.15 Résine anionique forte
9.1.1.16 Résine anionique
9.1.1.17 Membrane de seuil de coupure de 10 kDa
9.1.1.18 Appareil de chromatographie liquide basse pression avec pompe à gradient de concentration
9.1.1.19 Détecteur mesurant l'absorbance à 280 nm
9. 1.1.20 Détecteur conductimétrique

9.1.2 Préparation du tampon acétate de sodium (9.1.1.3) dilué à 50 mM, 0,25 % Triton X-100 (9.1.1.4) à pH 5

Dans une fiole jaugée de 1 L (9.1.1.10) placer successivement
- 4,1 g d'acétate de sodium (9.1.1.3)
- 2,5 g de triton X-100 (9.1.1.4)
- compléter à 1 L avec de l'eau ultra-pure (9.1.1.1) et agiter ; ajustement du pH à 5 au moyen de HCl à 37% (9.1.1.8) pour éviter d'avoir un milieu basique qui pourrait avoir un rôle néfaste sur les protéines à extraire ou gèner l'extraction de celles-ci

9.1.3 Préparation du tampon Tris-HCl 50 mM, pH 8,0

Dans une fiole jaugée de 1 L (9.1.1.10) placer successivement
- 7,9 g de Tris HCl Anhydre (9.1.1.7)
- Compléter à 1 litre avec de l'eau ultra pure (9.1.1.1), ajuster à pH 8 au moyen d'une solution de NaOH 1M (9.1.1.9)

9.1.4 Préparation du tampon Tris-HCl 50 mM, 100 mM de NaCl

Dans une fiole jaugée de 1 L (9.1.1.10) placer successivement :
- 7,9 g de Tris Hcl Anhydre (9.1.1.7)
- 5,8 g de chlorure de sodium anhydre (9.1.1.6)
- Compléter à 1 L avec de l'eau ultra-pure (9.1.1.1) et agiter.

9.1.5 Préparation solution de chlorure de sodium à 100 mM

Dans une fiole jaugée de 1 L (9.1.1.10) placer successivement :- 5,8 g de chlorure de sodium anhydre (9.1.1.6)
- Compléter à 1 L avec de l'eau ultra-pure (9.1.1.1) et agiter

9.2 Mode opératoire

Des raisins de cépage Pinot noir ou Chardonnay sont récoltés à maturité et congelés à -20 °C. Les pépins sont enlevés des baies congelées avant broyage. 3 g de baies épépinées sont broyées dans 10 mL de tampon acétate de sodium (9.1.2) dilué à 50 mM, pH 5 contenant 0,25% de Triton X-100 (9.1.1.4).
Le matériel insoluble est enlevé par centrifugation (5 min à 3000 g) (9.1.1.12). Le surnageant (2 mL) est alors congelé à -20 °C pendant la nuit pour clarification. L'extrait est alors centrifugé à 10000 g pendant 15 min pour éliminer le matériel insoluble.
Du sulfate d'ammonium (9.1.1.5) est ajouté au surnageant jusqu'à la concentration de 30%. Le mélange est agité 1 heure à 4 °C puis centrifugé à nouveau comme ci-dessus.
Du sulfate d'ammonium (9.1.1.5) est à nouveau ajouté au surnageant jusqu'à la concentration finale de 60%. Le mélange est agité 2 heures à 4 °C puis centrifugé à nouveau comme ci-dessus.
Le précipité protéique est collecté puis re-dissous dans 1 mL de tampon Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 (9.1.3). Les protéines sont fixées sur une colonne contenant une résine anionique forte (5 x 30 cm) 9.1.1.15). La colonne est lavée avec le tampon Tris-HCl décrit ci-dessus. Chitinase et Thaumatin-like sont alors décrochées par un tampon Tris-HCl contenant 100 mM de NaCl. Toutes les fractions sont collectées puis dessalées sur une membrane de seuil de coupure de 10 kDa (9.1.1.17) avec le tampon Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 (9.1.3). Les fractions protéines dessalées sont passées sur une colonne de chromatographie basse pression (9.1.1.18) contenant une résine anionique (9.1.1.16). L'élution est réalisée avec 120 mL d'un gradient de NaCl (9.1.5) allant de 0 à 100 mM au moyen d'une pompe à gradient de concentration utilisant une solution A d'eau ultra pure (9.1.1.1) et une solution B de chlorure de sodium à 100 mM (9. 1.5). Les concentrations en protéines et en sel sont estimées respectivement en mesurant l'absorbance à 280 nm et la conductivité des fluides en sortie de colonne à l'aide des détecteurs (9.1.1.19 et 9.1.1.20). Les fractions protéiques de Chitinase et de Thaumatin-like ainsi purifiées et séparées sont utilisées pour la production des anticorps.

9.3 Production des anticorps polyclonaux anti-Chitinase et Thaumatin-like chez le lapin

Le protocole utilisé est identique à celui décrit dans la Méthode OIV-MA-AS315-12.

10. Bibliographie

1. **Anonymous.** 2004. "Recherche Des Matières Protéiques D'origine Végétale Dans Les Vins Et Les Moûts," OIV, *Résolution Oeno 24/2004.* 1-7. (Méthode OIV-MA-AS315-12).
2. **Derckel, J. P.; J. C. Audran; B. Haye; B. Lambert and L. Legendre.** 1998. "Characterization, Induction by Wounding and Salicylic Acid, and Activity against *Botrytis cinerea* of Chitinases and Beta-1,3-Glucanases of Ripening Grape Berries." *Physiologia Plantarum*, 104(1), 56-64.
3. **Manteau, S.; B. Lambert; P. Jeandet and L. Legendre.** 2003. "Changes in Chitinase and Thaumatin-Like Pathogenesis-Related Proteins of Grape Berries During the Champagne Winemaking Process." *American Journal of Enology and Viticulture*, 54(4), 267-72.
4. **Manteau, S. and P. Poinsaut.** 2010. "Instabilité Protéique Des Vins Blancs Et Rosés. Partie 2/2: Comparaison Des Tests De Stabilité Protéique Dans Les Vins Blancs Et Rosés Et Mise Au Point D'un Nouveau Test: L'immunoTest ™." *Revue des Œnologues*, 135, 23-27.
5. **Manteau, S.; F.-X. Sauvage; P. Poinsaut; B. Scotti; N. Sieczkowski and M. Moutounet.** 2006. "Haze in White Wine: Involvement of Proteins Other Than Pathogenesis-Related Proteins in Spontaneous Haze," P. Jeandet, C. Clement and A. Conreux, *Macrowine: Macromolecules and Secondary Metabolites of Grape and Wine.* Reims: Intercept Publishers - Lavoisier, 165-68.
6. **Ribéreau-Gayon, J. and E. Peynaud.** 1961. "Précipitation Des Protéines," *Traité D'oenologie. Tome II - Composition, Transformations Et Traitements Des Vins.* Librairie Polytechnique Ch. Béranger, 346-356.
7. **Waters, E.; Y. Hayasaka; D. Tattersall; K. Adams and P. Williams.** 1998. "Sequence Analysis of Grape (*Vitis Vinifera*) Berry Chitinases That Cause Haze Formation in Wines." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(12), 4950-57.

OMéthode OIV-MA-AS315-30 Méthode Type IV

Dosage des alkylphénols dans les vins par chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse (GC-MS ou GC-MS/MS)

(Résolution OIV-OENO 620-2020)

1. Domaine d'application

La méthode suivante permet le dosage des molécules suivantes :

	Gamme étudiée
• 2-*tert*-butylphénol	1 - 100 µg/L
• 4-*tert*-butylphénol	1 - 100 µg/L
• 6-méthyl-2-*tert*-butylphénol	1 - 100 µg/L
• 4-méthyl-2-*tert*-butylphénol	1 - 100 µg/L
• 5-méthyl-2-*tert*-butylphénol	1 - 100 µg/L
• 4,6-di-méthyl-2-*tert*-butylphénol	1 - 100 µg/L
• 2,6-di-*tert*-butylphénol	1 - 100 µg/L
• 2,4-di-*tert*-butylphénol	1 - 100 µg/L

2. Références normatives

- ISO 78-2 : Chimie – Plans de normes
- ISO 3696 : Eau pour laboratoire à usage analytique
- Résolution OIV OENO 418-2013

3. Principe de la méthode

La méthode décrit d'une part l'analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée avec un
spectromètre de masse, GC-MS, et d'autre part, en chromatographie en phase gazeuse couplée avec un spectromètre de masse en tandem GC-MS/MS. L'extraction de l'échantillon se fait en espace de tête par la technique de micro-extraction sur phase solide (SPME).

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. Ethanol absolu ; (CAS 64-17-5)
4.1.3. Chlorure de sodium ; (CAS 7647-14-5)
4.1.4. 4-tert-butylphénol D13 ; (CAS 225386-58-3)
4.1.5. 4-tert-butylphénol ; (CAS 98-54-4)
4.1.6. 2-tert-butylphénol ; (CAS 88-18-6)
4.1.7. 4-méthyl-2-tert-butylphénol ; (CAS 2409-55-4)
4.1.8. 5-méthyl-2-tert-butylphénol ; (CAS 88-60-8)
4.1.9. 6-méthyl-2-tert-butylphénol ; (CAS 2219-82-1)
4.1.10. 4,6-di-méthyl-2-tert-butylphénol ; (CAS 1879-09-0)
4.1.11. 2,4-di-tert-butylphénol ; (CAS 96-76-4)
4.1.12. 2,6-di-tert-butylphénol ; (CAS 128-39-2)

4.2. Solutions mères

Des solutions mères individuelles à 1g/L sont préparées dans l'éthanol pour chaque alkylphénol ainsi que pour l'étalon interne (par exemple : 4-tert-butylphénol D13).

A partir des solutions mères individuelles, des solutions filles mélanges sont préparées dans l'éthanol aux concentrations souhaitées afin de pouvoir couvrir l'ensemble de la gamme de mesure.

4.3. Solutions d'étalonnage

Afin d'assurer le raccordement au plus près au système international d'unités (S.I.) la gamme d'étalonnage doit être réalisée avec des solutions et poudres pures (grade élevés) des différents alkylphénols, préparées par pesée ou volumétrie métrologiquement raccordées au SI.

La gamme d'étalonnage est réalisée dans des solutions à 12% v/v d'éthanol (4.1.2). La gamme de mesure (de 1 à 100 µg.L-1), par exemple comporte 5 points. Ces solutions sont préparées au moment de l'analyse et sont à utiliser dans des délais rapides après préparation (quelques heures).

L'équation d''étalonnage obtenue est généralement une fonction quadratique.

5. Appareillage

5.1. GC-MS équipé d'un injecteur "split – splitless" et d'un détecteur à spectromètre de masse ou à spectromètre de masse en tandem
5.2. Colonne capillaire de phase stationnaire apolaire, 5% phénylmethylpolysiloxane (ex: 5MS, 30m x 0,25 mm x 0,25 µm de film) ou équivalente.
5.3. Micropipettes 100 µL, 1mL et 10mL étalonnées
5.4. Vial SPME de 20 mL, fermant avec une capsule perforée, et opercule à face téflonée
5.5. Système de microextraction sur phase solide (SPME), avec fibre revêtue d'un film de polydiméthylsiloxane de 100 µm d'épaisseur, ou équivalent
5.6. Balance
Celle-ci doit être raccordée au SI et avoir une précision de 0.1 mg.
5.7. Verrerie de mesure

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

6. Echantillonnage

Un standard interne, le 4-tert-butylphénol D13 est utilisé ici l'est à titre d'exemple, et d'autres standards internes sont possibles.

10 mL de vin sont placés dans un flacon SPME en verre de 20 mL (5.4), avec 2 g environ de NaCl (4.1.3), et 50 µl d'une solution de 4-tert-butylphénol D13 (standard interne) à 5 mg/L (4.1.4).
Le flacon est scellé avec une capsule perforée et opercule à face téflonée (5.4).

7. Mode opératoire GC/MS

Le mode opératoire est donné à titre d'exemple. La technique GC/MS utilisée permettant des variantes ou des optimisations nécessaires à chaque configuration matérielle.

7.1. Extraction
L'extraction Head Space – SPME se fait pendant 20 minutes à 40°C

7.2. Injection
La désorption de la fibre se fait pendant 10 minutes dans l'injecteur
Injecteur à 260°C en mode splitless
Débit hélium : 1mL/min

7.3. Paramétrage chromatographe en phase gazeuse
Colonne : 5MS UI 30m x 0,25mm x 0,25µm
Ligne de transfert : 300°C
Four : 50°C
Puis 10°C/min jusqu'à 300°C
Puis 300°C pendant 3 minutes
Temps d'analyse : 28,0 minutes

7.4. Acquisition
Température source : 250°C
Température quad : 150°C
Acquisition : SIM

	Tr (min)	Ions de quantification	Ions de qualification
2-*tert*-butylphénol	8,9	135	107 - 150
4-*tert*-butylphénol d13 (IS)	9,1	145	113 - 163
4-*tert*-butylphénol	9,2	135	107 - 150
6-méthyl-2-*tert*-butylphénol	9,4	149	164 - 121
4-méthyl-2-*tert*-butylphénol	10,0	149	164 - 121
5-méthyl-2-*tert*-butylphénol	10,2	149	164 - 121
4,6-diméthyl-2-*tert*-butylphénol	10,5	163	135 - 178
2,6-di-*tert*-butylphénol	11,2	191	206 - 192
2,4-di-*tert*-butylphénol	12,0	191	206 - 192

Tableau 1 : Ions utilisés en spectrométrie de masse.

8. Mode opératoire GC/MSMS

Le mode opératoire est donné à titre d'exemple. La technique GC/MS-MS utilisée permettant des variantes ou des optimisations nécessaires à chaque configuration matérielle.

8.1. Extraction
L'extraction « head space » – SPME se fait pendant 5 minutes à 40°C

8.2. Injection
La désorption de la fibre se fait pendant 8 minutes dans l'injecteur
Injecteur à 250°C en mode Pulsed-split avec un ratio de 2 :1
Débit hélium : 2mL/min

8.3.Paramétrage chromatographe en phase gazeuse
Colonne : 5MS UI 30m x 0,25 mm x 0,25 µm, ou équivalente.
Ligne de transfert : 300°C
Four : 50°C
Puis 25°C/min jusqu'à 130°C
Puis 10°C/min jusqu'à 170°C
Puis 25°C/min jusqu'à 300°C
Puis 300°C pendant 3 minutes
Temps de run : 15,4 minutes

8.4. Acquisition
Température source : 250°C
Température quad : 150°C
Acquisition : MRM

	Tr (min)	Transitions de quantification	Transition de qualification
2-*tert*-butylphénol	5,0	135>107	150>107 & 150>135
4-*tert*-butylphénol D13 (IS)	5,1	145>113	163>113 & 163>145
4-*tert*-butylphénol	5,2	135>107	150>107 & 150>135
6-méthyl-2-*tert*-butylphénol	5,3	149>121	164>121 & 164>149
4-méthyl-2-*tert*-butylphénol	5,7	149>121	164>121 & 164>149
5-méthyl-2-*tert*-butylphénol	5,8	149>121	164>121 & 164>149
4,6-diméthyl-2-*tert*-butylphénol	6,1	163>135	178>135 & 178>163
2,6-di-*tert*-butylphénol	6,6	206>191	191>163 & 191>57
2,4-di-*tert*-butylphénol	7,2	191>57	191>163 & 206>191

Tableau 2 : Ions utilisés en spectrométrie de masse en tandem.

9. Expression des résultats

Les résultats sont exprimés en µg/L.

10. Annexe 1 : Résultats de validation interne

Les performances ont été mesurées avec un plan d'expérience intralaboratoire : 5 matériaux couvrant le domaine d'application de la méthode (1 ; 5 ; 25 ; 50 ; 100µg/L) ont été constitués par formulation, dans une matrice vin synthétique (solution hydroalcoolique à 12 % v/v, 6 g/L acide tartrique, ajustement pH 3,5 avec NaOH 1M)

Chaque matériau est analysé 5 fois en conditions de fidélité intermédiaire avec 2 répétitions à chaque analyse. Les analyses ont été réalisées en septembre et octobre 2018.

Les calculs sont réalisés conformément à résolution OIV ŒNO 418/2013 : « Guide pratique pour l'évaluation, le contrôle qualité et l'étude des incertitudes d'une méthode d'analyse œnologique ».

GC/MS	CV % (k=2) Fidélité intermédiaire	CVr (%) (k=2) Répétabilité	LQ Validée
2-*tert*-butylphénol	6,7%	4,3 %	1µg/L
4-*tert*-butylphénol	7,3%	5,1 %	1µg/L
6-méthyl-2-*tert*-butylphénol	12,1%	10,2 %	1µg/L
4-méthyl-2-*tert*-butylphénol	6,0%	4,6 %	1µg/L
5-méthyl-2-*tert*-butylphénol	6,4%	4,9 %	1µg/L
4,6-diméthyl-2-*tert*-butylphénol	12,7%	10,5 %	1µg/L
2,6-di-*tert*-butylphénol	19,5%	14,6 %	1µg/L
2,4-di-*tert*-butylphénol	11,9%	9,9 %	1µg/L

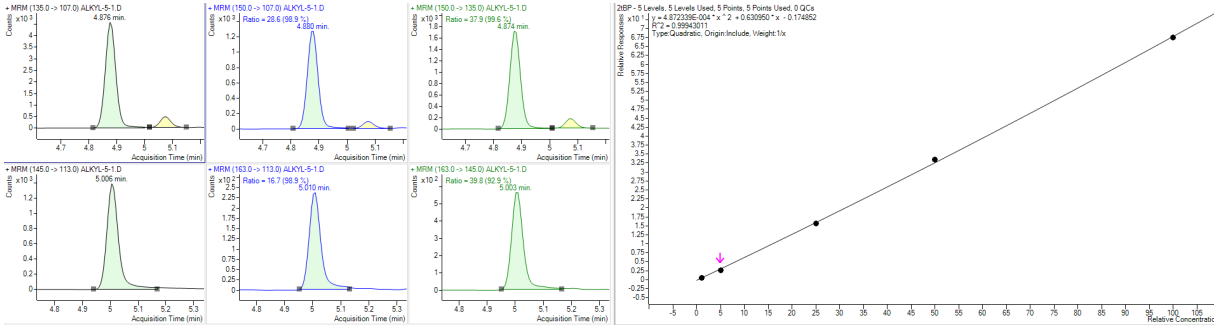
Tableau 3 : Performances obtenues avec la spectrométrie de masse.

GC/MSMS	CV % (k=2) Fidélité intermédialire	CVr (%) (k=2) Répétabilité	LQ Validée
2-*tert*-butylphénol	11,3%	10,1 %	1µg/L
4-*tert*-butylphénol	10,4%	11,0 %	1µg/L
6-méthyl-2-*tert*-butylphénol	13,9%	13,5 %	1µg/L
4-méthyl-2-*tert*-butylphénol	11,1%	9,6 %	1µg/L
5-méthyl-2-*tert*-butylphénol	12,3%	10,3 %	1µg/L
4,6-diméthyl-2-*tert*-butylphénol	13,4%	12,6 %	1µg/L
2,6-di-*tert*-butylphénol	16,6%	16,8 %	1µg/L
2,4-di-*tert*-butylphénol	14,5%	12,4 %	1µg/L

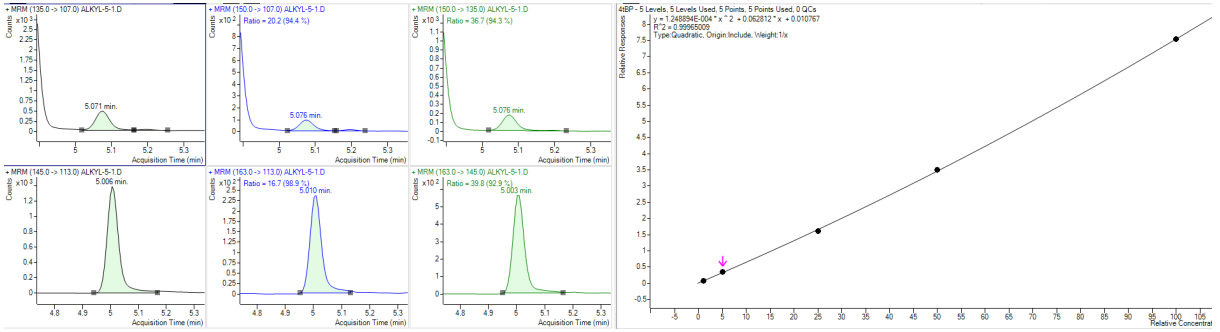
Tableau 4 : Performances obtenues avec la spectrométrie de masse en tandem.

11. Annexe 2 : Exemples de chromatogrammes et de courbes d'étalonnage

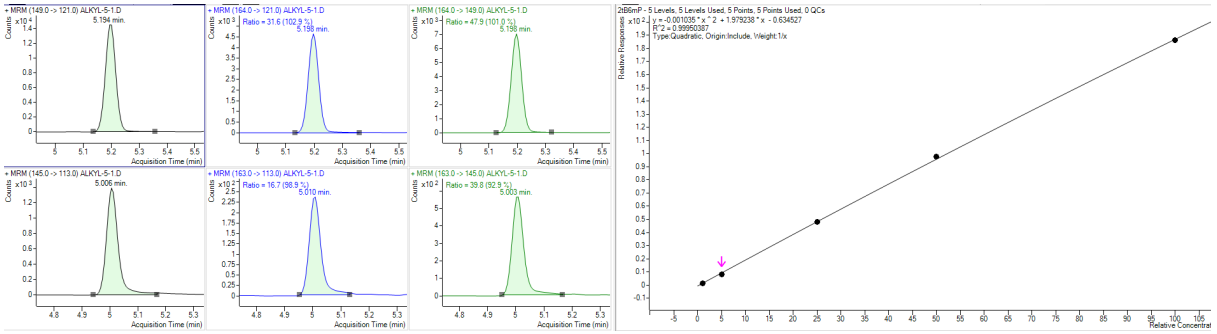
11.1.2-tert-butylphénol



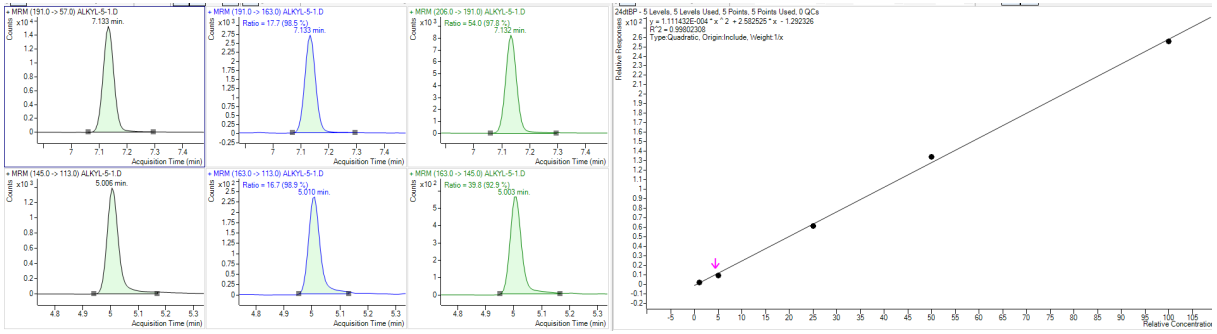
11.2. 4-tert-butylphénol



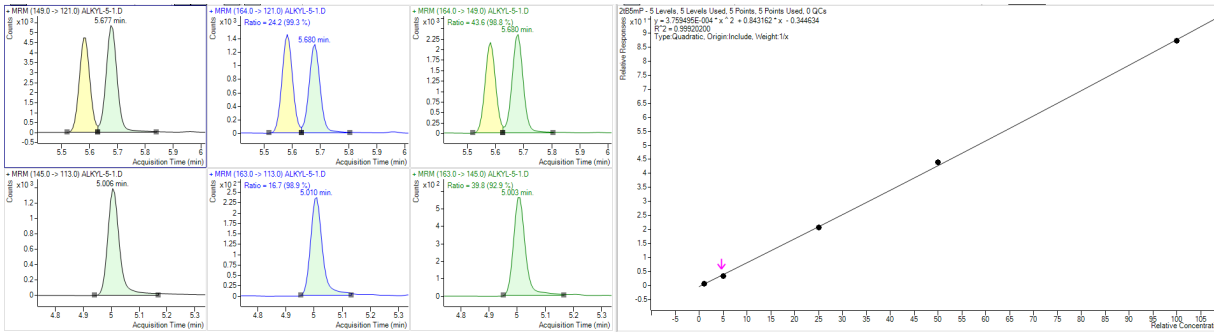
11.3. 6-méthyl-2-tert-butylphénol



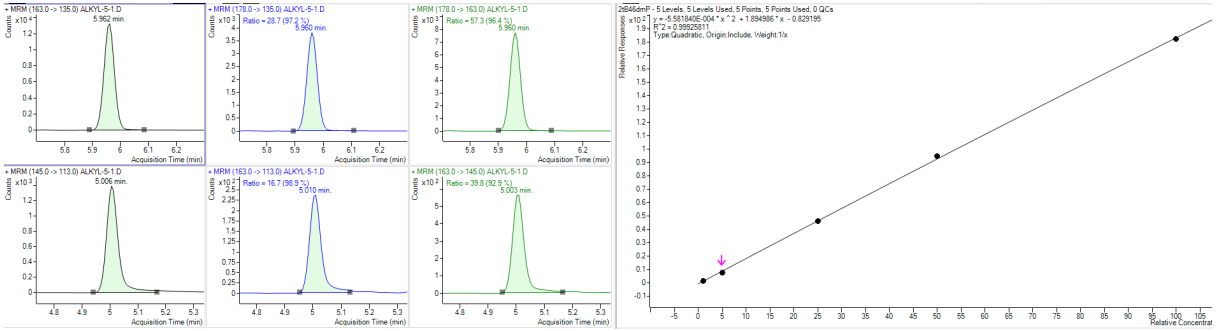
11.4. 4-méthyl-2-tert-butylphénol



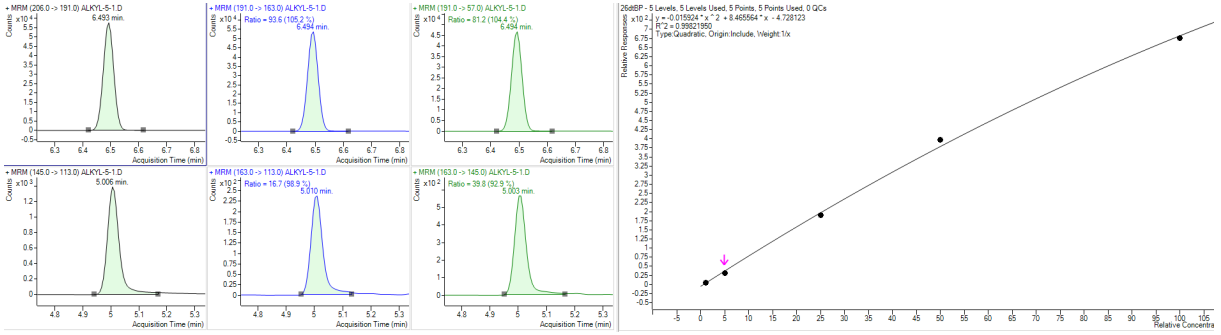
11.5. 5-méthyl-2-tert-butylphénol



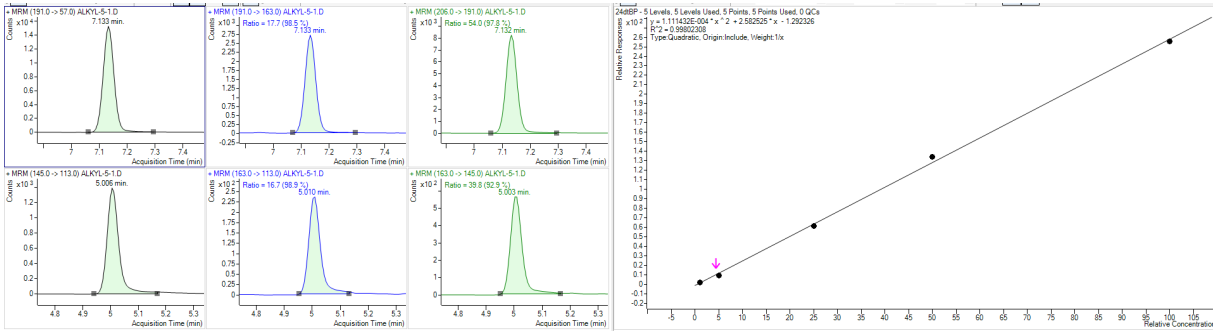
11.6.4,6-diméthyl-2-tert-butylphénol



11.7. 2,6-di-tert-butylphénol



11.8. 2,4-di-tert-butylphénol



Méthode OIV-MA-AS315-31 Méthodes Type IV

Détermination qualitative des édulcorants dans le vin par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (CL-SM)

(Résolution OIV-OENO 636-2021)

1. Domaine d'application

La présente méthode est adaptée pour la détermination de la présence de cinq édulcorants artificiels (aspartame, acésulfame potassium, cyclamate de sodium, saccharine et sucralose), ainsi que de l'édulcorant naturel stévioside, dans les vins blancs, rosés et rouges.

2. Définitions

ESI : ionisation par électronébuliseur

CL : chromatographie en phase liquide

CL-SM : chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse

m/z : rapport masse sur charge

SM : spectrométrie de masse

SM/SM : mode d'acquisition de la spectrométrie de masse mesurant les ions d'un produit

Q-TOF : spectrométrie de masse à analyseur quadripolaire et à temps de vol

RP : phase inverse

TR : temps de rétention

CLUHP : chromatographie en phase liquide ultra-haute performance

3. Principe

Le vin est analysé directement par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (système CL-SM). Dans la chromatographie en phase liquide (CL), la séparation est réalisée en utilisant une colonne en phase inversée (RP) et la détection est accomplie par spectrométrie de masse (SM) en fonction du rapport masse sur charge (m/z) des composés. Les données de la SM combinées au temps de rétention (TR) sont utilisées pour l'identification et la quantification des édulcorants.

4. Réactifs et matériel

4.1. Réactifs

4.1.1. Acétonitrile, pureté ≥ 99,95 % (n° CAS : 75-05-8)
4.1.2. Eau purifiée : 18 MΩ·cm, COT ≤ 5 µg/L
4.1.3. Acide formique, pureté ≥ 98,0 % (n° CAS : 64-18-6)
4.1.4. Aspartame, pureté ≥ 99,0 % (n° CAS : 22839-47-0)
4.1.5. Acésulfame K, pureté ≥ 99,9 % (n° CAS : 55589-62-3)
4.1.6. Cyclamate de sodium, pureté ≥ 99,8 % (n° CAS : 139-05-9)
4.1.7. Saccharine, pureté ≥ 99,0 % (n° CAS : 81-07-2)
4.1.8. Sucralose, pureté ≥ 98,0 % (n° CAS : 56038-13-2)
4.1.9. Stévioside, pureté ≥ 95,0 % (n° CAS : 57817-89-7)
4.1.10. Vins représentatifs des matrices de travail et préalablement contrôlés comme étant dépourvus de tout édulcorant, afin d'être utilisés pour la préparation des solutions d'étalonnage et des étalons

4.2. Préparation de la solution (à titre d'exemple)

Les étalons et solutions d'étalonnage sont conservés au réfrigérateur à environ 6 °C. Les solutions d'aspartame sont instables dans les médias acides, et elles doivent donc être fraîchement préparées chaque fois que l'étalon est analysé.

4.2.1. Solutions étalons

Les solutions étalons individuelles à 1 g/L sont par exemple préparées en dissolvant 10,0 mg de chaque édulcorant dans des fioles jaugées de 10 mL, complétées au trait de jauge avec de l'eau (4.1.2) ou une solution d'éthanol à 12 % v/v.

4.2.2. Étalons

Les étalons sont préparés et analysés par CL-SM comme tout autre échantillon (voir point 6).

Les étalons sont préparés dans le vin (4.1.10) en diluant la quantité appropriée de solution étalon (4.2.1) permettant d'obtenir des concentrations de 50 µg/L, 100 µg/L, 500 µg/L et 1000 µg/L de chaque édulcorant.

En cas de nécessité d'une performance accrue de la méthode, il est recommandé de procéder à l'étalonnage avec la même matrice que celle à évaluer.

5. Appareillage

5.1. Filtres seringues : membrane en polypropylène à pores de 0,2 µm, de 25 mm de diamètre

5.2. Verrerie de laboratoire, à savoir fioles volumétriques de classe A

5.3. Balance analytique d'une résolution de ± 0,0001 g

5.4. Micropipettes pour des volumes allant de 5 à 1000 µL

5.5. Instrument de chromatographie en phase liquide à haute performance couplé à un spectromètre de masse

5.5.1. Il est possible d'utiliser des systèmes standards de CLHP et de CLUP en réglant les conditions de la séparation chromatographique en conséquence.

5.5.2. Diverses configurations du système SM sont possibles, tels que quadripôle, piège ionique, temps de vol, ainsi que des systèmes hybrides.

6. Préparation des échantillons

Chaque échantillon de vin est préparé par filtration à l'aide d'un filtre seringue (5.1) avant l'injection.

Les échantillons sont préalablement dégazés si nécessaire, en utilisant par exemple un bain à ultrasons ou un barbotage à l'azote. Si les concentrations ne coïncident pas avec la plage d'étalonnage, les échantillons devraient être dilués.

Il est possible d'obtenir une performance accrue en intégrant des étapes supplémentaires à la préparation des échantillons, telles que la dilution (en fonction de la sensibilité de l'instrument), la purification des échantillons et l'extraction.

7. Mode opératoire

La description suivante, fournie à titre d'exemple, se réfère à un instrument de CLUHP-Q-TOF équipé d'une source d'ESI. Des modifications peuvent devoir être réalisées selon le type d'équipement et les prescriptions du fabricant.

7.1. Analyse CL

- Phase mobile A : eau purifiée (4.1.2) contenant 0,1 % d'acide formique (4.1.3)
- Phase mobile B : acétonitrile (4.1.1) contenant 0,1 % d'acide formique (4.1.3)
- Volume d'injection : 2 µL
- Température de l'échantillonneur : 10 °C
- Colonne : RP C8 2,1 mm x 100 mm, 1,9 µm
- Température du four de la colonne : 30 °C
- Gradient :

Temps min	Débit mL/min	% A	% B
0	0,4	90	10
3	0,4	60	40
3	0,4	1	99
4	0,4	1	99
4	0,8	1	99
5,5	0,8	1	99
5,5	0,5	90	10
9,5	0,5	90	10
9,5	0,4	90	10
10	0,4	90	10

7.2. Paramètres de la spectrométrie de masse

- ESI : ionisation négative
- Température de la source : 200 °C
- Tension capillaire : 3000 V
- Mode d'acquisition : dissociation induite par collision en mode large bande (bbCID)
    - Cela consiste en une acquisition alternée de spectres en modes balayage intégral et SM-SM (acquisition des ions du précurseur et du produit respectivement)
- Énergie de collision : 30 eV
- Fréquence d'acquisition du spectre : 2,0 Hz
- Débit du gaz sec : 8 L/min
- Pression du nébuliseur : 2,0 x 10^5 Pa (2,0 bar)

8. Identification

L'identification des édulcorants est confirmée en utilisant un étalon pour chaque composé (4.1.4, 4.1.5, 4.1.6, 4.1.7, 4.1.8 et 4.1.9). Les données orientatives récoltées pour la confirmation du pic sont le temps de rétention TR (pouvant varier en fonction des paramètres chromatographiques) et la m/z des ions du précurseur et du produit (Tableau 1).

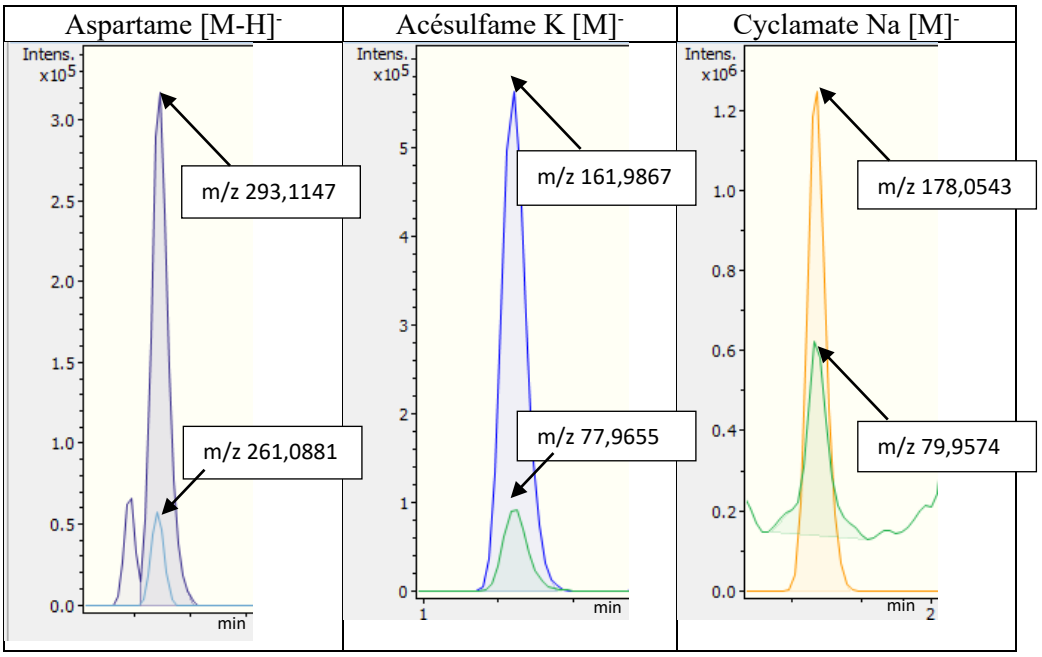
Tableau 4. Données d'identification des édulcorants : TR, m/z du précurseur et m/z du produit

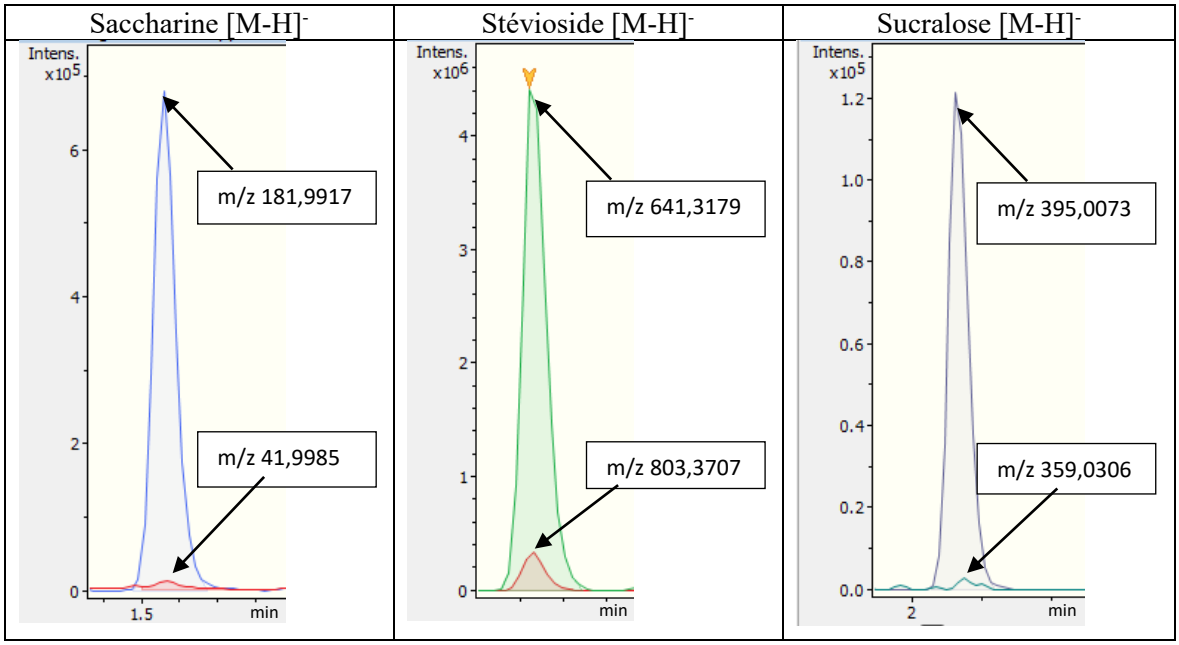
Édulcorant	TR min	Ion	*m/z du précurseur*	*m/z du produit*
Acésulfame K	1,24	$[M]^-$	<u>161,9867</u>	77,9655
Aspartame	2,30	$[M-H]^-$	<u>293,1143</u>	261,0881
Cyclamate Na	1,66	$[M]^-$	<u>178,0543</u>	79,9574
Saccharine	1,55	$[M-H]^-$	<u>181,9917</u>	41,9985
Sucralose	2,14	$[M-H]^-$	<u>395,0073</u>	359,0306
Stévioside	3,63	$[M-H]^-$	803,3707	<u>641,3026</u>

Note : Les ions utilisés pour la quantification sont soulignés dans le Tableau 1.

Les signaux ioniques sont suivis avec les chromatogrammes des ions extraits avec une tolérance de ±3 mDa (Figure 1).

Figure 3. Confirmation des pics du précurseur et du produit pour un étalon à 250 µg/L





Remarque : Un exemple de sensibilité pour un étalon de faible concentration et d'autres transitions sont fournis en annexe.

9. Calculs

Les résultats sont calculés à partir de la courbe d'étalonnage obtenue avec la quantité (µg/L) fonction de l'aire du pic de chaque édulcorant :

$$C = \frac{A_e - Int}{P}$$

où C est la concentration de l'édulcorant (µg/L), A_e l'aire du pic de l'échantillon, Int l'ordonnée à l'origine de la courbe d'étalonnage et P la pente de la courbe d'étalonnage.

10. Résultats

Les concentrations sont exprimées en µg/L, sans décimales.

11. Validation interne

11.1. Matrices

La validation a été réalisée en utilisant un total de 43 vins différents : 20 vins rouges, 10 vins rosés et 13 vins blancs. Ces vins ont été choisis à partir de plusieurs régions, de manière à obtenir une grande variabilité au niveau des caractéristiques, permettant une approche exhaustive. Les principales caractéristiques des vins sont résumées dans le tableau ci-après.

Tableau 2. Principales caractéristiques des matrices

	Vins rouges (R)	Vins rosés (Ro)	Vins blancs (W)
Régions	Alentejo 4 Bairrada 1 Dão 3 Douro 4 Lisboa 1 Valladolid 1 Autre(1) 6	Douro 3 Vinho Verde 1 Autre(1) 6	Açores 1 Alentejo 2 Dão 1 Douro 1 Lisboa 1 Vinho Verde 4 Autre(1) 3
Titre alcoométrique volumique % v/v	12,1-17,2	9,8-12,6	8,7-13,6
Teneur en sucres g/L (glucose + fructose)	0,5-108,0	0,7-28,8	0,2-17,1

Acidité totale g/L (acide tartrique)	4,6-6,4	4,7-6,0	5,2-7,1
pH	3,5-3,8	3,2-3,5	3,2-3,4
Intensité	2,4-16,2	0,1-0,5	0,03-0,29[(2)]

[(1)] Sans indication géographique
[(2)] Absorbance à 420 nm au lieu de l'intensité

11.2. Linéarité

La méthode s'est révélée linéaire dans une plage de concentration située entre 50 µg/L et 1000 µg/L.

11.3. Étalonnage

Au total, 14 étalonnages indépendants ont été réalisés, avec 6 vins rouges, 4 vins rosés et 4 vins blancs. Trois approches différentes ont été envisagées pour chaque composé en considérant :

- un étalonnage unifié pour toutes les matrices,
- deux groupes de matrices comptant un groupe pour les vins blancs et un deuxième pour les autres vins (vins rouges et vins rosés),
- trois groupes de matrices comptant des vins blancs, des vins rosés et des vins rouges.

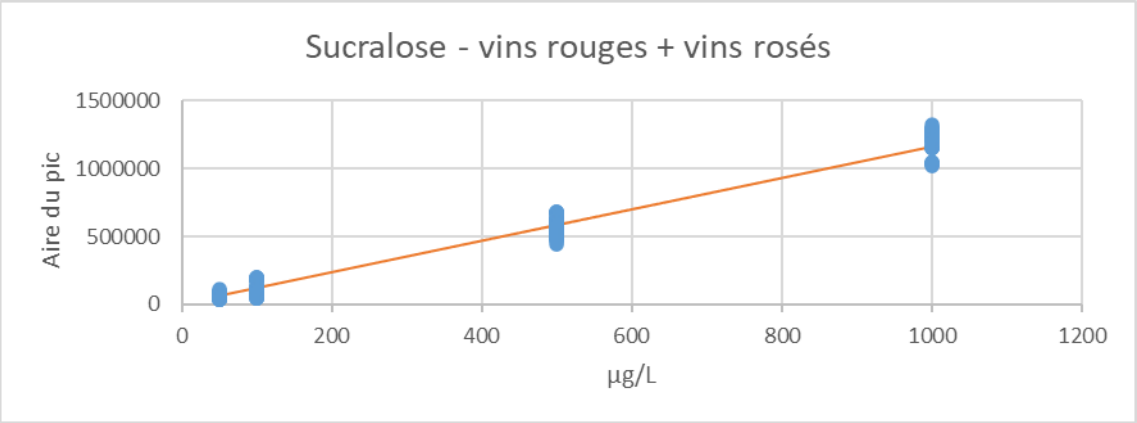
Les résultats optimisés de l'étude de validation sont présentés ci-après. Conditions d'étalonnage choisies : pour l'acésulfame, la saccharine et le sucralose, les fonctions d'étalonnage et les calculs postérieurs ont été réalisés en considérant un groupe pour les vins blancs et un deuxième groupe pour les autres matrices (vins rouges et vins rosés) ; pour l'aspartame, le cyclamate et le stévioside, trois groupes de matrices ont été considérés (vins rouges, vins rosés et vins blancs).

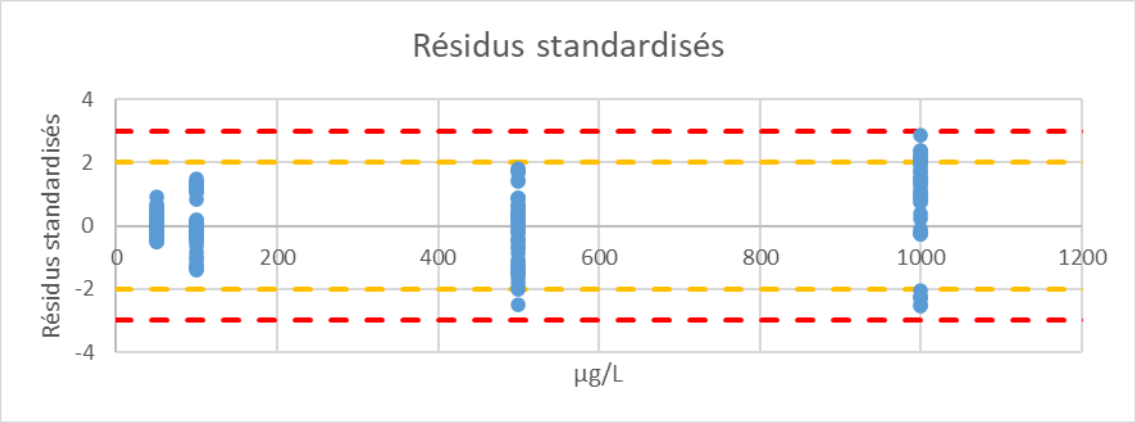
Tableau 3. Schéma d'étalonnage pour chacun des composés

Étalonnages	Individuel			Combiné
Matrices	Vins blancs	Vins rosés	Vins rouges	Vins rouges + vins rosés
Acésulfame	X			X
Aspartame	X	X	X	
Cyclamate	X	X	X	
Saccharine	X			X
Stévioside	X	X	X	
Sucralose	X			X

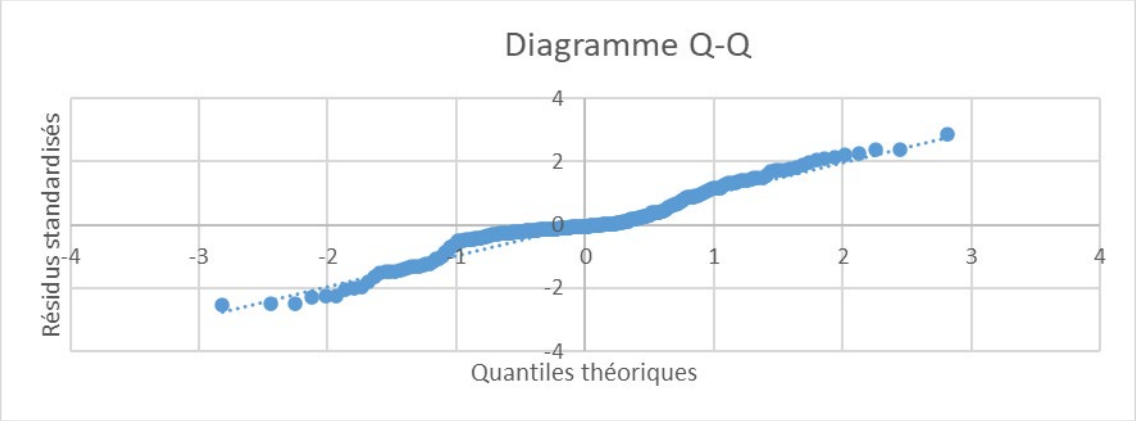
Compte tenu de l'hétéroscédasticité et de la distribution normale des résidus, les moindres carrés pondérés ont été employés comme modèle de régression. À titre d'exemple, le cas du sucralose pour le groupe des vins rouges et des vins rosés dans une plage de concentration de 50 µg/L à 1000 µg/L est présenté ci-après.

Figure 4. Courbe d'étalonnage, résidus standardisés et diagramme Q-Q pour l'étalonnage combiné vins rouges + vins rosés pour le sucralose





jaune	2× écart type
rouge	3× écart type



11.4. Limites de détection et limites de quantification

Les limites de quantification ont été calculées à partir des courbes d'étalonnage.

Tableau 4. LD et LQ obtenues pour chaque composé

LD (mg/L)	LQ (mg/L)

	Vins blancs	Vins rosés	Vins rouges	Vins blancs	Vins rosés	Vins rouges
Acesulfame K	0,003	0,003		0,011	0,011	
Aspartame	0,004	0,006	0,004	0,014	0.019	0.014
Cyclamate Na	0,002	0,005	0,004	0,006	0.015	0.014
Saccharin	0,002	0,005		0,006	0,016	
Stevioside	0,002	0,002	0,005	0,005	0.005	0.016
Sucralose	0,014	0,007		0,048	0,022	

11.5. Répétabilité

La répétabilité a été évaluée à trois niveaux de fortification : 50 µg/L, correspondant à la limite de notification, 250 µg/L et 1000 µg/L. Cette évaluation est basée sur huit répétitions d'injection à chaque niveau de fortification et pour chaque matrice.

Les tableaux ci-après présentent les valeurs de répétabilité obtenues pour chaque édulcorant, comprenant la concentration moyenne mesurée dans chaque échantillon, l'écart type (ET), l'écart type relatif (RSD_r%) et la valeur HorRat de répétabilité [HorRat (r)].

Tableau 5. Valeurs de répétabilité pour l'acésulfame potassium aux trois niveaux de fortification

Acésulfame	Vins blancs (W)								
Échantillon	W1	W2	W3	W4	W5	W6	W7	W8	W9
Moyenne µg/L	45	42	49	233	207	240	1036	926	1060
Écart type	1,4	2,1	0,8	3,3	5,2	2,6	13,2	13,7	15,8
Recouvrement %	89 %	84 %	98 %	93 %	83 %	96 %	104 %	93 %	106 %
RSDr %	3,2 %	5,0 %	1,6 %	1,4 %	2,5 %	1,1 %	1,3 %	1,5 %	1,5 %
HorRat (r)	0,13	0,20	0,06	0,07	0,13	0,05	0,08	0,09	0,09

Acésulfame	Vins rosés (Ro)								
Échantillon	Ro1	Ro2	Ro3	Ro4	Ro5	Ro6	Ro7	Ro8	Ro9
Moyenne µg/L	49	52	53	248	248	247	1063	1091	1097
Écart type	2,0	1,2	1,4	2,9	3,5	3,9	14,1	13,2	15,5
Recouvrement %	98 %	104 %	107 %	99 %	99 %	99 %	106 %	109 %	110 %
RSDr %	4,1 %	2,3 %	2,6 %	1,2 %	1,4 %	1,6 %	1,3 %	1,2 %	1,4 %
HorRat (r)	0,17	0,09	0,10	0,06	0,07	0,08	0,08	0,08	0,09

Acésulfame	Vins rouges (R)								
Échantillon	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9
Moyenne µg/L	56	50	57	275	241	260	1195	1064	1160
Écart type	1,2	2,0	1,4	3,2	5,1	4,3	13,8	14,5	10,0
Recouvrement %	112 %	101 %	115 %	110 %	96 %	104 %	120 %	106 %	116 %
RSDr %	2,1 %	3,9 %	2,4 %	1,2 %	2,1 %	1,6 %	1,2 %	1,4 %	0,9 %
HorRat (r)	0,08	0,16	0,10	0,06	0,11	0,08	0,07	0,09	0,05

Tableau 6. Valeurs de répétabilité pour l'aspartame aux trois niveaux de fortification

Aspartame	Vins blancs (W)								
Échantillon	W1	W2	W3	W4	W5	W6	W7	W8	W9
Moyenne µg/L	34	51	45	237	231	235	981	973	982
Écart type	7,3	4,2	6,7	27,5	7,6	10,9	29,0	18,0	23,2
Recouvrement %	68 %	101 %	91 %	95 %	92 %	94 %	98 %	97 %	98 %

RSDr %	21,6 %	8,3 %	14,7 %	11,6 %	3,3 %	4,6 %	3,0 %	1,8 %	2,4 %
HorRat (r)	0,87	0,33	0,59	0,59	0,17	0,24	0,19	0,12	0,15

Aspartame	Vins rosés (Ro)								
Échantillon	Ro1	Ro2	Ro3	Ro4	Ro5	Ro6	Ro7	Ro8	Ro9
Moyenne µg/L	38	42	41	200	211	210	833	905	916
Écart type	3,0	2,9	4,3	6,8	5,2	5,9	20,9	34,0	22,5
Recouvrement %	75 %	85 %	82 %	80 %	84 %	84 %	83 %	90 %	92 %
RSDr %	8,0 %	6,9 %	10,6 %	3,4 %	2,5 %	2,8 %	2,5 %	3,8 %	2,5 %
HorRat (r)	0,32	0,28	0,43	0,17	0,13	0,14	0,16	0,24	0,15

Aspartame	Vins rouges (R)								
Échantillon	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9
Moyenne µg/L	46	51	50	227	254	230	956	1099	1013
Écart type	8,6	3,2	8,1	16,9	10,4	7,3	21,8	39,0	20,2
Recouvrement %	92 %	103 %	100 %	91 %	102 %	92 %	96 %	110 %	101 %
RSDr %	18,5 %	6,3 %	16,2 %	7,4 %	4,1 %	3,2 %	2,3 %	3,5 %	2,0 %
HorRat (r)	0,74	0,25	0,65	0,38	0,21	0,16	0,14	0,22	0,13

Tableau 7. Valeurs de répétabilité pour le cyclamate de sodium aux trois niveaux de fortification

Cyclamate	Vins blancs (W)								
Échantillon	W1	W2	W3	W4	W5	W6	W7	W8	W9
Moyenne µg/L	51	50	50	261	247	246	1092	1040	1045

Écart type	1,0	1,4	1,4	2,8	4,2	3,5	12,2	17,7	14,4
Recouvrement %	103 %	100 %	101 %	104 %	99 %	99 %	109 %	104 %	105 %
RSDr %	1,9 %	2,9 %	2,9 %	1,1 %	1,7 %	1,4 %	1,1 %	1,7 %	1,4 %
HorRat (r)	0,08	0,12	0,11	0,05	0,09	0,07	0,07	0,11	0,09

Cyclamate	Vins rosés (Ro)								
Échantillon	Ro1	Ro2	Ro3	Ro4	Ro5	Ro6	Ro7	Ro8	Ro9
Moyenne µg/L	42	42	44	232	228	233	982	992	1002
Écart type	1,6	1,3	0,8	2,8	4,4	4,5	14,9	6,0	12,9
Recouvrement %	84 %	85 %	88 %	93 %	91 %	93 %	98 %	99 %	100 %
RSDr %	3,9 %	3,0 %	1,7 %	1,2 %	2,0 %	1,9 %	1,5 %	0,6 %	1,3 %
HorRat (r)	0,16	0,12	0,07	0,06	0,10	0,10	0,10	0,04	0,08

Cyclamate	Vins rouges (R)								
Échantillon	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9
Moyenne µg/L	51	55	54	250	265	243	1069	1160	1086
Écart type	1,2	1,3	1,4	5,5	5,2	4,2	27,4	13,9	18,4
Recouvrement %	103 %	110 %	108 %	100 %	106 %	97 %	107 %	116 %	109 %
RSDr %	2,4 %	2,4 %	2,6 %	2,2 %	2,0 %	1,7 %	2,6 %	1,2 %	1,7 %
HorRat (r)	0,10	0,10	0,10	0,11	0,10	0,09	0,16	0,08	0,11

Tableau 8. Valeurs de répétabilité pour la saccharine aux trois niveaux de fortification

Saccharine	Vins blancs (W)

Échantillon	W1	W2	W3	W4	W5	W6	W7	W8	W9
Moyenne µg/L	45	45	59	216	214	252	920	909	1055
Écart type	1,5	1,4	1,4	5,1	5,1	3,7	21,3	23,7	21,5
Recouvrement %	89 %	91 %	119 %	86 %	86 %	101 %	92 %	91 %	105 %
RSDr %	3,3 %	3,0 %	2,4 %	2,4 %	2,4 %	1,5 %	2,3 %	2,6 %	2,0 %
HorRat (r)	0,13	0,12	0,10	0,12	0,12	0,08	0,15	0,16	0,13

Saccharine	Vins rosés (Ro)								
Échantillon	Ro1	Ro2	Ro3	Ro4	Ro5	Ro6	Ro7	Ro8	Ro9
Moyenne µg/L	58	56	56	303	276	278	1263	1190	1204
Écart type	1,4	2,0	0,6	5,5	3,5	4,8	28,8	24,8	25,2
Recouvrement %	116 %	112 %	112 %	121 %	110 %	111 %	126 %	119 %	120 %
RSDr %	2,4 %	3,5 %	1,1 %	1,8 %	1,3 %	1,7 %	2,3 %	2,1 %	2,1 %
HorRat (r)	0,10	0,14	0,04	0,09	0,07	0,09	0,14	0,13	0,13
Saccharine	Vins rouges (R)								
Échantillon	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9
Moyenne µg/L	47	44	46	224	203	199	955	906	885
Écart type	1,4	0,5	1,5	4,4	2,2	2,9	20,6	20,1	25,8
Recouvrement %	94 %	88 %	92 %	89 %	81 %	80 %	95 %	91 %	88 %
RSDr %	3,0 %	1,1 %	3,2 %	2,0 %	1,1 %	1,5 %	2,2 %	2,2 %	2,9 %
HorRat (r)	0,12	0,04	0,13	0,10	0,06	0,07	0,14	0,14	0,18

Tableau 9. Valeurs de répétabilité pour le stévioside aux trois niveaux de fortification

Stévioside	Vins blancs (W)								
Échantillon	W1	W2	W3	W4	W5	W6	W7	W8	W9

Moyenne µg/L	41	43	30	262	265	204	1094	1116	860
Écart type	0,4	0,4	0,7	2,0	31,2	1,9	13,6	12,9	6,6
Recouvrement %	83 %	86 %	60 %	105 %	106 %	81 %	109 %	112 %	86 %
RSDr %	1,0 %	1,0 %	2,2 %	0,8 %	11,8 %	0,9 %	1,2 %	1,2 %	0,8 %
HorRat (r)	0,04	0,04	0,09	0,04	0,60	0,05	0,08	0,07	0,05

Stévioside	Vins rosés (Ro)								
Échantillon	Ro1	Ro2	Ro3	Ro4	Ro5	Ro6	Ro7	Ro8	Ro9
Moyenne µg/L	50	39	41	237	254	286	935	1104	1109
Écart type	0,8	1,3	0,9	2,6	5,3	7,1	10,5	10,2	18,3
Recouvrement %	99 %	77 %	81 %	95 %	102 %	114 %	93 %	110 %	111 %
RSDr %	1,7 %	3,4 %	2,2 %	1,1 %	2,1 %	2,5 %	1,1 %	0,9 %	1,6 %
HorRat (r)	0,07	0,14	0,09	0,06	0,11	0,13	0,07	0,06	0,10

Stévioside	Vins rouges (R)								
Échantillon	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9
Moyenne µg/L	60	40	43	262	211	210	1048	904	921
Écart type	0,9	0,7	0,4	4,0	4,0	2,6	18,0	18,4	11,9
Recouvrement %	120 %	80 %	86 %	105 %	85 %	84 %	105 %	90 %	92 %
RSDr %	1,5 %	1,8 %	1,0 %	1,5 %	1,9 %	1,3 %	1,7 %	2,0 %	1,3 %
HorRat (r)	0,06	0,07	0,04	0,08	0,10	0,06	0,11	0,13	0,08

Tableau 10. Valeurs de répétabilité pour le sucralose aux trois niveaux de fortification

Sucralose	Vins blancs (W)								
Échantillon	W1	W2	W3	W4	W5	W6	W7	W8	W9
Moyenne µg/L	53	52	53	221	225	223	986	973	1021
Écart type	5,3	7,8	8,1	10,8	27,5	6,5	29,8	43,9	31,5
Recouvrement %	106 %	103 %	105 %	88 %	90 %	89 %	99 %	97 %	102 %
RSDr %	10,0 %	15,1 %	15,4 %	4,9 %	12,2 %	2,9 %	3,0 %	4,5 %	3,1 %
HorRat (r)	0,40	0,61	0,62	0,25	0,63	0,15	0,19	0,28	0,19
Sucralose	Vins rosés (Ro)								
Échantillon	Ro1	Ro2	Ro3	Ro4	Ro5	Ro6	Ro7	Ro8	Ro9
Moyenne µg/L	35	43	36	215	236	194	944	1075	905
Écart type	4,1	2,1	2,2	7,2	7,4	7,7	21,3	27,5	19,3
Recouvrement %	70 %	86 %	71 %	86 %	94 %	78 %	94 %	108 %	91 %
RSDr %	11,7 %	5,0 %	6,2 %	3,3 %	3,1 %	4,0 %	2,3 %	2,6 %	2,1 %
HorRat (r)	0,47	0,20	0,25	0,17	0,16	0,20	0,14	0,16	0,13

Sucralose	Vins rouges (R)								
Échantillon	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9
Moyenne µg/L	50	46	48	236	255	228	1017	1194	1041
Écart type	7,7	3,1	6,8	11,5	9,2	8,4	16,9	27,5	23,0
Recouvrement %	100 %	92 %	96 %	94 %	102 %	91 %	102 %	119 %	104 %
RSDr %	15,3 %	6,9 %	14,1 %	4,9 %	3,6 %	3,7 %	1,7 %	2,3 %	2,2 %
HorRat (r)	0,61	0,28	0,57	0,25	0,18	0,19	0,10	0,15	0,14

Tableau 11. Tableau récapitulatif pour la répétabilité

Composé	Recouvrement	RSDr %	HorRat (r)
Acésulfame	83 %-120 %	0,9 %-5,0 %	0,05-0,20
Aspartame	68 %-110 %	1,8 %-21,6 %	0,12-0,87
Cyclamate	84 %-116 %	0,6 %-3,9 %	0,04-0,16
Saccharine	80 %-126 %	1,1 %-3,5 %	0,04-0,18
Stévioside	60 %-112 %	0,8 %-11,8 %	0,04-0,60
Sucralose	70 %-119 %	1,7 %-15,4 %	0,10-0,63

11.6. Fidélité intermédiaire

La fidélité intermédiaire (FI) a été évaluée en analysant des échantillons fortifiés avec 50 µg/L, 250 µg/L et 1000 µg/L à différents moments étalés sur plusieurs jours. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-après. Le recompte représente le nombre de points à considérer pour déterminer les valeurs moyennes et l'écart type correspondant (ET). Le pourcentage de recouvrement, l'écart type relatif (RSD%) et la valeur HorRat sont également indiqués pour chaque cas.

Tableau 12. Valeurs de fidélité intermédiaire pour l'acésulfame potassium aux trois niveaux de fortification

Acésulfame	Vins blancs (W)			Vins rouges (R) et vins rosés (Ro)					
Échantillon	W1	W2	W3	Ro1	Ro2	Ro3	R1	R2	R3
Recompte	12	12	11	12	12	12	12	12	12
Moy. µg/L	46	223	928	54	252	1089	53	252	1113
Écart type	6,1	31,4	76,6	6,1	23,6	66,3	2,4	9,1	41,3
Recouvr. %	91 %	89 %	93 %	108 %	101 %	109 %	106 %	101 %	111 %
RSD% FI	13,2 %	14,1 %	8,2 %	11,3 %	9,4 %	6,1 %	4,5 %	3,6 %	3,7 %
HorRat	0,53	0,72	0,52	0,46	0,48	0,38	0,18	0,18	0,23

Tableau 13. Valeurs de fidélité intermédiaire pour l'aspartame aux trois niveaux de fortification

Aspartame	Vins blancs (W)			Vins rosés (Ro)			Vins rouges (R)		
Échantillon	W1	W2	W3	Ro1	Ro2	Ro3	R1	R2	R3
Recompte	11	10	10	11	12	12	11	12	12
Moy. µg/L	57	281	1190	41	202	841	41	222	998
Écart type	5,5	21,8	91,9	4,1	12,9	73,9	7,5	15,4	43,5
Recouvr. %	114 %	113 %	119 %	82 %	81 %	84 %	83 %	89 %	100 %
RSD% FI	9,6 %	7,7 %	7,7 %	10,0 %	6,4 %	8,8 %	18,1 %	6,9 %	4,4 %
HorRat	0,38	0,40	0,49	0,40	0,32	0,55	0,73	0,36	0,27

Tableau 14. Valeurs de fidélité intermédiaire pour le cyclamate de sodium aux trois niveaux de fortification

Cyclamate	Vins blancs (W)			Vins rosés (Ro)			Vins rouges (R)		
Échantillon	W1	W2	W3	Ro1	Ro2	Ro3	R1	R2	R3
Recompte	10	10	10	11	12	12	12	12	12
Moy. µg/L	48	237	1011	40	210	918	49	226	999
Écart type	5,5	27,3	134,3	2,5	20,1	70,7	1,3	7,4	26,6
Recouvr. %	97 %	95 %	101 %	80 %	84 %	92 %	98 %	91 %	100 %
RSD% FI	11,3 %	11,5 %	13,3 %	6,3 %	9,6 %	7,7 %	2,7 %	3,3 %	2,7 %
HorRat	0,45	0,59	0,84	0,25	0,49	0,48	0,11	0,17	0,17

Tableau 15. Valeurs de fidélité intermédiaire pour la saccharine aux trois niveaux de fortification

Saccharine	Vins blancs (W)			Vins rouges (R) et vins rosés (Ro)					
Échantillon	W1	W2	W3	Ro1	Ro2	Ro3	R1	R2	R3
Recompte	11	10	10	12	12	12	12	12	12
Moy. µg/L	51	241	1010	56	270	1166	44	195	857
Écart type	2,6	8,4	36,8	2,8	10,7	47,6	3,0	8,3	31,7
Recouvr. %	103 %	96 %	101 %	112 %	108 %	117 %	88 %	78 %	86 %
RSD% FI	5,0 %	3,5 %	3,6 %	5,1 %	4,0 %	4,1 %	6,9 %	4,3 %	3,7 %
HorRat	0,20	0,18	0,23	0,20	0,20	0,26	0,28	0,22	0,23

Tableau 16. Valeurs de fidélité intermédiaire pour le stévioside aux trois niveaux de fortification

Stéviosid e	Vins blancs (W)			Vins rosés (Ro)			Vins rouges (R)		
Échantill on	W1	W2	W3	Ro1	Ro2	Ro3	R1	R2	R3
Recompt e	11	10	10	12	12	12	12	12	12
Moy. µg/L	35	232	977	31	210	921	41	208	905
Écart type	6,5	45,8	184,1	8,1	45,4	184,4	3,1	22,2	84,5
Recouvr. %	70 %	93 %	98 %	61 %	84 %	92 %	81 %	83 %	91 %
RSD% FI	18,5 %	19,7 %	18,8 %	26,4 %	21,6 %	20,0 %	7,6 %	10,7 %	9,3 %
HorRat	0,74	1,01	1,19	1,06	1,10	1,26	0,31	0,55	0,59

Tableau 17. Valeurs de fidélité intermédiaire pour le sucralose aux trois niveaux de fortification

Sucralose	Vins blancs (W)			Vins rouges (R) et vins rosés (Ro)					
Échantillon	W1	W2	W3	Ro1	Ro2	Ro3	R1	R2	R3
Recompte	10	11	11	10	11	12	12	12	12
Moy. µg/L	51	197	776	51	295	1196	42	228	1069
Écart type	10,4	41,6	137,5	11,9	48,7	184,5	5,3	18,0	51,3
Recouvr. %	101 %	79 %	78 %	101 %	118 %	120 %	85 %	91 %	107 %
RSD% FI	20,5 %	21,1 %	17,7 %	23,5 %	16,5 %	15,4 %	12,5 %	7,9 %	4,8 %
HorRat	0,82	1,08	1,12	0,94	0,84	0,97	0,50	0,40	0,30

Tableau 18. Tableau récapitulatif pour la fidélité intermédiaire

Composé	**Recouvrement**	**RSD%**	**HorRat**
Acésulfame	89 %-111 %	3,6 %-14,1 %	0,18-0,72
Aspartame	81 %-119 %	4,4 %-18,1 %	0,27-0,73
Cyclamate	80 %-101 %	2,7 %-13,3 %	0,11-0,84
Saccharine	78 %-117 %	3,5 %-6,9 %	0,18-0,28
Stévioside	61 %-98 %	7,6 %-26,4 %	0,31-1,26
Sucralose	78 %-120 %	4,8 %-23,5 %	0,30-1,12

12. Bibliographie

DIRECTION GÉNÉRALE POUR LA SANTÉ ET LA SÉCURITÉ ALIMENTAIRE DE LA COMMISSION EUROPÉENNE, SANTE/11813/2017, « Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed ». En vigueur à partir du 01/01/2018.

Horwitz, W., et Albert, R., « The Horwitz Ratio (HorRat): A Useful Index of Method Performance with Respect to Precision », *J AOAC Int*, 89, 2006, p. 1095-1109.

Code international des pratiques œnologiques, édition 2021, OIV, Paris.

Règlement (CE) n° 1333/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 sur les additifs alimentaires (Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE), JO L 354 de 2008, p. 16-33.

Annexe

A1. Performance de quantification pour un échantillon de vin fortifié avec 50 µg/L de chaque édulcorant

Édulcorant	S/B
Acésulfame K	789,4
Aspartame	586,5
Cyclamate Na	282,5
Saccharine	24,3
Sucralose	80,5
Stévioside	224,1

A2. Données d'identification des édulcorants – autres transitions fournies à titre d'orientation

Édulcorant	Autres transitions sous ESI en mode négatif
Acésulfame K	162 > 82
Aspartame	293 > 200
Cyclamate Na	178 > 96
Saccharine	182 > 106
Sucralose	397 > 361
Stévioside	641 > 479 641 > 317

Méthode OIV-MA-315-32 Méthode Type IV

Détermination des édulcorants dans le vin blanc et les boissons à base de vin blanc par chromatographie liquide haute performance couplée à un détecteur à barrette de diodes et un détecteur à aérosol chargé

(OIV-OENO 665-2022)

1. Domaine d'application

Cette méthode permet de doser cinq édulcorants artificiels (Acésulfame-K, Aspartame, Saccharine, Cyclamate de sodium, Sucralose) dans les vins blancs (et boissons à base de vin blanc), dans des plages de concentration allant jusqu'à 50 mg/L pour la saccharine, 125 mg/L pour l'acésulfame-K et 250 mg/L pour le sucralose, le cyclamate de sodium et l'aspartame.

Pour des concentrations plus élevées, une dilution de l'échantillon est nécessaire.

Remarque : la présence des anthocyanes gêne le dosage de ces édulcorants dans les vins rosés et les vins rouges.

2. Principe

Les cinq édulcorants sont analysés par chromatographie liquide haute performance par séparation dans une colonne en phase inverse C18 couplée à un détecteur à barrette de diodes et à un détecteur d'aérosol chargé disposés en série (CLHP/UV-CAD).

3. Réactifs et solutions

3.1. **Réactifs :**

3.1.1. Eau selon EN ISO 3696 ou équivalent

3.1.2. Acésulfame K (pureté ≥ 99%) (n° CAS **55589-62-3**)

3.1.3. Aspartame (pureté ≥ 98%) (n° CAS **22839-47-0**)

3.1.4. Cyclamate de sodium (pureté ≥ 98%) (n° CAS **139-05-9)**

3.1.5. Saccharine, sel de sodium dihydraté (pureté ≥ 98%) (n° CAS **6155-57-3**)

3.1.6. Sucralose (pureté ≥ 98%) (n° CAS **56038-13-2**)
3.1.7. Acide formique (pureté ≥ 98%) (n° CAS **64-18-6)**
3.1.8. Bicarbonate d'ammonium (pureté ≥ 98%) (n° CAS **1066-33-7)**
3.1.9. Méthanol pour CLHP (pureté ≥ 99,9%) (n° CAS **67-56-1)**
3.1.10. Acétone pour CLHP (pureté ≥ 99,8%) (n° CAS **67-64-1)**

3.2. **Préparation de la solution tampon**

Préparer une solution tampon de bicarbonate d'ammonium (3.1.8) à 0,4 g/L dans de l'eau (3.1.1) et ajuster le pH à 4,6 avec de l'acide formique (3.1.7).

Cette solution peut être conservée 1 mois à température ambiante.

4. Appareillage

4.1. Matériel courant de laboratoire
4.2. pH-mètre
4.3. Agitateur
4.4. Bain à ultrasons
4.5. Balance analytique d'une précision de ± 0,1 mg
4.6. Fioles jaugées de classe A
4.7. Filtres seringues 0.45 µm cellulose régénérée (par exemple)
4.8. Colonne pour CLHP C18 (15 cm de longueur, 4,6 mm de diamètre interne, 5µm)
4.9. Système chromatographique composé :
- d'un système de pompage disposant d'un minimum de trois voies
- d'un passeur d'échantillons thermostaté
- d'un four à colonne
- d'un détecteur à barrette de diodes ou UV-Visible
- d'un détecteur d'aérosol chargé (CAD)
- d'un système d'acquisition de données, d'intégration et de calcul

5. Mode opératoire

5.1. **Préparation des échantillons**

Filtrer les échantillons avec des filtres seringues avant de mettre en flacon.

Si l'échantillon est trop concentré, réaliser une dilution avec la solution tampon de façon à obtenir une concentration comprise dans la gamme.

5.2. **Préparation des solutions étalon**

5.2.1. **Préparation de la solution mère N3 (donnée à titre d'exemple)**

Dans une fiole de 100 mL, introduire environ exactement :

- **12,5 mg d'acésulfame de potassium (3.1.2)**
- **25 mg d'aspartame (3.1.3)**
- **25 mg de cyclamate de sodium (3.1.4)**
- **5 mg de saccharine (3.1.5)**
- **25 mg de sucralose (3.1.6)**

Dissoudre dans environ 20 mL d'eau/méthanol (1:1) puis compléter au trait de jauge avec la solution tampon. Passer aux ultrasons si nécessaire.

Cette solution N3 est conservée entre 2°C et 8°C pendant 6 mois.

5.2.2. **Préparation des solutions filles N2 et N1**

Préparer deux autres niveaux à partir de la solution N3 :

N2 : solution N3 diluée au ½. Par exemple, dans une fiole de 20 mL, introduire 10 mL de N3 et compléter avec de la solution tampon

N1 : solution N3 diluée au 2/25. Par exemple, dans une fiole de 25 mL, introduire 2 mL de N3 et compléter avec de la solution tampon

Filtrer les solutions étalons avec des filtres seringues et mettre les flacons dans le passeur.

Tableau récapitulatif des solutions étalons (donné à titre d'exemple):

Edulcorants	***Solution mère (N3)***			***Solution fille (N2)***			***Solution fille (N1)***		
	Pesée (mg)	Volume fiole	Concentration en mg/L	Volume prélevé de N3	Volume fiole	Concentration en mg/L	Volume prélevé de N3	Volume fiole	Concentration en mg/L
Acésulfame K	12,5	100 mL	125	10mL	20 mL	62,5	2mL	25mL	10
Aspartame	25		250			125			20
Cyclamate Na	25		250			125			20

Saccharine	5		50			25			4
Sucralose	25		250			125			20

5.3. **Conditions chromatographiques**

A titre d'exemple, les conditions ayant permis d'atteindre les performances décrites en annexe sont les suivantes :

- Température du four colonne : 30°C
- Température du passeur : 20°C
- Composition de la phase mobile (réactifs de qualité HPLC) :
  - Phase A : 72% Méthanol / 25% Tampon / 3% Acétone
  - Phase B : 12% Méthanol / 88% Tampon
- Longueur d'onde de détection UV : 210 nm
- Débit : 1 mL/min
- Volume d'injection : 10 µL
- Paramètres du CAD :
- Filtre : 3,6
- Taux de collection de données : 10 Hz
- Température : High (50°C)
- Power function : de 0 à 13 min : 1,50 ; de 13 à 40 min : 1,48

Gradient d'élution à appliquer :

Temps (min)	Pourcentage de A	Pourcentage de B
0	0 %	100 %
4	0%	100 %
11	53 %	47 %
18,5	82 %	18 %
25	82 %	18 %
27	100 %	0 %

31	100 %	0 %
32	0 %	100 %
40	0 %	100 %

Stabiliser le temps nécessaire la colonne avec la phase mobile B, ainsi que le CAD et le détecteur DAD.

6. Calculs

Les résultats sont calculés par étalonnage externe en fonction de l'aire du pic de chaque édulcorant, et exprimées en mg/L selon le calcul :

$$\frac{\quad}{\quad}$$

Avec l'aire du pic de l'échantillon, l'ordonnée à l'origine de la courbe d'étalonnage et la pente de la courbe d'étalonnage.

7. Expression des résultats

Pour les teneurs 10 mg/L, les résultats peuvent être exprimés en mg/L avec un chiffre significatif après la virgule.

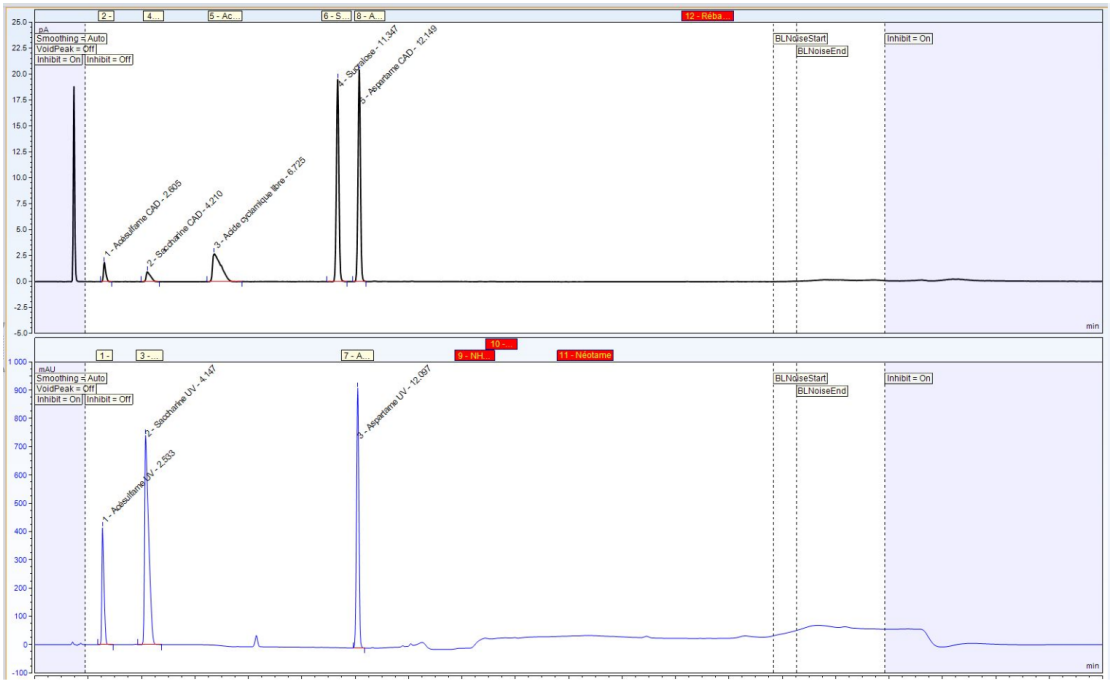
Pour les teneurs 10 mg/L, les résultats peuvent être exprimés en mg/L, sans décimale.

8. 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.
- NF EN 15911 : Simultaneous determination of nine sweeteners by high performance liquid chromatography and evaporative light scattering detection in beverages and canned fruits.
- ISO 3696 : Eau pour Laboratoire à usage analytique – Spécification et méthodes d'essai.

- ISO 11352 : Qualité de l'eau — Estimation de l'incertitude de mesure basée sur des données de validation et de contrôle qualité.

Annexe 1 : Exemple de chromatogramme pour une solution étalon de niveau 3



Annexe 2 : Exemple de validation interne

La méthode a fait l'objet d'une évaluation des performances et une étude de validation interne a été menée pour la matrice vin blanc et boisson à base de vin blanc.

Les caractéristiques de la méthode obtenues suite à ce travail sont résumées dans ce tableau :

Edulcorants	Répétabilité en % (r%)	Reproductibilité intralaboratoire en % (R%)	Limite de détection retenue en mg/L	Limite de quantification retenue en mg/L	Plage de linéarité en mg/L
Acésulfame K	2.5	8.5	2	5	5-125
Saccharine	1.7	6.8	1	2	2-50
Aspartame	1.9	8.7	4	10	10-250
Cyclamate Na	5.5	12.8	4	10	10-250
Sucralose	6.6	12.9	4	10	10-250

La limite de quantification retenue correspond au niveau 1, c'est le premier point de la gamme d'étalonnage.

La limite de détection retenue correspond à 1/3 de la limite de quantification.

La linéarité a été vérifiée par l'analyse de 5 niveaux de concentration pour chaque édulcorant à partir de 5 répétitions par niveau sur des jours différents.

La répétabilité et la reproductibilité ont été obtenues par l'analyse de chaque édulcorant dans chaque type de matrice sur 5 jours différents avec 2 répétitions à chaque fois, ceci sur 3 niveaux de concentration choisis dans le domaine de linéarité de la méthode.

Méthode OIV-MA-AS316-01 Méthode Type IV

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

(OIV-OENO 618-2020)

1. Introduction

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

2. Domaine d'application

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

Domaine de travail (mg/L) :

Glucose	600-50 000
Acide malique	300-5000
Acide acétique	30-2000
Acide fumarique	20-300
Acide shikimique	20-500
Acide sorbique	20-800

3. Abréviations

RMN	Résonance magnétique nucléaire
RMN ^{1}H	Résonance magnétique nucléaire du proton
TSP	Sel sodique de l'acide triméthylsilylpropanoïque
PULCON	PULse lengthbased CONcentration measurement

4. Principe

L'échantillon de vin est dilué avec une solution tampon à 10 % dans D_2O.Le TSP est utilisé comme étalon interne pour fixer à 0 le déplacement chimique (δ) (0 ppm). L'échantillon est ensuite mesuré par RMN ^{1}H. Il convient de réaliser au minimum une suppression du signal de l'eau. Pour augmenter la sensibilité, le signal de l'éthanol est également supprimé. Les analytes du vin sélectionnés sont évalués et quantifiés à partir des signaux pertinents (voir point 11.1 de l'annexe, tableau 1.).

5. Réactifs et matériel

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

5.1 D_2O (99,9 % en atomes de D), n° CAS : 7789-20-0

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

5.3 Solution tampon pH 2,9-3,3pour ajuster le pH du vin
Par exemple : KH_2PO_4(dihydrogénophosphate de potassium, n° CAS : 7778-77-0) 1 M, TSP (2,2,3,3-tétradeutério-3-triméthylsilylpropanoate de sodium) (5.2) à 0,1 % et NaN_3 (azoture de sodium, n° CAS : 26628-22-8) 3 mM dans D_2O (5.1), à pH 3,10

5.4 Acide chlorhydrique 1 M, n° CAS : 7647-01-0

5.5 Hydroxyde de sodium 1 M n° CAS : 1310-73-2

5.6 Solutions tampons pour l'étalonnage des électrodes
pH 4,00 et pH 2,00
(matériau de référence certifié, par ex. : Certipur®)

5.7 Acide citrique monohydraté, n° CAS : 5949-29-1

5.8 Eau ultra-pure, ISO 3696

6. Appareillage

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

6.1 Tubes RMN de 5 mm, avec déviation maximale du diamètre interne de ±1 %

6.2 Spinner avec jauge pour l'ajustement des tubes RMN

6.3 Dispositif de mesure du pH (±0,01 unité de pH)

6.4 Système de titrage automatique (ajustement du pH à ±0,01 unité de pH) ; ajustement manuel alternatif

6.5 Spectromètre de RMN, par exemple de 400 MHz avec sonde de 5 mm (gradient Z) et stabilisation de la température à ±0,2 K

6.6 Pipettes de 100-1000 µL

6.7 Flacons de réaction de 1,5 mL

6.8 Filtre à membrane en polyfluorure de vinylidène (PVDF), taille des pores 0,2 µm, diamètre de 15 mm

7. Préparation des échantillons

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

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

8. Mode opératoire

8.1 Spectromètre de RMN et mesure

Les mesures doivent être réalisées avec des séquences de suppression des signaux de l'eau et de l'éthanol par multi-présaturation. Diverses techniques sont disponibles pour supprimer les signaux indésirables, telles que la multi-présaturation sélective et la méthode WATERGATE. Pour une suppression correcte du signal de l'eau, les spectromètres sont dotés de séquences d'impulsion appropriées.
Le rapport signal-bruit des signaux sélectionnés pour la quantification des analytes doit être supérieur à 10:1.

En principe, les paramètres critiques sont les suivants :

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

8.2 Quantification des composés

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

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

9. Calculs

9.1 Calculs avec étalon interne

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

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

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

9.2 Calculs avec étalon externe (méthode PULCON)

Pour la quantification, les signaux correspondants des analytes peuvent être évalués selon la méthode PULCON en appliquant la formule F1 ci-après. Un échantillon externe de concentration connue d'une substance appropriée pour l'étalonnage est utilisé à chaque passage, par exemple de l'acide citrique à 20 g/L (échantillon $Quant_{ref}$). Le facteur de quantification résultant fait partie intégrante des données de chaque échantillon. L'échantillon $Quant_{ref}$ est utilisé pour calculer *fq* suivant la formule F2 ci-après.

La méthode PULCON est basée sur la formule suivante :

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

où :

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

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

où :

I_{Ref} = intégrale absolue du signal de référence
SW_{Ref} = largeur spectrale (par ex., 20,55 ppm)

M_{Ref} = masse molaire de la substance de référence (g/mol)
SI_{Ref} = taille (par ex., 131072 = 128k = 2^{17})
γ_{Ref} = concentration massique de la substance de référence
$N_{H, Ref}$ = nombre de protons correspondant au signal de la substance de référence
d_{Ref} = diamètre interne du tube de la substance de référence
NS_{Ref} = nombre de FID obtenues pour le tube de la substance de référence

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

9.3 Expression des résultats

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

10. Fidélité

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

10.1 Répétabilité et reproductibilité

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

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

	Glucose	Acide malique	Acide acétique	Acide fumarique	Acide shikimique	Acide sorbique
NMRP01 (vin modèle)						
Nombre de laboratoires	15	14	15	14	13	14
Moyenne (mg/L)	9903	2628	1056	82,1	103,6	126,1*
RSD_r %	1,5	1,7	1,4	1,5	1,8	7,5

RSD_R %	5,5	4,3	7,5	12,5	5	11,9
NMRP02 (vin blanc)						
Nombre de laboratoires	15	14	15	14	13	15
Moyenne (mg/L)	28 304	3528	868	12,1 (<LQ)	45,8	164,6
RSD_r %	1,3	1,7	1,6		4	2,1
RSD_R %	4,6	14,3	9		18,3	5,1
NMRP03 (vin rouge)						
Nombre de laboratoires	14	9	14	13	13	14
Moyenne (mg/L)	11 505	240 (<LQ)	544	29,1	34,6	149,7
RSD_r %	2,2		3,6	3,1	14,7	2,7
RSD_R %	4,3		7,6	9,1	20	5,4
NMRP04 (vin rouge)						
Nombre de laboratoires	14	11	14		13	5
Moyenne (mg/L)	12 538	251	627	n/a	61,8	10,9 (<LQ)
RSD_r %	1,7	6,6	2,7		9,4	
RSD_R %	3,9	11,4	5,8		15,3	
NMRP05 (vin blanc)						
Nombre de laboratoires	14	13	14	13	13	15
Moyenne (mg/L)	30 303	2615	1011	27,1	29,3	191,8
RSD_r %	3,2	4,6	2,7	3	8,8	3,9
RSD_R %	5	13,7	7	5,3	15,6	7
NMRP06 (vin rouge)						
Nombre de laboratoires	14	11	14	4	12	14
Moyenne (mg/L)	6090	267	630	n/a	30	158,5
RSD_r %	3	6,1	2,1		9,6	4,3
RSD_R %	5,3	10,2	4,9		12,6	6,3
NMRP07 (vin blanc)						
Nombre de laboratoires	13	10	14	14	13	4
Moyenne (mg/L)	5297	8036	794	n/a	36,2	3,2 (<LQ)
RSD_r %	1,5	3,7	2,6		11,5	
RSD_R %	6,3	5,9	7,4		14,7	
NMRP08 (vin blanc)						
Nombre de laboratoires	14	14	14	13	13	6
Moyenne (mg/L)	16 518	5254	301	n/a	68,4	5,4 (<LQ)
RSD_r %	1	2,2	3		4,2	
RSD_R %	4,5	8,6	7,1		6,4	
NMRP09 (vin blanc)						
Nombre de laboratoires	14	12	14	14	13	15
Moyenne (mg/L)	2091	2390	176	45,9	44,1	98
RSD_r %	3,1	2,6	4,6	2,2	4,3	1,8
RSD_R %	6,6	5,7	12	4,6	8,4	5,1
NMRP10 (vin rouge)						
Nombre de laboratoires	9	7	14	15	13	15
Moyenne (mg/L)	442 (<LQ)	178 (<LQ)	502	90,6	58	200,3
RSD_r %			2,4	2,5	5,2	2,9
RSD_R %			11,7	7,7	16,4	6,8

10.2 Limites de détection et de quantification

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

Tableau 2. Limites de détection et de quantification

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

11. Annexe

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

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

11.2 Justesse/recouvrement

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

Les recouvrements calculés sont de

100,3 % (n=9, 95,2-106,4) pour le glucose,

108,9 % (n=10, 99,9-123) pour l'acide acétique,

104,1 % (n=7, 91,4-124,1) pour l'acide malique,

105,2 % (n=10, 91,2-122,3) pour l'acide shikimique,

100,2 % (n=8, 97,9-102,5) pour l'acide sorbique et

96,8 % (n=6, 80,5-104,1) pour l'acide fumarique.

Seuls les résultats obtenus pour le paramètre acide acétique se sont avérés supérieurs à 100 %, avec une moyenne globale de 109 %. Ces résultats pourraient être expliqués par le facteur de correction de 1,28 employé (voir point 11.1 de l'annexe, tableau 1). Les recouvrements ont été calculés en se basant sur les valeurs de référence issues de méthodes de l'OIV.

Tableau 2. Recouvrement des analytes

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

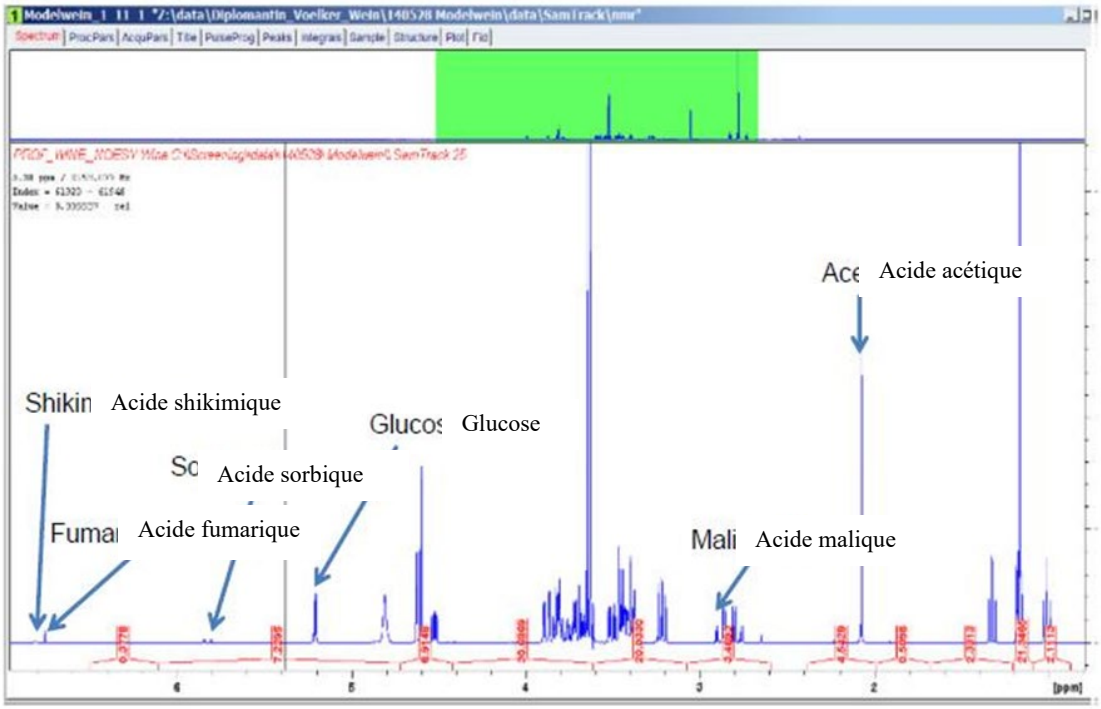
11.3 Valeurs HorRat de tous les composés

Tableau 4.

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

11.4 Exemple de spectre RMN

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



12. Bibliographie

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

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

Méthode OIV-MA-AS321-01 Méthode Type IV

Brome total

(A23, révision par OIV/OENO 377/2009)

1. Principe de la méthode

Incinération du vin à 525 °C en présence d'un excès de chaux sodée. Dosage colorimétrique à 590 nm de la tétrabromophénolsulfonephthaléine obtenue par action, sur la phénolsulfonephataléine, du brome libéré par action de la chloramine T sur la solution des cendres portée à pH 4,65.

2. Appareillage

2.1 Bain d'eau à 100 °C.

2.2 Four électrique à régulation de température.

2.4 Spectrophotomètre permettant des mesures entre 300 et 700 nm.

3. Réactifs

3.1 Solution d'hydroxyde de sodium à 50 p. 100 (*m/m*)

3.2 Suspension d'hydroxyde de calcium 2 M contenant 120 g de CaO par litre.

3.3 Solution de phénolsulfonephthaléine:
0.24 g de phénolsulfonephthaléine (rouge phénol) sont dissous dans 24 ml de solution d'hydroxyde de sodium, 0,1 M et porté au litre avec de l'eau distillée.

3.4 Solution tampon pH 4,65 :

acide acétique, 2 M	500 ml
hydroxyde de sodium 2 M	250 ml
eau distillée q.s.p.	1 l

3.5 Solution oxydante :

chloramine T	2 g
eau distillée q.s.p.	1 l

Préparer cette solution 48 heures avant l'emploi

Conservation : 2 semaines à ± 4 °C

3.6 Solution réductrice :

thiosulfate de sodium	25 g
eau distillée q.s.p.	1 l

3.7 Acide sulfurique, (r_{20} = 1,84 g/ml) dilué 1/10 (v/v).

3.8 Acide sulfurique, (r_{20} = 1,84 g/ml) dilué 1/100 (v/v).

3.9 Solution de bromure de potassium correspondant à 1 g de brome par litre. 1,489g de bromure de potassium, KBr, est dissous dans de l'eau distillée et porté au litre.

4. Mode opératoire

4.1 *Obtention des cendres et de la solution des cendres*

50 ml de vin, placés dans une capsule de silice de 7 cm de diamètre, sont additionnés de 0,5 ml de solution d'hydroxyde de sodium à 50 p. 100 et de 1 ml de suspension d'hydroxyde de calcium 2 M. Vérifier que le pH est supérieur ou égal à 10. La capsule, recouverte d'un verre de montre, est abandonnée au repos pendant 24 h. Le liquide est ensuite évaporé au bain d'eau à 100°C jusqu'à siccité en s'aidant, pour accélérer l'opération, éventuellement d'un courant d'air chaud.

Effectuer ensuite l'incinération de la façon suivante : la capsule est laissée pendant 30 min. dans un four réglé à 525°C; après refroidissement le résidu est repris par un peu d'eau distillée, l'eau est éliminée sur le bain d'eau à 100°C; calciner à nouveau à 525°C. Cette opération est répétée jusqu'à ce que les cendres obtenues soient d'un blanc grisâtre.

Reprendre les cendres par 5 ml d'eau distillée bouillante. Ajouter à la burette de l'acide sulfurique dilué au 1/10, puis au 1/100 pour amener le pH entre 4 et 5, le pH étant mesuré à l'aide de papier indicateur. Soit X ml le volume de ces solutions sulfuriques versé. Ajouter alors 10,2 - (X + 5) ml d'eau distillée. Broyer à l'aide d'un petit agitateur le sulfate de calcium précipité. Transvaser le contenu de la capsule dans un tube à centrifugation. Centrifuger 10 min. Prélever dans un tube à essai les 8 à 9 ml de liquide limpide.

4.2 *Essai qualitatif*

Cet essai est destiné à savoir si la teneur en brome du vin étant comprise entre 0 et 1 mg/l, le dosage peut être effectué sur la solution des cendres sans dilution préalable.

Dans un petit tube à essai placer:

- 1 ml de solution des cendres,
- 1 goutte de solution tampon pH 4,65
- 1 goutte de solution de phénolsulfonephthaléine,
- 1 goutte de solution chloramine.

Après 1 min. exactement, arrêter la réaction par addition de 1 goutte de solution de thiosulfate de sodium.

Si la coloration obtenue est jaune, jaune brun ou jaune vert, la solution des cendres peut être utilisée telle quelle.

Si la coloration obtenue est bleu ou violette et *a fortiori* violette fugace, le vin contient plus de 1 mg de brome par litre; il faut diluer la solution des cendres

au ½ ou au 1/5 et recommencer l'essai qualitatif sur la dilution jusqu'à ce que la coloration obtenue réponde aux conditions ci-dessus.

4.3 *Dosage proprement dit*

Dans un tube à essai placer :

- 5 ml de solution des cendres, diluée ou non, ajouter :
- 0,25 ml de solution tampon pH 4,65
- 0,25 ml of phénolsulfonephthaléine;
- 0,25 ml de solution de chloramine T;

attendre 1 min. exactement, et ajouter :

- 0,25 ml de solution de thiosulfate de sodium.

Examiner au spectrophotomètre à 590 nm dans une cuve de 1 cm de trajet optique par rapport à un témoin obtenu en ajoutant à 5 ml d'eau distillée les mêmes quantités de réactifs.

Remarque : Lorsque la teneur en brome est faible (coloration jaune à peine verdâtre), déterminer l'absorbance dans une cuve de 2 cm de trajet optique.

4.4 *Établissement de la courbe d'étalonnage*

Au moment de l'emploi préparer une solution contenant 10 mg de brome par litre en faisant deux dilutions successives au $^1/_{10}$ de la solution titrée de bromure de potassium correspondant à 1 g de brome par litre.

Dans une série de tubes à essai, introduire 0,25, 0,50, 0,75, 1,00, 1,25, 1,50, 2,00 et 2,50 ml de la dilution à 10 mg de brome par litre; compléter à 5 ml avec de l'eau distillée, (la gamme obtenue correspond à des teneurs de 0,10, 0,20, 0,30, 0,40, 0,50, 0,60, 0,80 et 1 mg de brome par litre de vin dans les conditions opératoires décrites, sans dilution de la solution des cendres). Traiter les 5 ml de chacune de ces solutions comme il est indiqué pour la solution des cendres. Déterminer les absorbances de ces solutions par rapport au témoin préparé en traitant de la même façon 5 ml d'eau distillée. Les absorbances obtenues en fonction des teneurs en brome correspondantes se situent sur une droite légèrement incurvée vers l'origine.

5. Expression des résultats

5.1 *Calculs*

La teneur en brome du vin est obtenue en reportant sur la courbe d'étalonnage l'absorbance déterminée sur la solution des cendres et en tenant compte éventuellement de l'épaisseur de la cuve ou de la dilution de la solution des cendres effectuée.

La teneur en brome total est exprimée en milligrammes par litre (mg/l) avec deux décimales.

BIBLIOGRAPHIE

DAMIENS A., *Bull. Sci. Pharmacologiques*, 1920, **27**, 609; Ibid, 1921, **28**, 37, 85 et 105.
BALANTRE P., *J. Pharm. Chem.*, 1936, **24**, 409.
PERRONET M., ROCQUES Mme S., *Ann. Fals. Fraudes*, 1952, **45**, 347.
CABANIS J.-C., *Le brome dans les vins*, Thèse doct. Pharm., Montpellier, 1962.
JAULMES P., BRUN Mme S., Cabanis J.-C., *Chim anal.*, 1962, 327.
STELLA C., *Riv. Viticolt. Enol.*, Conegliano, 1967, 5.

Méthode OIV-MA-AS321-02 Méthode Type II

Chlorures

(A15 ; révision par OIV/OENO 377/2009)

1. Principe de la méthode

Les chlorures sont dosés directement dans le vin par potentiométrie en utilisant l'électrode Ag/AgCl.

2. Appareillage

2.1. pH mètre millivoltmètre gradué au moins de 2 en 2 mV.

2.2. Agitateur magnétique.

2.3. Electrode Ag/AgCl, avec une solution saturée de nitrate de potassium comme électrolyte.

2.4. Microburette graduée au 1/100ème de ml.

2.5. Chronomètre.

3. Réactifs

3.1. Solution étalon de chlorures; 2,1027 g de chlorure de potassium, KCl (max. 0,005 % Br), desséchés avant l'emploi par conservation durant quelques jours dans un dessiccateur, sont dissous dans de l'eau distillée; porter au litre : 1 ml de cette solution contient 1 mg de Cl^-.

3.2. Solution titrée de nitrate d'argent : 4,7912 g de nitrate d'argent, $AgNO_3$, pour analyse, sont dissous et portés au litre dans une solution alcoolique à 10 p. 100 (v/v) : 1 ml de cette solution correspond à 1 mg de Cl^-.

3.3. Acide nitrique pur au moins à 65 p. 100 (ρ_{20} = 1,40 g/ml).

4. Mode opératoire

4.1. 5,0 ml de solution étalon de chlorures sont introduits dans un vase cylindrique de 150 ml placé sur un agitateur magnétique, dilués à 100 ml environ avec de l'eau distillée et acidifiés avec 1,0 ml d'acide nitrique à 65 p. 100 au minimum. Après plongée de l'électrode, titrer en ajoutant à la microburette la solution titrée de nitrate d'argent, l'agitation étant modérée. Les additions effectuées sont d'abord de 1,00 ml pour les quatre premiers millilitres, lire les valeurs en millivolts correspondantes. Puis ajouter les 2 ml suivants par fractions de 0,20 ml. Enfin reprendre les additions par fractions de 1 ml jusqu'à ce qu'on ait versé 10 ml au total. Après chaque addition attendre environ 30 secondes avant d'effectuer la lecture des millivolts correspondants. Porter les valeurs obtenues sur un papier millimétré, en fonction des millilitres de solution titrée

correspondants et déterminer le potentiel du point équivalent d'après le point singulier de la courbe obtenue.

4.2. 5 ml de la solution étalon de chlorures sont introduits dans un vase cylindrique de 150 ml ainsi que 95 ml d'eau distillée et 1 ml d'acide nitrique à 65 p. 100 au minimum. Plonger l'électrode et titrer en agitant jusqu'à obtention du potentiel du point équivalent. Cette détermination est répétée jusqu'à ce que l'on ait obtenu une bonne concordance des résultats. Il faut effectuer ce contrôle avant chaque série de dosages de chlorures dans les échantillons.

4.3. 50 ml de vin à analyser sont introduits dans un vase cylindrique de 150 ml. Ajouter 50 ml d'eau distillée et 1 ml d'acide nitrique à au moins 65 p. 100 et titrer suivant le procédé indiqué en 4.2.

5. Expression des résultats

5.1. *Calculs*

Si n représente le nombre de millilitres de solution titrée de nitrate d'argent, la teneur en chlorure du liquide étudié est :

$20 \times n$	exprimée en milligrammes de Cl par litre;
$0{,}5633 \times n$	exprimée en milliéquivalents par litre;
$32{,}9 \times n$	exprimée en milligrammes de chlorure de sodium par litre.

5.2. *Répétabilité (r) :*

r = 1,2 mg Cl par litre
r = 0,03 meq/l
r = 2,0 mg NaCl/l

5.3. *Reproductibilité* (R) :

R = 4,1 mg/l
R = 0,12 meq/l
R = 6,8 mg NaCl/l

6. Remarque : Dosage très précis.

On se réfère à la courbe de titration complète obtenue au cours du dosage du liquide étudié par la solution de nitrate d'argent.

a) Placer 50 ml de vin à analyser dans un vase cylindrique de 150 ml. Ajouter 50 ml d'eau distillée et 1 ml d'acide nitrique à au moins 65 p. 100. Titrer au moyen de la solution de nitrate d'argent, en procédant à des additions de 0,5 ml pour lesquelles on relève le potentiel en millivolts correspondant. Déduire de ce premier titrage le volume approximatif de solution de nitrate d'argent nécessaire.

b) Recommencer le dosage dans les mêmes conditions. Procéder tout d'abord à des additions de 0,5 ml de solution titrante jusqu'à ce que le volume versé soit inférieur de 1,5 à 2 ml au volume déterminé en a). Procéder alors à des additions de 0,2 ml; continuer les affusions au-delà du point équivalent

approximativement repéré, d'une manière symétrique, par addition de 0,2 ml, puis de 0,5 ml.

Le point final du dosage et le volume de solution de nitrate d'argent exactement consommé est obtenu :

- soit en traçant la courbe et en déterminant le point équivalent;
- soit par le calcul :
-

$$V = V' + \Delta V_i \quad \frac{\Delta\Delta E_1}{\Delta\Delta E_1 + \Delta\Delta E_2}$$

avec

V = volume de solution titrée au point équivalent;
V' = volume de solution titrée avant le plus grand saut de potentiel.
ΔV_i = volume constant des fractions de solution titrée ajouté, soit 0,2 ml;
$\Delta\Delta E_1$ = différence de potentiel seconde avant la plus grande variation du potentiel;
$\Delta\Delta E_2$ = différence de potentiel seconde après la plus grande variation du potentiel.

Exemple :

Volume de solution titrée de $AgNO_3$	Potentiel E en mV	Différence ΔE	Différence seconde $\Delta\Delta E$
0	204		
0,2	208	4	0
0,4	212	4	2
0,6	218	6	0
0,8	224	6	0
1,0	230	6	2
1,2	238	8	4
1,4	250	12	10
1,6	272	22	22
1,8	316	44	10
2,0	350	34	8
2,2	376	26	6
2,4	396	20	

Dans cet exemple, le point final du titrage se situe entre 1,6 et 1,8 ml : car c'est dans cet intervalle qu'apparaît le plus grand saut de potentiel (ΔE = 44 mV). Le volume de solution titrée de nitrate d'argent consommé pour doser les chlorures dans la prise d'essai est :

$$V = 1{,}6 + 0{,}2\,\frac{22}{22+10} = 1{,}74\text{ml}$$

BIBLIOGRAPHIE

MIRANDA PATO C. de, *F.V., O.I.V.*, 1959, n°12.
HUBACH C.E., *J. Ass. Off. Agric. Chem*., 1966, **49**, 498.
Fédération internationale des Producteurs de jus de fruits, *F. O.I.V.*,1968, n°37.
JUNGE Ch., *F.V., O.I.V.*, 1973, n°440.

Méthode OIV-MA-AS321-03 Méthode Type II

Détermination de la teneur des vins en fluorures a l'aide d'une électrode sélective et ajouts dosés

(A22 ; OENO 22/2004 ; OIV/OENO 377/2009)

1. PORTEE ET CHAMP D'APPLICATION

Cette méthode est applicable à l'analyse des fluorures dans tous les vins. Avec une dilution adaptée, la fourchette de détection peut aller de 0,1 mg/l à 10,0 mg/l.

2. PRINCIPE

La concentration des fluorures dans l'échantillon est mesurée après addition d'un tampon, en utilisant une électrode sélective des ions fluorure. Le tampon fournit une force ionique élevée; complexe le fer et l'aluminium (qui autrement complexeraient avec le fluor) et ajuste le pH à un niveau qui minimise la formation d'un complexe HF•HF. Les effets de matrice sont ensuite minimisés par l'utilisation d'un ajout dosé.

3. REACTIFS

3.1 Eau distillée ou désionisée
3.2 Chlorure de sodium pureté ≥ 99,0%.
3.3 Citrate trisodique pureté ≥ 99,0%.
3.4 CDTA (acide 1,2-diaminocyclohexane-N,N,N',N'- tétracétique hydrate) pureté ≥ 98,0%.
3.5 Hydroxyde de sodium pureté ≥ 98,0%.
3.6 Solution d'hydroxyde de sodium 32% (m/v) fait avec 3.5.
3.7 Acide acétique glacial pureté ≥ 99,0%.
3.8 Fluorure de sodium pureté ≥ 99,0%.
3.9 Tampon commercial d'ajustement de force ionique totale (TISAB) (TISAB III-Orion Research Inc. Cat. # 940911) ou équivalent (Voir 4.2)
3.10 Alternative TISAB :

3.10.1 A environ 700 ml d'eau distillée (3.1) dans un vase cylindrique de 1 l (4.3), ajouter 58,0 g ± 0,1 g de chlorure de sodium (3.2) et 29,4 g ± 0,1 g de citrate trisodique (3.3).

3.10.2 Dissoudre 10,0 g ± 0,1 g de CDTA (acide 1,2-diaminocyclohexane-N,N,N',N'- tétracétique) (3.4) et 6 ml d'hydroxyde de sodium à 32 % (m/v) (3.6) dans approximativement 50 ml d'eau (3.1).

3.10.3 Mélanger les deux solutions, puis ajouter 57 ml d'acide acétique glacial (3.7) et ajuster le pH à 5,5 avec l'hydroxyde de sodium à 32 % (m/v) (3.6). Refroidir à température ambiante, transférer dans une fiole jaugée de 1 l (4.10), et ajuster au volume avec de l'eau (3.1).

3.11 Solutions étalons de fluorures

3.11.1 Solution étalon de fluorures à 100 mg/l : peser 221 mg ± 1 mg de fluorure de sodium (3.8) (séché à 105 °C pendant 4 heures) dans une fiole volumétrique de 1 l en polyéthylène (4.10) et ajuster avec de l'eau (3.1).

3.11.2 Etalons de travail de fluorures à 1,0 mg/l, 2,0 mg/l, et 5,0 mg/l : à l'aide de pipettes (4.11), verser respectivement 1ml, 2 ml, et 5 ml de la solution étalon à 100 mg/l (3.11.1) dans trois fioles volumétriques de 100 ml en polyéthylène (4.10) et ajuster avec de l'eau (3.1).

3.12 Vin témoin : vin réputé ne contenant pas de fluorures, utilisé comme témoin.

3.13 Vin étalon surchargé à 1 mg/l : mettre 10 ml (4.11) de solution étalon de fluorures à 100 mg/l (3.11.1) dans une fiole jaugée de 1l (4.10) et compléter au trait de jauge avec du vin sans fluorures (3.12).

4. APPAREILLAGE

4.1 Ionomètre avec une fonction ajouts dosés (ex. Analyseur Corning pH/ion 455, Cat. # 475344) ou ionomètre permettant la lecture des tensions (mV).
4.2 Electrode sélective pour les ions fluorures et une électrode de référence ou une électrode combinée (ex. Electrode de fluorure Corning Cat. # 34108-490).
4.3 Vases cylindriques de 150 ml et de 1 l en polyéthylène.
4.4 Eprouvette graduée à pied de 50 ml en polyéthylène.
4.5 Agitateur magnétique
4.6 Barreau magnétique, revêtu de téflon.
4.7 Flacons en plastique (Nalgène ou équivalent) de 125 ml, avec des bouchons
4.8 Pipette de précision, 500 µl
4.9 Bain d'eau à ultrasons

4.10 Fioles jaugées, Classe A, 50 ml, 100 ml, et 1 l.
4.11 Pipettes, Classe A, 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml, et 25 ml.

5. PREPARATION DES SOLUTIONS D'ETALONNAGE

5.1 Mettre 25 ml (4.11) de solutions étalon (3.11.2) de 1,0 mg/l, 2,0 mg/l, et 5,0 mg/l respectivement dans trois vases cylindriques de 150 ml (4.3) et ajouter 20 ml (4.11) d'eau (3.1) et5 ml de TISAB commercial (3.9) à chacun. Mélanger avec un agitateur magnétique (4.5 et 4.6).

5.2 Quand le tampon TISAB alternatif (3.10) est utilisé : mettre 25 ml (4.11) de solutions étalon (3.11.2) de 1,0 mg/l, 2,0 mg/l, et 5,0 mg/l respectivement dans trois vases cylindriques de 150 ml (4.3) et ajouter dans chacun 25 ml (4.11) de tampon alternatif (3.10). Mélanger avec un agitateur magnétique (4.5 et 4.6).

6. PREPARATION DES ECHANTILLONS

Bien mélanger l'échantillon de vin avant le prélèvement. Les vins mousseux devront être dégazés avant le prélèvement en les transférant dans un vase cylindrique propre placé dans un bain d'eau à ultrasons (4.9) jusqu'à élimination du gaz.

6.1 Si le tampon commercial TISAB (3.9) est utilisé : mettre 25 ml d'échantillon (4.11) dans un vase cylindrique de 150 ml (4.3) avec 20 ml d'eau (3.1) et ajouter 5 ml (4.11) de tampon commercial TISAB (3.9). Mélanger avec un agitateur magnétique (4.5 et 4.6). Facteur de dilution (*DF*) = 1.

6.2 Si le tampon alternatif TISAB (3.10) est utilisé : mettre 25 ml d'échantillon (4.11) dans un vase cylindrique de 150 ml (4.3) et ajouter 25 ml (4.11) de tampon alternatif TISAB (3.10). Mélanger avec un agitateur magnétique (4.5 et 4.6). Facteur de dilution (*DF*) = 1.

7 MODE OPERATOIRE

Pour effectuer les mesures, les solutions étalons et les échantillons de vin doivent avoir la même température.

7.1 Etalons de référence

Mesurer le potentiel de chaque solution étalon, en utilisant le ionomètre (4.1), l'électrode sélective de fluorure (4.2), et l'électrode de référence (4.2). La lecture finale doit être effectuée quand la mesure est stabilisée (la stabilité est atteinte quand le potentiel ne varie pas plus de 0,2 à 0,3 mV/ 3 minutes). Noter les lectures pour chaque mélange de référence. Le log des concentrations en fonction du voltage mesuré pour chacune des solutions d'étalonnage est reportée sur un papier graphique pour déterminer la pente de l'électrode.

7.2 Echantillons de vin

Mesurer et noter le potentiel exprimé en mV (E1) de l'échantillon (6.1 ou 6.2) quand la mesure est stabilisée. Ajouter 500 µl (4.8) de solution étalon à 100 mg/l de fluorure (3.11.1) au prélèvement (6.1 ou 6.2). Quand la mesure est stabilisée, lire et noter le potentiel exprimé en mV (E2) de la solution de vin.
Pour une meilleure précision, il est recommandé que la concentration finale en ions fluorure après addition soit au moins du double de celle de l'échantillon. Pour s'en assurer, il est suggéré, si la concentration dans l'échantillon est supérieure à 2 mg/l lors de la première détermination, d'effectuer une seconde détermination après dilution de l'échantillon. Dans ce cas , la dilution doit être faite comme suit (7.2.1 ou 7.2.2).

7.2.1 Lorsqu'on utilise le tampon commercial TISAB (3.9) : à l'aide d'une pipette (4.11) mettre 25 ml d'échantillon de vin dans une fiole jaugée de 50 ml (4.10) et ajuster avec de l'eau (3.1). Verser 25 ml (4.11) de ce vin dilué dans un vase cylindrique de 150 ml (4.3) et ajouter 20 ml d'eau (3.1) et 5 ml de tampon commercial TISAB (3.9). Mélanger avec un agitateur magnétique (4.5 et 4.6), puis procéder à la mesure comme en 7.2. Facteur de dilution (DF) = 2.

7.2.2 Lorsqu'on utilise le tampon alternatif TISAB (3.10) : à l'aide d'une pipette (4.11) mettre 25 ml d'échantillon de vin dans une fiole jaugée de 50 ml (4.10) et ajuster avec de l'eau (3.1). Verser 25 ml (4.11) de ce vin dilué dans un vase cylindrique de 150 ml (4.3) et ajouter 25 ml de tampon alternatif TISAB (3.10). Mélanger avec un agitateur magnétique (4.5 et 4.6), puis procéder à la mesure comme en 7.2. Facteur de dilution (DF) = 2.

8. CALCUL

La teneur en fluorure de l'échantillon, exprimée en mg/l, est obtenue avec la formule suivante :

$$C_f = \frac{V_a \times C_a}{V_o} \times \quad \frac{1}{((anti\log \Delta E / S) - 1)}$$

si le volume de solution étalon ajouté V_{std} est < 1% du volume de la solution après ajout,
alors $V_a = V_o$ et

$$C_f = DF \times Ca \times \quad \frac{1}{((anti\log \Delta E / S) - 1)}$$

C_f = concentration en fluorure de l'échantillon (mg/l)
DF = facteur de dilution. S'il est nécessaire de diluer l'échantillon comme en (7.2.1) ou en (7.2.2), utiliser une valeur identique à la dilution de l'échantillon, c'est à dire *DF* = 2 pour un échantillon dilué (7.2.1) et (7.2.2) ou *DF* = 1 s'il ne l'est pas, comme en (6.1) ou (6.2).

V_o = volume initial d'échantillon avant ajout (ml)

V_a = volume de la solution après ajout (ml)

ΔE = différence entre potentiels E1 et E2 obtenus en (7.2) en mV.

S = pente de la droite de calibration de l'électrode.

$$C_a = \frac{V_{std} \times C_{std}}{V_{samp}}$$

où
C_a = concentration (en mg/l) de fluorure ajoutée à la solution de l'échantillon (V_o) obtenu en multipliant le volume de l'étalon ajouté (3.11.1) (V_{std}) par la concentration (C_{std}) de l'étalon (3.11.1) et divisé par le volume d'échantillon (25 ml) utilisé en (6.1) ou (6.2).

V_{std} = volume ajouté d'étalon (3.11.1) (0,5 ml)
V_{samp} = volume d'échantillon utilisé en (6.1) ou (6.2), V_{samp} = 25 ml.
C_{std} = concentration de l'étalon (3.11.1).

Exemple de calcul :

(1) pour un échantillon préparé comme en (6.2) et déterminé comme en (7.2)

DF = 1

$$C_a = \frac{V_{std} \times C_{std}}{V_{samp}} = \frac{0.5\ ml \times 100\ mg/l}{25\ ml} = 2 \text{ mg /l}$$

ΔE = 19,6 mV
S = -58,342

$$C_f = DF \times Ca \times \frac{1}{((anti\log \Delta E / S) - 1)}$$

$$C_f = 1 \times 2\ mg/l \times \frac{1}{((anti\log 19{,}6 / 58{,}342) - 1)}$$

$$C_f = 1 \times 2\ mg/l \times 0{,}856 = 1{,}71 \text{ mg / l de fluorures}$$

(2) pour un échantillon préparé comme en (7.2.2), et déterminé comme en (7.2)
DF = 2

$$C_a = \frac{V_{std} \times C_{std}}{V_{samp}} = \frac{0{,}5\ ml \times 100\ mg/l}{25\ ml} = 2 \text{ mg /l}$$

ΔE = 20,4 mV
S = -55,937

$$C_f = DF \times Ca \times \frac{1}{((anti\log \Delta E / S) - 1)}$$

$$C_f = 2 \times 2\ mg/L \times \frac{1}{((anti\log 20{,}4 / 55{,}937) - 1)}$$

$$C_f = 2 \times 2\ mg/L \times \frac{1}{((anti\log 20{,}4 / 55{,}937) - 1)}$$

C_f = 2 x 2 mg / l x 0,760 = 3,04 mg / l de fluorures

9. FIDELITE

Les détails de l'étude interlaboratoires sont donnés en annexe B. Les valeurs de HORRAT (Ho_R) variant de 0,30 à 0,97 indiquent une bonne reproductibilité parmi les participants.

Les résultats des calculs statistiques sont donnés dans l'annexe B tableau 2. L'écart type de répétabilité (RDS_r) varie de 1,94% à 4,88% ; l'écart type de reproductibilté (RDS_R) varie de 4,15% à 18,40%. La moyenne des taux de recouvrement varie entre 99,% et 100,3% de la valeur cible.

10. ASSURANCE ET MAITRISE DE LA QUALITE

10.1 Analyser une solution étalon à 1,0 mg/l (3.11.2) au début et à la fin de chaque série de mesure. Les résultats doivent être de 1,0 ± 0,1 mg/l.

10.2 Avant chaque série de mesures, analyser un blanc (3.12) et, pour le contrôle de qualité interne (CQI), un vin surchargé (3.13). Le blanc ne doit pas excéder 0,0 mg/l ± 0,1 mg/l et le CQI ne doit pas dépasser 1,0 mg/l ± 0,2 mg/l.

Annexe A

Bibliographie

[1] AOAC International, AOAC Official Methods Program, Associate Referee's Manual On Development, Study, Review, and Approval Process,1997

[2] Postel, W.; Prasch, E., Wein-Wissenschaft, (1975) 30 (6), 320-326

[3] Office International de la Vigne et du Vin, Compendium of International Methods of Wine Analysis, 5/10/94, 255–257

[4] Gil Armentia, J. M.; Arranz, J. F.; Barrio, R. J.; Arranz, A., Anales de Bromatologia, (1988) 40 (1) 71-77

[5] Gran, G; Analyst (1952) 77, 661

[6] Corning fluoride ion selective electrode – Instruction Manual, 1994

[7] Corning Instruction Manual pH/ion analyzer 455, 109121-1 Rev. A, 11/96

[8] Horwitz,W.; Albert, R.; Journal of the Association of Official Analytical Chemists, (1991) 74 (5) 718

Annexe B

Etude interlaboratoires

B.1 INTRODUCTION

La méthode de détermination des fluorures dans les vins a été validée par une étude collaborative. Douze participants au total ont participé à cette étude, six européens et six américains. L'étude collaborative a été menée en utilisant, le protocole de Youden de l'AOAC.

B.2 Participants

Les douze laboratoires participant à la validation se situaient en Allemagne, Autriche, Espagne, Etats-Unis et France : BATF Alcohol and Tobacco Laboratory—Alcohol Section, SF, Walnut Creek, CA., Etats-Unis; BATF, National Laboratory Ctr., Rockville, MD, Etats-Unis; Bundesinstitut für Gesundheitlichen Verbraucherschutz, Berlin, Allemagne ; Canandaigua Winery, Madera, CA, Etats-Unis; CIVC, Epernay, France ; E. & J. Gallo Winery-Analytical Services Laboratory, Modesto, CA, Etats-Unis; E. & J. Gallo Winery-Technical Analytical Services Laboratory, Modesto, CA, Etats-Unis; ETS Labs, St. Helena, CA, Etats-Unis; Höhere Bundeslehranstalt & Bundesamt für Wein und Obstbau, Klosterneuburg, Autriche ; Institut Catala de la Vinya i el Vi, Vilafranca del Penedes (Barcelone), Espagne ; Laboratorio Arbitral Agroalimentario, Madrid, Espagne ; and Sutter Home Winery, St. Helena, CA., Etats-Unis.

B.3 Les échantillons utilisés pour l'étude

Les échantillons utilisés pour l'étude sont donnés dans l'Annexe I. Ils ont été distribués en double aveugle (six paires d'échantillons, trois vins rouges et trois vins blancs).

Echantillon	Description de l'échantillon
1	Vin blanc sans surcharge (total de 0,6 mg/l F^-)
2	Vin blanc surchargé avec 0,3 mg /l (total de 0,9 mg/l F^-)
3	Vin blanc surchargé avec 0,9 mg /l (total de 1,5 mg/l F^-)
4	Vin blanc surchargé avec 1,2 mg /l (total de 1,8 mg/l F^-)
5	Vin blanc surchargé avec 1,4 mg /l (total de 2,0 mg/l F^-)
6	Vin blanc surchargé avec 1,7 mg /l (total de 2,3 mg/l F^-)

7 Vin rouge sans surcharge (total de 0,2 mg/l F^-)
8 Vin rouge surchargé avec 0,3 mg /l (total de 0,5 mg/l F^-)
9 Vin rouge surchargé avec 0,8 mg /l (total de 1,0 mg/l F^-)
10 Vin rouge surchargé avec 1,1 mg /l (total de 1,3 mg/l F^-)
11 Vin rouge surchargé avec 2,5 mg /l (total de 2,7 mg/l F^-)
12 Vin rouge surchargé avec 2,8 mg /l (total de 3,0 mg/l F^-)

B.4 Résultats

Un résumé des résultats obtenus par les douze participants se trouve dans le Tableau I. Aucun des laboratoires n'a signalé de difficulté particulière. Le test de Cochran a mis en évidence une paire aberrante. Ces résultats sont notés [(c)] dans le Tableau I, et n'ont pas été utilisés dans l'analyse statistique.

Tableau 1

Données concernant l'analyse collaborative pour la détermination des fluorures dans les vins par électrode sélective après ajouts dosés
Les résultats sont exprimés en mg fluorures/l

Labo	Vin blanc						Vin rouge					
	Paire 1[b]		Paire 2[b]		Paire 3[b]		Paire 4[b]		Paire 5[b]		Paire 6[b]	
Numéro	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
1	0,55	0,80	1,33	1,56	1,86	2,24	0,19	0,45	0,89	1,17	2,54	2,77
2	0,52	0,81	1,39	1,64	1,86	2,31	0,19	0,46	0,92	1,20	2,58	2,77
3	0,52	0,81	1,40	1,70	1,92	2,25	0,14	0,42	0,96	1,22	2,64	2,95
4	0,62	0,98	1,48	1,64	1,85	2,14	0,28	0,56	1,00	1,32	2,64	2,72
5	0,48	0,78	1,34	1,64	1,84	2,11	0,12	0,39	0,88	1,16	2,56	2,82
6	0,53	0,84	1,45	1,74	1,97	2,30	0,13	0,43	0,92	1,21	2,66	2,93
7	0,53	0,76	1,27	1,64	1,89	2,06	0,14	0,40	0,88	1,12	2,44	2,83
8	0,57	0,88	1,51	1,85	2,11	2,33	0,48[c]	0,48[c]	1,01	1,32	2,64	3,08
9	0,51	0,81	1,40	1,71	1,90	2,20	0,13	0,42	0,90	1,19	2,60	2,86
10	0,54	0,84	1,43	1,71	1,93	2,22	0,18	0,44	0,96	1,23	2,66	2,87
11	0,60	0,93	1,48	1,75	1,98	2,32	0,25	0,57	1,06	1,31	2,68	2,82
12	0,65	0,94	1,54	1,79	2,05	2,32	0,21	0,52	1,03	1,24	2,81	3,07
No de cas	12	12	12	12	12	12	11	11	12	12	12	12
Minimum	0,48	0,76	1,27	1,56	1,84	2,06	0,12	0,39	0,88	1,12	2,44	2,72
Maximum	0,65	0,98	1,54	1,85	2,11	2,33	0,28	0,57	1,06	1,32	2,81	3,08
Ecart	0,17	0,22	0,27	0,29	0,27	0,27	0,16	0,18	0,18	0,20	0,37	0,36
Moyenne	0,55	0,85	1,42	1,70	1,93	2,23	0,18	0,46	0,95	1,22	2,62	2,87
Médiane	0,54	0,83	1,42	1,71	1,91	2,25	0,18	0,44	0,94	1,22	2,64	2,85
Ecart-type	0,050	0,069	0,079	0,079	0,084	0,091	0,052	0,063	0,061	0,065	0,090	0,114

[b] Paires de Youden

[c] Valeur supprimée après test de Cochran et qui n'est pas reprise dans l'analyse statistique

[c]

Tableau 2

Résultats de l'analyse collaborative pour la détermination des fluorures dans les vins par électrode sélective après ajouts dosés

	Vin Blanc			Vin rouge		
STATISTIQUE	**Paire 1**	**Paire 2**	**Paire 3**	**Paire 4**	**Paire 5**	**Paire 6**
Nombre de Laboratoires	12	12	12	11[d]	12	12
Nombre de répétitions par laboratoire	2	2	2	2	2	2
Moyenne (deux niveaux)	0,55 0,85	1,42 1,70	1,93 2,23	0,18 0,46	0,95 1,22	2,62 2,87
Variance de répétabilité	0,0006	0,0015	0,0026	0,0002	0,0005	0,0049
Ecart type de répétabilité	0,0235	0,0382	0,5106	0,0156	0,0211	0,0703
Ecart-type relatif RSDr de répétabilité	3,35 %	2,45 %	2,45 %	4,88 %	1,94 %	2,55 %
Variance de reproductibilité	0,0039	0,0070	0,0089	0,0034	0,0042	0,0130
Ecart-type de reproductibilité	0,0625	0,0835	0,0945	0,0587	0,0647	0,1141
Ecart-type RSDR, de reproductibilité	8,92 %	5,36 %	4,54 %	18,39 %	5,95 %	4,15 %
Reproductibilité théorique selon Horwitz (RSDR)	16,88	14,97	14,33	19,00	15,80	13,74
Valeur de HORRAT HoR (RSDR (mesuré)/RSDR (Horwitz))	0,53	0,36	0,32	0,97	0,38	0,30
taux moyen de récupération (en%)	93,1	94,6	96,7	91,0	94,4	96,4

[d] Une paire d'un labo a été supprimée des données fixées par le Test de Cochran

Méthode OIV-MA-AS321-04 Méthode Type IV

Phosphore total

(A16, révision par OIV/OENO 377/2009)

1. Principe de la méthode

Après oxydation nitrique et incinération, l'acide phosphorique est dosé colorimétriquement sur la solution chlorhydrique des cendres grâce à la coloration jaune qu'il donne avec le réactif vanadomolybdique.

2. Appareillage

2.1 Bain d'eau à 100°C

2.2 Plaque chauffante

2.3 Four électrique à régulation de température

2.4 Spectrophotomètre permettant des mesures entre 300 et 700 nm.

3. Réactifs

3.1 *Acide nitrique*, (r_{20} = 1,39 g/ml).

3.2 *Acide chlorhydrique environ 3 M*; obtenu en ajoutant à 1 volume d'acide chlorhydrique (r_{20} = 1,15 – 1,18 g/ml), 3 volumes d'eau.

3.3 *Réactif vanadomolybdique:*

Solution A : dissoudre 40 g molybdate d'ammonium, $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$, dans 400 ml d'eau.

Solution B : dissoudre 1 g de vanadate d'ammonium, $NH_4\ VO_3$, dans 300 ml d'eau et 200 ml d'acide nitrique (r_{20} = 1,39g/l). Laisser refroidir.

Réactif vanadomolybdique : dans une fiole jaugée de 1 l, verser d'abord la solution B puis la solution A; compléter à 1 litre avec de l'eau. Réactif à utiliser 8 jours après sa préparation.

3.4 *Solution de P_2O_5 à 0,1 g/l.*

Préparer une solution à 1 g/l de P_2O_5 en dissolvant 2,454 de dihydrogénophosphate de potassium, K_2HPO_4, dans 1 litre d'eau; la diluer au $^1/_{10}$ (v/v).

4. Mode opératoire

4.1 *Obtention des cendres*

5 ml* de vin ou de moût prélevés dans une capsule de platine ou de silice, sont mis à évaporer sur un bain d'eau à 100°C.

* Une prise d'essai de 5 ml permet le dosage de teneurs en P2O5 comprises entre 100 et 500 mg/l. En dehors de ces limites augmenter ou diminuer la prise d'essai.

Quand le résidu est presque sec, ajouter 1 ml d'acide nitrique (r_{20} = 1,39g/l) et placer la capsule pendant 1 h sur une plaque chauffante puis dans un four porté à 600-650°C jusqu'à obtention des cendres blanches.

4.2 *Dosage*

Reprendre les cendres par 5 ml d'acide chlorhydrique environ 3 M et verser la solution obtenue dans une fiole jaugée de 100 ml. Rincer la capsule avec environ 50 ml d'eau distillée et verser ces eaux de lavage dans la fiole. Ajouter 25 ml exactement mesurés de réactif vanadomolybdique. Agiter, laisser la coloration se développer pendant 15 à 20 min. Porter à 100 ml le contenu de la fiole avec de l'eau distillée. Examiner au spectrophotomètre à 400 nm.

Simultanément, préparer la gamme d'étalonnage. Placer dans des fioles jaugées de 100 ml, 5, 10, 15, 20 et 25 ml de la solution titrant 0,1 g de P_2O_5/l amener le volume à 50 ml environ avec de l'eau distillée, ajouter 25 ml de réactif vanadomolybdique. Laisser la coloration se développer en même temps dans la gamme étalon et dans les échantillons à doser, car la coloration évolue légèrement avec le temps. Déterminer les absorbances à 400 nm après avoir porté à 100 ml avec de l'eau distillée le contenue des fioles jaugées.

Pour rester toujours dans la zone d'absorbance la mieux adaptée, ne pas utiliser de mise au zéro avec de l'eau distillée, mais régler la déviation du galvanomètre du spectrophotomètre sur une valeur donnée d'absorbance pour une concentration déterminée.

5. Expression des résultats

5.1 *Calculs*

La teneur en phosphore total, exprimée en milligrammes par litre d'anhydride phosphorique, P_2O_5, est obtenue en reportant sur la courbe d'étalonnage l'absorbance déterminée sur l'échantillon de vin.

La teneur en phosphore total est exprimée en milligrammes par litre de P_2O_5 sans décimale.

BIBLIOGRAPHIE

A.F.N.O.R., Norme U, 42-246, Tour Europe, Paris.

SUDRAUD P., *Bull. O.I.V.*, 1969, n^{os}462-463, 933.

Méthode OIV-MA-AS321-05A Méthode Type II

Sulfates

(A14, révision par OIV/OENO 377/2009)

1. Principe des méthodes

Précipitation du sulfate de baryum et pesée. Le phosphate de baryum précipité dans les mêmes conditions est éliminé par un lavage du précipité à l'acide chlorhydrique.

Dans le cas des moûts ou des vins riches en dioxyde de soufre, un désulfitage préalable par ébullition à l'abri de l'air est prescrit.

2. Méthode

2.1. *Réactifs*

2.1.1. Acide chlorhydrique en solution 2 M.

2.1.2. Chlorure de baryum en solution à 200 g/l de $BaCl_2.2H_2O$.

2.2. *Mode opératoire*

2.2.1. Cas général

Introduire dans un tube à centrifugation de 50 ml, 40 ml d'échantillon à analyser; ajouter 2 ml d'acide chlorhydrique 2 M et 2 ml de solution de chlorure de baryum à 200 g/l; agiter avec une baguette de verre; rincer la baguette avec un peu d'eau distillée et abandonner au repos pendant 5 min. Centrifuger pendant 5 min., puis décanter avec précaution le liquide surnageant.

Laver ensuite le précipité de sulfate de baryum en procédant de la façon suivante : ajouter 10 ml d'acide chlorhydrique 2 M, mettre le précipité en suspension et centrifuger pendant 5 minutes. Séparer avec précaution le liquide surnageant. Répéter deux fois le lavage du précipité dans les mêmes conditions avec 15 ml d'eau distillée chaque fois.

Transvaser quantitativement en rinçant, avec de l'eau distillée, le précipité dans une capsule de platine tarée et la placer sur un bain d'eau à 100 °C jusqu'à évaporation à sec. Le précipité desséché est calciné plusieurs fois brièvement sur flamme jusqu'à obtention d'un résidu blanc. Laisser refroidir dans un dessiccateur et peser.

Soit *m* la masse en milligrammes de sulfate de baryum obtenue.

2.2.2. Cas particulier : moûts sulfités et vin à teneur élevée en dioxyde de soufre.

Procéder au préalable à l'élimination du dioxyde de soufre.

Dans une fiole conique de 500 ml, munie d'une ampoule à robinet et d'un tube de dégagement, introduire 25 ml d'eau et 1 ml d'acide chlorhydrique pur (r_{20} = 1,15 1,18 g/ml). Faire bouillir cette solution pour chasser l'air et introduire 100 ml de vin par l'ampoule à robinet, tout en maintenant l'ébullition. Poursuivre l'ébullition jusqu'à ce que le volume de liquide contenu dans la fiole conique soit réduit à environ 75 ml et le transvaser quantitativement, après refroidissement dans une fiole jaugée de 100 ml. Compléter au trait de jauge avec de l'eau. Procéder au dosage des sulfates sur une prise d'essai de 40 ml, comme il est indiqué en 2.2.1.

2.3. *Expression des résultats*

2.3.1. Calculs

La teneur en sulfates, exprimée en milligrammes par litre de sulfate de potassium, K_2SO_4, est :

$$18{,}67 \times m$$

La teneur du moût ou du vin en sulfates est exprimée en milligrammes par litre de sulfate de potassium, sans décimale.

2.3.2. Répétabilité :

jusqu'à 1000 mg/l : r = 27 mg/l
environ 1500 mg/l : r = 41 mg/

2.3.3. Reproductibilité :

jusqu'à 1000 mg/l : R = 51 mg/l
environ 1500 mg/l : R = 81 mg/l

BIBLIOGRAPHIE

DEIBNER L, BÉNARD P., *Ind. alim. agric.*, 1954, **71**, n°1, 23; n°5, 427; 1955, **72**, n°9-10, 565 et n°11, 673.
DEIBNER L., *Rév. ferm. ind. alim.*, 1959, **14** n°5, 179 et n°6, 227.
BLAREZ Ch., *Vins et spiritueux*, 1908, 149, Maloine éd., Paris.
DER HEIDE X. von, SCHITTHENNER F., *Der Wein*, 1922, 320, Vieweg & Sohn Verlag, Braunschweig.
JAULMES P., *Analyse des vins*, 1924, 73, Dubois et Poulain, éd., Montpellier; 2e édition, 1951, 112.
SIMONEAU G., *Étude sur les moûts concentrés de raisins*, 1946, Thése pharm., Montpellier, 49.

RIBÉREAU-GAYON J., PEYNAUD E., *Analyse et contrôle des vins,* 1947, 244, Ch. Béranger éd., Paris-Liège.
FROLOV-BAGREEV A., AGABALIANTZ G., *Chimie du vin,* 1951, 369, Moscou, Laboratoire de chimie de l'État de Würzburg (R.F. Allemagne), *F.V., O.I.V.*, 1969, n°321.

Méthode OIV-MA-AS321-05B Méthode Type IV

Sulfates

1. Principe des méthodes

Classement des vins en plusieurs catégories par une méthode dite des limites, basée sur la précipitation du sulfate de baryum à l'aide d'une solution titrée d'ions baryum.

SUPPRIMÉE
(Résolution OIV-Oeno-377-2009)

Méthode OIV-MA-AS322-01 Méthode Type IV

Ammonium

(A20, révision par OIV/OENO 377/2009)

1. Principe de la méthode

Fixation du cation ammonium sur une résine cationique faible, élution par une solution acide, distillation de l'éluat et dosage de l'ammoniaque dans le distillat par une solution titrée d'acide chlorhydrique.

2. Appareillage

2.1. *Colonne de résine échangeuse de cations*

Employer une burette à robinet de 50 ml dans laquelle est placé un petit tampon de laine de verre et 25 g de résine faiblement cationique (Amberlite IR−50, 80−100 mesh, par exemple).

Commencer par deux lavages, alternés, avec une solution M d'hydroxyde de sodium et une solution M d'acide chlorhydrique, laver ensuite la résine avec de l'eau distillée jusqu'à réaction négative de l'ion chlorure avec le nitrate d'argent, faire passer lentement à travers la colonne 50 ml de la solution tampon neutre et rincer avec de l'eau distillée jusqu'à élimination des phosphates (décelés à l'aide d'une solution saturée d'acétate de plomb).

2.2. Appareil de distillation

Utiliser l'appareil décrit au chapitre *Titre alcoométrique* en 3.1.

Le liquide condensé est amené dans la fiole conique réceptrice par un tube effilé touchant le fond de ce récipient.

On peut également employer l'appareil à entraînement par la vapeur d'eau décrit au chapitre *Acidité volatile* en 4.1., ou tout autre appareil répondant aux essais décrits ci-après (qui vérifient également la pureté des réactifs) :

a) placer dans le ballon à distillation 40-50 ml de solution d'hydroxyde de sodium à 30 p. 100, 50 ml d'une solution M d'acide chlorhydrique. Distiller la moitié du volume en recueillant le distillat dans 30 ml de solution d'acide borique à 40 g/l additionnée de 5 gouttes de solution de rouge de méthyle. Le virage de l'indicateur doit être obtenu par 0,1 ml de solution 0,1 M d'acide chlorhydrique.

b) Un essai semblable est fait avec, en plus des réactifs énumérés en *a*), 10 ml de solution 0,05 M de sulfate d'ammonium, contenant 3,55 g/l de $(NH_4)_2SO_4$. Dans ce cas, on doit utiliser entre 10 et 10,1 ml de solution 0,1 M d'acide chlorhydrique pour obtenir le virage de l'indicateur.

3. Réactifs

3.1. Solution M d'acide chlorhydrique

3.2. Solution M d'hydroxyde de sodium

3.3. *Solution neutre pour le lavage de la résine* :

hydrogénophosphate de sodium, $Na_2HPO_4.12H_2O$ ..... 15 g
dihydrogénophosphate de potassium, KH_2PO_4 ..... 3,35 g
eau q.s.p. ..... 1000 ml

Vérifier que le pH est 7 ± 0,2.

3.4. Solution d'hydroxyde de sodium à 30 p. 100 (m/m), ρ = 1,33 g/ml.

3.5. Solution 0,1 M d'acide chlorhydrique.

3.6. Solution de phénolphtaléine à 1 p. 100 (m/v) dans l'alcool neutre, à 96% vol.

3.7. Solution de vert de bromocrésol à 1 p. 100 (m/v) :

vert de bromocrésol ..... 1 g
dissoudre dans une solution 0,1 M d'hydroxyde de sodium ..... 14 ml
eau q.s.p. ..... 100 ml

3.8. *Solution hydroalcoolique de rouge de méthyle à 0,2 p. 100 (m/v)* :

rouge de méthyle ..... 0,2 g
alcool à 95% vol. ..... 60 ml
eau q.s.p. ..... 100 ml

3.9. *Solution d'acide borique* :

Acide borique ..... 40 g
eau q.s.p. ..... 1000 ml

Cette solution, additionnée de 5 gouttes de solution de rouge de méthyle, doit devenir rose par addition de 0,1 ml au plus de solution 0,1 M d'acide chlorhydrique. Lorsque l'acide borique dont on dispose contient une petite quantité de bases comme impuretés, il est possible de corriger ce défaut en ajoutant à la solution 5 gouttes d'un de ces deux indicateurs et d'en amener le virage par quelques gouttes d'acide chlorhydrique 0,1 M.

4. Mode opératoire

Placer 50 ml de l'échantillon à analyser dans un vase cylindrique de 250 ml. Ajouter un volume de solution M d'hydroxyde de sodium égal à ½ (n – 0,5) ml, n étant le volume de solution 0,1 M d'hydroxyde de sodium utilisé dans le titrage de l'acidité totale sur 10 ml de vin. Les faire passer sur la colonne de résine échangeuse de cations préparée ci-dessus, à raison de une goutte toutes les deux secondes. Le pH de l'effluent doit être compris entre 4 et 5. Rincer la colonne avec 50 ml d'eau distillée qui doit passer avec la même vitesse.

Le cation ammonium ainsi que les autres cations sont quantitativement fixés. Les amides, les oligopeptides et la presque totalité des acides aminés sont entraînés par les eaux de lavage.

Éluer ensuite les cations fixés par la résine avec 50 ml d'une solution M d'acide chlorhydrique et rincer avec 50 ml d'eau distillée.* L'éluat et les eaux de lavage sont recueillis dans un ballon à distillation à fond rond de un litre.

Ajouter 1 goutte de solution de phénolphtaléine à 1 p. 100 et une quantité suffisante de solution d'hydroxyde de sodium à 30 p. 100 pour obtenir une réaction franchement alcaline, en ayant soin de refroidir constamment le ballon pendant cette addition. Distiller ensuite la moitié environ du volume du liquide qui se trouve dans le ballon à distillation en recueillant le distillat dans 30 ml de solution d'acide borique à 40 g/l.

Titrer l'ammoniaque distillée en présence de vert de bromocrésol ou de rouge de méthyle, à l'aide d'une solution 0,1 M d'acide chlorhydrique, soit *n* ml le volume versé.

5. Expression des résultats

La teneur en ammonium, NH_4, est exprimée en milligrammes par litre sans décimale.

5.1. Calcul

La teneur en ammonium, exprimée en milligrammes par litre est :

$$36 \times n$$

Lorsqu'on a affaire à des vins pauvres en ammonium, effectuer le dosage sur 100 ml de vin. La quantité d'ammonium est, dans ce cas :

$$18 \times n$$

BIBLIOGRAPHIE

JAULMES P., *Analyse des vins*, 1951, 220, Montpellier.
KOURAKOU Mme S., *Ann. Fals. Exp. Chim*., 1960, **53**, 337

* Faire passer 50 ml de la solution tampon neutre et rincer avec de l'eau avant d'employer la colonne pour un nouveau dosage.

Méthode OIV-MA-AS322-02A Méthode Type II

Potassium

(A8, révision par OIV/OENO 377/2009)

1. Principe des méthodes

Le potassium est dosé directement dans le vin dilué par spectrophotométrie d'absorption atomique après addition d'un tampon spectral de chlorure de césium pour éviter l'ionisation du potassium.

2. Méthode

2.1. *Appareillage*

- Spectrophotomètre d'absorption atomique équipé d'un brûleur alimenté par de l'air et de l'acétylène.
- Lampe à cathode creuse au potassium.

2.2. *Réactifs*

2.2.1. Solution de potassium à 1 g par litre

Utiliser une solution standard de potassium du commerce à 1 g/l. Cette solution peut être préparée en dissolvant 4,813 g d'hydrogénotartrate de potassium dans de l'eau distillée et en ajustant le volume à 1 litre.

2.2.2. Solution modèle

Acide citrique ($C_6H_8O_7.H_2O$)	3,5 g
Saccharose	1,5 g
Glycérol	5,0 g
Chlorure de calcium anhydre ($CaCl_2$)	50 mg
Chlorure de magnésium anhydre ($Mg\ Cl_2$)	50 mg
Alcool absolu	50 ml
Eau q.s.p.	500 ml

2.2.3. Solution de chlorure de césium à 5 p. 100 en césium

Dissoudre 6,330 g de chlorure de césium (CsCl) dans 100 ml d'eau distillée.

2.3. *Mode opératoire*

2.3.1. Préparation de l'échantillon

Prélever 2,5 ml de vin (préalablement dilué $^1/_{10}$), les placer dans une fiole jaugée de 50 ml, ajouter 1 ml de la solution de chlorure de césium (2.1.3) et amener au trait de jauge avec de l'eau distillée.

2.3.2. Étalonnage

Dans une série de fioles jaugées de 100 ml, introduire 5 ml de solution modèle, placer 0 - 2,0 - 4,0 - 6,0 - 8,0 ml de la solution de potassium à 1 g par litre (préalablement diluée au $^1/_{10}$), ajouter dans toutes les fioles 2 ml de la solution de chlorure de césium (2.1.3), ajuster le volume à 100 ml avec de l'eau distillée.

Les solutions-étalons préparées titrent respectivement 0-2-4-6-8 mg de potassium par litre et contiennent 1 g de césium par litre. Ces solutions seront conservées dans des flacons en polyéthylène.

2.3.3. Dosage

Sélectionner la longueur d'onde 769,9 nm. Régler le zéro de l'échelle des absorbances avec la solution modèle contenant 1 g de césium par litre. Aspirer directement le vin dilué dans le brûleur du spectrophotomètre puis successivement les solutions étalons; relever les absorbances. Effecteur les déterminations en double.

2.4. *Expression des résultats*

2.4.1. Mode de calcul

Tracer la courbe de variation de l'absorbance en fonction de la concentration en potassium des solutions-étalons.

Reporter la valeur moyenne des absorbances obtenues pour l'échantillon de vin dilué sur cette courbe et déterminer la concentration C en potassium en milligrammes par litre.

La concentration en potassium exprimée en milligrammes par litre de vin, sans décimale, sera:

$$F \times C$$

F = facteur de dilution (ici 200).

2.4.2. Répétabilité (*r*) $r = 35$ mg/l.

2.4.3. Reproductibilité (R) $R = 66$ mg/l.

2.4.4. Autres expressions des résultats

- en milliéquivalents par litre : 0,0256 x F x C
- en tartrate acide de potassium en milligrammes par litre 4,813 x F x C.

Méthode OIV-MA-AS322-02B Méthode Type III

Potassium

(A28, révision par OIV/OENO 377/2009)

1. Principe des méthodes

Le potassium est dosé directement dans le vin dilué par photométrie de flamme.

2. Méthode

3.1. *Appareillage*

3.1.1. Photomètre à flamme alimenté par un mélange air-butane.

3.2. *Réactifs*

3.2.1. Solution de référence à 100 mg de potassium par litre

Alcool absolu	10 ml
Acide citrique $C_6H_8O_7$, H_2O	700 mg
Saccharose	300 mg
Glycérol	1000 mg
Chlorure de sodium desséché, NaCl	50,8 mg
Chlorure de calcium anhydre, $Ca Cl_2$	10 mg
Chlorure de magnésium anhydre ($Mg Cl_2$)	10 mg
Hydrogénotartrate de potassium desséché	481,3 mg
Eau q.s.p.	1000 ml

3.2.2. Solution de dilution

Alcool absolu	10 ml
Acide citrique $C_6H_8O_7$, H_2O	700 mg
Saccharose	300 mg
Glycérol	1000 mg
Chlorure de sodium desséché, NaCl	50,8 mg
Chlorure de calcium anhydre, $Ca Cl_2$	10 mg
Chlorure de magnésium anhydre ($Mg Cl_2$)	10 mg
Hydrogénotartrate de potassium desséché	383 mg
Eau q.s.p.	1000 ml

Pour préparer les solutions 3.2.1. et 3.2.2., dissoudre l'hydrogénotartrate de potassium dans environ 500 ml d'eau distillée très chaude, mélanger la solution

aux autres constituants préalablement dissous dans 400 ml d'eau distillée et ajuster à 1 litre.

Ces solutions, additionnées de 2 gouttes d'isothiocyanate d'allyle seront conservées dans des flacons en polyéthylène.

3.3. *Mode opératoire*

3.3.1. Étalonnage

Dans quatre fioles jaugées de 100 ml, placer 25-50-75-100 ml de la solution de référence et compléter à 100 ml avec la solution de dilution. On obtient ainsi des solutions contenant respectivement 25-50-75-100 mg par litre de potassium.

3.3.2. Dosage

Effectuer les mesures à 766 nm. Régler le 100 % de transmission avec de l'eau distillée. Aspirer directement dans le brûleur du photomètre, successivement les solutions-étalons, puis le vin dilué au $1/10^{ème}$ avec de l'eau distillée et relever les pourcentages de transmission. Si cela est nécessaire, diluer à nouveau le vin déjà dilué au $1/10^{ème}$, avec la solution de dilution.

3.4. *Expression des résultats*

3.4.1. Mode de calcul

Tracer la courbe de variation des pourcentages de transmission en fonction de la concentration en potassium des solutions-étalons. Reporter la transmission obtenue pour l'échantillon de vin dilué sur cette courbe et déterminer la concentration C en potassium.

La concentration en milligrammes de potassium par litre sans décimale sera:

C x F

F = facteur de dilution.

3.4.2.Répétabilité (r) r = 17 mg/l.

3.4.3. Reproductibilité (R) R = 66 mg/l.

3.4.4. Autres expressions des résultats:
- en milliéquivalents par litre: 0,0256 x F·x C
- en hydrogénotartrate acide de potassium par litre: 4,813 x·F x C.

Méthode OIV-MA-AS322-02C Méthode Type IV

Potassium

Dosage du potassium par pesée du tétraphénylborure précipité

SUPPRIMÉE
(Résolution OIV/OENO-377/2009)

Méthode OIV-MA-AS322-03A Méthode Type II

Sodium

(A25, révision par OIV/OENO 377/2009)

1. Principe des méthodes

Spectrophotométrie d'absorption atomique

Le sodium est dosé directement dans le vin par spectrophotométrie d'absorption atomique après addition d'un tampon spectral de chlorure de césium pour éviter l'ionisation du sodium.

2. Méthode

2.1. *Appareillage*

- Spectrophotomètre d'absorption atomique équipé d'un brûleur alimenté par de l'air et de l'acétylène.
- Lampe à cathode creuse au sodium.

2.2. *Réactifs*

2.2.1. Solution de sodium à 1 g par litre

Utiliser une solution standard de sodium du commerce à 1 g/l. Cette solution peut être préparée en dissolvant 2,542 g de chlorure de sodium NaCl, desséché, dans de l'eau distillée et en ajustant le volume à 1 litre.

Conserver cette solution dans un flacon en polyéthylène.

2.2.2. Solution modèle

Acide citrique, ($C_6H_8O_7.H_2O$)	3,5 g
Saccharose	1,5 g
Glycérol	5,0 g
Chlorure de calcium anhydre ($CaCl_2$)	50 mg
Chlorure de magnésium anhydre, ($MgCl_2$)	50 mg
Alcool absolu	50 ml
Eau q.s.p.	500 ml

2.1.3. Solution de chlorure de césium à 5 p. 100 en césium

Dissoudre 6,330 g de chlorure de césium (CsCl) dans 100 ml d'eau distillée.

2.3. *Mode opératoire*

2.3.1. Préparation de l'échantillon

Prélever 2,5 ml de vin, les placer dans une fiole jaugée de 50 ml, ajouter 1 ml de la solution de chlorure de césium et amener au trait repère avec de l'eau distillée.

2.3.2. Étalonnage

Dans une série de fioles jaugées de 100 ml introduire 5,0 ml de solution modèle, placer 0-2,5-5-7,5-10 ml de la solution de sodium à 1 g/l préalablement diluée 1/100, ajouter dans toutes les fioles 2 ml de la solution de chlorure de césium et ajuster le volume à 100 ml avec de l'eau distillée.

Les solutions étalons préparées titrent respectivement 0-0,25-0,50-0,75-1,00 mg de sodium par litre et contiennent 1 g de césium par litre. Ces solutions seront conservées dans des flacons en polyéthylène.

2.3.3. Dosage

Sélectionner la longueur d'onde 589 nm. Régler le zéro de l'échelle des absorbances avec la solution modèle contenant 1 g de césium par litre. Aspirer directement le vin dilué dans le brûleur du spectrophotomètre puis successivement les solutions étalons. Relever les absorbances. Effectuer les déterminations en double.

2.4. *Expression des résultats*

2.4.1. Mode de calcul

Tracer la courbe de variation de l'absorbance en fonction de la concentration en sodium des solutions étalons.

Reporter la valeur moyenne des absorbances obtenues pour l'échantillon sur cette courbe et déterminer la concentration C en sodium en milligrammes par litre.

La concentration en sodium exprimée en milligrammes par litre de vin sans décimale sera :

$$20.\ C$$

2.4.2. Répétabilité (r) $\quad r = 1 + 0{,}024\ x_i$

x_i = concentration en sodium de l'échantillon en mg/l.

2.4.3. Reproductibilité (R) $\quad R = 2{,}5 + 0{,}05\ x_i$

x_i = concentration en sodium de l'échantillon en mg/l.

Méthode OIV-MA-AS322-03B Méthode Type III

Sodium

(A25, révision par OIV/OENO 377/2009)

1. Principe des méthodes

Photométrie de flamme

Le sodium est dosé directement dans le vin dilué au moins $^1/_{10}$ par photométrie de flamme

2. Méthode

2.1. *Appareillage*

2.1.1. Photomètre de flamme alimenté par un mélange air-butane.

2.2. *Réactifs*

2.2.1. Solution étalon de sodium à 20 mg par litre

Alcool absolu	10 ml	
Acide citrique, ($C_6H_8O_7.H_2O$)	700 mg	
Saccharose	300 mg	
Glycérol	1000 mg	
Hydrogénotartrate de potassium	481,3 mg	
Chlorure de calcium anhydre ($CaCl_2$)	10 mg	
Chlorure de magnésium anhydre, ($MgCl_2$)	10 mg	
Chlorure de sodium desséché	50,84 mg	
Eau q.s.p.		1 l

2.2.2. Solution de dilution

Alcool absolu	10 ml	
Acide citrique, ($C_6H_8O_7$ H_2O)	700 mg	
Saccharose	300 mg	
Glycérol	1000 mg	
Tartrate de potassium	481,3 mg	
Chlorure de calcium anhydre ($CaCl_2$)	10 mg	
Chlorure de magnésium anhydre, ($MgCl_2$)	10 mg	
Eau q.s.p.		1 l

Pour préparer les solutions 2.2.1 et 2.2.2, dissoudre l'hydrogénotartrate de potassium dans 500 ml environ d'eau distillée très chaude, mélanger la solution aux autres constituants préalablement dissous dans 400 ml d'eau distillée et ajuster à 1 litre.

Ces solutions additionnées de 2gouttes d'isothiocyanate d'allyle seront conservées dans des flacons en polyéthylène.

2.3. *Mode opératoire*

2.3.1. Étalonnage

Dans une série de fioles jaugées de 100 ml, placer 5-10-15-20-25 ml de la solution de sodium à 20 mg/l et compléter à 100 ml avec la solution de dilution. On obtient ainsi des solutions contenant respectivement 1-2-3-4-5 mg de sodium par litre.

2.3.2. Dosage

Effectuer les mesures à 589 nm. Régler le 100 % de transmission avec de l'eau distillée. Aspirer directement dans le brûleur du photomètre, successivement les solutions-étalons, puis le vin dilué au $^1/_{10}$ avec de l'eau distillée et relever les pourcentages de transmission. Si cela est nécessaire, diluer le vin déjà dilué au $^1/_{10}$, avec la solution de dilution.

2.4. *Expression des résultats*

2.4.1. Mode de calcul

Tracer la courbe des variations du pourcentage de transmission en fonction de la concentration en sodium des solutions étalons. Reporter la transmission obtenue pour l'échantillon de vin dilué sur cette courbe et relever la concentration C en sodium.

La concentration en milligrammes de sodium par litre sans décimale sera :

$$C \cdot F$$

F = Facteur de dilution.

2.4.2. Répétabilité (*r*)

Sauf vins de liqueur, $r = 1{,}4$ mg/l
Vins de liqueur $r = 2{,}0$ mg/l.

2.4.3. Reproductibilité (R) $R = 4{,}7 + 0{,}08\ x_i$.

x_i = concentration en sodium de l'échantillon en mg/l.

Méthode OIV-MA-AS322-04 Méthode Type II

Calcium

(A26, révision par OIV/OENO 377/2009)

1. Principe

Le calcium est dosé directement dans le vin convenablement dilué par spectrophotométrie d'absorption atomique, après addition d'un tampon spectral.

2. Appareillage

2.1. Spectrophotomètre d'absorption atomique équipé d'un brûleur alimenté par de l'air et de l'acétylène.

2.2. Lampe à cathode creuse au calcium.

3. Réactifs

3.1. Solution étalon de calcium titrant 1 g par litre. Utiliser une solution standard de calcium du commerce, à 1 g par litre.
Cette solution peut être préparée en dissolvant 2,5 g de carbonate de calcium, ($CaCO_3$), dans la quantité suffisante d'acide chlorhydrique dilué au 1/10 (v/v) pour obtenir sa dissolution et en ajustant le volume à 1 litre avec de l'eau distillée.

3.2. Solution étalon diluée de calcium titrant 50 mg par litre.

Remarque : Conserver les solutions-étalons de calcium dans des flacons en polyéthylène.

3.3. Solution de chlorure de lanthane à 50 g/l en lanthane.

Dissoudre 13,369 g de chlorure de lanthane $La\,Cl_3.7H_2O$, dans de l'eau distillée; ajouter 1 ml d'acide chlorhydrique dilué 1/10 (v/v) et ajuster le volume à 100 ml.

4. Mode opératoire

4.1. *Préparation de l'échantillon*

Dans une fiole jaugée de 20 ml, placer 1 ml de vin, 2 ml de solution 3.3 et amener au trait de jauge avec de l'eau distillée. Le vin dilué au $^1/_{20}$, titre 5 g de lanthane par litre.

Remarque : Pour les vins doux, la concentration de 5 g de lanthane par litre est suffisante à condition que la dilution amène la teneur en sucres à moins de 2,5 g par litre. Pour des concentrations supérieures en sucres, il est nécessaire de porter à 10 g par litre la teneur en lanthane.

4.2. *Étalonnage*

Dans une série de fioles jaugées de 100 ml placer 0-5-10-15 et 20 ml de la solution 3.2, ajouter dans toutes les fioles 10 ml de la solution 3.3 et ajuster le volume à 100 ml avec de l'eau distillée. Les solutions-étalons préparées titrent respectivement 0-2,5-5-7,5 et 10 mg de calcium par litre et contiennent 5 g de lanthane par litre. Ces solutions seront conservées dans des flacons en polyéthylène.

4.3. *Dosage*

Sélectionner la longueur d'onde 422,7 nm. Régler le zéro de l'échelle des absorbances avec la solution contenant 5 g de lanthane par litre. Aspirer directement le vin dilué dans le brûleur du spectrophotomètre, puis successivement les solutions-étalons préparées en 4.2. Relever les absorbances. Effectuer les déterminations en double.

5. Expression des résultats

5.1. *Mode de calcul*

Tracer la courbe de variation de l'absorbance en fonction de la concentration en calcium des solutions-étalons.

Reporter la valeur moyenne des absorbances obtenues pour l'échantillon de vin dilué sur cette courbe et déterminer sa concentration C en calcium. La concentration en calcium exprimé en milligrammes par litre de vin sans décimale sera:

$$20 \times C$$

5.2. Répétabilité (r) :

teneur < 60 mg/l: r = 2,7 mg/l
teneur > 60 mg/l: r = 4,0 mg/l.

5.3.Reproductibilité (R) :

$$R \text{ mg/l} = 0{,}114 \times_i - 0{,}5$$

$\times_i$ = concentration en mg/l de l'échantillon.

Méthode OIV-MA-AS322-05A Méthode Type IV

Fer

(A9, révision par OIV/OENO 377/2009)

1. Principe des méthodes

Après dilution convenable du vin et élimination de l'alcool, le fer est dosé directement par spectrophotométrie d'absorption atomique.

2. Méthode

2.1. *Appareillage*

2.1.1. Évaporateur rotatif avec bain d'eau thermostaté.

2.1.2. Spectrophotomètre d'absorption atomique équipé d'un brûleur alimenté par de l'air et de l'acétylène.

2.1.3. Lampe à cathode creuse en fer.2.3. Mode opératoire

2.2. *Réactifs*

2.2.1. Solution étalon concentrée de fer III titrant 1 g par litre.

Utiliser une solution standard du commerce à 1 g/l. Cette solution peut être préparée en dissolvant 8,6341 g de sulfate de fer III et d'ammonium ($FeNH_4(SO_4)_2.12H_2O$) dans de l'eau distillée légèrement acidifiée par de l'acide chlorhydrique M et en ajustant le volume à 1 litre.

2.2.2. Solution étalon diluée de fer titrant 100 milligrammes par litre.

2.3. *Mode opératoire*

2.3.1. Préparation de l'échantillon

Éliminer l'alcool du vin par concentration du volume de l'échantillon au demi à l'aide d'un évaporateur rotatif (50-60 °C). Ramener au volume initial avec de l'eau distillée. Effectuer si nécessaire une dilution préalablement au dosage

2.3.2. Étalonnage

Dans une série de fioles jaugées de 100 ml, placer 1-2-3-4-5 ml de la solution de fer à 100 milligrammes par litre et compléter à 100 ml avec de l'eau distillée. Les solutions préparées titrent respectivement 1-2-3-4-5 mg de fer par litre.
Ces solutions seront conservées dans des flacons en polyéthylène.

2.3.3. Dosage

Sélectionner la longueur d'onde 248,3 nm. Régler le zéro de l'échelle des absorbances avec de l'eau distillée. Aspirer directement l'échantillon dilué dans le brûleur du spectrophotomètre puis successivement les solutions-étalons

préparées en 2.3.2. Relever les absorbances. Effectuer les déterminations en double.

2.4. *Expression des résultats*

2.4.1. Mode de calcul

Tracer la courbe de variation de l'absorbance en fonction de la concentration en fer des solutions-étalons. Reporter la valeur moyenne de l'absorbance obtenue pour l'échantillon de vin dilué sur cette courbe et déterminer la concentration C en fer.

La concentration en fer exprimée en milligrammes par litre de vin avec 1 décimale sera :

$$C \times F$$

F = facteur de dilution.

Méthode OIV-MA-AS322-05B Méthode Type IV

Fer

(A9, révision par OIV/OENO 377/2009)

1. Principe des méthodes

Après minéralisation du vin par le peroxyde d'hydrogène, le fer qui se trouve à l'état de fer II est dosé grâce à la coloration rouge qu'il donne avec l'orthophénanthroline.

2. Méthode

2.1. *Appareillage*

2.1.1. Fiole ovoïde de Kjeldahl de 100 ml.

2.1.2. Spectrophotomètre permettant d'effectuer des mesures à la longueur d'onde de 508 nm.

2.2. *Réactifs*

2.2.1. Solution de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) à 30 p. 100 (m/g) exempt de fer.

2.2.2. Solution M d'acide chlorhydrique, exempt de fer.

2.2.3. Hydroxyde d'ammonium, (ρ_{20} = 0,92 g/ml).

2.2.4. Pierre ponce traitée par l'acide chlorhydrique au 1/2 bouillant et lavée avec de l'eau distillée.

2.2.5. Solution d'hydroquinone à 2,5 p. 100, acidifiée par 1 ml d'acide sulfurique pur pour 100 ml de solution. Cette solution est conservée dans un flacon jaune au réfrigérateur et remplacée dès apparition du moindre brunissement.

2.2.6. Solution de sulfite de sodium à 20 p. 100 préparée à partir du sulfite neutre et anhydre.

2.2.7. Solution d'orthophénanthroline à 0,5 p. 100 dans l'alcool à 96 % vol.

2.2.8. Solution d'acétate d'ammonium à 20 p. 100.

2.2.9. Solution de fer III à 1 g de fer par litre. Utiliser une solution standard du commerce. Cette solution peut être préparée en dissolvant 8,6341 g de sulfate de fer et d'ammonium ($FeNH_4(SO_4)_2.12H_2O$) dans 100 ml de solution M d'acide chlorhydrique et en ajustant le volume à 1 litre avec la solution M d'acide chlorhydrique.

2.2.10 Solution étalon diluée de fer à 100 milligrammes par litre.

2.3. *Mode opératoire*

2.3.1.Minéralisation

2.3.1.1. Vin dont la teneur en sucres est inférieure à 50 g/l :

Dans la fiole de Kjeldahl introduire 25 ml de vin, 10 ml de solution de peroxyde d'hydrogène et quelques grains de pierre ponce. Concentrer le liquide jusqu'à un volume de 2 à 3 ml. Après refroidissement, ajouter au résidu obtenu, sans mouiller les parois du ballon, de l'hydroxyde d'ammonium en quantité nécessaire pour alcaliniser le milieu et précipiter les hydroxydes.

Après refroidissement, additionner le liquide alcalin de solution M d'acide chlorhydrique en quantité nécessaire pour dissoudre le précipité des hydroxydes et transvaser la solution obtenue dans une fiole jaugée de 100 ml. Après rinçage de la fiole de Kjeldahl avec la solution M d'acide chlorhydrique, ajuster le volume à 100 ml à l'aide de la même solution.

2.3.1.2. Moûts et vins dont la teneur en sucres est supérieure à 50 g/l :

- Teneur en sucres comprise entre 50 et 200 g/l : la prise d'essai de 25 ml de moût ou de vin est traitée par 20 ml de solution de peroxyde d'hydrogène
- Teneur en sucres supérieure à 200 g/l : les échantillons de moût ou de vin doivent être préalablement dilués au ½ ou même au ¼ ; la prise d'essai de 25 ml d'échantillon dilué est traitée par 20 ml de solution de peroxyde d'hydrogène.

2.3.2. Essai à blanc

Effectuer un essai à blanc avec de l'eau distillée en employant le même volume de solution de peroxyde d'hydrogène que celui utilisé pour la minéralisation et en suivant le protocole expérimental décrit en 2.3.1.1.

2.3.3. Dosage

Prélever 20 ml de la solution chlorhydrique du produit de minéralisation de l'échantillon et 20 ml de la solution chlorhydrique «essai à blanc» et les introduire dans deux fioles jaugées de 50 ml. Ajouter dans chaque fiole 2 ml de la solution d'hydroquinone, 2 ml de la solution de sulfite et 1 ml de la solution d'orthophénanthroline. Laisser au repos pendant 15 min. pour favoriser la réduction du Fe III en Fe II. Ajouter 10 ml de la solution d'acétate d'ammonium, ajuster le volume à 50 ml avec de l'eau distillée et agiter les deux fioles jaugées. Mesurer l'absorbance à 508 nm de la solution à doser en réglant le zéro de l'échelle des absorbances avec la solution provenant de l'essai à blanc.

2.3.4. Étalonnage

Dans une série de fioles jaugées de 50 ml, placer 0,5-1-1,5-2 ml de la solution à 100 mg de fer par litre, 20 ml d'eau distillée; continuer selon le mode opératoire décrit en 2.3.3 et mesurer l'absorbance de chacune des solutions étalons préparées, correspondent respectivement à 50-100-150-200 microgrammes de fer dans la prise d'essai.

2.4. *Expression des résultats*

2.4.1. Mode de calcul

Tracer la courbe des variations de l'absorbance en fonction de la concentration en fer des solutions étalons. Reporter l'absorbance obtenue pour la solution à examiner et déterminer la concentration en fer C contenue dans la prise d'essai de 20 ml de solution chlorhydrique de minéralisation, c'est-à-dire dans 5 ml d'échantillon à analyser.

La concentration en fer exprimée en milligrammes par litre de vin avec 1 décimale sera :

$$200 \times C.$$

Si le vin (ou le moût) a été dilué, la concentration en fer exprimée en milligrammes par litre de vin avec 1 décimale sera :

$$200 \times C \times F.$$

F = facteur de dilution.

Méthode OIV-MA-AS322-06 Méthode Type IV

Cuivre

(Résolution OIV/OENO 377/2009)

1. Principe de la méthode

Emploi de la spectrophotométrie d'absorption atomique.

2. Appareillage

2.1. Capsule de platine.

2.2. Spectrophotomètre d'absorption atomique.

2.3. Lampe à cathode creuse au cuivre.

2.4. Gaz d'alimentation: acétylène/air ou acétylène/protoxyde d'azote.

3. Réactifs

3.1. Cuivre métal.

3.2. Acide nitrique concentré 65 % (ρ_{20} = 1,38 g/ml).

3.3. Acide nitrique dilué 1/2 (v/v).

3.4. Solution de cuivre à 1 g/l

Utiliser une solution standard de cuivre du commerce. Cette solution peut être préparée en pesant 1,000 g de cuivre métal, qui est transféré quantitativement dans une fiole jaugée de 1000 ml. Ajouter de l'acide nitrique dilué 1/2 en quantité strictement suffisante pour dissoudre le métal, ajouter 10 ml d'acide nitrique concentré, porter au trait repère avec de l'eau bidistillée.

3.5. Solution de cuivre à 100 mg/l.

Prélever 10 ml de la solution 3.4 et les placer dans une fiole jaugée de 100 ml en complétant le volume avec de l'eau bidistillée.

3.6. Eau bidistillée

4. Mode opératoire

4.1. *Préparation de l'échantillon et dosage du cuivre*

Prélever 20 ml de l'échantillon, les placer dans une fiole jaugée de 100 ml et amener au trait repère avec de l'eau bidistillée. Modifier la dilution si nécessaire.

Lire au spectrophotomètre d'absorption atomique l'absorbance de l'échantillon dilué, à la longueur d'onde de 324,8 nm, après avoir réglé le zéro de l'échelle des absorbances avec de l'eau distillée.

4.2. *Établissement de la courbe d'étalonnage*

Prélever 0,5-1-2 ml de solution à 100 mg de cuivre par litre, les placer dans des fioles jaugées de 100 ml en complétant le volume avec de l'eau bidistillée; les solutions obtenues contiennent respectivement 0,5-1-2 mg/l de cuivre. Avec les valeurs des absorbances de ces solutions, mesurées comme il est décrit au point 4.1., construire la courbe d'étalonnage.

5. Expression des résultats

Reporter l'absorbance lue pour le dosage sur la courbe d'étalonnage et relever la concentration C en mg/l.

Si F est le facteur de dilution, la teneur du vin en cuivre en milligrammes par litre est:

$$F \times C.$$

Elle est donnée avec 2 décimales.

Remarques:

a) Les solutions pour l'établissement de la courbe d'étalonnage et les dilutions de l'échantillon doivent toutefois être choisies en fonction de la sensibilité de l'appareil utilisé et de la concentration en cuivre présente dans l'échantillon.
b) Pour une série de déterminations, il est opportun de contrôler au moins un point de la courbe d'étalonnage.
c) Pour des concentrations très faibles en cuivre dans l'échantillon, le mode opératoire est le suivant: placer 100 ml d'échantillon dans une capsule de platine, évaporer au bain d'eau à 100 °C jusqu'à consistance sirupeuse, ajouter goutte à goutte 2,5 ml d'acide nitrique concentré en cherchant à recouvrir tout le fond de la capsule. Procéder avec précaution à l'incinération du résidu sur une plaque chauffante électrique ou bien sur une petite flamme; introduire ensuite la capsule dans un four à moufle réglé à 500 °C ± 25 °C, la laisser pendant environ une heure. Après refroidissement, humecter les cendres avec 1 ml d'acide nitrique concentré en les écrasant avec une petite baguette de verre, évaporer et incinérer à nouveau comme précédemment. Porter à nouveau la capsule dans le four pendant 15 min.; répéter au moins trois fois ce traitement avec l'acide nitrique concentré. Solubiliser les cendres en ajoutant dans la capsule 1 ml d'acide nitrique concentré et 2 ml d'eau bidistillée; transvaser dans une fiole jaugée de 10 ml. Laver la capsule trois fois avec 2 ml chaque fois d'eau bidistillée, compléter au trait repère avec de l'eau bidistillée. Procéder au dosage comme il est indiqué en 4.1. en utilisant les 10 ml de solution; tenir compte du facteur de concentration pour l'expression des résultats.

Méthode OIV-MA-AS322-07 Méthode Type II

Magnésium

1. Principe

Le magnésium est dosé directement dans le vin convenablement dilué par spectrophotométrie d'absorption atomique.

2. Appareillage

2.1. Spectrophotomètre d'absorption atomique équipé d'un brûleur alimenté par de l'air et de l'acétylène.

2.2. Lampe à cathode creuse au magnésium.

3. Réactifs

2.1. Solution étalon concentrée de magnésium titrant 1 g par litre.

Utiliser une solution standard de magnésium du commerce, à 1 g/l.

Cette solution peut être préparée en dissolvant 8,3646 g de chlorure de magnésium ($MgCl_2.6H_2O$) dans de l'eau distillée et en ajustant le volume à 1 litre.

2.2. Solution étalon diluée de magnésium titrant 5 mg par litre.

Remarque : Conserver les solutions-étalons de magnésium dans des flacons en polyéthylène.

4. Mode opératoire

4.1. *Préparation de l'échantillon*

Diluer le vin au $^1/_{100}$ avec de l'eau distillée.

4.2. *Étalonnage*

Dans une série de fioles jaugées de 100 ml, placer 5-10-15 et 20 ml de la solution 3.2 et compléter à 100 ml avec de l'eau distillée. Les solutions préparées titrent respectivement 0,25-0,50-0,75-1 mg de magnésium par litre. Ces solutions seront conservées dans des flacons en polyéthylène.

4.3. *Dosage*

Sélectionner la longueur d'onde 285 nm. Régler le zéro de l'échelle des absorbances avec de l'eau distillée. Aspirer directement le vin dilué dans le brûleur du spectrophotomètre, puis successivement, les solutions-étalons préparées en 4.2.

Relever les absorbances; effectuer les déterminations en double.

5. Expression des résultats

5.1. *Mode de calcul*

Tracer la courbe de variation de l'absorbance en fonction de la concentration en magnésium des solutions-étalons.

Reporter la valeur moyenne des absorbances obtenues pour l'échantillon de vin dilué sur cette courbe et déterminer la concentration en C en magnésium.

La concentration en magnésium exprimée en milligrammes par litre de vin sans décimale sera :

$$100 \times C.$$

5.2. *Répétabilité* (*r*) : $r = 3$ mg/l.

5.3. *Reproductibilité* (R) : $R = 8$ mg/l.

Méthode OIV-MA-AS322-08 Méthode Type IV

Zinc

1. Principe

Le zinc est dosé directement dans le vin désalcoolisé par spectrophotométrie d'absorption atomique.

2. Appareillage

2.1. Évaporateur rotatif avec bain d'eau thermostaté.

2.2. Spectrophotomètre d'absorption atomique équipé d'un brûleur alimenté par de l'air et de l'acétylène.

2.3. Lampe à cathode creuse en zinc.

3. Réactifs

L'eau utilisée doit être de l'eau bidistillée dans un appareil en verre borosilicaté ou de l'eau de pureté équivalente.

3.1. Solution étalon de zinc à 1 g par litre.

Utiliser une solution standard de zinc du commerce. Cette solution peut être préparée en dissolvant 4,3975 g de sulfate de zinc ($ZnSO_4.7H_2O$) dans de l'eau et en ajustant le volume à un litre.

3.2. Solution étalon diluée de zinc titrant 100 milligrammes par litre.

4. Mode opératoire

4.1. *Préparation de l'échantillon*

Éliminer l'alcool du vin par concentration au 1/2 de 100 ml de vin placés dans un évaporateur rotatif (température: 50-60 °C). Ramener au volume initial de 100 ml avec de l'eau bidistillée.

4.2. *Étalonnage*

Dans une série de fioles jaugées de 100 ml, placer 0,5-1-1,5-2 ml de la solution de zinc à 100 mg/l et ajuster au trait de jauge avec de l'eau bidistillée. Les solutions étalons correspondent respectivement à 0,5-1-1,5 et 2 mg de zinc par litre.

4.3. *Dosage*

Sélectionner la longueur d'onde 213,9 nm. Régler le zéro de l'échelle des absorbances avec de l'eau bidistillée. Aspirer directement le vin dans le brûleur

du spectrophotomètre, puis successivement les solutions étalons. Relever les absorbances. Effectuer les déterminations en double.

5. Expression des résultats

5.1. *Mode de calcul*

Tracer la courbe de variation de l'absorbance en fonction de la concentration en zinc des solutions étalons. Reporter la valeur moyenne des absorbances obtenues pour le vin et déterminer la concentration en zinc en milligrammes par litre de vin, avec une décimale.

Méthode OIV-MA-AS322-09 Méthode Type IV

Argent

(Recueil OIV ed. 1990, révision par OIV/OENO 377/2009)

1. Principe de la méthode

Emploi de la spectrophotométrie d'absorption atomique précédée de la minéralisation de l'échantillon.

2. Appareillage

2.1. Capsule de platine.

2.2. Bain d'eau thermostaté à 100 °C.

2.3. Four régulé à 500–525 °C.

2.4. Spectrophotomètre d'absorption atomique.

2.5. Lampe à cathode creuse à l'argent.

2.6. Gaz d'alimentation : air, acétylène

3. Réactifs

3.1. Nitrate d'argent ($AgNO_3$).

3.2. Acide nitrique concentré 65 % (HNO_3 ρ_{20} = 1,38 g/ml).

3.3. Acide nitrique dilué $^1/_{10}$ (v/v).

3.4. Solution d'argent à 1 g/l

Utiliser une solution standard d'argent du commerce. Cette solution peut être préparée en dissolvant 1,5750 g de nitrate d'agent dans l'acide nitrique dilué et en ajustant le volume à 1000 ml avec l'acide nitrique dilué.

3.5. Solution d'argent à 10 mg/l

10 ml de solution 3.4 sont dilués à 100 ml avec l'acide nitrique dilué.

4. Mode opératoire

4.1. *Préparation de l'échantillon et dosage de l'argent*

Placer 20 ml d'échantillon dans une capsule de platine, évaporer à sec sur bain d'eau à 100 °C. Incinérer au four jusqu'à cendres blanches à 500–525 °C. Reprendre les cendres avec 1 ml d'acide nitrique concentré, évaporer au bain d'eau à 100 °C, répéter l'addition de 1 ml d'acide nitrique et l'évaporation. Ajouter 5 ml d'acide nitrique dilué et chauffer légèrement jusqu'à dissolution. Effectuer la mesure de l'absorbance au spectrophotomètre d'absorption atomique à la longueur d'onde de 328,1 nm dans une flamme air-acétylène.

4.2. *Établissement de la courbe d'étalonnage*

Dans une série de fioles jaugées de 100 ml, placer 2-4-6-8-10 et 20 ml de solution 3.5 à 10 mg d'argent par litre et porter au trait repère avec l'acide nitrique dilué. Ces solutions contiennent 0,20-0,40-0,60-0,80-1,0 et 2,0 mg/l d'argent.

Effectuer les mesures au spectrophotomètre d'absorption atomique et tracer la courbe d'étalonnage avec les valeurs d'absorbance trouvées.

5. Expression des résultats

Reporter l'absorbance lue pour le dosage sur la courbe d'étalonnage et relever la concentration C en mg/l.

La teneur du vin en argent, exprimée en milligrammes par litre est : 0,25 C.
Elle est donnée avec 2 décimales.

Remarque : Les solutions de référence pour l'établissement de la courbe d'étalonnage, la quantité d'échantillon prélevée et le volume final de liquide peuvent être modifiés en fonction de la sensibilité de l'appareil utilisé.

Méthode OIV-MA-AS322-10 Méthode Type IV

Cadmium

(Recueil OIV ed.1990, révision par OIV/OENO 377/2009)

1. Principe de la méthode

Le cadmium est dosé directement dans le vin par spectrophotométrie d'absorption atomique sans flamme.

2. Appareillage

Toute la verrerie doit être lavée au préalable avec de l'acide nitrique concentré chaud (70-80 °C) et rincée à l'eau bidistillée.

2.1. Spectrophotomètre d'absorption atomique équipé d'un four graphite, d'un correcteur de bruit de fond et d'un enregistreur multipotentiométrique.

2.2. Lampe à cathode creuse au cadmium.

2.3. Micropipettes de 5 µl munies d'embouts spéciaux pour mesures d'absorption atomique.

3. Réactifs

L'eau utilisée doit être de l'eau bidistillée dans un appareil en verre borosilicaté ou de l'eau de pureté équivalente. Tous les réactifs doivent être de pureté analytique reconnue, et en particulier être exempts de cadmium.

3.1. Acide phosphorique à 85 p. 100 (ρ_{20} = 1,71 g/ml).

3.2. Solution d'acide phosphorique obtenue par dilution de 8 ml d'acide phosphorique à 100 ml avec de l'eau.

3.3. Solution 0,02 M de sel disodique de l'acide éthylènediaminetétracétique (EDTA).

3.4. Solution tampon pH 9 obtenue par dissolution dans une fiole jaugée de 100 ml de 5,4 g de chlorure d'ammonium dans quelques millilitres d'eau, addition de 35 ml de solution d'hydroxyde d'ammonium (ρ_{20} = 0,92 g/ml) diluée à 25 % (v/v) et ajustage au trait repère avec de l'eau.

3.5. Noir ériochrome T : dilution solide à 1 % (m/m) dans du chlorure de sodium.

3.6. Sulfate de cadmium ($3CdSO_4.8H_2O$)

Le titre du sulfate de cadmium doit être vérifié selon le mode opératoire suivant :

Peser exactement 102,6 mg de l'échantillon de sulfate de cadmium, entraîner quantitativement dans un vase cylindrique avec de l'eau, agiter jusqu'à dissolution; ajouter 5 ml de solution tampon pH9, 20 mg environ de noir ériochrome T. Titrer à l'aide de la solution d'EDTA jusqu'à virage de l'indicateur au bleu.

Le volume d'EDTA versé doit être égal à 20 ml. Si le volume est peu différent, corriger en conséquence la prise d'essai de sulfate de cadmium pesée utilisée pour la préparation de la solution de référence.

3.7. Solution de référence de cadmium à 1 g par litre

Utiliser une solution standard du commerce. Cette solution peut être obtenue par dissolution de 2,2820 g de sulfate de cadmium dans de l'eau et ajustage du volume à 1 litre. Conserver la solution dans un flacon de verre borosilicaté à bouchon rodé.

4. Mode opératoire

4.1. *Préparation de l'échantillon*

Diluer le vin au ½ (v/v) avec la solution d'acide phosphorique.

4.2. *Préparation des solutions de la gamme d'étalonnage*

À partir de la solution de référence de cadmium, préparer par dilutions successives des solutions titrant respectivement 2,5-5-10-15 microgrammes de cadmium par litre.

4.3. *Détermination*

4.3.1. Programme du four (proposé à titre indicatif) :

Séchage à 100 °C pendant 30 s
Minéralisation à 900 °C pendant 20 s
Atomisation à 2 250 °C pendant 2 à 3 s
Débit d'azote (gaz de balayage) : 6 litres par min.

Remarque : En fin d'opération, montée de température jusqu'à 2700 °C pour purger le four.

4.3.2. Mesures d'absorption atomique

Sélectionner la longueur d'onde 228,8 nm. Régler le zéro de l'échelle des absorbances avec de l'eau bidistillée. Injecter dans le four, à l'aide d'une micropipette, trois fois 5 µl de chacune des solutions de la gamme d'étalonnage et de la solution de l'échantillon à analyser. Enregistrer les absorbances mesurées. Calculer la valeur moyenne de l'absorbance à partir des résultats relatifs aux trois injections.

5. Expression des résultats

5.1. *Mode de calcul*

Tracer la courbe des variations de l'absorbance en fonction des concentrations en cadmium des solutions de la gamme d'étalonnage. La variation est linéaire. Reporter la valeur moyenne de l'absorbance de la solution de l'échantillon sur la droite d'étalonnage, en déduire la concentration C en cadmium. La concentration en cadmium exprimée en microgrammes par litre de vin est égale à : 2 C.

BIBLIOGRAPHIE

MEDINA B., *Application de la spectrométrie d' absorption atomique sans flamme au dosage de quelques métaux dans les vins,* Thèse Doct. en (œnologie, Bordeaux II, 1978.
MEDINA B. et SUDRAUD P., FV O.I.V 1979, nº 695.

Méthode OIV-MA-AS322-11 Méthodes Type II

Plomb

(Résolution oeno 3/94)

Principe de la méthode

Le plomb est dosé directement dans le vin par spectrophotométrie d'absorption atomique sans flamme.

SUPPRIMÉE

(Remplacée par la méthode OIV-MA-AS322-12)

Méthode OIV-MA-AS322-12 Méthodes Type II

Critères pour les méthodes de détermination de la teneur en plomb du vin

(OENO 7/2006; OIV/OENO 377/2009)

1.1 Définitions des critères de la méthode

justesse	étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une grande série de résultats d'essais et la valeur de référence acceptée.
r =	limite de répétabilité, valeur au-dessous de laquelle la valeur absolue de la différence entre deux résultats d'un même essai obtenus sous des conditions de répétabilité (c'est à dire même échantillon, même opérateur, même appareillage, même laboratoire, et court intervalle de temps), peut être attendue dans une limite de probabilité spécifique (en principe 95 %), d'où $r = 2{,}8 \times s_r$.
S_r =	écart-type, calculé à partir des résultats obtenus dans des conditions de répétabilité.
RSD_r=	écart-type relatif, calculé à partir des résultats obtenus dans des conditions de répétabilité $[(S_r/\bar{x}) \times 100]$, où $\bar{x}$ représente la moyenne des résultats pour tous les laboratoires et échantillons.
R =	limite de reproductibilité, valeur au-dessous de laquelle la valeur absolue de la différence entre deux résultats d'un même essai obtenus dans des conditions de reproductibilité (c'est à dire pour un produit identique, obtenu par les opérateurs dans des laboratoires différents en utilisant la même méthode d'essais), peut être attendue avec une certaine probabilité (en principe 95 %) ; $R = 2{,}8 \times s_R$.
S_R =	écart-type, calculé à partir de résultats obtenus dans des conditions de reproductibilité.
RSD_R =	écart-type relatif calculé à partir de résultats obtenus dans des conditions de reproductibilité $[(S_R/\bar{x} \times 100]$

Ho_R = valeur du HORRAT: la valeur observée du RSD_R, divisée par la valeur RSD_R calculée à partir de l'équation de Horwitz [1].

2 Méthode d'analyse à utiliser par le laboratoire et exigences de contrôle pour le laboratoire

2.1 Exigences

Il n'existe pas de méthodes spécifiques de détermination de la teneur en plomb du vin. Les laboratoires sont tenus d'utiliser une méthode (Type II) validée selon les exigences de l'OIV [2] et qui répond aux critères de performance figurant dans le Tableau 1. Les méthodes GFAA (spectrométrie d'absorption atomique au four graphite) ou ICP-MS (spectromètre de masse) sont applicables à condition qu'elles respectent les critères de performance indiqués ci-dessous. Chaque fois que possible, la validation doit inclure un matériau de référence certifié dans les matériaux soumis à l'essai collaboratif. Dans le cas contraire, une estimation de la justesse devra être effectuée. Des exemples de méthodes validées pour la détermination de la teneur en plomb du vin sont présentés dans les Annexes 1 et 2.

2.2 Considérations générales

Tout appareillage entrant en contact avec l'échantillon doit être d'un matériau inerte (par ex. polypropylène, polytétrafluoroéthylène [PTFE], etc.). L'utilisation de la céramique n'est pas recommandée en raison de la présence possible de plomb. Si les matériaux disponibles ne sont pas exempts avec certitude des analytes précités, leur utilisation doit être évaluée au moyen d'études *ad hoc*, qui doivent être considérées comme faisant partie intégrante de la validation de la méthode d'analyse. Tout le matériel en plastique, y compris les récipients pour échantillons, doivent être nettoyés à l'acide. L'équipement utilisé pour préparer les échantillons doit si possible être réservé aux analyses du plomb uniquement.

Tableau 1 : Critères de performance pour les méthodes d'analyse de la teneur en plomb du vin

Paramètres	Valeur/Commentaire
Applicabilité	Convient pour déterminer le plomb dans le vin dans des buts officiels.
Limite de détection	Pas plus d'un dixième de la valeur correspondant à la limite de l'OIV (exprimée en µg/l)
Limite de quantification	Pas plus d'un cinquième de la valeur correspondant à la limite de l'OIV, (exprimée en µg/l) sauf si la valeur précisée pour le plomb est inférieure à 100 µg/l. Dans ce dernier, pas plus de deux cinquièmes de la valeur précisée.
Fidélité	Valeurs du HORRAT inférieures ou égales à 2 dans l'essai collaboratif de validation.
Recouvrement	80 % - 105 % (comme indiqué dans l'essai collaboratif)
Spécificité	Pas d'interférences spectrales ou de matrice
Justesse	$\left\|\overline{x} - m\right\| < 1{,}96 * \sqrt{s_{R(lab)^2} - s_{r(lab)^2} * \left(1 - 1/n\right)}$ où m est la valeur certifiée du matériau de référence vin et $\overline{x}$ est la moyenne de *n* mesures de la concentration en plomb de ce vin, dans le même laboratoire. $s_{R(lab)}$ et $s_{r(lab)}$ représentent les écarts-types calculés à partir des résultats obtenus dans un même laboratoire dans des conditions de reproductibilité et de répétabilité.

2.3 Estimation de la justesse analytique et calculs de recouvrement

Chaque fois que possible, la justesse des analyses doit être estimée [3] en incluant dans la partie analytique les matériaux de référence certifiés requis. L'analyste doit également bien prendre note des 'Directives harmonisées concernant l'utilisation des taux de recouvrement dans les mesures analytiques' [4], mises au point sous les auspices de l'UIPAC, l'ISO et l'AOAC. La récupération devrait avoisiner 100 %, auquel cas les calculs de recouvrement sont alors de moindre importance.

Bibliographie

[1] W Horwitz, "Evaluation of Analytical Methods for Regulation of Foods and Drugs", Anal. Chem., 1982, **54**, 67A - 76A

[2] Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies, FV 1061, OIV, 1998

[3] ISO 5725-6:1994, 4.2.3. International Organisation for Standardisation, case Postal 56, CH-1211, Genève 20, Switzerland.

[4] ISO/AOAC/IUPAC Harmonised Guidelines for the Use of Recovery Information in Analytical Measurement. *Edited* Michael Thompson, Steven L R Ellison, Ales Fajgelj, Paul Willetts and Roger Wood, Pure Appl. Chem., 1999, 71, 337 – 348

EXEMPLE 1

Détermination de la teneur en plomb dans les vins par spectrophotométrie d'absorption atomique

1 DOMAINE D'APPLICATION

La méthode peut être utilisée pour les vins rouges, blancs, tranquilles, mousseux et fortifiés.

2 DEFINITION

Concentration en plomb du vin : Concentration en plomb déterminée par cette procédure exprimée en mg/l.

3 PRINCIPE

Le vin est dilué par une matrice synthétique simulant la composition du vin et la concentration en plomb mesurée directement par spectrophotométrie d'absorption atomique utilisant un four graphite (SAAFG). Une matrice synthétique simulant la composition du vin est ajoutée aussi bien au vin à analyser qu'aux solutions modèles d'étalonnage de plomb. Ce mélange contient les 'modificateurs de matrice' et les composants simulant le vin. Leur but est de 'modifier' les matrices de sorte que la même allure d'absorption par rapport au temps soit obtenue à la fois sur les solutions étalons et les solutions échantillons pendant l'étape d'atomisation dans le four graphite.

Un mécanisme d'atomisation retardé, tel une plate-forme de L'vov, est nécessaire.

Il se peut que la composition exacte du diluant ait besoin d'être ajustée pour convenir à des modèles particuliers d'instruments du four graphite. Avant d'appliquer la méthode, des expériences doivent être menées pour vérifier le rapport absorbance – temps produit par les étalons et échantillons, et le diluant doit faire l'objet des ajustements qui s'imposent**.** L'instrument utilisé doit être capable de contrôler le rapport de l'absorption au temps pendant l'atomisation. Le profil doit être tel que les étalons et échantillons parviennent aux mêmes résultats et que le pic d'atomisation du plomb précède la majeure partie de l'absorption de fond

non spécifique, permettant le mécanisme de correction de fond employé de fonctionner efficacement. Des exemples de profils correspondants sont donnés dans l'Annexe 2.

4 REACTIFS

Les produits chimiques doivent être aussi exempts de plomb que possible. Il convient d'utiliser de l'eau distillée desionisée, ou de l'eau d'une pureté équivalente. Sauf contre-indication, toutes les solutions sont préparées chaque jour d'analyse.

4.1 Solution du diluant

NOTE 1 : la composition exacte du diluant utilisé peut nécessiter un ajustement pour correspondre au modèle spécifique d'instrument et de four graphite utilisés. Si des problèmes surviennent avec la composition du modificateur suggérée, ajuster les concentrations en phosphate et nitrate afin d'obtenir :

i) un signal stable de l'élément à la température d'incinération optimale et

ii) l'atomisation avec un pic unique d'analyte reproductible décalé dans le temps par rapport au signal de l'absorption non spécifique.

L'équipement avec des aménagements VDU permet aux analystes de confirmer le décalage dans le temps entre les pics d'échantillon et l'absorption non spécifique (voir l'Annexe). L'exemple suivant est une technique pour déterminer l'allure de la courbe d'absorbance en fonction du temps :

Mesurer la largeur totale à mi-hauteur (LTMH) d'un pic d'échantillon et le comparer à la LTMH d'un étalon de calibration d'absorbance maximale similaire. Si les allures des pics sont à l'évidence différentes, il convient alors d'ajuster la composition du modificateur de matrice.

Ci-dessous des exemples de diluants utilisés pour :

(a) un appareillage Perkin-Elmer 3030 équipé d'un correcteur d'absorption non spécifique à arc au deutérium, équipé d'un four HGA 500 ; et (b) un Thermo-Electron Video 12E équipé d'un correcteur d'absorption non spécifique Smith-Hieftje,d'un four CTF 188 et d'un système de dépôt d'échantillon FASTAC.

4.1.1 *Diluant Perkin-Elmer 3030 :*

Dans une bouteille en plastique de 250 ml (5.1) à 187 g d'eau, ajouter 11 g d'éthanol (4.1.3), 1,1 g de glucose (4.1.4), 1,1 g de fructose (4.1.5) et 0,28 g de chlorure de sodium (4.1.6). Agiter pour dissoudre les solides. Puis ajouter 22 ml d'acide nitrique (4.1.7) et 4,4 g de dihydrogéno-phosphate d'ammonium (4.1.8). Agiter jusqu'à ce que tout le phosphate soit dissous. Ajouter enfin 0,88 g de nitrate de magnésium (4.1.9) et agiter de nouveau jusqu'à ce que tout le solide soit dissous.

4.1.2 *Diluant Thermo-Electron Video 12E :*

Comme précédemment, mais en utilisant seulement 0,66 g de dihydrogéno-phosphate d'ammonium (4.1.8) et 0,44 g de nitrate de magnésium (4.1.9).

4.1.3 *Ethanol (absolu)*

4.1.4. *D-glucose*

4.1.5. *D(-)fructose*

4.1.6. *Chlorure de sodium*

4.1.7. *Acide nitrique (concentré)*

4.1.8. *Dihydrogéno-phosphate d'ammonium*

4.1.9. *Nitrate de magnésium hexahydraté*

4.2 Ethanol à 10 %(v/v)

Dans une bouteille en plastique de 250 ml (5.1), ajouter à 180 ml d'eau 20 ml d'éthanol (4.1.3.) en utilisant une pipette et agiter pour mélanger.

4.3. Solutions-étalons de plomb

4.3.1. *Solution-étalon de plomb (1000 mg/l)*

4.3.2 *Solution-étalon de plomb (10,00 mg/l)*

Dans un ballon jaugé de 100 ml (5.2), pipeter (5.7) 1,00 ml de solution-étalon de plomb (4.3.1). Diluer au volume avec de l'eau et mélanger soigneusement.

NOTE 2 : vérifier la calibration de la pipette juste avant l'utilisation.

4.3.3 *Solution de travail étalonnée en plomb (1,00 mg/l)*

Dans un ballon jaugé de 100 ml (5.2), peser 10,00 g de la solution mère de plomb (4.3.2) en utilisant une pipette Pasteur (5.3). Laver à l'eau l'intérieur du col du ballon jaugé, ajouter 1 ml d'acide nitrique (4.1.7) et amener jusqu'au trait de jauge avec de l'eau. Mélanger soigneusement.

4.3.4. *Solutions d'étalonnage en plomb.*

Les huit solutions étalon de calibration sont préparées dans des récipients universels (5.4). Les étalons varient de 0 à 50 µg/l. Ils correspondent à 0,0 ; 2,5 ; 5,0 ; 10,0 ; 20,0 ; 30,0 ; 40,0 et 50,0 µg/l. Un neuvième conteneur est utilisé pour préparer un blanc réactif.

Rincer trois fois l'intérieur de chaque récipient avec de l'eau, et sécher en agitant ; rincer les couvercles trois fois et sécher en agitant. Laisser debout les récipients fermés pendant 5-10 minutes puis vider le liquide résiduel en agitant. Pipeter (5.8) dans les 9 récipients, dans l'ordre : 5,00 ; 5,00 ; 4,95 ; 4,90 ; 4,80 ; 4,60 ; 4,40 ; 4,20 et 4,00 ml d'eau. Pipeter (5.8) dans chacun des récipients 5,00 ml d'éthanol à 10 % (4.2) suivi de deux fois 5,00 ml de diluant (4.1).

Dans les 9 récipients, pipeter (5.6) (5.7) dans l'ordre : 0 (blanc réactif), 0, 50, 100, 200, 400, 600, 800 et 1000 µl de solution de travail étalonnée (4.3.3). Fermer les récipients et agiter pour mélanger les contenus. Refaire ces préparations pour chaque lot d'échantillons.

4.4 Acide nitrique à 1 % (v/v).

5. APPAREILLAGE

Toute la verrerie et les articles en plastique doivent être lavés à l'acide (tremper dans de l'acide nitrique à 20 % pendant au moins 24 heures), rincer soigneusement avec de l'eau distillée avant utilisation et les maintenir fermés (avec film étirable si nécessaire) pour empêcher toute contamination par l'air.

5.1 250 bouteilles en plastique, avec bouchon (par exemple : Nalgene ou équivalent).

5.2 Fioles jaugées, 100 ml (classe A).

5.3 Pipettes Pasteur, avec poires

5.4 Récipients universels de 30 ml (Nunc, Sterilin ou équivalent).

5.5 Récipients coniques en verre de 600 ml.

5.6 Pipette*, 40 – 200 µl (Finnpipette de Labsystem ou équivalent).

5.7 Pipette*, 200 – 1000 µl (Finnpipette de Labsystem ou équivalent).

5.8 Pipette*, 0.5 - 5.0 ml (Finnpipette de Labsystem ou équivalent).

5.9 Pipette*, 2.0 - 10.0 ml (Finnpipette de Labsystem ou équivalent).

**NOTE 3: les pipettes doivent être calibrées chaque jour (d' utilisation).*

5.10 Balance analytique, (+ ou – 1 mg, Mettler PC440 ou équivalent).

5.11 Agitateur de type Vortex ou équivalent.

5.12 Tubes à essai, capacité de 20 ml.

5.13 Portoirs de tubes à essai, compatibles pour utilisation avec 5.12.

5.14 Portoirs de conteneurs, compatibles pour utilisation avec 5.4.

5.15 Agitateur magnétique.

5.16 Barreau magnétique, recouvert de PTFE.

5.17 Embouts de pipette, compatibles pour utilisation avec 5.6, 5.7, 5.8 et 5.9

5.18 Spectrophotomètre d'absorption atomique,

Spectrophotomètre d'absorption atomique équipé d'un four graphite, d'une cuvette de retard à l'atomisation, d'un injecteur automatique, d'un correcteur d'absorption non spécifique, et d'un équipement de contrôle de l'absorbance en fonction du temps équivalent à ce qui suit. Les conditions instrumentales doivent être ajustées de façon appropriée au modèle utilisé.

Exemples donnés ci-dessous :

(a) Spectrophotomètre d'absorption atomique, Perkin-Elmer 3030 équipé d'un correcteur d'absorption non spécifique à arc au deutérium pur. Lampe à cathode creuse au plomb que l'on fait fonctionner à 12 mA. Sélectionner la raie à 283,3 nm; largeur de fente 0,7 nm. Four graphite, HGA 500 équipé d'un tube de graphite à revêtement pyrolytique avec à l'intérieur une plate-forme L'vov de graphite pyrolytique solide. Utiliser de l'argon comme gaz de purge. Les conditions du four pour le HGA 500 sont les suivantes :

Etape	1	2	3	4	5	6
Température (°C)	200	1100	1100	1800	2400	20
Rampe (s)	5	20	1	0	1	1
Plateau (s)	60	20	2	3	6	25
Gaz	Ar	Ar	Ar	Ar	Ar	Ar
Débit de gaz (ml/min)	50	50	0	0	300	300
Lecture (intégration à 2,5 s)				X		

Echantillonneur/injecteur automatique, AS 40. Volume d'injection de 20 µl, 3 injections par position de plateau.

(b) Spectrophotomètre d'absorption atomique Thermo-electron Video 12E utilisé avec un four graphite CTF 188 et un système de dépôt d'échantillon FASTAC répondant aux conditions suivantes :

Etape	1	2	3	4	5
Température (°C)	150	350	650	1000	2400
Rampe (s)	0	30	15	1	
Plateau (s)	2	0	5	4	10
Gaz	Ar	Ar	Ar	Ar	Ar
Débit du gaz (ml/min)	50	50	0	0	300
Lecture (intégration à 2,5 s)				X	

Dépôt d'échantillon 5 s, retard FASTAC 10 s, avec 3 injections par position de plateau. Sélectionner la raie à 283,3 nm.

6. MODE OPERATOIRE

6.1. Préparation du vin

Agiter le récipient de vin pour bien mélanger les contenus avant le sous-échantillonage. Les vins mousseux doivent être transférés dans un bécher propre et placés dans un bain ultrasonique jusqu'à ce qu'il n'y ait plus d'émission de gaz avant utilisation.

6.2 Solutions de mesure

6.2.1 *Echantillons de vin*

Dans un tube à essai de 20 ml (5.12), pipeter (5.8) 2,00 ml d'eau, 4,00 ml de diluant (4.1) et 2,00 ml de l'échantillon de vin. Mélanger soigneusement en utilisant l'agitateur vortex (5.11).

6.2.2 *Estimation du recouvrement*

Afin d'estimer le recouvrement, dans un tube à essai de 20 ml (5.12), pipeter (5.8) 1,80 ml d'eau, 4,00 ml de diluant (4.1), 2,00 ml de l'échantillon de vin et ajouter 0,200 ml de solution de travail étalonnée en plomb (4.3.3) en utilisant une pipette (5.7). Mélanger soigneusement en utilisant l'agitateur vortex (5.11).

NOTE 4 : tout échantillon dépassant l'étalon de calibration le plus élevé devra être analysé à nouveau en utilisant une quantité d'échantillon plus petite. Ajouter de l'éthanol supplémentaire à 10 % (4.2) au volume de l'échantillon.

6.3. Mesure

Les déterminations sont effectuées par lots. Chaque lot doit contenir au moins quatre répliques du blanc réactif et trois répliques des échantillons supplémentés pour estimation du recouvrement. Les solutions d'étalonnage du plomb sont distribuées de façon régulière parmi les inconnues sur le plateau de l'échantillonneur automatique. Transférer les échantillons et étalons dans les récipients pour échantillons de l'échantillonneur automatique en utilisant une pipette Pasteur (5.3). Se débarrasser du premier remplissage du récipient et mesurer le deuxième remplissage (s'il n'y a pas assez d'échantillon, prendre garde à ce que les récipients des échantillons soient parfaitement propres). Laver la pipette Pasteur

quatre ou cinq fois à l'acide nitrique à 1 % (4.4.) entre chaque transfert d'étalon et d'échantillon.

6.4. Quantification du plomb

La moyenne des absorbances de 3 injections est utilisée dans tous les cas. Tracer une courbe d'étalonnage à partir des réponses moyennes fournies par les lots d'étalons. Noter les absorbances enregistrées par l'instrument pour chaque échantillon. La concentration en plomb des échantillons est déterminée par comparaison avec la courbe d'étalonnage.

NOTE 5 : il est recommandé de remplacer le tube du four et la plate-forme tous les deux lots voire plus fréquemment si une baisse de l'absorbance des étalons est notée.

7 EXPRESSION DES RESULTATS

Corriger les résultats pour la récupération moyenne par lots .

7.1 Calcul

Obtenir à partir du graphique d'étalonnage la concentration en plomb de toutes les solutions de mesure. Calculer la concentration en plomb des échantillons de vin et des échantillons de vins supplémentés en utilisant le calcul suivant :

$$\text{Concentration en plomb (mg/l)} = \frac{(Cm - Cb) \times Vt}{Vm}$$

où :
Cm est la concentration moyenne en plomb de la solution de mesure (mg/l).
Cb est la concentration moyenne en plomb mesurée, des solutions de blanc réactif (mg/l).
Vt est le volume total final de la solution de mesure (ml).
Vm est le volume de l'échantillon de vin prélevé (ml).

7.2 Calcul des estimations de recouvrement

$$\text{Récupération (\%)} = \frac{(Cs - Ca) \times Vs \times 100}{S}$$

où :
Cs est la concentration calculée moyenne en plomb de l'échantillon de vin supplémenté (mg/l).
Ca est la concentration calculée moyenne de plomb dans le vin non supplémenté (mg/l).
Vs est le volume de vin auquel le supplément est ajouté (ml).
S est la quantité de supplément ajoutée (µg).

7.3 Calcul des résultats corrigés du recouvrement

$$\text{Concentration en plomb corrigée (mg/l)} = \frac{Cw \times 100}{Ra}$$

où:
Cw est la concentration en plomb calculée de l'échantillon de vin (mg/l).
Ra est la moyenne de recouvrement par lots (%).

ANNEXE : ETUDE DE VALIDATION

L'étude suivante a mené à des procédures acceptées à l'échelle internationale (1)(2).

TABLEAU 1 ECHANTILLONS

Code de l'échantillon	Description de l'échantillon
5 & 9	Bordeaux (vin doux)
3 & 11	Chardonnay italien (blanc)
7 & 8	Vin rouge espagnol supplémenté avec 260 µg/l
6 & 10	Pinot Noir roumain
2 & 12	Pinot Noir roumain supplémenté avec 150 µg/l
1	Echantillon 3/11 supplémenté avec 124 µg/l
4	Echantillon 3/11 supplémenté avec 134 µg/l

TABLEAU II RESUME DES PARAMETRES STATISTIQUES POUR L'ETUDE COLLABORATIVE SUR LA CONCENTRATION EN PLOMB DU VIN (Les résultats d'un laboratoire n'ont pas été retenus dans l'analyse statistique)

Echantillon	A	B	C	D	E	F	F1
Code	5, 9	3, 11	7, 8	6, 10	2, 12	1	4
n	16	15*	16	16	16	16	
n (-val. aberr.)	16	15	14	16	15	16	
Valeur cible	56	24	279	67	192	143	153
Moy.	50,8	27,2	298	70,6	189	143	149
r	23	15	24	32	51	38	
S_r	8,1	5,3	8,7	11,8	18.2	13,6	
RSD_r	16	19	3	17	10	9	
Ho_r	**1,0**	**1,1**	**0,2**	**1,1**	**0,7**	**0,7**	
R	42	25	83	57	154	79	
S_R	15,1	8,8	29,8	20,3	55,2	28,2	
RSD_R	**30**	**28**	**10**	**29**	**29**	**19**	
Ho_R	**1,2**	**1 ,2**	**0,5**	**1,2**	**1,4**	**0,9**	

CONCERNANT LES TABLEAUX I-II

n Nombre initial de laboratoires

n (-val. aberr.)Nombre de laboratoires après élimination des valeurs aberrantes

(*) Laboratoire 17 a indiqué <20 µg/l pour le matériel de test 11. Ses résultats n'ont pas été inclus dans l'analyse statistique pour cet échantillon (B).

Moy. Moyenne observée, la moyenne obtenue des données de l'essai collaboratif après élimination des valeurs aberrantes.

Valeur cible La valeur moyenne observée « à l'interne » en utilisant l'ICP-MS

r Limite de répétabilité, la valeur en dessous de laquelle on peut estimer que se situe la différence absolue entre deux résultats d'analyse unique obtenus dans des conditions de répétabilité (c'est à dire même échantillon, même opérateur, même appareillage, même laboratoire, et court intervalle de temps) dans une limite donnée de probabilité (en principe 95 %) d'où $r = 2,8 \times s_r$.

S_r L'écart-type de répétabilité.

RSD^r L'écart-type relatif de répétabilité (S_r x 100/MOYENNE).

Ho^r Le RSD_r observé divisé par la valeur RSD_r estimée à partir de l'équation de Horwitz en supposant que r=0.66R.

R Limite de reproductibilité, la valeur en dessous de laquelle on peut estimer que se situe la différence absolue entre deux résultats d'analyse unique obtenus dans des conditions de reproductibilité (c'est à dire avec du matériel identique obtenu par des opérateurs dans différents laboratoires, en utilisant la méthode d'essai standardisée), dans une limite donnée de probabilité (en principe 95 %) ; $R = 2.8 \times s_R$.

S^R L'écart-type de la reproductibilité (entre la variation des laboratoires).

RSD^R L'écart-type relatif de la reproductibilité (S_R x 100/MOYENNE).

Ho^R La valeur RSD_R observée divisée par la valeur RSD_R calculée à partir de l'équation de Horwitz.

$RSD_R = 2^{(1-0.5\log_{10}C)}$ (où C = concentration exprimée en décimale)

Les valeurs du HORRAT[(4)] sont :

- Pour la répétabilité, la RSD_r observée divisée par la valeur RSD_r estimée à partir de l'équation de Horwitz en supposant que r = 0.66R.
- Pour la reproductibilité, la RSD_R observée divisée par la valeur RSD_R estimée à partir de l'équation de Horwitz.

8. BIBLIOGRAPHIE

8.1 Paul A. Brereton, Paul Robb, Christine M Sargent, Helen M. Crews and Roger Wood. Determination of Lead in Wine by Graphite Furnace Atomic

Absorption Spectrometry: Interlaboratory Study. *JAOAC Int*., 1997, 80, No 6, 1287-1297.

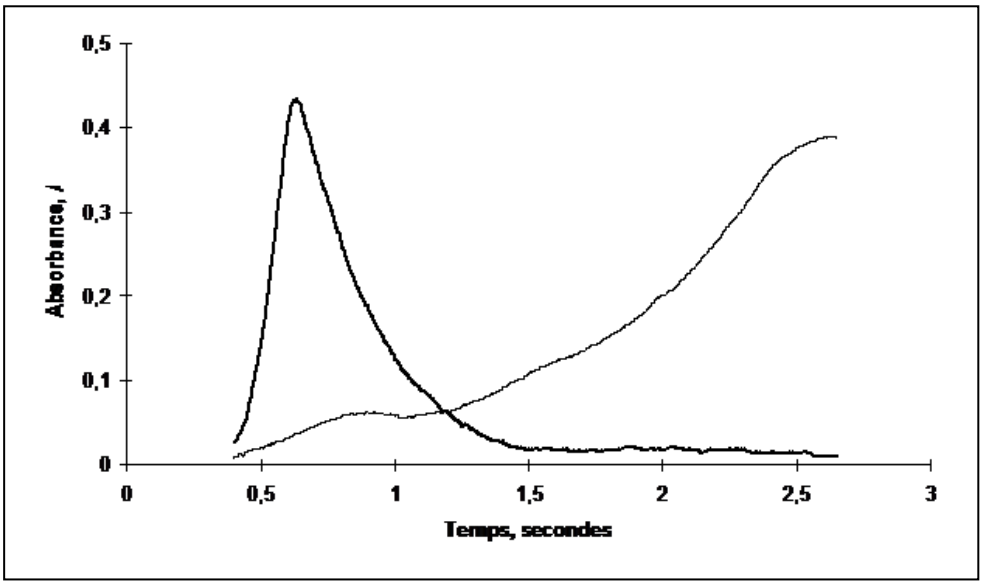
8.2 "Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Collaborative Studies." Editor W Horwitz, Pure & Appl. Chem., Vol. 67, No., 2, pp.331-343, 1995

8.3 Horwitz W, Evaluation of Methods Used for Regulation of Foods and Drugs, *Analytical Chemistry*, 1982, **57**, 67A-76A.

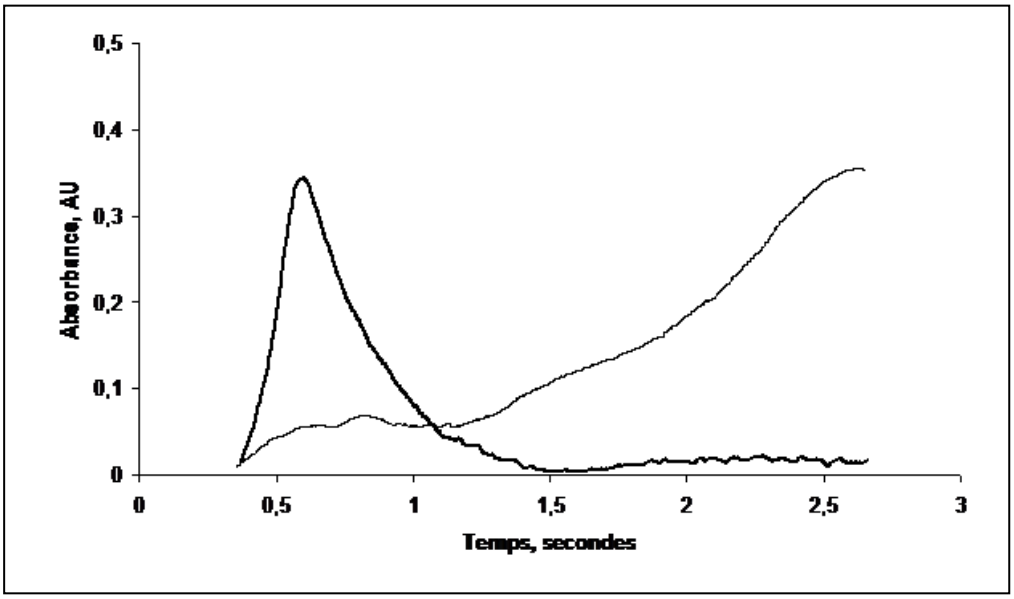
8.4 Peeler J T, Horwitz W and Albert R, Precision Parameters of Standard Methods
of Analysis for Dairy Products, *JAOAC*, 1989, 72, No 5, 784-806.

Annexe

Allure des courbes absorbance - temps pour la mesure de la concentration en plomb du vinavec utilisation d'un spectrophotomètre d'absorption atomique Perkin-Elmer 3030 équipé d'une correction d'absorption non spécifique à
arc au deuterium.



(i) étalon de vin à 30 ng/l



(ii) échantillon de vin

Clé : ▫▫▫▫▫▫▫▫▫ absorbance corrigée, —— absorbance non spécifique

EXEMPLE 2

Détermination de la teneur en plomb dans les vins par spectrophotométrie d'absorption atomique

1. DOMAINE D'APPLICATION

La méthode d'analyse est applicable à tout type de vins, eut égard à la limite maximum fixée par l'O.I.V.

2. BIBLIOGRAPHIE

2.1. Journal Officiel des Communautés Européennes (3 octobre 1990). *Méthode de dosage du plomb dans le vin* (p. 152 et 153).
2.2. Teissèdre P.L., Brun S., Médina B. (1992). *Dosage du plomb dans les vins / Proposition de modifications à la méthode du Recueil*. Feuillet Vert de l'O.I.V., n°928, 1997/151292.
2.3. Moreira Balio da Silva M., Gaye J., Médina B. (1996). *Comparaison de six méthodes de dosage du plomb dans les vins par absorption atomique en four graphite*. Feuillet Vert de l'O.I.V. n° 1013, 2310/190196.
2.4. Brereton P., Robb P., Sargent C., Crews H., Wood R. (1996). *Validation of a graphite furnace atomic absorption spectrometry method for the detection of lead in wine*. Feuillet Vert de l'O.I.V. n° 1016, 2913/230196.
2.5. Bourguignon J.B., Douet Ch., Gaye J., Médina B. (1997). *Dosage du plomb dans le vin / Interprétation des résultats de l'essai interlaboratoire*. Feuillet Vert 1055 de l'O.I.V. n° 2456/190397.

3. PRINCIPE

Le vin ne subit aucune préparation, excepté une dilution dans le cas des vins blancs doux.
L'ajout de dihydrogéno-phosphate d'ammonium permet au plomb contenu dans le vin d'être stable à haute température - ce qui conduit à éliminer les interférences - et de se comporter de façon identique à une solution étalon.
L'atomiseur est un tube en graphite pyrolytique chauffé par effet Joule équipé d'une plate-forme.
La longueur d'onde de la raie utilisée est de 283,3 nanomètres.

La correction de l'absorption non spécifique peut se faire par effet Zeeman ou avec une lampe au deutérium.
Le type de détermination du plomb dans le vin est une méthode directe de dosage avec un étalonnage externe.

4. REACTIFS

4.1. Eau déminéralisée : ultra pure ; ayant une résistivité supérieure à 18 MΩ/cm.

4.2. Acide nitrique : à 65 % ; acide de qualité pour analyses.

4.3. Dihydrogéno-phosphate d'ammonium $NH_4H_2PO_4$ pour analyses.

4.4. Solution étalon de plomb : à 1000 µg/mL (ou 1 g/l) dans de l'acide nitrique à 2 % (solution du commerce, prête à l'emploi).

5. APPAREILLAGE

5.1 Balance analytique (e = 1 mg).

5.2 Verrerie :

5.2.1 *Fioles jaugées* de 50, 100 ml (classe A),

5.2.2 *Pipettes jaugées* de 1, 10 ml (classe A),

5.2.3 *Décontamination de la verrerie utilisée :* rinçage à l'eau déminéralisée; trempage au moins 24 heures dans un bac d'acide nitrique à 10 % ; rinçage deux fois à l'eau déminéralisée.

5.3 Spectrophotomètre d'absorption atomique équipé d'un atomiseur à tube de graphite, avec correction de l'absorption non spécifique et passeur automatique d'échantillons (rincer auparavant les godets du passeur dans de l'acide nitrique à 10 %).

5.3.1. *Four en graphite pyrolytique* contenant une plate-forme de L'Vov **éventuellement** tantalisée (référence 9.1 - voir ci-dessous:

5.3.1.1 solution de tantale : placer 3 g de poudre de tantale (tantale métal dont la pureté est supérieure à 99,7 %) dans un bécher en téflon de 100 mL ; ajouter 10 mL d'acide fluorhydrique dilué (1 + 1), 3 g d'acide oxalique déshydraté et 0,5 mL d'eau oxygénée à 30 % ; chauffer l'ensemble avec précaution pour dissoudre le

métal ; ajouter de l'eau oxygénée lorsque la réaction se ralentit ; quand la dissolution est complète, ajouter 4 g d'acide oxalique déshydraté et approximativement 30 mL d'eau déminéralisée ; dissoudre l'acide ; porter la solution à 50 mL ; cette solution est stockée dans un flacon en matière plastique.

5.3.1.2 tantalisation d'une plate-forme : la plate-forme est déposée à l'intérieur d'un tube en graphite. L'ensemble est fixé sur l'unité d'atomisation du spectrophotomètre. Un volume de 10 µL de la solution de tantale est injecté sur la plate-forme à l'aide du distributeur automatique d'échantillons. Le cycle des températures est fixé selon le programme suivant : séchage à 150°C pendant 40 s ; minéralisation à 900°C pendant 60 s ; atomisation à 2600°C pendant 2,5 s. L'argon est utilisé comme gaz inerte.

6. MODE OPERATOIRE

6.1 Prise d'essai : Le goulot d'une bouteille de vin possédant une capsule de surbouchage en plomb-étain doit être très soigneusement nettoyé avant débouchage.

6.2 Préparation de l'échantillon : généralement, aucune préparation du vin n'est nécessaire ; les échantillons sont placés directement dans les godets du passeur automatique. Il faut filtrer les vins troubles. Pour prolonger la durée d'utilisation des plates-formes, les vins blancs doux sont dilués : pour des teneurs en sucre de 10 à 50 g/l, diluer au 1/2 ; pour des teneurs supérieures à 50 g/l, diluer au 1/4.

6.3 Préparation des solutions :

6.3.1 *Blanc de dilution :*
la solution servant de complément au volume à l'injection est constituée par de l'eau déminéralisée contenant 1 % d'acide nitrique (4.2.).

6.3.2. *Modificateur de matrice :*
introduire 3 g de dihydrogéno-phosphate d'ammonium (4.3.) dans un ballon jaugé de 50 mL (5.2.1.) ; dissoudre et compléter avec de l'eau déminéralisée (4.1.).

6.3.3. *Solution de plomb à 10 mg/l :*
placer 1 mL de la solution à 1 g/l (4.4.) dans un ballon jaugé de 100 mL (5.2.1.) ; ajouter 1 % d'acide nitrique (4.2.) ; compléter au volume avec de l'eau déminéralisée (4.1.). Cette solution se conserve un mois à la température de + 4°C.

6.3.4 *Solution de plomb à 100 µg/l :*

placer 1 mL de la solution de plomb à 10 mg/l (6.3.3.) dans un ballon jaugé de 100 ml (5.2.1.); compléter au volume avec de l'eau déminéralisée (4.1.). Cette solution doit être préparée chaque jour d'analyse.

6.3.5 *Gamme d'étalonnage* (à titre indicatif) : 0 ; 16,7 ; 33,3 et 50 µg/l (voir tableau II).

6.4 Etalonnage et dosage :

6.4.1 *Mesurages spectrométriques :*

6.4.1.1 longueur d'onde : 283,3 nm;
6.4.1.2 largeur de la fente : 0,5 nm;
6.4.1.3 intensité de la lampe à cathode creuse : 5 mA ;
6.4.1.4 correction du fond continu : par effet Zeeman ou deutérium ;
6.4.1.5 introduction à chaud des étalons et des échantillons dans le four graphite, avec un passeur automatique d'échantillons. Le liquide de rinçage est constitué de 500 ml d'eau déminéralisée contenant une goutte de Triton X 100.

Note: pour obtenir une injection à 90°C sur la plate-forme, il faut régler la température du four à 150°C environ.

6.4.1.6 mesure du signal: en hauteur de pic ;
6.4.1.7 durée de la mesure: 3 secondes ;
6.4.1.8 nombre de mesures par étalon ou échantillon: 2

Note: la moyenne de ces deux mesures constitue le résultat d'essai. Si le coefficient de variation de deux mesures est supérieur à 15 %, on doit refaire deux autres mesures.

6.4.1.9. paramètres du four (à titre indicatif) : voir tableau I.

Tableau I – Paramètres du four pour le dosage du plomb dans les vins				
température (en °C)	durée (en s)	type de gaz	débit du gaz (en l/mn)	lecture du signal
150	60	argon	3,0	
750	10	argon	3,0	
750	30	argon	3,0	
750	2	argon	0	
2400	1	argon	0	oui
2400	2	argon	0	oui
2400	2	argon	3,0	
40	20	argon	3,0	

6.4.1.10. Paramètres de l'échantillonneur automatique (à titre indicatif): voir tableau II.

Tableau II - Paramètres de l'échantillonneur pour le dosage du plomb dans les vins				
Analyse :	volumes injectés en µl			
	échantillon	solution de Pb à 100 µg/l	"blanc" de dilution	modificateur de matrice
blanc de calibration	0	0	5	1
étalon n°1	0	1	4	1
étalon n°2	0	2	3	1
étalon n°3	0	3	2	1
échantillon	2	0	3	1

6.4.2 *Tracé de la courbe d'étalonnage :* le cycle du distributeur automatique permet de réaliser la préparation des étalons à partir de la solution de plomb à 100 µg/l (tableau II). On établit le graphe d'étalonnage : absorbance en fonction de la quantité de plomb en microgrammes par litre.

7. EXPRESSION DES RESULTATS

7.1 Concentration en plomb de la solution injectée : On l'obtient à partir de la courbe d'étalonnage (6.4.2.).

7.2 Concentration en plomb du vin : On la déduit en multipliant par 3 le résultat donné en 7.1. (2 µl de solution injectée pour un volume final de 6 µl sur la plate-forme). Tenir compte d'une éventuelle dilution du vin (cas des vins blancs doux).

7.3 Résultat : On l'exprime en milligrammes de plomb par litre de vin (mg/l), avec deux chiffres significatifs.

8. ESSAI INTERLABORATOIRE

L'essai a été conduit "en double aveugle" avec 8 vins différents, obtenus à partir de mélanges de vins de Bordeaux : deux vins rouges (R1 et R2), deux vins rosés (Ro1 et Ro2), deux vins blancs secs (Bs1 et Bs2) et deux vins blancs doux (D1 et D2). Onze laboratoires espagnols, portugais, marocains et français ont participé à l'étude en dosant le plomb dans les 16 échantillons reçus.

8.1 Présentation des 8 échantillons de vins :

Tableau III : Caractéristiques des vins utilisés pour l'essai interlaboratoire

Vins	Type	T.A.V. (% Vol.)	Acidité Totale (g/l H2SO4)	Acidité Volatile (g/l H2SO4)	Sucres Réducteurs (g/l)
R1	Rouge	11,86	4,43	1,57	1,2
R2	Rouge	12,54	3,77	0,34	1,5
Ro1	Rosé	12,23	5,30	0,44	1,2
Ro2	Rosé	11,43	4,88	0,45	1,1
Bs1	Blanc sec	11,65	4,62	0,37	2,2
Bs2	Blanc sec	12,32	4,57	0,31	0,9
D1	Blanc doux	12,94	3,72	0,67	76,4
D2	Blanc doux	12,66	4,70	0,45	62,8

8.2 Exploitation statistique des résultats :

Tableau IV : Analyse statistique des résultats de l'essai interlaboratoire

Echantillon de vin	R1	R2	Ro1	Ro2	BS1	BS2	D1	D2
Répétitions en double aveugle	C & K	F & I	D & G	J & L	B & H	P & N	A & E	M & 0
Nombre initial de laboratoires	11	11	11	11	11	11	11	11
Nombre de laboratoires après élimination des plus grandes dispersions	11	10	11	11	10	10	11	10
Moyenne (µg/l)	44	162	28	145	52	138	60	145
Limite de répétabilité r	18	12	7	17	6	13	28	7
Ecart-type de répétabilité S_r	6,4	4,3	2,5	6,1	2,1	4,6	10	2,5
Coefficient de variation de répétabilité RSDr (en %)	14,5	2,8	9,2	4,2	4,2	3,4	16,5	1,8
Valeur du Horrat (Ho_r):RSDr observé / RSD_r Horwitz	0,6	0,1	0,3	0,2	0,2	0,2	0,7	0,1
Limite de reproductibilité R	34	105	23	86	30	101	86	144
Ecart-type de reproductibilité S_R	12,3	37,5	8,2	30,8	10,7	35,9	30,6	51,6
Coefficient de variation de reproductibilité RSD_R (en %)	28	23,1	29,3	21,2	20,6	26	51	35,6
Valeur du Horrat (Ho_R):RSD_R observé / RSD_R Horwitz	1,1	1,1	1,1	1	0,8	1,2	2,1	1,7

Parmi les 11 laboratoires ayant participé à l'essai, 7 ont déclaré avoir suivi la méthode d'analyse proposée, 4 ont modifié quelques paramètres.

9. PERFORMANCES DE LA METHODE ET CONTROLE QUALITE

9.1 Limite de détection : Elle est déterminée à partir d'une série de 20 répétitions du blanc analytique et elle est égale à 3 écarts types. Dans le cas de la méthode proposée, une série de 20 mesures du blanc analytique a donné comme résultat : moyenne = 1,29 µg/l; écart type = 0,44 µg/l; limite de détection = 1,3 µg/l.

9.2 Limite de quantification : Elle est égale à 3 fois la limite de détection. Dans le cas de la méthode proposée, la limite de quantification est de 4 µg/l (3 * 1,32 = 3,96).

9.3 Justesse : L'intervalle de confiance de la moyenne d'une série de résultats est comparé avec celui donné pour un matériau de référence.

Trois matériaux de référence ont été utilisés: un vin rouge, un vin blanc sec et un vin blanc doux dont les concentrations en plomb ont été certifiées par le B.C.R. (Bureau Communautaire de Référence) en 1992.

Tableau V : Justesse de la méthode

		Vin rouge BCR E	Vin blanc sec BCR C	Vin blanc doux BCR D
Concentration en plomb (µg/l)	Valeur certifiée (B.C.R. 1992)	36,1 ± 4,9	65,1 ± 9,1	132,4 ± 32
	Valeur moyenne (série : 10 résultats)	41,0 ± 3,8	66,0 ± 4,4	128,3 ± 14,1

9.4Carte de contrôle

Une carte de contrôle peut être établie pour chaque matériau de référence utilisé. Les limites de contrôle sont égales à : +/- 2 $S_R$intra (S_R intra : écart-type de reproductibilité).

10. BIBLIOGRAPHIE

10.1. Zatka V. (1978). *Treated graphite atomizer tubes for atomic absorption spectrometry*. Analytical Chemistry, vol. 50, n°3.

10.2. US Bureau of Alcohol, Tobacco and Firearms (1991). *Analysis of lead in wines and related products by graphite furnace atomic absorption spectrometry*. Note d'information de l'O.I.V. du 21 août 1991 : « Plomb dans les vins aux U.S.A. ».

10.3. Mindak W.R. (1994). *Determination of lead in table wines by graphite furnace atomic absorption spectrometry*. Journal of A.O.A.C. International, vol. 77, n°4, p. 1023-1030.

10.4. Médina B. (1994). *Apport de nouvelles techniques au dosage des métaux dans les vins*. Congrès des Œnologues de France à Bordeaux.

10.5. Norme française NF ISO 5725-2 (1994). *Application de la statistique : Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure*.

10.6. Jorhem L., Sundström B. (1995). *Direct determination of lead in wine using graphite furnace AAS*. Atomic Spectroscopy, September/October 1995.

Méthode OIV-MA-AS322-13 Méthode Type III

Analyse des éléments minéraux des vins per ICP/AES

(Plasma inductivement couplé / spectrométrie d'émission atomique)

(Résolution OIV-OENO 478-2013)

1. Avertissement

PRÉCAUTIONS DE SÉCURITÉ — Il convient, lors de la manipulation des acides, que les opérateurs protègent leurs mains et leurs yeux. La manipulation des acides doit être effectuée sous une hotte appropriée.

2. Domaine d'application

La présente méthode spécifie une méthode de spectrométrie d'émission atomique à plasma à couplage inductif (ICP-AES) pour la détermination de la teneur des éléments suivants dans les vins:

- éléments minéraux majeurs :
  - potassium (jusqu'à 1500 mg/L)
  - calcium (jusqu'à 250 mg/L)
  - magnésium (jusqu'à 150 mg/L)
  - sodium (jusqu'à 100 mg/L).

- éléments minéraux mineurs
  - Fer (1 à 10 mg/L)
  - Cuivre (0,1 à 5 mg/L)
  - Zinc (0,5 à 5 mg/L)
  - Manganèse (0,5 à 5 mg/L)
  - Strontium (0,1 à 3 mg/L)
  - Aluminium (0,75 à 7,5 mg/L)
  - Baryum (0,1 à 5 mg/L).

3. Principe

3.1. Analyse simultanée des éléments majeurs et mineurs

La préparation des échantillons proposée dans cette méthode est une dilution au 1/5 de façon à pouvoir analyser aussi bien les éléments majeurs que les éléments mineurs.
La gamme d'étalonnage contient de l'éthanol (2,5 %) pour prendre en compte les effets de matrice liés à la présence de celui-ci au niveau de la nébulisation et au niveau de la température du plasma, ainsi que de l'acide nitrique (HNO_3 - 1%) qui permet de stabiliser les solutions.
Les raies Sc $_{335,372}$ (scandium à 5 mg/l) et Cs $_{697,327}$ (césium à 1% en $CsNO_3$) proposées dans cette méthode peuvent être utilisées comme étalon interne afin de minimiser l'impact des autres interférences non spectrales.
D'autres étalons internes, choisis judicieusement, peuvent également être utilisés afin d'optimiser la méthode tel que Y $_{371,029}$.
Le césium, sous forme de $CsNO_3$, utilisé comme étalon interne a également un rôle de tampon ionique. La présence de ce tampon fixe ainsi les équilibres d'ionisation des autres constituants. Le chlorure de césium CsCl peut également être utilisé comme tampon ionique.
Les étalons internes et le tampon ionique sont préparés dans une même fiole et ainsi conduits jusqu'à l'échantillon par l'ajout d'une troisième voie au niveau de la pompe péristaltique avant de parvenir en un mélange homogène jusqu'au nébuliseur.

3.2. Analyse des éléments majeurs uniquement

L'analyse seule des éléments majeurs est également réalisable en procédant à une dilution au 1/50ème de l'échantillon. De l'acide nitrique (HNO_3 - 1%) est ajouté dans les étalons et dans les échantillons afin de stabiliser les solutions.
Compte-tenu de la dilution effectuée, les effets de matrice sont considérés comme négligeables. Il ne sera pas nécessaire d'utiliser des étalons internes. De même, il ne sera donc pas nécessaire d'ajouter de l'éthanol à la gamme d'étalonnage.

4. Réactifs et solutions

Sauf indications contraires, utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue

4.1 Eau déminéralisée, ultra pure avec une résistivité (> à 18 MΩ), conformément à la norme ISO 3696.

4.2 Solution(s) certifiée(s) mono élémentaire(s) (à 1000 ou 10000 mg/L) pour les éléments minéraux analysés ainsi que pour l'étalon interne (scandium par exemple)

4.3 Contrôle interne : matériau de référence certifié (vin) ou échantillon issu d'un programme d'intercomparaison entre laboratoires, comportant les éléments analysés.

4.4 Acide nitrique de concentration supérieure à 60 % (pour analyse de traces) (CAS 7697-37-2).

4.5 Ethanol de concentration supérieure à 95 % (pour analyse de traces) (CAS 64-17-5).

4.6 Solution d'acide nitrique à 1 %

Préparer une solution d'acide nitrique à 1% en ajouter 10 mL d'acide nitrique (4.4) dans une fiole de 1000 mL.

5. Appareil et équipement

5.1 Spectromètre d'émission optique avec excitation en plasma argon induit et système dispersif (pour les longueurs d'onde d'analyse, voir le tableau de la section 7) à visée axiale, radiale ou dual et à détecteur de préférence séquentiel de type PM, CCD, CID ou SCCD

Note 1 : ***L'analyse multi-élémentaire par un spectromètre de type*** *simultané* ***est fortement conseillée si un étalon interne est utilisé dans la méthode***

Note 2 : ***d'autres systèmes d'introduction d'échantillon peuvent être utilisés afin d'augmenter la sensibilité et la robustesse de la méthode (système par injection en flux continu, désolvatation par micro-onde (MWDS)…).***

5.2 Micropipettes contrôlées permettant des prises de volume de 200 µL à 5 mL et/ou pipette graduée de classe A de 1, 5 et 10 mL

5.3 Fioles jaugées de classe A

Note 3 : *le matériel en contact avec l'échantillon doit rester au moins pendant 12 heures, dans une solution d'acide nitrique (4.4) à une concentration de 10 %, et doit ensuite être rincé plusieurs fois avec de l'eau déminéralisée (4.1).*

Afin d'évaluer la robustesse de la méthode sur l'appareil utilisé, il est conseillé de calculer le rapport d'intensité de $Mg_{279,800}/Mg_{285,213}$. $Mg_{285,213}$ étant une raie atomique et $Mg_{279,800}$ étant une raie ionique.

6. Préparation de l'échantilllon

6.1 PREPARATION DE LA GAMME D'ETALONNAGE

Le nombre des solutions d'étalonnage dépend de la fidélité requise. Au moins cinq solutions d'étalonnage sont nécessaires. La fidélité ainsi que la justesse des résultats peut être vérifiée en analysant un matériau de référence.
La gamme sera choisie en fonction de la dilution effectuée. Elle devra couvrir le domaine d'applications des différents éléments. Il est important que la concentration en acide nitrique soit la même dans les étalons et dans les échantillons.

6.1.1 Préparation d'une solution étalon pour l'analyse simultanée des éléments majeurs et des éléments mineurs (dilution 1/5) :

Dans une fiole de 100 mL (5.3), introduire avec une micropipette (5.2) le volume souhaité d'étalon ; 2.5 mL d'éthanol (4.5) ; 1 mL d'acide nitrique (4.4), compléter à 100 mL avec de l'eau déminéralisée (4.1) et homogénéiser.

6.1.2 Préparation d'une solution étalon pour l'analyse des éléments majeurs uniquement (dilution 1/50)

Dans une fiole de 100 mL (5.3), introduire avec une micropipette (5.2) le volume souhaité d'étalon, compléter à 100 mL avec la solution d'acide nitrique (4.6) et homogénéiser.

6.2 Préparation de l'échantillon pour l'essai

6.2.1 Préparation des échantillons d'essai pour l'analyse simultanée des éléments majeurs et des éléments mineurs (dilution 1/5) :

Dans une fiole de 50 mL (5.3), introduire avec une pipette graduée ou une micropipette (5.2) 10 mL d'échantillon ; 0,5 mL d'acide nitrique (4.4) et compléter à 50 mL avec de l'eau déminéralisée (4.1) et homogénéiser.

Les échantillons de vin mousseux doivent faire l'objet d'un dégazage en utilisant un bain d'ultrasons par exemple pendant au moins 10 minutes.

Pour des échantillons riches en sucre notamment, une minéralisation par digestion micro-onde dans l'acide nitrique permet la destruction des composés organiques. Enfin, une dilution plus importante pourra être envisagée en raison de la teneur trop élevée pour certains éléments. Dans ce cas, la teneur en éthanol pourra être corrigée en conséquence dans les solutions et les étalons.

Note 4 : En fonction de la robustesse de l'appareil utilisé et compte-tenu de l'utilisation du tampon ionique et des étalons internes, il est possible de travailler avec un facteur de dilution 1 :2 afin d'améliorer la sensibilité de la méthode pour

les éléments traces. Il faudra modifier en conséquence, les gammes d'étalonnage, la teneur en éthanol et éventuellement les paramètres expérimentaux (puissance…)

6.2.2 Préparation des échantillons d'essai pour l'analyse des éléments majeurs uniquement (dilution 1/50)

Dans une fiole de 50 mL (5.3), introduire avec une pipette graduée ou une micropipette (5.2) 1 mL d'échantillon de vin; ; 0,5 mL d'acide nitrique (4.4) et compléter à 50 mL avec de l'eau déminéralisée (4.1) et homogénéiser.

7. Mode opératoire

Paramètres expérimentaux

Les paramètres optimaux de l'appareil nous ayant permis d'atteindre les spécificités en termes de répétabilité et de reproductibilité pour cette méthode sont décrits ci-dessous. Ils sont ici présentés à titre d'exemple, et peuvent être modifiés en fonction de l'appareil utilisé.

Puissance : 1,3 kW

Débit gaz plasmagène (plasma gas flow) : 15 L/min
Débit gaz auxiliaire : 1,5 L/min
Pression de nébulisation : 200 kPa
Délai de stabilisation : 20 s
Temps de lecture par réplique : 5 s

Vitesse de pompe : 15 tour/min

Temps de rinçage : 30 s

Diamètre interne tuyau étalon interne : 0.51 mm

Diamètre interne tuyau échantillon : 0.8 mm

Mettre l'appareil en marche (pompe en fonctionnement et plasma allumé) et nettoyer le système pendant au moins 20 minutes avec de l'acide nitrique (4.6) à 1 %.

Analyser un blanc à la suite de la série des étalons dans l'ordre croissant des concentrations. Un échantillon de référence (4.3) peut être utilisé comme contrôle qualité interne pour vérifier que l'étalonnage est satisfaisant. Analyser ensuite à nouveau le blanc pour s'assurer de l'absence d'effet-mémoire. Procéder ensuite à l'analyse des échantillons en intercalant un contrôle qualité tous les 10 échantillons et à la fin de la série d'analyse.

Une carte de contrôle peut être établie à partir des résultats obtenus sur l'échantillon de contrôle afin de définir des critères d'acceptation et des actions à entreprendre en cas de dérive.
Les analyses se feront pour chaque élément avec un minimum de 3 répliques.

Raies pouvant être utilisées pour les différents éléments (d'autres raies peuvent être utilisées en fonction de l'équipement) :

Eléments	Raie principale ($E_{sum} = E_{exc} + E_{ion}$)	Étalon interne pouvant être associé	Raie secondaire ($E_{sum} = E_{exc} + E_{ion}$)	Étalon interne pouvant être associé

K	769,897 (I) *(1,6 eV)*	Cs 697,327	766,491 (I) *(1,6 eV)*	Cs 697,327
Ca	317,933 (II) *(10 eV)*	Sc 335,372	315,887 (II) *(10,1 eV)*	Sc 335,372
Mg	285,213 (I) *(4,3 eV)*	Cs 697,327	279,800 (II) *(10,6 eV)*	Sc 335,372
Na	589,592 (I) *(2,1 eV)*	Cs 697,327		
Fe	259,940 (II) *(12,7 eV)*	Sc 335,372	239,563 (II) *(11,4 eV)*	Sc 335,372
Cu	327,395 (I) *(3,8 eV)*	Cs 697,327	324,754 (I) (3,8 eV)	Cs 697,327
Zn	213,857 (I) *(5,8 eV)*	Cs 697,327	206,200 (II) *(12,2 eV)*	Sc 335,372
Mn	257,61 (II) *(12,3 eV)*	Sc 335,372	260,568 (II) *(11 eV)*	Sc 335,372
Sr	421,552 (II) *(8,6 eV)*	Sc 335,372	407,771 (II) *(8,7 eV)*	Sc 335,372
Al	396,152 (I) *(3,1 eV)*	Cs 697,327	167,019 (I) *(7,4 eV)*	Cs 697,327
Rb	780,026 (I) *(1,6 eV)*	Cs 697,327		
Li	670,783 (I) *(1,9 eV)*	Cs 697,327		
Ba	455,403 (II) *(7,9 eV)*	Sc 335,372		
Sc	335,372 (II) *(10,3 eV)*			
Cs	697,327 (I) *(1,8 eV)*			

8. Calcul

Calculer la concentration des éléments dans l'échantillon en utilisant l'équation suivante :

$$C = \frac{Cm \times Vt}{Vm}$$

Avec :
C : concentration de l'élément dans l'échantillon de vin (mg/L)
Cm : concentration de l'élément dans la solution diluée (mg/L)

Vt : volume de la fiole de dilution (mL) (ici V=50 mL)
Vm : volume d'échantillon prélevé pour la dilution (mL) (ici V=1 ou 10 mL)

9. Fidélité

Eléments	Répétabilité (RSD %)	Reproductibilité (RSD %)	LD (mg/L)	LQ (mg/L)	Taux de récupération
K	2,3	5,5	majeur	majeur	Entre 80 % et 120 %
Ca	3,5	11,3	majeur	majeur	
Mg	2,4	8,9	majeur	majeur	
Na	2,6	9,1	majeur	majeur	
Fe	2,2	6,9	0,08	0,25	
Cu	13,4	15,8	0,03	0,10	
Zn	3,6	6,5	0,03	0,10	
Mn	4,7	7,0	0,03	0,10	
Al	5,6	17,0	0,03	0,10	
Sr	2,1	9,9	0,03	0,10	
Ba	8,2	20,8	0,03	0,10	

ANNEXE :

ÉTUDE DE VALIDATION - Résultats des essais collaboratifs

Une étude de validation a été réalisée en novembre 2011 (étude préliminaire) et février 2012 (étude de validation), conformément à la norme ISO 5725 et la résolution OENO 6/2000.

Étude préliminaire :

3 échantillons (vin blanc sec, vin rouge et vin blanc doux, surchargés en éléments suivants :
Al, Fe, Cu, Sr, Ba, Mn et Zn.

	Echantillons		
Elément (mg/l)	Vin rouge	Vin blanc sec	Vin doux
K	1258	725	841
Ca	50	75	81
Na	20	28	24
Mg	78	70	66
Al	1,29	1,33	1,97
Fe	8,12	6,91	9,29
Cu	0,86	0,86	0,94
Sr	1,07	1,08	1,07
Ba	0,77	0,72	0,63
Mn	1,6	2,01	1,77
Zn	1,51	2,53	1,69

	Vin blanc 1			**Vin blanc 2**		
Élément	Valeur de réf (mg/L)	Surcharge (mg/L)	% de recouvrement	Valeur de réf (mg/L)	Surcharge (mg/L)	% de recouvrement
K	754	0	98	1080	351	96
Ca	83	11	98	76	0	102
Na	50	28	105	24	0	100
Mg	65	0	98	72	7	102

Al	0,5	0	100	1,19	1	104
Fe	2,86	1	94	1,71	0	97
Cu	0,04	0	non aj.	0,71	1	103
Sr	1,27	1	105	0,22	0	108
Ba	0,08	0	102	0,64	1	96
Mn	1,84	1	98	1,12	0	102
Zn	1,4	0	100	2,12	1	102

	Vin rouge 1			Vin rouge 2		
Élément	Valeur de réf (mg/L)	Surcharge (mg/L)	% de recouvrement	Valeur de réf (mg/L)	Surcharge (mg/L)	% de recouvrement
K	1160	70	100	1371	316	95
Ca	62	1	103	67	7	101
Na	71	56	100	19	0	100
Mg	82	7	102	80	0	99
Al	0,81	0	105	1,82	1	103
Fe	4,9	0	101	4,55	0	101
Cu	0,46	0	102	0,12	0	65
Sr	0,28	0	102	1,32	1	105
Ba	0,12	0	102	0,62	1	97
Mn	1,81	1	100	1,1	0	101
Zn	0,95	0	107	1,68	1	101

	Vin doux 1			Vin doux 2		
Élément	Valeur de réf (mg/L)	Surcharge (mg/L)	% de recouvrement	Valeur de réf (mg/L)	Surcharge (mg/L)	% de recouvrement
K	1105	246	96	832	0	102
Ca	85	4	99	92	10	101
Na	68	42	98	21	0	100
Mg	63	0	97	66	6	101
Al	1,65	1	101	0,8	0	96

Fe	3,03	0	97	4,63	0	101
Cu	0,73	1	101	0,12	0	94
Sr	1,73	1	106	0,22	0	96
Ba	0,11	0	94	0,34	0	90
Mn	1,01	0	99	1,62	1	102
Zn	1,53	1	102	1,18	0	100

Les laboratoires participants avaient le choix de réaliser les analyses des éléments :

- soit en deux étapes : une forte dilution pour les éléments majeurs et une faible dilution pour les éléments mineurs, préférablement avec des étalons internes ;
- soit en une étape : la même dilution pour tous les éléments avec des étalons standards.

La première valeur individuelle a été utilisée pour chaque numéro d'échantillon et chaque dosage. Les deux portions individuelles des répétitions en double aveugle de chaque laboratoire sont considérées comme un seul et unique matériel.
L'élimination des valeurs aberrantes a été réalisée en utilisant une application séquentielle des tests de Cochran (appliqué aux variances) et de Grubbs (appliqué aux valeurs moyennes) (à un niveau de probabilité (P) de 2,5 %, unilatéral pour celui de Cochran et bilatéral pour celui de Grubbs) jusqu'à ce qu'aucune autre valeur aberrante ne soit signalée, ou jusqu'à obtention d'une baisse de 22,2 % du nombre initial de laboratoires fournissant des données valides.

Exception faite de l'élément calcium dans l'échantillon « vin doux 2 », qui montre une valeur Horrat R de 2,2, tous les éléments étaient conformes. Pour cet échantillon, 93 % des laboratoires ont obtenu un score Z satisfaisant (14 résultats) et 7 % des laboratoires ont obtenu un score Z questionnable (1 résultat). En conséquence, et étant donné que les cinq autres échantillons étaient conformes pour le dosage du calcium, y compris un autre échantillon de vin doux présentant la même concentration de calcium, il a été décidé de valider cet élément et de l'inclure dans la méthode analytique.
Pour le dosage des éléments majeurs, 9 laboratoires ont utilisé une forte dilution et 6 laboratoires ont utilisé une dilution unique pour tous les éléments (majeurs et mineurs). Aucune différence entre les résultats de ces deux groupes n'a été mise à jour.

Tableau 1 - Potassium

Paramètres statistiques	Vin blanc 1	Vin blanc 2	Vin rouge 1	Vin rouge 2	Vin doux 1	Vin doux 2
Total	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00
Acceptés	13,00	13,00	14,00	11,00	14,00	14,00
Répétitions	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Vréf (mg/L)	754,38	1079,82	1160,33	1370,96	1105,46	831,62
Limite de répétabilité - r	22,45	47,32	132,68	50,64	124,78	42,92
RSD r (%)	1,10	1,50	4,00	1,30	4,00	1,80
RSD r Horwitz	3,90	3,69	3,65	3,56	3,68	3,84
r Horrat	0,30	0,40	1,10	0,40	1,10	0,50
Limite de reproductibilité - R	139,25	182,82	165,46	147,56	176,10	142,93
RSD R (%)	6,50	6,00	5,00	3,80	5,60	6,10
RSD R Horwitz	5,90	5,59	5,53	5,39	5,57	5,82
R Horrat	1,10	1,10	0,90	0,70	1,00	1,00

Tableau 2 - Calcium

Paramètres statistiques	Vin blanc 1	Vin blanc 2	Vin rouge 1	Vin rouge 2	Vin doux 1	Vin doux 2
Total	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00
Acceptés	10,00	10,00	13,00	10,00	13,00	15,00
Répétitions	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Vréf (mg/L)	85,37	73,43	67,68	66,00	78,35	92,39
Limite de répétabiLité - r	3,30	4,12	4,60	2,86	7,96	26,66
RSD r (%)	2,10	2,00	2,40	1,50	3,60	10,20
RSD r Horwitz	5,85	5,53	5,60	5,62	5,48	5,34
r Horrat	0,30	0,40	0,40	0,30	0,70	1,90
Limite de reproductibilité - R	10,68	10,45	42,58	9,51	29,85	45,60
RSD R (%)	4,40	5,00	22,20	5,10	13,50	17,40
RSD R Horwitz	8,19	8,38	8,48	8,52	8,30	8,10
R Horrat	0,50	0,60	2,60	0,60	0,60	2,20

Tableau 3 - Sodium

Paramètres statistiques	Vin blanc 1	Vin blanc 2	Vin rouge 1	Vin rouge 2	Vin doux 1	Vin doux 2
Total	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00
Acceptés	15,00	13,00	12,00	12,00	14,00	15,00
Répétitions	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Vréf (mg/L)	50,50	24,09	71,43	18,76	67,91	21,42
Limite de répétabilité - r	3,00	1,32	2,53	1,73	5,20	1,85
RSD r (%)	2,10	1,90	1,20	3,30	2,70	3,00
RSD r Horwitz	5,85	6,54	5,55	6,79	5,60	6,6
r Horrat	0,30	0,30	0,20	0,50	0,50	0,50
Limite de reproductibilité - R	9,41	6,09	15,19	6,72	13,09	6,49
RSD R (%)	6,60	9,90	7,50	12,70	6,80	10,70
RSD R Horwitz	8,87	9,91	8,42	10,29	8,48	10,09
R Horrat	0,70	0,90	0,90	1,20	0,80	1,10

Tableau 4 - Magnésium

Paramètres statistiques	Vin blanc 1	Vin blanc 2	Vin rouge 1	Vin rouge 2	Vin doux 1	Vin doux 2
Total	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00
Acceptés	15,00	15,00	14,00	14,00	13,00	14,00
Répétitions	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Vréf (mg/L)	65,30	72,03	82,15	80,01	62,63	65,53
Limite de répétabilité - r	3,43	4,29	10,27	7,25	5,32	2,27
RSD r (%)	1,90	2,10	4,40	3,20	3,00	1,20
RSD r Horwitz	5,63	5,55	5,44	5,46	5,67	5,63
r Horrat	0,30	0,40	0,80	0,60	0,50	0,20
Limite de reproductibilité - R	15,26	16,33	29,80	20,23	15,86	13,74
RSD R (%)	8,30	8,00	12,80	8,90	8,90	7,40
RSD R Horwitz	8,53	8,40	8,24	8,27	8,58	8,53
R Horrat	1,00	1,00	1,60	1,10	1,00	0,90

Tableau 5 - Aluminium

Paramètres statistiques	Vin blanc 1	Vin blanc 2	Vin rouge 1	Vin rouge 2	Vin doux 1	Vin doux 2
Total	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00
Acceptés	10,00	9,00	8,00	8,00	9,00	8,00
Répétitions	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Vréf (mg/L)	0,50	1,19	0,81	1,82	1,65	0,80
Limite de répétabilité - r	0,19	0,11	0,22	0,15	0,15	0,05
RSD r (%)	13,10	3,30	9,40	2,80	3,20	2,10
RSD r Horwitz	11,71	10,29	10,89	9,65	9,79	10,93
r Horrat	1,10	0,30	0,90	0,30	0,30	0,20
Limite de reproductibilité - R	0,42	0,33	0,33	0,46	0,97	0,41
RSD R (%)	29,80	10,00	14,20	8,90	20,80	18,10
RSD R Horwitz	17,75	15,59	16,50	14,61	14,84	16,56
R Horrat	1,70	0,60	0,90	0,60	1,40	1,10

Tableau 6 - Fer

Paramètres statistiques	Vin blanc 1	Vin blanc 2	Vin rouge 1	Vin rouge 2	Vin doux 1	Vin doux 2
Total	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00
Acceptés	6,00	7,00	7,00	6,00	7,00	7,00
Répétitions	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Vréf (mg/L)	2,86	1,71	4,90	4,55	3,03	4,63
Limite de répétabilité - r	0,19	0,06	0,57	0,33	0,21	0,70
RSD r (%)	2,30	1,30	4,10	2,60	2,40	0,50
RSD r Horwitz	9,02	9,74	8,31	8,41	8,94	8,38
r Horrat	0,30	0,10	0,50	0,30	0,30	0,10
Limite de reproductibilité - R	0,20	0,29	0,99	0,34	0,34	2,52
RSD R (%)	2,50	6,10	7,10	2,60	3,90	19,20
RSD R Horwitz	13,66	14,76	12,59	12,74	13,54	12,70
R Horrat	0,20	0,40	0,60	0,20	0,30	1,50

Tableau 7 - Cuivre

Paramètres statistiques	Vin blanc 1	Vin blanc 2	Vin rouge 1	Vin rouge 2	Vin doux 1	Vin doux 2
Total	9,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00
Acceptés	7,00	10,00	8,00	10,00	8,00	10,00
Répétitions	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Vréf (mg/L)	0,04	0,71	0,46	0,12	0,73	0,12
Limite de répétabilité - r	0,03	0,10	0,08	0,05	0,03	0,10
RSD r (%)	24,30	4,80	6,00	14,40	1,70	29,00
RSD r Horwitz	16,95	11,12	11,87	14,62	11,07	14,55
r Horrat	1,40	0,40	0,50	1,00	0,20	2,00
Limite de reproductibilité - R	0,03	0,21	0,09	0,05	0,14	0,10
RSD R (%)	24,30	10,40	6,80	16,40	6,80	30,10
RSD R Horwitz	25,68	16,84	17,98	22,15	16,77	22,05
R Horrat	0,90	0,60	0,40	0,70	0,40	1,40

Tableau 8 – Strontium

Paramètres statistiques	Vin blanc 1	Vin blanc 2	Vin rouge 1	Vin rouge 2	Vin doux 1	Vin doux 2
Total	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00
Acceptés	7,00	7,00	7,00	6,00	7,00	6,00
Répétitions	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Vréf (mg/L)	1,27	0,22	0,28	1,32	1,73	0,22
Limite de répétabilité - r	0,03	0,01	0,04	0,06	0,12	0,00
RSD r (%)	1,00	1,70	5,50	1,70	2,60	0,50
RSD r Horwitz	10,19	13,25	12,76	10,13	9,72	13,30
r Horrat	0,01	0,10	0,40	0,20	0,30	0,00
Limite de reproductibilité - R	0,18	0,07	0,12	0,09	0,24	0,12
RSD R (%)	5,10	11,40	15,30	2,50	5,00	20,00
RSD R Horwitz	15,44	20,08	19,34	15,34	14,73	22,15
R Horrat	0,30	0,60	0,80	0,20	0,30	1,00

Tableau 9 - Barium

Paramètres statistiques	Vin blanc 1	Vin blanc 2	Vin rouge 1	Vin rouge 2	Vin doux 1	Vin doux 2
Total	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00
Acceptés	7,00	8,00	8,00	7,00	8,00	8,00
Répétitions	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Vréf (mg/L)	0,08	0,64	0,12	0,62	0,11	0,34
Limite de répétabilité - r	0,01	0,38	0,01	0,16	0,01	0,06
RSD r (%)	5,70	21,00	3,60	9,20	3,30	6,30
RSD r Horwitz	15,33	11,30	14,52	11,34	14,73	12,41
r Horrat	0,40	1,90	0,20	0,80	0,20	0,50
Limite de reproductibilité - R	0,04	0,38	0,05	0,54	0,05	0,24
RSD R (%)	18,80	21,00	13,90	30,07	15,80	24,50
RSD R Horwitz	23,23	17,12	22,00	17,18	22,32	18,80
R Horrat	0,80	1,20	0,60	1,80	0,70	1,30

Tableau 10 - Manganèse

Paramètres statistiques	Vin blanc 1	Vin blanc 2	Vin rouge 1	Vin rouge 2	Vin doux 1	Vin doux 2
Total	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00
Acceptés	9,00	10,00	9,00	10,00	8,00	8,00
Répétitions	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Vréf (mg/L)	1,84	1,12	1,81	1,10	0,11	1,62
Limite de répétabilité - r	0,09	0,21	0,49	0,14	0,13	0,60
RSD r (%)	1,60	6,50	9,60	4,50	4,60	1,30
RSD r Horwitz	9,64	10,38	9,66	10,41	10,55	9,82
r Horrat	0,20	0,60	1,00	0,40	0,40	0,10
Limite de reproductibilité - R	0,25	0,21	0,49	0,22	0,22	0,38
RSD R (%)	4,80	6,50	9,60	7,10	7,10	8,30
RSD R Horwitz	14,60	15,73	14,63	15,78	15,98	14,88
R Horrat	0,30	0,40	0,70	0,50	0,30	0,60

Tableau 11 - Zinc

Paramètres statistiques	Vin blanc 1	Vin blanc 2	Vin rouge 1	Vin rouge 2	Vin doux 1	Vin doux 2
Total	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00
Acceptés	7,00	8,00	9,00	8,00	7,00	7,00
Répétitions	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Vréf (mg/L)	1,40	2,12	0,95	1,68	1,53	1,18
Limite de répétabilité - r	0,09	0,16	0,22	0,10	0,18	0,05
RSD r (%)	2,40	2,60	8,40	2,20	4,20	1,60
RSD r Horwitz	10,03	9,43	10,65	9,77	9,91	10,30
r Horrat	0,20	0,30	0,80	0,20	0,40	0,20
Limite de reproductibilité - R	0,10	0,39	0,29	0,36	0,22	0,22
RSD R (%)	2,40	6,50	10,70	7,60	5,10	6,70
RSD R Horwitz	15,20	14,28	16,13	14,80	15,01	15,61
R Horrat	0,20	0,50	0,70	0,50	0,30	0,40

2/ Laboratoires participants :
Onze laboratoires ont participés à cette étude collaborative :

- State General Laboratory, NMR Lab, Nicosia Chypre
- ANALAB CHILE S.A., Santiago Chile
- CISTA, National Reference Laboratoty Brno Czech Republic
- Laboratório de Análises- REQUIMTE- FCT/UNL, Caparica Portugal
- Laboratório Central de Análises - Universidade de Aveiro Portugal
- Laboratory of National Center of Alcoholic Beverages Testing, Chisinau Republic of Moldova
- National Research Institute of Brewing, Higashihiroshima Japon
- Instituto Nacional de Vitivinicultura, Laboratorio General, Mendoza Argentine
- LFZ Wein und Obstbau, Klosterneuburg Autriche
- Laboratorio Arbitral Agroalimentario, Madrid Spain
- Laboratoire SCL de Bordeaux-Pessac France

Méthode OIV-MA-AS323-01A Méthodes Type IV

Dosage de l'arsenic dans le vin par spectrometrie d'absorption atomique

(OENO 14/2002 révision par OIV/OENO 377/2009)

1. PRINCIPE

Après avoir évaporé l'alcool éthylique et après réduction de l'arsenic V en arsenic III, l'arsenic du vin est dosé par génération d'hydrure et spectrométrie d'absorption atomique.

2. APPAREILLAGE

2.1. Verrerie :

2.1.1. Fioles jaugées de 50, 100 ml (classe A)
2.1.2. Pipettes jaugées de 1, 5, 10, 25 ml (classe A)

2.2. Bain d'eau à 100°C

2.3. Filtres sans cendres

2.4. Spectrophotomètre :

2.4.1. Spectrophotomètre d'absorption atomique
2.4.2. Paramètres instrumentaux :
2.4.2.1. flamme air-acétylène oxydante
2.4.2.2. lampe à cathode creuse (arsenic)
2.4.2.3. longueur d'onde : 193,7 nm
2.4.2.4. largeur de la fente : 1,0 nm
2.4.2.5. intensité de la lampe à cathode creuse : 7 mA
2.4.2.6. correction de l'absorption non spécifique avec une lampe au deutérium

2.5. Accessoires :

2.5.1. Cellule d'absorption d'hydrure, placée sur le brûleur air-acétylène.
2.5.2. Générateur de vapeur (séparateur gaz-liquide)
2.5.3. Gaz neutre (argon)

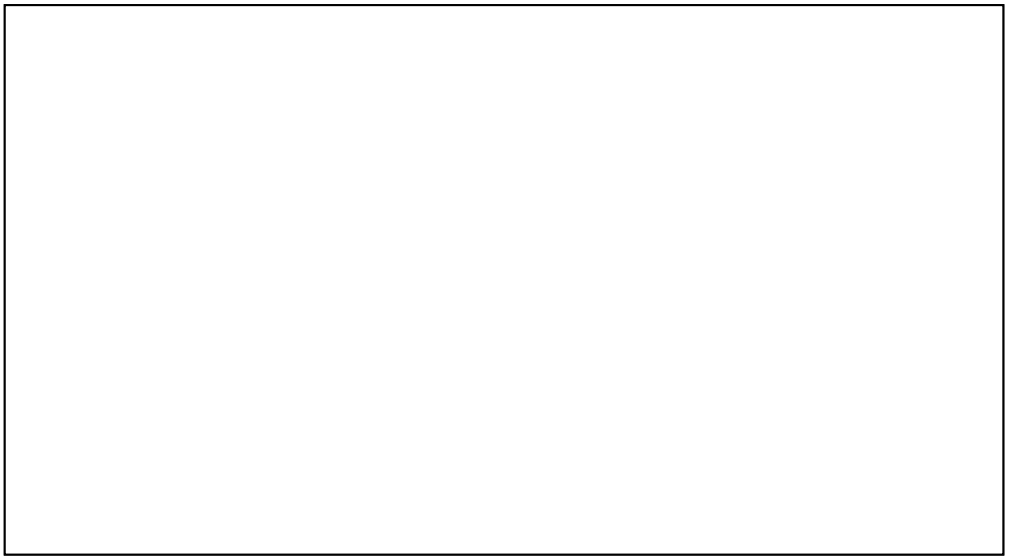


Figure 1. Générateur d'hydrure.

3. REACTIFS

3.1 Eau déminéralisée ultra-pure
3.2 Acide nitrique ultra-pur à 65 %
3.3 Iodure de potassium KI
3.4 Iodure de potassium à 10 % (m/v)
3.5 Acide chlorhydrique concentré (R)
3.6 Acide chlorhydrique à 10 % (R)
3.7 Borohydrure de sodium $NaBH_4$
3.8 Hydroxyde de sodium NaOH
3.9 Borohydrure de sodium à 0,6 % (contenant de l'hydroxyde de sodium : 0,5 % (m/v)
3.10 Chlorure de calcium $CaCl_2$ (utilisé comme desséchant)
3.11 Solution-mère d'arsenic à 1 g/l
Dissoudre 1,5339 g de As_2O_5 dans de l'eau déminéralisée, ajuster à 1 l.
3.12 Solution d'arsenic à 10 mg/l :
Placer 1 ml de la solution-mère (3.11.) dans une fiole de 100 ml (2.1.1.) ; ajouter 1 % d'acide nitrique (3.2.) ; compléter au volume avec de l'eau déminéralisée (3.1.).

3.13 Solution d'arsenic à 100 µg/l :

Placer 1 ml de la solution d'arsenic à 10 mg/l (3.12.) dans une fiole de 100 ml (2.1.1.) ; compléter au volume avec de l'eau déminéralisée (3.1.).

3.14 Gamme d'étalonnage : 0, 5, 10, 25 µg/l

Placer successivement 0, 5, 10, 25 ml de la solution d'arsenic à 100 µg/l (3.13.) dans 4 fioles de 100 ml (2.1.1.) ; ajouter dans chaque fiole 10 ml d'iodure de potassium à 10% (3.4.) et 10 ml d'acide chlorhydrique concentré (3.5.) ; laisser au repos pendant une heure, ajuster à 100 ml avec de l'eau déminéralisée.

4. PREPARATION DES ECHANTILLONS

25 ml de vin sont évaporés sur bain d'eau à 100 °C et ramenés à 50 ml en présence de 5 ml d'iodure de potassium à 10 % et 5 ml d'acide chlorhydrique concentré ; laisser au repos une heure ; filtrer sur un filtre sans cendres.

Faire un blanc analytique.

5. DETERMINATION

La pompe péristaltique aspire la solution de borohydrure, la solution d'acide chlorhydrique à 10 % et l'étalon ou l'échantillon.

Présenter successivement les solutions d'étalonnage (3.14.) ; faire une lecture de l'absorbance pendant 10 secondes ; réaliser deux mesures ; le logiciel de l'appareil établit la courbe d'étalonnage (absorbance en fonction de la concentration en arsenic en µg/l).

Présenter ensuite les échantillons (4) ; le logiciel donne la concentration en arsenic des échantillons en µg/l ; déduire la concentration en arsenic du vin en µg/l en tenant compte de la dilution 1/2 .

6. CONTROLE QUALITE

Le contrôle qualité est effectué en plaçant un échantillon de contrôle qualité interne (*) de façon régulière tous les 5 échantillons, ou bien un après la gamme-étalon, un au milieu de la série et un à la fin des dosages. Une tolérance de deux écarts-types par rapport à la valeur connue est acceptée.

(*) Echantillons du Bureau Communautaire de Référence (B.C.R.) : un vin rouge, un vin blanc sec et un vin blanc doux.

7. BIBLIOGRAPHIE

Varian Techtron, 1972. Analytical methods for flame spectroscopy.

Hobbins B., 1982. Arsenic Determination by Hydride Generation. Varian Instruments at Work.

Le Houillier R., 1986. Use of Drierite Trap to Extend the Lifetime of Vapor Generation Absorption Cell. Varian Instruments at Work.

Varian, 1994. Vapor Generation Accessory VGA-77.

Méthode OIV-MA-AS323-01B Méthodes Type IV

Arsenic

(A34, révision par OIV/OENO 377/2009)

1. Principes des méthodes

Après minéralisation sulfo-nitrique, réduction de l'arsenic V en arsenic III par l'iodure de potassium en milieu chlorhydrique, l'arsenic est transformé en hydrure arsénieux H_3As par action du borohydrure de sodium $NaBH_4$.

L'hydrure arsénieux formé est entraîné par un courant d'azote, dissocié à haute température et dosé par spectrophotométrie d'absorption atomique.

2. Méthode

2.1. *Appareillage*

2.1.1. Fiole de type Kjeldahl en verre borosilicaté.

2.1.2. Spectrophotomètre d'absorption atomique équipé d'une lampe à cathode creuse à l'arsenic, d'un générateur d'hydrures, d'un correcteur de bruit de fond et d'un enregistreur multipotentiométrique.

Le générateur d'hydrures comporte un flacon réacteur (qui peut éventuellement être placé sur un dispositif d'agitation magnétique) relié par une première tubulure à un générateur d'azote (gaz de balayage, débit = 11 l/min.) et, par une deuxième tubulure, à une cellule en quartz qui peut être portée à la température de 900 °C. Le flacon réacteur porte, en outre, une ouverture pour l'introduction du réactif (borohydrure).

2.2. *Réactifs*

Tous les réactifs doivent être de pureté analytique reconnue et, en particulier, exempts d'arsenic. L'eau utilisée doit être de l'eau bidistillée dans un appareil en verre borosilicaté ou de l'eau de pureté équivalente.

2.2.1. Acide sulfurique (ρ_{20} = 1,84 g/ml) exempt d'arsenic.

2.2.2. Acide nitrique (ρ_{20} = 1,38 g/ml) exempt d'arsenic.

2.2.3. Acide chlorhydrique (ρ_{20} = 1,19 g/ml) exempt d'arsenic.

2.2.4. Solution d'iodure de potassium à 10 g pour 100 ml.

2.2.5. Solution de borohydrure de sodium à 2,5 g pour 100 ml obtenue par dissolution de 2,5 g de borohydrure de sodium, $NaBH_4$, dans 100 ml de solution d'hydroxyde de sodium à 4 g pour 100 ml. Cette solution doit être préparée au moment de l'emploi.

2.2.6. Solution de référence d'arsenic à 1 g par litre. Utiliser une solution standard d'arsenic du commerce. Cette solution peut être préparée en

dissolvant dans une fiole jaugée de 1000 ml, 1,320 g de trioxyde d'arsenic III, As_2O_3, dans un volume minimum de solution d'hydroxyde de sodium à 20 g pour 100 ml, acidifier par de l'acide chlorhydrique dilué 1/2 (v/v) et ajuster au trait de jauge avec de l'eau.

2.3. *Mode opératoire*

2.3.1. Minéralisation

Placer 20 ml de vin dans une fiole Kjeldahl, porter à l'ébullition et concentrer le volume au demi, environ, de manière à éliminer l'alcool. Laisser refroidir. Ajouter 5 ml d'acide sulfurique et, lentement, 5 ml d'acide nitrique ; porter à l'ébullition ; dès que le liquide tend à brunir, rajouter, goutte à goutte, de l'acide nitrique, en quantité juste suffisante pour éclaircir le milieu en maintenant une ébullition douce. Poursuivre le chauffage jusqu'à décoloration du milieu et concentration de fumées blanches de trioxyde de soufre au-dessus du liquide de minéralisation.

Laisser refroidir, reprendre une deuxième fois la même opération. Laisser refroidir, diluer le résidu sulfurique par quelques millilitres d'eau distillée, transvaser quantitativement la solution dans une fiole jaugée de 40 ml, ajouter les eaux de rinçage et ajuster au trait de jauge après refroidissement avec de l'eau distillée.

2.3.2. Dosage

2.3.2.1. Préparation de la solution à analyser.

Placer 10 ml de la solution de minéralisation obtenue en 2.3.1. dans le flacon réacteur du générateur d'hydrures, ajouter 10 ml d'acide chlorhydrique, 1,5 ml de solution d'iodure de potassium, brancher l'agitateur magnétique et le courant d'azote (débit : 11 l/min.) ; après 10 s de contact, ajouter 5 ml de solution de borohydrure de sodium. La vapeur d'hydrure produite aussitôt est entraînée par le courant d'azote dans la cellule portée à la température de 900 °C où se produit la dissociation du composé et l'atomisation de l'arsenic.

2.3.2.2. Préparation des solutions de la gamme d'étalonnage.

A partir de la solution de référence d'arsenic, préparer, par dilutions successives, des solutions titrant respectivement 1-2-3-4-5 microgrammes d'arsenic par litre.

Placer dans le flacon réacteur du générateur d'hydrures successivement 10 ml de chacune des solutions préparées et traiter selon le mode opératoire décrit en 2.3.2.1.

2.3.2.3. Mesures

Sélectionner la longueur d'onde 193,7 nm. Régler le zéro de l'échelle des absorbances du spectrophotomètre avec de l'eau bidistillée. Effectuer les déterminations en double. Enregistrer les absorbances mesurées pour la

solution de l'échantillon et les solutions de la gamme d'étalonnage. Calculer la valeur moyenne de l'absorbance pour chacune des solutions.

2.4. *Expression des résultats*

2.4.1. Mode de calcul

Tracer la courbe des variations de l'absorbance en fonction des concentrations en arsenic des solutions de la gamme d'étalonnage. La variation est linéaire. Reporter sur la droite d'étalonnage la valeur moyenne de l'absorbance de la solution analysée. En déduire la concentration C en arsenic.

La concentration du vin en arsenic, exprimée en microgrammes par litre est égale à 2 C.

BIBLIOGRAPHIE

JAULMES P. et HAMELLE G., *Trav. Soc. Pharm. Montpellier,* 1967, **27**, nº 3, 213-225.

JAULMES P., *F.V., O.I.V.,* 1967, nº 238

MEDINA B et SUDRAUD P., *F.V., O.I.V.,* 1983, nº 770.

Méthode OIV-MA-AS323-01C Méthodes Type IV

Arsenic

1. Principes des méthodes

Après minéralisation sulfo-nitrique, réduction de l'arsenic V en arsenic III par le chlorure d'étain II, l'arsenic est transformé en hydrure arsénieux H_3As par action de l'hydrogène naissant. L'hydrure arsénieux est détecté par réaction avec le bromure de mercure II (essai limite).

Le dosage de l'arsenic est réalisé par spectrophotométrie à 520 nm d'un complexe coloré en rouge, formé par action de l'hydrure arsénieux sur le diéthyldithiocarbamate d'argent.

SUPPRIMÉE
(Résolution OIV-Oeno-377-2009)

Méthode OIV-MA-AS323-02A Méthodes Type IV

Azote total

(A40, révision par OIV/OENO 377/2009)

1. Principe

Minéralisation par l'acide sulfurique en présence de catalyseur, alcalinisation des produits de la réaction, distillation de l'ammoniac libéré qui est titré par alcalimétrie.

2. Appareillage

2.1 *Appareil de minéralisation :*

Matras ovoïde à long col de 300 ml posé sur un disque de métal de 15 cm de diamètre, percé d'une ouverture circulaire de 3 cm de diamètre.

Support permettant de maintenir ce matras le col incliné à 45 °.

2.2 *Appareil de distillation:*

L'appareil est constitué par un ballon à fond rond de 1 litre, surmonté d'une petite colonne rectificatrice de 30 cm de long sur 2,5 cm de diamètre, ou tout autre dispositif antiprimage et rectificateur efficace. La vapeur, à la sortie de ce dispositif, pénètre dans la partie supérieure d'un réfrigérant cylindrique, tenu verticalement, de 30 cm de longueur utile et 1 cm de diamètre interne. Le liquide condensé est amené dans la fiole conique réceptrice par un tube effilé touchant le fond de ce récipient. On peut également employer l'appareil à entraînement par la vapeur d'eau, tel que celui qui est décrit au chapitre *Acidité volatile*, ou tout autre appareil répondant aux essais décrits au paragraphe *Essais à blanc et essais témoins*.

3. Réactifs

3.1 Acide sulfurique exempt d'ammoniaque (r_{20} = 1,83 à 1,84g/ml)

3.2 Acide benzoïque

3.3 Catalyseur:

Sulfate de cuivre, $CuSO_4.5H_2O$ ..... 10 g
Sulfate de potassium, K_2SO_4 ..... 100 g

3.4 Lessive d'hydroxyde de sodium à 30 P.100 (m/m) (r_{20} =1,33 g/ml);

3.5 Solution 0,1 M d'acide chlorhydrique

3.6 Indicateur:

Rouge de méthyle ..... 100 mg
Bleu de méthylène ..... 50 mg
Alcool à 50% vol. ..... 100 ml

3.7 Solution d'acide borique :

Acide borique H_3BO_3 ..... 40 g
Eau q.s.p. ..... 1000 ml

Cette solution, additionnée de 5 gouttes de solution de rouge de méthyle, doit devenir rose par addition de 0,1 ml au plus de solution 0,1 M d'acide chlorhydrique.

3.8 Solution de sulfate d'ammonium:

Sulfate d'ammonium $(NH_4)_2SO_4$ ..... 6,608 g
Eau q.s.p ..... 1000 ml

3.9 Tryptophane, $C_{11}H_{12}O_2N_2$, (ce corps contient en théorie 13,72 g d'azote pour 100 g)

4. Mode opératoire

Dans le matras à long col de 300 ml, placer 25 ml de vin, 2 g d'acide benzoïque et 10 ml d'acide sulfurique. Ajouter 2 à 3 g de catalyseur. Chauffer ce matras, le col incliné à 45°, posé sur un disque de métal percé d'un trou de 3 cm de diamètre, jusqu'à décoloration complète, et prolonger ce chauffage pendant 30 min. de plus.

Après refroidissement, verser le contenu du matras dans un ballon de 1 litre où l'on a placé 30 ml d'eau, et rincer le matras à plusieurs reprises avec de l'eau. Après refroidissement du ballon, ajouter 1 goutte de solution de phénolphtaléine à 1 p.100 et une quantité suffisante de lessive d'hydroxyde de sodium à 30 p. 100 pour obtenir une réaction franchement alcaline (40 ml environ), en ayant soin de refroidir constamment le ballon pendant cette addition. Distiller ensuite 200-250 ml en recueillant le distillat dans 30 ml de solution d'acide borique à 40 g/l.

Titrer l'ammoniaque distillé en présence de 5 gouttes d'indicateur à l'aide d'une solution 0,1 M d'acide chlorhydrique.

NOTA. – On peut utiliser l'appareil à entraînement par la vapeur décrit au chapitre Acidité volatile pour obtenir la distillation rapide de l'ammoniac. Dans ce cas placer successivement dans le barboteur 40 à 45 ml de lessive d'hydroxyde de sodium à 30 p. 100, 50 ml d'eau, et le contenu du matras préalablement diluée à 50-60 ml 10 min. avant d'être introduite dans le barboteur.

5. Calculs

Soit *n* le volume d'acide chlorhydrique 0,1 M utilisé. La quantité d'azote total contenu dans le vin est de 0,56 x *n* g/l.

6. Essais à blanc et essais témoins

Tout appareil de distillation permettant de doser avec exactitude l'ammoniac doit satisfaire aux essais suivants :

a) Placer dans le barboteur 40 - 45 ml d'hydroxyde de sodium, 50 ml d'eau, 2 g d'acide benzoïque et 5 g de sulfate de potassium, 10 ml d'acide

sulfurique dilué à 50 ml. Distiller 200 ml en recueillant le distillat dans 30 ml d'acide borique à 40 g/l additionné de 5 gouttes d'indicateur. Le virage de l'indicateur doit être obtenu par 0,1 ml de solution 0,1 M d'acide chlorhydrique.

b) Un essai semblable est fait avec 10 ml de solution 0,1 M de sulfate d'ammonium. Dans ce cas, on doit utiliser entre 10,0 et 10,1 ml de solution 0,1 M d'acide chlorhydrique pour obtenir le virage de l'indicateur.

c) c) L'essai de la méthode complète (minéralisation et distillation) doit être réalisé en utilisant 200 mg de tryptophane; on doit utiliser 19,5 à 19,7 ml d'acide chlorhydrique 0,1 M.

Méthode OIV-MA-AS323-02B Méthodes Type II

Quantification de l'azote total selon la méthode de Dumas (moûts et vins)

(OENO 13/2002 ; OIV-OENO 683-2022)

1. Domaine d'application

La présente méthode s'applique à l'analyse de l'azote total des moûts et des vins jusqu'à 1000 mg/L.

2. Principe

L'analyse de l'azote total se trouvant dans une matrice organique peut-être réalisée par la méthode de Dumas. Celle-ci consiste en une combustion totale de la matrice sous oxygène à une température supérieure à 900°C, suivie d'une oxydation complémentaire. Les oxydes d'azote sont ensuite réduits en diazote, qui est quantifié à l'aide d'un détecteur thermo conductif (catharomètre) après élimination des autres oxydes, des traces d'eau et du dioxyde de carbone.

La nature et le positionnement des pièges varie selon le type de matériel.

3. Réactifs et produits

3.1. Azote (qualité technique) ;
3.2. Hélium de haute pureté pour la GC (par exemple H_2O 3 ppm ; O_2 2 ppm ; C_nH_m 1 ppm ; N_2 5 ppm) ;
3.3. Oxygène de haute pureté pour la GC (par exemple H_2O 3 ppm ; Ar 3 ppm ; C_nH_m 0,2 ppm ; N_2 5 ppm) ;
3.4. Eau déminéralisée (par exemple ISO 3696 type I ou type HPLC) ;
3.5. Oxydant (par exemple oxyde de cuivre [1317-38-0], sesquioxyde de chrome [1308-38-9] ou oxyde cobalto-cobaltique argenté [1308-06-1]) ;
3.6. Réducteur (par exemple cuivre [7440-50-8]) ;
3.7. Déshydratants (par exemple hydroxyde de sodium sur silice ou en mélange en cristaux avec du quartz [1310-73-2], perchlorate de magnésium anhydre [10034-81-8] ou sulfate de calcium [7778-18-9]) ;
3.8. Produit pour gamme étalon (par exemple tris(hydroxyméthyl)aminomethane [77-86-1] ou atropine [51-55-8]) ;
3.9. Contrôle qualité interne (par exemple chlorhydrate d'acide glutamique [138-15-8], ou échantillon issu d'un programme d'intercomparaison entre laboratoires).

4. Appareillage

4.1. Centrifugeuse ;
4.2. Bain à ultrasons ;
4.3. Analyseur d'azote éventuellement équipé d'un passeur d'échantillons ;
4.4. Balance de précision entre 0,5 mg et 30 g à ± 0,01 mg.

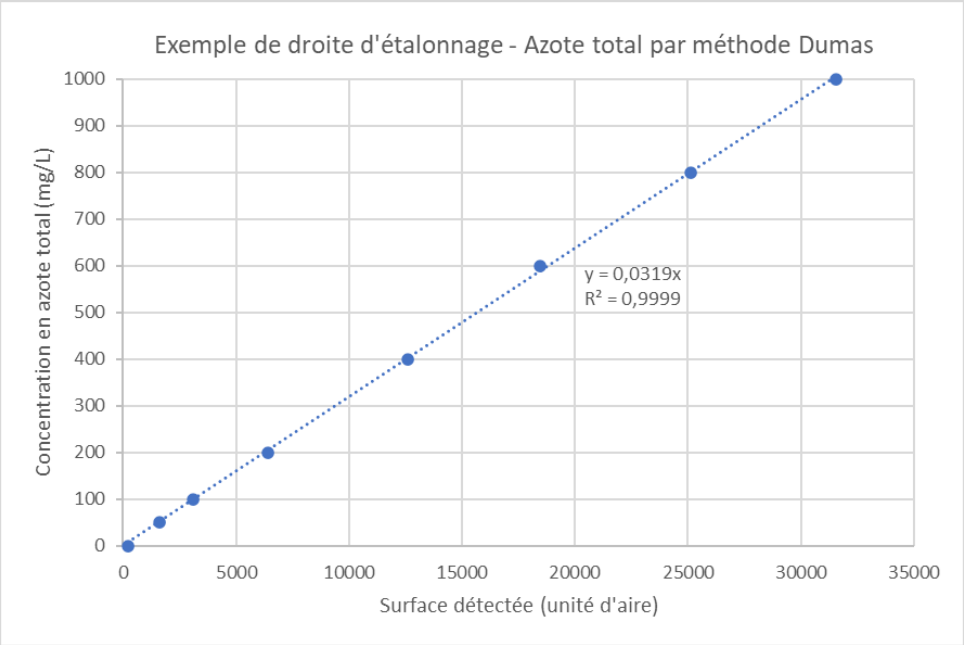
5. Echantillonnage

Si l'échantillon contient des quantités notables de dioxyde de carbone, réaliser un dégazage, par exemple par barbotage à l'azote (3.1) pendant 5 à 10 min ou à l'aide d'un bain à ultrasons (4.2). Les moûts sont centrifugés (4.1).

6. Mode opératoire

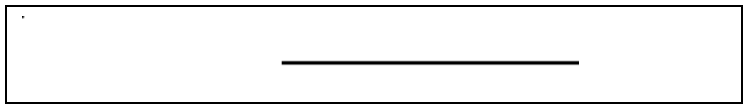
6.1. Préparation de la gamme étalon (à titre d'exemple)

A partir d'une solution à 1 g N/L, préparer des échantillons de TRIS (3.8) à 800, 500, 250, 100 et 50 mg N/L. La courbe étalon passe donc par 7 points, depuis un blanc jusqu'à la solution à 1 g N/L en suivant un modèle linéaire. Elle est enregistrée dans la méthode de l'appareil. Repasser l'étalon à 500 mg N/L en début de séquence analytique et à chaque fois que nécessaire pour ajuster l'appareil.



6.2. Préparation des autocontrôles (à titre d'exemple)

Les autocontrôles sont passés régulièrement en début et au milieu d'une série d'analyses. Ils peuvent être réalisés à l'aide d'acide glutamique sous forme de chlorhydrate (3.9) utilisé sous forme de solutions à 150, 300 et 600 mg N/L dans de l'eau déminéralisée (3.4).



Avec :

- la concentration d'acide glutamique dans la solution, exprimée en g/L ;
- la concentration d'azote dans la solution, exprimée en g/L ;
- la masse molaire de l'acide glutamique. = 183,59 g/mol ;
- la masse molaire de l'azote. M_N= 14,007 g/mol.

Peser (4.4) 7,864 g d'acide glutamique (3.9) et le diluer dans l'eau déminéralisée (3.4) pour obtenir 1L d'une solution à 600 mg N/L. Réaliser une dilution au demi en transférant 250 mL de cette solution et en ajoutant 250 mL d'eau déminéralisée, pour obtenir une solution à 300 mg N/L. Répéter l'opération avec 250 mL de la solution à 300 mg N/L dans 500 mL pour obtenir une solution à 150 mg N/L.

6.3. Préparation des échantillons

Peser (à 0,01 mg près) le volume défini pour l'analyse de moût ou vin avec la balance de précision (4.4). Les placer sur l'appareil en attente d'analyse.

6.4. Analyse des échantillons

Effectuer l'analyse des étalons et des échantillons selon les instructions du constructeur de l'appareil.

7. Expression des résultats

Ils sont exprimés en mg/L d'azote sans chiffre significatif après la virgule.

8. Fidélité

Nombre de laboratoires	teneur moyenne	Répétabilité r	Reproductibilité R
11	591 mg/L	43 mg/L	153 mg/L

9. Bibliographie

- DUMAS, A.: *Annales de chimie*, vol. 33, 1826, p.342.
- Buckee, G. K.: *Determination of total nitrogen in Barley, Malt and Beer by Kjeldahl procedures and the Dumas combustion method*, Collaborative trial. J. Inst. Brew., vol. 100, 1994, pp. 57-64.
- ISO 3696: Eau pour laboratoire à usage analytique - Spécification et méthodes d'essai.
- Manuel d'utilisation du constructeur de l'appareil, ou équivalent.

Méthode OIV-MA-AS323-03 Méthodes Type IV

Bore

Méthode colorimétrique rapide

(A44, révision par OIV/OENO 377/2009)

1. Principe

Après concentration au demi pour chasser l'alcool, le vin est passé sur une colonne de plyvinylpolypyrollidone qui retient les matières colorantes. Sur une fraction de l'éluat quantitativement recueilli, le bore est dosé à 420 nm grâce au complexe coloré en jaune qu'il donne avec l'azométhine H à pH 5,2.

2. Appareillage

2.1. Evaporateur rotatif.

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

2.3. Cuves de 1 cm de trajet optique.

2.4. Colonne de verre d'un diamètre intérieur de 1 cm et de 15 cm de haut contenant sur une hauteur de 8 cm environ de la polyvinylpolypyrrolidone.

3. Réactifs

3.1. Azométhine H (acide-4-hydroxy-5-(2-hydroxybenzylideneamino)-napthalène-2,7-disulfonique);

3.2. Solution d'azométhine H

Peser 1 g d'azométhine H et 2 g d'acide of ascorbique et les diluer avec 50 ml d'eau bidistillée. Tiédir pour faire dissoudre puis compléter à 100 ml dans un ballon jaugé. Le réactif est stable 2 jours si on le conserve au froid.

3.3. Solution tampon, pH 5,2.

Dissoudre 3 g d'E.D.T.A. (sel disodique de l'acide éthylènediamine-tetraacétique) dans 150 ml d'eau distillée. Ajouter 125 ml d'acide acétique (r_{20} = 1,05 g/ml) et dissoudre 250 g d'acétate d'ammonium, (NH_4CH_3COO). Vérifier le pH au pH-mètre et l'ajuster, si nécessaire à pH 5,2.

3.4. Solution étalon de bore à 100 mg/l

Utiliser une solution standard du commerce. Cette solution peut être préparée en dissolvant 0,571 g d'acide borique H_3BO_3, préalablement desséché à 50 °C jusqu'à poids constant, dans 500 ml d'eau bidistillée. Compléter au litre.

3.5. Solution étalon de bore à 1 mg/l

Diluer au 1/100ème la solution étalon à 100 mg/l avec de l'eau bidistillée.

3.6. Polyvinylpolypyrrolidone ou PVPP (Voir *Codex œnologique international*).

4. Mode opératoire

Éliminer l'alcool de 50 ml de vin par concentration au demi dans un évaporateur rotatif à 40 °C. Ramener à 50 ml avec de l'eau bidistillée.

Prélever 5 ml de cette solution et les faire passer sur la colonne de PVPP.

La matière colorante est totalement fixée. Recueillir l'éluat et les eaux de rinçage de la colonne dans un ballon jaugé de 50 ml. L'éluat obtenu est du vin dilué au $^1/_{10}$.

Le dosage colorimétrique s'effectue sur un volume de 5 ml d'éluat, placé dans un ballon jaugé de 25 ml; diluer à 15 ml environ avec de l'eau bidistillée et ajouter en agitant après chaque addition :

5 ml de solution d'azométhine H;
4 ml de solution tampon pH 5,2.

Compléter à 25 ml avec de l'eau bidistillée.

Attendre 30 min. et déterminer l'absorbance A_s, à 420 nm, le zéro de l'échelle des absorbances étant réglé sur l'eau distillée.

Faire un blanc en portant à 25 ml les mêmes volumes de réactifs. Attendre 30 min. et lire l'absorbance A_b dans les mêmes conditions. Elle doit être comprise entre 0,20 et 0,24; une absorbance supérieure signifie un apport de bore par l'eau ou les réactifs.

Établissement de la droite d'étalonnage :

Dans une série de ballons jaugés de 25 ml, placer de 1 à 10 µg de bore soit 1 à 10 ml de solution de bore à 1 mg/l et continuer comme il est indiqué ci-dessus. La courbe représentative de la variation de (A_s-A_b) en fonction de la concentration est une droite passant par l'origine.

A_s = absorbance de l'échantillon
A_b = absorbance du blanc

5. Calculs

Soit E µg de bore contenus dans 5 ml d'éluat, correspondant à 0,5 ml de vin, obtenu en reportant la différence (A_S - A_b) déterminée pour l'échantillon sur la courbe d'étalonnage. La teneur en milligrammes de bore par litre est :

$$\text{B mg/L} = \frac{E}{0,5}$$

BIBLIOGRAPHIE

WOLF B., *Soil Science and Plant Analysis*, 1971, **2**(5), 363-374 et 1974, **5**(1), 39-44.

CHARLOT C. et BRUN S., *F.V., O.I.V.*, 1983, n°771.

Méthode OIV-MA-AS323-04A1 Méthodes Type IV

Dioxyde de soufre libre

OIV/OENO 377/2009
OIV-OENO 591A-2018 ;
OIV-OENO 661/2021

1 Domaine d'application

Cette méthode permet de déterminer le dioxyde de soufre libre dans les moûts et les vins.

2 Définitions

On appelle dioxyde de soufre libre, le dioxyde de soufre présent dans le moût ou le vin sous les formes suivantes : H_2SO_3, HSO_3, dont l'équilibre est fonction du pH et de la température :

$$H_2SO_3 \rightleftharpoons H^+ + HSO_3^-$$

H_2SO_3 représente le dioxyde de soufre moléculaire.

3 Principe

Le dioxyde de soufre est entraîné par un courant d'air ou d'azote ; il est fixé et oxydé par barbotage dans une solution diluée et neutre de peroxyde d'hydrogène. L'acide sulfurique formé est dosé par une solution titrée d'hydroxyde de sodium.
La quantité de dioxyde de soufre entraîné étant fortement dépendante de la température, il a été décidé de travailler à température ambiante (entre 18 et 24°C). Cette température, de même que les flux d'air ou d'azote, doivent être maintenus constants tout au long du dosage.

4 Réactifs et produits

4.1 Acide phosphorique pur à 85% (ρ_{20} = 1,71 g/mL) (CAS 7664-38-2)
4.2 Acide phosphorique dilué (~25,5%):
A titre indicatif : Diluer 300 mL d'acide phosphorique 85% (4.1) dans 1 L d'eau pour usage analytique
4.3 Réactif indicateur :

Rouge de méthyle (CAS 493-52-7)	100 mg (± 1 mg)
Bleu de méthylène (CAS 7220-79-3)	50 mg (± 0.5 mg)
Ethanol (≥ 95%) (CAS 64-17-5)	50 mL

Compléter à 100 mL avec de l'eau pour usage analytique. Respecter les proportions pour des volumes différents de 100 mL.
Les réactifs indicateurs commerciaux avec la même composition peuvent être utilisés
4.4 Hydroxyde de sodium 1 M (3.84%) ou anhydre (pellets) (CAS 1310-73-2)
4.5 Solution 0,01 M d'hydroxyde de sodium:
A titre indicatif : Diluer 10,0 mL d'hydroxyde de sodium 1 M (4.4) dans 1L d'eau pour usage analytique.
Si nécessaire, contrôler régulièrement le titre de la solution (facteur de correction à appliquer) et la conserver à l'abri du CO_2 atmosphérique
4.6 Solution de peroxyde d'hydrogène à 3 volumes (=9,1 g/L = 0,27 mol/L d'H_2O_2) préparée ou commerciale (par exemple, H_2O_2 30% : CAS, mixture 7722-84-1)
Remarque : Une solution à 30% en masse correspond à un titre de 110 volumes ($\rho_{20} \cong 1{,}11$ g/mL), soit le volume d'oxygène dégagé idéalement par litre d'H_2O_2 dans des conditions standards de température et pression, tandis qu'une solution à 3% en masse ($\rho_{20} \cong 1$ g/mL) correspond à un titre de 10 volumes (0,89 mol/L). La préparation va donc dépendre de la solution commerciale utilisée, sachant que de toute façon le volume employé dans la méthode sera en excès.

5 Appareillage

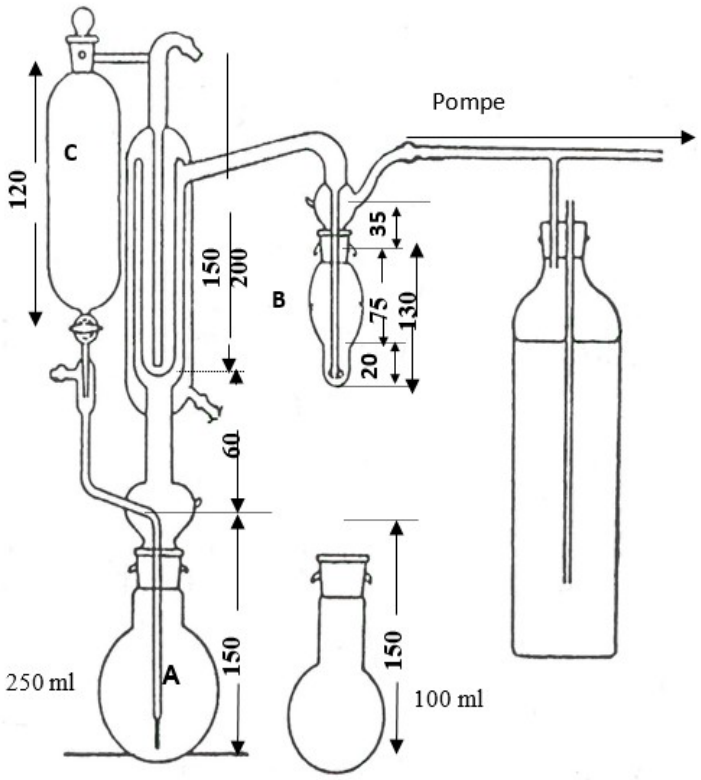
L'appareil utilisé doit être conforme au schéma ci-dessous, particulièrement en ce qui concerne le réfrigérant.

Le tube d'amenée des gaz dans le barboteur B est terminé par une petite sphère de 1 cm de diamètre comportant sur sa plus grande circonférence horizontale 20 trous de 0,2 mm de diamètre. On peut également le terminer par une plaque de verre fritté assurant la formation d'un grand nombre de très petites bulles réalisant un bon contact entre les phases gazeuse et liquide.

Le débit gazeux dans l'appareil doit être de 40 L/h environ. Le flacon placé à la droite de l'appareil est destiné à limiter la réduction de pression produite par la trompe à eau à 20 à 30 cm d'eau. Pour pouvoir régler cette réduction de pression de manière que le débit soit correct, il y a avantage à placer un débitmètre à tube semi-capillaire entre le barboteur et le flacon.

Le ballon A doit être maintenu à une température comprise entre 18 et 24°C pendant toute la distillation. A chacun de s'équiper en conséquence si la température ambiante du laboratoire ne se situe pas dans ces limites ou si l'on fait usage d'acide phosphorique 85% qui peut augmenter fortement la température dans le ballon lors de l'ajout (par ex. utiliser un bain thermostaté).

Figure 1 - Les dimensions sont indiquées en millimètres. Les diamètres internes des 4 tubes concentriques qui constituent le réfrigérant sont: 45, 34, 27 et 10 mm



6 Mode opératoire

Il est conseillé de rincer l'appareil à l'air ou à l'azote avant chaque nouveau dosage (par exemple pendant 5 minutes). Si un essai à blanc est effectué, la couleur de l'indicateur dans l'eau oxygénée neutralisée à la sortie du tube d'amenée ne doit pas changer.

- Brancher l'eau du réfrigérant
- Contrôler la température du laboratoire ou pré-équilibrer le bain (entre 18 et 24°C)
- Dans le barboteur B de l'appareil à entraînement introduire 2-3 mL de solution de peroxyde d'hydrogène (4.6), 2 gouttes de réactif indicateur (4.3) et

neutraliser par la solution 0,01 M d'hydroxyde de sodium (4.5) ; pH neutre= couleur verte.

Remarque : Pour de grandes séries d'échantillons, il est aussi possible de préparer une solution de H_2O_2 déjà neutralisée avant de l'introduire dans le ballon. Adapter les concentrations et les volumes en conséquence, sachant qu'il faut maintenir le pouvoir oxydatif de la solution (durée de conservation réduite).

- Adapter ce barboteur à l'appareil.
- Dans le ballon A de 250 mL, introduire 50 mL d'échantillon et le fixer à l'appareil.
- Dans l'ampoule C, introduire 15 mL d'acide phosphorique dilué (4.2)
  Remarque : Si la concentration attendue en dioxyde de soufre libre est supérieure à 50 mg/L, il peut être nécessaire d'utiliser de l'acide phosphorique à 85% (4.1). Veiller toutefois à ce que la température dans le ballon A n'augmente pas pendant l'ajout.
- Ouvrir le robinet pour rajouter l'acide à l'échantillon, et dans le même temps démarrer le courant de gaz et la minuterie, réglée sur 15 minutes. Le dioxyde de soufre libre entraîné est oxydé en acide sulfurique.
- Après 15 minutes, retirer le barboteur B et rincer à l'eau le tube d'amenée de gaz (à partir du rodage).
- Titrer l'acide formé par la solution d'hydroxyde de sodium 0,01 M (4.5) jusqu'au virage vert.

Soit *n* le nombre de millilitres versés.

7 Calcul et expression des résultats

Le dioxyde de soufre libre est exprimé en milligrammes par litre (mg/L) sans décimale

Calcul : Dioxyde de soufre libre en milligrammes par litre : 6,4 *n*

8 Bibliographie

PAUL F., *Mitt. Klosterneuburg, Rebe u. Wein,* 1958, ser. A, 821.

Mitt. Klosterneuburg, Rebe u. Wein, 1958, ser. A, 821.

Etude collaborative
Validation du dosage du dioxyde de soufre libre méthode

1.Domaine d'application

Etude collaborative internationale selon la résolution OIV ŒNO 6/2000, pour la validation des mises à jour des méthodes dioxyde de soufre libre et dioxyde de soufre total OIV-MA-AS323-04A, selon la décision de la sous-commission aux méthodes d'analyse de l'OIV, avril 2018.

2.Références normatives

- Mise à jour (projet) des méthodes OIV-MA-AS323-04A.
- ISO 5725
- Résolution OIV ŒNO 6/2000

3.Protocole

20 échantillons ont été constitués à partir de volumes homogènes de 10 vins, issus de diverses régions viticoles de la France et du France. Chaque échantillon a été présenté deux fois, sous anonymat, selon le principe du double aveugle.

Les échantillons ont été préparés entre le 18 et le 20 juin 2018, puis expédiés sans délais aux laboratoires participants.

N° échantillon	N° anonymat (double aveugle)	Nature de l'échantillon
A	1 -14	Vin blanc sec
B	2- 16	Vin blanc sec
C	3 – 19	Vin rosé sec
D	4 – 12	Vin rosé sec
E	5 – 20	Vin rouge sec
F	6 – 18	Vin rouge sec
G	7 – 11	Vin rouge sec
H	8 – 15	Vin de liqueur blanc
I	9 – 17	Vin de liqueur rouge
J	10 – 13	Vin de liqueur rouge

Les analyses ont été réalisées simultanément par tous les laboratoires participants entre le 16 et le 20 juillet 2018. Les échantillons ont été conservés en enceintes réfrigérées par tous les laboratoires entre la date de réception et celle d'analyse, conformément au protocole transmis.

Les laboratoires suivants ont rendu leurs résultats :

Laboratoire	Ville	Pays
Estación de Viticultura e Enoloxía de Galicia	Leiro (Ourense)	Espagne
Laboratorio arbitral agroalimentario	Madrid	Espagne
ASAE	Lisboa	Portugal
SCL Montpellier	Montpellier cedex 5	France
HBLA und BA für Wein- und Obstbau	Klosterneuburg	Autriche
Laboratorio de Salud Publica	Madrid	Espagne
Laboratorio Agroambiental de Zaragoza	Zaragoza	Espagne
Laboratoire SCL Bordeaux	Pessac decex – CS 98080	France
Unione Italiana Vini Servizi	Verona	Italie
Laboratorio Agroalimentario de Valencia	Burjassot (Valencia)	Espagne
Agroscope	Nyon	Suisse
Laboratoires Dubernet	Montredon des Corbières	France
Laboratoire Dioenos Rhône	Orange	France
Laboratoire Natoli	Saint Clément de Rivière	France

NB : l'ordre des laboratoires dans ce tableau ne correspond pas avec l'ordre des tableaux suivants, afin de préserver l'anonymat des résultats.

4.Dioxyde de soufre libre

5. Données SO_2 libre

SO_2 libre (mg/L)	A		B		C		D		E		F		G		H		I		J	
Ech	**1**	**14**	**2**	**16**	**3**	**19**	**4**	**12**	**5**	**20**	**6**	**18**	**7**	**11**	**8**	**15**	**9**	**17**	**10**	**13**
Labo 3			31	36	18	18	21	23	20	18	6	6	20	17	5	6				
Labo 5			37	35	21	24	24	25	20	20	8	7	20	20	3	4				
Labo 6	4	1	38	33	21	20	20	26	19	20	7	6	21	19	7	8	1	3	1	1
Labo 7	1	1	37	40	20	22	24	26	20	22	9	8	20	23	8	8	2	1	1	1
Labo 8			31	32	18	19	23	22	22	20	6	7	19	20	5	3	1	1		
Labo 9			35	34	23	19	25	24	21	24			17	17						
labo10	2	1	35	34	20	21	24	24	22	21	9	8	21	20	7	7	2	2	1	1
labo 11	0	0	33	30	17	11	22	16	16	21	6	4	15	19	6	3	1	1	0	0
Labo 15			15	19	15	13	18	20	8	16	6	5	8	15	5	5				
labo 17	0	0	37	38	24	26	28	28	26	23	8	8	24	22	7	7	1	2	0	0
Labo 18	0	4	33	31	21	11	23	27	15	19	6	4	9	20	3	4	1	1	0	0
Labo 20	0	0	32	32	20	19	21	21	29	21	8	8	20	18	12	4	1	1	0	0
Labo 21	2	1	33	38	19	15	25	22	19	21	6	6	19	20	8	7	2	1	0	0

Les résultats non renseignés ont été rendus non quantifiables (< limite quantification)

Résultat retiré par le test de COCHRAN à 5%

Résultat retiré par le test de GRUBBS à 5%

6. Résultats SO_2 libre

SO_2 libre (mg/L)	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**	**G**	**H**	**I**	**J**
Nb laboratoires retenus	7	9	11	10	10	12	11	11	9	8
Nb répétitions	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Min	0	31,5	14	19	17	5	17	3,5	1	0
Maxi	2,5	38,5	25	28	24,5	8,5	23	8	2	1
moyenne	0,9	34,2	19,8	23,4	20,6	6,8	19,6	5,7	1,4	0,4
Ecart type	0,98	2,67	2,91	2,46	2,04	1,31	1,77	1,72	0,42	0,52
Variance répétabilité	0,79	1,67	2,59	1,20	2,60	0,58	2,23	0,82	0,39	0,00
Ecart-type interlaboratoire	0,98	2,67	2,91	2,46	2,04	1,31	1,77	1,72	0,42	0,52
Variance de reproductibilité	1,35	7,97	9,76	6,64	5,46	2,00	4,25	3,38	0,37	0,27
Ecart type répétabilité	0,89	1,29	1,61	1,10	1,61	0,76	1,49	0,90	0,62	0,00
limite r	2,48	3,61	4,51	3,07	4,51	2,14	4,18	2,53	1,75	0,00
CV % répétabilité (k=2)	191	8	16	9	16	23	15	32	90	0
Ecart type reproductibilité	1,16	2,82	3,12	2,58	2,34	1,41	2,06	1,84	0,61	0,52
Limite R	3,25	7,90	8,75	7,22	6,54	3,96	5,78	5,15	1,70	1,45
CV % Reproductibilité (k=2)	**250**	**16**	**32**	**22**	**23**	**42**	**21**	**64**	**87**	**276**
Horwitz PRSDR %	16,18	9,40	10,21	9,95	10,15	12,00	10,22	12,30	15,23	18,55
SR Horwitz	0,15	3,22	2,02	2,33	2,09	0,81	2,00	0,70	0,21	0,07
R Horwitz	0,42	9,10	5,71	6,59	5,91	2,29	5,67	1,99	0,60	0,20
Horwitz ratio	7,64	0,87	1,53	1,10	1,11	1,73	1,02	2,58	2,84	7,37

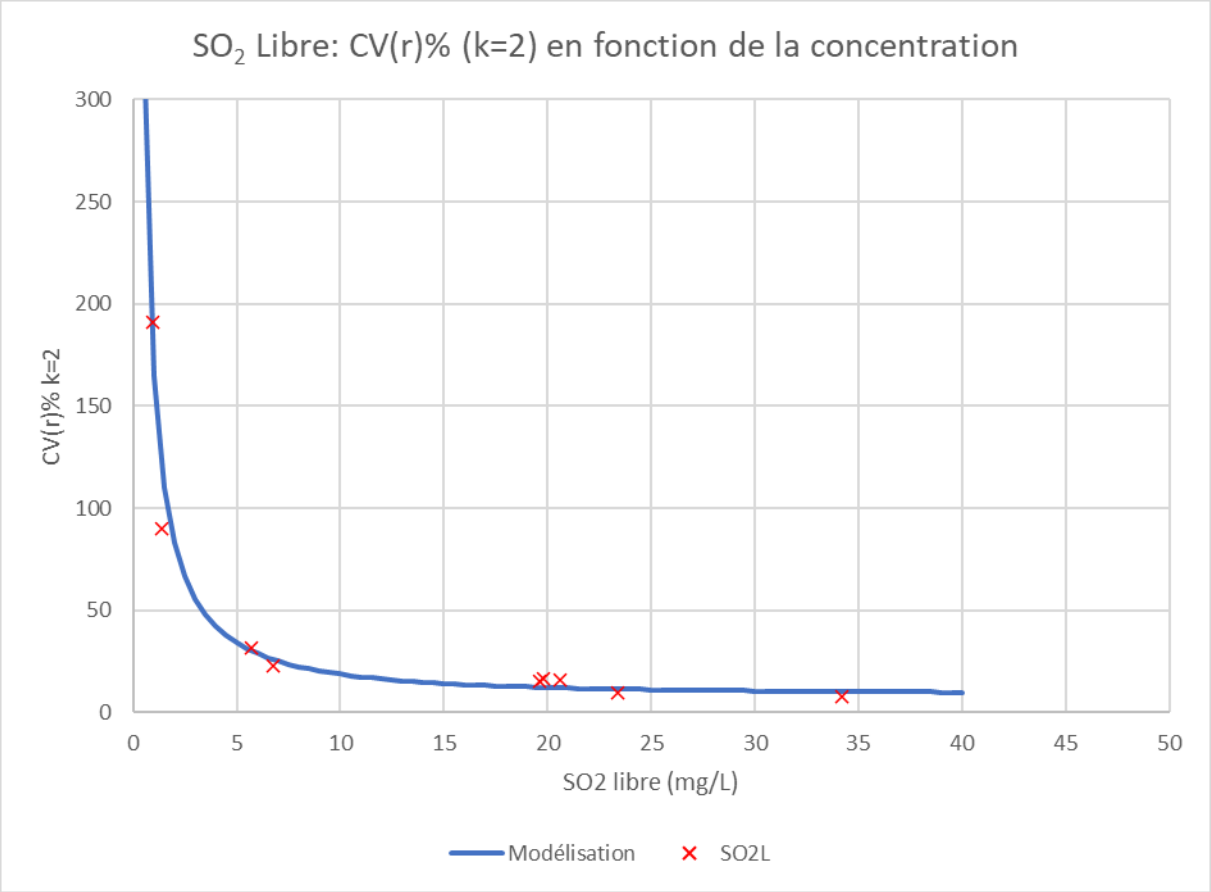


Figure 1 : Modélisation du coefficient de variation de la répétabilité CV(r)% (k=2) en fonction de la concentration C

$$CV(r)\% = \sqrt{\frac{164{,}55^2}{C^2} + 9^2}$$

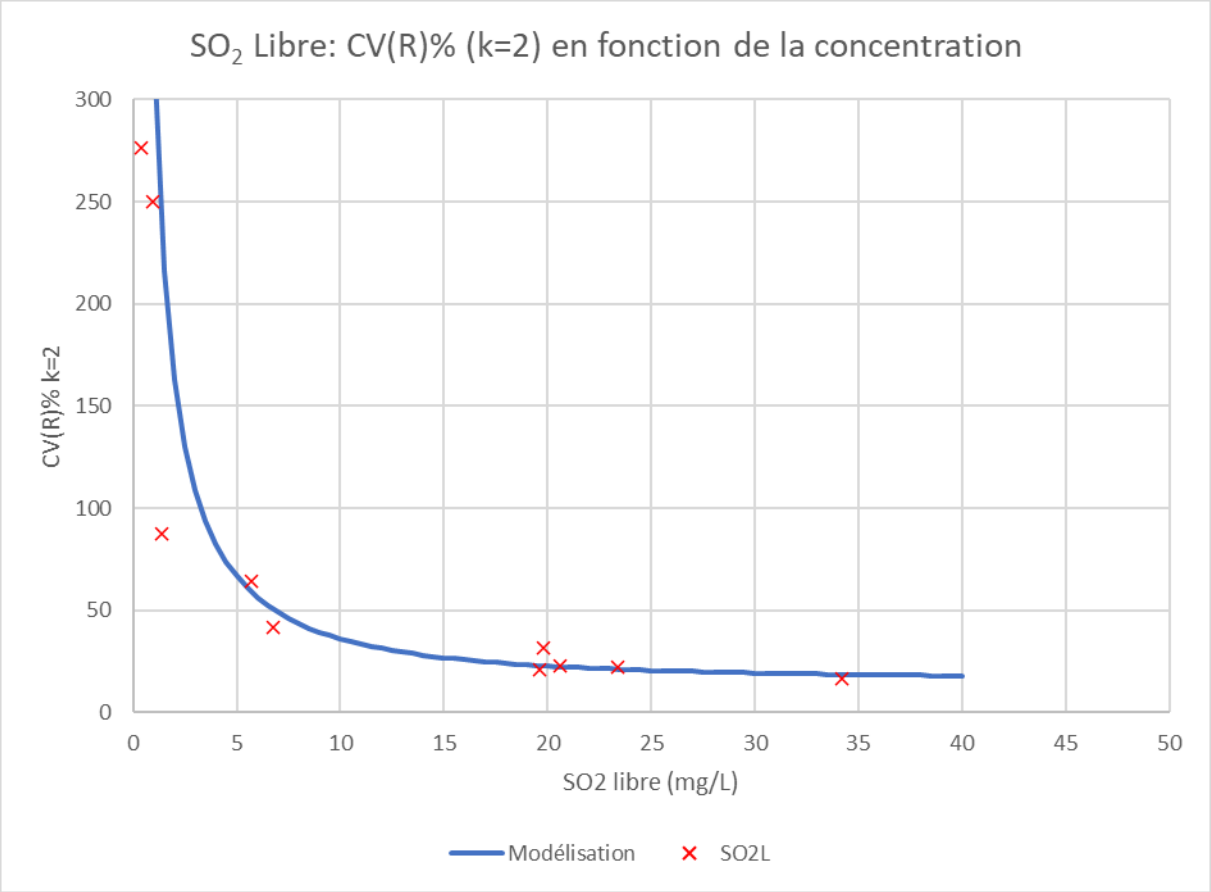


Figure 2 : Modélisation du coefficient de variation de la reproductibilité interlaboratoire $CV_R\%$ (k=2) en fonction de la concentration C

$$CV(R)\% = \sqrt{\frac{323{,}6^2}{C^2} + 16^2}$$

7.Dioxyde de soufre total

8. Données SO_2 total

SO_2 total (mg/L)	A		B		C		D		E		F		G		H		I		J	
Ech	**1**	**14**	**2**	**16**	**3**	**19**	**4**	**12**	**5**	**20**	**6**	**18**	**7**	**11**	**8**	**15**	**9**	**17**	**10**	**13**
Labo 3			128	127	72	73	128	131	61	59	28	28	57	56	102	102	47	45		
Labo 5			122	121	68	71	112	114	42	53	22	22	51	42	102	101	35	34		
Labo 6		1	128	131	72	72	126	131	53	54	22	20	42	49	98	99	31	34	3	1
Labo 7	3	3	131	131	70	74	130	131	54	59	26	23	46	48	106	101	37	40	1	1
Labo 8	2	1	125	127	72	72	129	128	58	57	22	23	46	45	97	99	42	39	1	1
Labo 9			120	128	77	75	132	108	71	59	21	25	44	47	110	99	38	48		
Labo10	2	2	130	130	74	76	130	130	61	61	28	32	55	56	103	104	43	44	3	4
Labo 11	4	3	119	125	71	74	118	118	39	40	18	21	45	41	89	94	26	38	2	2
Labo 14	3	3	129	128	72	72	127	129	58	58	32	29	50	49	102	101	42	41	3	4
Labo 15			134	136	76	78	134	136	60	58	39	27	52	61	110	106	51	50		
Labo 17	3	3	134	132	82	76	136	133	59	50	24	23	46	44	107	105	35	38	0	0
Labo 18	5	3	130	129	78	73	133	133	62	59	29	32	58	52	105	105	50	48	2	2
Labo 20	1	1	128	131	72	74	130	130	58	56	26	28	48	45	98	93	41	43	0	0
Labo 21		0	124	125	69	72	124	126	45	51	19	20	42	42	97	97	35	34	0	1

Les résultats non renseignés ont été rendus non quantifiables (< limite quantification)

Résultat retiré par le test de COCHRAN à 5%

Résultat retiré par le test de GRUBBS à 5%

5.2 Résultats SO_2 total

SO_2 total (mg/L)	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**	**G**	**H**	**I**	**J**
Nb laboratoires retenus	7	12	13	13	8	13	10	13	12	9
Nb répétitions	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Min	1	121,5	69,5	113	53,5	19,5	42	91,5	32,5	0
Maxi	3,5	135	77	135	61	30,5	56,5	108	50,5	3,5
moyenne	2,4	128,8	73,0	128,0	58,3	24,7	47,6	100,9	40,8	1,5
Ecart type	0,93	3,63	2,20	6,24	2,42	4,04	4,89	4,61	5,80	1,35
Variance répétabilité	0,14	1,46	3,27	2,35	1,44	3,04	2,30	3,96	2,21	0,17
Ecart-type interlaboratoire	0,93	3,63	2,20	6,24	2,42	4,04	4,89	4,61	5,80	1,35
Variance de reproductibilité	0,94	13,93	6,49	40,11	6,57	17,84	25,03	23,28	34,72	1,90
Ecart type répétabilité	0,38	1,21	1,81	1,53	1,20	1,74	1,52	1,99	1,49	0,41
limite r	1,1	3,4	5,1	4,3	3,4	4,9	4,2	5,6	4,2	1,1
CV % répétabilité (k=2)	31	2	5	2	4	14	6	4	7	54
Ecart type reproductibilité	0,97	3,73	2,55	6,33	2,56	4,22	5,00	4,82	5,89	1,38
Limite R	2,7	10,5	7,1	17,7	7,2	11,8	14,0	13,5	16,5	3,9
CV % Reproductibilité (k=2)	**80**	**6**	**7**	**10**	**9**	**34**	**21**	**10**	**29**	**184**
Horwitz PRSDR %	14,00	7,70	8,39	7,71	8,68	9,87	8,95	7,99	9,16	15,05
SR Horwitz	0,34	9,92	6,13	9,86	5,06	2,44	4,26	8,06	3,73	0,23
R Horwitz	0,96	28,05	17,33	27,90	14,31	6,91	12,04	22,80	10,56	0,64
Horwitz ratio	2,82	0,37	0,41	0,64	0,50	1,71	1,16	0,59	1,56	6,04

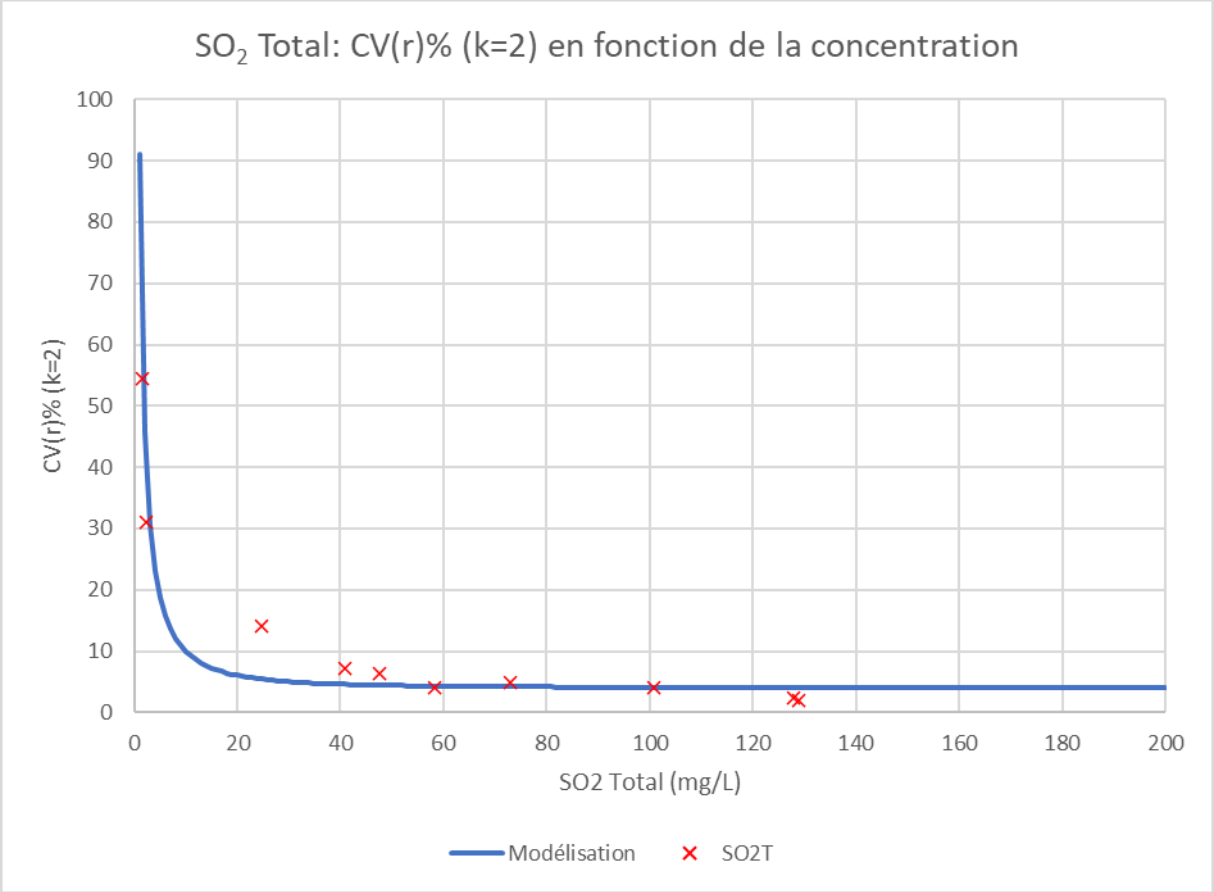


Figure 3 : Modélisation du coefficient de variation de la répétabilité CV(r)% (k=2) en fonction de la concentration C

$$CV(r)\% = \sqrt{\frac{91^2}{C^2} + 4^2}$$

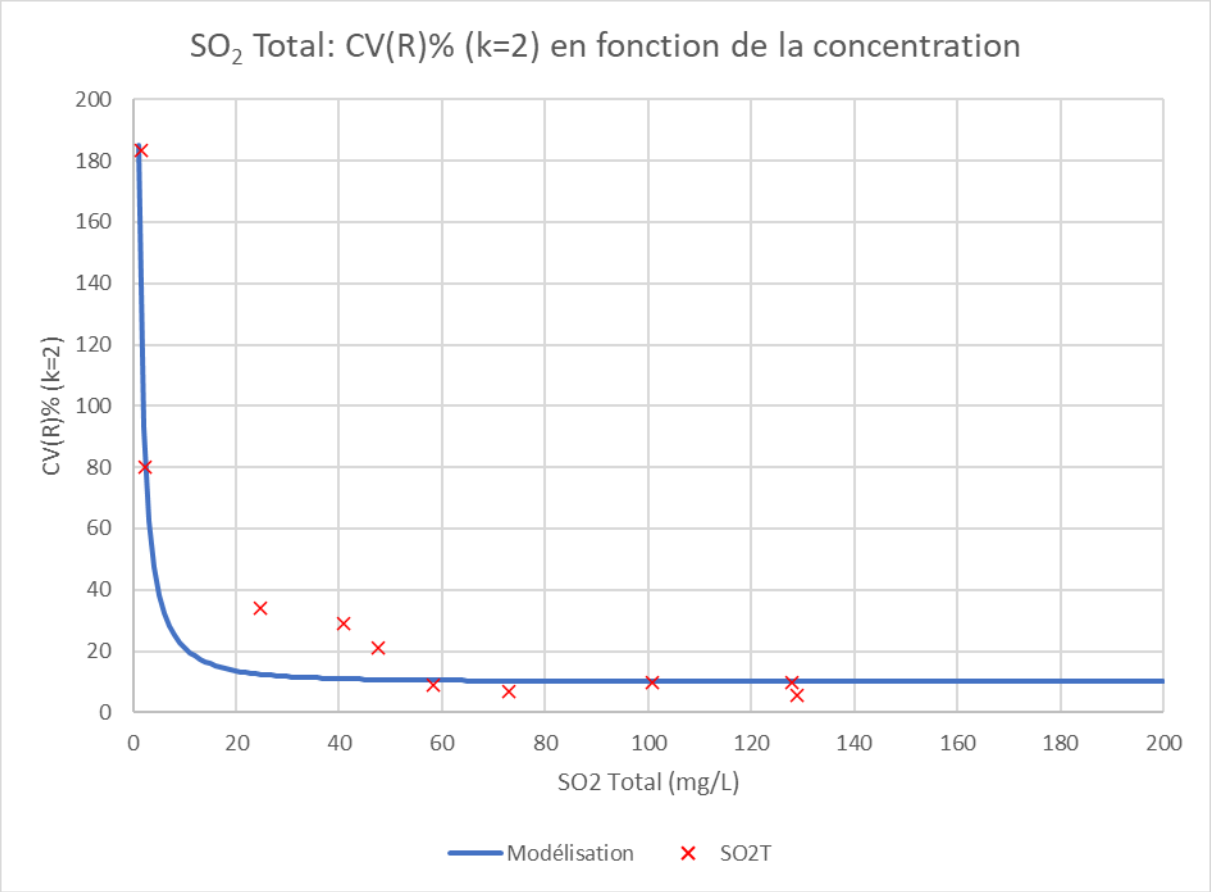


Figure 4 : Modélisation du coefficient de variation de la reproductibilité interlaboratoire CV_R% (k=2) en fonction de la concentration C

$$CV(R)\% = \sqrt{\frac{184{,}9^2}{C^2} + 10^2}$$

Méthode OIV-MA-AS323-04A2 Méthodes Type II

Dioxyde de soufre total

OIV/OENO 377/2009
OIV-OENO 591B-2018
OIV-OENO 661-2021

1 Domaine d'application

Cette méthode permet de déterminer le dioxyde de soufre total dans les vins et les moûts.

2 Définitions

On appelle dioxyde de soufre total l'ensemble des différentes formes de dioxyde de soufre présentes dans le vin à l'état libre ou combiné à ses constituants.

3 Principe

Le dioxyde de soufre est entraîné par un courant d'air ou d'azote ; il est fixé et oxydé par barbotage dans une solution diluée et neutre de peroxyde d'hydrogène. L'acide sulfurique formé est dosé par une solution titrée d'hydroxyde de sodium.

Le dioxyde de soufre total est extrait du vin par entraînement à chaud (100 °C environ).

4 Réactifs et produits

4.1 Acide phosphorique pur à 85% (ρ_{20} = 1,71 g/mL) (CAS 7664-38-2)
4.2 Réactif indicateur :
Rouge de méthyle (CAS 493-52-7) 100 mg (±1 mg)
Bleu de méthylène (CAS 7220-79-3) 50 mg (±0.5 mg)
Ethanol (≥ 95%) (CAS 64-17-5) 50 mL
Compléter à 100 mL avec de l'eau pour usage analytique. Respecter les proportions pour des volumes différents de 100 mL.
Les réactifs indicateurs commerciaux avec la même composition peuvent être utilisés
4.3 Hydroxyde de sodium 1 M (3.84%) ou anhydre (pellets) (CAS 1310-73-2)
4.4 Solution 0,01 M d'hydroxyde de sodium :
A titre indicatif: Diluer 10,0 mL d'hydroxyde de sodium 1 M (4.3) dans 1L d'eau pour usage analytique.
Si nécessaire, contrôler régulièrement le titre de la solution (facteur de correction à appliquer) et la conserver à l'abri du CO_2 atmosphérique
4.5 Solution de peroxyde d'hydrogène à 3 volumes (=9,1 g/L = 0,27 mol/L d'H_2O_2)

préparée ou commerciale (par exemple, H_2O_2 30% : CAS, mixture 7722-84-1)

Remarque : Une solution à 30% en masse correspond à un titre de 110 volumes ($\rho_{20} \cong 1{,}11$ g/mL), soit le volume d'oxygène dégagé idéalement par litre d'H_2O_2 dans des conditions standards de température et pression, tandis qu'une solution à 3% en masse ($\rho_{20} \cong 1$ g/mL) correspond à un titre de 10 volumes (0,89 mol/L). La préparation va donc dépendre de la solution commerciale utilisée, sachant que de toute façon le volume employé dans la méthode sera en excès.

5 Appareillage

L'appareil utilisé doit être conforme au schéma ci-dessous, particulièrement en ce qui concerne le réfrigérant.

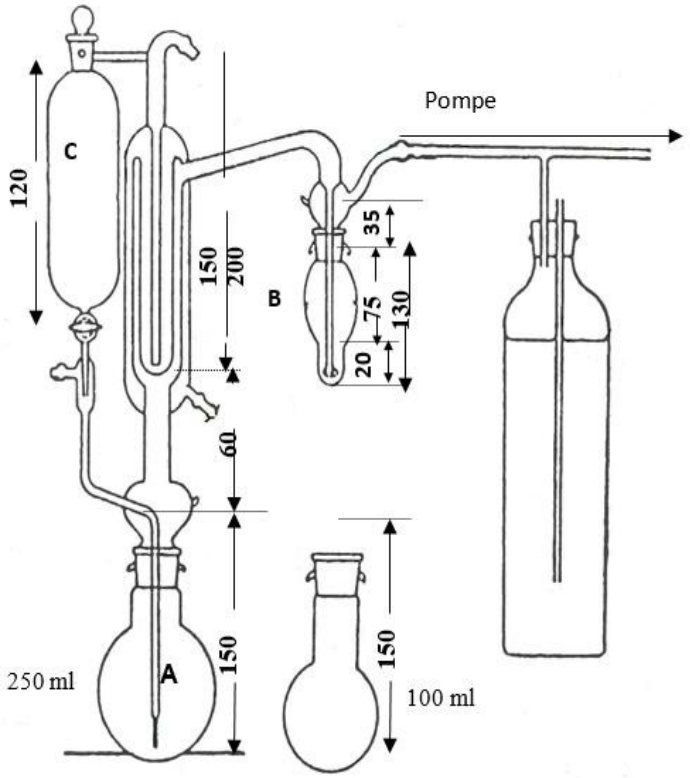
Le tube d'amenée des gaz dans le barboteur B est terminé par une petite sphère de 1 cm de diamètre comportant sur sa plus grande circonférence horizontale 20 trous de 0,2 mm de diamètre. On peut également le terminer par une plaque de verre fritté assurant la formation d'un grand nombre de très petites bulles réalisant un bon contact entre les phases gazeuse et liquide.

Le débit gazeux dans l'appareil doit être de 40 l/h environ. Le flacon placé à la droite de l'appareil est destiné à limiter la réduction de pression produite par la trompe à eau à 20 à 30 cm d'eau. Pour pouvoir régler cette réduction de pression de manière que le débit soit correct, il y a avantage à placer un débitmètre à tube semi-capillaire entre le barboteur et le flacon.

Pour le dosage du dioxyde de soufre total, il est préférable d'utiliser un brûleur (à flamme de 4-5 cm de haut ou à infrarouge) qui permet d'atteindre très rapidement l'ébullition. Ne pas placer sous le ballon A une toile métallique, mais un déflecteur avec un orifice de 2 à 4 cm On évite ainsi la pyrogénation des matières extractives du vin sur les parois du ballon.

Utiliser un ballon A de 250 mL si la prise d'échantillon est de 50 mL et un ballon de 100-150 mL si la prise d'échantillon est de 20 mL.

Figure 1 - Les dimensions sont indiquées en millimètres. Les diamètres internes des 4 tubes concentriques qui constituent le réfrigérant sont: 45, 34, 27 et 10 mm



6 Mode opératoire

Il est conseillé de rincer l'appareil à l'air ou à l'azote avant chaque nouveau dosage (par exemple pendant 5 minutes). Si un essai à blanc est effectué, la couleur de l'indicateur dans l'eau oxygénée neutralisée à la sortie du tube d'amenée ne doit pas changer.

- Brancher l'eau du réfrigérant
- Dans le barboteur B de l'appareil à entraînement introduire 2-3 mL de solution de peroxyde d'hydrogène (4.5), 2 gouttes de réactif indicateur (4.2) et neutraliser par la solution 0,01 M d'hydroxyde de sodium (4.4) ; pH neutre= couleur verte.

  Remarque : Pour de grandes séries d'échantillons, il est aussi possible de préparer une solution de H_2O_2 déjà neutralisée avant de l'introduire dans le ballon. Adapter les concentrations et les volumes en conséquence, sachant qu'il

faut maintenir le pouvoir oxydatif de la solution (durée de conservation réduite).

- Adapter ce barboteur à l'appareil.
- Dans le ballon A, introduire :
  50 mL d'échantillon si la teneur présumée de l'échantillon < 50mg/L SO_2 total
  20 mL d'échantillon si la teneur présumée de l'échantillon ≤ 50mg/L SO_2 total
  et le fixer à l'appareil.
- Dans l'ampoule C, introduire :
  15 mL d'acide phosphorique (4.1), si la teneur présumée de l'échantillon < 50mg/l SO_2 total
  5 mL d'acide phosphorique (4.1), si la teneur présumée de l'échantillon ≥ 50mg/l SO_2 total
- Ouvrir le robinet pour rajouter l'acide à l'échantillon, activer la source de chauffage et, dans le même temps, démarrer le courant de gaz et la minuterie, réglée sur 15 minutes. Maintenir l'ébullition pendant le passage du courant gazeux. Le dioxyde de soufre total entraîné est oxydé en acide sulfurique.
- Après 15 minutes, éteindre le chauffage, retirer le barboteur B et rincer à l'eau le tube d'amenée de gaz (à partir du rodage).
- Titrer l'acide formé par la solution d'hydroxyde de sodium 0,01 M (4.4) jusqu'au virage vert.
  Soit *n* le nombre de millilitres versés.

7 Calculs et expression des résultats

Le dioxyde de soufre total est exprimé en milligrammes par litre (mg/L) sans décimale

Calculs :

- Echantillons pauvres en dioxyde de soufre (prise d'essai de 50 mL) : 6,4 *n*
- Autres échantillons (prise d'essai de 20 mL) 16 *n*

8 Fidélité

8.1 Répétabilité (r)

Teneur < 50 mg/L (prise d'essai de 50 mL), r = 1 mg/L
Teneur ≥ 50 mg/L (prise d'essai de 20 mL), r = 6 mg/L

8.2 Reproductibilité (R)

Teneur < 50 mg/L (prise d'essai de 50 mL), R = 9 mg/L
Teneur ≥ 50 mg/L (prise d'essai de 20 mL), R = 15 mg/L

9 Bibliographie

PAUL F., *Mitt. Klosterneuburg, Rebe u. Wein,* 1958, ser. A, 821.

Etude collaborative
Mise à jour de la validation du dosage du dioxyde de soufre total

1.Domaine d'application

Etude collaborative internationale selon la résolution OIV ŒNO 6/2000, pour la validation des mises à jour des méthodes dioxyde de soufre libre et dioxyde de soufre total OIV-MA-AS323-04A, selon la décision de la sous-commission aux méthodes d'analyse de l'OIV, avril 2018.

2.Références normatives

- Mise à jour (projet) des méthodes OIV-MA-AS323-04A.
- ISO 5725
- Résolution OIV ŒNO 6/2000
-

3.Protocole

20 échantillons ont été constitués à partir de volumes homogènes de 10 vins, issus de diverses régions viticoles de la France et du France. Chaque échantillon a été présenté deux fois, sous anonymat, selon le principe du double aveugle.
Les échantillons ont été préparés entre le 18 et le 20 juin 2018, puis expédiés sans délais aux laboratoires participants.

N° échantillon	N° anonymat (double aveugle)	Nature de l'échantillon
A	1 -14	Vin blanc sec
B	2- 16	Vin blanc sec
C	3 – 19	Vin rosé sec
D	4 – 12	Vin rosé sec
E	5 – 20	Vin rouge sec
F	6 – 18	Vin rouge sec
G	7 – 11	Vin rouge sec
H	8 – 15	Vin de liqueur blanc
I	9 – 17	Vin de liqueur rouge
J	10 – 13	Vin de liqueur rouge

Les analyses ont été réalisées simultanément par tous les laboratoires participants entre le 16 et le 20 juillet 2018. Les échantillons ont été conservés en enceintes réfrigérées par tous les laboratoires entre la date de réception et celle d'analyse, conformément au protocole transmis.

Les laboratoires suivants ont rendu leurs résultats :

Laboratoire	Ville	Pays
Estación de Viticultura e Enoloxía de Galicia	Leiro (Ourense)	Espagne
Laboratorio arbitral agroalimentario	Madrid	Espagne
ASAE	Lisboa	Portugal
SCL Montpellier	Montpellier cedex 5	France
HBLA und BA für Wein- und Obstbau	Klosterneuburg	Autriche
Laboratorio de Salud Publica	Madrid	Espagne
Laboratorio Agroambiental de Zaragoza	Zaragoza	Espagne
Laboratoire SCL Bordeaux	Pessac decex – CS 98080	France
Unione Italiana Vini Servizi	Verona	Italie
Laboratorio Agroalimentario de Valencia	Burjassot (Valencia)	Espagne
Agroscope	Nyon	Suisse
Laboratoires Dubernet	Montredon des Corbières	France
Laboratoire Dioenos Rhône	Orange	France
Laboratoire Natoli	Saint Clément de Rivière	France

NB : l'ordre des laboratoires dans ce tableau ne correspond pas avec l'ordre des tableaux suivants, afin de préserver l'anonymat des résultats.

4.Dioxyde de soufre libre

5. Données SO_2 libre

SO_2 libre (mg/L)	A		B		C		D		E		F		G		H		I		J	
Ech	**1**	**14**	**2**	**16**	**3**	**19**	**4**	**12**	**5**	**20**	**6**	**18**	**7**	**11**	**8**	**15**	**9**	**17**	**10**	**13**
Labo 3			31	36	18	18	21	23	20	18	6	6	20	17	5	6				
Labo 5			37	35	21	24	24	25	20	20	8	7	20	20	3	4				
Labo 6	4	1	38	33	21	20	20	26	19	20	7	6	21	19	7	8	1	3	1	1
Labo 7	1	1	37	40	20	22	24	26	20	22	9	8	20	23	8	8	2	1	1	1
Labo 8			31	32	18	19	23	22	22	20	6	7	19	20	5	3	1	1		
Labo 9			35	34	23	19	25	24	21	24			17	17						
labo10	2	1	35	34	20	21	24	24	22	21	9	8	21	20	7	7	2	2	1	1
labo 11	0	0	33	30	17	11	22	16	16	21	6	4	15	19	6	3	1	1	0	0
Labo 15			15	19	15	13	18	20	8	16	6	5	8	15	5	5				
labo 17	0	0	37	38	24	26	28	28	26	23	8	8	24	22	7	7	1	2	0	0
Labo 18	0	4	33	31	21	11	23	27	15	19	6	4	9	20	3	4	1	1	0	0
Labo 20	0	0	32	32	20	19	21	21	29	21	8	8	20	18	12	4	1	1	0	0
Labo 21	2	1	33	38	19	15	25	22	19	21	6	6	19	20	8	7	2	1	0	0

Les résultats non renseignés ont été rendus non quantifiables (< limite quantification)

Résultat retiré par le test de COCHRAN à 5%

Résultat retiré par le test de GRUBBS à 5%

6. Résultats SO_2 libre

SO_2 libre (mg/L)	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**	**G**	**H**	**I**	**J**
Nb laboratoires retenus	7	9	11	10	10	12	11	11	9	8
Nb répétitions	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Min	0	31,5	14	19	17	5	17	3,5	1	0
Maxi	2,5	38,5	25	28	24,5	8,5	23	8	2	1
moyenne	0,9	34,2	19,8	23,4	20,6	6,8	19,6	5,7	1,4	0,4
Ecart type	0,98	2,67	2,91	2,46	2,04	1,31	1,77	1,72	0,42	0,52
Variance répétabilité	0,79	1,67	2,59	1,20	2,60	0,58	2,23	0,82	0,39	0,00
Ecart-type interlaboratoire	0,98	2,67	2,91	2,46	2,04	1,31	1,77	1,72	0,42	0,52
Variance de reproductibilité	1,35	7,97	9,76	6,64	5,46	2,00	4,25	3,38	0,37	0,27
Ecart type répétabilité	0,89	1,29	1,61	1,10	1,61	0,76	1,49	0,90	0,62	0,00
limite r	2,48	3,61	4,51	3,07	4,51	2,14	4,18	2,53	1,75	0,00
CV % répétabilité (k=2)	191	8	16	9	16	23	15	32	90	0
Ecart type reproductibilité	1,16	2,82	3,12	2,58	2,34	1,41	2,06	1,84	0,61	0,52
Limite R	3,25	7,90	8,75	7,22	6,54	3,96	5,78	5,15	1,70	1,45
CV % Reproductibilité (k=2)	**250**	**16**	**32**	**22**	**23**	**42**	**21**	**64**	**87**	**276**
Horwitz PRSDR %	16,18	9,40	10,21	9,95	10,15	12,00	10,22	12,30	15,23	18,55
SR Horwitz	0,15	3,22	2,02	2,33	2,09	0,81	2,00	0,70	0,21	0,07
R Horwitz	0,42	9,10	5,71	6,59	5,91	2,29	5,67	1,99	0,60	0,20
Horwitz ratio	7,64	0,87	1,53	1,10	1,11	1,73	1,02	2,58	2,84	7,37

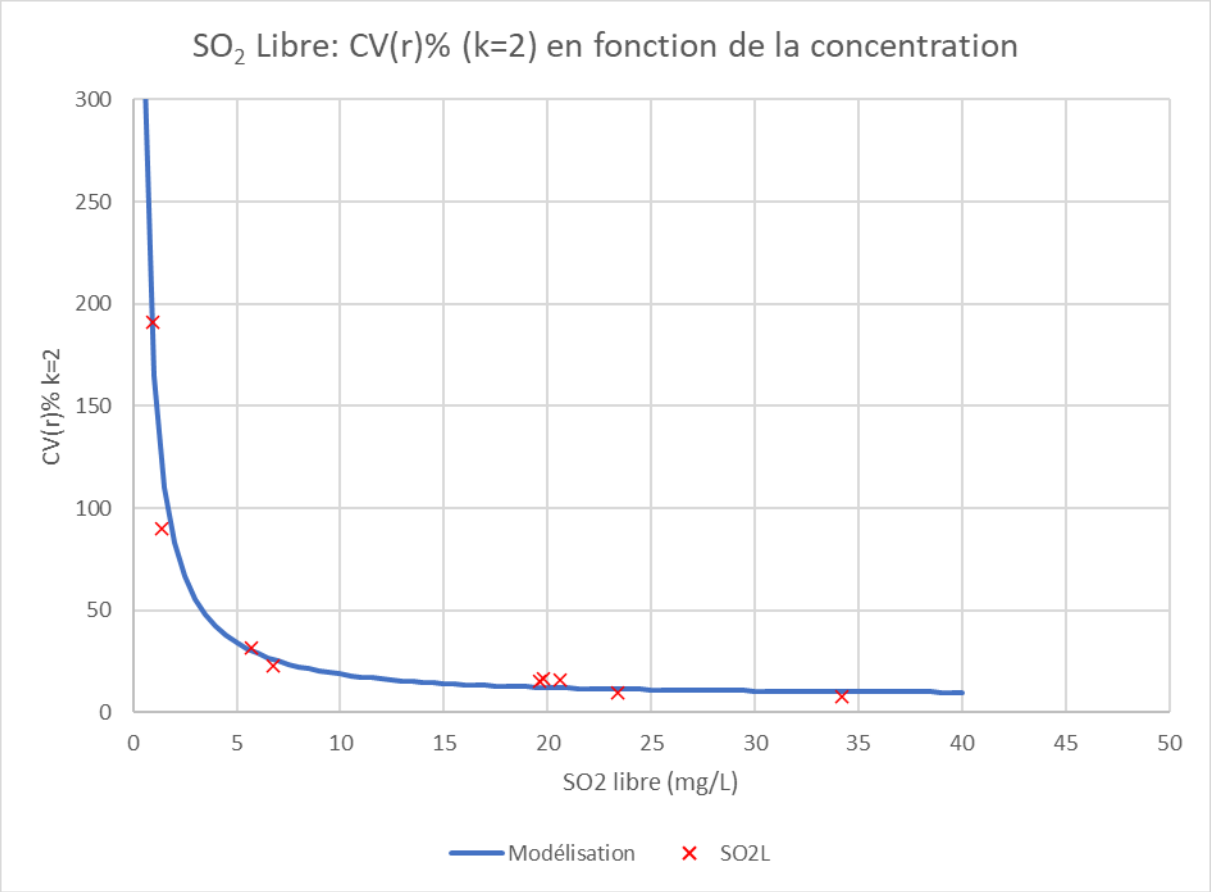


Figure 1 : Modélisation du coefficient de variation de la répétabilité CV(r)% (k=2) en fonction de la concentration C

$$CV(r)\% = \sqrt{\frac{164{,}55^2}{C^2} + 9^2}$$

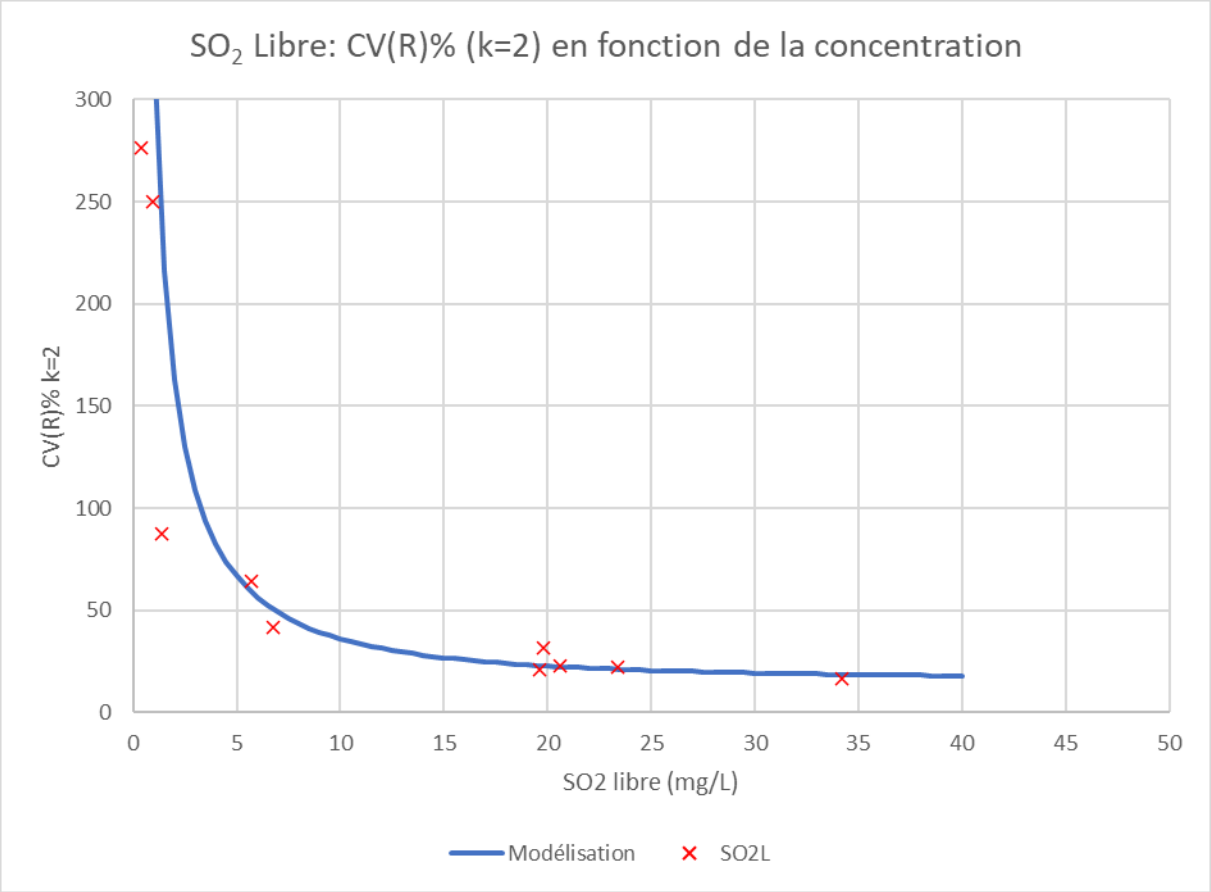


Figure 2 : Modélisation du coefficient de variation de la reproductibilité interlaboratoire $CV_R\%$ (k=2) en fonction de la concentration C

$$CV(R)\% = \sqrt{\frac{323{,}6^2}{C^2} + 16^2}$$

7.Dioxyde de soufre total

8. Données SO_2 total

SO_2 total (mg/L)	A		B		C		D		E		F		G		H		I		J	
Ech	**1**	**14**	**2**	**16**	**3**	**19**	**4**	**12**	**5**	**20**	**6**	**18**	**7**	**11**	**8**	**15**	**9**	**17**	**10**	**13**
Labo 3			128	127	72	73	128	131	61	59	28	28	57	56	102	102	47	45		
Labo 5			122	121	68	71	112	114	42	53	22	22	51	42	102	101	35	34		
Labo 6		1	128	131	72	72	126	131	53	54	22	20	42	49	98	99	31	34	3	1
Labo 7	3	3	131	131	70	74	130	131	54	59	26	23	46	48	106	101	37	40	1	1
Labo 8	2	1	125	127	72	72	129	128	58	57	22	23	46	45	97	99	42	39	1	1
Labo 9			120	128	77	75	132	108	71	59	21	25	44	47	110	99	38	48		
Labo10	2	2	130	130	74	76	130	130	61	61	28	32	55	56	103	104	43	44	3	4
Labo 11	4	3	119	125	71	74	118	118	39	40	18	21	45	41	89	94	26	38	2	2
Labo 14	3	3	129	128	72	72	127	129	58	58	32	29	50	49	102	101	42	41	3	4
Labo 15			134	136	76	78	134	136	60	58	39	27	52	61	110	106	51	50		
Labo 17	3	3	134	132	82	76	136	133	59	50	24	23	46	44	107	105	35	38	0	0
Labo 18	5	3	130	129	78	73	133	133	62	59	29	32	58	52	105	105	50	48	2	2
Labo 20	1	1	128	131	72	74	130	130	58	56	26	28	48	45	98	93	41	43	0	0
Labo 21		0	124	125	69	72	124	126	45	51	19	20	42	42	97	97	35	34	0	1

Les résultats non renseignés ont été rendus non quantifiables (< limite quantification)

Résultat retiré par le test de COCHRAN à 5%

Résultat retiré par le test de GRUBBS à 5%

5.2 Résultats SO_2 total

SO_2 total (mg/L)	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**	**G**	**H**	**I**	**J**
Nb laboratoires retenus	7	12	13	13	8	13	10	13	12	9
Nb répétitions	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Min	1	121,5	69,5	113	53,5	19,5	42	91,5	32,5	0
Maxi	3,5	135	77	135	61	30,5	56,5	108	50,5	3,5
moyenne	2,4	128,8	73,0	128,0	58,3	24,7	47,6	100,9	40,8	1,5
Ecart type	0,93	3,63	2,20	6,24	2,42	4,04	4,89	4,61	5,80	1,35
Variance répétabilité	0,14	1,46	3,27	2,35	1,44	3,04	2,30	3,96	2,21	0,17
Ecart-type interlaboratoire	0,93	3,63	2,20	6,24	2,42	4,04	4,89	4,61	5,80	1,35
Variance de reproductibilité	0,94	13,93	6,49	40,11	6,57	17,84	25,03	23,28	34,72	1,90
Ecart type répétabilité	0,38	1,21	1,81	1,53	1,20	1,74	1,52	1,99	1,49	0,41
limite r	1,1	3,4	5,1	4,3	3,4	4,9	4,2	5,6	4,2	1,1
CV % répétabilité (k=2)	31	2	5	2	4	14	6	4	7	54
Ecart type reproductibilité	0,97	3,73	2,55	6,33	2,56	4,22	5,00	4,82	5,89	1,38
Limite R	2,7	10,5	7,1	17,7	7,2	11,8	14,0	13,5	16,5	3,9
CV % Reproductibilité (k=2)	**80**	**6**	**7**	**10**	**9**	**34**	**21**	**10**	**29**	**184**
Horwitz PRSDR %	14,00	7,70	8,39	7,71	8,68	9,87	8,95	7,99	9,16	15,05
SR Horwitz	0,34	9,92	6,13	9,86	5,06	2,44	4,26	8,06	3,73	0,23
R Horwitz	0,96	28,05	17,33	27,90	14,31	6,91	12,04	22,80	10,56	0,64
Horwitz ratio	2,82	0,37	0,41	0,64	0,50	1,71	1,16	0,59	1,56	6,04

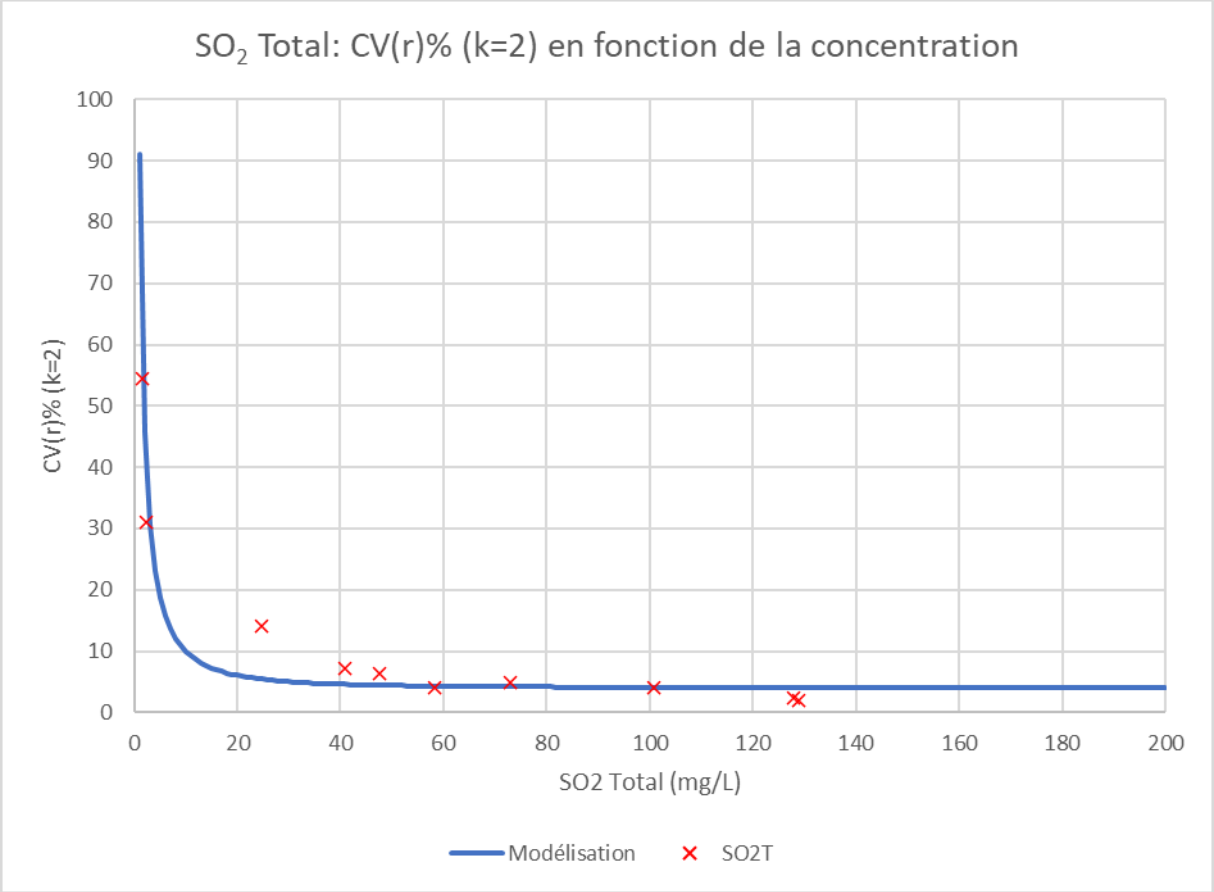


Figure 3 : Modélisation du coefficient de variation de la répétabilité CV(r)% (k=2) en fonction de la concentration C

$$CV(r)\% = \sqrt{\frac{91^2}{C^2} + 4^2}$$

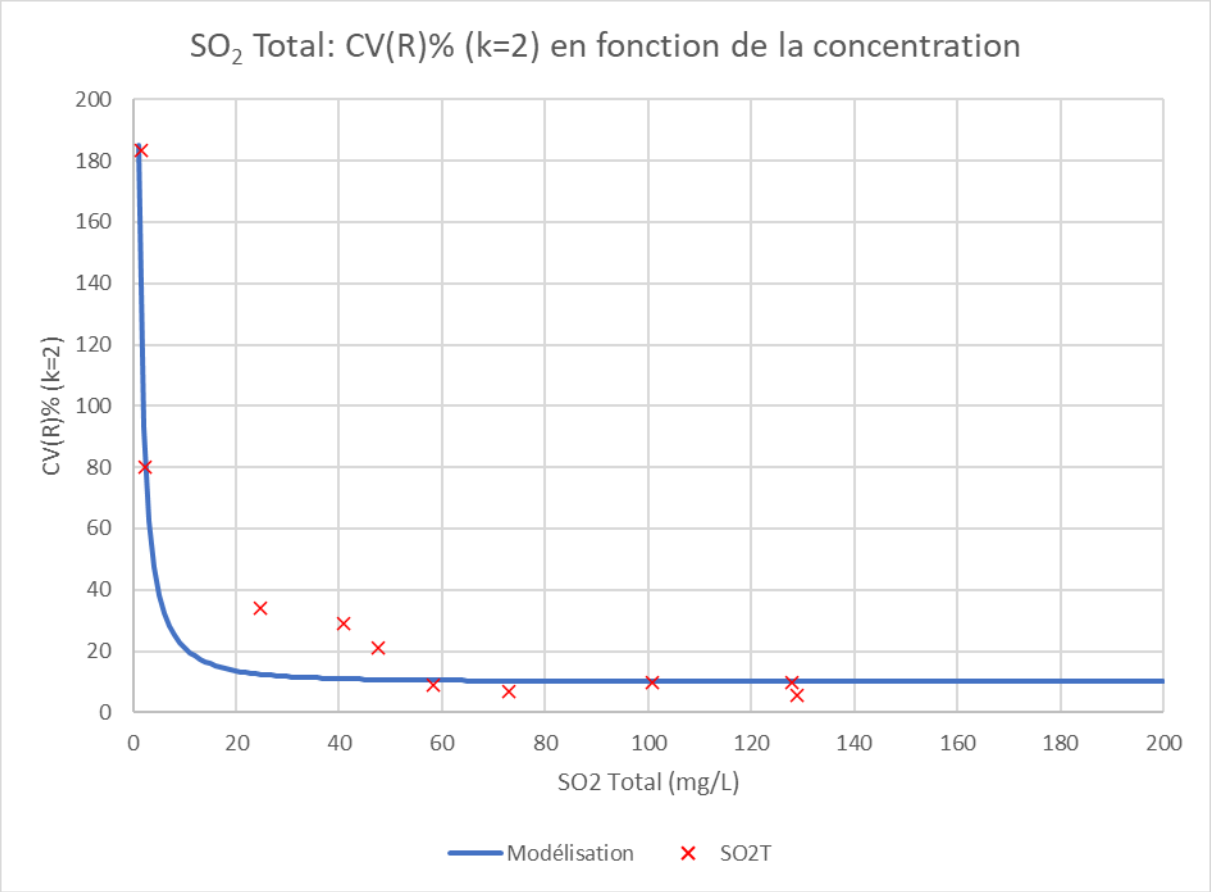


Figure 4 : Modélisation du coefficient de variation de la reproductibilité interlaboratoire CV_R% (k=2) en fonction de la concentration C

$$CV(R)\% = \sqrt{\frac{184{,}9^2}{C^2} + 10^2}$$

Méthode OIV-MA-AS323-04B Méthodes Type IV

Dioxyde de soufre

1 Définitions

On appelle dioxyde de soufre libre, le dioxyde de soufre présent dans le moût ou le vin sous les formes suivantes : H_2SO_3, HSO_3^-, dont l'équilibre est fonction du pH et de la température :

$$H_2SO_3 \rightleftharpoons H^+ + HSO_3^-$$

H_2SO_3 représente le dioxyde de soufre moléculaire.

On appelle dioxyde de soufre total l'ensemble des différentes formes de dioxyde de soufre présentes dans le vin à l'état libre ou combiné à ses constituants.

2. Dioxyde de soufre libre et total

2.1. *Principe des méthodes*

Méthode rapide d'essai

Le dioxyde de soufre libre est dosé par titrage iodométrique direct.

Le dioxyde de soufre combiné est dosé, à la suite, par titrage iodométrique après hydrolyse alcaline. Ajouté au dioxyde de soufre libre, il permet d'obtenir le dioxyde de soufre total.

2.2. *Méthode rapide d'essai*

2.2.1. Réactifs

2.2.1.1. EDTA : sel disodique de l'acide éthylènediaminetétracétique.

2.2.1.2. Solution 4 M d'hydroxyde de sodium (160 g/l).

2.2.1.3. Acide sulfurique (ρ_{20} = 1,84 g/ml), solution au $^1/_{10}$ (v/v).

2.2.1.4. Empois d'amidon solution 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.

2.2.1.5. Solution 0,025 M d'iode.

2.2.2. *Dioxyde de soufre libre*

Dans une fiole conique de 500 ml, placer :

- 50 ml de vin
- 5 ml d'empois d'amidon (2.2.1.4)
- 30 mg de EDTA (2.2.1.1)
- 3 ml de H_2SO_4 au $^1/_{10}$ (v/v) (2.2.1.3)

Titrer immédiatement par l'iode 0,025 M (2.2.1.5) jusqu'à ce que la coloration bleue persiste nettement durant 10 à 15 secondes. Soit *n* ml le volume d'iode utilisé.

2.2.3. *Dioxyde de soufre combiné*

Ajouter 8 ml de solution 4 M d'hydroxyde de sodium (2.2.1.2), agiter une seule fois et laisser 5 minutes en contact. Verser d'un seul coup et en agitant énergiquement le contenu d'un petit vase cylindrique dans lequel 10 ml d'acide sulfurique au 1/10e (2.2.1.3) avaient été placés. Titrer immédiatement par l'iode 0,025 M, (2.2.1.5). Soit *n*' le volume d'iode employé.

Ajouter 20 ml de solution 4 M d'hydroxyde de sodium (2.2.1.2), laisser en contact 5 minutes après avoir agité une seule fois. Diluer avec 200 ml d'eau aussi froide que possible.

En agitant énergiquement, verser d'un seul coup 30 ml d'acide sulfurique au $^1/_{10}$ préalablement placés dans une éprouvette. Titrer par l'iode 0,025 M (2.2.1.5) le dioxyde de soufre libéré. Soit *n*" le volume d'iode employé.

2.2.4. Expression des résultats

2.2.4.1. Calcul

Dioxyde de soufre libre en milligrammes par litre : 32 *n*

Dioxyde de soufre total en milligrammes par litre : 32 ($n + n' + n''$).

Remarques :

1. Pour les vins rouges pauvres en SO_2 il y a intérêt à employer de l'iode plus dilué que 0,025 M, par exemple : 0,01M. Remplacer le coefficient 32 par 12,8 dans les formules ci-dessus.
2. Pour les vins rouges, il y a avantage à éclairer le vin par-dessous avec un faisceau de lumière jaune obtenue à l'aide d'une ampoule électrique ordinaire et d'une solution de chromate de potassium ou à l'aide d'une lampe à vapeur de sodium. Il faut se placer dans une chambre noire et observer la transparence du vin, qui devient opaque dès que le virage de l'empois est atteint.
3. Lorsque la quantité de dioxyde de soufre trouvée avoisine ou dépasse la limite légale, il convient de doser le dioxyde de soufre total par la méthode de référence.
4. Lorsqu'on attache un intérêt particulier au dosage du dioxyde de soufre, il sera conventionnellement déterminé sur un échantillon maintenu pendant 2 jours à l'abri de l'air à la température de 20 °C avant l'analyse : celle-ci sera également exécutée à cette température.
5. Étant donné que certaines substances sont oxydées par l'iode en milieu acide, il est nécessaire - pour des dosages plus précis - d'évaluer la quantité d'iode ainsi utilisée. Pour cela, il faut combiner le dioxyde de soufre libre par un excès d'éthanal ou de propanal, avant d'effectuer le titrage par l'iode. À 50 ml de vin placés dans une fiole conique de 300 ml, ajouter 5 ml de solution d'éthanal (C_2H_4O à 7 g/l) ou 5 ml d'une solution de propanal (C_3H_6O) à 10 g/l.

Boucher et laisser au repos 30 minutes au moins. Ajouter 3 ml d'acide sulfurique au $^1/_{10}$ (2.2.1.3) et de l'iode 0,025 M (2.2.1.5) en quantité suffisante pour faire virer l'empois

d'amidon. Soit *n‴* le volume d'iode employé. Il doit être retranché de *n* (dioxyde de soufre libre) et de *n* + *n′* + *n″* (dioxyde de soufre total).

n‴ est généralement faible : 0,2 à 0,3 ml d'iode 0,025 M. Si le vin a été additionné d'acide ascorbique, *n‴* est beaucoup plus élevé et on peut, au moins approximativement, mesurer la quantité de ce produit par la valeur de *n‴* sachant que 1 ml d'iode 0,025 M oxyde 4,4 mg d'acide ascorbique. Par la mesure de *n‴*, on peut ainsi déceler sans difficultés les vins qui ont été additionnés d'acide ascorbique en quantité supérieure à 20 mg/l et qui ne s'est pas transformé en produits d'oxydation.

BIBLIOGRAPHIE

Méthode rapide d'essai :

RIPPER M., *J. Prakt. Chem.,* 1892, **46,** 428.
JAULMES, P., DIEUZEIDE J.-C., *Ann. Fals. Fraudes,* 1954, **46,** 9; *Bull. O.I.V.,* 1953, **26,** n° 274, 52.
KIELHOFER E., AUMANN H., *Mitt. Klosterneuburg, Rebe und Wein,* 1957, **7,** 289.
JAULMES P., HAMELLE M^{me} G., *Ann. Fals. Exp. Chim.*, 1961, **54,** 338

Méthode OIV-MA-AS323-04C Méthode Type IV

Dioxyde de soufre

(A17, révision par OIV/OENO 377/2009)

1 Définitions

On appelle dioxyde de soufre libre, le dioxyde de soufre présent dans le moût ou le vin sous les formes suivantes : H_2SO_3, HSO_3^-, dont l'équilibre est fonction du pH et de la température :

$$H_2SO_3 \rightleftharpoons H^+ + HSO_3^-$$

H_2SO_3 représente le dioxyde de soufre moléculaire.

On appelle dioxyde de soufre total l'ensemble des différentes formes de dioxyde de soufre présentes dans le vin à l'état libre ou combiné à ses constituants.

2. Dioxyde de soufre moléculaire

2.1. Principe de la méthode

Le pourcentage de dioxyde de soufre moléculaire, H_2SO_3, dans le dioxyde de soufre libre, est évalué en fonction du pH, du titre alcoométrique et de la température.
Pour une température et un titre alcoométrique donnés :

$$H_2SO_3 \rightleftharpoons H^+ + HSO_3^-$$

$$[H_2SO_3] = \frac{L}{10^{(pH - pk_M)} + 1} \qquad (1)$$

avec $L = [H_2SO_3] + [HSO_3^-]$

$$pk_M = pk_T - \frac{A\sqrt{I}}{I + B\sqrt{I}}$$

I = force ionique
A et B = coefficients qui varient avec la température et le titre alcoométrique
k_T = constante thermodynamique de dissociation; la valeur de pkT est donnée dans le tableau 1 en fonction du titre alcoométrique et de la température
k_M = constante mixte de dissociation

En prenant pour la force ionique i la valeur moyenne 0,038 le tableau 2 donne les valeurs de pk_M en fonction de la température et du titre alcoométrique.

La teneur en dioxyde de soufre moléculaire calculée à partir de la relation (1) est donnée dans le tableau 3 en fonction du pH, de la température et du titre alcoométrique.

2.2. *Calcul*

Connaissant le pH du vin, son titre alcoométrique, le pourcentage de dioxyde de soufre moléculaire est donné par le tableau 3 pour la température t °C; soit X %.

Teneur en dioxyde de soufre moléculaire en mg/l : $X \cdot C$
C = teneur en dioxyde de soufre libre en mg/l.

Tableau 1
Valeurs de la constante thermodynamique pk_T

Alcool % en volume	Température °C				
	20	25	30	35	40
0	1,798	2,000	2,219	2,334	2,493
5	1,897	2,098	2,299	2,397	2,527
10	1,997	2,198	2,394	2,488	2,606
15	2,099	2,301	2,503	2,607	2,728
20	2,203	2,406	2,628	2,754	2,895

Tableau 2
Valeurs de la constante mixte pk_M (I = 0,038)

Alcool % en volume	Température °C				
	20	25	30	35	40
0	1,723	1,925	2,143	2,257	2,416
5	1,819	2,020	2,220	2,317	2,446
10	1,916	2,116	2,311	2,405	2,522
15	2,014	2,216	2,417	2,520	2,640
20	2,114	2,317	2,538	2,663	2,803

Tableau 3
Dioxyde de soufre moléculaire en pourcentage du dioxyde de soufre libre (I = 0,038)

PH	T = 20 ºC				
	Alcool % en volume				
		0	10	15	20
2,8	7,73	9,46	11,55	14,07	17,09
2,9	6,24	7,66	9,40	11,51	14,07
3,0	5,02	6,18	7,61	9,36	11,51
3,1	4,03	4,98	6,14	7,58	9,36
3,2	3,22	3,99	4,94	6,12	7,58
3,3	2,58	3,20	3,98	4,92	6,12
3,4	2,06	2,56	3,18	3,95	4,92
3,5	1,64	2,04	2,54	3,16	3,95
3,6	1,31	1,63	2,03	2,53	3,16
3,7	1,04	1,30	1,62	2,02	2,53
3,8	0,83	1,03	1,29	1,61	2,02
T = 25 ºC					
2,8	11,47	14,23	17,15	20,67	24,75
2,9	9,58	11,65	14,12	17,15	22,71
3,0	7,76	9,48	11,55	14,12	17,18
3,1	6,27	7,68	9,40	11,55	14,15
3,2	5,04	6,20	7,61	9,40	11,58
3,3	4,05	4,99	6,14	7,61	9,42
3,4	3,24	4,00	4,94	6,14	7,63
3,5	2,60	3,20	3,97	4,94	6,16
3,6	2,07	2,56	3,18	3,97	4,55
3,7	1,65	2,05	2,54	3,18	3,98
3,8	1,32	1,63	2,03	2,54	3,18
T = 30 ºC					
2,8	18,05	20,83	24,49	29,28	35,36
2,9	14,89	17,28	20,48	24,75	30,29
3,0	12,20	14,23	16,98	20,71	25,66
3,1	9,94	11,65	13,98	17,18	21,52
3,2	8,06	9,48	11,44	14,15	17,88
3,3	6,51	7,68	9,30	11,58	14,75
3,4	5,24	6,20	7,53	9,42	12,08
3,5	4,21	4,99	6,08	7,63	9,84
3,6	3,37	4,00	4,89	6,16	7,98
3,7	2,69	3,21	3,92	4,95	6,44
3,8	2,16	2,56	3,14	3,98	5,19

Tableau 3 (suite)
Dioxyde de soufre moléculaire en pourcentage du dioxyde de soufre libre (I = 0,038)

pH	T=35 ºC				
	Alcool % en volume				
	0	5	10	15	20
2,8	22,27	24,75	28,71	34,42	42,18
2,9	18,53	20,71	24,24	29,42	36,69
3,0	15,31	17,18	20,26	24,88	31,52
3,1	12,55	14,15	16,79	20,83	26,77
3,2	10,24	11,58	13, 82	17,28	22,51
3,3	8,31	9,42	11,30	14,23	18,74
3,4	6,71	7,63	9,19	11,65	15,49
3,5	5,44	6,16	7,44	9,48	12,71
3,6	4,34	4,95	6,00	7,68	10,36
3,7	3,48	3,98	4,88	6,20	8,41
3,8	2,78	3,18	3,87	4,99	6,80
T = 40 ºC					
2,8	29,23	30,68	34,52	40,89	50,14
2,9	24,70	26,01	29,52	35,47	44,74
3,0	20,67	21,83	24,96	30,39	38,85
3,1	17,15	18,16	20,90	25,75	33,54
3,2	14,12	14,98	17,35	21,60	28,62
3,3	11,55	12,28	14,29	17,96	24,15
3,4	9,40	10,00	11,70	14,81	20,19
3,5	7,61	8,11	9,52	12,13	16,73
3,6	6,14	6,56	7,71	9,88	13,77
3,7	4,94	5,28	6,22	8,01	11,25
3,8	3,97	4,24	5,01	6,47	9,15

BIBLIOGRAPHIE

Dioxyde de soufre moléculaire :

BEECH F.W. & TOMAS Mme S., *Bull. O.I.V.,* 1985, **58,** 564-581.
USSEGLIO-TOMASSET L. & BOSIA P.D., *F.V., O.I.V.,* 1984, n° 784.

Méthode OIV-MA-AS323-06 Méthode Type IV

Dosage du mercure dans le vin par génération de vapeur et spectrométrie de fluorescence atomique

(OENO 15/2002 ; OIV/OENO 377/2009)

1. DOMAINE D'APPLICATION

La présente méthode s'applique à l'analyse du mercure des vins dans la gamme de concentration de 0 à 10 µg/l.

2. DESCRIPTION DE LA TECHNIQUE

2.1. Principe de la méthode

2.1.1. Minéralisation du vin : Elle est effectuée en milieu acide, en chauffant sous reflux.
La minéralisation est achevée par du permanganate de potassium.

2.1.2. Réduction du permanganate non consommé par du chlorhydrate d'hydroxylamine.

2.1.3. Réduction du mercure II en mercure métal par du chlorure d'étain II.

2.1.4. Entraînement du mercure par un courant d'argon, à température ambiante.

2.1.5. Dosage du mercure à l'état de vapeur monoatomique par spectrométrie de fluorescence atomique, à la longueur d'onde de 254 nm : les atomes de mercure sont excités par une lampe à vapeur de mercure ; les atomes ainsi excités réémettent une radiation dite de fluorescence qui permet de quantifier le mercure présent à l'aide d'un détecteur photonique placé à 90° par rapport au faisceau d'excitation ; la détection par fluorescence atomique permet d'obtenir une bonne linéarité et élimine les effets de mémoire.

2.2. Principe de l'analyse (figure n°1)

La pompe péristaltique aspire la solution de chlorure d'étain II, le blanc (eau déminéralisée contenant 1 % d'acide nitrique) et l'étalon ou l'échantillon de vin minéralisé.
Le mercure métal est entraîné, dans le séparateur gaz-liquide, par un courant d'argon.

Après passage dans la gaine d'un desséchant, le mercure est détecté par fluorescence.
Puis, le courant gazeux passe dans une solution de permanganate de potassium afin de piéger le mercure.

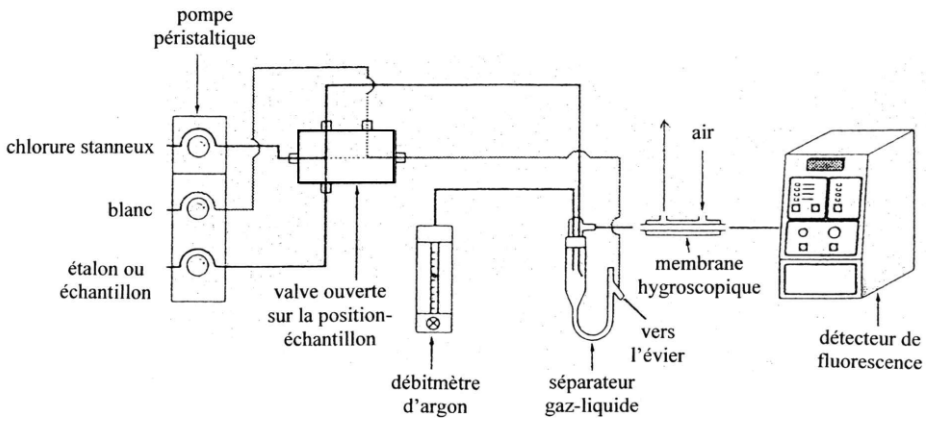


Figure n°1. Chaîne analytique pour doser le mercure

3. REACTIFS ET PREPARATION DES SOLUTIONS REACTIVES

3.1. Eau déminéralisée ultra-pure

3.2. Acide nitrique ultra-pur à 65 %

3.3. Blanc

eau déminéralisée (3.1.) contenant 1 % d'acide nitrique (3.2.)

3.4. Solution d'acide nitrique 5,6 M :

Introduire 400 ml d'acide nitrique (3.2.) dans une fiole de 1000 ml ; compléter au volume avec de l'eau déminéralisée (3.1.).

3.5. Acide sulfurique (d = 1,84)

3.6. Solution d'acide sulfurique 9 M :

Introduire 200 ml d'eau déminéralisée (3.1.) dans une fiole de 1000 ml, puis 500 ml d'acide sulfurique (3.5.) ; après refroidissement, compléter au volume avec de l'eau déminéralisée (3.1.).

3.7. Permanganate de potassium $KMnO_4$

3.8. Solution de permanganate de potassium à 5 % (m/v):

Dissoudre, avec de l'eau déminéralisée (3.1.), 50 g de permanganate de potassium (3.7.) dans une fiole de 1000 ml ; compléter au volume avec de l'eau déminéralisée (3.1.).

3.9. Chlorhydrate d'hydroxylamine NH_2OH, HCl

3.10. Solution réductrice :

Peser 12 g de chlorhydrate d'hydroxylamine (3.9.) et les dissoudre dans 100 ml d'eau déminéralisée (3.1.).

3.11. Chlorure d'étain II ($SnCl_2$, 2 H_2O)

3.12. Acide chlorhydrique concentré

3.13. Solution de chlorure d'étain II :

Peser 40 g de chlorure d'étain II (3.11.) et les dissoudre dans 50 ml d'acide chlorhydrique (3.12.) ; compléter à 200 ml avec de l'eau déminéralisée (3.1.).

3.14. Solution-mère de mercure à 1 g/l,

Préparée par dissolution de 1,708 g de $Hg(NO_3)_2.H_2O$ dans une solution aqueuse d'acide nitrique à 12 %.

3.15. Solution-étalon de mercure à 10 mg/l,

Placer 1 ml de la solution mère de mercure (3.14) dans une fiole jaugée de 100 ml, ajouter 5 ml d'acide nitrique (3.2), compléter au volume avec de l'eau déminéralisée (3.1)

3.16. Solution de mercure à 50 µg/l :

Placer 1 ml de la solution à 10 mg/l (3.15.) dans une fiole de 200 ml ; ajouter 2 ml d'acide nitrique (3.2.) ; compléter au volume avec de l'eau déminéralisée (3.1.).

4. APPAREILLAGE

4.1 Verrerie :

4.1.1 fioles jaugées de 100, 200 et 1000 ml (classe A)
4.1.2 pipettes jaugées de 0,5 ; 1,0 ; 2,0 ; 5 ; 10 et 20 ml (classe A)
4.1.3 précautions : Avant toute utilisation, la verrerie doit être lavée avec de l'acide nitrique à 10 %, laissée en contact pendant 24 heures, puis rincée avec de l'eau déminéralisée.

4.2 Appareil de minéralisation (figure n°2)

4.3 Chauffe-ballon thermostaté

4.4 Pompe péristaltique

4.5 Générateur de vapeur froide

4.5.1 séparateur gaz-liquide

4.6 Desséchant

(membrane hygroscopique) parcouru par un courant d'air (fourni par un compresseur) et placé avant le détecteur

4.7 Spectrofluorimètre :

4.7.1 lampe à vapeur de mercure, réglée à la longueur d'onde de 254 nm
4.7.2 détecteur spécifique de fluorescence atomique

4.8 Micro-ordinateur :

4.8.1 logiciel réglant les paramètres du générateur de vapeur et du détecteur de fluorescence atomique et permettant l'étalonnage et l'exploitation des résultats.

4.8.2 imprimante archivant les résultats

4.9 Bouteille de gaz neutre (argon)

5. PREPARATION DE LA COURBE D'ETALONNAGE ET DES ECHANTILLONS

5.1 Courbe d'étalonnage : 0 ; 0,25 ; 0,5 et 1,0 µg/l

Introduire 0 ; 0,5 ; 1,0 ; 2,0 ml de la solution de mercure à 50 µg/l (3.16.) dans 4 fioles de 100 ml ; ajouter 1 % d'acide nitrique (3.2.) ;

compléter au volume avec de l'eau déminéralisée (3.1.).

5.2 Préparation des échantillons (figure n°2)

Le vin est minéralisé dans un appareil en verre-pyrex composé de trois éléments réunis entre eux par des rodages sphériques : un ballon de 250 ml, une chambre de récupération des vapeurs, un réfrigérant.

Placer à l'aide d'une pipette 20 ml de vin dans le ballon à réaction de 250 ml ; assembler l'appareil de minéralisation.

Ajouter très lentement 5 ml d'acide sulfurique (3.6.) et 10 ml d'acide nitrique (3.4.) ; laisser agir une nuit.

Chauffer lentement sous reflux jusqu'à disparition des vapeurs nitreuses ; laisser refroidir.

Récupérer les vapeurs condensées dans le ballon à réaction.

Rincer le dispositif avec de l'eau déminéralisée.

Transvaser le contenu du ballon à réaction dans une fiole jaugée de 100 ml. Ajouter la solution de permanganate de potassium (3.8.) jusqu'à persistance de la coloration.

Solubiliser le précipité (MnO_2) avec la solution réductrice (3.10.). Compléter au volume avec de l'eau déminéralisée (3.1.).

Faire un essai à blanc sur de l'eau déminéralisée.

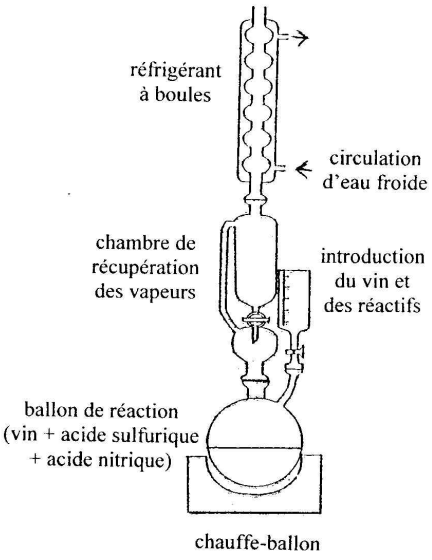


Figure n°2. Appareil de minéralisation du vin

6 MODE OPERATOIRE

6.1 Détermination analytique

Allumer le fluorimètre ; l'appareil est stabilisé au bout de 15 minutes. La pompe péristaltique aspire le blanc (3.3.), la solution de chlorure d'étain II (3.13.) et les étalons ou les échantillons (5.1.) ou (5.2.).
Vérifier qu'il se produit un bullage dans le séparateur gaz-liquide.
Présenter successivement les solutions d'étalonnage (5.1.) ; déclencher la programmation du générateur de vapeur. Le logiciel de l'ordinateur établit la courbe d'étalonnage (pourcentage de fluorescence en fonction de la concentration en mercure en µg/l).
Présenter ensuite les échantillons (5.2.).

6.2.Autocontrôles

Toutes les cinq déterminations, un blanc analytique et un étalon sont analysés afin de corriger une éventuelle dérive du spectrofluorimètre.

7. EXPRESSION DES RESULTATS

Les résultats sont donnés par le logiciel de l'ordinateur et exprimés en µg/l. Déduire la concentration en mercure du vin en µg/l en tenant compte de la dilution 1/5.

8. CONTROLE DES RESULTATS

Le contrôle qualité est effectué en plaçant, après la gamme d'étalonnage et tous les cinq échantillons, un matériau de référence dont on connaît avec certitude la teneur en mercure. Suivant les séries analytiques, le matériau de référence est un vin rouge, ou un vin blanc sec ou un vin blanc doux.

Une carte de contrôle est établie pour chaque matériau de référence utilisé. Les limites de contrôle ont été fixées à : +/- 2SR intra (SR intra : écart-type de reproductibilité).

Le calcul de l'incertitude, réalisé à partir des cartes de contrôle, a donné pour le vin rouge de référence : 3,4 +/- 0,8 µg/l et pour le vin blanc sec de référence : 2,8 +/- 0,9 µg/l.

9. BIBLIOGRAPHIE

CAYROL M., BRUN S., 1975. Dosage du mercure dans les vins. Feuillet Vert de l'O.I.V. n°371.

REVUELTA D., GOMEZ R., BARDON A., 1976. Dosage du mercure dans le vin par la méthode des vapeurs froides et spectrométrie d'absorption atomique. Feuillet Vert de l'O.I.V. n°494.

CACHO J., CASTELLS J.E., 1989. Determination of mercury in wine by flameless atomic absorption spectrophotometry. Atomic Spectroscopy, vol. 10, n°3.

STOCKWELL P.B., CORNS W.T., 1993. The role of atomic fluorescence spectrometry in the automatic environmental monitoring of trace element analysis. Journal of Automatic Chemistry, vol. 15, n°3, p 79-84.

SANJUAN J., COSSA D., 1993. Dosage automatique du mercure total dans les organismes marins par fluorescence atomique. IFREMER, Rapport d'activité.

AFNOR, 1997. Dosage du mercure total dans les eaux par spectrométrie de fluorescence atomique. XPT 90-113-2.

GAYE J., MEDINA B., 1998. Dosage du mercure dans le vin par analyse en flux continu et spectrofluorimétrie. Feuillet Vert de l'O.I.V. n°1070.

Méthode OIV-MA-AS323-07 **Méthode de type II**

Analyse multi-éléments dans le vin par spectrométrie à plasma induit couplée à un spectromètre de masse (SM-PCI)

(OIV-OENO 666-2023)

Abroge la résolution OIV/OENO 344/2010 – Type II pour les éléments listés sauf l'arsenic (type IV pour l'arsenic)

1. DOMAINE D'APPLICATION

La présente méthode peut être appliquée à l'analyse des éléments présents dans le vin dans la plage de concentration indiquée dans la liste suivante :

- aluminium, entre 0,25 et 5,0 mg/L,
- arsenic, entre 0,010 et 10 mg/L,
- bore, entre 10 et 40 mg/L,
- brome, entre 0,20 et 2,5 mg/L,
- cadmium, entre 0,001 et 0,040 mg/L,
- cobalt, entre 0,002 et 0,050 mg/L,
- cuivre, entre 0,10 et 2,0 mg/L,
- strontium, entre 0,30 et 1,0 mg/L,
- fer, entre 0,80 5,0 mg/L,
- lithium, entre 0,010 et 0,050 mg/L,
- magnésium, entre 50 et 300 mg/L,
- manganèse, entre 0,50 et 1,5 mg/L,
- nickel, entre 0,010 et 0,20 mg/L,
- plomb, entre 0,010 et 0,20 mg/L,
- rubidium, entre 0,50 et 1,2 mg/L,
- sodium, entre 5 et 30 mg/L,
- vanadium, entre 0,003 et 0,20 mg/L,
- zinc, entre 0,30 et 1,0 mg/L.

La technique de SM-PCI peut également être employée pour analyser d'autres éléments dans le vin.

De manière optionnelle, il peut s'avérer avantageux de pratiquer une minéralisation préalable de certains échantillons, par exemple pour les vins contenant plus de 100 g/L de sucres. Il est alors recommandé de réaliser une digestion à l'acide nitrique par micro-ondes en système fermé.

La méthode peut également être appliquée aux moûts, après minéralisation.

2. PRINCIPE

Dosage multi-éléments par spectrométrie à plasma induit couplée à un spectromètre de masse (SM-PCI).

Injection et nébulisation de l'échantillon dans un plasma formé par un courant à haute fréquence. Le plasma provoque la désolvatation, l'atomisation et l'ionisation des éléments présents dans l'échantillon. Extraction des ions à travers un système de vide doté de lentilles ioniques. Séparation des ions en fonction de leur rapport masse/charge dans un spectromètre de masse, par exemple un quadripôle. Détection et quantification des ions à travers un système multiplicateur d'électrons.

3. RÉACTIFS ET SOLUTIONS

3.1. Eau de qualité I, conforme à la norme ISO 3696.

3.2. Solution(s) certifiée(s) (par exemple 100 mg/L) contenant les métaux à analyser. Des solutions multi-éléments ou mono-élément peuvent être employées.

3.3. Solutions étalons internes (normalement 1 g/L). Exemples de solutions étalons internes pouvant être utilisées dans cette méthode : indium, scandium, tellure, rhodium, yttrium, iridium et le germanium (le tellure, l'yttrium et le germanium sont spécifiquement recommandés pour le dosage de l'arsenic).

3.4. Acide nitrique (HNO_3) ≥ 60 % v/v (impuretés métalliques ≤ 0,1 µg/L), n° CAS : 7697-37-2.

3.5. Argon avec une pureté minimale de 99,999 %, n° CAS : 7440-37-1.

3.6. Azote (teneur maximale en impuretés : H_2O≤ 3 mg/L, O2 ≤ 2 mg/L et CnHm ≤ 0,5 mg/L), n° CAS : 7727-37-9.

3.7. Alcool isopropylique avec une pureté minimale de 99,8 %, n° CAS : 67-63-0.

REMARQUE : Le laboratoire démontrera, grâce à l'étude des blancs des réactifs, l'absence de contamination des éléments à analyser pour les volumes des ajouts spécifiés dans la méthode.

La concentration des solutions, ainsi que les étalons internes, sont donnés à titre de référence.

Préparation des solutions étalons

La concentration en acide nitrique dans les étalons et dans la dilution finale des échantillons de vin doit être identique. La concentration en acide nitrique à utiliser dépend de la tolérance du dispositif de SM-PCI (habituellement entre 1 et 5 % v/v). Les préparations suivantes sont données à titre d'exemple.

3.8. Solution mère (5 mg/L)

Dans un tube de 10 mL (4.4), introduire 500 mL d'eau (3.1), 500 µL de la solution (3.2) et ajouter 100 µL d' HNO_3 (3.4). Compléter à 10 mL avec de l'eau (3.1) et homogénéiser.

3.9. Solution étalon interne (1 mg/L)

À l'aide des micropipettes (4.3), introduire 25 mL d'eau (3.1), 50 µL de la solution d'indium ou de rhodium (3.3) et 500 µL d' HNO_3 (3.4) dans un tube de 50 mL (4.5). Compléter à 50 mL avec de l'eau (3.1) et homogénéiser.

3.10. Solution étalon interne (pour un ajout en ligne de l'étalon interne)

La solution étalon interne peut être introduite via un canal séparé de la pompe péristaltique, puis mélangée avec l'échantillon et les solutions d'étalonnage au moyen d'une pièce en Y.

Préparer cette solution en diluant la solution 3.9, en fonction du diamètre interne (DI) des tubes d'admission, de manière à ce que, dans le mélange final, la concentration de l'étalon interne soit, par exemple, de 10 µg/L.

3.11. Solutions étalons de la gamme d'étalonnage

Elles sont préparées par dilution de la solution mère (3.8). Adapter le domaine d'étalonnage en fonction de la dilution effectuée sur l'échantillon ou l'équipement utilisé.

Utiliser les micropipettes de 1000 µL et 100 µL (4.3).

Ajouter l'étalon interne de manière à ce que sa concentration finale soit égale aussi bien dans les solutions étalons que dans les échantillons (10 µg/L dans cet exemple). Lorsque l'étalon interne est ajouté en ligne, comme expliqué au point 3.10., ne pas ajouter d'étalon interne dans la solution d'étalonnage.

Ces solutions étalons peuvent également être préparées de manière gravimétrique.

4. MATÉRIEL ET APPAREILLAGE

4.1. Spectromètre de masse à plasma à couplage inductif avec ou sans cellule de réaction/collision.
4.2. Échantillonneur automatique (en option).
4.3. Micropipettes de 1000 µL, 500 µL et 100 µL.
4.4. Tubes à essai en plastique gradués de 10 mL avec bouchon.
4.5. Tubes à essai en plastique gradués de 50 mL avec bouchon.
4.6. Système de digestion à revêtement de téflon ou bain d'eau pouvant être utilisé jusqu'à 90 °C.

5. PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Dégazer les échantillons contenant du CO_2 par barbotage à l'azote (3.6), par ultrasons ou par toute autre méthode appropriée.

À l'aide d'une micropipette (4.3), introduire 5 mL d'eau (3.1), 500 µL de vin, 100 à 500 µL d'HNO3 (3.4) et 100 µL de solution étalon interne (3.9) (sauf en cas

d'introduction en ligne de l'étalon interne, comme indiqué au point 3.10) dans un tube de 10 mL (4.4). Compléter avec de l'eau (3.1) et homogénéiser.

Lorsque les étalons sont préparés de manière gravimétrique, la dilution finale de l'échantillon doit également être obtenue de manière gravimétrique.

Pour certains éléments, une dilution supérieure pourra être nécessaire, du fait de leur teneur naturellement élevée dans l'échantillon.

Cas particuliers :

A. Brome

Le brome (Br) est doté d'un fort potentiel ionisant et son ionisation dans le plasma peut être incomplète à cause de la présence de concentrations élevées d'autres éléments ayant un potentiel ionisant faible dans les vins. Il peut en résulter une quantification incorrecte du brome. Une dilution au 1/50 est recommandée afin d'éviter cet effet (au cas où une autre dilution est utilisée, confirmer les résultats en vérifiant le recouvrement après un ajout).

B. Arsenic

Lors du dosage de l'arsenic par SM-PCI, l'éthanol contenu dans l'échantillon augmente l'ionisation de l'arsenic dans le plasma, conduisant à une surestimation de sa concentration. Il existe diverses alternatives pour contrebalancer cet effet ; les trois options suivantes sont indiquées à titre d'exemples :

B.1. Utilisation de tellure (Te) comme étalon interne

Du fait de son énergie ionisante élevée, le tellure corrige l'effet matrice lors du dosage de l'arsenic. Du Te est ajouté aux étalons et aux échantillons, soit en ligne comme indiqué au point 3.10, soit au cours de la préparation des étalons et des échantillons, comme indiqué aux point 3.11 et 5 respectivement.

B.2. Ajout d'alcool isopropylique aux étalons et aux échantillons

Pour masquer l'effet matrice de l'éthanol du vin dans l'ionisation de l'arsenic, ajouter 200 µL d'alcool isopropylique (3.7) lors de la préparation des solutions d'échantillon avant de compléter à niveau.

Ajouter également de l'alcool isopropylique (3.7) aux solutions étalons (3.11) afin d'obtenir la même concentration que dans les solutions d'échantillon.

Alternativement, si l'étalon interne est ajouté en ligne au moyen d'une pièce en Y, de l'alcool isopropylique (3.7) peut être ajouté à la solution étalon interne (3.10) au lieu d'être ajouté lors de la préparation des solutions étalons et d'échantillon. Pour calculer la concentration en alcool isopropylique (3.7) dans le mélange final, il

convient de prendre en compte le diamètre interne des tubes d'admission de l'échantillon et de l'étalon interne. Il est recommandé que la concentration en alcool isopropylique dans le mélange final soit de 2 % (v/v). La concentration en alcool isopropylique (3.7) dans le mélange final peut être calculé en appliquant la formule suivante :

$$Cf = Co \times F$$

où :

- Cf : concentration en alcool isopropylique (3.7) dans le mélange final
- Co : concentration en alcool isopropylique (3.7) ajouté à la solution étalon interne (3.10)
- F : facteur de dilution obtenu à partir de la formule suivante :

$$F = \frac{(\frac{DI_1}{2})^2}{\left|(\frac{DI_2}{2})^2 + (\frac{DI_2}{2})^2\right|}$$

où :

DI_1: diamètre interne du tube d'admission de l'étalon interne

DI_2: diamètre interne du tube d'admission de l'échantillon

B.3. Minéralisation des échantillons

Les conditions suivantes sont fournies à titre d'exemple :

Préparation des échantillons : ôter le bouchon avec soin pour veiller à ce que le vin ne soit pas contaminé par des débris de liège. Pipeter les échantillons de vin directement dans la bouteille, sans passer par un contenant intermédiaire. À l'aide d'une micropipette (4.3), introduire 2,5 mL de vin, 2,5 mL d' HNO_3 concentré (3.4), 2 mL d'eau (3.1) et 500 µL de solution étalon interne (3.9) dans un tube de 50 mL (4.4).

Attendre quelques minutes car une réaction exothermique peut causer des débordements.

Sceller les tubes hermétiquement ou les équiper d'un système permettant les reflux. Les solutions sont placées dans un système chauffant (4.6) avec le thermostat à 90 °C pendant 180 minutes.

Une fois la digestion achevée, laisser les tubes refroidir à température ambiante.

Compléter le volume à 50 mL avec de l'eau (3.1) et homogénéiser.

6. MODE OPÉRATOIRE

Cette procédure est donnée à titre d'exemple.

Conformément aux instructions du fabricant de l'instrument, mettre l'appareil sous tension (pompe en fonctionnement et plasma activé).

Nettoyer le système pendant 20 minutes avec de l'HNO_3 à 2 % v/v (3.4).

S'assurer que le dispositif fonctionne correctement. Analyser un blanc et la série de solutions étalons dans l'ordre croissant des concentrations, ainsi que les contrôles de qualité internes établis par chaque laboratoire.

Élément	m/z*
Aluminium	27
Arsenic	75/91 (pour l'AsO, formé par réaction avec l'oxygène)
Bore	11
Brome	79
Cadmium	114
Cobalt	59
Cuivre	63
Strontium	88
fer	56/57
Lithium	7
Magnésium	24
Manganèse	55
Nickel	60
Plomb	Moyenne de 206, 207 et 208
Rubidium	85
Sodium	23
Vanadium	51
Zinc	64

* Le tableau ci-dessus est donné à titre d'exemple. D'autres isotopes peuvent être nécessaires en fonction de l'équipement.

En cas d'utilisation d'un équipement sans cellule de collision/réaction, des équations de correction pourront être nécessaires pour certains éléments.

REMARQUE :

Des interférences spectrales peuvent perturber le dosage de certains éléments, comme par exemple :

- Interférences isobariques (deux éléments de masse similaire ; par exemple 115 pour l'In et le Sn). Dans ce cas, le choix de l'isotope étudié doit être adapté.
- Interférences attribuables aux charges doubles et aux oxydes : les teneurs en oxydes et en charges doubles peuvent être contrôlées avant l'analyse au moyen de solutions témoins. L'optimisation des paramètres de l'équipement (débit de nébulisation, réglages des lentilles, position de la torche, du nébuliseur, etc.) permet de réduire ces interférences.
- Interférences polyatomiques, qui peuvent être corrigées par le biais de l'utilisation d'équations de correction voire même de cellules de collision-réaction.

7. RÉSULTATS

Le logiciel peut calculer directement les résultats.

Les résultats doivent être exprimés dans les mêmes unités que les limites maximales établies dans les règlementations.

Obtenir, en interpolant dans la courbe d'étalonnage, la concentration de l'élément dans les échantillons dilués. Calculer la concentration des éléments dans l'échantillon en utilisant l'équation suivante :

$$C = \frac{C_m x V_t}{V_m}$$

où :

- C = concentration de l'élément dans l'échantillon
- C_m= concentration de l'élément dans l'échantillon dilué
- V_t= volume final de la solution de mesure, en mL
- V_m= volume de l'aliquote de vin, en mL

8. FIDÉLITÉ

Les résultats des paramètres statistiques de l'essai collaboratif sont présentés en annexe A.

Le tableau 1 représente l'écart type relatif (en %) correspondant à la répétabilité et à la reproductibilité (%RSDr et %RSDR) de la méthode. (*) C = Concentration

Tableau 1. Écarts types relatifs de la répétabilité et de la reproductibilité

Élément	Concentration	$\%RSD_r$	$\%RSD_R$
Aluminium	0,25 - 5,0 mg/L	4	10
Bore	10 - 40 mg/L	3,8	6,3

Brome	0,20 - 1,0 mg/L	4,1	16,3
	≥ 1,0 - 2,5 mg/L	2,1	8,0
Cadmium	0,001 - 0,020 mg/L	0,06 C*+0,18	10
	≥ 0,020 - 0,040 mg/L	1,5	10
Cobalt	0,002 - 0,050 mg/L	3,2	13,2
Cuivre	0,10 - 0,50 mg/L	3,8	11,4
	≥ 0,50 - 2,0 mg/L	2,0	11,4
Strontium	0,30 - 1,0 mg/L	2,5	7,5
Fer	0,80 - 1,0 mg/L	4,2	15,7
	≥ 1,0 - 5,0 mg/L	4,2	7,8
Lithium	0,010 - 0,050 mg/L	7	12
Magnésium	50 - 300 mg/L	2	6
Manganèse	0,50 - 1,5 mg/L	3	7
Nickel	0,010 - 0,20 mg/L	5	8
Plomb	0,010 - 0,050 mg/L	8	7
	≥ 0,050 - 0,20 mg/L	2	7
Rubidium	0,50 - 1,2 mg/L	3	6
Sodium	5 - 10 mg/L	2	10
	≥ 10 - 30 mg/L	0,3 C*–2,5	10
Vanadium	0,003 - 0,010 mg/L	8	10
	≥ 0,010 - 0,20 mg/L	3	10
Zinc	0,30 - 1,0 mg/L	5	12

Les résultats des paramètres statistiques d'une validation interne pour l'arsenic sont présentés en annexe B.

9. BIBLIOGRAPHIE

- ISO 5725:1994, Fidélité des méthodes d'essais – Détermination de la répétabilité et de la reproductibilité d'une méthode d'essai normalisée par essais interlaboratoires.
- ISO 17294:2004, Qualité de l'eau Application de la spectrométrie de masse avec plasma à couplage inductif (ICP-MS) Partie 1 : lignes directrices générales.
- Almeida, C. M. R., Vasconcelos, M. T. S. D., Barbaste, M. et Medina, B., Anal. Bioanal Chem., vol. 374, 2002, p. 314-322

- Castiñeira, M. M., Brandt, R., von Bohlen, A. et Jakubowski, N., Frenesius J. Anal. Chem., vol. 370, 2001, p. 553-558.
- Castiñeira, M. M., Brandt, R., von Bohlen, A., Jakubowski, N. et Andersson, J. T., J. Agric Food Chem., vol. 52, 2004, p. 2962-2974.
- Almeida, C. M. R et Vasconcelos, M. T. S. D., J. Agric. Food Chem., vol. 51, 2003, p. 3012-3023.
- Almeida, C. M. R et Vasconcelos, M. T. S. D., J. Agric Food Chem., vol. 51, 2003, p. 4788-4798.
- Pérez-Jordan, M. Y., Soldevilla, J., Salvador, A., Pastor, A. et de la Guardia, M., J. Anat. At. Spectrom., vol. 13, 1998, p. 33-39.
- Perez-Trujillo, J.-P., Barbaste, M. et Medina, B., Anal. Lett., vol. 36(3) 2003, p. 679-697.
- Taylor, V. F., Longerich, H. P. et Greenough, J. D., J. Agric Food Chem., vol. 51, 2003, p. 856-860.
- Thiel, G., Geisler, G., Blechschmidt, I. et Danzer, K., Anal. Bioanal. Chem., vol. 378, 2004, p. 1630-1636.

ANNEXE A RÉSULTATS DES ESSAIS COLLABORATIFS

La présente méthode a été vérifiée grâce à deux essais collaboratifs, en évaluant la fidélité conformément à la norme IS0 5725. La justesse de la méthode a été évaluée au travers d'études de recouvrement.

Premier essai collaboratif

Huit échantillons (A, B, C, D, E, F, MH1 et MH2) ont été utilisés, avec les provenances suivantes :

- trois échantillons de vin rouge, avec et sans ajout,
- trois échantillons de vin blanc, avec et sans ajout,
- deux échantillons de mélange synthétique hydroalcoolique (MH), préparé avec de l'éthanol et de l'eau.

L'échantillon hydroalcoolique MH1 ayant présenté des problèmes d'instabilité lors de l'essai, ses résultats n'ont pas été pris en compte.

	MH2	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**
Métal (mg/L)	Mélange hydro-alcoolique	Vin rouge 2	Vin rouge 3	Vin blanc 2	Vin blanc 3	Vin rouge	Vin blanc
Aluminium	5	0,5	2	2	1	Pas d'ajout	Pas d'ajout
Cadmium	0,001	0,005	0,02	0,05	0,01	Pas d'ajout	Pas d'ajout
Strontium	0,300	Pas d'ajout	Pas d'ajout	Pas d'ajout	Pas d'ajout	Pas d'ajout	Pas d'ajout

Lithium	0,020	0,01	0,02	0,04	0,01	Pas d'ajout	Pas d'ajout
Magnésium	50	100	200	50	25	Pas d'ajout	Pas d'ajout
Manganèse	0,500	0,5	1	1	0,5	Pas d'ajout	Pas d'ajout
Nickel	0,070	0,025	0,2	0,1	0,1	Pas d'ajout	Pas d'ajout
Plomb	0,010	0,05	0,1	0,15	0,05	Pas d'ajout	Pas d'ajout
Rubidium	1,0	Pas d'ajout	Pas d'ajout	Pas d'ajout	Pas d'ajout	Pas d'ajout	Pas d'ajout
Sodium	20	10	10	20	5	Pas d'ajout	Pas d'ajout
Vanadium	0,070	0,025	0,2	0,1	0,1	Pas d'ajout	Pas d'ajout
Zinc	0,010	0,05	0,1	0,15	0,05	Pas d'ajout	Pas d'ajout

Deuxième essai collaboratif

Seize échantillons (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O et P) ont été utilisés, avec les provenances suivantes :

- quatre échantillons de vin rouge, avec et sans ajout,
- quatre échantillons de porto, avec et sans ajout,
- six échantillons de vin blanc, avec et sans ajout,
- deux échantillons de champagne.

Quantités ajoutées aux échantillons

Échantillons	Code	Ajout	B	Br	Co	Cu	Fe
			mg/L	mg/L	µg/L	mg/L	mg/L
Vin blanc	F-N	Pas d'ajout	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	C-I	Ajout 1	5,0	0,5	5,0	5,0	1,0
	A-O	Ajout 2	10,0	1,0	10,0	1,0	2,0
Vin liquoreux	B-K	Pas d'ajout	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	E-L	Ajout 3	15,0	1,5	20,0	1,5	3,0
Vin rouge	D-M	Pas d'ajout	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	H-J	Ajout 4	20,0	2,0	50,0	2,0	5,0
Vin effervescent	G-P	Pas d'ajout	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

PARAMÈTRES DE FIDÉLITÉ (tableaux 1 à 17) :

Les valeurs de Horratr et HorratR ont été obtenues à l'aide de l'équation de Horwitz en tenant compte de la modification de Thompson pour les concentrations inférieures à 120 µg/L.

Tableau 1 : Aluminium (mg/L)

ÉCHANTILLON	Nb. labos	Acceptés	Valeur assignée	Sr	r	RSD_r (%)	Horwitz RSD_r (%)	$Horrat_r$	SR	R	RSD_R (%)	Horwitz RSD_R (%)	$Horrat_R$
A	11	10	0,68	0,020	0,06	2,9	11	0,26	0,077	0,22	11	17	0,66
B	11	9	2,1	0,043	0,12	2,0	9,4	0,22	0,21	0,61	10	14	0,71
C	11	9	2,1	0,032	0,09	1,5	9,5	0,16	0,21	0,59	10	14	0,69
D	11	10	1,2	0,041	0,12	3,4	10	0,34	0,10	0,29	8,3	16	0,56
E	11	10	0,34	0,014	0,04	4,1	12	0,34	0,029	0,08	8,5	19	0,46
F	11	10	0,27	0,006	0,02	2,2	13	0,17	0,028	0,08	10	20	0,52
MH2	11	8	5,2	0,26	0,73	5,0	8,2	0,60	0,56	1,6	11	13	0,86

Tableau 2 : Bore (mg/L)

ÉCHANTILLON	Nb. labos	Acceptés	Valeur assignée	Sr	r	RSD_r (%)	Horwitz RSD_r (%)	$Horrat_r$	SR	R	RSD_R (%)	Horwitz RSD_R (%)	$Horrat_R$
A-O	8	6	18	0,77	2,2	4,3	6,8	0,62	0,94	2,69	5,2	10	0,50
B-K	8	4	4,5	0,27	0,76	6,0	8,4	0,72	0,40	1,14	8,9	13	0,70
C-I	8	4	13	0,31	0,89	2,4	7,2	0,33	0,33	0,94	2,5	11	0,24
D-M	8	7	11	0,26	0,74	2,4	7.4	0,31	1,1	3,11	10	11	0,90
E-L	8	5	21	0,47	1,3	2,2	6.7	0,33	0,85	2,43	4,0	10	0,40
F-N	8	5	8,3	0,43	1,2	5,2	7.7	0,68	0,47	1,34	5,7	12	0,48
G-P	7	4	3,1	0,094	0,27	3,0	8.9	0,34	0,18	0,51	5,8	14	0,43
H-J	8	5	31	1,0	3,0	3,2	6.3	0,54	1,6	4,43	5,2	9,6	0,52

Tableau 3 : Brome (mg/L)

ÉCHANTILLON	Nb. labos	Acceptés	Valeur assignée	Sr	r	RSD_r (%)	Horwitz RSD_r (%)	$Horrat_r$	SR	R	RSD_R (%)	Horwitz RSD_R (%)	$Horrat_R$
A-O	6	2	1,21	0,028	0,08	2,3	10,3	0,22	0,041	0,12	3,4	15,6	0,22

B-K	5	2	0,19	0,006	0,02	2,9	13,6	0,21	0,0043	0,012	2,3	20,5	0,11
C-I	6	3	0,81	0,017	0,05	2,1	10,9	0,19	0,062	0,18	7,7	16,5	0,47
D-M	6	4	0,38	0,017	0,05	4,5	12,2	0,37	0,066	0,19	17,4	18,5	0,94
E-L	6	3	1,72	0,030	0,09	1,7	9,7	0,17	0,22	0,62	12,8	14,8	0,86
F-N	6	3	0,22	0,014	0,04	6,4	13,3	0,48	0,046	0,13	20,9	20,1	1
H-J	6	2	2,30	0,061	0,17	2,7	9,3	0,28	0,092	0,26	4	14,1	0,28

Tableau 4 : Cadmium (µg/L)

ÉCHANTILLON	Nb. labos	Acceptés	Valeur assignée	Sr	r	RSD_r (%)	Horwitz RSD_r (%)	$Horrat_r$	SR	R	RSD_R (%)	Horwitz RSD_R (%)	$Horrat_R$
A	12	11	6	0,2	0,6	3,3	15	0,22	1	3	17	22	0,77
B	12	11	16	0,4	1	2,5	15	0,17	2	6	13	22	0,59
C	12	9	40	0,4	1	1,0	15	0,07	3	8	7,5	22	0,34
D	12	10	10	0,3	0,8	3,0	15	0,20	0,9	3	9,0	22	0,41
E	8	7	0,3	0,20	0,6	67	15	4,47	0,20	0,67	67	22	3,05
F	8	6	0,3	0,04	0,1	13	15	0,87	0,20	0,45	67	22	3,05
MH2	9	5	0,9	0,08	0,2	8,9	15	0,59	0,10	0,29	11	22	0,50

Tableau 5 : Cobalt (µg/L)

ÉCHANTILLON	Nb. labos	Acceptés	Valeur assignée	Sr	r	RSD_r (%)	Horwitz RSD_r (%)	$Horrat_r$	SR	R	RSD_R (%)	Horwitz RSD_R (%)	$Horrat_R$
A-O	10	6	22	0,5	1	2,3	15	0,15	2	6	9,1	22	0,41
B-K	10	6	8	0,3	0,9	3,8	15	0,25	1	4	13	22	0,59
C-I	10	8	19	0,4	1	2,1	15	0,14	3	7	16	22	0,73
D-M	10	3	3	0,07	0,2	2,3	15	0,15	0,1	0,3	3,3	22	0,15
E-L	10	8	27	1	3	3,7	15	0,25	3	9	11	22	0,50
F-N	10	7	12	0,5	2	4,2	15	0,28	1	4	8,3	22	0,38
G-P	9	5	2	0,2	0,5	10	15	0,67	0,3	0,8	15	22	0,68
H-J	10	6	49	0,5	1	2,3	15	0,15	6	18	12	22	0,55

Tableau 6 : Cuivre (mg/L)

ÉCHANTILLON	Nb. labos	Acceptés	Valeur assignée	Sr	r	RSD_r (%)	Horwitz RSD_r (%)	$Horrat_r$	SR	R	RSD_R (%)	Horwitz RSD_R (%)	$Horrat_R$
A-O	10	8	1,1	0,013	0,040	1,2	10	0,12	0,11	0,32	10	16	0,63
B-K	10	8	0,21	0,006	0,020	2,9	13	0,22	0,021	0,060	10	20	0,50
C-I	10	7	0,74	0,009	0,030	1,2	10	0,12	0,046	0,13	6,2	17	0,36
D-M	10	8	0,14	0,007	0,020	5,0	14	0,36	0,015	0,043	11	22	0,50
E-L	10	9	1,7	0,061	0,17	3,6	7,8	0,5	0,16	0,46	9,0	15	0,60
F-N	10	7	0,16	0,006	0,020	3,8	14	0,27	0,029	0,083	18	21	0,86
G-P	9	4	0,042	0,004	0,010	9,5	15	0,63	0,006	0,017	14	22	0,64
H-J	10	7	2,1	0,018	0,050	0,86	9,5	0,09	0,24	0,69	11	14	0,79

Tableau 7 : Strontium (µg/L)

ÉCHANTILLON	Nb. labos	Acceptés	Valeur assignée	Sr	r	RSD_r (%)	Horwitz RSD_r (%)	$Horrat_r$	SR	R	RSD_R (%)	Horwitz RSD_R (%)	$Horrat_R$
A	12	11	1091	33	93	3,0	10	0,30	78	222	7,2	16	0,45
B	12	8	1139	66	188	5,8	10	0,58	69	195	6,1	16	0,38
C	12	9	328	6	18	1,8	13	0,14	19	54	5,8	19	0,31
D	12	10	313	7	20	2,2	13	0,17	22	61	7,0	19	0,37
E	12	10	1176	28	80	2,4	10	0,24	86	243	7,3	16	0,46
F	12	10	293	3	9	1,0	13	0,08	22	62	7,5	19	0,39
MH2	12	9	352	7	19	2,0	12	0,17	24	69	6,8	19	0,36

Tableau 8 : Fer (mg/L)

ÉCHANTILLON	Nb. labos	Acceptés	Valeur assignée	Sr	r	RSD_r (%)	Horwitz RSD_r (%)	$Horrat_r$	SR	R	RSD_R (%)	Horwitz RSD_R (%)	$Horrat_R$
A-O	10	6	3,2	0,017	0,05	0,53	8,9	0,06	0,23	0,66	7,2	13	0,55
B-K	10	6	1,5	0,085	0,24	5,7	9,9	0,58	0,11	0,31	7,3	15	0,49
C-I	10	5	2,1	0,036	0,10	1,7	9,4	0,18	0,18	0,51	8,6	14	0,61
D-M	10	5	3,1	0,033	0,094	1,1	8,9	0,12	0,29	0,83	9,4	14	0,67
E-L	10	5	4,3	0,120	0,34	2,8	8,5	0,33	0,29	0,83	6,7	13	0,52

F-N	10	6	1,1	0,051	0,15	4,6	10	0,46	0,16	0,46	15	16	0,94
G-P	9	6	0,83	0,024	0,07	2,9	11	0,26	0,14	0,40	17	16	1,06
H-J	10	7	7,8	0,180	0,52	2,3	7,8	0,29	1,2	3,52	15	12	1,25

Tableau 9 : Lithium (µg/L)

ÉCHANTILLON	Nb. labos	Acceptés	Valeur assignée	Sr	r	RSD_r (%)	Horwitz RSD_r (%)	$Horrat_r$	SR	R	RSD_R (%)	Horwitz RSD_R (%)	$Horrat_R$
A	11	10	34	2	5	5,9	15	0,39	4	11	11	22	0,50
B	11	11	42	3	8	7,1	15	0,47	4	12	10	22	0,45
C	11	11	47	1	4	2,1	15	0,14	5	13	9,8	22	0,45
D	11	11	18	1	4	5,6	15	0,37	2	7	14	22	0,64
E	11	11	25	1	3	4,0	15	0,27	3	9	12	22	0,55
F	11	9	9	0,3	1	3,8	15	0,25	0,6	2	7,2	22	0,33
MH2	11	7	22	1	3	4,6	15	0,31	1	3	5,3	22	0,24

Tableau 10 : Magnésium (mg/L)

ÉCHANTILLON	Nb. labos	Acceptés	Valeur assignée	Sr	r	RSD_r (%)	Horwitz RSD_r (%)	$Horrat_r$	SR	R	RSD_R (%)	Horwitz RSD_R (%)	$Horrat_R$
A	10	7	182	2,9	8,1	1,6	4,3	0,37	9,3	26	5,1	7,3	0,70
B	10	6	280	3,9	11	1,4	4,5	0,31	6,0	17	2,1	6,9	0,30
C	10	7	104	2,4	6,9	2,3	5,3	0,43	6,8	19,25	6,5	8,0	0,81
D	10	6	85	1,4	4,0	1,7	5,4	0,31	2,2	6,1	2,6	8,2	0,32
E	10	7	94	2,2	6,2	2,3	5,3	0,43	5,5	16	5,9	8,1	0,73
F	10	7	65	0,95	2,7	1,5	5,6	0,27	3,8	11	5,9	8,5	0,69
MH2	10	7	51	0,90	2,5	1,8	5,8	0,31	2,4	6,9	4,7	8,9	0,53

Tableau 11 : Manganèse (mg/L)

ÉCHANTILLON	Nb. labos	Acceptés	Valeur assignée	Sr	r	RSD_r (%)	Horwitz RSD_r (%)	$Horrat_r$	SR	R	RSD_R (%)	Horwitz RSD_R (%)	$Horrat_R$
A	11	10	1,3	0,014	0,040	1,1	10	0,11	0,13	0,37	10	15	0,67

B	11	9	1,8	0,14	0,40	7,8	9,7	0,80	0,20	0,56	11	15	0,73
C	11	8	1,5	0,028	0,080	1,9	9,9	0,19	0,084	0,24	5,6	15	0,37
D	11	8	1,0	0,035	0,10	3,5	11	0,32	0,049	0,14	4,9	16	0,31
E	11	9	0,84	0,019	0,050	2,3	11	0,21	0,057	0,16	6,8	16	0,43
F	11	9	0,59	0,015	0,040	2,5	11	0,23	0,031	0,090	5,3	17	0,31
MH2	11	8	0,52	0,029	0,080	5,6	12	0,47	0,037	0,10	7,1	18	0,39

Tableau 12 : Nickel (µg/L)

ÉCHANTILLON	Nb. labos	Acceptés	Valeur assignée	Sr	r	RSD_r (%)	Horwitz RSD_r (%)	$Horrat_r$	SR	R	RSD_R (%)	Horwitz RSD_R (%)	$Horrat_R$
A	11	10	40	2	6	5,0	15	0,33	5	13,90	13	22	0,59
B	12	10	194	7	20	3,6	14	0,26	17	48,96	8,8	21	0,42
C	12	8	148	4	10	2,7	14	0,19	5	15,12	3,4	21	0,16
D	12	8	157	4	12	2,6	14	0,19	8	23,10	5,1	21	0,24
E	11	8	15	0,6	2	4,0	15	0,27	1	3,33	6,7	22	0,30
F	12	9	66	1	4	1,5	15	0,10	4	10,58	6,1	22	0,28
MH2	11	7	71	5	14	7,0	15	0,47	4	11,41	5,6	22	0,25

Tableau 13 : Plomb (µg/L)

ÉCHANTILLON	Nb. labos	Acceptés	Valeur assignée	Sr	r	RSD_r (%)	Horwitz RSD_r (%)	$Horrat_r$	SR	R	RSD_R (%)	Horwitz RSD_R (%)	$Horrat_R$
A	12	9	59	1	4	1,7	15	0,11	3	9	5,1	22	0,23
B	12	10	109	2	6	1,8	15	0,12	8	23	7,3	22	0,33
C	12	9	136	3	9	2,2	14	0,16	13	37	9,6	22	0,44
D	12	9	119	2	6	1,7	15	0,11	5	13	4,2	22	0,19
E	12	10	13	1	3	7,7	15	0,51	1	4	7,7	22	0,35
F	12	9	92	1	4	1,1	15	0,07	4	11	4,4	22	0,20
MH2	12	10	13	1	3	7,7	15	0,51	1	3	7,7	22	0,35

Tableau 14 : Rubidium (µg/L)

ÉCHANTILLON	Nb. labos	Acceptés	Valeur assignée	Sr	r	RSD_r (%)	Horwitz RSD_r (%)	$Horrat_r$	SR	R	RSD_R (%)	Horwitz RSD_R (%)	$Horrat_R$
A	11	6	717	14	41	2,0	11	0,18	13	36	1,8	17	0,11
B	11	7	799	25	70	3,1	11	0,28	30	86	3,8	17	0,22
C	11	8	677	10	27	1,5	11	0,14	34	96	5,0	17	0,29
D	11	7	612	18	51	2,9	11	0,26	18	50	2,9	17	0,17
E	11	9	741	19	53	2,6	11	0,24	66	187	8,9	17	0,52
F	11	9	617	10	28	1,6	11	0,15	43	123	7,0	17	0,41
MH2	11	7	1128	10	28	0,89	10	0,09	64	181	5,7	16	0,36

Tableau 15 : Sodium (mg/L)

ÉCHANTILLON	Nb. labos	Acceptés	Valeur assignée	Sr	r	RSD_r (%)	Horwitz RSD_r (%)	$Horrat_r$	SR	R	RSD_R (%)	Horwitz RSD_R (%)	$Horrat_R$
A	10	9	19	0,59	1,7	3,1	6,8	0,46	2,2	5,7	12	10	1,20
B	10	9	20	1,3	3,6	6,5	6,7	0,97	2,2	6,3	11	10	1,10
C	10	7	28	0,33	0,93	1,2	6,4	0,19	1,9	5,4	6,8	9,7	0,70
D	10	8	11	0,24	0,68	2,2	7,4	0,30	1,1	3,0	10	11	0,91
E	10	8	9,8	0,19	0,53	1,9	7,5	0,25	0,89	2,5	9,1	11	0,83
F	10	8	6,1	0,093	0,26	1,5	8,1	0,19	0,74	2,1	12	12	1,00
MH2	10	8	24	1,8	5,0	7,5	6,6	1,14	2,6	7,2	11	9,9	1,11

Tableau 16 : Vanadium (µg/L)

ÉCHANTILLON	Nb. labos	Acceptés	Valeur assignée	Sr	r	RSD_r (%)	Horwitz RSD_r (%)	$Horrat_r$	SR	R	RSD_R (%)	Horwitz RSD_R (%)	$Horrat_R$
A	12	11	46	1	3	2,2	15	0,15	5	13	11	22	0,50
B	12	11	167	5	15	3,0	14	0,21	19	54	11	21	0,52
C	12	11	93	3	8	3,2	15	0,21	12	33	13	22	0,59
D	12	9	96	3	8	3,1	15	0,21	8	22	8,3	22	0,38
E	10	7	3	0,2	0,7	6,7	15	0,45	0,3	0,9	10	22	0,45

F	10	8	3	0,2	0,6	6,7	15	0,45	0,2	0,7	6,7	22	0,30
MH2	12	9	11	0,3	1	2,7	15	0,18	0,9	3	8,2	22	0,37

Tableau 17 : Zinc (µg/L)

ÉCHANTILLON	Nb. labos	Acceptés	Valeur assignée	Sr	r	RSD_r (%)	Horwitz RSD_r (%)	$Horrat_r$	SR	R	RSD_R (%)	Horwitz RSD_R (%)	$Horrat_R$
A	11	8	405	22	61	5,4	12	0,45	45	128	11	18	0,61
B	11	9	1327	49	138	3,7	10	0,37	152	429	11	15	0,73
C	11	9	990	14	41	1,4	11	0,13	86	243	8,7	16	0,54
D	11	9	1002	28	79	2,8	11	0,25	110	310	11	16	0,69
E	11	9	328	13	37	4,0	13	0,31	79	224	24	19	1,26
F	11	9	539	15	42	2,8	12	0,23	61	172	11	18	0,61
MH2	11	8	604	72	204	12	11	1,09	89	251	15	17	0,88

ANNEXE B : RÉSULTATS D'UNE VALIDATION INTERNE POUR L'ARSENIC

DOSAGE DE L'ARSENIC DANS LE VIN PAR SM-PCI CONFORMÉMENT À LA MÉTHODE OIV-OENO 344-2010 EN UTILISANT LE TELLURE COMME ÉTALON INTERNE

Les échantillons ont été préparés et analysés en double en 5 jours non consécutifs. Le dosage a été réalisé en utilisant 2 systèmes de SM-PCI différents.

Les échantillons ont été préparés conformément à la méthode OIV-OENO 344-2010, en diluant 1 mL de vin dans 20 mL d' HNO_3 à 3 %, aucun des échantillons n'ayant été soumis à une minéralisation préalable.

Étalon interne : Te, ajouté en ligne.

Résultats de la validation :

Produit	Valeur de référence (µg/L)	Résultat (µg/L)	Ajout (µg/L)	Recouvrement (%)	RSD_r%	**RSD_R%**
Vin rouge		< 5	10	101	3,27	8,1
			200	100	0,98	3,1
			1000	102	3,1	5,8
Vin blanc		< 5	10	99	1,8	5,1
			200	102	2,8	4,7
			1000	101	2,2	5,8

Vin de liqueur		< 5	10	102	0,9	5,4
			200	104	1,4	5,2
			1000	103	1,1	4,4
Vin effervescent		< 5	10	101	3,2	6,8
			200	101	0,8	4,3
			1000	103	4,1	5,8
*Vin rouge (MRC) MAPA 2021	39,0 ± 2,17	39,77	N/A	102	3,8	1,1
*[1]Vin blanc (MRC) MAPA 2021	59,5 ± 3,7	58,16	N/A	98	2,0	1,9

***** Matériel de référence certifié (MRC) de vin rouge produit, au travers d'un essai d'intercomparaison, par le ministère de l'Agriculture, de la pêche et de l'alimentation de l'Espagne (MAPA) en 2021.

*[1] Matériel de référence certifié (MRC) de vin blanc produit, au travers d'un essai d'intercomparaison, par le ministère de l'Agriculture, de la pêche et de l'alimentation de l'Espagne (MAPA) en 2021.

Méthode OIV-MA-AS323-08 Méthode type II

Dosage de résidus de pesticides dans le vin après extraction par la méthode Quechers

(OIV-OENO 436-2012)

1 -INTRODUCTION

La présente méthode d'analyse est déclinée de plusieurs textes de référence et a été validée par un laboratoire [1] [2].

2 –DOMAINE D'APPLICATION

La présente méthode définit les modalités d'extraction des résidus de pesticides dans le vin par la méthode QuEChERS *(Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe)* et l'analyse des extraits obtenus par GC/MS et/ou LC/MS-MS.

3 -PRINCIPE

L'échantillon est extrait par de l'acétonitrile suivi d'un partage liquide-liquide par addition de sulfate de magnésium, de chlorure de sodium et de sels de citrate tampons. L'extrait est ensuite purifié à l'aide d'amino-adsorbant (SPE dispersive avec du APS et du sulfate de magnésium). Les extraits sont acidifiés par addition d'une petite quantité d'acide formique, afin d'améliorer leur stabilité au stockage. L'extrait final peut être utilisé directement pour les analyses de détermination par GC/MS et LC/MS-MS.
Pour les analyses en LC/MS-MS seule, la SPE dispersive n'est pas indispensable.

4. REACTIFS ET PRODUITS

4.1. Généralités et sécurité

Les pesticides sont potentiellement toxiques et donc doivent être manipulés dans des conditions de sécurité protégeant les analystes notamment la préparation des solutions mères à partir de matières actives commerciales.

Prendre toutes les précautions nécessaires pour éviter une éventuelle contamination de l'eau, solvants et autres produits.

Sauf spécification contraire, les réactifs utilisés seront de qualité analytique reconnue.

4.2 Eau, qualité CLHP

4.3 Acétonitrile [75-05-8] qualité CLHP

4.4 Méthanol [67-56-1], qualité CLHP

4.5 Sulfate de magnésium anhydre [7487-88-9], particules

4.6 Sulfate de magnésium, anhydre [7487-88-9], poudre fine

4.7 Chlorure de sodium [7647-14-5]

4.8 Citrate d'hydrogène disodique sesquihydraté [6132-05-4]

4.9 Citrate trisodique dihydraté [6132-04-3]

4.10 Mélange de sels tampons pour l'étape d'extraction :

Peser 4 g de sulfate de magnésium anhydre particules, 1 g de chlorure de sodium, 1 g de citrate trisodique dihydraté et 0,5 g de citrate d'hydrogène disodique sesquihydraté dans un flacon. Le mélange préalable des sels permet d'éviter la formation de cristaux.

4.11 Solution d'acide formique dans l'acétonitrile

Diluer 0,5 ml d'acide formique jusqu'à 10 ml avec de l'acétonitrile

4.12 Adsorbant à amines primaires et secondaires APS

Par exemple Bondesil-PSA® 40 µm Varian n° 12213023 1

4.13. Solutions étalons internes et solutions étalons de contrôle qualité.

Plusieurs composés peuvent être utilisés comme étalons internes : par exemple le triphénylphosphate [115-86-6] et le triphénylméthane [519-73-3].

L'étalon de contrôle qualité permet de disposer d'un indicateur de rendement d'extraction des résidus des échantillons : par exemple le tris(1,3 dichloroisopropyl)phosphate ou TCPP.

Il convient de préparer des solutions de concentration appropriée.

Exemple de préparation : solution de TCPP à 10mg/l

Dans une fiole jaugée de 50mL, placer 1 ml de solution mère à 500mg/l de tris(1,3-dichloroisopropyl) phosphate compléter avec de l'acétonitrile.

4.14. Gammes d'étalonnage ; solutions étalons de différentes matières actives.

4.14.1. Solutions mères étalons

Préparer des solutions mères à partir de matières actives à 500mg/l dans un solvant adapté (acétone par exemple).

Conservation à -18°C.

4.14.2. Solutions filles

Mélange de matières actives selon l'application (CPG ou LC) et selon les besoins des gammes d'étalonnage.

4.14.3. Gamme d'étalonnage

Etalons dans l'acétonitrile

A partir des solutions filles une gamme d'étalonnage est préparée afin d'établir une droite d'étalonnage de 20 à 500 µg/l.

Etalons dans matrice vin

A partir d'un vin exempt de matières actives, une matrice blanche est préparée selon le protocole 6.1.1 , puis supplémentée par des quantités croissantes de matières actives afin d'établir une droite d'étalonnage de 20 à 500 µg/l.

5. Matériels

5.2. Verrerie et matériels volumétriques de laboratoire :

5.2.1. Flacons de 100 ml avec bouchon
5.2.2. Tubes à centrifuger à usage unique de 50 ml et de 12 ml avec bouchons à vis
5.2.3. Eprouvettes graduées de 10 ml de classe A
5.2.4. Fioles jaugées de 10 mL, 50 ml et 100 ml de classe A
5.2.5. Instruments volumétriques à piston à volumes variables de 30 µl à 1000 µl vérifiés selon ISO 8655-6
5.2.6. Seringues de prélèvements de 2 ml

5.3. Microfiltres nylon de porosité 0.45 µm

5.4. Balance analytique

5.5. Dispositif d'agitation à grande vitesse (type Vortex)

5.6. Centrifugeuse pour tubes de 50 ml et 12 ml, capable d'atteindre 3000 g.

5.7. Système LC/MS-MS, muni d'une interface d'ionisation par électrospray.

5.8. Système CPG/MS, muni de dispositifs d'injection et de détection appropriés (par exemple trappe d'ions ou triple quad).

6. MODE OPERATOIRE

6.1. Préparation des échantillons

6.1.1. Extraction par la méthode QuEchERS

Dans un tube à centrifuger, peser 10 g ou mesurer 10ml d'échantillon (vin), ajouter 10 mL d'acétonitrile et 100 µl d'une solution de tris(1,3-dichloroisopropyl)phosphate à 10 mg/L. Agiter vigoureusement pendant 1 minute. Verser la préparation de sels (4.10) dans le tube à centrifuger contenant le mélange liquide.

Agiter vigoureusement pendant 1min. Centrifuger pendant 5 min à 3000g.

1mL de solution environ est filtrée sur filtre Nylon 25mm/45µm pour ensuite procéder à l'analyse en LC-MS.

6.1.2. Purification de l'extrait à l'aide d'amino-adsorbant («SPE dispersive» avec du APS)

6 ml de phase d'acétonitrile obtenus en 6.1.1. sont transvasés dans un tube à centrifuger contenant 900mg de sulfate de magnésium, poudre fine (4.6) et 150mg de APS (4.12).Fermer le tube et le secouer vigoureusement pendant 30 s, puis le centrifuger pendant 5 min à 3 000g. Sans attendre, isoler et acidifier l'extrait ainsi purifié par un ajout de 50µl de solution d'acide formique (4.11).

L'analyse GC-MS peut être réalisée.

NOTE : pour minimiser les effets matrice, il est possible d'utiliser une solution d'agents « protectants » ajoutée dans les extraits d'échantillons et dans la gamme d'étalonnage [3]

Préparation de 10 ml de solution d'agents « protectants »:
Peser 15 mg de sorbitol, 300mg d' éthylglycerol et 100 mg de gluconolactone ,
Ajouter 2ml d'eau et completer à 10ml avec de l' acétonitrile.

20µl de cette solution est ajoutée dans chaque flacon contenant les solutions d'étalonnage (1 ml) et les extraits des échantillons (1 ml).

6.2. Résultats et Calculs

6.2.1. Identification des résidus

Les résidus sont identifiés à partir de plusieurs paramètres :

- leur temps de rétention
- leur spectre de masse
- l'abondance relative des ions fragments (il est recommandé de disposer de 1 à 2 transistions en SM/SM et 2 à 3 ions en SM).

6.2.2. Quantification

L'analyse des extraits obtenus en 6.1.1 et 6.1.2 peut être réalisée à l'aide de divers instruments, paramètres et colonnes. Il convient toutefois d'adapter les conditions pour chaque composé en fonction des instruments utilisés afin d'obtenir les meilleures sensibilités.

A partir des solutions étalons, on prépare une gamme d'étalonnage à 5 points afin de vérifier la linéarité pour chaque matière active.

La concentration en mg/kg (ou mg/L) pour chaque substance identifiée est

directement obtenue à partir de la droite d'étalonnage.

6.2.3. Rendement d'extraction

Le rendement peut se vérifier par l'addition dans les échantillons d'un étalon de contrôle qualité, le TCPP par exemple (voir 6.1.1).

Il doit être compris entre 70 et 120%.

Les résultats de rendement ne sont pas pris en compte pour corriger les teneurs en résidus dans les vins mais permettent de valider le mode opératoire.

7. FIDELITE DE LA METHODE

Les résultats de la validation réalisée en suivant MA-F-AS1-08-FIDMET[4] et MA-F-AS1-09-PROPER [5], sont indiqués dans le tableau ci-après.
Les taux de récupération moyens sont compris entre 70% et 120% (les niveaux de dopage effectués ont couvert un domaine de concentration allant de 0,020mg/L à 0.200mg/L)

7.1 Répétabilité (exprimée en CVr%)

La repétabilité (exprimée en CVr%) est en moyenne égale à 10%.

7.2 Reproductibilité

La reproductibilté (CV_R%) est en moyenne égale à 30%.

	%Taux recup.	CV_r%	CV_R%	Horrat
Metalaxyl	89	7	26	1,1
Chlorphyriphos ethyl	81	13	23	1,0
Tebuconazole	99	9	32	1,3
Cyprodinyl	93	9	29	1,1
Tebufenozide	102	11	28	1,2
Fludioxonil	101	7	40	1,4
Benalaxyl	98	9	29	1,1
Cyproconazole	92	11	31	1,3
Tebufenpyrad	95	10	31	1,2
Pyraclostrobine	116	6	29	1,2
Vinclozoline	84	9	28	1,1
Mepanipyrin	82	11	30	1,1
Boscalid	95	7	28	1,1
Iprovalicarbe	106	7	33	1,2
Iprodione	108	10	27	1,1
Procymidone	100	11	34	1,2
Pyrimethanil	75	12	27	1,0
Carbendazime	113	11	41	1,6
Fenbuconazole	94	6	48	2,0
Fenitrothion	90	13	36	0,7
Metrafenone	93	8	19	0,7
Penconazole	109	8	35	1,1
Fluzilazole	93	8	37	1,3
Oxadixyl	86	8	37	1,3
Azoxystrobine	84	8	30	1,2
Dimethomorphe	90	9	36	1,4
Fenhexamide	87	8	22	0,8

L'ensemble des résultats des essais inter laboratoires ayant conduit aux données de fidélité sont présentés en **annexe A**

8. BIBLIOGRAPHIE

[1]P. Paya, J. Oliva, A. Barba, M. Anastassiades, D. Mack, I. Sigalova, B. Tasdelen ; « Analysis of pesticides residues using the Quick Easy Cheap Affective Rugged and Safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectroscopy detection », *Anal Bioanal Chem,* 2007.

[2]EN 15662 : 2008 – Aliments d'origine végétale - Méthode polyvalente de détermination des résidus des pesticides par CG-SM et SL/MS/MS avec extraction/partition avec de l'acétonitrile et nettoyage par SPE dispersés – Méthode QuEchERS ; janvier 2009 ; AFNOR

[3]K. Mastovska, Steven J. Lehotay, and M. Anastassiades ; "Combination of analyte protectants to overcome matrix effects in routine GC analysis of pesticides residues in food matrixes", *Anal. Chem.* 2005, 77, 8129-8137.

[4]MA-F-AS1-08-FIDMET, OIV : Fidélité des méthodes analytiques (résolution oeno 5/99).

[5]MA-F-AS1-09-PROPER, OIV : Protocole pour la planification, la conduite et l'interprétation des études de performance des méthodes d'analyse (résolution 6/2000).

FV 1410 : Résultats de l'étude inter-laboratoire

ANNEXE A

RESULTATS DE L'ETUDE DE FIDELITE

Ce document présente les résultats de l'étude de validation de la méthode de dosage des résidus de pesticides dans le vin après extraction Quechers (FV 1340).

L'étude a été menée selon les documents OIV MA-F-AS1-08-FIDMET et MA-F-AS1-09-PROPER

1- Laboratoires participants

Seize laboratoires ont participé à l'étude :

- Laboratoire INTER RHONE
  France
- INSTITUT FUR HYGIENE UND UMWELT
  Allemagne
- LABORATORIO AGROENOLOGICO UNIVERSIDAD CATOLICA DEL MAULE Chili
- AGRICULTURAL OFFICE OF BORSOD-ABAUJ-ZEMPLEN COUNTY
  Hongrie
- PESTICIDE RESIDUE ANALYTICAL LABORATORY
  Hongrie
- AUSTRIAN AGENCY FOR HEALTH AND FOOD SAFETY
  Autriche
- COMPETENCE CENTER FOR PLANT PROTECTION PRODUCTS
  Autriche
- LABORATOIRE DEPARTEMENTAL DE LA SARTHE
  France
- LABORATOIRE PHYTOCONTROL
  France
- BENAKI PHYTOPATHOLOGICAL INST. PESTICIDES RESIDUES LAB.
  Grèce
- LABORATOIRE DUBERNET OENOLOGIE
  France
- ARPAL DIPARTIMENTO LA SPEZIA
  Italie
- ARPA VENETO – SERVIZIO LABORATORI VERONA
  Italie
- ARPALAZIO – SEZIONE DI LATINA
  Italie

- ANALAB CHILE S.A.
  Chili
- LABORATORIO REGIONAL DE LA CCAA DE LA RIOJA
  Espagne
- SCL LABORATOIRE DE BORDEAUX
  France
- ARPA – FVG DIP. DI PORDENONE
  Italie

2- Echantillons - Matières actives analysées

Pour cette étude 12 échantillons ont été proposés :

- quatre vins rouges : A, B, G, H
- quatre vins blancs : C, D, I, J
- deux vins de Porto : E, Kdeux muscat : F, L

27 matières actives devaient être dosées, réparties dans les 12 échantillons en quantités couvrant un domaine de concentration de 0, 015 mg/L à 0,200 mg/L (cf tableau ci-après).

	A – G *mg/L*	**B – H** *mg/L*	**C – I** *mg/L*	**D – J** *mg/L*	**E – K** *mg/L*	**F – L** *mg/L*
Metalaxyl	0.050	0.040	0.100	0.020		
Chlorphyriphos éthyl	0.100	0.040	0.200	0.020		
Tebuconazole	0.025	0.080	0.050	0.040		
Cyprodinyl	0.050	0.040	0.100	0.020		
Tebufenozide	0.050		0.100			
Fludioxonil	0.025		0.050			
Benalaxyl	0.052	0.041	0.104	0.021		
Cyproconazole	0.054	0.086	0.108	0.043		
Tebufenpyrad	0.050	0.040	0.100	0.020		
Pyraclostrobine	0.050		0.100			
Vinclozoline		0.040		0.020	0.050	0.100
Mepanipyrin		0.080		0.040	0.025	0.050

Boscalid		0.080		0.040	0.100	0.200
Iprovalicarbe					0.050	0.100
Iprodione		0.076		0.038	0.047	0.094
Procymidone		0.020		0.010		
Pyrimethanil		0.040		0.020		
Carbendazime				0.054		0.027
Fenbuconazole		0.080		0.040		
Fenitrothion		0.040		0.020		
Metrafenone		0.040		0.020		
Penconazole		0.016		0.008		
Fluzilazole		0.040		0.020		
Oxadixyl	0.050				0.025	
Azoxytrobine	0.100				0.050	
Dimethomorphe	0.100				0.050	
Fenhexamide	0.100				0.050	

4- Evaluation statistique

L'ensemble des résultats bruts est présenté dans le FV 1410.
Dans chaque tableau, les valeurs éliminées ou aberrantes apparaissent en caractères différents.

4.1 Valeurs éliminées

Certaines valeurs sont éliminées avant l'évaluation dans les cas suivants :

- pour évaluer la répétabilité de la méthode nous avons utilisé le principe des doubles échantillons en aveugle : certains laboratoires ont donné seulement un résultat sur un des échantillons de la paire, cette valeur est éliminée (notées dans les tableaux « **xxx** »)
- lorsque les résultats sont exprimés sous la forme « inférieur à » (notés dans les tableaux « **< *xxx*** »)

LES TESTS DE COCHRAN ET DE GRUBBS ONT ETE APPLIQUES SUCCESSIVEMENT AUX COUPLES DE VALEURS POUR ELIMINER LES VARIANCES ABERRANTES D'UNE PART ET LES VALEURS MOYENNES EXTREMES ABERRANTES D'AUTRE PART.

Les valeurs éliminées par ces deux tests apparaissent dans les tableaux sous la forme ***« xxx »***

4.2 Répétabilité-Reproductibilité

Les paramètres de répétabilité et de reproductibilté sont regroupés dans le **tableau 2**.
Dans ce tableau sont indiqués pour chaque substance :

- n : nombre d'essais retenus
- moyenne : moyenne des résultats
- TR% : taux de récupération moyen
- CVr% : répétabilité en % de la moyenne
- CV_R% : reproductibilité en % de la moyenne
- PR CV_R% : reproductibilité en % calculée par l'équation de Horwitz (PR $CV\% = 2C^{-0,1505}$)
- HoR : valeur de HorRaT (CV_R% / PR CV_R%)

Les critères d'évaluation choisis sont :

- taux de recupération compris entre 70% et 120%.
- les résultats obtenus sous conditions de reproductibilité sont comparés à ceux prédits selon le modèle de Horwitz, en utilisant le rapport de HorRat.Les valeurs de reproductibilité sont jugées satisfaisantes lorsque ce rapport est inférieur ou égal à 2.
- la répétabilité est considérée satisfaisante lorsqu'elle ne dépasse pas la valeur de 0,66x Horwitz.

TABLEAU 2 : Valeurs de fidélité

		Vin rouge 1	Vin rouge 2	Vin blanc 1	Vin blanc 2	Porto	Muscat
metalaxyl	n	12	13	13	11	8	
	moyenne	0,051	0,041	0,105	0,033	0,014	
	TR%	102	103	82	69		
	CV_r%	6	8	6	9	5	
	CV_R%	26	26	17	26	33	
	$PRCV_R$%	25	26	22	27	30	
	HoR	1,1	1	0,9	0,6	1,1	
chlorphyriphos	n	9	12	11	11		
	moyenne	0,073	0,031	0,166	0,018		
	TR%	73	78	83	90		
	CV_r%	11	16	11	15		
	CV_R%	30	27	18	18		
	$PRCV_R$%	24	27	21	29		
	HoR	1,3	1	0,9	0,6		
tebuconazole	n	12	14	15	14		
	moyenne	0,025	0,078	0,05	0,04		
	TR%	100	98	100	100		
	CV_r%	6	10	10	9		
	CV_R%	37	30	30	31		
	$PRCV_R$%	28	23	25	26		
	HoR	1,3	1, 3	1,2	1,2		
cyprodinyl	n	15	14	13	14		
	moyenne	0,045	0,036	0,098	0,023		
	TR%	90	90	94	96		
	CV_r%	19	6	3	3		
	CV_R%	36	34	13	31		
	$PRCV_R$%	26	26	23	28		
	HoR	1,4	1,3	0,6	1,1		
tebufenozide	n	10		11			
	moyenne	0,049		0,106			
	TR%	98		106			
	CV_r%	16		6			
	CV_R%	25		30			
	$PRCV_R$%	25		22			

	HoR	1		1,3			

TABLEAU 2 : Valeurs de fidélité

		Vin rouge 1	Vin rouge 2	Vin blanc 1	Vin blanc 2	Porto	Muscat
fludioxonil	n	10		11	10		
	moyenne	0,026		0,064	0,015		
	TR%	104		98	100		
	CV_r%	4		8	10		
	CV_R%	47		30	43		
	$PRCV_R$%	28		24	30		
	HoR	1,7		1,2	1,4		
benalxyl	n	12	12	12	12		
	moyenne	0,046	0,04	0,099	0,023		
	TR%	88	98	95	110		
	CV_r%	8	7	7	14		
	CV_R%	37	32	25	21		
	$PRCV_R$%	25	26	23	28		
	HoR	1,4	1,2	1,1	0,8		
cyproconazote	n	14	15	14	14		
	moyenne	0,049	0,08	0,095	0,042		
	TR%	91	93	95	98		
	CV_r%	23	7	7	7		
	CV_R%	36	32	25	33		
	$PRCV_R$%	25	23	23	26		
	HoR	1,4	1,4	1,1	1,3		
tebufenpyrad	n	15	14	14	12		
	moyenne	0,042	0,038	0,094	0,021		
	TR%	84	95	94	105		
	CV_r%	21	6	5	6		
	CV_R%	33	31	26	32		
	$PRCV_R$%	26	31	26	32		
	HoR	1,3	1,2	1,1	1,1		
Pyraclostrobine	n	8		9			
	moyenne	0,055		0,121			
	TR%	110		121			
	CV_r%	6		5			
	CV_R%	31		26			

	$PRCV_R$%	25		22			
	HoR	1,2		1,2			

TABLEAU 2 : Valeurs de fidélité

		Vin rouge 1	Vin rouge 2	Vin blanc 1	Vin blanc 2	Porto	Muscat
Vinclozoline	n		10		9	11	11
	moyenne		0,031		0,020	0,039	0,08
	TR%		78		100	78	80
	CV_r%		8		10	14	4
	CV_R%		35		26	27	22
	$PRCV_R$%		24		29	26	23
	HoR		1,4		0,9	1	0,9
Mepanipyrin	n		12		13	10	11
	moyenne		0,063		0,028	0,022	0,046
	TR%		79		70	88	92
	CV_r%		8		24	5	7
	CV_R%		35		36	20	28
	$PRCV_R$%		24		27	29	25
	HoR		1,4		1,3	0,7	1,1
Boscalid	n	11	12		11	12	11
	moyenne	0,022	0,097		0,034	0,083	0,174
	TR%	105	121		85	83	87
	CV_r%	12	7		6	6	4
	CV_R%	45	30		26	16	17
	$PRCV_R$%	28	23		27	23	21
	HoR	1,6	1,3		1	0,7	0,8
Iprovalicarbe	n	11	12			13	13
	moyenne	0,016	0,016			0,052	0 ?1
	TR%	107	114			104	100
	CV_r%	9	8			5	6
	CV_R%	39	38			28	27
	$PRCV_R$%	30	30			25	23
	HoR	1,3	1,3			1,1	1,2
Iprodione	n		10		10	10	8
	moyenne		0,079		0,039	0,053	0,101
	TR%		104		103	113	107

	CV_r%		10		7	10	13
	CV_R%		35		24	25	17
	$PRCV_R$%		23		26	25	22
	HoR		1,5		0,9	1	0,8

TABLEAU 2 : Valeurs de fidélité

		Vin rouge 1	Vin rouge 2	Vin blanc 1	Vin blanc 2	Porto	Muscat
Procymidone	n		11		11		
	moyenne		0,018		0,011		
	TR%		90		110		
	CV_r%		12		10		
	CV_R%		34		34		
	$PRCV_R$%		29		31		
	HoR		1,2		1,1		
Pyrimethanil	n		15	10	14		
	moyenne		0,036	0,011	0,027		
	TR%		60	46	120		
	CV_r%		9	20	7		
	CV_R%		26	31	25		
	$PRCV_R$%		26	31	28		
	HoR		1	1	0,9		
Carbendazime	n				8		9
	moyenne				0,057		0,033
	TR%				106		120
	CV_r%				11		10
	CV_R%				36		45
	$PRCV_R$%				25		27
	HoR				1,5		1,7
Fenbuconazole	n		8		7		
	moyenne		0,067		0,042		
	TR%		84		105		
	CV_r%		6		5		
	CV_R%		45		50		
	$PRCV_R$%		24		26		
	HoR		1,9		2		
Fenitrothion	n		11		10		
	moyenne		0,034		0,019		
	TR%		85		95		

	CV_r%		16		10		
	CV_R%		31		40		
	$PRCV_R$%		27		29		
	HoR		1,2		1,4		

TABLEAU 2 : Valeurs de fidélité

		Vin rouge 1	Vin rouge 2	Vin blanc 1	Vin blanc 2	Porto	Muscat
Metrafenone	n		7		7		
	moyenne		0,038		0,018		
	TR%		95		90		
	CV_r%		8		7		
	CV_R%		18		19		
	$PRCV_R$%		26		29		
	HoR		0,7		0,6		
Penconazole	n		14		13		
	moyenne		0,017		0,009		
	TR%		106		113		
	CV_r%		8		8		
	CV_R%		31		38		
	$PRCV_R$%		30		33		
	HoR		1		1,2		
Fluzilazole	n		13		13		
	moyenne		0,035		0,019		
	TR%		88		95		
	CV_r%		6		9		
	CV_R%		37		36		
	$PRCV_R$%		26		29		
	HoR		1,4		1,2		
Oxadixyl	n	7				10	
	moyenne	0,04				0,023	
	TR%	80				92	
	CV_r%	10				5	
	CV_R%	18				31	
	$PRCV_R$%	26				28	
	HoR	0,7				1,1	
Azoxystrobine	n	12				13	

	moyenne	0,078				0,045	
	TR%	78				90	
	CV_r%	10				6	
	CV_R%	29				31	
	$PRCV_R$%	23				26	
	HoR	1,2				1,2	

TABLEAU 2 : Valeurs de fidélité

		Vin rouge 1	Vin rouge 2	Vin blanc 1	Vin blanc 2	Porto	Muscat
Dimethomorphe	n	12		9	9	13	
	moyenne	0,086		0,019	0,019	0,047	
	TR%	86				94	
	CV_r%	6		8	14	8	
	CV_R%	30		41	44	29	
	$PRCV_R$%			29	29	25	
	HoR			1,4	1,5	1,2	
Fenhexamide	n	11		11	10	11	
	moyenne	0,083		0,026	0,025	0,039	
	TR%	83		96	93	78	
	CV_r%	7		9	10	7	
	CV_R%	31		18	19	18	
	$PRCV_R$%	23		28	28	26	
	HoR	1,3		0,6	0,7	0,7	

Méthode OIV-AS323-09 Méthode type IV

Détermination de la natamycine dans le vins

OIV-OENO 461-2012

1. INTRODUCTION

Différentes méthodes de détermination de la natamycine sont utilisées, reposant principalement sur la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) couplée à la détection à réseau de diodes (DAD) ou à la spectrométrie de masse (MS). L'estimation des limites de performance - limite de détection et de quantification – est de la responsabilité des laboratoires accrédités (par exemple selon la norme ISO / EN 17025 / 2005) qui appliquent les recommandations de l'OIV (OENO 7 / 2000, E-AS1-10-LIMDET) ou d'autres directives normatives.

En l'absence d'estimation interlaboratoire fiable du niveau critique, une limite de prise de décision de 5 µg/l est provisoirement adoptée jusqu'à ce qu'une estimation fiable interlaboratoire ou d'autres indicateurs robustes soient disponibles.

2. MÉTHODES

2.1 Détermination de la natamycine (pimaricine) dans le vin par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution

2.1.1 OBJET

Cette méthode décrit une méthode d'analyse pour la détermination de la natamycine (pimaricine) dans le vin. Le niveau de la natamycine est exprimé en microgrammes par litre (µg/l) de vin. Une validation interne a été effectuée avec des solutions de solvant, du vin rouge et du vin blanc sur la plage de concentration allant de 5 à 2 600 µg/l.

2.1.2 PRINCIPE

Le niveau de natamycine dans le vin est déterminé par injection directe de l'échantillon dans un système de détection par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution (LC-HR/MS). La

quantification est réalisée avec la méthode de dosage par ajouts dosés. L'échantillon est d'abord analysé une première fois afin d'obtenir une estimation de la concentration en natamycine. L'analyse est ensuite répétée avec ajouts dosés de solutions étalons mieux adaptées à la concentration en natamycine de l'échantillon.

2.1.3 RÉACTIFS

2.1.3.1 Analytes

2.1.3.1.1 Natamycine (Pimaricine) > 95 %

2.1.3.2 Produits chimiques

2.1.3.2.1 Méthanol de qualité HPLC par fluorescence (n° CAS 67-56-1).

2.1.3.2.2 Eau purifiée pour laboratoire, par exemple de qualité EN ISO 3696 (eau pour utilisation en laboratoire de chimie analytique - spécification et méthodes d'essai [ISO 3696 :1987]).

2.1.3.2.3 Acide acétique, 100 %, (n° CAS 64-19-7)

2.1.3.3 Solutions

2.1.3.3.1 Solution mère de natamycine (1 000 µg/ml)

Peser à 0,1 mg près environ 10 mg de natamycine (2.1.3.1.1) dans une fiole jaugée ambrée de 10 ml et compléter jusqu'au repère avec la solution méthanol:eau:acide acétique (2.1.3.3.4). Boucher et soniquer. Calculer la concentration réelle en microgrammes de natamycine par millilitre de solution.

2.1.3.3.2 Solution de travail n°1 : natamycine (10 µg/ml)

Introduire à la pipette 100 µl de solution mère (2.1.3.3.1) dans une fiole jaugée ambrée de 10 ml et compléter jusqu'au repère avec la solution méthanol:eau:acide acétique (2.1.3.3.4).

2.1.3.3.3 Solution de travail n°2 : natamycine (0,5 µg/ml)

Introduire à la pipette 500 µl de solution de travail n°1 (2.1.3.3.2) dans une fiole jaugée ambrée de 10 ml et compléter jusqu'au repère avec la solution méthanol:eau:acide acétique (2.1.3.3.4).

2.1.3.3.4 Solution de méthanol:eau:acide acétique (50:47:3, v/v)

Avec une éprouvette graduée, verser 500 ml de méthanol (2.1.3.2.1) dans une fiole jaugée de 1 L. Ajouter 470 ml d'eau (2.1.3.2.2) et agiter pour mélanger. Ajouter 30 ml d'acide acétique (2.1.3.2.3) et bien agiter.

2.1.3.3.5 Méthanol, 3 % d'acide acétique

Avec une éprouvette graduée, verser 30 ml d'acide acétique (2.1.3.2.3) dans une fiole jaugée de 1 L. Compléter jusqu'au repère avec du méthanol (2.1.3.2.1) et bien agiter.

2.1.3.3.6 Eau, 3 % d'acide acétique

Avec une éprouvette graduée, verser 30 ml d'acide acétique (2.1.3.2.3) dans une fiole jaugée de 1 L. Compléter jusqu'au repère avec de l'eau (2.1.3.2.2) et bien agiter.

2.1.4 APPAREILLAGE

REMARQUE : Un instrument ou appareil n'est répertorié que s'il est spécialisé ou conçu en fonction d'un cahier des charges particulier, la verrerie et les équipements de laboratoire habituels étant supposés disponibles.

2.1.4.1 Chromatographe en phase liquide (LC)

Équipé d'un injecteur automatique, d'une boucle d'injection de 100 µL et d'un spectromètre de masse haute résolution.

2.1.4.1.1 Colonne LC

Capable d'obtenir des pics de natamycine reproductibles et capable de distinguer les pics de natamycine des pics parasites provenant de la matrice de l'échantillon et/ou des solvants utilisés.

REMARQUE : Les conditions opératoires devront être optimisées en fonction du type de matériel utilisé pour l'analyse.

2.1.4.1.2 Analyse HPLC

La colonne et les paramètres suivants ont été jugés appropriés :

Colonne :	Waters Sunfire C18, 150 x 2,1 mm, 3,5 µm
Température de la colonne :	30 ºC
Débit :	0,25 ml/min
Volume d'injection :	20 µL
Phase mobile A :	Eau:acide acétique, 97:3 (v/v) (2.1.3.3.6)
Phase mobile B :	Méthanol:acide acétique, 97:3 (v/v) (2.1.3.3.5)
Temps :	30 mn
Plateau de l'échantillonneur automatique:	8 ºC

Gradient :

Temps (mn)	Phase mobile A (%)	Phase mobile B (%)
0	90	10
25	10	90
27	10	90
27.1	90	10
30	90	10

2.1.4.2 Détection par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution (LC-HR/MS)

Mode d'ionisation :	électrospray positif
Résolution de masse :	m/z/□m/z
Cible AGC :	Plage dynamique étendue
Temps d'injection max. :	50 ms

Plage de balayage :	m/z 480-670
Gaz de balayage :	60 L/min
Gaz auxiliaire :	5 L/min
Tension de pulvérisation :	3,75 V
Natamycine :	m/z 666.31069 $[M+H]^+$. ion de
confirmation m/z 503.22672	
Temps de rétention :	16,5 min

2.1.5 PROCÉDURE EXPÉRIMENTALE

Les échantillons doivent être agités pour assurer leur homogénéité avant de procéder au sous-échantillonnage.

2.1.5.1 Tamisage

Pour chaque vin, introduire à la pipette 2 ml d'échantillon dans deux tubes de centrifugation Eppendorf de 2 ml. Ajouter respectivement 0 µl et 20 µl de solution de travail n°2 de natamycine à 0,5 µg/ml (2.1.3.3.3) dans les tubes. Ceci équivaut à un ajout de 0 µg/l et 5 µg/l de natamycine. Agiter les tubes pendant une minute, puis centrifuger à 14 000 t/mn pendant 10 mn. Filtrer une partie aliquote sur un filtre en PTFE de 0,2 µm dans un tube ambré de 2 ml. Analyser par LC-HR/MS (section 2.1.6) et évaluer la concentration de natamycine dans l'échantillon (section 2.1.7).

Si la concentration estimée de natamycine est inférieure à 5 µg/l, indiquer pour résultats < 5 µg/l. Si la concentration estimée de natamycine est supérieure à 5 µg/l, procéder comme indiqué à la section 2.1.5.2.

2.1.5.2 Quantification

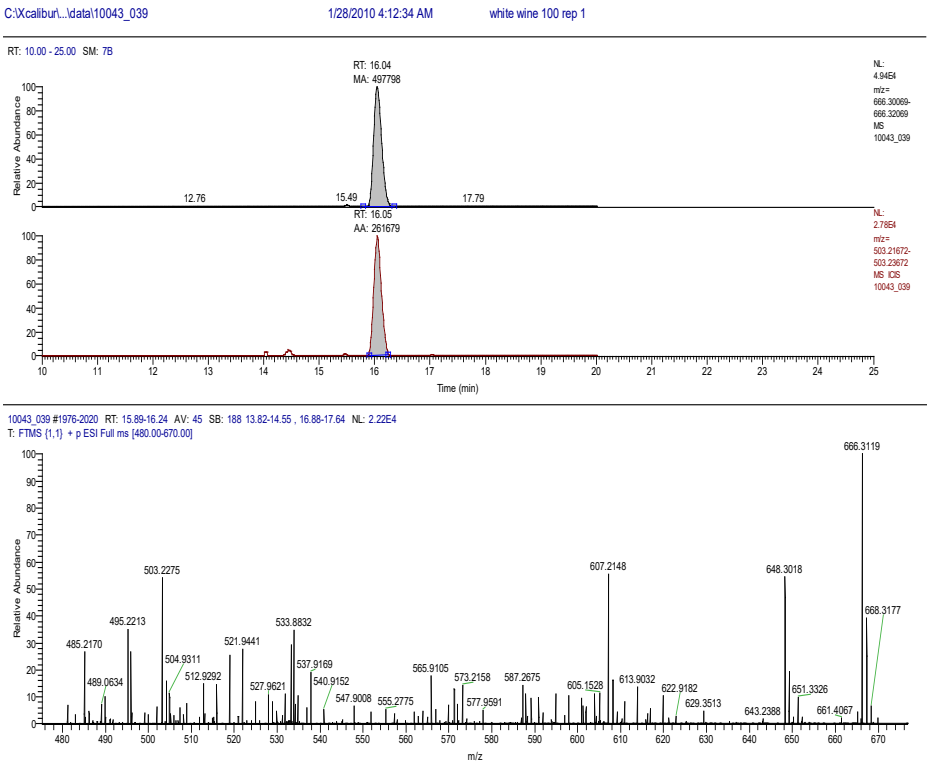
Détermination de la natamycine dans des échantillons dont la concentration estimée est supérieure à 5 µg/l. Introduire à la pipette 2 ml de vin dans cinq tubes pour centrifugation Eppendorf de 2 ml et ajouter respectivement 0 µl, 5 µl, 10 µl, 20 µl et 50 µl de solution de travail n°1 de natamycine (2.1.3.3.2) dans les tubes. Ceci équivaut à un ajout de 0 µg/l, 25 µg/l, 50 µg/l, 100 µg/l et

250 µg/l de natamycine. Agiter les tubes pendant une minute, puis centrifuger à 14 000 t/mn pendant 10 mn. Filtrer une partie aliquote sur un filtre en PTFE de 0,2 µm dans un tube ambré de 2 ml. Analyser par LC-HR/MS (section 2.1.6) et évaluer la concentration de natamycine dans l'échantillon (section 2.1.7).

2.1.6 ANALYSE

REMARQUE : Au début des mesures, contrôler la stabilité de la ligne de base et la linéarité des réponses du détecteur, et vérifier la limite de détection. Maintenir les mêmes conditions opératoires lors de la mesure de tous les échantillons et des solutions étalons. Identifier les pics de natamycine sur la base du temps de rétention et de leur canal de masse précis, et mesurer l'aire des pics. Injecter chacune des solutions préparées dans la colonne LC. Mesurer l'aire des pics de natamycine dans chacun des canaux de quantification et de confirmation. Un exemple de chromatogramme typique est présenté en Figure 1.

Figure 1. Chromatogramme LC-HR/MS typique et spectre de masse de la natamycine, dans un échantillon de vin blanc dopé en natamycine à une concentration équivalant à 50 µg/l.



Tracer l'aire des pics du principal canal de quantification en fonction de la concentration de natamycine ajoutée en microgrammes par litre (µg/l). Déterminer la pente, l'ordonnée à l'origine et le coefficient de corrélation de la droite de régression. La courbe d'étalonnage doit être rectiligne et le coefficient de corrélation doit être au moins de 0,99.

2.1.7 EXPRESSION DES RÉSULTATS

2.1.7.1 Calcul du niveau d'analyte

La concentration de natamycine dans l'échantillon, en microgrammes par litre (µg/l) est calculée en appliquant la formule suivante :

$$C = b/a$$

où C = concentration de natamycine dans le vin (µg/l), a = pente de la droite de régression, b = y – ordonnée à l'origine de la droite de régression

2.1.8 CONFIRMATION

La présence de la natamycine dans les échantillons doit être confirmée en appliquant les critères suivants :

Présence d'un pic dans les deux canaux de masse précis *m/z* 666.31069 et *m/z* 503.22672 au même temps de rétention. Calculer le ratio de l'aire des pics du principal canal de quantification de la masse par rapport à l'aire des pics du canal de confirmation. Le critère est que ce ratio concorde à ±25 % avec ceux obtenus avec la méthode des ajouts dosés de solutions étalons.

2.1.9 DONNÉES DE PERFORMANCE DE LA MÉTHODE

2.1.9.1 Linéarité

La méthode est linéaire sur toute la gamme d'étalonnage de 1 à 2 640 µg/l dans des matrices solvant, vin blanc et vin rouge (figures 2, 3 et 4).

Figure 2. Graphique d'étalonnage à dix points d'ajout de natamycine dans le solvant, dans la plage allant de 1 à 2 600 µg/l.

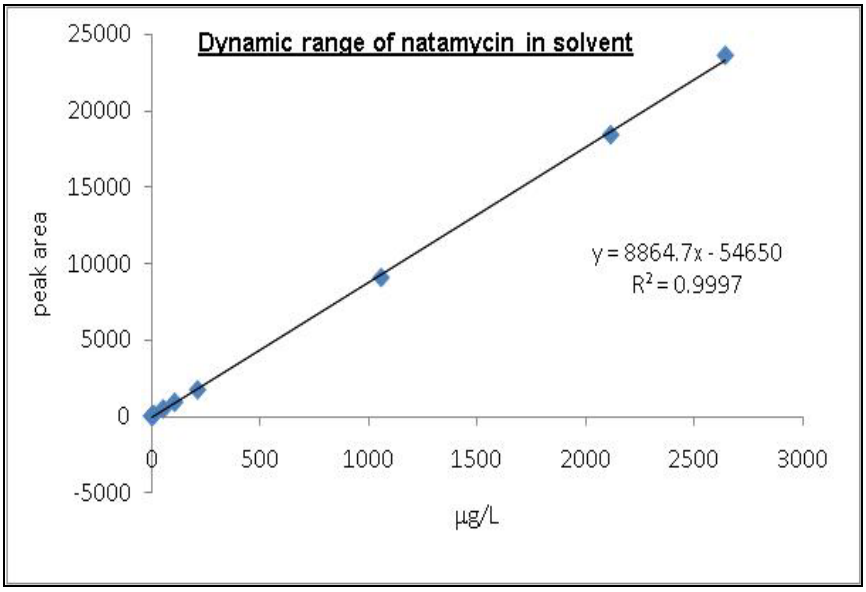


Table 1. Résidus d'étalonnage dans le solvant

Natamycine (µg/l)	Conc. prévue (µg/l)	Résidus	Résidus d'étalon
0	6,4	-6,4	-0,4
1,056	6,8	-5,7	-0,3
5,28	10,9	-5,6	-0,3
10,56	16,8	-6,3	-0,4
52,8	58,9	-6,1	-0,3
105,6	108,3	-2,7	-0,2
211,2	200,1	11,1	0,6
1056	1029,8	26,2	1,5
2112	2084,8	27,2	1,6
2640	2671,8	-31,8	-1,8

Figure 3. Graphique d'étalonnage à dix points d'ajout de natamycine dans le vin blanc, dans la plage allant de 1 à 2 600 µg/l.

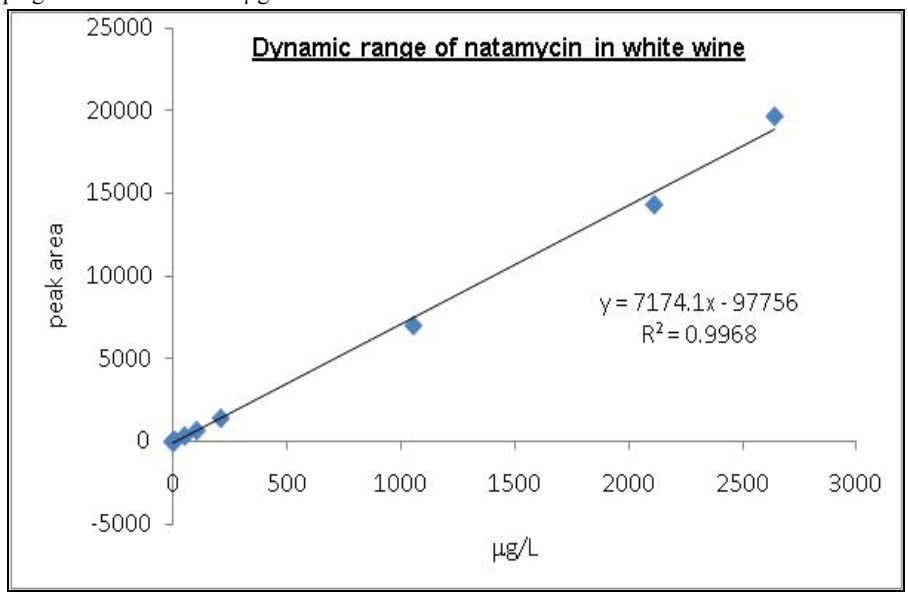


Tableau 2 Résidus d'étalonnage dans la matrice vin blanc

Natamycine (µg/l)	Conc. prévue (µg/l)	Résidus	Résidus d'étalon
0	15.5	-15.5	-0.3
1.056	15.6	-14.6	-0.3
5.28	18.8	-13.5	-0.2
10.56	23.9	-13.3	-0.2
52.8	63.6	-10.8	-0.2
105.6	109.3	-3.7	-0.1
211.2	212.8	-1.6	0.0
1056	989.0	67.0	1.2
2112	2003.2	108.8	2.0
2640	2742.7	-102.7	-1.8

Figure 4. Graphique d'étalonnage à dix points d'ajout de natamycine dans le vin rouge, dans la plage allant de 1 à 2 600 µg/l.

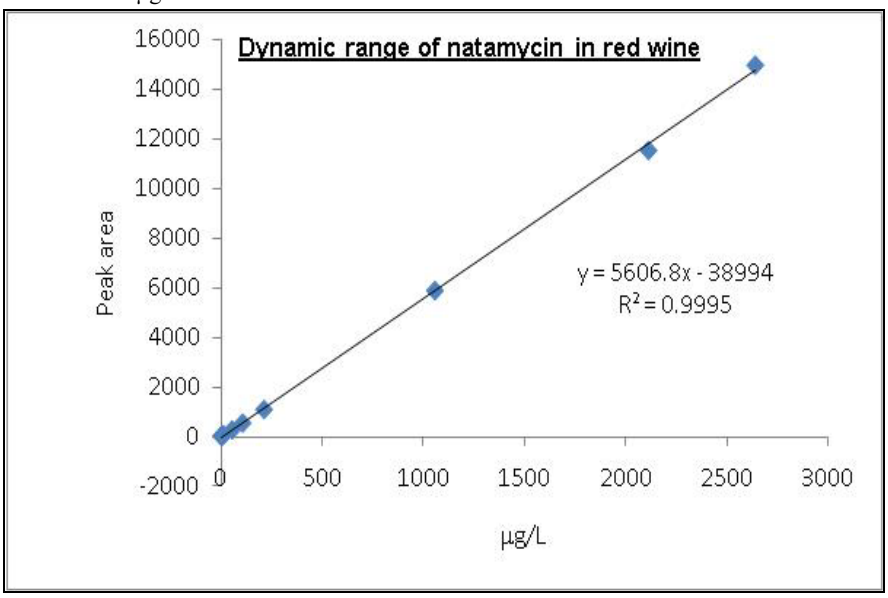


Tableau 3 Résidus d'étalonnage dans la matrice vin rouge.

Natamycine (µg/l)	Conc. prévue (µg/l)	Résidus	Résidus d'étalon
0	7,2	-7,2	-0,3
1,056	8,2	-7,1	-0,3
5,28	10,9	-5,7	-0,3
10,56	16,8	-6,2	-0,3
52,8	52,1	0,7	0,0
105,6	102,1	3,5	0,2
211,2	199,8	11,4	0,5
1056	1055,2	0,8	0,0
2112	2063,7	48,3	2,3
2640	2678,4	-38,4	-1,8

2.1.9.2 Exactitude et Précision

La répétabilité de la méthode a été évaluée à la limite d'intervention de 5 µg/l et à 200 µg/l, dans des matrices solvant, vin blanc et vin rouge (tableaux 4, 5 et 6). L'exactitude a été évaluée par enrichissement du vin blanc et du vin rouge avec une quantité connue de natamycine, à deux niveaux différents. L'analyse a ensuite été effectuée par un second analyste ignorant la concentration de la natamycine ajoutée. Les résultats sont présentés dans le tableau 7.

Tableau 4. Répétabilité de la natamycine ajoutée dans le solvant (méthanol:eau:acide acétique, 50:47:3 v/v) à deux concentrations différentes : 5 et 200 µg/l.

	Conc. de Natamycine ug/l	**Extraction (%)**
Solvant étalon à 5 ng/ml rép 1	5,3	99,7
Solvant étalon à 5 ng/ml rép 2	5,4	101,8
Solvant étalon à 5 ng/ml rép 3	5,8	108,6
Solvant étalon à 5 ng/ml rép 4	5,7	108,2
Solvant étalon à 5 ng/ml rép 5	5,8	109,0
Solvant étalon à 5 ng/ml rép 6	5,9	112,2
Solvant étalon à 5 ng/ml rép 7	5,7	108,4
Solvant étalon à 5 ng/ml rép 8	6,4	120,2
Moyenne	5,8	108,5
Écart-type	0,3	6,2
RSD (%)	5,7	5,7
Solvant étalon à 200 ng/ml rép 1	238,3	112,9
Solvant étalon à 200 ng/ml rép 2	237,1	112,4
Solvant étalon à 200 ng/ml rép 3	231,5	109,7
Solvant étalon à 200 ng/ml rép 4	228,0	108,1
Solvant étalon à 200 ng/ml rép 5	244,0	115,7
Solvant étalon à 200 ng/ml rép 6	220,7	104,6
Solvant étalon à 200 ng/ml rép 7	229,4	108,7
Solvant étalon à 200 ng/ml rép 8	251,7	119,3
Moyenne	235,1	111,4
Écart-type	9,8	4,7
RSD (%)	4,2	4,2

Tableau 5. Répétabilité de la natamycine ajoutée dans le vin blanc à deux concentrations différentes, 5 et 200 µg/l.

	Conc. de Natamycine ug/l	**Extraction (%)**
Vin blanc à 5,3 ng/ml rép 1	5,3	99,1
Vin blanc à 5,3 ng/ml rép 2	4,4	82,8
Vin blanc à 5,3 ng/ml rép 3	5,1	96,0
Vin blanc à 5,3 ng/ml rép 4	4,9	92,5
Vin blanc à 5,3 ng/ml rép 5	4,6	86,4
Vin blanc à 5,3 ng/ml rép 6	5,1	96,4
Vin blanc à 5,3 ng/ml rép 7	4,8	90,9
Vin blanc à 5,3 ng/ml rép 8	4,9	92,2
Moyenne	4,9	92,0
Écart-type	0,3	5,4
RSD (%)	5,9	5,9
Vin blanc à 211 ng/ml rép 1	217,6	103,1
Vin blanc à 211 ng/ml rép 2	223,3	105,8
Vin blanc à 211 ng/ml rép 3	213,0	101,0
Vin blanc à 211 ng/ml rép 4	216,8	102,7
Vin blanc à 211 ng/ml rép 5	211,4	100,2
Vin blanc à 211 ng/ml rép 6	208,6	98,9
Vin blanc à 211 ng/ml rép 7	204,2	96,8
Vin blanc à 211 ng/ml rép 8	214,4	101,6
Moyenne	213,7	101,3
Écart-type	5,8	2,8
RSD (%)	2,7	2,7

Tableau 6. Répétabilité de la natamycine ajoutée dans le vin rouge à deux concentrations différentes, 5 et 200 µg/l.

	Conc. de Natamycine ug/l	**Extraction (%)**
Vin rouge à 5,3 ng/ml rép 1	5,3	99,7
Vin rouge à 5,3 ng/ml rép 2	5,0	93,8
Vin rouge à 5,3 ng/ml rép 3	3,8	72,5
Vin rouge à 5,3 ng/ml rép 4	5,1	96,5
Vin rouge à 5,3 ng/ml rép 5	5,0	95,0
Vin rouge à 5,3 ng/ml rép 6	5,5	103,5
Vin rouge à 5,3 ng/ml rép 7	4,3	80,9
Vin rouge à 5,3 ng/ml rép 8	4,8	90,7
Moyenne	4,9	91,6
Écart-type	0,5	10,2
RSD (%)	11,1	11,1
Vin rouge à 211 ng/ml rép 1	183,9	87,1
Vin rouge à 211 ng/ml rép 2	178,4	84,5
Vin rouge à 211 ng/ml rép 3	181,1	85,8
Vin rouge à 211 ng/ml rép 4	197,5	93,6
Vin rouge à 211 ng/ml rép 5	178,2	84,5
Vin rouge à 211 ng/ml rép 6	184,2	87,3
Vin rouge à 211 ng/ml rép 7	181,2	85,9
Vin rouge à 211 ng/ml rép 8	171,3	81,2
Moyenne	182,0	86,2
Écart-type	7,5	3,6

RSD (%)	4,1	4,1

Tableau 7. Exactitude de la natamycine ajoutée dans le vin blanc et le vin rouge à deux concentrations différentes, 125 et 220 µg/l.

	Concentration théorique (µg/l)	**Concentration obtenue (µg/l)**	**Exactitude (%)**	**Ecart réduit**
Vin blanc A rép 1	125	135	108	0,50
Vin blanc A rép 2	125	142	114	0,85
Vin blanc A rép 3	125	138	110	0,65
Vin blanc B rép 1	220	230	105	0,28
Vin blanc B rép 2	220	230	105	0,28
Vin blanc B rép 3	220	239	109	0,54
Vin rouge A rép 1	220	213	97	-0,20
Vin rouge A rép 2	220	234	106	0,40
Vin rouge A rép 3	220	223	101	0,09
Vin rouge B rép 1	125	129	103	0,20
Vin rouge B rép 2	125	129	103	0,20
Vin rouge B rép 3	125	120	96	-0,25

Calculs
Écart réduit calculé comme suit :
= (concentration obtenue – concentration theorique)/ écart-type cible

Où :
Écart-type cible = 0,16 x concentration ajoutée
c.-à-d. selon Horwitz

2.2 Détermination de la natamycine (pimaricine) dans le vin par HPLC/DAD

2.2.1 Objet

Cette méthode décrit une méthode d'analyse pour la détermination de la natamycine (pimaricine) dans le vin par HPLC. Le niveau de la natamycine est exprimé en microgrammes par litre (µg/l) de vin.
La méthode décrite a été validée en laboratoire en prenant en compte l'influence de la matrice vin (ex : vin blanc ou vin rouge).

2.2.2 Principe

Les échantillons de vin tranquille sont directement injectés dans le système HPLC. Les échantillons de vin mousseux sont d'abord dégazés par filtration ou au moyen d'un bain à ultrasons. L'analyte est séparé de la matrice sur une colonne C8. La fenêtre de fractionnement avec l'analyte est automatiquement transférée sur une colonne C18 pour poursuivre la séparation. La natamycine est détectée à 304 nm et 319 nm. En outre, le spectre DAD est utilisé pour l'identification. La quantification est effectuée par référence à des étalons externes.

2.2.3 Réactifs et produits

2.2.3.1. Réactifs

2.2.3.1.1 Eau désionisée
2.2.3.1.2 Méthanol, qualité HPLC ***(n° CAS 67-56-1).***
2.2.3.1.3 Acide formique, qualité analytique ***(n° CAS 64-18-6).***
2.2.3.1.4 Acide acétique, qualité analytique ***(n° CAS 64-19-7).***
2.2.3.1.5 Acide chlorhydrique, qualité analytique, 0,1 N ***(n° CAS 7647-01-0).***
2.2.3.1.6 Matrice vin, natamycine non détectable
2.2.3.1.7 Natamycine, > 95 % ***(n° CAS 7681-93-8).***

La pureté est vérifiée par mesure photométrique à 291 nm, 304 nm et 319 nm d'une solution de natamycine dans de l'acide chlorhydrique 0,1 N par rapport à un blanc d'acide chlorhydrique 0,1 N :

Données de référence selon la littérature	291 nm	304 nm	319 nm
Extinction (1 % en masse de natamycine, cellule de 1 cm)	758	1 173	1 070

Alternative :

Après dilution (ex : facteur de dilution de 20) la solution mère (2.1.3.3.1) peut également être utilisée pour la mesure photométrique, par exemple en introduisant à la pipette 1,0 ml de solution mère dans une fiole jaugée de 20 ml et en complétant jusqu'au repère avec de l'acide chlorhydrique 0,1 N. Comparer la mesure à celle d'un blanc ayant la même composition de solvants que la solution mère diluée.

2.2.3.2 Préparation de la phase mobile

2.2.3.2.1 Solutions pour la phase mobile :

2.2.3.2.1.1 5 ml d'acide acétique dans 2 l de méthanol

2.2.3.2.1.2 5 ml d'acide acétique dans 2 l d'eau désionisée

2.2.3.2.2 Éluant 1 : méthanol-acide acétique / eau désionisée-acide acétique (65 / 35)

2.2.3.2.3 Éluant 2 : méthanol-acide acétique / eau désionisée-acide acétique (80 / 20)

2.2.3.3 Préparation de la solution mère et des solutions étalons

Toutes les solutions ont une stabilité limitée et doivent être stockées au froid et à l'abri de la lumière dans un réfrigérateur. La solution mère (2.1.3.3.1.1) a une durée de stockage de plusieurs semaines, mais sa concentration doit être vérifiée peu de temps avant de l'utiliser (ex : voir la méthode alternative, 2.2.3.1.7). Les dilutions I (2.2.3.3.1.2) et II (2.2.3.3.1.3) ainsi que les solutions étalons (2.2.3.3.2) doivent être préparées chaque jour.

2.2.3.3.1 Préparation de la solution mère et des dilutions

2.2.3.3.1.1 Solution mère (approximativement 100 mg/l)

Peser environ 5 mg de natamycine (2.2.3.1.7) et transférer avec du méthanol dans une fiole jaugée de 50 ml. Ajouter 0,5 ml d'acide formique,

vérifier que toute la natamycine est dissoute, tempérer à 20°C et compléter jusqu'au repère avec du méthanol.

2.2.3.3.1.2 Dilution I (approximativement 5 mg/l)

Introduire à la pipette 2,5 ml de solution mère (2.1.3.3.1) dans une fiole jaugée de 50 ml et compléter jusqu'au repère avec de l'eau désionisée.

2.2.3.3.1.3 Dilution II (approximativement 1 mg/l)

Introduire à la pipette 4 ml de Dilution I (2.2.3.3.1.2) dans une fiole jaugée de 20 ml et compléter jusqu'au repère avec la matrice vin (2.2.3.1.6).

2.2.3.3.2 Préparation des solutions étalons

Pour les solutions étalons, diluer la Dilution II (2.2.3.3.1.3) aux concentrations désirées avec la matrice vin (2.2.3.1.6) ; par exemple, 50 µl dans une fiole jaugée de 10 ml équivalent à 5 µg/l :

Fiole jaugée	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml
Volume de Dilution II (µl)	50	100	200	400	500	1000	3700
Quantité de natamycine (µg/l)	5	10	20	40	50	100	370

2.2.4 Appareillage

Matériel de laboratoire courant, notamment :

2.2.4.1 Appareils HPLC-DAD avec vanne HPLC 6 ports et deux pompes isocratiques ou une pompe à gradient pour le fractionnement

2.2.4.2 Colonne HPLC RP-8

2.2.4.3 Colonne HPLC RP-18

2.2.4.4 Photomètre

2.2.5. Echantillonnage

Les échantillons de vin tranquille sont directement injectés dans le système HPLC. Les échantillons de vin mousseux sont d'abord dégazés par filtration ou au moyen d'un bain à ultrasons. Si les échantillons doivent être stockés, ils doivent l'être au froid et à l'abri de la lumière.

2.2.6. Procédure

2.2.6.1 Conditions de fonctionnement du système HPLC

La colonne et les paramètres suivants ont été jugés appropriés :

Colonne 1 :	Colonne C 8 (ex : Merck Select B 125*4mm/5µm, avec bouchon)
Phase mobile :	Éluant 1 (2.2.3.2.2) à température ambiante
Débit :	1 ml/mn
Colonne 2 : 125*4mm/5µm)	Colonne C 18 (ex : Merck Lichrospher
Phase mobile :	Éluant 2 (2.2.3.2.3) à 30°C
Débit :	1 ml/mn
Volume d'injection :	500 µl
Détection UV :	304 nm et 319 nm
Fenêtre de fractionnement :	La position de la fenêtre de fractionnement doit être contrôlée avant l'analyse suivante (figure 1). La plage de la fenêtre de fractionnement doit être fixée à 0,5 mn avant et après élution du pic désiré par la colonne C 8.

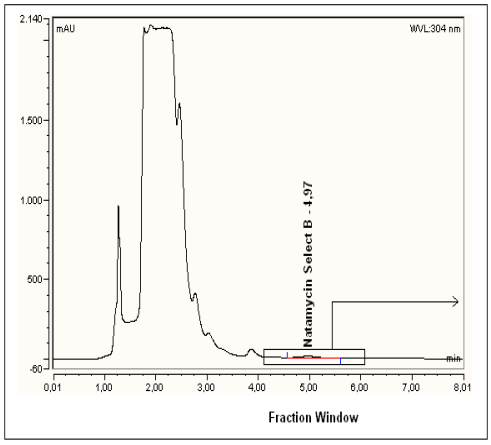


Fig. 1 Colonne 1
Fenêtre de fractionnement

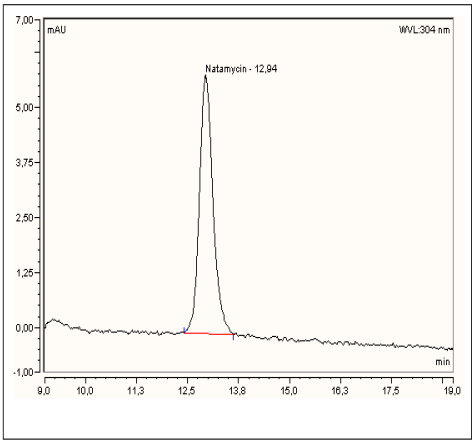


Fig. 2 Colonne 2
Vin blanc dopé en natamycine (50 µg/l

2.2.6.2 Identification/ Confirmation

L'identification des pics se fait par comparaison des temps de rétention des étalons et des échantillons aux deux longueurs d'onde mesurées 304 nm et 319 nm. Avec le système chromatographique et les paramètres présentés en 2.2.6.1, le temps de rétention de la natamycine est d'environ 12,9 mn (fig. 2).

Le spectre DAD est utilisé pour la confirmation des résultats positifs (fig. 3 et fig. 4).

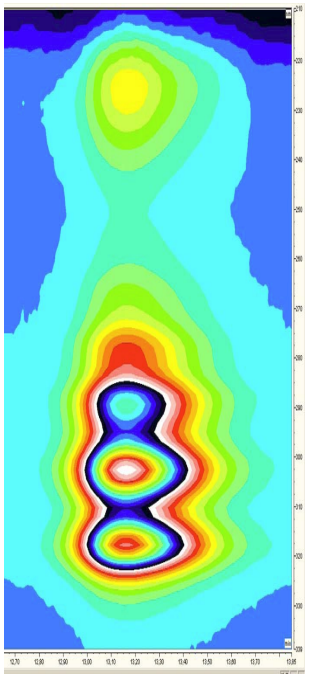


Fig. 3 Spectres DAD de la natamycine en 3D

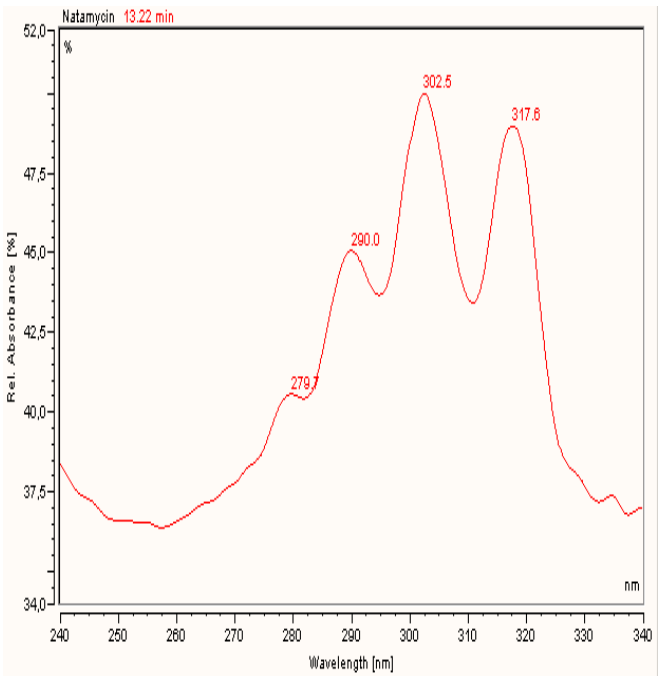


Fig. 4 Spectres DAD de la natamycine

2.2.7 Calculs et expression des résultats

Une courbe d'étalonnage des solutions étalons (2.2.3.3.2) est préparée à l'aide des chromatogrammes mesurés à 304 nm. La quantification de la natamycine est réalisée selon la méthode de l'étalonnage externe. Une courbe d'étalonnage linéaire est générée en comparant les aires des pics et les concentrations correspondantes. Le coefficient de corrélation doit être au moins de 0,99.

Les résultats sont exprimés en µg/l.

2.2.8. Données de performance de la méthode

Limite de détection, limite de quantification

La limite de détection et la limite de quantification ont été déterminées selon la norme DIN 32645 (détermination directe : mesures multiples d'un blanc

d'échantillon matrice, n = 10, et courbe d'étalonnage couvrant tout le domaine de mesure).
Limite de détection : 2,5 µg/l
Limite de quantification : 8,5 µg/l

Linéarité
La linéarité dans la matrice vin est confirmée dans la gamme d'étalonnage allant de 5 µg/l à 100 µg/l (fig. 5).

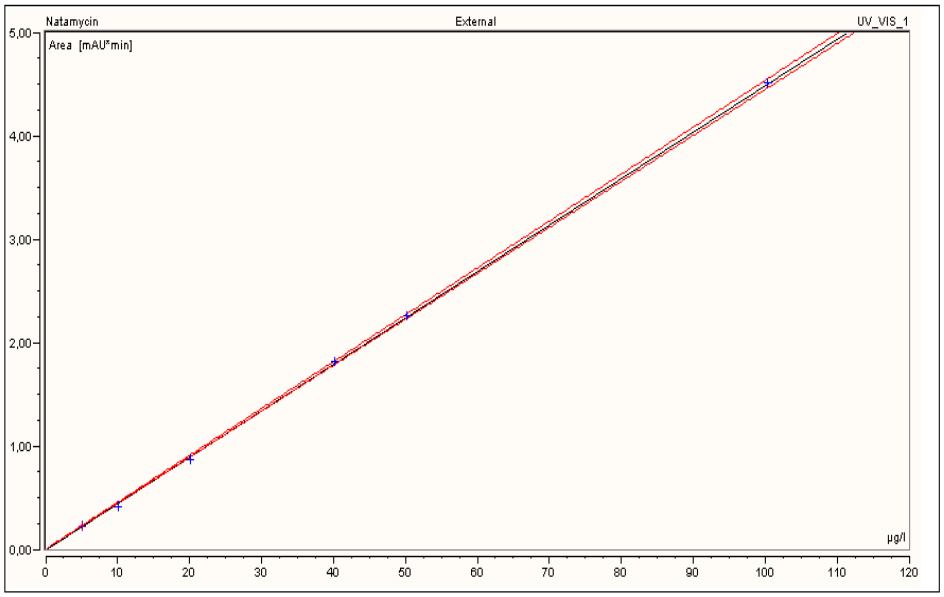


Figure 5. Graphique d'étalonnage à six points d'ajout de natamycine dans le vin blanc, dans la plage allant de 5 à 100 µg/l, R^2=0,9999.

2.2.9 Exactitude et précision
L'exactitude et la répétabilité ont été évaluées par enrichissement de vins blanc, rosé et rouge avec une quantité connue de natamycine et en mesurant chacun de ces échantillons à cinq reprises. Les résultats sont présentés dans le tableau 1.

Matrice	Teneur en natamycine dans la matrice (µg/l)	Teneur en natamycine ajoutée (µg/l	Teneur en natamycine mesurée (µg/l)	Taux d'extraction (%)	Écart réduit
Vin blanc	n. d.	5,02	5,04	100,4	0,0
			4,70	93,6	-0,2
			5,12	102,0	0,1
			5,29	105,4	0,2
			4,97	99,0	0,0
		Moyenne	**5,02**	**100,1**	
		Écart type	**0,22**		
		RSD (%)	**4,3**		
		Répétabilité r	**0,85**		
Vin rosé	n. d.	5,02	4,79	95,4	-0,1
			4,83	96,2	-0,1
			4,76	94,8	-0,1
			4,79	95,4	-0,1
			4,73	94,2	-0,2
		Moyenne	**4,78**	**95,2**	
		Ecart type	**0,04**		
		RSD (%)	**0,78**		
		Répétabilité r	**0,15**		
Vin rouge	n. d.	5,02	4,61	91,8	-0,2
			4,65	92,6	-0,2
			4,89	97,4	-0,1
			4,67	93,0	-0,2
			4,34	86,5	-0,4
		Moyenne	**4,63**	**92,3**	
		Écart type	**0,20**		
		RSD (%)	**4,2**		
		Répétabilité r	**0,77**		
Vin rouge	n. d.	21,2	19,73	93,1	-0,2
			20,66	97,5	-0,1
			21,16	99,8	0,0
			19,73	93,1	-0,2
			19,58	92,4	-0,3

		Moyenne	**20,17**	**95,2**	
		Écart type	**0,70**		
		RSD (%)	**3,5**		
		Répétabilité r	**2,7**		
Vin rouge	n.d.	53,2	51,84	97,4	-0,1
			51,91	97,6	-0,1
			51,42	96,7	-0,1
			50,12	94,2	-0,2
			50,62	95,2	-0,2
		Moyenne	**51,18**	**96,2**	
		Écart type	**0,78**		
		RSD (%)	**1,5**		
		Répétabilité r	**3,1**		

Table 1 Exactitude de la natamycine ajoutée dans le vin blanc, le rosé et le vin rouge ; n.d. « non détecté » ; limite de détection 2,5 µg/l

Calculs (Tableau 1) :

Répétabilité r = écart type * $t_{4;0,95}$ * $2^{1/2}$

Écart réduit = (tenur en natamicine mesurée – teneur en natamicine ajoutée)/ écart-type cible *

* selon Horwitz
écart-type cible = 1/100 * quantité ajoutée * $2^{(1 - 0,5 \log \text{quantité ajoutée})}$

Références

DIN 32645:2008-11

UV- und IR-Spektren wichtiger pharmazeutischer Wirkstoffe, Editio Cantor Aulendorf, 1978, Herausgeber/ Editior Hans-Werner Dibbern in Zusammenarbeit mit E. Wirbitzki

Macarthur R, Feinberg M, Bertheau Y, 2010, Construction of measurement uncertainty profiles for quantitative analysis of genetically modified organisms based on interlaboratory validation data, Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 93(3), 1046 – 1056.

FV 1351. Dominic Roberts and Adrian Charlton. Determination of natamycin in wine by liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry: standard operating procedure and method performance data. OIV SCMA mars 2010.
FV 1355. Tomasz Brzezina. Natamycin in Wein. OIV SCMA mars 2010.

Méthode OIV-MA-AS323-10 Méthode Type II/IV

Méthode de dosage de phtalates dans les vins par couplage en chromatographie gazeuse et spectrométrie de masse

OIV-OENO 477-2013
OIV-OENO 596-2019

1. DOMAINE D'APPLICATION

Cette méthode s'applique à la recherche et au dosage de phtalates dans les vins.

2. PRINCIPE

L'échantillon est soumis à une extraction par de l'isohexane. L'extrait est concentré par évaporation. On procède à l'analyse de l'extrait concentré par couplage chromatographie gazeuse/spectrométrie de masse (GC/MS) avec étalons internes deutérés.

3. REACTIFS ET PRODUITS

Sauf spécification contraire, tous les réactifs utilisés sont de qualité analytique reconnue.

3.1 DMP (Ddi-méthyl phtalate) [n° CAS : 131-11-3]
3.2 DnBP (di-butyl phtalate) [n° CAS : 84-74-2]
3.3 DEHP (bis-(2-éthylhexyl) phtalate) [n° CAS : 117-81-7]
3.4 BBP (Butyl benzyl phtalate) [n° CAS 85-68-7]
3.5 DINP (di-isononyl phtalate) [n° CAS : 068515-48-0/028553-12-0]
3.6 DIDP (di-isodécyl phtalate) [n° CAS : 068515-49-1/026761-40-0
3.7 DCHP (dicyclohexyl phtalate) [n° CAS : 84-61-7]
3.8 DEP (diéthyl phtalate) [n° CAS : 84-66-2]
3.9 DiBP (di-isobutyl phtalate) [n° CAS : 84-74-2]
3.10 DnOP (di-n-octyl phtalate) [n° CAS : 117-84-0]
3.11 DMP-d4 : standard interne [n° CAS : 93951-89-4]
3.12 DEP-d4 : standard interne [n° CAS : 93952-12-6]
3.13 DiBP-d4 : standard interne [n° CAS : 358730-88-8]
3.14 DnBP-d4 : standard interne [n° CAS : 93952-11-5]
3.15 BBP-d4 : standard interne [n° CAS : 93951-88-3]
3.16 DCHP-d4 : standard interne [n° CAS : 358731-25-6]
3.17 DEHP–d4: standard interne [n° CAS : 93951-87-2]

3.18 DnOP-d4 : standard interne [n° CAS : 93952-13-7]
3.19 Isohexane [n° CAS : 107-83-5] et Acétone [n° CAS :67-64-1]

3.20 Solutions étalons

Toutes les fioles jaugées utilisées pour préparer les solutions d'étalonnage seront rincées à l'acétone puis à l'isohexane pour éviter toute contamination

3.20.1. Solutions mères

- Phtalate-solution individuelle à 1 g/L : pour chaque phtalate peser 100 mg dans une fiole de 100 mL, dissoudre dans l'isohexane et compléter à 100 mL.
- DINP-DIDP solution individuelle à 5g/L : peser pour chacun d'eux 500mg dans une fiole de 100 mL, dissoudre dans l'isohexane et compléter à 100 mL.
- Etalon interne-solution individuelle à 0,5 g/L : les étalons deutérés sont conditionnés dans des ampoules scellées de 25mg ; pour chaque étalon interne la totalité de chaque ampoule est transférée dans une fiole jaugée de 50 mL ;ajuster à 50mL avec l'isohexane.

3.20.2. Solutions filles

- Solution fille phtalates **F1** à 1 mg/L

  Prélever 100 µL de chaque solution mère à 1 g/L et 5g/L («3.20.1), les introduire dans une fiole de 100 mL, compléter à 100 mL avec de l'isohexane.

- Solution fille phtalates **F2** à 10 mg/L

  Prélever 1 mL de chaque solution mère à 1 g/L et 5g/L (3.20.1), les introduire dans une fiole de 100 mL, compléter à 100 mL avec de l'isohexane.

- Solution fille étalons internes **EI** à 10 mg/L

  Prélever 1 mL de chaque solution mère d'étalon deutéré à 0,5 g/L (3.20.1), les introduire dans une fiole de 50 mL, compléter à 50 mL avec de l'isohexane.

3.20.3. Gamme d'étalonnage

A partir des différentes solutions filles (4.20.2), on prépare la gamme d'étalonnage dans l'isohexane directement dans les flacons pour injection préalablement traités thermiquement, rincés (cf § 6.1) et séchés sous hotte, selon le tableau ci-dessous :

Points de calibration	**Conc. en phtalate (mg/L)***	**Vol. Sol. fille F1 (µL)**	**Vol. Sol. fille F2 (µL)**	**Vol. sol. fille EI (µL)**	**Vol. isohexane (µL)**
C1	0	0	0	50	1000
C2	0,05	50	0	50	950
C3	0,10	100	0	50	900
C4	0,20	200	0	50	800
C5	0,50	0	50	50	950
C6	0,80	0	80	50	920
C7	1,00	0	100	50	900

***** pour DINP et DIDP concentrations à multiplier par 5

4. MATERIEL

4.1 Verrerie et matériels volumétriques de laboratoire :

4.1.1 Fioles jaugées, 50 mL et 100ml de classe A
4.1.2 Tubes à centrifuger en verre avec bouchon 50 mL
4.1.3 Tubes à essai en verre avec bouchon 10mL
4.1.4 Micropipettes à volumes variables de 25 µl à 1000µl vérifiées selon ISO 8655-6
4.1.5 Evaporateur sous flux d'azote

4.2 Balance analytique

4.3 Système CG-MS (par exemple : 450GC-300MS Varian)

5. MODE OPERATOIRE

5.1 Précautions

Du fait de la présence de phtalates dans l'environnement du laboratoire, l'analyse de ces composés nécessite des précautions tout au long de l'analyse :

- Eviter tout contact avec du matériel en matière plastique (tout particulièrement les PVC souples) dans la mesure du possible. Dans le cas contraire s'assurer que cela n'apporte pas de contamination.
- Tester les solvants utilisés et dédier des bouteilles de solvant à ces analyses.
- Utiliser de la verrerie traitée thermiquement, uniquement la verrerie **non jaugée** (400°C pendant au moins 2h). Rincer soigneusement tout le matériel (acétone puis isohexane).
- S'assurer que les septum des flacons d'injection sont exempts de phtalates.
- Avant et après chaque injection, rincer plusieurs fois la seringue d'injection.
- Si possible manipuler dans une salle blanche ou une salle dédiée à ces analyses.

5.2 Préparation des échantillons

Dans un tube à centrifuger de 50 mL introduire 12,5 mL d'échantillon. Ajouter 10 mL d'isohexane.

Agiter vigoureusement (vortex) pendant au moins une minute.

Laisser décanter le mélange jusqu'à séparation des 2 phases (un passage au bain à ultra-sons30 minutes à 50°C permet d'accélérer la séparation des deux phases). Récupérer 8 mL de la phase organique et transférer dans un tube à essai de 10 mL. Evaporer sous courant d'azote (0,3 bar) à 35°C en évitant d'aller à sec (attention : la température ne doit pas dépasser 40°C)

Reprendre avec 1 mL d'isohexane.

Ajouter 50µl de solution de l'étalon interne à 0,01 g/L dans chaque extrait.

Transférer dans un flacon d'injection.

NOTE : pour minimiser les effets matrices lors de l'analyse par GC-MS, il est possible d'utiliser l'ajout d'un agent « protectant », par exemple l'undécanoate de méthyle [n°CAS : 1731-86-8].

20µL de cette substance sont ajoutés dans chaque solution d'étalonnage et dans les extraits des échantillons avant d'évaporer sous courant d'azote.

5.3 Essai à blanc

Préparer un « blanc » en suivant le mode opératoire décrit en 5.2 sans mettre l'échantillon.

5.4 Analyse par GC/MS

En fonction de l'appareillage disponible et de ses performances, choisir pour la spectrométrie de masse entre le mode SIM et le mode MRM

A titre informatif, des conditions d'analyses sont données en annexe I et un chromatogramme type en annexe II.

5.4.1 Etalonnage

Effectuer en premier plusieurs injections de solvant (minimum 2). Injecter ensuite les solutions étalons (3.20.3) en double dans l'ordre croissant de concentration et terminer par au moins deux injections de solvant.

Etablir pour chaque phtalate une courbe de calibration :

$$(A_{analyte}/A_{IS}) = f(C_{analyte}/C_{IS}).$$

A : aire du pic
C : concentration
IS : standard interne

Chaque phtalate est quantifié par rapport à l'étalon deutéré correspondant sauf le DINP et le DIDP qui sont quantifiés par rapport au DnOP-d4.

5.4.2 Analyse des échantillons

Commencer la séquence d'analyse par l'analyse du « blanc » (5.3).
Injecter ensuite les échantillons préparés (5.2) en double.
Prévoir des injections de solvant après les échantillons potentiellement très contaminés.

Terminer la série par l'injection d'un ou plusieurs points de gamme pour vérifier une éventuelle dérive de signal au cours de la série d'analyse et de plusieurs injections de solvant.
Pour chaque injection, mesurer l'aire des pics identifiés et des standards internes et utiliser l'équation de la courbe d'étalonnage (5.4.1) pour déterminer la concentration dans l'extrait analysé.

5.4.3 Expression des résultats

Pour chaque échantillon, faire la moyenne des résultats obtenus (5.4.2) pour les deux injections.
Les résultats sont exprimés en mg/L .

6. CONTROLE QUALITE

Dans chaque série d'analyses, un contrôle qualité est mis en place par l'analyse d'un échantillon de vin supplémenté en phtalates à un niveau de concentration de 0,020mg/L.

L'extrait de l'échantillon préparé selon 6.2 est analysé au début de série, les résultats obtenus, exprimés en taux de rendement, sont reportés sur une carte de contrôle.

7. CHARATERISTIQUES DE LA METHODE

Les analyses réalisées au laboratoire, dans des conditions de répétabilité et de fidélité intermédiaire, sur un vin rouge et un vin blanc supplémentés en phtalates à deux niveaux de concentration (0,040 mg/L et 0,080 mg/L) ont permis de déterminer les valeurs de répétabilité (CV_r%), de reproductibilité intermédiaire (CV_{RI}%) et de rendement suivantes :

Phtalates	%Rdt	CV_r%	CV_{FI}%
DMP (di-methyl-phtalate)	67	5	8
DEP (di-ethyl phtalate)	84	8	11
DiBP (di-isobutyl phtalate)	93	7	10
DnBP (di-butyl phtalate)	95	5	7
BBP (butyl benzyl phtalate)	98	5	6
DCHP (di-cyclohexyl phtalate)	97	5	7
DEHP (bis-2-ethylhexyl phtalate)	98	6	7
DnOP (di-octyl phtalate)	98	6	7
DINP (di-isononyl phtalate)	104	7	8

DIDP (di-isodecyl phtalate)	96	8	11

Soit pour l'ensemble des phtalates, les valeurs moyennes suivantes :

Répétabilité (exprimée en CVr%) : **6%**

Fidélité intermédiaire (exprimée en CV_{FI}%) : **8%**

8. LIMITES DE DETECTION ET DE QUANTIFICATION

Pour chaque phtalate recherché, les limites de détection et de quantification sont données dans le tableau suivant :

Phtalates	Limite de quantification (mg/L)	Limite de détection (mg/L)
DMP (di-methyl-phtalate)	0,010	0,004
DEP (di-ethyl phtalate)	0,010	0,004
DiBP (di-isobutyl phtalate)	0,010	0,004
DnBP (di-butyl phtalate)	0,010	0,004
BBP (butyl benzyl phtalate)	0,010	0,004
DCHP (di-cyclohexyl phtalate)	0,010	0,004
DEHP (bis-2-ethylhexyl phtalate)	0,010	0,004
DnOP (di-octyl phtalate)	0,010	0,004

DINP (di-isononyl phtalate)	0,050	0,020
DIDP (di-isodecyl phtalate)	0,050	0,020

9. REFERENCES

FV 1371. Recherche et dosage de phtalates dans les boissons alcoolisées. 2011
FV 1234. Questions sur les Phtalates. 2006

ANNEXE I
(informative)

Conditions pour la chromatographie gazeuse

Colonne capillaire de type VF-5ms : 30m x 0,25 mm diamètre interne, 0,25 µm d'épaisseur de film

Programme de températures :

Pour une détection en mode SIM :
Four maintenu à 100 °C pendant 1 min ; monter à 230 °C à 10 °C/min ; monter à 270 °C à 10 °C/min ; maintien pendant 2 min, monter à 300 °C à 25 °C/min ; maintien pendant 8 min.
Remarque : cette programmation permet de séparer les pics du DEHP et du DCHP (ce qui n'est pas le cas avec la programmation du mode MRM)

Pour une détection en mode MRM :
Four maintenu à 80 °C pendant 1 min ; monter à 200 °C à 20 °C/min ; monter à 300°C à 10 °C/min ; maintien pendant 8 min.

Injecteur : maintenu à 150°C pendant 0,5 min ; monter à 280 °C à 200 °C/min, en mode sans division à l'injection

Helium : 1 mL/min à débit constant

Volume injecté : 1 µl

Conditions de la spectrométrie de masse (MS)

Ionisation en mode EI à 70 eV
Température de la source :250°C
Température ligne de transfert :300°C
Manifold : 40°C

Paramètres de quantification et d'identification des phtalates

Le tableau 1 indique, dans le cas d'une analyse en mode SIM, l'ion de quantification et les deux ions d'identification pour chaque phtalate et son homologue deutéré.

Le tableau 2 reprend, dans le cas d'une analyse en mode MRM, les transitions quantifiantes et qualifiantes pour chaque phtalate et son homologue deutéré.

Remarque : Le DIDP et le DINP sont chacun un mélange de composés. La chromatographie ne permet pas de les séparer complètement. Par conséquent ils sont dosés en « groupe ».

ANNEXE I (suite)
(informative)
Tableau 1

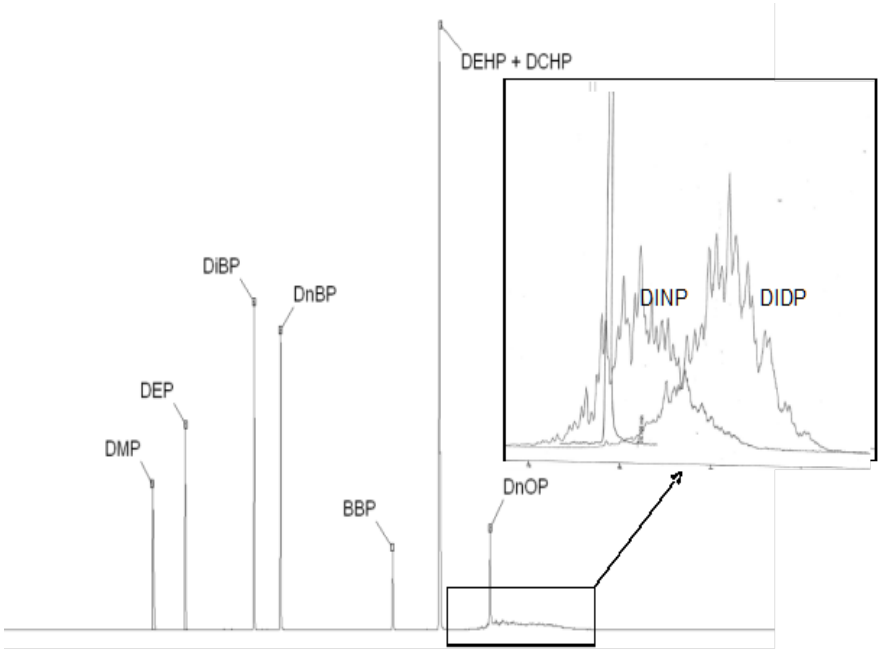
		Ion quantification m/z	Ions qualification m/z	
			1	2
DMP	(di-méthyl phtalate)	163	77	194
DMP-d4		167	81	198
DEP	(di-ethyl phtalate)	149	177	222
DEP-d4		153	181	226
DiBP	(di-isobutyl phtalate)	149	167	223
DiBP-d4		153	171	227
DnBP	(di-butyl phtalate)	149	205	223
DnBP-d4		153	209	227
BBP	(butyl benzyl phtalate)	149	91	206
BBP-d4		153	95	210
DCHP	(di-cyclohexyl phtalate)	149	167	249
DCHP-d4		153	171	253
DEHP	(bis-2-ethylhexyl phtalate)	149	167	279
DEHP-d4		153	171	283
DnOP	(di-octyl phtalate)	149	167	279
DnOP-d4		153	171	283
DINP	(di-isononyl phtalate)	149	293	
DIDP	(di-isodecyl phtalate)	149	307	

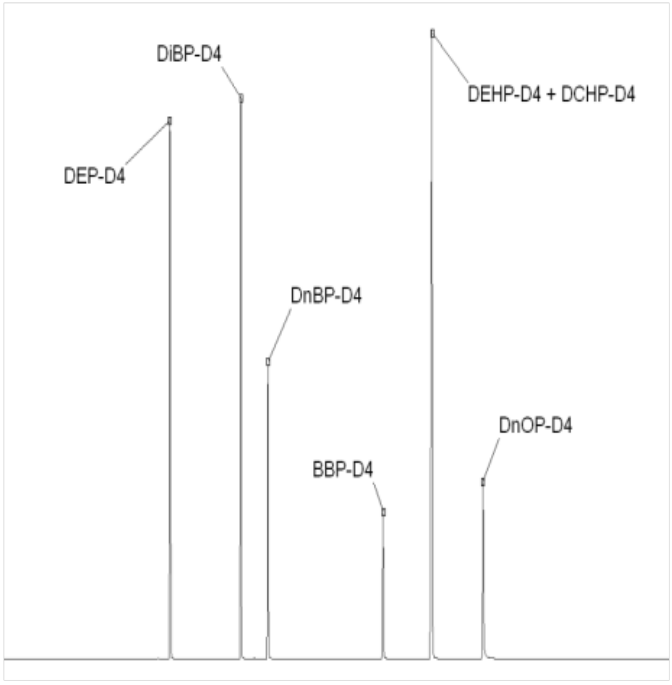
Tableau 2

		Transition quantifiante	Transition qualifiante
DMP	(di-methyl-phtalate)	194>163	194>77
DMP-d4		198>167	198>81
DEP	(di-ethyl phtalate)	177>149	177>93
DEP-d4		181>153	181>97
DiBP	(di-isobutyl phtalate)	223>149	205>149
DiBP-d4		227>153	209>153
DnBP	(di-butyl phtalate)	223>149	205>149
DnBP-d4		227>153	209>153
BBP	(butyl benzyl phtalate)	206>149	149>121
BBP-d4		210>153	153>125
DCHP	(di-cyclohexyl phtalate)	249>149	249>93
DCHP-d4		253>153	253>97
DEHP	(bis-2-ethylhexyl phtalate)	279>149	279>93
DEHP-d4		283>153	283>97
DnOP	(di-octyl phtalate)	279>149	279>93
DnOP-d4		283>153	283>93
DINP	(di-isononyl phtalate)	293>149	
DIDP	(di-isodecyl phtalate)	307>149	

ANNEXE II
(informative)

Chromatogrammes GC/MS d'une solution standard de phtalates et des étalonss internes deutérés.


DEHP + DCHP
DiBP
DnBP
DINP
DIDP
DEP
DMP
BBP
DnOP


DiBP-D4
DEHP-D4 + DCHP-D4
DEP-D4
DnBP-D4
DnOP-D4
BBP-D4

ANNEXE III
(informative)

VALIDATION DE L'ANALYSE DES PHTALATES DANS LES VINS

1. Résumé analytique

L'Institut des matériaux et mesures de référence (IRMM) a organisé en étroite collaboration avec l'Organisation de la vigne et du vin (OIV) cette étude collaborative destinée à valider la méthode OIV-MA-AS323-10 :2013 du *Recueil* pour le dosage de dix phtalates dans le vin par couplage de chromatographie gazeuse et de spectrométrie de masse (CG-SM).
La conception de cette étude de performance est conforme aux dispositions de la norme ISO 5725-2 et à celles prévues par l'OIV. Les échantillons d'essais ont consisté en un vin rouge, un vin blanc et un vin doux présentés en double aveugle (voir table 1). Les vins ont été supplémentés à l'IRMM, mis en fioles et distribués aux participants à l'étude de validation.

En plus des échantillons d'essais, les participants ont reçu une solution de phtalates deutérés, afin de préparer des solutions étalons internes.

Les participants à l'étude ont été identifiés par l'OIV en suivant une étude de prévalidation de la méthode. Ils correspondent à des laboratoires basés en Europe, en Asie, en Amérique du Sud et en Australie (voir tableau 2).
L'évaluation des résultats rapportés a été réalisée en conformité avec les normes ISO 5725-2 et ISO 5725-4, ainsi qu'avec les dispositions prévues par l'OIV. Les écarts types relatifs de reproductibilité se sont essentiellement situés dans la plage située entre 9 et 71 %.

Tableau : 1

Échantillon	S001	S002	S003	S004	S005	S006
Type	Vin blanc		Vin rouge		Vin doux	

2. Participants à l'étude

Tableau 2 : participants à l'étude

Analab Chile S.A.	Chili
Animal & Plant & Food Inspection Centre, Tianjin Exit- Entry Inspection and Quarantine Bureau	République populaire de Chine
Bureau Interprofessionnel du Cognac	France
Centrul National de Verificare a Calității Producției Alcoolice	République de Moldavie
Chemisches und Veterinaeruntersuchungsamt Stuttgart	Allemagne
Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica Portuguesa	Portugal
Instituto Nacional de Vitivinicultura, Departamento de Normas Analíticas Especiales	Argentine
Laboratorio Arbitral Agroalimentario	Espagne
Laboratoires DUBERNET	France
Miguel Torres S.A.	Espagne
SAILab	Espagne
SCL Laboratoire de Bordeaux	France
SCL Laboratoire de Montpellier	France
The Australian Wine Research Institute	Australie

3. Évaluation des résultats soumis

L'aptitude à l'emploi des écarts types de reproductibilité calculés a été évaluée. À cet effet, l'écart type relatif de reproductibilité calculé (RSD_R) a été comparé avec l'écart type relatif dérivé de l'équation d'Horwitz modifiée (RSD_{mH}), telle que proposée par Thompson (Thompson, 2000). Cette dernière fournit un niveau indicatif de reproductibilité en fonction de la concentration.

La concordance avec le niveau indicatif de fidélité a été exprimée en valeurs HORRAT de reproductibilité ($HORRAT_R$).

4. Évaluation des effets systématiques

Les laboratoires ayant rapporté des résultats qui dépassaient, pour un ou plusieurs analytes, le seuil de 1 % au niveau des statistiques k ou h de Mandel, ont été contactés par les organisateurs afin de vérifier les données fournies et de les confirmer le cas échéant. Dans le cas où la justesse des résultats du laboratoire n'était pas confirmée, les résultats en question ont été exclus de l'évaluation des données.

5. Évaluation des résultats par analyte

Sur la base des résultats d'analyse obtenus séparément pour chaque analyte et en fonction de leurs résultats de reproductibilité, la méthode doit être considérée de type II (DCHP, BBP, DBP, DIBP et DEP) ou de type IV (DIDP, DINP, DNOP, DEHP et DMP).

Tableau 3 : Dimethyl Phtalate (DMP)[3] – Résultats de l'évaluation des données

		S001	S002	S003	S004	S005	S006
Nbre de laboratoires ayant soumis des résultats conformes		11	10	11	10	10	11
Moyenne	mg/L	0,020	0,073	0,018	0,031	0,053	0,027
Médiane	mg/L	0,020	0,060	0,018	0,030	0,056	0,028
Valeur assignée	mg/L	0,030	0,097	0,030	0,049	0,104	0,046
Valeur d'écart type relatif assignée		-33,3 %	-38,1 %	-40,0 %	-38,8 %	-46,2 %	-39,1 %
ÉT de répétabilité.	mg/L	0,003	0,007	0,002	0,006	0,011	0,003
ÉT de reproductibilité	mg/L	0,006	0,041	0,007	0,011	0,022	0,009
ÉT rel. de répétabilité		9,42 %	7,33 %	8,04 %	13,00 %	10,25 %	7,09 %
ÉT rel. de reproductibilité		20,10 %	42,40 %	23,12 %	22,54 %	21,10 %	19,07 %
ÉT Horwitz modifiée**		22,00 %	22,00 %	22,00 %	22,00 %	22,00 %	22,00 %
HORRATR		0,91	1,93	1,05	1,02	0,96	0,87
Limite de répétabilité, r (2.77 X sr)	mg/L	0,008	0,020	0,007	0,018	0,030	0,009
Limite de reproductibilité, R (2.77 X sR)	mg/L	0,017	0,114	0,019	0,031	0,061	0,024
Limite rel. de répétabilité		26,09 %	20,32 %	22,28 %	36,00 %	28,38 %	19,64 %
Limite rel. de reproductibilité		55,67 %	117,45 %	64,05 %	62,44 %	58,45 %	52,84 %
Nbre de laboratoires après élimination des valeurs aberrantes		9	9	8	8	9	10
Nbre de mesures sans valeurs aberrantes		18	18	15	16	18	20

[3] Méthode de type IV

Tableau 4 : Diethyl Phtalate (DEP)[4] – Résultats de l'évaluation des données

		S001	S002	S003	S004	S005	S006
Nbre de laboratoires ayant soumis des résultats conformes		12	11	11	11	10	12
Moyenne	mg/L	0,048	0,065	0,030	0,039	0,021	0,059
Médiane	mg/L	0,044	0,076	0,029	0,041	0,023	0,061
Valeur assignée	mg/L	0,057	0,092	0,031	0,056	0,030	0,089
Valeur d'écart type relatif assignée		-22,8 %	-17,4 %	-6,5 %	-26,8 %	-23,3 %	-31,5 %
ÉT de répétabilité.	mg/L	0,006	0,010	0,005	0,004	0,003	0,002
ÉT de reproductibilité	mg/L	0,026	0,026	0,015	0,017	0,008	0,019
ÉT rel. de répétabilité		10,49 %	11,32 %	15,28 %	7,00 %	11,41 %	2,53 %
ÉT rel. de reproductibilité		45,36 %	28,49 %	47,95 %	29,71 %	25,74 %	20,98 %
ÉT Horwitz modifiée**		22,00 %	22,00 %	22,00 %	22,00 %	22,00 %	22,00 %
HORRATR		2,06	1,30	2,18	1,35	1,17	0,95
Limite de répétabilité, r (2.77 X sr)	mg/L	0,017	0,029	0,013	0,011	0,009	0,006
Limite de reproductibilité, R (2.77 X sR)	mg/L	0,072	0,073	0,041	0,046	0,021	0,052
Limite rel. de répétabilité		29,05 %	31,35 %	42,32 %	19,40 %	31,60 %	7,01 %
Limite rel. de reproductibilité		125,66 %	78,91 %	132,81 %	82,29 %	71,30 %	58,12 %
Nbre de laboratoires après élimination des valeurs aberrantes		11	10	11	9	10	11
Nbre de mesures sans valeurs aberrantes		21	20	21	17	20	22

[4] Méthode de type II

Tableau 5 : Diisobutyl Phtalate (DIBP)[5] – Résultats de l'évaluation des données

		S001	S002	S003	S004	S005	S006
Nbre de laboratoires ayant soumis des résultats conformes		11	10	11	10	10	11
Moyenne	mg/L	0,049	0,087	0,076	0,119	0,054	0,046
Médiane	mg/L	0,049	0,085	0,076	0,123	0,055	0,045
Valeur assignée	mg/L	0,035	0,076	0,058	0,107	0,061	0,045
Valeur d'écart type relatif assignée		40,0 %	11,8 %	31,0 %	15,0 %	-9,8 %	0,0 %
ÉT de répétabilité.	mg/L	0,003	0,006	0,007	0,009	0,002	0,004
ÉT de reproductibilité	mg/L	0,011	0,019	0,014	0,023	0,012	0,013
ÉT rel. de répétabilité		7,43 %	7,71 %	11,55 %	8,81 %	4,04 %	9,54 %
ÉT rel. de reproductibilité		32,18 %	25,23 %	24,48 %	21,95 %	19,98 %	28,37 %
ÉT Horwitz modifiée**		22,00 %	22,00 %	22,00 %	22,00 %	22,00 %	22,00 %
HORRATR		1,46	1,15	1,11	1,00	0,91	1,29
Limite de répétabilité, r (2.77 X sr)	mg/L	0,007	0,016	0,019	0,026	0,007	0,012
Limite de reproductibilité, R (2.77 X sR)	mg/L	0,031	0,053	0,039	0,065	0,034	0,035
Limite rel. de répétabilité		20,58 %	21,35 %	31,98 %	24,42 %	11,19 %	26,44 %
Limite rel. de reproductibilité		89,15 %	69,88 %	67,80 %	60,81 %	55,35 %	78,58 %
Nbre de laboratoires après élimination des valeurs aberrantes		11	10	11	10	10	11
Nbre de mesures sans valeurs aberrantes		21	20	21	20	20	22

[5] Méthode de type II

Tableau 6 : Dibutyl Phtalate (DBP)[6] – Résultats de l'évaluation des données

		S001	S002	S003	S004	S005	S006
Nbre de laboratoires ayant soumis des résultats conformes		12	11	12	11	11	12
Moyenne	mg/L	0,103	0,264	0,078	0,728	0,090	0,178
Médiane	mg/L	0,103	0,266	0,074	0,666	0,089	0,174
Valeur assignée	mg/L	0,107	0,281	0,057	1,039	0,032	0,153
Valeur d'écart type relatif assignée		-3,7 %	-5,3 %	29,8 %	-35,9 %		
ÉT de répétabilité	mg/L	0,009	0,014	0,011	0,033	0,004	0,012
ÉT de reproductibilité	mg/L	0,022	0,048	0,021	0,314	0,018	0,022
ÉT rel. de répétabilité		8,24 %	5,03 %	19,11 %	3,21 %	13,79 %	7,87 %
ÉT rel. de reproductibilité		20,73 %	17,01 %	36,78 %	30,25 %	57,05 %	14,66 %
ÉT Horwitz modifiée**		22,00 %	19,36 %	22,00 %	15,91 %	22,00 %	21,22 %
$HORRAT_R$		0,94	0,88	1,67	1,90	2,59	0,69
Limite de répétabilité, r (2.77 X sr)	mg/L	0,024	0,039	0,030	0,092	0,012	0,033
Limite de reproductibilité, R (2.77 X sR)	mg/L	0,061	0,132	0,058	0,871	0,051	0,062
Limite rel. de répétabilité		22,81 %	13,92 %	52,94 %	8,89 %	38,21 %	21,80 %
Limite rel. de reproductibilité		57,43 %	47,12 %	101,88 %	83,79 %	158,03 %	40,60 %
Nbre de laboratoires après élimination des valeurs aberrantes		12	11	12	10	11	11
Nbre de mesures sans valeurs aberrantes		23	22	23	20	22	22

[6] Méthode de type II

Tableau 7 : Benzyl Butyl Phtalate (BBP)[7] – Résultats de l'évaluation des données

		S001	S002	S003	S004	S005	S006
Nbre de laboratoires ayant soumis des résultats conformes		11	10	11	10	10	11
Moyenne	mg/L	0,049	0,026	0,033	0,074	0,075	0,050
Médiane	mg/L	0,050	0,027	0,034	0,075	0,078	0,051
Valeur assignée	mg/L	0,057	0,029	0,037	0,088	0,087	0,053
Valeur d'écart type relatif assignée		-12,3 %	-6,9 %	-8,1 %	-14,8 %	-10,3 %	-3,8 %
ÉT de répétabilité.	mg/L	0,002	0,001	0,003	0,004	0,003	0,003
ÉT de reproductibilité	mg/L	0,008	0,004	0,005	0,011	0,015	0,007
ÉT rel. de répétabilité		4,30 %	4,96 %	8,08 %	5,10 %	3,31 %	4,78 %
ÉT rel. de reproductibilité		13,71 %	13,82 %	13,93 %	12,72 %	17,00 %	14,00 %
ÉT Horwitz modifiée**		22,00 %	22,00 %	22,00 %	22,00 %	22,00 %	22,00 %
HORRAT$_R$		0,62	0,63	0,63	0,58	0,77	0,64
Limite de répétabilité, r (2.77 X sr)	mg/L	0,007	0,004	0,008	0,012	0,008	0,007
Limite de reproductibilité, R (2.77 X sR)	mg/L	0,022	0,011	0,014	0,031	0,041	0,021
Limite rel. de répétabilité		11,90 %	13,75 %	22,38 %	14,14 %	9,16 %	13,23 %
Limite rel. de reproductibilité		37,98 %	38,27 %	38,58 %	35,23 %	47,09 %	38,77 %
Nbre de laboratoires après élimination des valeurs aberrantes		9	8	10	9	9	10
Nbre de mesures sans valeurs aberrantes		17	15	19	18	18	20

[7] Méthode de type II

Tableau 8 : Di-cyclohexyl Phtalate (DCHP)[8] – Résultats de l'évaluation des données

		S001	S002	S003	S004	S005	S006
Nbre de laboratoires ayant soumis des résultats conformes		9	8	9	8	8	9
Moyenne	mg/L	0,079	0,042	0,030	0,088	0,046	0,031
Médiane	mg/L	0,076	0,044	0,033	0,091	0,050	0,033
Valeur assignée	mg/L	0,084	0,048	0,038	0,105	0,057	0,036
Valeur d'écart type relatif assignée		-9,5 %	-8,3 %	-13,2 %	-13,3 %	-12,3 %	-8,3 %
ÉT de répétabilité	mg/L	0,005	0,006	0,003	0,005	0,002	0,001
ÉT de reproductibilité	mg/L	0,024	0,008	0,005	0,011	0,011	0,006
ÉT rel. de répétabilité		5,60 %	13,13 %	6,75 %	4,84 %	3,25 %	3,67 %
ÉT rel. de reproductibilité		28,46 %	16,05 %	12,93 %	10,20 %	18,83 %	16,37 %
ÉT Horwitz modifiée**		22,00 %	22,00 %	22,00 %	22,00 %	22,00 %	22,00 %
HORRATR		1,29	0,73	0,59	0,46	0,86	0,74
Limite de répétabilité, r (2.77 X sr)	mg/L	0,013	0,017	0,007	0,014	0,005	0,004
Limite de reproductibilité, R (2.77 X sR)	mg/L	0,066	0,021	0,014	0,030	0,030	0,016
Limite rel. de répétabilité		15,53 %	36,37 %	18,69 %	13,40 %	9,00 %	10,18 %
Limite rel. de reproductibilité		78,83 %	44,46 %	35,82 %	28,24 %	52,15 %	45,35 %
Nbre de laboratoires après élimination des valeurs aberrantes		9	7	8	7	7	8
Nbre de mesures sans valeurs aberrantes		18	14	15	14	14	16

[8] Méthode de type II

Tableau 9 : Bis (2-ethylhexyl) Phtalate (DEHP)[9] – Résultats de l'évaluation des données

		S001	S002	S003	S004	S005	S006
Nbre de laboratoires ayant soumis des résultats conformes		12	11	12	11	11	12
Moyenne	mg/L	0,101	0,028	0,602	0,150	0,741	1,032
Médiane	mg/L	0,099	0,026	0,654	0,180	0,709	1,115
Valeur assignée	mg/L	0,217	0,046	1,049	0,328	1,569	2,013
Valeur d'écart type relatif assignée		-54,4 %	-43,5 %	-37,7 %	-45,1 %	-54,8 %	-44,6 %
ÉT de répétabilité	mg/L	0,017	0,005	0,206	0,016	0,122	0,266
ÉT de reproductibilité	mg/L	0,019	0,011	0,238	0,063	0,465	0,563
ÉT rel. de répétabilité		7,72 %	11,54 %	19,66 %	4,82 %	7,78 %	13,20 %
ÉT rel. de reproductibilité		8,92 %	24,15 %	22,70 %	19,11 %	29,61 %	27,96 %
ÉT Horwitz modifiée**		20,13 %	22,00 %	15,88 %	18,92 %	14,95 %	14,40 %
HORRATR		0,44	1,10	1,43	1,01	1,98	1,94
Limite de répétabilité, r (2.77 X sr)	mg/L	0,046	0,015	0,571	0,044	0,338	0,736
Limite de reproductibilité, R (2.77 X sR)	mg/L	0,054	0,031	0,660	0,174	1,287	1,559
Limite rel. de répétabilité		21,39 %	31,98 %	54,45 %	13,36 %	21,54 %	36,55 %
Limite rel. de reproductibilité		24,70 %	66,91 %	62,87 %	52,93 %	82,03 %	77,46 %
Nbre de laboratoires après élimination des valeurs aberrantes		10	10	12	9	11	12
Nbre de mesures sans valeurs aberrantes		20	20	23	18	22	24

[9] Méthode de type IV

Tableau 10 : Di-n-octyl Phtalate (DNOP)[10] – Résultats de l'évaluation des données

		S001	S002	S003	S004	S005	S006
Nbre de laboratoires ayant soumis des résultats conformes		11	10	11	10	9	10
Moyenne	mg/L	0,031	0,015	0,051	0,073	0,016	0,026
Médiane	mg/L	0,035	0,015	0,049	0,061	0,019	0,028
Valeur assignée	mg/L	0,086	0,031	0,059	0,114	0,036	0,054
Valeur d'écart type relatif assignée		-59,3 %	-51,6 %	-16,9 %	-46,5 %	-47,2 %	-48,1 %
ÉT de répétabilité	mg/L	0,007	0,003	0,021	0,005	0,004	0,005
ÉT de reproductibilité	mg/L	0,010	0,003	0,023	0,038	0,008	0,011
ÉT rel. de répétabilité		7,84 %	9,25 %	36,33 %	4,51 %	11,18 %	9,23 %
ÉT rel. de reproductibilité		11,50 %	9,33 %	38,90 %	33,40 %	23,32 %	20,10 %
ÉT Horwitz modifiée**		22,00 %	22,00 %	22,00 %	22,00 %	22,00 %	22,00 %
HORRATR		0,52	0,42	1,77	1,52	1,06	0,91
Limite de répétabilité, r (2.77 X sr)	mg/L	0,019	0,008	0,059	0,014	0,011	0,014
Limite de reproductibilité, R (2.77 X sR)	mg/L	0,027	0,008	0,064	0,105	0,023	0,030
Limite rel. de répétabilité		21,73 %	25,61 %	100,62 %	12,50 %	30,97 %	25,56 %
Limite rel. de reproductibilité		31,85 %	25,85 %	107,76 %	92,52 %	64,60 %	55,66 %
Nbre de laboratoires après élimination des valeurs aberrantes		9	8	10	9	7	8
Nbre de mesures sans valeurs aberrantes		18	15	18	16	14	16

[10] Méthode de type IV

Tableau 11 : Di-isononyl Phtalate (DINP)[11] – Résultats de l'évaluation des données

		S001	S002	S003	S004	S005	S006
Nbre de laboratoires ayant soumis des résultats conformes		9	8	10	8	8	9
Moyenne	mg/L	0,027	0,108	1,820	0,059	0,115	0,064
Médiane	mg/L	0,028	0,116	1,497	0,058	0,136	0,051
Valeur assignée	mg/L	0,054	0,242	3,134	0,104	0,271	0,057
Valeur d'écart type relatif assignée		-48,1 %	-52,1 %	-52,2 %	-44,2 %	-49,8 %	-10,5 %
ÉT de répétabilité	mg/L	0,004	0,019	0,520	0,005	0,010	0,003
ÉT de reproductibilité	mg/L	0,006	0,027	1,067	0,019	0,072	0,040
ÉT rel. de répétabilité.¡		8,14 %	7,84 %	16,60 %	5,17 %	3,83 %	5,51 %
ÉT rel. de reproductibilité		10,27 %	11,18 %	34,06 %	18,41 %	26,60 %	70,59 %
ÉT Horwitz modifiée**		20,00 %	20,00 %	20,00 %	20,00 %	20,00 %	20,00 %
HORRATR		0,51	0,56	1,70	0,92	1,33	3,53
Limite de répétabilité, r (2.77 X sr)	mg/L	0,012	0,053	1,441	0,015	0,029	0,009
Limite de reproductibilité, R (2.77 X sR)	mg/L	0,015	0,075	2,957	0,053	0,200	0,111
Limite rel. de répétabilité		22,55 %	21,71 %	45,99 %	14,32 %	10,61 %	15,27 %
Limite rel. de reproductibilité		28,44 %	30,98 %	94,35 %	50,99 %	73,69 %	195,53 %
Nbre de laboratoires après élimination des valeurs aberrantes		5	6	9	7	6	6
Nbre de mesures sans valeurs aberrantes		10	11	17	13	12	12

[11] Méthode de type IV

Tableau 12 : Di-isodecyl Phtalate (DIDP)[12] – Résultats de l'évaluation des données

		S001	S002	S003	S004	S005	S006
Nbre de laboratoires ayant soumis des résultats conformes		8	7	8	7	7	8
Moyenne	mg/L	0,096	0,103	0,677	0,152	0,186	1,828
Médiane	mg/L	0,102	0,107	0,540	0,152	0,181	1,660
Valeur assignée	mg/L	0,275	0,186	0,200	0,281	0,427	3,070
Valeur d'écart type relatif assignée		-62,9 %	-42,5 %	170,0 %	-45,9 %	-57,6 %	-45,9%
ÉT de répétabilité	mg/L	0,009	0,018	0,477	0,048	0,027	0,202
ÉT de reproductibilité	mg/L	0,025	0,018	0,505	0,058	0,109	1,676
ÉT rel. de répétabilité		3,42 %	9,61 %	238,49 %	17,11 %	6,27 %	6,57 %
ÉT rel. de reproductibilité		9,11 %	9,61 %	252,34 %	20,51 %	25,43 %	54,59 %
ÉT Horwitz modifiée**		20,00 %	20,00 %	20,38 %	20,00 %	20,00 %	20,00 %
HORRATR		0,46	0,48	12,38	1,03	1,27	2,73
Limite de répétabilité, r (2.77 X sr)	mg/L	0,026	0,050	1,321	0,133	0,074	0,559
Limite de reproductibilité, R (2.77 X sR)	mg/L	0,069	0,050	1,398	0,160	0,301	4,642
Limite rel. de répétabilité		9,46 %	26,62 %	660,61 %	47,40 %	17,37 %	18,21 %
Limite rel. de reproductibilité		25,25 %	26,62 %	698,98 %	56,82 %	70,44 %	151,21 %
Nbre de laboratoires après élimination des valeurs aberrantes		7	5	7	7	7	7
Nbre de mesures sans valeurs aberrantes		14	10	13	14	14	14

[12] Méthode de type IV

6. Références

Report on the Method Performance Study of a Method to Determine Phthalates in Wine Determination of Ten Phthalates in Wine by Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC-MS), Wenzl Thomas, Karasek Lubomir, Giri Anupam. Publications Office of the European Union 2015 doi :10.2787/666948 (online) https://publications.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/b3ebef67-f1db-4fb2-97ce-bfc301c8ce68/language-en

Méthode OIV-MA-AS323-11 Méthode Type II

Méthode de dosage du polyaspartate de potassium dans le vin par chromatographie liquide à haute performance couplée a un détecteur de fluorescence

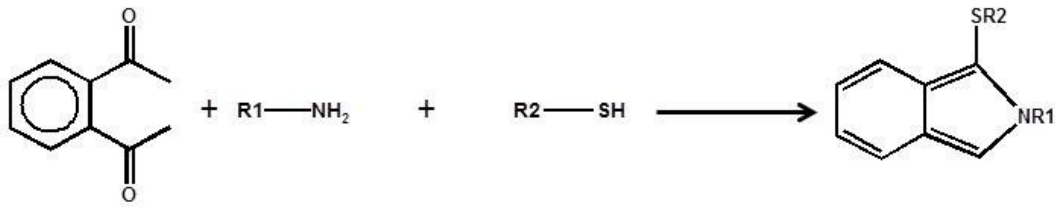
(Résolution OIV-OENO 619-2019)

1. DOMAINE D'APPLICATION

Cette méthode s'applique à l'analyse du polyaspartate de potassium (PAK) dans les vins à des concentrations supérieures à 40 mg/L.

2. PRINCIPE

La procédure consiste à réaliser le dosage de l'acide aspartique dans le vin avant et après hydrolyse acide, par l'intermédiaire d'une dérivatisation avec de l'ortho-phtalaldéhyde (OPA) suivie d'une analyse chromatographique couplée à un détecteur de fluorescence. La différence de teneur en acide aspartique entre l'échantillon hydrolysé et celui non hydrolysé indiquera le niveau d'addition de polyaspartate.



Ortho-phtalaldéhyde (OPA) AA dérivatisé

R1-NH_2 : acide aspartique
R2-SH : mercaptoéthanol

3. RÉACTIFS ET PRODUITS

Utiliser de l'eau ultra-pure (EN ISO 3696 de classe 3 ou eau bidistillée).

Pour l'hydrolyse acide :

3.1. Solution de métabisulfite de sodium ($Na_2S_2O_5$, n° CAS : 7681-57-4) à 10 g/L : peser 5 g de métabisulfite de sodium dans une fiole jaugée de 500 mL de classe A et compléter avec de l'eau ultra-pure.

3.2. Acide chlorhydrique (HCl, n° CAS : 7647-01-0) 6 M

3.3. Hydroxyde de sodium (NaOH, n° CAS : 1310-73-2) 5 M

Solutions étalons :

3.4. Acide aspartique (acide DL-aspartique, $C_4H_7NO_4$, pureté ≥ 99 %, n° CAS : 617-45-8)

3.4.1. Solution mère 1 : solution d'acide aspartique à 8000 mg/L dans de l'eau ultra-pure

3.4.2. Solution mère 2 : solution d'acide aspartique à 200 mg/L dans de l'eau ultra-pure

3.5. Acide aminocaproïque ($C_6H_{13}NO_2$, pureté ≥ 99 %, n° CAS : 60-32-2)

3.5.1. Solution mère d'acide aminocaproïque à 1000 mg/L dans de l'eau ultra-pure (étalon interne)

Solutions d'étalonnage préparées par dilution des solutions mère 1 et 2 dans de l'eau bidistillée. Les valeurs de référence sont les suivantes :

- **ÉT1 à 2 mg/L** : prélever 0,200 mL de la solution mère 2 (3.4.2.) et compléter à 20 mL dans une fiole jaugée avec de l'eau ultra-pure,
- **ÉT2 à 10 mg/L** : prélever 1,000 mL de la solution mère 2 (3.4.2.) et compléter à 20 mL dans une fiole jaugée avec de l'eau ultra-pure,
- **ÉT3 à 50 mg/L** : prélever 5,000 mL de la solution mère 2 (3.4.2.) et compléter à 20 mL dans une fiole jaugée avec de l'eau ultra-pure,
- **ÉT4 à 100 mg/L** : prélever 0,250 mL de la solution mère 1 (3.4.1) et compléter à 20 mL dans une fiole jaugée avec de l'eau ultra-pure,
- **ÉT5 à 250 mg/L** : prélever 0,625 mL de la solution mère 1 (3.4.1.) et compléter à 20 mL dans une fiole jaugée avec de l'eau ultra-pure,
- **ÉT6 à 500 mg/L** : prélever 1,250 mL de la solution mère 1 (3.4.1.) et compléter à 20 mL dans une fiole jaugée avec de l'eau ultra-pure.

Solution de dérivatisation :

3.6. Tétraborate de sodium décahydraté (solide, pureté ≥ 99 %, n° CAS : 1303-96-4)

3.6.1. Solution tampon à pH 10,5 de tétraborate de sodium décahydraté à 0,1 M : dissoudre 19,1 g de tétraborate de sodium dans une fiole jaugée de 500 mL avec de l'eau ultra-pure et compléter à 500 mL. Vérifier la valeur du pH.

3.7. Ortho-phtalaldéhyde (OPA) ($C_8H_6O_2$, pureté ≥ 99 %, n° CAS : 643-79-8)

3.8. Mercaptoéthanol (C_2H_6OS, pureté ≥ 99 %, n° CAS : 60-24-2)

3.9. Solution de dérivatisation : dans une fiole jaugée de 10 mL, introduire 100 mg d'OPA, 200 µL de mercaptoéthanol et 1 mL de méthanol, compléter au volume avec la solution tampon à pH 10,5 de tétraborate de sodium décahydraté à 0,1 M. La solution doit être préparée au moment de l'utilisation.

Phases mobiles pour CLHP :

3.10. Méthanol de qualité CLHP (liquide)

3.11. Tétrahydrofurane de qualité CLHP (liquide)

3.12. Acétate de sodium anhydre (n° CAS : 127-09-3)

3.12.1. Solution tampon d'acétate de sodium 0,05 M : dissoudre 2,05 g d'acétate de sodium anhydre dans une fiole jaugée de 500 mL avec de l'eau ultrapure et compléter à 500 mL.

3.13. Acétonitrile (CH_3CN) de qualité CLHP (liquide)

3.14. Eau ultrapure (par exemple de qualité EN ISO 3696 de classe 3 ou eau bidistillée)

3.15. Phase mobile :

- [éluent A] : eau ultra-pure
- [éluent B] : solution tampon d'acétate de sodium à 0,05 M/tétrahydrofurane (96:4)
- éluent C] : méthanol
- [éluent D] : acétonitrile

4. MATÉRIEL ET APPAREILLAGE

Sauf mention contraire, la verrerie nécessaire pour la préparation des solutions devra être de classe A.

4.1. Plaque chauffante

4.2. Flacon de 4 mL en verre teinté avec bouchon à vis

4.3. Micropipette de 0,100-1,000 mL

4.4. Filtre seringue à membrane en acétate de cellulose avec une porosité de 0,20 µm

4.5. Balance de précision

4.6. Fioles jaugées

4.7. Système CLHP incluant une pompe quaternaire, un échantillonneur automatique, un compartiment thermostaté pour la colonne et un détecteur FLD

4.8. Colonne : C18 à extrémités polaires ou « end-capping » (par exemple Syncronis aQ 4,6 x 250 mm ; 5 µm)

5. MODE OPÉRATOIRE

Le mode opératoire comporte trois étapes : l'hydrolyse acide à chaud de l'échantillon de vin, la procédure de préparation des échantillons (aussi bien des solutions étalons que des vins avant et après hydrolyse) à soumettre à l'analyse par CLHP-FLD pour la détermination de la concentration en acide aspartique et à l'analyse par CLHP-FLD.

Étape 1 : hydrolyse acide

- Dans un flacon de 4 mL (4.2.) en verre teinté avec bouchon à vis, introduire successivement :
- 0,2 mL de la solution de métabisulfite de sodium à 10 g/L (3.1.)
- 2 mL d'échantillon de vin
- 2 mL de HCl 6 M (3.2.)
- Chauffer à 108 °C (± 2 °C) sur la plaque chauffante pendant 72 heures
- Transférer dans une fiole jaugée de 10 mL, ajouter 2,5 mL de NaOH 5 M (3.3.) et compléter au volume à 10 ml avec de l'eau ultra-pure.

La vérification de l'intégralité du processus d'hydrolyse acide est détaillée au point 6.

Étape 2 : préparation pour l'analyse CLHP

La méthode consiste en une réaction de dérivatisation de l'acide aspartique avec l'ortho-phtalaldéhyde (OPA).
La préparation des échantillons pour l'analyse CLHP est la suivante :

Solutions d'étalonnage et échantillons de vin avant hydrolyse :

- prélever et microfiltrer (filtre de 0,20 µm) 1 mL de la solution à analyser dans une fiole jaugée de 20 mL,
- ajouter 0,2 mL d'étalon interne (3.5.1.),
- compléter à 20 ml avec de l'eau ultra-pure.

Échantillons après hydrolyse :

- prélever et microfiltrer (filtre de 0,20 µm) 5 mL de la solution à analyser dans une fiole jaugée de 20 mL,
- ajouter 0,2 mL d'étalon interne (3.5.1.),
- compléter à 20 ml avec de l'eau ultra-pure.

Étape 3 : analyse CLHP

Paramètres instrumentaux pour l'analyse CLHP-FLD, à titre d'exemple :

- Température du four : 40 °C
- Injection : 10 µL
- Longueur d'onde du détecteur FLD (λ) : λex = 340 nm ; λem = 450 nm
- La séparation est réalisée en mode gradient (voir les éluents au point 3.15.) :

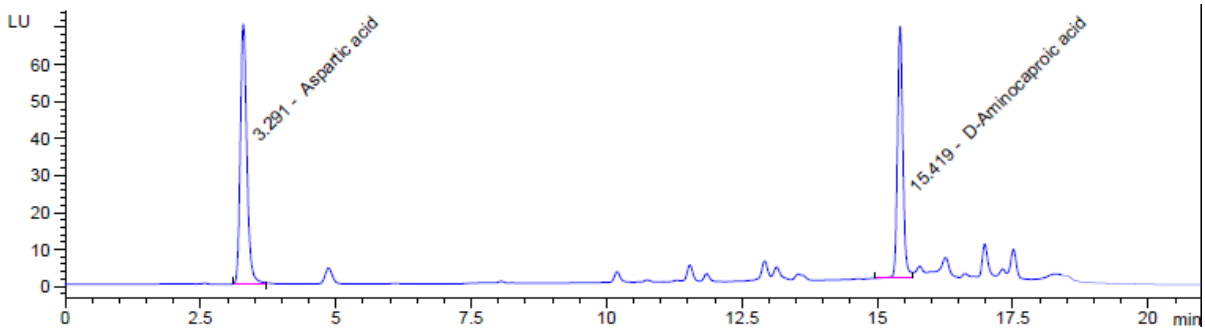
Temps	% B	% C	% D	Débit
0,00	100,0	0,0	0,0	1,1
3,00	100,0	0,0	0,0	1,1
15,00	50,0	25,0	25,0	1,1
17,00	84,0	8,0	8,0	1,1
18,00	100,0	0,0	0,0	1,1
Temps d'exécution : 21 min + 2 min de temps d'arrêt				

Exemple de dérivatisation automatisée réalisée par un échantillonneur automatique :

- Position des réactifs dans l'échantillonneur :
  - Position 1 : méthanol
  - Position 3 : OPA
  - Position 4 : flacon vide
  - Position 11 : eau ultra-pure

- <u>Étapes de dérivatisation :</u>
  - prélever 2,0 µL d'air,
  - prélever 20,0 µL du flacon 1,
  - transférer 20,0 µL dans le flacon 4,
  - prélever 5,0 µL de l'échantillon,
  - transférer 5,0 µL dans le siège,
  - prélever 0,0 µL du flacon 1 (pour nettoyer l'extérieur de l'aiguille),
  - prélever 5,0 µL du flacon 3,
  - transférer 5,0 µL dans le siège,
  - mélanger 10,0 µL dans le siège, 10 fois,
  - attendre 0,50 min,
  - injecter.

Si les résultats excèdent la limite supérieure de la courbe d'étalonnage, diluer l'échantillon de manière appropriée et répéter la procédure analytique.



Chromatogramme issu d'un vin rouge

6. CONTRÔLE QUALITÉ

Pour chaque série d'analyses, il convient d'effectuer un contrôle qualité par l'analyse d'un échantillon de vin additionné de 100 mg/L d'acide aspartique.
L'échantillon, préparé selon les indications du point 5, est analysé au début de la série. Les résultats obtenus, exprimés par le taux de rendement, sont reportés sur une carte de contrôle.

7. CARACTÉRISTIQUES DE LA MÉTHODE : PARAMÈTRES DE VALIDATION INTRALABORATOIRE

- Linéarité

Des solutions d'étalonnage non hydrolysées ni dérivatisées de concentration connue sont utilisées pour simuler la totalité du processus analytique. Pour être acceptée, chaque séquence doit présenter une courbe d'étalonnage avec un $R^2 > 0,990$ (figure 1).

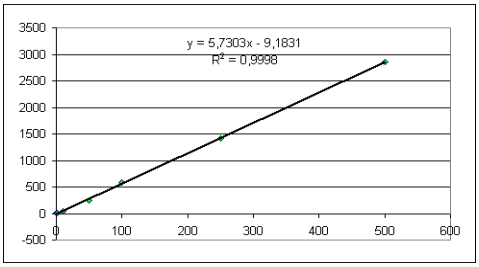


Figure 1

- Recouvrement et effet matrice

Solutions aqueuses :
La vérification du taux de recouvrement des processus d'hydrolyse acide et de dérivatisation est effectuée par comparaison entre les solutions étalons aqueuses d'acide aspartique avant et après hydrolyse. Trois solutions de concentration connue (25, 100 et

200 mg/L) ont été préparées et les valeurs obtenues sont reportées dans le tableau suivant :

	Test 1	**Test 2**	**Test 3**
Avant hydrolyse (mg/L)	25,4	109	213
Après hydrolyse (mg/L)	25,2	108	213
Taux de recouvrement (%)	**99,2**	**99,1**	**100**

Vin :

La méthode des ajouts dosés à un vin blanc et un vin rouge a été appliquée (ajouts graduels de polyaspartate de potassium à 50 et 200 mg/L, pour vérifier l'interférence de la matrice dans le dosage du PAK). Cinq essais de répétabilité ont été réalisés pour chacune de ces teneurs.

	Vin rouge brut (mg/L)	**Vin rouge + 50 mg/L**	**Vin rouge + 200 mg/L**	**Vin blanc brut (mg/L)**	**Vin blanc + 50 mg/L**	**Vin blanc + 200 mg/L**
Répétitions (acide asp.)	84,0	123,9	258,2	121,9	164,6	294,2
	85,4	127,3	259,4	123,2	163,3	291,5
	83,8	125,1	250,2	121,9	170,3	291,3
	87,7	124,4	253,5	119,5	161,9	284,8
	83,2	126,1	256,9	123,3	160,0	287,4
Moyenne (acide asp.)	84,8	125,4	255,6	122,0	164,0	289,8
S_r (acide asp.)	1,8	1,4	3,8	1,5	3,9	3,7
Moyenne (PAK ajouté)	-	46,6	196,3	-	48,3	193,0
S_r (PAK ajouté)	-	2,8	5,0	-	4,9	3,8
Horrat r	-	0,99	0,52	-	1,71	0,48
PAK théorique	-	50	200	-	50	200
Rec PAK %	-	93	98	-	94	96

S_r (acide asp.) : écart type des essais de répétabilité, exprimé en acide aspartique
S_r (PAK) : écart type des essais de répétabilité, exprimé en PAK
Rec PAK % : recouvrement, exprimé en PAK

Le taux de recouvrement doit être compris entre 80 et 110 %.
La répétabilité satisfait au critère d'Horrat.

Limites de détection et de quantification
En considérant que le vin contient naturellement de l'acide aspartique, il a été choisi de déterminer LD et LQ sur la base du rapport signal/bruit déterminé sur des échantillons de vin.

CALCUL DES LIMITES DE DÉTECTION ET DE QUANTIFICATION **CAS n°3 : LE RAPPORT SIGNAL SUR BRUIT (S/B) EST CONNU POUR UNE CONCENTRATION BASSE**		
C	24,74	Valeur de la concentration de l'échantillon de vin
S/B	122,5	Rapport signal/bruit
LD	**0,7**	Limite de détection
LQ	**2,1**	Limite de quantification (3 x LD)

8. CALCUL ET EXPRESSION DU RÉSULTAT

Le calcul de la concentration en acide aspartique en milligrammes par litre (mg/L) présent dans les échantillons est réalisé par le programme d'acquisition.

La quantité de polyaspartate de potassium (PAK) additionnée correspond à la différence entre l'échantillon soumis à l'hydrolyse et l'échantillon brut non hydrolysé :

$$PAK\ (mg/L) = \left(acide\ aspartique_{vin_hydrolysé} - acide\ aspartique_{vin_brut}\right) \times f_{PAK}$$

où f_{PAK} est le facteur de conversion du polyaspartate de potassium en acide aspartique calculé comme le rapport entre les masses moléculaires du monomère de polyaspartate de potassium et l'acide aspartique, selon l'équation :

$$f_{PAK} = \frac{PM_{monomère\ PAK}}{PM_{acide\ aspartique}} = 1{,}15$$

Les résultats sont exprimés en mg/L avec un seul chiffre significatif après la virgule.

9. BIBLIOGRAPHIE

- OIV-MA-AS1-10 (OENO 7-2000)

Méthode OIV-MA-AS323-12 Méthodes Type IV

Analyse simultanée du Fer, du Cuivre, du Potassium, du Calcium, et du Manganèse dans les vins, par MP/AES (Spectromètre d'émission atomique à plasma micro-ondes)

(Résolution OIV-OENO 637-2021)

1 Domaine d'application

La présente méthode décrit une méthode (type IV) de spectrométrie d'émission atomique à plasma d'azote, pour la détermination simultanée des éléments suivants dans les vins.

Cuivre	0,05 à 1 $mg.L^{-1}$
Fer	1 à 10 $mg.L^{-1}$
Potassium	15 à 1200 $mg.L^{-1}$
Calcium	1 à 100 $mg.L^{-1}$
Manganèse	0,25 à 4 $mg.L^{-1}$

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

- ISO 78-2 : Chimie – Plans de normes
- ISO 3696 : Eau pour laboratoire à usage analytique
- Résolution OIV OENO 418-2013

3 Principe

Le spectromètre d'émission atomique (MP-AES) couplé au plasma d'azote induit par micro-onde est une méthode d'analyse spectroscopique élémentaire fonctionnant sur le principe de l'émission atomique, avec détection optique.

L'échantillon, sous forme liquide, est introduit dans un nébuliseur concentrique où un aérosol de l'échantillon va être généré via une chambre de nébulisation cyclonique double passage puis introduit au centre du plasma par la torche à plasma. Le plasma est généré à l'aide d'un guide d'onde qui va focaliser et maintenir l'énergie micro-onde autour de la torche. L'échantillon est ainsi désolvaté, atomisé, et ionisé conduisant à une excitation des atomes et des ions qui sont ensuite transférés dans le système optique monochromateur. Le détecteur CCD permet d'analyser simultanément le fond et le signal pour une meilleure justesse de l'analyse.

Cet appareil fonctionne avec un plasma d'azote généré à partir d'air comprimé et permet ainsi de réduire les coûts de fonctionnement comparativement aux autres techniques d'analyse en spectroscopie élémentaire (ICP, ou AA).

4 Réactifs et solutions

Sauf indication contraire, utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue.

4.1 Eau déminéralisée, ultrapure avec une résistivité ≥ à 18 MΩ (norme ISO 3696).

4.2 Solution(s) mono ou multi-élémentaires (à 1000 ou 10000 $mg.L^{-1}$) pour les éléments minéraux analysés (Ca, Cu, Fe, K et Mn) et pour l'Indium (In) utilisé en contrôle interne. Utiliser quand cela est possible des solutions certifiées.

4.3 Contrôle interne (à titre d'exemple) : Solutions synthétiques mono ou multi-élémentaire préparées, et vin de contrôle dont les valeurs cibles ont été obtenues dans des conditions fiables (vins certifiés, ou issus d'un programme de comparaison interlaboratoire).

4.4 Acide nitrique à plus de 60% (w/w), pour analyse de traces (CAS 7697-37-2).

4.5 Ethanol à plus de 99 % (v/v) (CAS 64-17-5).

4.6 Chlorure de Cesium à plus de 99 % (w/w) (CAS 7647-17-8).

5 Appareil et équipements

5.1 Spectromètre d'émission atomique couplé au plasma micro-onde d'azote (MP-AES).

Note : Le MP-AES peut être équipé d'une boucle d'introduction d'échantillon afin d'augmenter la durée de vie des consommables (nébuliseur et torche à plasma). Ce système réalise un rinçage à l'acide nitrique des voies d'entrée de l'échantillon dans la chambre de nébulisation. La quantité d'échantillon introduite dans le nébuliseur, ainsi que l'usure du matériel sont de cette manière minimisées.

5.2 Micropipettes raccordées, permettant des prises de volumes variables.

5.3 Fioles jaugées de classe A

6 Préparation de l'échantillon

6.1 Exemple de préparation de la gamme d'étalonnage

La quantification est réalisée par étalonnage externe à partir de solutions étalons, permettant de constituer des droites d'étalonnage en 5 points.
Les solutions de calibrage sont ajustées à 12 % v/v d'éthanol et 0,2 % v/v d'acide nitrique

Exemple de gamme d'étalonnage :

$mg.L^{-1}$	**S0**	**S1**	**S2**	**S3**	**S4**	**S5**
Cu	0	0,1	0,25	0,5	0,75	1
Fe	0	1	2,5	5	7,5	10
K	0	400	600	800	1000	1200
Ca	0	10	25	50	75	100
Mn	0	0,5	1	2	3	4

6.2 Dilution en ligne des échantillons

La gamme d'étalonnage, ainsi que les échantillons à analyser sont dilués en ligne au 1 :2, à l'aide d'un simple dispositif en Y placé en sortie de pompe péristaltique. L'échantillon (voie 1) est dilué à l'aide d'une solution d'acide nitrique à 0,2 %, d'Indium (600 $mg.L^{-1}$) et de chlorure de Césium (0,3 $g.L^{-1}$) (voie 2). L'indium est utilisé comme contrôle de stabilité tout au long de la séquence analytique, ainsi son intensité est mesurée pour l'ensemble des solutions analysées.

Cette dilution permet de limiter les effets de saturation, notamment sur le potassium. L'acide nitrique produit un léger effet de minéralisation, qui même partiel, facilite le passage des composés organique dans le plasma.

Précautions de sécurité – ***Il convient, lors de la manipulation des acides, que les opérateurs protègent leurs mains et leurs yeux. La manipulation des acides doit être effectuée sous une hotte appropriée.***

7 Mode opératoire

Les paramètres ayant permis d'atteindre les performances décrites dans le § 8 sont les suivants :

7.1 Paramètres de l'instrument :

La description suivante se réfère à un instrument MP-AES et constitue un exemple de conditions analytiques fournies à titre indicatif. Des modifications peuvent être réalisées par le laboratoire, autant que de besoin.

Paramètre de l'instrument	**Réglages**
Nébuliseur	Concentrique OneNeb inert
Chambre de nébulisation	Cyclonique à double passage
Tuyau pour l'échantillon	Noir-noir (débit moyen 0,25 mL/mn)
Tuyau pour diluant (HNO_3 à 0,2%)	Noir-noir (débit moyen 0,25 mL/mn)
Tuyau pour rejet	Bleu-bleu (débit moyen 1 mL/mn)
Durée de prélèvement	20 sec
Durée de stabilisation	15 sec
Durée de rinçage	15 sec
Vitesse de la pompe	15 rpm
Nombre de répliques	3
Vanne AVS4	**Réglages**
Vitesse de la pompe	10 tr/min
Délai de prélèvement	20 sec (vitesse : rapide)
Délai de basculement	18 sec
Durée de rinçage	15 sec (vitesse : rapide)
Durée de stabilisation	20 sec
Nombre de répliques	3

7.2 Paramètres d'acquisition

	Cuivre	Calcium	Fer	Potassium	Manganèse	Indium
Durée de lecture	3 secondes					
Position de visualisation	0	10	0	20	0	0
Débit de nébulisation	0,5 mL/min	0,95 mL/min	0,55 mL/min	0,9 mL/min	0,65 mL/min	0,75 mL/min
Taux d'injection d'air	Moyen					Elevé
Correction de fond	Automatique					
Ajustement de l'étalonnage	Rationnel					/
Longueur d'onde d'analyse	327,395 nm	445,478 nm	371,993 nm	404,414 nm	403,076 nm	325,600 nm

8 Expression des résultats

Les résultats sont exprimés en $mg.L^{-1}$ d'élément analysé, le nombre de décimales dépend des performances de la méthode pour l'élément considéré. Ainsi, le Cuivre et le Manganèse sont exprimés avec 2 décimales, le Fer avec 1 décimale, le Potassium et le Calcium à l'unité de mesure prés, en accord avec les incertitudes de mesures et limites de quantification de la méthode.

9 Annexe : Exemple de validation interne

Une évaluation des performances et une validation ont été menées selon le guide pratique pour la validation, le contrôle qualité, et l'estimation d'une méthode d'analyse œnologique usuelle (résolution OIV-OENO 418-2013).

9.1 Acquisition des données

7 matériaux de référence (MRE, échantillons dopés et/ou solutions synthétiques) répartis sur la gamme couvrant le domaine d'application des méthodes en termes de concentration ont été utilisés. Ces matériaux ont été analysés dans n = 5 séries dans des conditions de reproductibilité et dans un temps de stabilité du matériau pour le paramètre considéré. Pour chaque matériau et dans chaque série, p = 2 répétitions ont été réalisées. En l'absence de MR des solutions synthétiques, composées de 12 % éthanol et 0,2 % acide nitrique, peuvent être utilisées.

9.2 Résultats de fidélité

Cuivre 327,395 nm
(mg.L^{-1})

Fidélité	**Matériau 1** (vin rosé)	**Matériau 2** (vin rouge)	**Matériau 3** (vin rosé)	**Matériau 4** (vin rouge)	**Matériau 5** (vin blanc effervescent)	**Matériau 6** (vin blanc)
Valeur cible	0,05	0,15	0,25	0,5	0,75	1,0
Sr	0,0008	0	0,0032	0,0095	0,01	0,05
r	0,002	0	0,00885	0,02656	0,029	0,137
S*FI*	0,0015	0,00548	0,01500	0,01500	0,025	0,051
CV% (k=2)	6,27	7,11	12,88	6,01	6,66	9,96

Avec sr l'écart-type de répétabilité, r la répétabilité, sFI l'écart-type de fidélité intermédiaire et CV% le coefficient de variation de fidélité élargi.

Fer 371,993 nm
($mg.L^{-1}$)

Fidélité	**Matériau 1** (solution synthétique)	**Matériau 2** (vin rouge)	**Matériau 3** (Vin blanc effervescent)	**Matériau 4** (vin rosé)	**Matériau 5** (vin rouge)	**Matériau 6** (vin rouge)	**Matériau 7** (vin blanc)
Valeur cible	1	1,5	2	2,3	5	7,5	10
Sr	0,078	0	0,045	0,032	0,109	0,145	0,212
r	0,217	0	0,125	0,088	0,307	0,406	0,255
S*FI*	0,106	0,055	0,088	0,122	0,294	0,280	0,415
CV% (k=2)	24,11	6,68	8,63	10,51	11,56	7,19	8,06

Potassium 404,414 nm
($mg.L^{-1}$)

Fidélité	**Matériau 1** (solution synthétique)	**Matériau 2** (vin rosé)	**Matériau 3** (Vin blanc effervescent)	**Matériau 4** (vin blanc)	**Matériau 5** (vin rouge)	**Matériau 6** (solution synthétique)	**Matériau 7** (vin rouge)
Valeur cible	15	363	404,5	675	800	1000	1253
Sr	0,4	5,0	2,8	6,0	4,0	5,6	10,8
r	1,2	14,0	7,9	16,8	11,2	15,7	13,0
S*FI*	1,0	16,0	19,3	33,5	22,7	41,6	37,1
CV% (k=2)	13,94	8,54	8,79	9,08	5,34	7,87	5,45

Calcium 445,478 nm
($mg.L^{-1}$)

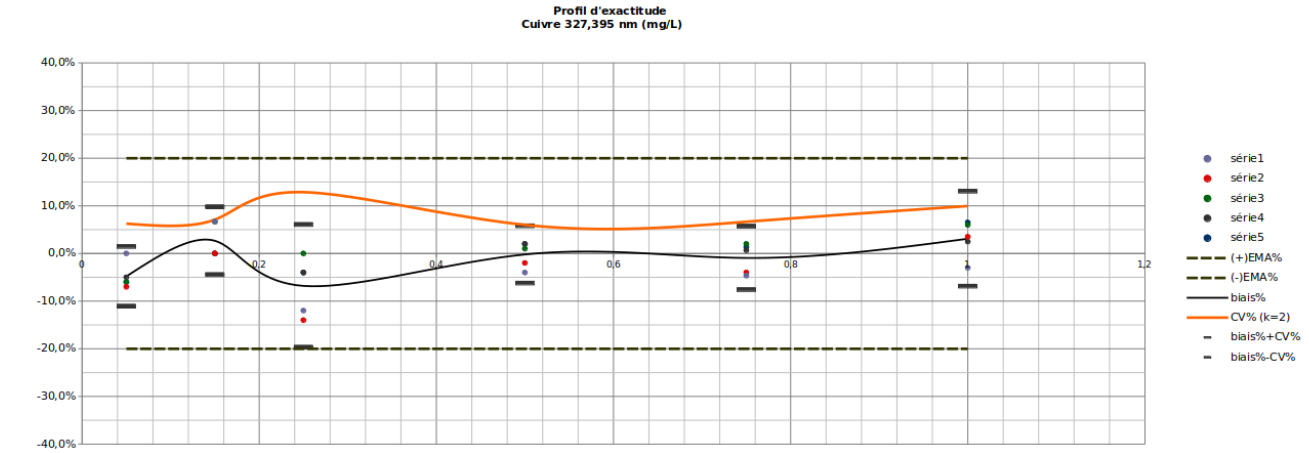
Fidélité	**Matériau 1** (solution synthétique)	**Matériau 2** (solution synthétique)	**Matériau 3** (Vin blanc)	**Matériau 4** (vin blanc effervescent)	**Matériau 5** (vin rouge)	**Matériau 6** (vin blanc)	**Matériau 7** (vin rosé)
Valeur cible	0,5	1	6,8	27,5	54	68	100
Sr	0,08	0,03	0,07	0,32	0,83	0,41	0,86
r	0,23	0,09	0,20	0,90	2,33	1,16	0,15
S*FI*	0,14	0,089	0,15	1,49	2,00	2,06	3,28
CV% (k=2)	68,59	15,33	4,81	10,59	6,67	6,01	6,64

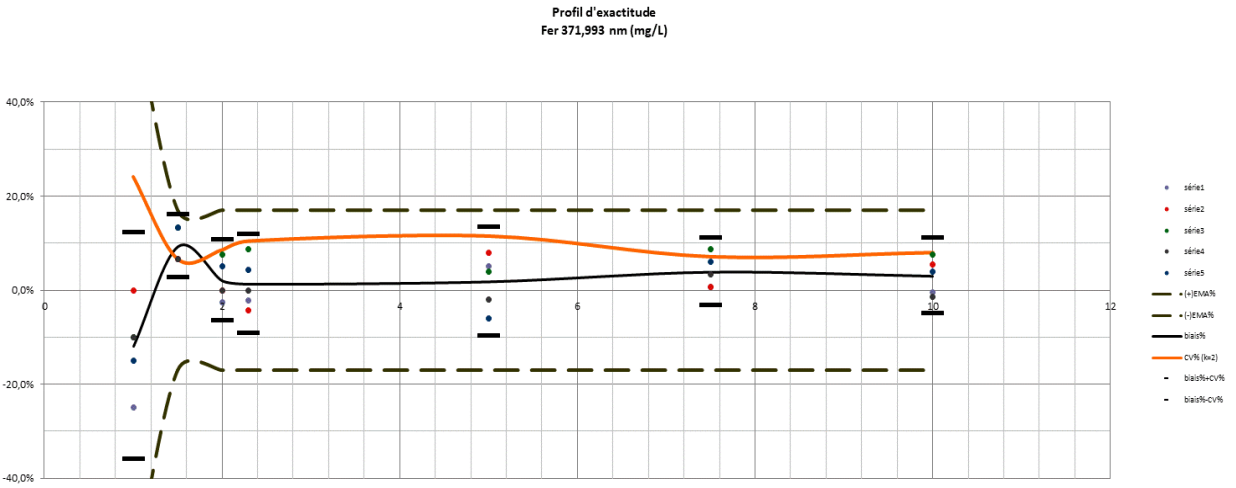
Manganèse 403,076 nm
($mg.L^{-1}$)

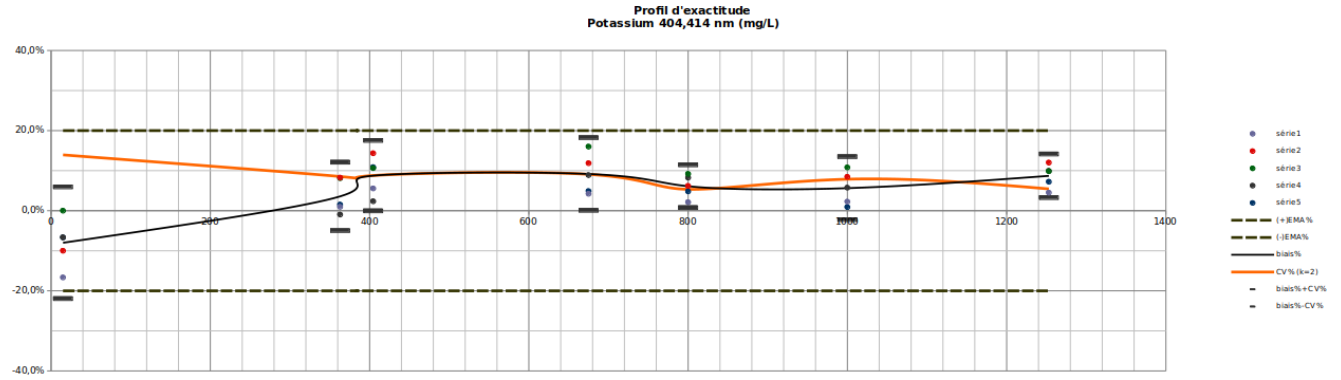
Fidélité	**Matériau 1** (solution synthétique)	**Matériau 2** (vin rouge)	**Matériau 3** (Vin rosé)	**Matériau 4** (vin rouge)	**Matériau 5** (vin blanc effervescent)	**Matériau 6** (vin rosé)	**Matériau 7** (vin blanc)
Valeur cible	0,25	0,54	0,67	1,34	2	3	4
Sr	0,019	0,008	0,006	0,012	0,015	0,016	0,020
r	0,054	0,023	0,018	0,034	0,042	0,045	0,017
S*FI*	0,023	0,011	0,021	0,028	0,051	0,092	0,153
CV% (k=2)	17,46	3,69	5,63	3,67	4,78	5,68	7,22

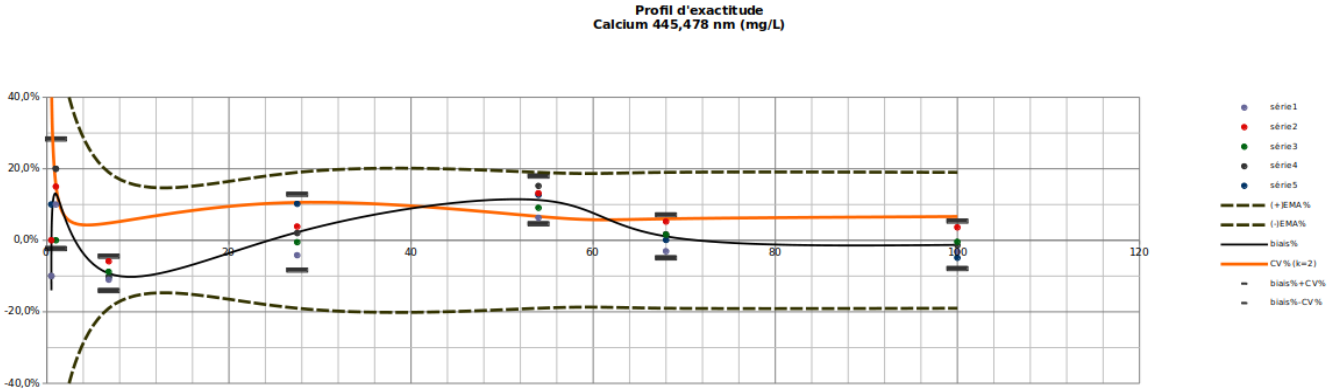
9.3 Justesse de la méthode

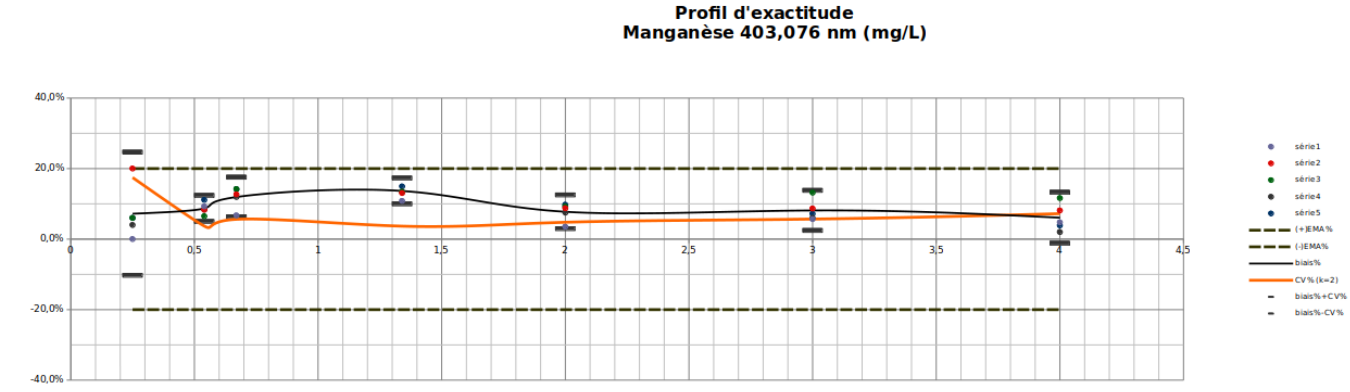
Des profils d'exactitude sont établis, graphiquement.


Profil d'exactitude
Cuivre 327,395 nm (mg/L)
40,0%
30,0%
20,0%
10,0%
0,0%
-10,0%
-20,0%
-30,0%
-40,0%
0
0,2
0,4
0,6
0,8
1
1,2
série1
série2
série3
série4
série5
(+)EMA%
(-)EMA%
biais%
CV% (k=2)
biais%+CV%
biais%-CV%


Profil d'exactitude
Fer 371,993 nm (mg/L)
40,0%
20,0%
0,0%
-20,0%
-40,0%
0
4
6
8
10
12
série1
série2
série3
série4
série5
(+)EMA%
(-)EMA%
biais%
CV% (k=2)
biais%+CV%
biais%-CV%







La vérification de la justesse est réalisée, pour chaque niveau de concentration, en comparant l'intervalle produit par la fidélité intermédiaire autour de la valeur

mesurée ($CV_{fidélité}$) à l'intervalle de l'EMA (Ecart Maximum Accepté) autour de la valeur de référence du matériau. L'exactitude est acceptée si le $CV_{fidélité}$ est compris dans l'EMA exactitude. Au regard des EMA, les tests de justesse sont validés pour l'ensemble des éléments étudiés.

9.4 Limites de quantification

Les limites de quantifications (LQ) sont établies en étudiant la gamme proche des valeurs limites basses. La valeur testée pour la LQ est validée si son CV% (k=2) < 60% (RESOLUTION OIV-OENO 418-2013).

Les limites de quantification suivantes ont été validées :

$mg.L^{-1}$	**LQ méthode**
Cuivre	0,05
Fer	1
Potassium	15
Calcium	1
Manganèse	0,25

METHOD OIV-MA-AS4-01 Méthode Type IV

Analyse microbiologique des vins et des moûts : detection, differenciation et denombrement des micro-organismes

(OIV-Oeno 206-2010)

L'analyse microbiologique a pour but de suivre les fermentations alcoolique et/ou malolactique et de déceler les risques d'altérations microbiennes, ce qui permet de détecter toute anomalie, non seulement dans le produit fini, mais aussi pendant les différentes phases de sa fabrication.

Remarque :

Toutes les manipulations doivent être faites selon les conditions aseptiques usuelles dans les travaux de microbiologie, en utilisant du matériel stérilisé, à proximité de la flamme d'un bec Bunsen ou dans une chambre à flux laminaire et en passant à la flamme les orifices des pipettes, tubes, flacons, etc. Avant d'effectuer l'analyse microbiologique, il est nécessaire d'effectuer correctement le prélèvement de l'échantillon à analyser.

Champ d'application :

L'analyse microbiologique peut être appliquée aux vins, moûts, mistelles et à tous produits similaires, même lorsque ceux-ci sont altérés par une activité microbienne. Ces méthodes sont aussi adaptées à l'analyse des préparations industrielles de microorganismes sélectionnés, levures LSA et bactéries lactiques.

Techniques d'analyse microbiologique :

1. Réactifs et produits
2. Installations et équipement
3. Échantillonnage
4. Essais de tenue

4.1 objectif
4.2 principe
4.3 mode opératoire
4.3.1 essai de tenue à l'air
4.3.2 essai de tenue à l'étuve

5. Techniques de microscopie pour la détection, différenciation des micro-organismes et dénombrement direct des levures

5.1. Examen microscopique des liquides ou des dépôts

5.2. Coloration de Gram pour la différentiation des bactéries isolées à partir de colonies (voir paragraphe 6)

5.3. Recherche de la catalase pour la différentiation des bactéries isolées à partir de colonies(voir paragraphe 6)

5.4. Dénombrement des cellules de levure – hémocytométrie

5.5. Dénombrement des cellules de levure – Coloration au bleu de méthylène

6. Dénombrement des micro-organismes par culture

6.1 Détection, différenciation et dénombrement des micro-organismes (numération sur plaque)

6.2. Culture en milieu liquide - "nombre le plus probable" (NPP).

1. RÉACTIFS ET PRODUITS

Équipement et appareillage courants de laboratoire, comme indiqué dans ISO 7218:2007 - Microbiologie des denrées alimentaires et aliments pour animaux - Règles générales relatives aux analyses microbiologiques.

Le matériel suivant est recommandé :

- Matériel et verrerie de laboratoire courants, stériles (stérilisés ou stériles prêts à l'emploi).
- Tubes (16x160 mm ou similaires) contenant 9 ml d'eau peptonée stérile (tryptone : 1 g/l) ou d'autres diluants à utiliser pour les dilutions d'échantillons en série.
- Éthanol pour passer à la flamme les étaleurs et les brucelles.
- Solution de peroxyde d'hydrogène à 3 %.
- Micropipette à bouts stériles : 1 ml et 0,2 ml.
- Tiges de verre coudées en L ou de forme triangulaire (crosses de hockey) ou étaleurs en plastique.

- Brucelles en acier inoxydable, à bords plats.
- Membrane de porosité 0,2 et 0,45 µm en ester de cellulose stérile (ou équivalent), d'un diamètre de 47 ou 50 mm, si possible avec une grille imprimée sur la surface, en conditionnement individuel.

- Éprouvettes stériles.
- Pipettes stériles de 10 ml.

2. INSTALLATIONS ET ÉQUIPEMENT

Équipement et appareillage courants de laboratoire, comme indiqué dans ISO 7218:2007 - Microbiologie des denrées alimentaires et aliments pour animaux - Règles générales relatives aux analyses microbiologiques.

Le matériel suivant est recommandé :

- Hotte microbiologique ou hotte à flux laminaire. En l'absence de ce dispositif, travailler à proximité (moins de 50 centimètres) d'un brûleur à gaz.
- Balance, d'une précision de ± 0,01 g.
- Autoclave.
- Incubateur, réglable de 25°C à 37°C.
- pH-mètre, présentant une précision de ± 0,1 unité pH et un seuil de mesure minimum de ± 0,01 unité pH.
- Réfrigérateur(s), réglé(s) à 5 ± 3 °C, et congélateur(s) dont la température devra être inférieure à -18°C et de préférence égale à -24 ± 2 °C.
- Bain thermostatique, réglé à 45 ± 1 °C
- Four à micro-ondes.
- Microscope optique.
- Brûleur à gaz.
- Dispositif de comptage de colonies.
- Équipement de culture en atmosphère modifiée (fiole scellée dans laquelle l'anaérobiose peut avoir lieu).
- Appareillage de filtrage avec des filtres de diamètre 47 mm ou 50 mm (en cas de filtration sur membrane).
- Agitateur vortex ou équivalent ;
- Etuve pour la sterilisation à sec ;
- Centrifugeuse ;
- Pompe à vécue.

3. ÉCHANTILLONNAGE

L'échantillon doit reproduire la microbiologie de la masse totale de moût ou de vin à analyser.Dans la mesure du possible, la masse doit être homogénéisée avant échantillonnage, afin de remettre en suspension les

micro-organismes qui tendent à se déposer au fond du récipient. Lorsqu'une homogénéisation n'est pas souhaitée, les échantillons doivent être prélevés là où les micro-organismes sont susceptibles (ou suspectés) d'être présents (c.-à-d. en cas de recherche de levures au fond des réservoirs ou fûts), mais dans ce cas les résultats ne sont pas quantitatifs. Avant de prélever un échantillon provenant d'un robinet, ce dernier doit être passé à la flamme, et 2 à 3 litres de liquide doivent être évacués. L'échantillon doit être placé dans un récipient stérile

L'échantillon doit être maintenu au frais et analysé le plus rapidement possible.

Les quantités suivantes d'échantillons sont nécessaires pour l'examen microbiologique :

Moût, ou moût en fermentation ou vin stocké : pas moins de 250 ml ;

Vin mis en bouteille ou emballé : pas moins d'une unité, quelle que soit la capacité ;

4. ESSAIS DE TENUE

4.1 Objectif

Ces essais ont pour but de déceler à l'avance les risques d'altérations microbiennes.

4.2 Principe

Cette technique est basée sur les modifications organoleptiques et d'aspect (troubles, voiles, dépôts, couleurs inhabituelles) présentées par le vin quand il est soumis à certaines conditions d'aération et de température pouvant induire une activité microbiologique. La nature de l'altération devra être confirmée par examen microscopique.

4.3 Mode opératoire

4.3.1 Essais de tenue à l'air

Un échantillon de 50 ml de vin après filtration sur papier filtre grossier stérile est placé dans un Erlenmeyer stérile de 150 ml bouché avec du coton

et laissé à température ambiante pendant au moins 3 jours. La limpidité, la couleur, la présence éventuelle d'un trouble, d'un dépôt, d'un voile sont examinées au cours de cette période. Un examen microscopique est réalisé en cas de trouble, dépôt, voile ou changement de couleur.

4.3.2 Essais de tenue à l'étuve

Un échantillon de vin de 100 ml après filtration sur papier filtre grossier stérile est placé dans un Erlenmeyer stérile de 300 ml, bouché avec du coton, mis dans une étuve à 30 ° C et examiné après au moins 72 h. Des altérations organoleptiques ou visuelles peuvent être l'indice d'un développement microbien. Un examen microscopique doit alors être effectué.

5. TECHNIQUES MICROSCOPIQUES POUR LA DETECTION, LA DIFFERENCIATION DES MICRO-ORGANISMES ET LE DENOMBREMENT DIRECT DES LEVURES

5.1 Examen microscopique des liquides ou des dépôts

Objectif :
L'examen microscopique à l'état frais a pour but de déceler et de différencier, par leur taille et leur forme, les levures des bactéries éventuellement présentes. L'observation microscopique ne permet pas de distinguer les micro-organismes vivants de ceux qui sont morts.
Remarque :
Une estimation des levures vivantes peut être effectuée à l'aide d'une coloration appropriée (voir plus loin).

Principe :
Cette technique repose sur le grossissement au microscope permettant d'observer des micro-organismes dont la taille est de l'ordre du micron.
Mode opératoire :
L'examen au microscope peut être effectué directement sur le liquide ou sur le dépôt.
L'observation directe sur le liquide n'est intéressante que quand la population est suffisamment élevée (plus de 5 x 10^5 cellules/ml).

Quand le vin présente une population inférieure de micro-organismes, il est nécessaire de concentrer l'échantillon. Environ 10 ml de vin homogénéisé sont donc centrifugés à 3000-5000 tr/mn pendant 5 à 15 minutes. Après décantation du liquide surnageant, le dépôt est remis en suspension dans le liquide restant au fond du tube de centrifugation.

Pour réaliser l'observation au microscope, une goutte de l'échantillon de liquide ou du dépôt homogénéisé est déposée sur une lame de verre propre à l'aide d'une pipette Pasteur ou d'une anse stérilisée. Recouvrir avec une lamelle et placer la lame sur la platine du microscope. L'observation s'effectue en champ clair ou, de préférence à contraste de phase, ce qui permet de mieux observer les détails des micro-organismes. Un grossissement optique de 400 x à 1000 x est généralement utilisé.

5.2. Coloration de Gram pour la différentiation des bactéries isolées à partir de colonies (voir paragraphe 6)

Objectif :

La coloration de Gram a pour but de différencier les bactéries lactiques (Gram positif) des bactéries acétiques (Gram négatif) et d'observer également leur morphologie.

Remarque :

Il convient de garder à l'esprit que la coloration de Gram ne suffit pas à conclure car d'autres bactéries peuvent être présentes en plus des bactéries lactiques et acétiques.

Principe :

Cette coloration est basée sur la différence de structure et de composition chimique des parois cellulaires. des bactéries à Gram positif et à Gram négatif Dans les bactéries à Gram négatif, la paroi riche en lipides a une quantité très réduite de peptidoglycane. Ceci permet la pénétration de l'alcool et l'élimination du complexe violet de gentiane-iode en laissant la cellule incolore, laquelle sera ensuite recolorée en rouge par la safranine. Au contraire, la paroi cellulaire des bactéries à Gram positif contient une grande quantité de peptidoglycane et une faible concentration de lipides. Ainsi, l'épaisse paroi de peptidoglycane et la déshydratation produite par l'alcool ne permettent pas l'élimination de la coloration violette ou bleue foncée du complexe violet de gentiane-iode.

La coloration de Gram perd sa signification si elle est réalisée sur une culture trop âgée. Ainsi, la bactérie doit être dans une phase de croissance exponentielle de 24 à 48 heures. La coloration de Gram est réalisée après isolement de colonies et mise en culture liquide.

Solutions :

L'eau utilisée doit être distillée.

1. Solution de violet de gentiane

Préparation : peser 2 g de violet de gentiane (ou cristal violet), introduire dans un Erlenmeyer de 100 ml et dissoudre dans 20 ml d'alcool à 95 % vol. Dissoudre 0,8 g d'oxalate d'ammonium dans 80 ml d'eau distillée. Mélanger les deux solutions et utiliser seulement après 24 heures. Filtrer sur papier au moment de l'emploi. Maintenir à l'abri de la lumière dans un flacon foncé.

2. Solution de Lugol

Préparation : dissoudre 2 g d'iodure de potassium dans une quantité minimale d'eau (4 à 5 ml) et, dans cette solution saturée, dissoudre 1 g d'iode. Compléter le volume à 300 ml avec de l'eau distillée. Maintenir à l'abri de la lumière dans un flacon foncé.

3. Solution de safranine :

Préparation : peser 0,5 g de safranine dans un Erlenmeyer de 100 ml, dissoudre avec 10 ml d'alcool à 95 % vol. et ajouter 90 ml d'eau. Agiter. Maintenir à l'abri de la lumière dans un flacon foncé.

Mode opératoire :

Préparation du frottis

Faire un repiquage des bactéries en milieu liquide ou solide. Recueillir les bactéries des cultures jeunes dans le dépôt (après centrifugation de la culture liquide) ou directement dans le milieu solide avec une anse ou un fil et mélanger dans une goutte d'eau stérilisée.

Faire un frottis sur une lame en étalant une goutte de la suspension microbienne. Laisser sécher le frottis. Procéder ensuite à la fixation en passant rapidement la lame 3 fois sur la flamme d'un bec Bunsen ou par une technique équivalente.

Après refroidissement, effectuer la coloration.

Coloration

Verser sur le frottis fixé quelques gouttes de solution de violet de gentiane. Laisser agir pendant 2 minutes et laver avec de l'eau.

Verser 1 à 2 gouttes de la solution de lugol. Laisser agir pendant 30 secondes. Laver avec de l'eau et sécher sur papier filtre.

Verser l'alcool à 95 % vol., laisser agir pendant 15 secondes. Rincer avec de l'eau et sécher sur papier filtre.

Verser quelques gouttes de solution de safranine, laisser agir pendant 10 secondes. Laver avec de l'eau et sécher sur papier filtre.

Déposer sur le frottis coloré une goutte d'huile d'immersion.

Observer au microscope avec l'objectif à immersion en champ clair.

Résultats :

Les bactéries lactiques restent colorées en violet ou bleu foncé (Gram-positif). Les bactéries acétiques sont colorées en rouge (Gram-négatif).

5.3 Recherche de la catalase pour la différentiation des bactéries isolées à partir de colonies (voir paragraphe 6)

Objectif :
Cette recherche a pour but de faire la distinction entre les bactéries acétiques et les bactéries lactiques. Les levures et les bactéries acétiques ont une réaction positive. Les bactéries lactiques donnent une réponse négative.
Remarque :
Il convient de garder à l'esprit que la recherche de la catalase ne suffit pas car d'autres bactéries peuvent être présentes en plus des bactéries lactiques et acétiques.
Principe :
La recherche de la catalase est basée sur la propriété qu'ont les micro-organismes aérobies de décomposer le peroxyde d'hydrogène avec libération d'oxygène :

$$2H_2O_2 \xrightarrow{\text{catalase}} 2H_2O + O_2$$

Réactif :
Solution de peroxyde d'hydrogène à 12 volumes (3%)
Préparation : mesurer 10 ml de peroxyde d'hydrogène à 30 volumes dans une fiole jaugée de 100 ml et compléter avec de l'eau distillée récemment bouillie. Agiter et conserver au réfrigérateur dans un flacon foncé. La solution doit être fraîchement préparée.
Mode opératoire :
Déposer une goutte de peroxyde d'hydrogène à 3 volumes sur une lame et ajouter un petit échantillon d'une colonie jeune. S'il y a libération de gaz, on peut en déduire que la culture possède l'activité catalase. Il est parfois

difficile d'observer directement le dégagement gazeux, notamment avec les colonies de bactéries ; il est donc conseillé de faire l'observation au microscope (objectif 10 x).

5.4. Dénombrement des cellules de levure – hémocytométrie

5.4.1 Champ d'application

Détermination de la concentration en cellules de levure dans les moûts ou vins en fermentation, et les LSA (levure sèche active). Une concentration cellulaire élevée est nécessaire : au moins 5×10^6 cellules/ml. Les moûts et vins en fermentation peuvent faire l'objet d'une numération directe, la levure sèche active (LSA) doit être diluée 1000 ou 10000 fois. Les moûts ou vins contenant peu de cellules doivent être centrifugés (3000 g, 5 minutes) et le sédiment remis en suspension dans un volume connu.,

5.4.2 Principe

Une goutte de suspension de cellules de levure est déposée à la surface d'une lame comportant une cellule de comptage. La cellule de comptage a un volume défini et est subdivisée en carrés à la surface de la lame. La numération est réalisée sous microscope en champ clair. Le contraste de phase n'est pas indiqué si des cellules sont colorées.

5.4.3 Réactifs et produits

- Hémocytomètre, double cellule, de préférence à pinces : Bürker, Thoma, Malassez, Neubauer.
- Lamelle couvre-objets pour hémocytomètre : les lamelles couvre-objets ordinaires (largeur 0,17 mm) ne conviennent pas pour cette utilisation, car elles sont souples et ne garantissent pas une largeur de cellule constante.
- Pipettes à bouts fins, d'un volume de 1 et 10 ml.
- Fiole jaugée, 100 ml.
- Bécher, 250 ml.

5.4.4 Installations et équipement

- Microscope avec éclairage à fond clair : grossissement 250-500 x. Contraste de phase contre-indiqué.
- Barre magnétique et agitateur.

Des hémocytomètres sont disponibles avec différentes cellules de comptage : Thoma, Malassez, Bürker, Neubauer. Confirmer le type et le volume de la cellule de comptage à utiliser. Les cellules de Bürker, Thoma et Neubauer ont une profondeur de 0,1 mm , la cellule de Malassez 0,2 mm.

La cellule de Thoma possède un grand carré central (1 mm^2), ce qui fait que son volume est de 0,1 mm^3 (10^{-4} ml). Ce grand carré est subdivisé en 16 carrés, eux mêmes subdivisés en 16 petits carrés. Les petits carrés ont 0,05

mm de côté et une profondeur de 0,1 mm, de sorte que le volume de chaque petit carré est de 0,00025 mm^3 (25 x 10^{-8} ml). Il est également possible de compter dans les carrés moyens. Chaque carré moyen a 16 petits carreaux de 0,2 mm de côté, et d'un volume de 0,004 mm^3 soit 4 x 10^{-6} ml.
La cellule de Bürker contient 9 grands carrés de 1 mm^2 de côté, divisés en 16 carrés moyens de 0,2 mm de côté par des doubles lignes espacées de 0,05mm. La surface de chacun de ces carrés moyens est de 0,04 mm^2 et le volume de 0,004mm^3. Les petits carrés formés par les double lignes ont une surface de 0,025mm^2..
Les grands, moyens et petits carrés des cellules de Neubauer, de Thoma et de Bürker sont de même taille. Les carrés moyens des cellules de Bürker ne contiennent pas d'autres lignes à l'intérieur ; ce sont donc probablement les plus faciles à compter.

5.4.5 Méthodes d'examen
La cellule de comptage et la lamelle couvre-objets doivent être propres et sèches avant utilisation. Il peut être nécessaire de frotter la surface quadrillée, car des cellules sales ont une incidence sur le volume de l'échantillon. Nettoyer à l'eau déminéralisée, ou à l'éthanol, et sécher avec un papier doux.
En cas de numération de levure floculante, le milieu de suspension doit être de l'acide sulfurique à 0,5 %, afin d'éviter la floculation, mais ceci interdit la possibilité de coloration au bleu de méthylène et le comptage des cellules viables et des cellules mortes. La remise en suspension peut être effectuée par sonication.
Déposer l'échantillon sur la lame à l'aide d'une pipette à bout fin, en suivant l'un des deux modes opératoires énoncés ci-dessous.
Mode opératoire 1
Bien mélanger la suspension de levure. Si des dilutions sont nécessaires, procéder par dilutions décimales, comme d'habitude. En cas de coloration au

bleu de méthylène, effectuer la coloration sur l'échantillon le plus dilué en mélangeant 1 ml d'échantillon avec 1 ml de solution de bleu de méthylène.
Agiter en permanence la suspension de levure. Prélever un échantillon avec une pipette à bout fin, évacuer 4-5 gouttes de suspension et déposer une petite goutte de suspension de levure (diluée au besoin) sur chacune des deux zones quadrillées de la lame. Recouvrir avec la lamelle couvre-objets dans les 20 secondes qui suivent et presser fermement avec les pinces. La

zone de numération doit être complètement remplie, mais aucun liquide ne doit s'écouler dans la rigole.
Mode opératoire 2
Disposer la lamelle couvre-objets rigide de sorte que les deux cellules de comptage soient également couvertes. Utiliser les pinces pour presser la lamelle couvre-objets sur le support jusqu'à ce qu'une irisation apparaisse (anneaux de Newton). En l'absence de pinces, ne pas déplacer la lamelle couvre-objets en remplissant la cellule.
Agiter en permanence la suspension de levure. Prélever un échantillon avec une pipette à bout fin, évacuer 4-5 gouttes de suspension et laisser une petite goutte d'échantillon couler entre l'hémocytomètre et la lamelle couvre-objets. Procéder de même dans l'autre partie de la lamelle. La zone de numération doit être complètement remplie, mais aucun liquide ne doit s'écouler dans la rigole.
Laisser la lame préparée reposer pendant trois minutes, de façon à ce que les cellules de levure se déposent, et la placer sous le microscope.

Compter 10 carrés moyens dans chaque zone quadrillée. Des procédures normalisées doivent être définies, afin d'éviter de compter deux fois le même carré. Les cellules en contact avec ou reposant sur les lignes de délimitation supérieure ou droite ne sont pas prises en compte, celles en contact avec ou reposant sur les lignes de délimitation inférieure ou gauche sont comptées. Les cellules de levure en bourgeonnement sont comptées comme une seule cellule si la taille du bourgeon est inférieure à la moitié de celle de la cellule mère, dans le cas contraire les deux cellules sont comptées.

Pour obtenir une numération précise des cellules, il est recommandé de compter en moyenne au minimum un total de 200 à 500 cellules de levure. L'écart de numération entre les deux côtés de la lame doit être inférieur à

10 %. Si une dilution est utilisée, le facteur de dilution doit être intégré dans le calcul.

5.4.6 Expression des résultats
C étant le nombre moyen de cellules comptées dans un carré moyen de 0,2mm de côté, la population T totale dans l'échantillon est :
Exprimée en cellules/ml $T = C \times 0{,}25 \times 10^6 \times$ facteur de dilution

C étant le nombre moyen de cellules comptées dans un petit carré de 0,05mm de côté, la population T totale dans l'échantillon est :
Exprimée en cellules/ml $T = C \times 4 \times 10^6 \times$ facteur de dilution

5.4.7 Références
European Brewery Convention. Analytica Microbiologica – EBC. Fachverlag Hans Carl, 2001

5.5 Dénombrement des cellules de levure – Coloration de cellules de levure au bleu de méthylène

5.5.1 Champ d'application
Cette méthode permet une estimation rapide du pourcentage de cellules viables (non colorées), car les cellules mortes sont colorées en bleu. La méthode est applicable à tous les échantillons contenant des levures, excepté aux moûts contenant plus de 100 g de sucre par litre.
Les bactéries sont trop petites et leur coloration n'est pas visible avec cette méthode.
Remarque : il faut bien focalisé les cellules en differents profodeurs, pour bien visualiser leur coloration avec le bleu de méthylène.

5.5.2 Principe
Le bleu de méthylène est transformé en son dérivé incolore par l'activité réductrice des cellules de levure viables. Les cellules de levure mortes seront colorées en bleu.
La viabilité est calculée à partir du rapport entre le nombre de cellules viables et le nombre de cellules total. La méthode surestime la viabilité "réelle" lorsque les cellules viables représentent moins de 80 % du nombre de cellules total, car elle ne distingue pas les cellules "vivantes" des cellules aptes à se reproduire (Cellules viables mais non cultivables).
Si la concentration en sucre est supérieure à 100 g/l, la plupart des cellules sont bleu clair, cette méthode est donc déconseillée.

Dans le cas d'un vin à faible pH et fortement tamponné, le colorant ne peut pas opérer correctement. Dans ce cas, la numération doit être appliquée au moins à la première dilution décimale.

5.5.3 Réactifs et produits
Solution A : Bleu de méthylène, en solution dans de l'eau distillée, 0,1 g/500 ml.

Solution B : KH_2PO_4, en solution dans de l'eau distillée, 13,6 g/500 ml.
Solution C : Na_2HPO_4 x 12 H_2O, en solution dans de l'eau distillée, 2,4 g/100 ml
Solution D : 498,75 ml de solution B + 1,25 ml de solution C.
Solution E : Mélanger les 500 ml de solution D aux 500 ml de solution A pour obtenir la solution tamponnée finale de bleu de méthylène d'un pH approximatif de 4,6.

5.5.4 Installations et équipement
Microscope, avec grossissements de 250-500 x. Le contraste de phase est contre-indiqué.
Lames de microscope et lamelles couvre-objets, ou hémocytomètre (cellule de Thoma, de Bürker ou de Neubauer).
Tube à essai et agitateur.
Pipettes à bout fin.

5.5.5 Méthodes d'examen
Détermination de la viabilité
Diluer la suspension de levure avec la solution de bleu de méthylène dans un tube à essais jusqu'à ce que la suspension comporte approximativement 100 cellules de levure dans un champ microscopique. Déposer une petite goutte de suspension bien mélangée sur une lame de microscope et la recouvrir d'une lamelle couvre-objets. Examiner au microscope sous un grossissement de 400 x, dans les 10 minutes suivant la mise en contact avec le colorant.
Compter un total de 400 cellules, en notant le nombre de cellules mortes, cassées, ratatinées et plasmolysées. Les cellules de levure en bourgeonnement sont comptées comme une seule cellule si la taille du bourgeon est inférieure à la moitié de celle de la cellule mère. Si la taille du bourgeon est égale ou supérieure à la moitié de celle de la cellule mère, les

deux cellules sont comptées. Les cellules de couleur bleu clair doivent être considérées vivantes.

5.5.6 Expression des résultats

Si T est le nombre total de cellules et C le nombre de cellules colorées en bleu, alors le pourcentage des cellules viables est $\frac{T-C}{T} x100$

5.5.7 Références

European Brewery Convention. Analytica Microbiologica – EBC. Fachverlag Hans Carl, 2001

6. DENOMBREMENT DES MICRO-ORGANISMES PAR CULTURE

Objectif :

Le dénombrement des micro-organismes par culture a pour but d'évaluer le niveau de contamination de l'échantillon, c'est-à-dire d'estimer la quantité de micro-organismes cultivables. Selon les milieux de culture utilisés et les conditions de culture, quatre types de micro-organismes peuvent être dénombrés : levures, bactéries lactiques et bactéries acétiques et moisissures.

Principe :

Le dénombrement par culture est basé sur le fait que les micro-organismes vivants sont capables de se multiplier en milieu nutritif et conditions d'incubation appropriés pour former des colonies sur le milieu solidifié par de la gélose, ou un trouble dans le milieu liquide. Sur milieu gélosé une cellule produit par multiplication un amas de cellules visible à l'œil nu appelé colonie.

6.1 Détection, différenciation et dénombrement des micro-organismes (numération sur plaque).

6.1.1 Champ d'application

Cette norme formule des recommandations générales pour le dénombrement des levures, moisissures et bactéries lactiques et bactéries acétiques viables

dans les moûts, les moûts concentrés, les moûts partiellement fermentés, les vins (vins mousseux y compris) pendant leur élaboration et après la mise en bouteilles, par comptage des colonies cultivées sur un milieu solide après une incubation appropriée. Le but de l'analyse microbiologique est de contrôler le

processus de vinification et d'éviter l'altération microbienne des moûts ou des vins.

6.1. 2 Termes et définitions

Les termes "plaque" et "boîte de Petri" sont employés comme synonymes.
UFC = Unités formant colonies.

6.1. 3 Méthode

Le nombre de micro-organismes viables présents dans des moûts ou des vins est déterminé en étalant un petit volume connu d'échantillon à la surface d'un milieu de culture ou en l'ajoutant selon la méthode de incorporation (voir 6.1.7.4), et en laissant incuber les plaques le temps nécessaire, dans les conditions les plus favorables à la croissance. Chaque cellule, ou groupe de cellules, se divise et se rassemble en un groupe qui devient visible en tant que colonie. Le nombre de colonies présentes à la surface d'une plaque est une indication du nombre de cellules présentes dans l'échantillon original. Les résultats sont par conséquent exprimés en UFC. Si le nombre de cellules dans un échantillon est censé être élevé, des dilutions décimales en série sont réalisées afin d'obtenir un nombre de colonie compris entre 10 et 300 par plaque. Si le nombre d'UFC dans un échantillon est censé être bas, elles sont collectées sur un filtre stérile de 0,45 à 0,88 µm pour les levures et 0, 22 à 0,45 µm pour les bactéries, qui est ensuite placé dans la boîte de Petri sur la surface du milieu de culture.
La plage de mesure de cette méthode va de < 1 UFC/ (volume analysé) à 10^9 UFC/ml ou 10^{10} UFC/g dans l'échantillon original.

6.1.4 Réactifs et produits

Ceux indiqués au paragraphe 1 de la résolution, plus :

- Tubes (16x160 mm ou équivalents), contenant 9 ml d'eau peptonée stérile (Tryptone : 1 g/l) ou d'autres diluants à utiliser pour la dilution des échantillons (Annexe 4). Le nombre indicatif de tubes nécessaires pour les échantillons suivants est précisé ci-dessous :

Moûts non fermentés : 4 / échantillon.
Moûts de fermentation : 7 / échantillon.
Vins stockés : 2 / échantillon.

- Micropipette à bouts stériles : 1 ml et 0,2 ml.

- Tiges de verre coudées en L ou de forme triangulaire (tiges de Digralsky)) ou étaleurs en plastique.

Boîtes de Petri de 90 mm de diamètre (avec 15-20 ml de milieu de culture) (56 cm^2) pour la technique sur plaques, et de 90 mm ou 60 mm (avec 6-8 ml de milieu de culture) pour la technique de filtration sur membrane, remplies 18-24 h à l'avance avec 15-20 ml de milieu de culture (simple ou en dupliqué boîtes sont nécessaires pour chaque échantillon testé) :

Pour le comptage des levures et moisissures, utiliser : YM, YEPD, gélose nutritive WL, gélose à levure ou gélose TGY (trypticase-glucose-extrait de levure) ou équivalant si validé. Plaques de gélose de lysine et de gélose différentielle WL (annexe 1) ou équivalant si validé en cas de recherche de levures non *Saccharomyces*. (Annexe 5 milieux de culture)

- Pour le comptage des bactéries acétiques, utiliser : Gélose GYC, milieu G2 ou Kneifel (Annexe 5 milieux de culture) ou équivalant si validé
- Pour le comptage des bactéries lactiques, utiliser : MRS additionné de 20 % de jus de tomate (ou de pomme ou de raisin), ou gélose ATB (bouillon de tomate acide) modifiée (milieu pour *Oenococcus oeni*), ou bouillon de jus de tomate (TJB) plus gélose, ou milieu Lafon-Lafo*urcade, milieu* 104 ou gélose MTB (Annexe 5 milieux de culture) ou équivalant si validé
- Pour le comptage des champignons filamenteux, utiliser de la gélose Czapek-Dox modifiée, de la gélose DRBC (dichloran-rose Bengale-chloramphénicol) ou de la MEA additionnée de tétracycline (100 mg/l) et de streptomycine (100 mg/ l) (Annexe 5 milieux de culture) ou équivalant si validé
- Il convient d'ajouter des antibiotiques pour effectuer un comptage sélectif, étant donné que tous les micro-organismes sont présents ensemble dans le vin. (Voir Annexe I milieux de culture)

6.1.5 Installations et équipement

Comme indiqué au paragraphe 2 de la résolution.

6.1. 6 Échantillonnage

Comme indiqué au paragraphe 3 de la résolution

Les quantités suivantes d'échantillons sont exigées pour la numération sur plaques :

Moût ou moût en fermentation ou vin stocké : pas moins de 250 ml ;

Vin en bouteille ou conditionné : pas moins d'une unité, quelle que soit la capacité ;

6.1. 7 Méthodes d'examen

6.1.7.1 Conditions préalables requises

Tous les produits et équipements utilisés au cours des essais doivent être stériles, et des conditions aseptiques doivent être maintenues tout au long des opérations.

La hotte à flux laminaire doit être mise en marche 5 minutes avant de commencer le travail, afin d'avoir un flux d'air stérile et stable.

6.1.7.2 Stérilisation

Les milieux de culture doivent être stérilisés en autoclave à 121°C pendant au moins 15 minutes (20 minutes pour de grands volumes). Le matériel et la verrerie stériles à usage unique doivent être ouverts et utilisés sous la hotte à flux laminaire. Les brucelles et les étaleurs doivent être plongés dans l'éthanol et flambés avant utilisation. Les entonnoirs en acier inoxydable doivent être flambés avec de l'éthanol après chaque utilisation. Les entonnoirs en verre et en polycarbonate doivent en revanche être passés à l'autoclave avant utilisation, leur nombre doit par conséquent être égal à celui des échantillons à tester.

6.1.7.3 Dilution des échantillons (Annexe 1)

Un ml d'échantillon est introduit à la pipette dans un tube contenant 9 ml d'eau peptonée stérile. Le tube est mis en agitation pendant 20 secondes au moyen d'un agitateur vortex. C'est la première dilution (décimale), dont 1 ml est transféré dans le tube suivant de 9 ml d'eau peptonée stérile, ce qui constitue la deuxième dilution. Après 20 secondes d'agitation, l'opération est répétée autant de fois que nécessaire.

Le nombre indicatif de dilutions en série nécessaires pour les échantillons suivants est indiqué ci-dessous :

Moûts non fermentés : 4 dilutions décimales.

Moûts de fermentation : 7 dilutions décimales.

Vins non-filtrés pendant le vieillissement (comptage des levures) 2 dilutions décimales.

Vins non filtrés pendant le vieillissement (comptage des bactéries lactiques) 6 dilutions décimales.

Vins filtrés ou vins conditionnés (mis en bouteille) Aucune dilution.

Moûts concentrés Diluer 10 ml dans 100 ml d'eau peptonée (ou 100 ml dans 1000 ml).

Les vins en bouteille ou filtrés, et les moûts concentrés après dilution dans de l'eau peptonée stérile, sont analysés selon la technique de filtration sur membrane.

6.1.7.4 Préparation des plaques
Les dilutions en série nécessaires sont préparées en fonction du nombre d'échantillons à étaler sur des plaques. De multiples dilutions en série peuvent être préparées, si un grand nombre d'échantillons doivent être étalés sur des plaques, mais toute dilution devra être utilisée dans un délai de 20 minutes.
Inoculer chaque plaque avec 0,1 ou 0,2 ml des trois dilutions les plus faibles ayant été préparées, en procédant comme indiqué ci-dessous :
Moûts non fermentés dilutions -2 ; -3 ; -4.
Moûts de fermentation dilutions -5 ; -6 ; -7.
Vins non filtrés pendant le vieillissement dilutions 0 ; -1 ; -2.
Dans le doute, inoculer un nombre plus élevé de dilutions, jamais un nombre inférieur.

Dans des conditions aseptiques (de préférence sous une hotte à flux laminaire), avec une tige de verre coudée stérile (tige de Digralsky) ou à usage unique, étaler l'échantillon à la surface des milieux de culture avant absorption du liquide (généralement en 1-2 minutes). Utiliser une nouvelle " tige de Digralsky " pour chaque plaque ou procéder en allant de l'échantillon le plus dilué jusqu'au moins dilué. Laisser les plaques quelques minutes sous le flux d'air stérile, jusqu'à ce que le liquide soit absorbé.

Note 1 : Le fait d'utiliser 0,2 ml au lieu de 0,1 ml, comme fréquemment indiqué, facilite l'étalement et prolonge le délai d'utilisation. Ces éléments doivent être pris en compte dans les calculs.

Note 2 : Pour le dénombrement des levures, le développement bactérien est inhibé en ajoutant 50 mg/l de chloramphénicol (ou équivalant si validé) au

milieu de croissance, après passage dans l'autoclave, et le développement des moisissures en ajoutant 150mg/l de diphényle (ou équivalant si validé).

Note 3 : Pour le dénombrement des bactéries lactiques, le développement des levures est inhibé en ajoutant de la natamycine (pimaricine) (0,1 g/l) (ou équivalant si validé) et le développement des bactéries acétiques par incubation anaérobie.

Note 4 : Pour le dénombrement des bactéries acétiques, le développement des levures est inhibé en ajoutant de la natamycine (pimaricine) (0,1 g/l) (ou équivalant si validé) et celui des bactéries lactiques par ajout de pénicilline (12,5 mg/l) (ou équivalant si validé). L'ajout d'antibiotiques est effectué après la stérilisation en autoclave.

Pour une recherche spécifique de levures non *Saccharomyces*, inoculer, comme indiqué précédemment, trois plaques de gélose de lysine et trois plaques de gélose différentielle WL avec les dilutions appropriées

- Méthode de incorporation (méthode alternative).
Préparer et stériliser 15 ml de milieu dans des tubes, et maintenir les tubes dans un bain d'eau (ou équivalant si validé) à 47±1 °C.
Verser 1 ml d'échantillon ou de dilution dans une boîte de Petri vide.
Ajouter 15 ml de milieu de culture et remuer doucement la boîte de Petri, afin d'obtenir une répartition homogène des micro-organismes dans la masse du milieu.
Laisser refroidir et se solidifier en plaçant les boîtes de Petri sur une surface horizontale fraîche (le temps de solidification de la gélose ne devra pas excéder 10 minutes).

6.1.7.5 Dénombrement avec concentration par filtration sur membrane
La porosité de la membrane doit être de 0,45 ou 0,8 µm pour le dénombrement des levures ; 0,2 ou 0,45 µm pour celui des bactéries. La surface de la membrane doit de préférence être quadrillée, afin de faciliter le dénombrement des colonies.

Les plaques, sur lesquelles sont placées les membranes, peuvent contenir un milieu nutritif gélosé ou un tampon, dans lequel le milieu sec est dispersé et qui doit être imbibé d'eau stérile juste avant utilisation. Certains fournisseurs proposent des plaques stériles contenant un tampon stérile, sur lequel sont versés juste avant utilisation 2 ml de milieu liquide stérile à usage unique.
Assembler le matériel de filtration de manière aseptique, et relier au système qui permettra de faire le vide.
Plonger les brucelles dans l'éthanol et les flamber : une fois la flamme éteinte, attendre quelques secondes et mettre la membrane, avec les brucelles, sur son support dans l'unité de filtration.
Avant d'ouvrir la bouteille, bien l'agiter, renverser le goulot et le plonger dans l'éthanol (1-2 cm), puis flamber pour le stériliser.
Prélever trois volumes de chaque échantillon : 10 ml avec une pipette stérile de 10 ml, 100 ml avec une éprouvette cylindrique stérile de 100 ml, et le reste directement de la bouteille si applicable. Pour filtrer, verser le vin dans l'entonnoir, puis activer le vide.
Lorsque la quantité de vin désirée a été filtrée, casser le vide, flamber les brucelles, ouvrir l'entonnoir, maintenir la membrane avec les brucelles, placer sa face opposée sur le milieu solide d'une plaque et la faire adhérer à la surface du milieu en évitant que des bulles ne se forment en-dessous.

6.1.7.6 Incubation des échantillons
Incuber les plaques à l'envers, en conditions aérobies, pour les levures ou pour les bactéries acétiques, pendant 4 jours à 25 ± 2°C. Si la température est inférieure à 23°C, prolonger l'incubation d'un jour, si elle est inférieure à 20°C prolonger de trois jours supplémentaires. La température maximale ne doit pas excéder 28°C.
En cas de comptage portant sur des levures *Brettanomyces* (ou *Dekkera)*, doubler le temps d'incubation.
En cas de comptage de BL (bactéries lactiques), mettre les plaques dans une fiole ou un sac anaérobies, et incuber les plaques à l'envers pendant 10 jours à 30 ± 2°C. Si la température est inférieure à 28°C prolonger l'incubation

d'un jour ; si elle est inférieure à 25°C, prolonger de trois jours supplémentaires. La température maximale ne doit pas excéder 33°C.

6.1. 8 Expression des résultats
6.1.8.1 Dénombrement des colonies de levure et bactéries :

Compter les colonies développées en 4 jours pour les levures et les bactéries acétiques (8 jours pour les levures *Brettanomyces/Dekkera*), et 10 jours pour les bactéries lactiques au besoin à l'aide d'un compteur de colonies, en ignorant la morphologie différente des colonies en cas de comptage total des levures, ou en la prenant en compte s'il y a lieu.
Les milieux et les conditions d'incubation sont suffisamment spécifiques pour que les colonies visibles à l'œil nu permettent le comptage des différents types de micro-organismes.
6.1.8.2 Calcul des résultats.
Les résultats les plus fiables proviennent du comptage de plaques contenant de 10 à 300 colonies (ISO 7218:2007 - Microbiologie des denrées alimentaires et aliments pour animaux - Règles générales relatives aux analyses microbiologiques).
Calculer le nombre N de micro-organismes présents dans l'échantillon d'essai sous forme de moyenne pondérée de deux dilutions décimales successives, en utilisant l'équation suivante :

$$N = \frac{\sum C}{V \times 1{,}1 \times d}$$

où :

$\sum C$ est la somme des colonies comptées sur les deux boîtes conservées après deux dilutions décimales successives, dont une au moins contient au minimum 10 colonies.

V est le volume d'inoculum placé dans chaque boîte, en millilitres.
d est la dilution correspondant à la première dilution retenue [d = 1 quand le produit liquide non dilué (échantillon d'essai) est retenu].

En d'autres termes, si les plaques de deux dilutions décimales consécutives contiennent 10-300 colonies, calculer le nombre d'UFC/ml pour chaque

dilution, et ensuite la moyenne des deux valeurs : c'est la valeur d'UFC/ml de l'échantillon. Si une valeur est supérieure au double de l'autre, garder la valeur inférieure comme UFC/ml.
Arrondir les résultats au deuxième chiffre significatif seulement au moment de la conversion en UFC/ml, et rapporter les résultats sous la forme d'un nombre

compris entre 1,0 et 9,9 multipliés par la puissance 10 appropriée (ISO 7218:2007 - Microbiologie des denrées alimentaires et aliments pour animaux - Règles générales relatives aux analyses microbiologiques).

Si les échantillons ont été inoculés en double, et si une ou deux plaques inoculées avec la même dilution contiennent des colonies, calculer le nombre moyen de colonies et multiplier par l'inverse du facteur de dilution, pour obtenir le nombre d'UFC/ml.
Si aucune plaque ne contient 10-300 colonies, et que toutes les plaques contiennent plus de 300 colonies, compter celles comportant le moins de colonies. Si elles contiennent moins de 10 colonies/cm², compter 12 carrés de 1 cm^2 et multiplier la moyenne par 56 (la surface d'une plaque de 90 mm de diamètre) ; si les colonies sont plus denses, compter 4 carrés de 1 cm^2 et multiplier la moyenne par 56. Exprimer les résultats en tant que "Valeur UFC/ml estimée". Dans la mesure du possible, ne pas rapporter les résultats sous la forme TNTC [too numerous to count (trop nombreux pour être comptés)].
Si les seules plaques présentant des colonies contiennent moins de 10 colonies, mais au moins 4, calculer le résultat comme indiqué dans le cas général, et le rapporter en tant que "Valeur UFC/ml estimée".
Si le total est compris entre 3 et 1, la précision du résultat est trop faible, et le résultat sera rapporté sous la forme "(les micro-organismes recherchés) sont présents mais en quantité inférieure à $4 \times d$ UFC/ml".
Si les plaques de toutes les dilutions d'un échantillon ne présentent aucune colonie, rapporter le résultat sous la forme "moins de $1/d$ UFC/ml", mais tenir compte de la présence éventuelle d'inhibiteurs dans l'échantillon.

En cas d'application de la technique de filtration sur membrane, exprimer les résultats par rapport à la quantité de liquide filtrée, par exemple UFC/bouteille, UFC/100 ml ou UFC/10 ml.

6.1.9 Incertitude de la mesure
6.1.9.1 Critères de contrôle des résultats.
Pour chaque lot de milieu, une plaque est utilisée comme témoin de stérilité après stérilisation. Une plaque, par milieu de culture utilisé lors des tests, est laissée ouverte sous la hotte à flux laminaire tout au long des opérations afin

de contrôler la stérilité de l'environnement de travail. Cette plaque sera incubée comme les plaques inoculées.

Périodiquement, un échantillon est inoculé en double, et le K_p expérimental est calculé au moyen de l'équation suivante :

$$Kp = \frac{|C_1 - C_2|}{\sqrt{C_1 + C_2}}$$

dans laquelle C_1 et C_2 sont les résultats des deux comptages.

Si Kp < 1,96 ≈ 2,0 les résultats sont acceptables : la moyenne des deux comptages peut être utilisée comme résultat.
Si 2,0<Kp ≤ 2,576 ≈ 2,6 la différence des deux comptages est critique et doit être soigneusement évaluée avant d'accepter les résultats comme moyenne des deux comptages.
Si Kp > 2,6 la différence des deux comptages est anormale. Le résultat est rejeté et le test doit être répété. Dans ces circonstances, le responsable du laboratoire doit examiner tous les résultats obtenus après les derniers résultats acceptables.

6.1.9.2 Incertitude de la mesure
Si le nombre de colonies comptées sur la plaque pouvant l'être est inférieur à 10, le résultat est acceptable, mais la population des colonies est considérée conforme à la loi de Poisson. Le niveau de confiance de 95 %, et par conséquent l'incertitude de la mesure du comptage estimatif réalisé sur une seule boîte de Petri, est rapporté dans le tableau suivant.

Nombre de colonies	Limite de confiance au niveau 95 %		Pourcentage d'erreur de la limite *	
	Inférieure	Supérieure	Inférieure	Supérieure
1	<1	6	-97	457
2	<1	7	-88	261

3	<1	9	-79	192
4	1	10	-73	156
5	2	12	-68	133
6	2	13	-63	118
7	3	14	-60	106
8	3	16	-57	97
9	4	17	-54	90
10	5	18	-52	84
11	6	20	-50	79
12	6	21	-48	75
13	7	22	-47	71
14	8	24	-45	68
15	8	25	-44	65
* Par rapport au dénombrement des micro-organismes (1ère colonne)				

Si le nombre de colonies est > 10, la limite de confiance à un seuil de probabilité *p* est calculée au moyen de l'équation suivante :
$C = C_i \pm K_p \sqrt{C_i}$,
dans laquelle C_i est le nombre de colonies de la plaque, et K_p est le facteur de couverture. Généralement, le facteur de couverture est 2 ou 1,96. La valeur de C est calculée à partir de chaque plaque et multipliée par le nombre de dilutions ainsi que par le résultat du comptage.

6.2. Culture en milieu liquide - "nombre le plus probable" (NPP)

6.2.1 Objectif

Cette technique a pour but d'évaluer le nombre de micro-organismes viables dans les vins ayant des teneurs élevées en particules solides en suspension et/ou des indices élevés de colmatage.

6.2.2 Principe

Cette technique est basée sur l'estimation du nombre de micro-organismes viables en milieu liquide, en partant du principe d'une répartition normale dans l'échantillon.

6.2.3 Diluants et milieux de culture liquides (Annexes 4 et 5)

6.2.4 Mode opératoire
Plusieurs solutions quantitatives et successives sont préparées et, après incubation, une certaine proportion d'essais ne donneront lieu à aucun développement (essais négatifs), tandis que d'autres commenceront à se développer (essais positifs). Si l'échantillon et les dilutions sont homogènes et si le nombre de dilutions est suffisamment élevé, il est possible de faire un traitement statistique des résultats en utilisant des tables appropriées (tables reposant sur les calculs de probabilité de
McCrady) et d'extrapoler ce résultat à l'échantillon initial.
6.2.5 Préparation des dilutions
En partant d'un échantillon de vin homogénéisé, préparer une série de dilutions décimales ($^{1}/_{10}$) dans le diluant.
Prélever 1 ml de vin et ajouter à 9 ml de diluant dans le premier tube. Homogénéiser. Prélever 1 ml de cette dilution pour l'ajouter à 9 ml de diluant dans le deuxième tube. Continuer ce protocole de dilution jusqu'à la dernière dilution requise, selon la population microbienne présumée, en utilisant des pipettes
stériles pour chaque dilution. Les dilutions doivent être réalisées jusqu'à extinction, c'est-à-dire l'absence de développement dans les dilutions les plus faibles (*annexe* 2).

6.2.6 Préparation des inoculations
Inoculer 1 ml de vin et 1 ml de chacune des dilutions homogénéisées lors de leur préparation, dans trois tubes avec le milieu de culture approprié (*annexe 5*). Bien mélanger.
Incuber les tubes inoculés dans l'étuve à 25 °C, pour les levures (pendant 3 à 10 jours), en aérobiose et, pour les bactéries lactiques, en anaérobiose ou microaérophilie (pendant 8 à 10 jours), en faisant des observations périodiques jusqu'au dernier jour d'incubation.

6.2.7 Résultats
Sont considérés positifs tous les tubes qui présentent un développement microbien se traduisant par la formation d'un sédiment blanchâtre, plus ou moins évident et/ou par un trouble plus ou moins accentué. Les résultats

doivent être confirmés par observation au microscope. Préciser la durée d'incubation.
La lecture des tubes se fait en notant le nombre de tubes positifs ou négatifs de chaque combinaison de trois tubes (de chaque dilution). Par exemple, "3-1-0" signifie : trois tubes positifs dans la dilution 10^0 (vin), un dans la dilution 10^{-1} et zéro dans la dilution 10^{-2}.
Pour un nombre de dilutions supérieur à trois, seuls trois de ces résultats sont significatifs. Pour sélectionner les résultats à adopter dans la détermination du "NPP", il est nécessaire de déterminer le "nombre caractéristique" conformément aux exemples figurant dans le tableau suivant :

Tableau

Nombre de tubes positifs pour chaque dilution						Nombre caractéristique
Exemple	10	10	10	10	10	3-1-0
a	3	3	3	1	0	3-2-0
a	3	3	2	0	0	3-2-1
a	3	2	1	0	0	3-0-1
a	3	0	1	0	0	3-2-3
b	3	2	2	1	0	3-2-3
b	3	2	1	1	0	3-2-2
c	2	2	2	2	0	2-2-2
d	0	1	0	0	0	0-1-0
Exemple a : prendre la plus grande dilution pour laquelle tous les tubes sont positifs et les deux suivantes.						
Exemple b : si un résultat positif est noté pour une dilution plus grande que la dernière ainsi choisie, il faut l'ajouter à celle-ci.						
Exemple c : si aucune dilution ne fournit trois tubes positifs, prendre les dilutions correspondantes aux trois derniers tubes positifs.						
Exemple d : cas ou le nombre de tubes positifs est très réduit, choisir le nombre caractéristique de façon à ce que la dilution positive occupe le rang des dizaines						

Adapté de Bourgeois, C.M. et Malcoste, R. *in* : Bourgeois, C.M. et Leveau, J.Y. (1991).

Calcul du nombre le plus probable (NPP)
Le NPP est déterminé à l'aide du Tableau A (Annexe 3) reposant sur les calculs de probabilités de McCrady, en tenant compte du nombre caractéristique obtenu et de la dilution effectuée. Si la série de dilutions est

10^0, 10^{-1}, 10^{-2}, la lecture est directe. Si la série de dilutions est 10^1, 10^0, 10^{-1}, la lecture correspond à 0,1 fois cette valeur. Si la série de dilutions est 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, la lecture correspond à dix fois cette valeur.
Remarque :
S'il est nécessaire d'augmenter le niveau de détection, une concentration de vin de 10^1 peut être utilisée. Pour obtenir cette concentration de micro-organismes dans 1 ml, centrifuger 10 ml de vin et prélever 1 ml de dépôt (après avoir enlevé 9 ml du liquide surnageant) à inoculer selon la procédure décrite précédemment.

6.2.8 Expression des résultats
La teneur en micro-organismes du vin doit être présentée en germes par millilitre, en notation scientifique à une décimale. Si la teneur est inférieure à 1,0 cellule par millilitre, le résultat doit être présenté sous la forme "< 1,0 cellule par ml".
(voir les annexes en pages suivantes)

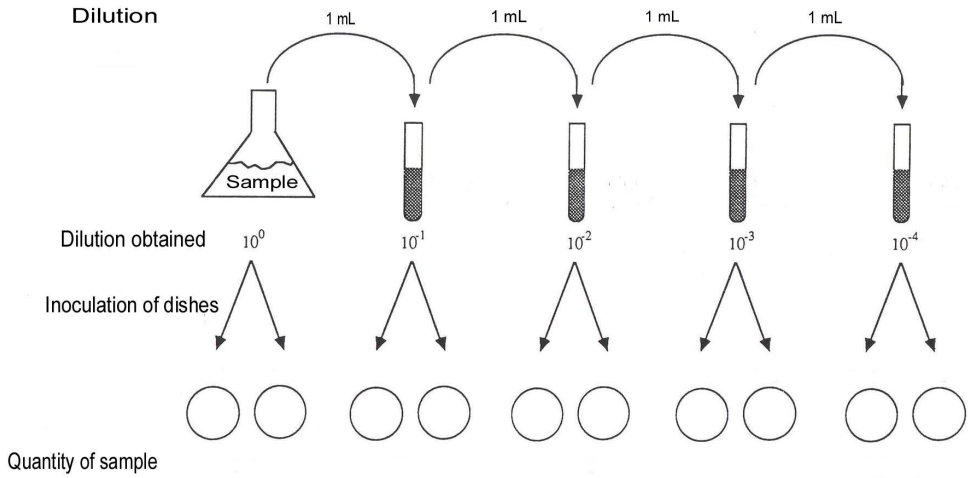
7. Bibliographie

- ISO 4833:2003. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal medium for the enumeration of microorganisms – Colony count technique at 30°C.
- ISO 7218:2007 - Microbiology of food and animal feeding stuff - General rules for microbiological examinations.
- ISO 7667:1983. Microbiology - Standard layout for methods of microbiological examination.
- Pallman, C., J. B. Brown, T. L. Olineka, L. Cocolin, D. A. Mills and L. F. Bisson. 2001. Use of WL medium to profile native flora fermentations. American Journal of Enology and Viticulture 52:198-203 ;
- A. Cavazza, M. S. Grando, C. Zini, 1992. Rilevazione della flora microbica di mosti e vini. Vignevini, 9-1992 17-20.- ANDREWS, W. et MESSER, J. (1990). Microbiological Methods. in : AOAC Official Methods of Analysis, 15th edition, 1, 425-497, Association of Analytical Chemist, Washington.
- BIDAN, P. (1992). Analyses Microbiologiques du Vin. F.V. O.I.V. nº 910, Paris.

- BOURGEOIS, C.M. et LEVEAU, J.Y. (1991). Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro alimentaires, 2ème édition, 3. Le Contrôle Microbiologique Lavoisier, Tec. & Doc., APRIA Ed. Paris.
- CARR, J. G. (1959). Acetic acid bacteria in ciders. Ann. Rep. Long Ashton Res. Sta., 160.
- DE MAN, J. C. (1975). The probability of most probable number. European Journal of Applied Microbiology, 1, 67-78.
- LAFON-LAFOURCADE, S. et al. (1980). Quelques observations sur la formation d'acide acétique par les bactéries lactiques. Conn. Vigne Vin, 14, 3, 183-194.
- MAUGENET, J. (1962). Les Acétobacter du cidre. Identification de quelques souches. An. Technol. Agric., 11, 1, 45-53.
- PLARIDIS et LAFON-LAFOURCADE, S. (1983). Contrôle microbiologique des vins. Bull. O.I.V., 618, 433-437, Paris.
- RIBÉREAU-GAYON, J. et PEYNAUD, E. (2004). Traité d'Œnologie, Tome 2, Librairie Polytechnique CH. Béranger, Paris et Liège.
- Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water (1976). 14th edition, American Public Health Association, Incorporated, New York.
- Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water (1985). 16th edition, American Public Health Association, DC 20005, Washington.
- VAZ OLIVEIRA, M., BARROS, P. et LOUREIRO, V. (1995). Analyse microbiologique du vin. Technique des tubes multiples pour l'énumération de micro-organismes dans les vins - "Nombre le plus probable" (NPP), F.V. O.I.V. nº 987, Paris.
- VAZ OLIVEIRA, M. et LOUREIRO, V. (1993). L'énumération de micro-organismes dans les vins ayant un indice de colmatage élevé, Compte rendu des travaux du groupe d'experts "Microbiologie du Vin" de l'O.I.V., 12ème session, annexe 2, Paris.
- VAZ OLIVEIRA, M. et LOUREIRO, V. (1993). L'énumération de micro-organismes dans les vins ayant un indice de colmatage élevé, 2ème partie, Doc. Travail du groupe d'experts "Microbiologie du Vin" de l'O.I.V., 13ème session, Paris.

Annexe 1
Annex 1

Preparation of dilutions and inoculations



Annexe 3

TABLEAU A

"Nombre le plus probable" (NPP) pour 1 ml d'échantillon en utilisant 3 tubes
contenant 1 ml, 0,1 ml et 0,01 ml

Tubes positifs				Tubes positifs				Tubes positifs			
1 ml	0,1 ml	0,01 ml	NPP 1 ml	1 ml	0,1 ml	0,01 ml	NPP 1 ml	1 ml	0.1 ml	0,01 ml	NPP 1 ml
0	0	0	0,0	2	0	2	2,0	1	1	1	7,5
0	0	1	0,3	2	1	0	1,5	3	1	2	11,5
0	1	0	0,3	2	1	1	2,0	3	1	3	16,0
0	1	1	0,6	2	1	2	3,0	3	2	0	9,5
0	2	0	0,6	2	2	0	2,0	3	2	1	15,0
1	0	0	0,4	2	2	1	3,0	3	2	2	20,0
1	0	1	0,7	2	2	2	3,5	3	2	3	30,0
1	0	2	1,1	2	2	3	4,0	3	3	0	25,0
1	1	0	0,7	2	3	0	3,0	3	3	1	45,0
1	1	1	1,1	2	3	1	3,5	3	3	2	110,0
1	2	0	1,1	2	3	2	4,0	3	3	3	>140,0
1	2	1	1,5	3	0	0	2,5				
1	3	0	1,6	3	0	1	4,0				
2	0	0	0,9	3	0	2	6,5				
2	0	1	1,4	3	1	0	4,5				

Échantillon

Quantité d'échantillon

Adapté de " Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water " (1976)

Annexe 4

Diluants :
Les diluants sont indiqués à titre d'exemple. L'eau à utiliser doit être distillée, bidistillée ou désionisée, sans traces de métaux, d'inhibiteurs ou d'autres substances antimicrobiennes.

1. Eau physiologique
Préparation : peser 8,5 g de chlorure de sodium dans une fiole jaugée de 1000 ml. Après dissolution dans l'eau, ajuster au volume de référence. Bien mélanger. Filtrer. Répartir 9 ml dans les tubes à essais. Boucher avec du coton cardé et placer en autoclave pendant 20 mn à 121 °C.

2. Solution de Ringer à 1/4

Préparation : dans une fiole jaugée de 1000 ml, peser 2,250 g de chlorure de sodium, 0,105 g de chlorure de potassium, 0,120 g de chlorure de calcium (CaCl2.6H2O), 0,050 g d'hydrogénocarbonate de sodium. Après dissolution dans de l'eau, ajuster au volume de référence. Bien mélanger. Répartir 9 ml dans les tubes à essais. Boucher avec du coton cardé et placer en autoclave pendant 15 mn à 121 °C. (cette solution est disponible dans le commerce)

3. Eau peptonée
Préparation : dans une fiole jaugée de 1000 ml, peser 1g de peptone. Après dissolution dans l'eau, ajuster au volume de référence. Bien mélanger. Répartir 9 ml dans les tubes d'essai. Boucher avec du coton cardé et placer en autoclave pendant 20 mn à 121 °C.

Annexe 5

Milieux de culture
Les milieux de culture et les antimicrobiens sont indiqués à titre d'exemple. L'eau à utiliser doit être distillée, bidistillée ou désionisée, sans traces de métaux, d'inhibiteurs ou d'autres substances antimicrobiennes.

1. Milieux de culture solides

En l'absence d'indication contraire, le pH de tous les milieux doit être ajusté entre pH 5,5 et pH 6,0

1 MILIEUX POUR LE DÉNOMBREMENT DES LEVURES

1.1 YM

Glucose	50 g
Peptone	5 g
Extrait de levure	3 g
Extrait de malt	3 g
Agar-agar	20 g
Eau : jusqu'à	1000 ml

Ajouter au besoin 100 mg de chloramphénicol pour inhiber le développement bactérien et 150 mg de diphényle pour inhiber le développement des moisissures.

1.2 YEPD

Glucose	20 g
Peptone	20 g
Extrait de levure	10 g
Agar-agar	20 g
Eau : jusqu'à	1000 ml

Ajouter au besoin 100 mg de chloramphénicol pour inhiber le développement bactérien et 150 mg de diphényle pour inhiber le développement des moisissures.

1.3 Gélose nutritive WL

Glucose	50 g
Peptone	5 g
Extrait de levure	4 g
Phosphate de potassium monobasique (KH_2PO_4)	0,55 g
Chlorure de potassium (KCl)	0,425 g
Chlorure de calcium ($CACL_2$)	0,125 g
Sulfate de magnésium ($MgSO_4$)	0,125 g
Chlorure ferrique ($FeCl_3$)	0,0025 g
Sulfite de manganèse (MnSO4)	0,0025 g
Vert de bromocrésol	0,022 g
Gélose bactériologique	12 g
Eau : jusqu'à	1000 ml
pH	5,5

La gélose différentielle est produite en ajoutant 4 mg/l de cycloheximide à la gélose nutritive WL.
Ajouter au besoin 100 mg de chloramphénicol pour inhiber le développement bactérien.

1.4 Gélose de lysine ASBC
Solution A :

Base carbonée de levure	2,35 g
Eau : jusqu'à	100 ml

Stériliser par filtration sur membrane.
Solution B :

Lysine-HCl	0,5 g
Agar-agar	4 g
Eau : jusqu'à	100 ml

Stériliser pendant 20 mn à 121 °C.
Ajouter au besoin 100 mg de chloramphénicol pour inhiber le développement bactérien.

2 MILIEUX POUR LE DÉNOMBREMENT DES BACTÉRIES LACTIQUES

2.1 M.R.S. + jus de tomate (ou pomme).

Glucose	20 g
Peptone	10 g
Extrait de bœuf	8 g
Extrait de levure	4 g
Phosphate de potassium, dibasique (KH_2PO_4)	2 g
Acétate de sodium · $3H_2O$	5 g
Citrate d'ammonium	2 g
Sulfate de magnésium · $6H_2O$	0,2 g
Sulfate de manganèse · $4H_2O$	0,05 g
"Tween 80"	1 ml
Agar-agar	12 g
Jus de tomate (ou jus de pomme ou de raisin)	200 ml
Eau jusqu'à	1000 ml

Ajouter 100 mg/L de natamycine (pimaricine) pour inhiber le développement des levures, après passage à l'autoclave, juste avant utilisation.

2.2 Gélose au jus de tomate

Jus de tomate (extrait sec de 400 ml)	20 g
Peptone	10 g
Lait peptonisé	10 g
Agar-agar	14 g
Eau : jusqu'à	1000 ml
pH	6,1

Ajouter 100 mg/L de natamycine (pimaricine) pour inhiber le développement des levures, après passage à l'autoclave, juste avant utilisation.

2.3 Milieu ATB modifié, ou milieu *Oenococcus oeni* (anciennement milieu *Leuconostoc oenos*).

Solution A :

Glucose	10 g
Extrait de levure	5 g
Peptone	10 g
Sulfate de magnésium	0,2 g
Sulfate de manganèse	0,050 g
Jus de tomate (ou jus de pomme ou de raisin)	250 ml
Agar-agar	12 g
Eau	750 ml

Stériliser à l'autoclave pendant 20 mn à 121 °C.

Solution B :

Cystéine HCl	1 g
Eau : jusqu'à	100 ml
pH	4,8

Stériliser par filtration sur membrane.
Ajouter 100 mg/L de natamycine (pimaricine) pour inhiber le développement des levures, juste avant utilisation.

Ajouter 1 ml de la solution B dans 20 ml de solution A au moment de l'utilisation

2.4 Milieu Lafon-Lafourcade

Glucose	20 g
Extrait de levure	5 g
Extrait de bœuf	10 g
Peptone	10 g
Acétate de sodium	5 g
Citrate de tri-ammonium	2 g
Sulfate de magnésium · $6H_2O$	0,2 g
Sulfate de manganèse · $4H_2O$	0,05 g
"Tween 80"	1 ml
Agar-agar	20 g
Eau : jusqu'à	1000 ml

pH	5,4

Ajouter 100 mg/L de natamycine (pimaricine) pour inhiber le développement des levures, après passage à l'autoclave, juste avant utilisation.

2.5 Milieu Dubois (milieu 104)

Jus de tomate	250 ml
Extrait de levure	5 g
Peptone	5 g
Acide malique	3 g
Sulfate de magnésium · $6H_2O$	0.05 g
Sulfate de manganèse · $4H_2O$	0.05 g
Agar-agar	20 g
Eau : jusqu'à	1000 ml
pH	4,8

Ajouter 100 mg/L de natamycine (pimaricine) pour inhiber le développement des levures, après passage à l'autoclave, juste avant utilisation.

2.6 MTb.

Glucose	15 g
Poudre Lab-Lemco (Oxoid)	8 g
Caséine hydrolysée	1 g
Extrait de levure	5 g
Jus de tomate	20 ml
Acétate de sodium	3 g
Citrate d'ammonium	2 g
Acide malique	6 g
Sulfate de magnésium	0,2 g
Sulfate de manganèse	0,035 g
"Tween 80"	1 mg
TC Vitamins Minimal Eagle, 100x (BD-Difco)	10 ml *
pH (avec KOH)	5,0
Eau jusqu'à	1000 ml

* à ajouter après stérilisation.

Ajouter 100 mg/L de natamycine (pimaricine) pour inhiber le développement des levures, après passage à l'autoclave, juste avant utilisation.

3 MILIEUX POUR LE DÉNOMBREMENT DES BACTÉRIES ACÉTIQUES

3.1 GYC

Glucose	50 g
Extrait de levure	10 g
Carbonate de calcium ($CaCO_3$)	3 g
Gélose	25 g
Eau : jusqu'à	1000 ml

Ajouter 100 mg/L de natamycine (pimaricine) pour inhiber le développement des levures, et 12,5 mg/L de pénicilline pour éliminer la croissance des bactéries lactiques, après passage à l'autoclave, juste avant utilisation.

3.2 Milieu G2

Extrait de levure	1,2 g
Phosphate d'ammonium	2 g
Jus de pomme	500 ml
Gélose	20 g
Eau : jusqu'à	1000 ml
pH	5,0

Ajouter 100 mg/L de natamycine (pimaricine) pour inhiber le développement des levures, et 12,5 mg/L de pénicilline pour éliminer la croissance des bactéries lactiques, après passage à l'autoclave, juste avant utilisation.

3.3 Milieu Kneifel

Extrait de levure	30 g
Éthanol	20 ml *
Gélose	20 g
Vert de bromocrésol à 2,2 %	1mL
Eau : jusqu'à	1000 ml

* à ajouter après stérilisation.

Ajouter 100 mg/L de natamycine (pimaricine) pour inhiber le développement des levures, et 12,5 mg/L de pénicilline pour éliminer la

croissance des bactéries lactiques, après passage à l'autoclave, juste avant utilisation.

Colonies bleues : *Acetobacter*, *Gluconacetobacter*
Colonies vertes : *Gluconobacter*

4 MILIEUX POUR LE DÉNOMBREMENT DES MOISISSURES

4.1 Czapek-Dox, Modifié

Sucrose	30 g
$NaNO_3$	3 g
K_2HPO_4	1 g
$MgSO_4$	0,5 g
KCl	0,5 g
$FeSO_4$	0,01g
Gélose	15 g
pH final (à 25 °C)	7,3 ± 0,2

Ajouter 10 mg/l de cycloheximide pour inhiber le développement des levures (le développement des levures résistantes au cycloheximide est généralement plus lent que celui des moisissures).
Remarque : Ce milieu permet la croissance uniquement des moisissures se développant en présence de nitrates.
Ajouter de la tétracycline (100 mg/l) et de la streptomycine (100 mg/l) pour inhiber la croissance des bactéries.

4.2 Gélose dichloran-rose Bengale-chloramphénicol (gélose DRBC)

Glucose	10 g
Peptone	5 g
KH_2PO_4	1 g
$MgSO_4$	0,5 g
Rose Bengale	0,025 g
Dichloran (2,6 dichloro-4-nitroaniline)	0,002g
Solution de chloramphénicol (0,1 g/10ml) *	10 ml
Gélose	15 g
pH final (à 25 °C)	5,6 ± 0,2

* À ajouter après stérilisation.

4.3 Gélose à l'extrait de malt (MEA)

Glucose	20 g
Extrait de malt	20 g
Peptone	5 g
Gélose	15 g
pH final (à 25 °C)	5,5 ± 0,2

Ajouter de la tétracycline (100 mg/l) et de la streptomycine (100 mg/l) pour inhiber la croissance des bactéries.

2. Milieux de culture liquides

2.1. *Pour les levures*

Milieu YEPD (extrait de levure, peptone, dextrose) + chloramphénicol

Préparation : Peser 10,0 g d'extrait de levure (Difco ou équivalent), 20 g de peptone, 20 g de glucose et 100 mg de chloramphénicol. Dissoudre, compléter le volume avec de l'eau jusqu'à 1000 ml et mélanger.

Verser des portions de 5 ml de ce milieu dans les tubes et placer en autoclave pendant 15 mn à 121 °C.

2.2. *Pour les bactéries lactiques*

Milieu MTJ (50 % de milieu MRS "bouillon pour lactobacilles selon Man, Rogosa et Sharpe"+ 50 % de milieu TJB "bouillon de jus de tomate") + actidione

Préparation : Peser 27,5 g de MRS "bouillon pour lactobacilles selon Man, Rogosa et Sharpe" (Difco ou équivalent). Ajouter 500 ml d'eau, porter à ébullition pour permettre la dissolution totale et ajouter 20,5 g de TJB "bouillon de jus de tomate" (Difco ou équivalent). Ajouter 50g d'actidione. Dissoudre avec de l'eau de façon à obtenir 1000 ml de solution après avoir corrigé le pH à 5,5 avec une solution d'acide chlorhydrique 1N et mélanger.

Verser des parties de 10 ml de ce milieu[3)] dans les tubes et placer en autoclave pendant 15 minutes à 121°C.

[3)] On utilise un volume de 10 ml au lieu de 5 ml comme dans le cas des levures, en raison de la plus grande sensibilité des bactéries lactiques à l'oxygène.

ANNEXE 6 : IDENTIFICATION DE MICRO-ORGANISMES SPÉCIFIQUES

6.1 Identification de colonies de levure sur gélose nutritive WL.

L'utilisation de ce milieu ne prétend pas constituer une méthode d'identification des espèces, mais peut offrir aux laboratoires non spécialisés un moyen rapide et bon marché de prévoir le genre des levures viables et cultivables. Après incubation de 4 jours, évaluer la morphologie des colonies comme suit (Pallman, C., J. B. Brown, T. L. Olineka, L. Cocolin, D. A. Mills et L. F. Bisson. 2001. Use of WL medium to profile native flora fermentations. American Journal of Enology and Viticulture 52:198-203 ; A. Cavazza, M. S. Grando, C. Zini, 1992. Rilevazione della flora microbica di mosti e de vini. Vignevini, **9**-1992 17-20) :

- ***Saccharomyces spp.*** *:* Se développe bien en 4 jours sur gélose nutritive WL, en formant des colonies circulaires de couleur crème à légèrement verdâtre. Les différentes nuances de couleur n'indiquent pas nécessairement la présence de différentes souches, mais la présence de légères mutations ; les colonies présentent une protubérance, ont une surface lisse et mate, et leur consistance est butyreuse. Ne se développe pas sur la gélose de lysine.
- ***Torulaspora spp****. :* Les colonies sont semblables à celles de *Saccharomyces* spp. Se développe sur la gélose de lysine.
- ***Hanseniaspora spp. (Kloeckera spp.) :*** Se développe sur la gélose nutritive WL en 4 jours, donnant des colonies plates, lisses et butyreuses de couleur vert foncé. Se développe sur la gélose de lysine et sur la gélose différentielle WL.
- ***Candida stellata :*** Se développe sur la gélose nutritive WL en 4 jours, donnant des colonies vert pois, lisses et butyreuses qui, avec le temps, deviennent plus foncées au centre. Se développe sur la gélose de lysine.
- ***Saccharomycodes spp.*** : Se développe sur la gélose nutritive WL en 4 jours, donnant des colonies convexes, lisses et butyreuses de couleur vert clair. Se développe sur la gélose de lysine, pas sur la gélose différentielle WL.

Remarque : Ses cellules, observées au microscope, sont très grandes (jusqu'à 25 µm).

- ***Schizosaccharomyces pombe*** : Se développe sur la gélose nutritive WL en 4 jours, donnant des colonies lisses, de la taille d'une pointe d'aiguille et de couleur vert foncé. Se développe sur la gélose de lysine.
Remarque : Ses cellules, observées au microscope sont facilement identifiables en raison de leur division caractéristique par scission.
- ***Rhodotorula spp.*** : Se développe sur la gélose nutritive WL en 4 jours, donnant des colonies butyreuses, à la surface lisse et muqueuse, et de couleur rose foncé. Se développe sur la gélose de lysine.
- ***Metschnikowia spp.*** : Se développe sur la gélose nutritive WL en 4 jours, donnant de petites colonies claires, lisses et butyreuses. Un pigment rougeâtre se répand dans le milieu au-dessous des colonies. Se développe sur la gélose de lysine.
- ***Pichia membranifaciens*** : Se développe sur la gélose nutritive WL en 4 jours, donnant des colonies convexes, à la surface grossière et pulvérulente, et de couleur grisâtre ou bleuâtre. Se développe sur la gélose de lysine.
- ***Pichia anomala*** (anciennement *Hansenula anomala*) : Se développe sur la gélose nutritive WL en 4 jours, donnant des colonies de couleur crème ou bleuâtre, nettement bleuâtre après 8 jours. Les colonies circulaires, à la surface lisse ont une consistance butyreuse mais parfois clairement muqueuse. Se développe sur la gélose de lysine.
- ***Dekkera spp.*** ou ***Brettanomyces spp.*** : Se développe sur la gélose nutritive WL en 8 jours, donnant de petites colonies lisses et butyreuses, en forme de dôme et de couleur crème. Produit une grande quantité d'acide acétique, nettement perceptible à l'odeur, qui fait virer le milieu au jaune. Se développe sur la gélose de lysine et sur la gélose différentielle WL. La croissance sur ce dernier milieu permet de la distinguer de *Zygosaccharomyces bailii*.
Remarque : Une confirmation est possible par examen microscopique : Dekkera possède des cellules de petite taille, dont certaines ont une forme ogivale caractéristique.
- ***Zygosaccharomyces bailii*** : Se développe sur la gélose nutritive WL en 4 jours, donnant de petites colonies lisses et butyreuses, de forme circulaire et de couleur crème. Se développe sur la gélose de lysine mais pas

sur la gélose différentielle WL. Un halo jaunâtre est souvent présent autour des jeunes colonies.
Remarque : en cas de développement dans du vin mis en bouteille, produit des groupes bruns de 0,5 - 1 mm. Ses cellules ne sont pas de forme ogivale.

- **Bactéries acétiques** : Se développent sur la gélose nutritive WL, en donnant des colonies brillantes et intensément vertes, d'une taille allant de petite à celle d'une pointe d'aiguille, et qui sont fortement positives au test à la catalase. *(Remarque – ce milieu n'est pas approprié à leur comptage)*.
- **Bactéries lactiques** : Se développent sur la gélose nutritive WL en 10 jours, en donnant des colonies catalase-négatives claires de la taille d'une pointe d'aiguille. *(Remarque – ce milieu n'est pas approprié à leur comptage).*

6.2 Identification des colonies de bactéries lactiques.

Les colonies de BL sont translucides et d'une taille allant de celle d'une pointe d'aiguille à quelques mm. Elles sont à Gram-positif et catalase-négatives. *Oenococcus oeni* se développe sous forme de courtes chaînes, les pédiocoques forment des tétrades et diplocoques, les lactobacilles forment des bacilles longs ou courts.

6.3 Identification des colonies de bactéries acétiques.

Les colonies de BA sont catalase-positives et à Gram négatif, et sont fortement acidogènes : ceci se traduit par une zone claire autour de leurs colonies dans les milieux contenant du carbonate de calcium ou par une couleur différente si le milieu contient un indicateur de pH. Leurs cellules sont des coques ou des bacilles, en général légèrement plus grandes que celles des BL.

Méthode OIV-MA-AS4-02A Méthode Type IV

Recherche des antiseptiques et des inhibiteurs de fermentation

(Méthode A 35 modifiée par la résolution Oeno 6/2006)

1. Test de fermentescibilité

1.1. Objectif

Mettre en évidence la présence éventuelle d'une ou plusieurs substances à action antifermentaire dans les vins, mais sans en préciser la nature.

1.2. Principe

Le vin, dont le dioxyde de soufre libre a été combiné par addition d'une solution aqueuse d'éthanal, est ramené à 10% vol. d'alcool, additionné de glucose pour que sa teneur en sucres soit comprise entre 20 et 50 g/l et de solutions nutritives.

Après un ensemencement par une souche de levure résistant à l'alcool, la fermentation est suivie par pesée de la quantité de dioxyde de carbone dégagée.

La vitesse de fermentation est comparée, d'une part à celle d'un vin naturel authentique, de composition aussi voisine que possible de celle du vin analysé, d'autre part à celle du vin analysé dont le pH a été amené à 6 (la plupart des antiseptiques minéraux et organiques sont sans action sur la fermentation à ce pH). Ces deux vins témoins sont ensemencés dans les mêmes conditions que le vin analysé.

1.3. Appareillage

Flacon de 90 ml obturé par un bouchon de caoutchouc perforé d'un trou, dans lequel est engagé un tube très effilé à son extrémité supérieure.

1.4. Réactifs et milieux de culture

1.4.1.- Solution aqueuse d'éthanal :

Solution préparée à partir d'éthanal obtenu par distillation de métaldéhyde ou de paraldéhyde, en présence d'acide sulfurique et titrée par la méthode au sulfite de sodium. On ajuste le titre de la solution à 6,9 g/1.

1 ml de cette solution fixe 10 mg de dioxyde de soufre.

1.4.2. Solutions nutritives :

- Sulfate d'ammonium, $(NH_4)_2SO_4$ ..... 25 g/l
- Asparagine ..... 20 g/l

Ces solutions sont à conserver au réfrigérateur.

1.4.3. Milieux de culture :

- Milieu solide : malt gélosé.
  Malt en poudre ..... 3 g

Glucose	10 g
Peptone pancréatique	5 g
Extrait de levure en poudre	3 g
Gélose	20 g
Eau q.s.p.	1l
pH	6

Stériliser 20 min. à 118 °C.

Ce mélange existe sous forme de préparations commerciales.

- Milieu liquide (au choix) :

- Répartir du jus de raisin contenant 170 à 200 g/1 de sucres, en tubes bouchés avec du coton, à raison de 10 ml par tube; stériliser au bain d'eau à 100 °C pendant 15 min.
- Malt liquide : même milieu que le milieu solide, mais sans gélose.

1.4.4. Culture et entretien de la souche de *Saccharomyces bayanus* et préparation du levain. .

a) Culture et entretien de la souche sur milieu solide :

À partir d'une souche de collection, ensemencer en stries les tubes de milieux solides. Ces tubes sont mis à incuber à l'étuve à 25 °C jusqu'à ce que la culture soit bien apparente (3 jours environ); ces tubes peuvent être conservés au réfrigérateur. Il suffit de les repiquer tous les 6 mois.

b) Préparation du levain :

Un des tubes du milieu liquide est ensemencé selon les techniques micro-biologiques à partir de la souche cultivée sur milieu solide; après croissance (24 à 48 h), repiquer 2 fois consécutivement sur le même milieu enrichi à 10% vol. d'alcool, de façon à accoutumer la souche.

La deuxième culture en pleine activité renferme environ 50 millions de levures par millilitre. Cette culture servira à ensemencer le vin étudié. Effectuer une numération et ensemencer à raison de 10^5 levures/ml.

1.5. *Mode opératoire*

- Préparation du vin :

100 ml de vin sont traités par la quantité nécessaire d'éthanal calculée d'après la teneur en dioxyde de soufre libre (44 mg d'aldéhyde bloquent 64 mg de dioxyde de soufre). Attendre 24 h et vérifier que le vin contient moins de 20 mg de dioxyde de soufre libre par litre.

Si le titre alcoométrique est supérieur à 10 % vol., le vin sera dilué avec des solutions de glucose et de l'eau en quantité calculée de manière à réaliser une teneur en sucres comprise entre 20 et 50 g/l et à ramener le titre à 10 % vol. environ. Pour les vins titrant moins de 10 % vol., ajouter du glucose solide pour ramener sans dilution la teneur en sucres entre ces valeurs, pour lesquelles la vitesse de fermentation n'est pas modifiée par la teneur en sucres.

- Test de fermentescibilité :

Dans le flacon de 90 ml, placer 60 ml de vin préparé comme ci-dessus, 2,4 ml de solution de sulfate d'ammonium et 2,4 ml de solution d'asparagine. Ensemencer par 3 gouttes d'une culture de 3 jours de *Saccharomyces bayanus,* de manière à réaliser une population initiale voisine de 10^5 levures/ml. Mettre en place le bouchon avec son tube effilé, peser à 10 mg près l'ensemble et le placer dans une étuve à 25 °C.

Une pesée est effectuée quotidiennement pendant au moins 8 jours.

Opérer chaque fois parallèlement, d'une part avec un vin de composition et d'origine analogues dont on est sûr qu'il n'a pas reçu d'antiseptique, d'autre part avec le vin à essayer dont on a ajusté le pH à 6.

Un flacon de vin non ensemencé indique la perte par évaporation.

1.6. *Interprétation*

Dans la plupart des cas, la fermentation se déclare en 48 h et le dégagement quotidien est maximum entre le 3ème et le 5ème jour.

On ne pourra affirmer la présence d'un inhibiteur de fermentation que :

a) Si la fermentation ne se déclare pas ou est retardée d'au moins 2 jours par rapport à l'un des 2 témoins. Il est difficile de se prononcer lorsque le retard est léger, car il peut y voir des résultats "faux positifs", certains vins naturels se conduisant parfois comme s'ils contenaient des traces d'inhibiteurs (en particulier les vins liquoreux issus de raisins atteints de pourriture noble).

b) Si le dégagement maximum quotidien n'a pas eu lieu entre le 3ème et le 5ème, mais après le 7ème jour, ce dégagement doit être supérieur ou égal à 50 mg pour 60 ml de vin.

c) Le tracé de la courbe de fermentation et celui de la courbe de dégagement quotidien de C02 en fonction du temps peuvent faciliter l'interprétation dans les cas difficiles.

Méthode OIV-MA-AS4-02B Méthode Type IV

Recherche des antiseptiques et des inhibiteurs de fermentation

(Méthode A 35 modifiée par la résolution Oeno 6/2006)

1. Recherche des acides sorbique, benzoïque, *p*-chlorobenzoïque, salicylique, *p*-hydroxybenzoïque et ses esters

1. *1. Chromatographie sur couche mince*

1.1.1. Principe

Ces antiseptiques sont extrait par l'éther du vin acidifié au préalable. Après séparation par chromatographie sur couche mince de poudre de polyamide, ils sont localisés et caractérisés par un examen du chromatogramme sous rayonnement ultraviolet.

1.1.2. Appareillage

- Dispositif pour l'étalement en couche mince.
- Plaques de verre 20 X 20 cm.

Préparation des plaques - Mélanger intimement à sec 12 g de poudre de polyamide avec 0,3 g d'indicateur fluorescent; ajouter en agitant 60 ml de méthanol; étaler sur plaques sur une épaisseur de 0,3 mm. Sécher à la température ordinaire.

Remarque : Des plaques prêtes à l'emploi commercialisées peuvent être utilisées.

1.1.3. Réactifs

- Éther diéthylique.
- Méthanol.
- Alcool à 96% vol.
- Acide sulfurique dilué à 20 p. 100 (v/v).
- Sulfate de sodium anhydre.
- Poudre de polyamide pour chromatographie (par exemple, Macherey-Nagel ou Merck).
- Indicateur fluorescent (F_{254} Merck ou équivalent).
- Solvants :

Pentane	10 vol.
Hexane	10 vol.
Acide acétique glacial	3 vol.

- Solutions étalons :
  - Préparer des solutions à 0,1 g pour 100 ml d'alcool à 96% vol. avec les acides sorbique, *p*-chlorobenzoïque, salicylique, *p*-hydroxybenzoïque et ses esters.

- Préparer une solution à 0,2 g pour 100 ml d'alcool à 96% vol. avec l'acide benzoïque.

1.1.4. Mode opératoire

Placer 50 ml de vin dans une ampoule à décanter; acidifier par l'acide sulfurique dilué à 20 p.100 et extraire à 3 reprises par 20 ml d'éther diéthylique chaque fois. Réunir les solutions éthérées dans une ampoule à décanter et les laver avec quelques millilitres d'eau distillée. Sécher ensuite cet éther avec du sulfate de sodium anhydre. Evaporer l'éther à sec, soit sur un bain d'eau à 100 °C, soit dans un évaporateur rotatif. Si l'évaporation est effectuée sur un bain d'eau, il est avantageux d'activer l'évaporation par un courant d'air modéré jusqu'aux 2 ou 3 derniers millilitres et de terminer l'évaporation à froid.

Dissoudre le résidu dans 1 ml d'éthanol, déposer 3 à 5 µ1 de cette solution sur la plaque de polyamide, ainsi que 3 à 5 µl des solutions alcooliques étalons des divers conservateurs. Introduire la plaque dans une cuve à chromatographie, saturée des vapeurs du solvant. Laisser migrer le solvant sur une hauteur de 15 cm environ, ce qui demande 1 h 30 à 2 h 30.

Retirer la plaque de la cuve et la laisser sécher à la température ordinaire. Examiner ensuite en lumière ultraviolette, à la longueur d'onde 254 nm. Les conservateurs apparaissent de bas en haut de la plaque dans l'ordre suivant : acide *p*-hydroxybenzoïque, esters de l'acide *p*-hydroxybenzoïque, acide salicylique, acide *p*-chlorobenzoïque, acide benzoïque, acide sorbique.

À l'exception de l'acide salicylique qui présente une fluorescence bleu clair, les autres conservateurs donnent des spots foncés sur fond jaune-vert fluorescent.

Sensibilité - Cette technique permet de déceler les quantités suivantes des divers conservateurs exprimées en milligrammes par litre :

Acide salicylique	3
Acide sorbique	5
Esters de l'acide *p*-hydroxybenzoïque	5
Acide *p*-hydroxybenzoïque	5-10
Acide *p*-chlorobenzoïque	5-10
Acide benzoïque	20

1.2. *Chromatographie liquide haute performance*

1.2.1. Mode opératoire

Le dosage s'effectue directement sur le vin, sans préparation d'échantillon. Il faut cependant diluer les vins rouges avant de les injecter afin de ménager la colonne.

D'après cette méthode, le seuil de détection de chaque antiseptique dans la solution soumise au dosage est d'environ 1 mg/l.

1.2.2. Conditions opératoires

Les conditions qui se sont révélées être les plus avantageuses sont les suivantes :

A. Pour le dosage des acides sorbique et benzoïque
   Procéder selon la méthode de dosage des acides sorbique, benzoïque, salicylique dans les vins par chromatographie liquide à haute performance (AS313-20-SOBESA) figurant au Recueil

B. Pour le dosage de l'acide *p*-chlorobenzoïque, de l'acide *p*-hydroxybenzoïque et ses esters

   Colonne : voir A

   Phase mobile :
   Solution 0,01 M d'acétate d'ammonium-méthanol (40:60)
   pH : 4,5-4,6
   Débit : voir A
   Volume injecté : voir A
   Détecteur : UV, 254 nm
   Température : voir A

BIBLIOGRAPHIE

JUNGE *Ch., Zeits. Unters. Lebensmit., 1967, 133, 319*

Méthode OIV-MA-AS4-02C Méthode Type IV

Recherche des antiseptiques et des inhibiteurs de fermentation

(Méthode A 35 modifiée par la résolution Oeno 6/2006)

1. Recherche des dérivés monohalogénés de l'acide acétique

1.1. *Principe*

Les dérivés monohalogénés de l'acide acétique sont extraits par l'éther du vin acidifié. On soumet ensuite cet éther à une extraction au moyen d'une solution 0,5 M d'hydroxyde de sodium. La solution d'extraction dont l'alcalinité doit être maintenue entre 0,4 et 0,6 M, est additionnée d'acide thiosalicylique, la synthèse du thioindigo se réalise en passant par les étapes suivantes :

a) Condensation du dérivé monohalogéné avec l'acide thiosalicylique et formation de l'acide phénylthioglycolique orthocarboxylé;

b) cyclisation de l'acide formé en milieu alcalin à chaud, avec formation de thioindoxyle;

c) Oxydation du thioindoxyle par l'hexacyanoferrate III de potassium en milieu alcalin avec formation de thioindigo, soluble dans le chloroforme qu'il colore en rouge.

1.2. *Appareillage*

- Bain d'eau à 100 °C.
- Agitateur mécanique.
- Étuve permettant d'obtenir une température de 200 ± 2 °C.

1.3. *Réactifs*

- Éther diéthylique.
- Solution d'acide chlorhydrique dilué au $^1/_3$ (v/v). Mélanger une partie d'acide chlorhydrique pur, ρ_{20} = 1,19 g/ml, avec 2 parties d'eau distillée.
- Sulfate de sodium anhydre.
- Solution d'acide thiosalicylique :
  Acide thiosalicylique ..... 3 g
  Solution d'hydroxyde de sodium 1,5 M q.s.p. ..... 100 ml
- Solution d'hydroxyde de sodium : 0,5 M.
- Solution d'hexacyanoferrate III de potassium contenant 2 g de $K_3Fe(CN)_6$ pour 100 ml d'eau.
- Chloroforme.

1.4. *Mode opératoire*

Placer dans une fiole d'extraction bouchée à l'émeri 100 ml de vin à analyser; ajouter 2 ml d'acide chlorhydrique dilué au $^1/_3$ et 100 ml d'éther. Agiter énergiquement le contenu pendant quelques secondes à la main, puis pendant 1 h avec un agitateur mécanique. Transvaser dans une ampoule à décanter et recueillir la couche éthérée après avoir laissé décanter et avoir éliminé la couche inférieure.

Agiter l'extrait éthéré avec 8 à 10 g de sulfate de sodium anhydre pendant quelques secondes.

Transvaser cet extrait dans une ampoule à décanter, ajouter 10 ml de la solution 0,5 M d'hydroxyde de sodium; agiter pendant 1 min. Laisser reposer.

Prélever 0,5 ml de l'extrait alcalin et vérifier, par titration au moyen d'acide sulfurique 0,05 M, que son titre est bien compris entre 0,4 et 0,6 M. Recevoir l'extrait alcalin contenu dans l'ampoule à décanter dans un tube à essai, dans lequel on a placé 1 ml de solution d'acide thiosalicylique Ajuster, si nécessaire, le titre de l'extrait alcalin pour qu'il soit compris dans les limites indiquées, au moyen d'une solution d'hydroxyde de sodium de titre plus élevé et connu exactement. Agiter le contenu du tube à essai pendant 30 s et le transvaser dans une capsule de porcelaine.

Placer la capsule sur un bain d'eau à 100 °C en projetant à sa surface un courant d'air froid. Maintenir la capsule sur le bain d'eau à 100 °C pendant 1 h, durée qui devra être respectée, même si l'on arrivait en un temps plus court à un résidu pratiquement sec. S'il se formait au cours de l'évaporation une croûte à la surface du résidu, il convient de la rompre en la triturant avec une fine baguette de verre pour faciliter l'évaporation.

Placer ensuite la capsule dans une étuve maintenue à 200 ± 2 °C pendant 30 min. exactement. Après refroidissement, reprendre le contenu de la capsule par 4 ml d'eau; transvaser dans un tube séparateur à robinet placer dans la capsule 3 ml de la solution d'hexacyanoferrate III de potassium pour finir de dissoudre le résidu qui pourrait y adhérer et le placer ensuite dans le tube séparateur. Agiter pendant 30 s pour favoriser l'oxydation. Ajouter 5 ml de chloroforme, agiter par 3 à 4 retournements Laisser décanter.

Une coloration rose ou rouge (selon la quantité de thioindigo formé) indique la présence de dérivé monohalogéné de l'acide acétique.

Sensibilité - La méthode permet de déceler 1,5 à 2 mg d'acide monochloracétique par litre de vin et les quantités correspondantes des autres dérivé monohalogénés. Mais le rendement des diverses extractions n'étant pas quantitatif, cette méthode ne peut être utilisée pour le dosage de ces dérivés monohalogénés dans les vins.

BIBLIOGRAPHIE

FRIEDLANDER, *Ber. Deutsch. Chem. Gesell., 1906, 39, 1062.*
RAMSEY L.L., PATTERSON *W.I., J. Ass.* Off. *Agr. Chem., 1951, 34, 827.*
PERONNET M., ROCQUES S., *Ann. Fais. Fraudes, 1953, 21-23.*
Traité de chimie organique, publié sous la direction de V. GRIGNARD, *1942, 19, 565–566.*
Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists
11e édition, publiée par l'Association of Official Analytical Chemists, Washington
1970, 340-341.
TERCERO C., F. V. O.I.*V., 1967,* n° *224.*

Méthode OIV-MA-AS4-02D Méthode Type IV

Recherche des antiseptiques et des inhibiteurs de fermentation

(Méthode A 35 modifiée par la résolution Oeno 6/2006)

1. Recherche et dosage du pyrocarbonate d'éthyle

1.1. *Principe*

Le carbonate diéthylique formé par la dégradation du pyrocarbonate d'éthyle (ester diéthylique de l'acide pyrocarbonique) en présence d'éthanol est extrait du vin par le sulfure de carbone et dosé par chromatographie en phase gazeuse. L'un ou l'autre des modes opératoires décrits ci-dessous peut être utilisé.

1.2. *Appareillage*

1.2.1. Chromatographe en phase gazeuse avec détecteur à ionisation de flamme.

1.2.2. Colonnes :

– Colonne capillaire garnie de Carbowax 1540
  Longueur de la colonne : 50 pieds (15,24 m)
  Diamètre intérieur : 0,02 pouce (0,51 mm)
– Polypropylèneglycol sur Celite 545 (15:100), 60-100 mesh
  Longueur de la colonne : 2 m
  Diamètre intérieur : 3 mm

1.3. *Réactifs*

– Sulfate de sodium anhydre
– Sulfure de carbone

Le sulfure de carbone ne devra pas présenter d'impuretés dans la zone de rétention critique (de 5 à 7 min.) pour une sensibilité maximale dans les conditions de chromatographie en phase gazeuse indiquées dans le paragraphe 1.4.2.

1.4. *Mode opératoire*

1.4.1. Utilisation de la colonne capillaire.

Introduire 100 ml de vin dans une ampoule à décanter de 250 ml de capacité avec 1 ml de sulfure de carbone. Agiter vigoureusement pendant 1 min. La phase sulfure de carbone séparée est centrifugée fortement, puis séchée au moyen de sulfate de sodium anhydre.

Injecter 10 µl du liquide limpide surnageant dans le chromatographe.

Conditions de la chromatographie :

– Gaz d'alimentation du détecteur :
  hydrogène : 37 ml/min.
  air : 250 ml/min.
– Gaz vecteur : azote :
  40 ml/min.

Un système de division dans un rapport voisin de 1/10 envoie dans le détecteur le mélange gazeux avec un débit de 3 à 5 ml/min.

– Température :
  injecteur : 150 °C, four : 80 °C, détecteur : 150 °C,
– Limite de détection :
  0,05 mg/1 de vin.

1.4.2. Utilisation de la colonne au polypropylèneglycol.

Introduire 20 ml de vin et 1 ml de sulfure de carbone dans un tube à centrifuger à fond conique et pouvant être bouché. Agiter vigoureusement pendant 5 min., puis centrifuger pendant 5 min. en appliquant une force centrifuge de 1000 à 1200 g. Le liquide surnageant est prudemment aspiré au moyen d'une pipette à pointe effilée; la phase sulfure de carbone est séchée par une faible quantité de sulfate de sodium anhydre, ajoutée en agitant avec une baguette de verre. Injecter 1 µl du liquide limpide dans le chromatographe en phase gazeuse.

Conditions de la chromatographie.

– Gaz d'alimentation du détecteur :
  hydrogène : 35 ml/min.
  air : 275 ml/min.
– Gaz vecteur : azote :
  25 ml/min.
– Température :
  injecteur : 240 °C
  four : 100 °C
  détecteur : 240 °C
– Domaine de sensibilité :
  12 x 10-11 A à 3 X 10^{-11} A
– Vitesse de déroulement du papier enregistreur :
  1 cm/min.
– Limite de détection :
  0,10-0,05 mg/1 de vin

En observant exactement ces conditions, le carbonate diéthylique présente un temps de rétention voisin de 6 min.

L'étalonnage de l'appareil est effectué au moyen de solutions à 0,01 et 0,05 p. 100 (m/v) de carbonate diéthylique dans le sulfure de carbone.

1.5. *Calculs*

La détermination quantitative du carbonate diéthylique est effectuée de préférence par la méthode de l'étalon interne, en se référant aux pics de l'alcool isobutylique ou de l'alcool isoamylique qui sont voisins de celui du carbonate diéthylique.

Pour ce faire, préparer deux échantillons du vin à analyser : l'un étant le vin additionné de 10 ml d'alcool à 10 % vol., l'autre le même vin additionné de 1 mg de carbonate diéthylique par litre au moyen de 10 -ml d'une solution de carbonate diéthylique à 100 mg/l dans l'alcool à 10 % vol.

Traiter ces deux échantillons selon l'une ou l'autre des techniques ci-dessus en fonction de la colonne utilisée.

Soit :

- S = la surface du pic du carbonate diéthylique correspondant au vin sur chargé de 1 mg de carbonate diéthylique par litre.
- S_x = la surface du pic correspondant au vin,
- I = la surface du pic de l'étalon interne dans le vin,
- 1 = la surface du pic de l'étalon interne dans le vin surchargé.

La concentration du carbonate diéthylique en mg/1 de vin est :

$$\frac{S_\chi}{S \times \frac{i}{I} - S_\chi}$$

Dans le cas où l'on effectue l'étalonnage au moyen d'une solution étalon pure de carbonate diéthylique, il est nécessaire de déterminer au préalable le rendement de l'extraction par le sulfure de carbone dans les conditions opératoires utilisées. Ce rendement est exprimé par le facteur d'extraction F, sous forme d'un nombre décimal inférieur ou égal à 1 (rendement 100%).

Soit :

- S_x = la surface du pic de carbonate diéthylique donné par le vin,
- S_e = la surface du pic donné par l'injection d'un même volume de solution étalon de carbonate diéthylique de concentration C en mg/1,
- V_x = le volume de vin soumis à l'extraction par le sulfure de carbone,
- V_s = le volume de sulfure de carbone utilisé pour l'extraction,
- E_x = la sensibilité pour l'enregistrement de S_x,
- E_e = la sensibilité pour l'enregistrement de S_e.

La concentration du carbonate diéthylique en mg/1 de vin est :

$$\frac{C \times S_\chi \times E_\chi \times V_s}{S_e \times E_e \times F \times V_\chi}$$

Si les concentrations des deux solutions injectées dans le chromatographe sont voisines, la sensibilité est la même pour l'enregistrement de S_x et de S_e, la formule se simplifie et devient :

$$\frac{C \times S_\chi \times V_s}{S_e \times F \times V_\chi}$$

BIBLIOGRAPHIE

KIELHOFER E., WURDIG *G., Dtsch. Lebensmit. Rdsch. . 1963, 59, 197-200 et 224-228.*
PRILLINGER F., *Weinberg u. Keller, 1967, 14, 5-15.* -
REINHARD *C., Dtsch. Lebensmit. Rdsch., 1967, 5, 151-153.*
BANDION *F., Mitt. Klosterneuburg, Rebe und. Wein, 1969, 19, 37-39.*

Méthode OIV-MA-AS4-02E Méthode Type IV

Recherche des antiseptiques et des inhibiteurs de fermentation

(Méthode A 35 modifiée par la résolution Oeno 6/2006)

1. Recherche de l'acide déhydroacétique

1.*1. Principe*

Le vin acidifié par l'acide sulfurique est traité par un mélange à parties égales d'éther diéthylique et d'éther de pétrole. Après évaporation du solvant, l'extrait, repris par une petite quantité d'éthanol à 96% vol., est déposé sur une couche mince de polyamide et de gel de silice avec indicateur de fluorescence et soumis à l'action du solvant mobile benzène-acétone-acide acétique. L'acide déhydroacétique est localisé et caractérisé par un examen en ultraviolet du chromatogramme.

1.2. Appareillage

– Dispositif pour chromatographie en couche mince.
– Étuve.
– Évaporateur rotatif.
– Lampe U.V. 254 nm.
–

1.3. *Réactifs*

– Éther diéthylique.
– Éther de pétrole (point d'ébullition 40 °C). - Méthanol.
– Acide sulfurique à 20 p. 100 (v/v). - Sulfate de sodium anhydre.
– Éthanol à 96% vol.
– Couche de séparation chromatographique : 10 g de poudre de polyamide avec indicateur de fluorescence (par exemple polyamide DC II UV254 de Macherey-Nagel) sont agités fortement avec 60 ml de méthanol. Ajouter, en continuant l'agitation, 10 ml d'eau et 10 g de gel de silice G avec indicateur fluorescent (par exemple Kiesselgel GF254 de Merck).

Étaler ce mélange sur 5 plaques (200 x 200 mm) sur une épaisseur de 0,25 mm. Sécher les plaques à température ambiante pendant 30 min. puis à l'étuve à 70 °C pendant 10 min.

– Solvant de migration :

Benzène cristallisable	60 vol.
Acétone	3 vol.
Acide acétique cristallisable	3 vol.

– Solutions témoins

Solutions alcooliques d'acide déhydroacétique et d'acide benzoïque à 0,2 p. 100.

Solutions alcooliques d'acide sorbique, d'acide *p*-chlorobenzoïque, d'acide salicylique, d'acide *p*-hydroxybenzoïque et de ses esters propylique, méthylique et éthylique à 0, 1 p. 100 (m/v).

1.4. Mode opératoire

Acidifier 100 ml de vin par 10 ml d'acide sulfurique dilué à 20 p. 100, puis procéder 3 fois à l'extraction avec chaque fois 50 ml d'un mélange éther diethylique-éther de pétrole (1:1, v/v). Les émulsions peuvent être habituellement éliminées en laissant s'écouler la partie limpide de la phase aqueuse. Agiter à nouveau le liquide restant dans l'ampoule à décantation composé d'une émulsion et de la phase éthérée. -La phase aqueuse résiduelle se sépare dans la plupart des cas d'une façon nette de la phase éther. S'il demeurait encore un peu d'émulsion, celle-ci serait éliminée par addition de quelques gouttes d'éthanol.

Les phases éther diéthylique-éther de pétrole réunies sont lavées au moyen de 50 ml d'eau, desséchées par le sulfate de sodium, puis évaporées dans un évaporateur rotatif à 30-35 °C. Le résidu est repris par 1 ml d'éthanol.

Déposer 20 µl de cette solution sur la ligne de départ sous forme d'un trait de 2 cm de largeur, ou 10 µl sous forme d'une tache circulaire. A titre de comparaison, déposer 5 µl de chacune des solutions témoins indiquées ci-dessus. Après la chromatographie (ascendante, hauteur de migration 15 cm, durée 1 h 15 min. à 1 h 45 min., saturation normale de la chambre), la plaque est séchée à température ambiante. L'acide déhydroacétique et les autres conservateurs éventuellement présents sont localisés sous la lampe U.V. à 254 nm.

Lorsque l'examen du chromatogramme a révélé la présence d'acide *p*–chlorobenzoïque, des esters propylique ou méthylique de l'acide *p*–hydroxybenzoïque qui ne sont séparés qu'en partie par cette méthode leur identification peut s'opérer, en partant de l'extrait ci-dessus, suivant la méthode décrite dans ce chapitre, en 2 **Recherche des acides sorbique, benzoïque, parachlorobenzoïque** . . . , 2. 1. *Chromatographe sur couche mince.*

BIBLIOGRAPHIE

HALLER H.E., JUNGE *Ch., F.V. O.LV., 1972,* n* *397, Mitt. BI. der Gd CH, Fachgruppe, Lebensmitt. u. gerichtl. Chem., 1971, 25,* n° 5, 164-166.

Méthode OIV-MA-AS4-02F Méthode Type IV

Recherche des antiseptiques et des inhibiteurs de fermentation

(Méthode A 35 modifiée par la résolution Oeno 6/2006)

1. Azothydrate de sodium

1. 1. *Méthode par chromatographie liquide haute performance*

1.1.1. Principe

L'acide azothydrique isolé du vin grâce à une double distillation est décelé après une dérivation avec le chlorure de 3,5-dinitrobenzoyle, par chromatographie en phase liquide haute performance. La détection est effectuée au spectrophotomètre d'absorption dans l'ultraviolet à 240 nm.

1.1.2. Appareillage

1.1.2.1. Appareil à distiller (appareil de distillation pour la détermination du titre alcoométrique volumique); l'extrémité du réfrigérant se termine par un tube effilé.

1.1.2.2. Ballons à col rodé de 500 ml.

1.1.2.3. Flacon de 10 ml bouchant à l'émeri.

1.1.2.4. Appareil pour HPLC.

– Conditions opératoires :
  Colonne : C_{18}, 25 cm de long.
  Phase mobile : acétonitrile-eau (50 :50)
  Débit : 1 ml/min.
  Volume injecté : 20 µl
  Détecteur : spectrophotomètre d'absorption dans l'ultraviolet à 240 nm
  Température : ambiante

1.1.3. Réactifs

1.1.3.1. Hydroxyde de sodium en solution à 5 p. 100 (m/v).

1.1.3.2. Acide sulfurique en solution à 10 p. 100 (m/v).

1.1.3.3. Réactif indicateur : rouge de méthyle 100 mg, bleu de méthylène 50 mg, alcool à 50% vol. 100 ml.

1.1.3.4. Acétonitrile pour la chromatographie.

1.1.3.5. Réactif pour la dérivation : solution de chlorure de 3,5-dinitrobenzoyle à 10 p.100 (m/v) dans l'acétonitrile.

1.1.3.6. Solution-tampon d'acétate de sodium, pH 4,7 : mélanger un volume de solution d'acétate de sodium ($NaC_2H_3O_2.3H_2O$) 1 M avec un volume de solution d'acide acétique 1 M,.

1.1.3.7. Azothydrate de sodium, NaN_3.

1.1.4. Mode opératoire

1.1.4.1. Préparation de l'échantillon.

Dans un ballon à col rodé, placer 100 ml de vin, distiller en plongeant l'extrémité du réfrigérant dans 10 ml d'une solution d'hydroxyde de sodium à 5 p. 100 additionnée de quelques gouttes du réactif indicateur. Distiller jusqu'à recueillir 40-50 ml de distillat.

Transvaser le distillat dans un autre ballon à col rodé en rinçant la fiole avec deux fois 20 ml d'eau et ajouter de l'eau pour atteindre, le volume de départ (100 ml). Pour chasser l'éthanol, fixer le ballon à l'appareil à distiller et éliminer environ 50 ml de distillat (réduction du volume au demi).

Refroidir complètement le ballon. Acidifier par de l'acide sulfurique à 10 p. 100. Distiller, recueillir le distillat dans un flacon de 10 ml bouchant à l'émeri, contenant 1 ml d'eau et immergé dans un bain glacé. Arrêter la distillation lorsque le volume total est de 10 ml.

1.1.4.2. Dérivation

Mélanger 1 ml du distillat + 0,5 ml d'acétonitrile + 0,2 ml de la solution tampon + 30 µl de réactif pour la dérivation et agiter vigoureusement; attendre cinq minutes.

1.1.4.3. Chromatographie

Injecter 20 µl dans les conditions adoptées, le dérivé de l'acide azothydrique a un temps de rétention voisin de 11 minutes.

Limite de détection : 0,01 mg/l

Remarque : Parfois, une autre substance non dérivée peut simuler l'acide azothydrique. C'est pourquoi il faut vérifier un résultat positif comme suit : on injecte *20 µl* de distillat directement; une disparition du pic indique la présence d'acide azothydrique.

1.1.5. Calcul

Pour connaître la concentration de l'azothydrate de sodium, se référer à la réponse donnée par une solution étalon après dérivation. Tenir compte de la concentration d'un facteur 10 de l'échantillon de vin lors de l'analyse.

1.2. *Méthode colorimétrique*

1.2.1. Principe

L'acide azothydrique, très volatil, est séparé par double distillation, condition permettant l'élimination de l'éthanol, de l'acide acétique et du dioxyde de soufre, puis dosé colorimétriquement après formation d'un complexe coloré avec le chlorure de fer III (absorbance maximum à 465 nm).

1.2.2. Appareillage

1.2.2.1. Appareil à distiller simple, composé d'un ballon de 500 ml à col rodé et d'un réfrigérant terminé par un tube effilé.

1.2.2.2. Spectrophotomètre et cuves de verre de 1 cm de trajet optique.

1.2.3. Réactifs

1.2.3.1. Hydroxyde de sodium en solution M.

1.2.3.2. Acide sulfurique M.

1.2.3.3. Peroxyde d'hydrogène à 3 p.100 en vol.; son titre doit être contrôlé extemporanément par une solution 0,02 M de permanganate de potassium; soit p ml le volume qui oxyde 1 ml de la solution de peroxyde d'hydrogène à 3 p.100.

1.2.3.4. Solution de fer III à 20 g par litre en Fe III : (peser 96,6 g de $FeC1_3.6H_2O$, ou davantage car ce sel est très hygroscopique, contrôler la teneur en Fe III de la solution et l'ajuster si nécessaire à 20 g par litre ± 0,5 g).

1.2.3.5. Solution mère d'azothydrate de sodium (NaN_3) à 1 g par litre dans l'eau distillée.

1.2.3.6. Solution d'azothydrate de sodium à 200 mg par litre préparée extemporanément par dilution de la solution à 1 g par litre.

1.2.4. Mode opératoire

a) Dans un ballon de 500 ml à col rodé, placer 200 ml de vin, distiller, recueillir le distillat dans une fiole jaugée de 50 ml contenant 5 ml d'eau et immergée dans un bain glacé. Arrêter la distillation lorsque le volume total est de 50 ml environ.

b) Transvaser quantitativement le distillat dans un autre ballon rodé de 500 ml en rinçant la fiole de 50 ml avec 2 fois 20 ml d'eau.

Neutraliser au moyen de la solution d'hydroxyde de sodium M (utiliser un papier indicateur de pH).

Acidifier par 10 ml d'acide sulfurique M, agiter, puis oxyder le dioxyde de soufre par addition de solution de peroxyde d'hydrogène à 3 p. 100.

Si le vin contient S mg par litre de dioxyde de soufre, et si p ml est le volume de solution de permanganate de potassium 0,02 M nécessaire pour oxyder 1 ml de solution de peroxyde d'hydrogène à 3 p. 100, il faut utiliser pour 200 ml de vin :

$$\frac{S}{5 \times 3{,}2p} = \frac{S}{16p} \text{ ml de solution } H_2O_2$$

Compléter le volume à 200 ml environ par addition d'eau distillée.

Distiller, recueillir le distillat dans une fiole jaugée de 50 ml contenant 5 ml d'eau distillée et immergée dans un bain glacé; arrêter la distillation juste avant le trait de jauge, ramener à la température ambiante et ajuster le volume à 50 ml.

c) Ajouter 0,5 ml (exactement mesuré) de solution de chlorure ferrique, homogénéiser et mesurer aussitôt (délai maximum 5 min.) l'absorbance à 465 nm dans une cuve de 1 cm de trajet optique, le zéro de l'appareil étant réglé sur un essai à blanc constitué par 50 ml d'eau additionnée de 0,5 ml de solution de chlorure ferrique.

d) Établissement de la courbe étalon.

Dans des fioles jaugées de 50 ml introduire 1, 2, 3, 4, 5 ml de solution d'azothydrate de sodium à 200 mg par litre, compléter le volume à 50 mi par de l'eau distillée, ajouter 0,5 ml de solution de chlorure de fer III et mesurer les absorbances à 465 nm.

Ces solutions contiennent 4, 8, 12, 16, 20 mg d'azothydrate de sodium par litre. Les teneurs correspondantes par litre de vin sont : 1, 2, 3, 4, 5 mg.

La courbe représentative de la variation des absorbances en fonction des concentrations est une droite passant par l'origine.

1.2.5. Calcul

Reporter l'absorbance lue pour l'échantillon à analyser sur la droite d'étalonnage et relever la teneur en azothydrate de sodium en mg/1 de vin.

BIBLIOGRAPHIE

Méthode par HPLC :
SWARIN S.J. et WALDO R.A., J. *Liquid. Chrom., 1982, 5 (4), 597-604.*
BATTAGLIA R. et *MITISKA* J., Z. *Lebensm. Unters. Forsch., 1986, 182, 501-502.*
Méthode colorimétrique :

CLERMONT S. et CHRÉTIEN *D., F. V. 0. L V., 1977, n° 627.*

Méthode OIV-MA-AS4-03 Méthode Type IV

Numération des Levures de l'espèce Brettanomyces bruxellenis par Qpcr

Résolution OIV-Oeno 414-2011

Avertissement aux utilisateurs :
Phénol : Toutes les étapes de manipulation où le phénol est présent doivent être réalisées sous la hotte avec des gants. Les résidus contaminés au phénol sont récupérés dans les containers appropriés.
SYBR Green : il présente une mutagenicité non nulle mais cependant très inférieure au Bromure d'éthydium. Les précautions d'usage doivent être néanmoins conservées.

1. Domaine d'application

Ce protocole décrit une méthode de dénombrement des levures de l'espèce *Brettanomyces bruxellensis* dans les vins en cuve ou embouteillés, par PCR (Polymérase chain reaction) quantitative en temps réel (qPCR). L'analyse des vins en cours de FA (Fermentation alcoolique) et des moûts n'est pas validée à ce jour.

2. Définition

Les microorganismes dénombrés par cette méthode sont les levures *Brettanomyces bruxellensis* qui disposent d'une copie du gène cible.

3. Principe

Le principe consiste à amplifier, par une réaction enzymatique répétée, une région d'ADN (Acide désoxyribonucléique) cible balisée par deux amorces. Le procédé nécessite la succession de nombreux cycles avec trois étapes :

- La dénaturation de l'ADN par chauffage
- L'hybridation des amorces
- La polymérisation réalisée par la *Taq (Thermophilus aquaticus)* polymérase

Cependant, contrairement à la PCR classique, la qPCR permet de quantifier l'ADN amplifié au cours de l'amplification grâce à l'utilisation d'un fluorophore.

Jusqu'ici deux régions se révélant spécifiques de l'espèce ont été utilisées comme cibles. Il s'agit du gène codant pour l'ARN (Acide ribonucléique) ribosomal 26S et du gène *RAD4* [2, 3]. Comme pour la méthode FISH, il s'agit donc d'une technique spécifique de *Brettanomyces bruxellensis* mais qui présente l'avantage d'être moins coûteuse.

La particularité de la qPCR réside dans la lecture, à chaque cycle d'amplification, de la fluorescence qui augmente de façon exponentielle au fur et à mesure que l'ADN est amplifié. De nombreuses technologies de fluorescence ont été développées pour cette application. Dans le cas présent, il s'agira d'utiliser le fluorophore SYBR® Green.

❖ Fluorophore SYBR® Green

Cet agent fluoresce fortement en s'intercalant de façon non spécifique entre les nucléotides au niveau de l'ADN double brin. En revanche à l'état libre il ne présente qu'une faible fluorescence. Grâce à cette technologie, une courbe de fusion peut être générée à la fin de l'amplification afin de s'assurer de la spécificité de la réaction .

❖ Contrôle interne

Afin de valider les étapes d'extraction et d'amplification de l'ADN, un contrôle interne a été intégré à la méthode ((Lip4) *Yarrowia lipolytica*).

4. Réactifs et produits

Tous les consommables plastiques doivent être autoclavés au préalable afin de détruire les DNAses (désoxyribonucléases), ainsi que les solutions de tampon Tris-HCl, TE (Tris EDTA, acide éthylène diamine tétra acétique), l'acétate d'ammonium et l'eau ultrapure (18 MΩ). Toutes les solutions aqueuses sont préparées dans l'eau ultrapure (18 MΩ). Certaines solutions sont stérilisées à l'autoclave (indiqué par "autoclavé"). Pour les solutions qui ne sont pas autoclavées, on utilise si possible de l'eau ultrapure (18 MΩ) stérile pour leur préparation. Il n'est pas nécessaire ensuite de travailler en conditions de stérilité.

- **PVPP** (par exemple : ISP Polyclar Super R ou Sigma P6755-100G),
- **solutions à température ambiante** : tampon Tris-HCl 10mM pH8, solution I (Tris-HCl 10 mM pH8, EDTA 1 mM, NaCl 100mM, SDS 1% (Sodium dodécyl sulfate), Triton X-100 2%), TE (Tris-HCl 10 mM pH8, EDTA 1 mM) autoclavé, acétate d'ammonium 4M, éthanol absolu,

- prévoir **un flacon d'eau ultrapure (18 MΩ) stérilisée** (20mL) autoclavé à chaque plaque qPCR,
- **solutions à 4°C** : phénol saturé pH8:chloroforme :IAA (alcool isoamylique : 24 :25 :1) et RNase (Ribonucléase) 1µg/µL
- **suspension à** –20°C : contrôle interne, SYBR Green (par exemple mix iQ SYBR Green supermix, Bio-Rad 170-8884), amorces 4µM Brett rad3, Brett rad4, YAL-F et YAL-R chacune.
- **bain-sec à 37°C**.

Toutes les étapes de manipulation où le phénol est présent doivent être réalisées sous la hotte avec des gants. Les résidus contaminés au phénol sont récupérés dans les containers appropriés.

Produits Chimiques PCR	**Spécifications**	*Numéro CAS*
4.1. acétate d'ammonium	≥ 98%	631-61-8
4.2. phénol:chloroforme:IAA 24:25:1	Ultra	136112-00-0
4.3. protéinase K	1215U/mg protéines (16,6 ng/mL)	39450-01-6
4.4. SDS	≥ 99% Ultra	151-21-3
4.5. Tris base	≥ 99,8% Ultra	77-86-1
4.6. BSA	Molecular biology grade	9048-46-8
4.7. phénol saturé pH 8		108-95-2
4.8. PVPP 360kDa		9003-39-8
4.9. RNase A	70U/mg en solution	9001-99-4
4.10. TE pH8	Ultra	Tris : 77-86-1

		EDTA : 60-00-4
4.11. amorces 25nmol		-

5. Appareillage

- **Consommables plastiques** : microtubes à vis 2mL, microtubes 1,5 et 1,7mL, embouts de pipettes blancs (10 µL), jaunes (200 µL) et bleus (1000 µL) pour micropipettes P20, P200, P1000, P5000, microplaques PCR 96 puits et film optique, gants non poudrés
- **Billes de verre** (Ø 500µm),
- **Flacon** (20mL) autoclavé (pour eau **ultrapure [18 MΩ]** stérilisée à chaque plaque qPCR),
- **Tubes à centrifuger** 15 et 50 mL.
- **Matériel** :

pipettes automatiques (P20, P200, P1000, P5000)
centrifugeuse à microtubes
agitateur automatique pour casser les cellules (par exemple GénieDisruptor)
Thermocycleur couplé à un spectrofluorimètre (système optique de détection de la fluorescence générée lors des réactions de PCR en temps réel)
Agitateur magnétique
Chronomètre
bain-sec à 37°C
autoclave
Fioles jaugées 100 mL
Fioles jaugées 50 mL
Fioles jaugées 10 mL
Béchers 100 mL
Béchers 50 mL
Béchers 10 mL
Barreaux aimantés

6. Echantillonnage (Préparation de l'échantillon)

6.1 Dénombrement échantillons :

Les échantillons sont prélevés soit directement dans les bouteilles à analyser, soit dans des flacons de prélèvements au préalable stérilisés

Aucune interférence de la méthode n'a été observée avec les levures testées (dont K1 et L2056) lorsque les populations de levures sont inférieures ou égales à 5.10^6UFC/mL (Unités formant colonies). Pas de données au delà, donc éviter les mesures sur vins en cours de FA.

NB : Lorsque le dénombrement des levures est réalisé par des méthodes d'analyse relevant de la microbiologie classique (croissance sur milieu gélosé nutritif, densité optique), les résultats sont exprimés en UFC/mL (unité formant colonie). *A contrario*, le dénombrement résultant de l'analyse par qPCR est exprimé en UG/mL (unité génétique)

6.2 Préparation du contrôle interne :

Culture *Yarrowia* en YPD (Yeast peptone dextrose) liquide à 28 °C jusqu'à une DO_{600} (Densité optique à 600 nm) de 1 (environ 48h).

Après estimation de la DO_{600nm} faire une dilution à $1,0.10^6$ UFC/mL dans de l'eau physiologique ($1DO = 1,0.10^7$ UFC/mL).

Prélever 110µL de la culture à $1,0.10^6$ UFC/mL dans un microtube de 1,7mL et ajouter 110µL de glycérol à 40% pour obtenir une population à $5,0.10^5$UFC/mL. Mélanger et conserver à -80°C. Un tube permet de traiter 5 échantillons de vin.

Réaliser une numération en parallèle afin de vérifier le titre de la suspension.

6.3 Préparation des solutions :

100mL de Tris-HCl pH8 10mM : peser 0,121 g de tris base (par exemple : Trizma base et dissoudre dans 80mL d'eau ultrapure (18 MΩ). Ajuster le pH avec de l'HCl. Ajuster le volume à 100mL. Autoclaver.

100mL TE : peser 0,121 g de tris base et dissoudre dans 80mL d'eau. Ajuster le pH avec de l'HCl. Ajouter 37,2 mg d'EDTA. Ajuster le pH à 8 (favorise la dissolution de l'EDTA) puis le volume à 100mL. Autoclaver.

100mL solution I : préparer 50mL de TE 2x et ajouter 10mL de NACl 1M, 10mL de SDS 10% (à dissoudre en chauffant légèrement) et 2g de Triton X100, puis ajuster le volume.

Acétate d'ammonium 4M : dissoudre 15,4 g d'acétate d'ammonium qsp (quantité suffisante pour) 50mL eau ultrapure (18 MΩ).

100mL phénol :chloroforme :IAA (25 :24 :1) : à partir de 50mL de phénol saturé avec du tampon TE pH8, ajouter 48mL de chloroforme et 2mL d'alcool isoamylique.Conserver à 4°C.

RNAse A 1µg/µL : diluer la RNase A 70U/mg en solution (par exemple :Sigma, R4642-50MG, stockée à –20°C) avec de l'eau ultrapure (18 MΩ). La concentration de la RNase stock est indiquée sur le tube et la feuille de spécifications du lot. La solution diluée est à conserver à 4°C maximum 3 semaines.

Amorces Brett 4µM : à partir des solutions stocks d'amorces (tubes fournisseurs) à 100µM, faire un mélange 4µM Brett rad3 (GTTCACACAATCCCCTCGATCAAC) et 4µM Brett rad4 (TGCCAACTGCCGAATGTTCTC) qsp 1mL avec de l'eau ultrapure [18 MΩ]. Conservation 1 an à –20°C.

Amorces YAL 4µM : à partir des solutions stocks d'amorces (tubes fournisseurs) à 100µM, faire un mélange 4µM YAL-F (ACGCATCTGATCCCTACCAAGG) et 4µM YAL-R (CATCCTGTCGCTCTTCCAGGTT) qsp 1mL avec de l' eau ultrapure [18 MΩ]). Conservation 1 an à –20°C.

7. Mode opératoire

Échantillon à analyser : agiter le flacon ou la bouteille de façon à homogénéiser son contenu.

Cas d'une bouteille bouchée : désinfecter le col de la bouteille à l'alcool à 70% et déboucher à la flamme, au moyen d'un tire-bouchon désinfecté à l'alcool à 70%.

Transvaser un échantillon de vin de 15-20mL dans un flacon stérile en matière plastique à usage unique de 30 mL.

Les étapes auxquelles le protocole peut être interrompu sont signalées par * (durée d'interruption max, T°).

7.1. Séparation des cellules

Cette étape doit être réalisée en double, **et les manipulations doivent être réalisées sous une hotte dédiée et confinée prévue à cet effet.**

- prélever **1mL de vin** dans un microtube à vis 2mL
- ajouter 20µL du contrôle interne à $5{,}0.10^5$ UFC/mL
- centrifuger **30s (secondes) à 9300 *g***
- éliminer le surnageant par retournement délicat
- reprendre le culot dans **1mL** de **Tris-HCl 10mM pH8**

- centrifuger **30s à 9300 *g*** et éliminer le surnageant.
- Agiter au vortex brièvement afin de suspendre le culot dans le liquide résiduel *** (3 mois, -20°C)**.

Un tube est utilisé pour l'extraction de l'ADN et l'autre conservé à –20°C jusqu'à obtention de résultats validés.

7.2. Extraction de l'ADN

A partir d'un culot frais ou congelé. Au maximum traiter 24 échantillons en parallèle.

- ajouter **PVPP** (1% final m/v)
- ajouter 0,3g de **billes de verre 200-500µm**
- ajouter **200µL de solution I**
- ajouter **200µL** de **phénol :chloroforme :IAA** (24 :25 :1)
- casser les cellules à l'agitateur automatique (par exemple **GénieDisruptor) 4x80s** avec passage au froid (bloc réfrigéré -20°C) 80s environ entre chaque casse
- additionner **200µL de TE**
- centrifuger **5min (minutes) à 15700 *g***.
- récupérer **délicatement** 400µL de la phase aqueuse supérieure dans un microtube 1,7mL. **En cas de mélange des deux phases, réitérer l'étape de centrifugation**.
- ajouter **1mL éthanol** absolu et mélanger le tube par inversion 4-5 fois *** (qqs heures, T° ambiante)**
- centrifuger **5min à 15700 *g*** et éliminer le surnageant par retournement
- reprendre le culot dans **400µL TE et 30µL de Rnase à 1µg/µL**
- incuber la solution à **37°C pendant 5min (modifier ensuite le réglage à 48°C)**
- ajouter **10µL acétate d'ammonium 4M** + **1mL éthanol** absolu ; mélanger par inversion
- centrifuger **5min à 15700 *g***
- Eliminer le surnageant par retournement, les dernières gouttes sont absorbées sur du papier filtre
- sécher le culot (tube ouvert dans le bain-sec à 48°C, 1 heure environ)
- ajouter au culot 25µL TE, agiter au vortex et mettre à 4°C entre 1 et 18h (favorise la solubilisation de l'ADN). Homogénéiser à l'agitateur automatique *** (qqs semaines, -20°C)**

7.3. qPCR

Pour chaque échantillon de vin, prévoir 2 puits avec les amorces Brett rad3/4 et 2 puits de contrôle interne avec les amorces YAL. Pour chaque plaque, prévoir un contrôle négatif avec du TE pour chaque couple d'amorces à réaliser en dernier. Faire aussi un contrôle positif avec l'ADN de *Brettanomyces bruxellensis* disponible à -20°C. Pour préparer le contrôle positif, ajouter 5 µL de solution mère (4,5 UG/mL) dans un volume de réaction final de 25 µL.

Programme d'amplification PCR :

Nombre de cycle	**Temps (sec)**	**Température (°C)**
1	**180**	**95**
40	**30**	**95**
	10	**64,6**
La courbe de fusion est déterminée à partir de 90°C en diminuant de 0,5°C toutes les 10 secondes		

nb puits Brett = nb puits YAL = 2 x nb échantillons + 2

La table ci-dessous indique selon le nombre d'échantillons, le nombre de puits et la quantité de chaque composant du mélange.

nombre d' échantillons	nombre de puits	eau à 18 MΩ (µL)	iQ SYBR Green supermix (µL)	mélange amorces 4µM
1	4	26,3	65,6	13,1
2	6	36,8	91,9	18,4
3	8	47,3	118,1	23,6
4	10	57,8	144,4	28,9
5	12	68,3	170,6	34,1
6	14	78,8	196,9	39,4
7	16	89,3	223,1	44,6
8	18	99,8	249,4	49,9
9	20	110,3	275,6	55,1
10	22	120,8	301,9	60,4
11	24	131,3	328,1	65,6
12	26	141,8	354,4	70,9
13	28	152,3	380,6	76,1
14	30	162,8	406,9	81,4
15	32	173,3	433,1	86,6
16	34	183,8	459,4	91,9
17	36	194,3	485,6	97,1

18	38	204,8	511,9	102,4
19	40	215,3	538,1	107,6
20	42	225,8	564,4	112,9
21	44	236,3	590,6	118,1
22	46	246,8	616,9	123,4
23	48	257,3	643,1	128,6

- sortir les amorces Brett 4µM et les amorces YAL 4µM du congélateur
- sortir le SYBR Green (4°C si tube en cours, sinon –20°C)
- préparer un mélange Brett et un mélange YAL avec la table ci-dessous selon le nombre d'échantillons.
- déposer au fond de chaque puits 20µL de mélange
- ajouter 5µL de solution d'ADN homogénéisée à l'agitateur automatique ou 5 µLd'eau pour les contrôles négatifs
- ajuster le film optique et charger la plaque

7.4. Lecture des résultats

- sortir la plaque et la mettre directement dans le sac pour destruction **(ne pas l'ouvrir)**
- fixer la ligne de base à 100.

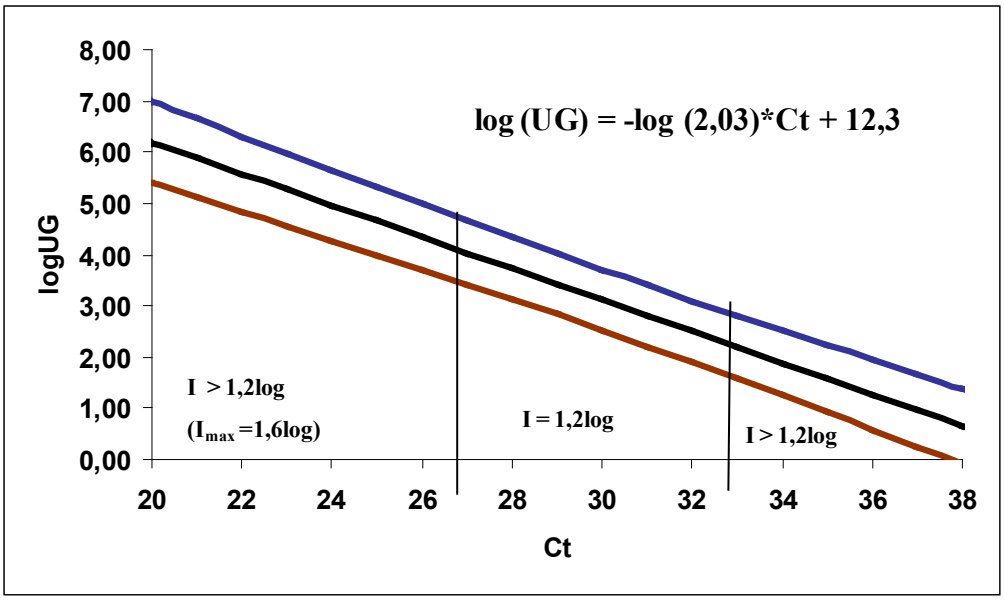
- analyser dans l'ordre :
    - les témoins négatifs qui ne doivent pas donner de signal. Si un Ct est observé avec une valeur inférieure à 37, recommencer la manipulation en changeant toutes les solutions
    - le contrôle positif Brett: son Ct doit être voisin de 25 avec une température de fusion de 82,5°C (± 0,5°C),
    - les contrôles internes YAL : si un Ct est obtenu, vérifier la température de fusion du produit (84°C ± 0,5°C). Dans les cas non conformes, l'absence de signal Brett ne peut être interprétée.,
    - les échantillons : vérifier le Tm du produit *Brettanomyces bruxellensis* (82°C ± 0,5°C). Si et seulement si le Tm est acceptable, vérifier l'allure exponentielle de l'amplification. Relever alors les valeurs de Ct pour les reporter sur la droite d'étalonnage.

NB : le Ct représente le temps nécessaire pour que la fluorescence de la séquence cible atteigne une valeur seuil. Il s'agit par conséquent le nombre de cycle PCR minimum pour que le signal fluorescent sorte du bruit de fond.

8. Calculs (Résultats)

Cinq souches *Brettanomyces bruxellensis* ont été inoculées à différentes concentrations allant de $3{,}1.10^5$ à 3 UFC/mL sur 14 vins (3 vins blancs, 2 vins rosés, 9 vins rouges dont les teneurs en composés phénoliques s'étendent sur une large gamme). L'ADN a ensuite été extrait en présence de PVPP 1%.
Une droite étalon a été établie à partir des résultats obtenus sur les différentes combinaisons de vins et de souches.

Les résultats sont obtenus en UG/mL (unité génétique/mL) à partir de la droite d'étalonnage
$\log UG = -\log(2{,}03) \times Ct + 12{,}34$



9. Caractéristiques de la méthode : paramètres de validation intralaboratoires

9.1. Linéarité, répétabilité et reproductibilité [4]

La courbe d'étalonnage en six points a été réalisée sur l'intervalle 0 à $2x10^5$ UFC/mL de la souche L0211 dans un vin, avec quatre réplicats. Cet intervalle de populations a été choisi d'après les niveaux habituels de *Brettanomyces bruxellensis* dans le vin. Le rapport log UG mesuré / log UG théorique a été établi à l'aide d'une analyse de régression simple. Les paramètres de régression, la pente et l'ordonnée à l'origine ont été déterminés comme indiqué dans le Tableau ci-dessous. Le modèle de régression a été accepté avec un risque α= 1 % et le domaine de linéarité choisi a été validé, aucune erreur de modèle n'ayant été constatée.
La fidélité de la méthode a été comparée à celle de la méthode de culture classique. Trois opérateurs ont préparé de l'ADN extrait d'un vin inoculé par la souche L0211 à deux niveaux de population : $1,9x10^4$ (élevé) ou $1,9x10^2$ (faible) UFC/mL. Quatre mesures par PCR ont été réalisées pour chaque ADN extrait. Les écarts-types pour la répétabilité et la reproductibilité, respectivement Sr et SR, ont été calculés d'après les valeurs de log UG pour les deux niveaux (tableau ci-dessous). Pour la méthode qPCR, Sr et SR étaient similaires pour le niveau bas, mais SR était supérieur à Sr pour les niveaux de population élevés. Les deux écarts-types ont été deux fois supérieurs à ceux obtenus avec la méthode microbiologique classique. Cet effet a été attribué à l'augmentation du nombre d'étapes pour la méthode qPCR.

Tableau : Paramètres de validation de la méthode qPCR pour la numération des *Brettanomyces* dans les vins

Paramètre	Valeurs
Equation de régression	
Intervalle (UFC/mL)	$0\text{-}2x10^5$
Pente (±ÉT)	0,957 (0,044)
Ordonnée à l'origine (±ÉT)	-0,049 (0,142)
Modèle de régression	$F_{obs}>F(1,18)$: modèle linéaire accepté
Erreur de modèle	$F_{obs}<F(4,18)$: aucune erreur de modèle
Fidélité	
S_r qPCR (bas/élevé)	0,26/0,25
S_r microbio (bas/élevé)	0,17/0,04
S_R qPCR (bas/élevé)	0,29/0,41
S_R microbio (bas/élevé)	0,17/0,04

Justesse	
Moyenne 43 échantillons (D)	2,39 (qPCR)/2,25 (microbio)
S_R D	1,18
Test d'égalité W=D/S_R D	0,11<3 justesse acceptable

9.2. Limite de détection (LD) et limite de quantification (LQ) [4]

LD et LQ indiquent la sensibilité de la méthode. LD est la plus basse population détectée par la méthode ; LQ est la population minimale qui peut être quantifiée avec précision. Dans l'analyse des produits alimentaires, ces paramètres sont calculés d'après les résultats antérieurs. Or, pour la qPCR, il n'existe pas de tels résultats. Nous avons donc utilisé les autres méthodes pour évaluer LD et LQ. La première méthode utilise la pente, l'ordonnée à l'origine et l'erreur type sur l'ordonnée à l'origine obtenues lors des essais de validation de la linéarité. Avec cette méthode, des valeurs de LD et LQ de 3 et 31 UG/mL respectivement ont été obtenues. Avec la deuxième méthode, la LD a été obtenue d'après le niveau de population donnant un résultat négatif pour 10 mesures indépendantes. L'analyse de nos données obtenues sur 14 vins inoculés par cinq souches a montré que 96 % des échantillons (48/50) contenant 101 à 250 UFC/mL conduisaient à des signaux positifs, tandis que 83 % (49/59) étaient positifs s'ils contenaient 26 à 100 UFC/mL et 65 % (44/68) pour un niveau de population de 5 à 25 UFC/mL. Par conséquent, la limite de détection évaluée avec cette méthode serait comprise dans l'intervalle 26-100 UFC/mL. Par répétition systématique du test PCR, une LD de 5 UFC/mL a été certifiée à l'aide de calculs de probabilités $(1-p)^2$. En effet, pour 5 UFC/mL, 88 % des échantillons ont été positifs. Ce pourcentage a atteint 97 % pour 25 UFC/mL.

10. Bibliographie

1. Phister T.G., Mills D.A., 2003. Real-time PCR assay for detection and enumeration of *Dekkera bruxellensis* in wine. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 7430-7434.
2. Cocolin L., Rantsiou K., Iacumin L., Zironi R., Comi G., 2003. Molecular detection and identification of *Brettanomyces*/*Dekkera bruxellensis* *Brettanomyces*/*Dekkera anomalus* in spoiled wines. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 1347-1355.

3. Ibeas J.I., Lozano I., Perdigones F., Jimenez J., 1996. Detection of *Dekkera-Brettanomyces* strains in sherry by a nested PCR method. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 998-1003.
4. Tessonnière H., Vidal S., Barnavon L., Alexandre H., Remize F., 2009. Design and performance testing of a real-time PCR assay for sensitive and reliable direct quantification of *Brettanomyces* in wine. *International Journal of Food Microbiology*, 129: 237-243.

Méthode OIV-MA-AS4-04 **Méthode de type IV**

Comptage des cellules de levures par cytométrie en flux dans les moûts de raisin et les vins

(OIV-OENO 713A-2025)

1. Domaine d'application

Méthode visant à quantifier les cellules de levures viables, stressées (membranes perméables) et mortes.

Cette méthode qui utilise une technique de double marquage ne permet pas la quantification des cellules viables métaboliquement inactives (membranes imperméables).

Cette méthode est applicable aux vins, aux moûts, aux moûts en fermentation alcoolique et à la prise de mousse.

Les limites de quantification dépendent de la performance de l'appareillage utilisé et de la méthode de préparation de l'échantillon.

2. Définitions

CYTOMÉTRIE EN FLUX : la cytométrie en flux est une technique qui permet une analyse rapide et multiparamétrique de cellules individuelles en solution. Le cytomètre en flux utilise des lasers comme sources lumineuses afin de produire des signaux lumineux de diffraction et de fluorescence qui sont lus par des détecteurs, comme des photodiodes ou des tubes photomultiplicateurs. Ces signaux sont convertis en signaux électroniques qui sont analysés par un ordinateur. Les populations de cellules peuvent être différentiées et/ou caractérisées en fonction des caractéristiques de leur fluorescence ou de leur diffraction lumineuse.

DIFFRACTION À ANGLE FAIBLE (FORWARD SCATTER, FSC) : signal produit par la diffraction de la lumière par la particule (cellule). Par convention, il est enregistré à 180° de la source lumineuse et peut être directement relié à la taille de la particule.

DIFFRACTION LATÉRALE (SIDE SCATTER SSC) : signal produit par la diffraction de la lumière par la particule (cellule). Par convention, il est enregistré à 90° de la source lumineuse et peut être directement relié à la complexité de la structure de la particule.

CANAUX DE FLUORESCENCE (FLx) : signaux produits par l'émission d'une fluorescence due aux fluorochromes associés aux particules au moyen de couleurs adéquates. Les différentes longueurs d'onde d'émission sont séparées par

l'intermédiaire de filtres optiques et, par convention, numérotées successivement (FL1, FL2, etc.).

COMPENSATION : processus de correction requis du fait du débordement spectral de fluorescence, consistant en la soustraction du signal de tout fluorochrome donné de tous les détecteurs à exception de celui consacré à la mesure de cette coloration. La compensation est typiquement appliquée aux canaux FL2 ou FL3, afin de soustraire la contribution du fluorochrome qui présente le pic maximal d'émission dans le canal FL1.

COMPTAGE VOLUMÉTRIQUE : mesure du nombre d'événements (cellules) dans un volume d'échantillon donné, habituellement mesuré par deux électrodes placées à différents niveaux dans la cuvette de l'échantillon. Des solutions alternatives peuvent être utilisées, par ex. une pompe volumétrique.

ÉVÈNEMENT : Un évènement est défini comme la détection d'une particule individuelle passant au travers du ou des faisceaux lasers de l'appareil. Chaque évènement correspond à une série de mesures de différentes propriétés optiques et physiques de cette particule. Il revient aux opérateurs de démontrer qu'un évènement peut être associé à une cellule individuelle en vérifiant l'absence de cellules regroupées (doublets, triplets, etc.).

3. Principe

Une suspension cellulaire, obtenue à partir d'une dilution décimale appropriée de l'échantillon, est analysée par cytométrie en flux en mode volumétrique, après marquage avec des colorants fluorescents permettant de différencier les cellules présentant une activité enzymatique (vivantes) et les cellules ayant une membrane cytoplasmique altérée (mortes). Dans certains cas, il est également possible d'identifier une 3ème sous-population de cellules présentant une activité métabolique, mais avec une altération de la perméabilité de la membrane cellulaire. Cette sous-population est généralement considérée comme formée de cellules stressées, mais viables.

La présente méthode est une méthode générique utilisant un laser bleu unique et deux fluorochromes. Il est également possible d'utiliser des méthodes plus sophistiquées employant des cytomètres dotés de lasers multiples et un marquage multiple.

Deux types de fluorochromes sont utilisés dans la présente méthode :

- Iodure de propidium (IP) : il s'agit d'un agent intercalant des acides nucléiques (ADN ou ARN). Il ne pénètre que dans les cellules dont la membrane plasmique est perméable. Il est considéré que ces dernières correspondent essentiellement à des cellules mortes, ou à des cellules soumises à un stress membranaire (sous l'effet de l'éthanol, par exemple). Leur pic d'excitation se situe entre 520 nm et 550 nm, avec une

fluorescence maximale émise entre 610 nm et 630 nm. Les cellules marquées IP(−) sont donc considérées comme viables, et les cellules IP(+) comme mortes ou présentant une membrane plasmique perméable.

- Diacétate de 5(6)-carboxyfluorescéine (CFDA) : il s'agit d'un substrat estérase pouvant pénétrer dans la cellule et qui agit comme indicateur d'activité métabolique (estérase). Au cours de l'hydrolyse provoquée par les estérases intracellulaires, cet ester d'acétoxyméthyle produit de la caroboxyfluorescéine, dont le pic d'excitation se situe à 498 nm, avec une fluorescence maximale émise à 516 nm. Son spectre d'émission s'étend jusqu'à 650 nm, ce qui peut amener à nécessiter une compensation sur d'autres canaux (FL2). Les cellules marquées CFDA(+) sont donc considérées comme métaboliquement (estérase) actives, et les cellules CFDA(−) comme métaboliquement inactives.

Tableau 1. Résumé des interprétations basées sur les réponses du fluorochrome

Quadrant	**IP(−)**	**IP(+)**
CFDA(−)	Non interprétable dans cette méthode	Mortes
CFDA(+)	Viables et actives	Cellules actives présentant une membrane plasmique altérée perméable à l'IP (cellules stressées)

Remarque 1 : Une population de cellules est définie IP(−), reflétant une intégrité membranaire, et CFDA(−), reflétant une activité métabolique non détectable.

Remarque 2 : Dans cette méthode, les cellules ne sont pas dissociées d'un éventuel bruit de fond. Le quadrant IP(−), CFDA(−) est donc non interprétable.

4. Réactifs et matériel

Verrerie de laboratoire courante, cuvettes pour cytométrie en flux et liquide d'entraînement, lorsque l'instrument l'exige.

Éprouvettes (16 × 160 mm ou similaires) contenant 9 mL de tampon phosphate salin (PBS) filtré à l'aide d'un filtre d'une porosité 0,2 µm (pH 7,4).

Diacétate de 5(6)-carboxyfluorescéine (en poudre) (CFDA, n° CAS : 124387-19-5).

Iodure de propidium (en poudre) à 95 % (IP ; n° CAS : 25535-16-4).

Diméthylsulfoxyde pure sous forme liquide (DMSO ; n° CAS : 67-68-5).

Culture pure de *S. cerevisiae* (par ex. : souche ATCC 9763) à une concentration nominale de 10^5 cellules/mL.

Solution aqueuse de NaCl à 8,5 g/L, stérilisée par filtration ou autoclave.

Solution de CFDA dans du DMSO ou de l'acétone à 0,1 mg/L.

Solution d'IP dans du DMSO ou en solution aqueuse à 1 mg/L.

Remarque 1 : La dilution des fluorochromes est réalisée dans du DMSO. Il est également possible de la réaliser dans de l'acétone. Il apparaît cependant que le mélange acétone/DMSO produit davantage de bruit de fond sur le cytomètre, et il est donc recommandé de n'utiliser que du DMSO.

5. Appareillage

Cytomètre en flux équipé d'un laser émettant à 488 nm (50 mW) et de paramètres optiques FSC, SSC, FL1 (530 nm), FL2 (630 nm) et FL3 (670 nm).

Agitateur de type Vortex.

Verrerie de laboratoire.

Filtre de laboratoire stérilisant d'une porosité de 0,2 µm (préférablement en acétate de cellulose, qui limite le bruit de fond).

Plaque pour cytométrie en flux.

Micropipettes de 1 mL et 0,2 mL à embouts stériles.

Balance analytique (précision de ± 0,01 g).

Centrifugeuse de laboratoire.

Remarque : Si la stérilité ne s'avère pas essentielle, il est cependant recommandé de maintenir un haut niveau d'hygiène et d'utiliser du matériel et des réactifs stériles.

6. Échantillonnage (préparation de l'échantillon)

Pour les vins et les moûts, se référer à la méthode OIV-MA-AS4-01, « Analyse microbiologique des vins et des moûts : détection, différenciation et dénombrement des microorganismes du *Recueil des méthodes internationales d'analyses des vins et des moûts* (résolution OIV/OENO 206/2010).

Il est recommandé d'homogénéiser l'ensemble de la masse de vin avant de prélever l'échantillon, ainsi que l'échantillon avant analyse, de manière à garantir une dispersion homogène des cellules dans le vin.

7. Mode opératoire

L'analyse par cytométrie en flux étant immédiate (moins de trois minutes avec un appareillage moderne), il existe peu de risques de contamination dus à la manipulation de l'échantillon en dehors de la hotte à flux laminaire ou durant la

lecture cytométrique. Il est cependant recommandé de maintenir un haut niveau d'hygiène et d'utiliser du matériel et des réactifs stériles.

La présente procédure est fournie à titre d'exemple. Des variations peuvent être introduites par le laboratoire. La technique de cytométrie en flux exige d'adapter constamment les dilutions en fonction de l'appareil utilisé ainsi que de la charge microbiologique des produits à analyser.

MISE AU POINT DU CYTOMÈTRE EN FLUX

Mettre sous tension le cytomètre en flux et procéder au nettoyage de l'appareil afin d'éviter des interférences lors de l'analyse. Régler les canaux d'acquisition FSC, SSC, FL1 (acquisition à 530 nm), FL2 (acquisition à 630 nm) et FL3 (acquisition à 670 nm) sur une échelle logarithmique.

Le cytomètre en flux est considéré comme prêt pour l'analyse une fois écartée la présence d'évènements susceptibles d'interférer avec l'acquisition de l'échantillon dans le canal FSC durant la lecture d'un échantillon contenant uniquement du liquide d'entraînement.

Exécuter la lecture d'une culture pure de *S. cerevisiae* en prenant soin de régler les voltages des canaux FSC et SSC, le cas échéant, afin que le pic du signal dans les deux canaux FSC et SSC soit clairement séparé du bruit de fond. Si le cytomètre en flux le permet, il est possible de soustraire la contribution du bruit de fond en agissant sur le seuil du paramètre FSC. Élaborer un graphique par points en intégrant les signaux FSC et SSC et repérer la zone contenant la population de cellules de levures, en l'identifiant avec une fenêtre d'acquisition spécifique (figure 1).

COLORATION DE L'ÉCHANTILLON

Vin ou moût : préparation pour une population de levures > 10^2 cellules/mL

Diluer l'échantillon avec la solution de NaCl entre au 1/10 et au 1/100 (voire davantage) en fonction de la performance de l'appareil utilisé et de la charge microbiologique.

Placer 980 µL d'échantillon dilué dans une cuvette pour cytométrie, conformément aux spécifications de l'appareil.

Procéder au marquage en introduisant, par exemple, 10 µL de solution de CFDA et 10 µL de solution d'IP dans 980 µL de vin dilué ou de moût.

Laisser incuber environ 10 minutes à température ambiante, à l'obscurité.

Au terme de l'incubation, homogénéiser et procéder à la lecture de l'échantillon, après avoir configuré le cytomètre en flux en mode de lecture volumétrique.

Vin ou moût : préparation pour une population de levures < 10^2 cellules/mL (par ex., vin conditionné)

Centrifuger 50 mL d'échantillon à 4500 tr/min pendant 8 minutes environ.

Éliminer le surnageant et collecter le culot de centrifugation.

Placer le culot dans, par exemple, 10 mL de solution de NaCl.

Procéder au marquage en introduisant, par exemple, 10 µL de solution de CFDA et 10 µL de solution d'IP dans 980 µL de culot redilué.

Laisser incuber l'échantillon à température ambiante pendant environ 10 minutes, dans l'obscurité.

Au terme de l'incubation, homogénéiser et procéder à la lecture de l'échantillon, après avoir configuré le cytomètre en flux en mode de lecture volumétrique.

Remarque 1 : La concentration en CFDA dans l'échantillon marqué est de l'ordre de 2 mg/L à 5 mg/L. La concentration en IP dans l'échantillon marqué est de l'ordre de 3 mg/L à 10 mg/L.

Remarque 2 : L'ordre des apports de fluorochromes est sans importance. Ils peuvent être introduits simultanément dans une même solution.

Remarque 3 : Le marquage reste habituellement stable pendant une heure ou plus.

ANALYSE CYTOMÉTRIQUE EN FLUX

Lire l'échantillon en prenant soin de régler les paramètres de l'appareil de manière à ce que la population de levures se trouve dans la fenêtre d'acquisition précédemment identifiée avec la culture pure de *S. cerevisiae*.

Régler les voltages des canaux FL1 et FL2 de manière à mieux séparer le pic d'émission de l'échantillon du bruit de fond (autofluorescence). Afin d'éviter des aberrations dues au spectre d'émission du FDA, que le paramètre FL2 pourrait également intercepter, ajuster adéquatement la compensation de l'appareil afin de soustraire de FL2 la contribution de FL1. Le cas échéant, le canal FL3 pourrait être utilisé au lieu du canal FL2 afin de permettre une meilleure discrimination des signaux de fluorescence liés aux cellules vivantes (FL1) et mortes (FL2 ou FL3). Procéder au comptage volumétrique des cellules présentes dans l'échantillon. Intégrer dans un graphique par points les canaux FL1 et FL2 (ou FL3) pour mieux visualiser la séparation des populations cellulaires (figure 2). Considérer comme cellules vivantes les évènements recueillis dans le canal FL1 et issus de la fenêtre d'acquisition contenant la population de levures, repérée dans le graphique par points des paramètres physiques FSC et SSC. Considérer comme cellules mortes les évènements recueillis dans le canal FL2 (ou FL3) et issus de la fenêtre d'acquisition contenant la population de levures, repérée dans le graphique par points des paramètres physiques FSC et SSC. Considérer comme cellules stressées, mais viables, la population d'évènements qui reste positive sur les deux canaux (FL1 et FL2 ou FL3) après compensation adéquate des signaux.

8. Calculs

Une fois le comptage volumétrique terminé, noter le nombre de cellules vivantes, mortes et endommagées comptées dans l'unité de volume ou de poids, en fonction du volume échantillonné par le cytomètre en flux, en tenant compte des dilutions décimales réalisées. S'agissant d'un comptage cellulaire direct, il est possible d'exprimer le résultat en « cellules/mL » ou « cellules/g » », tout en vérifiant l'absence de doublets ou de triplets.

Bibliographie

1. Longin, C., Petitgonnet, C., Guilloux-Benatier, M., Rousseaux, S. et Alexandre, H, Application of flow cytometry to wine microorganisms, *Food Microbiology*, 2017, vol. 62, p. 221-231. DOI : 10.1016/j.fm.2016.10.023.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), CLSI H62: Validation of Assays Performed by Flow Cytometry, 1ère édition, 2022. ISBN: 978-1-68440-129-1.
3. ISO 7218:2007 amd1:2013, Microbiologie des aliments — Exigences générales et recommandations.
4. Kwolek-Mirek, M., et Zadrag-Tecza, R., Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells, *FEMS Yeast Research*, 2014, vol. 14, p. 1068-1079. DOI : 10.1111-1567-1364.12202.
5. Guzzon, R. et Larcher, R., The application of flow cytometry in microbiological monitoring during winemaking: two case studies, *Annals of Microbiology*, 2015, vol. 65, p. 1865-1878. DOI : 10.1007/s13213-014-1025-6.

Figure 1. Graphique par points FSC/SSC montrant la fenêtre d'acquisition de la population d'événements correspondant aux cellules de S. cerevisiae (YEAST) présentes dans un échantillon à une concentration de 10^5 cellules/mL.

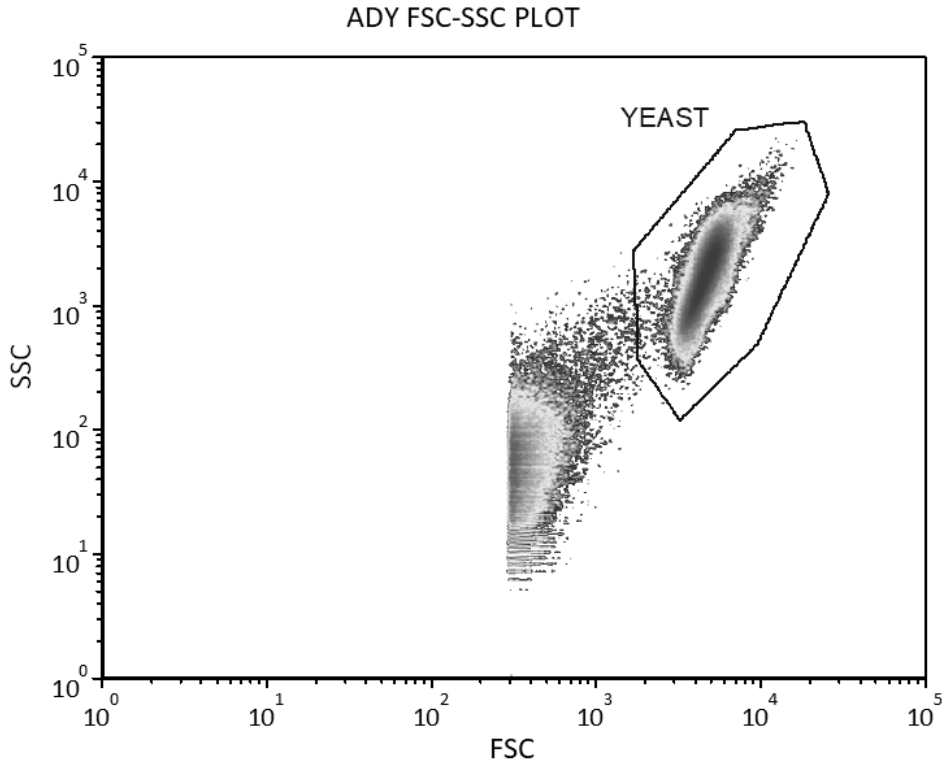
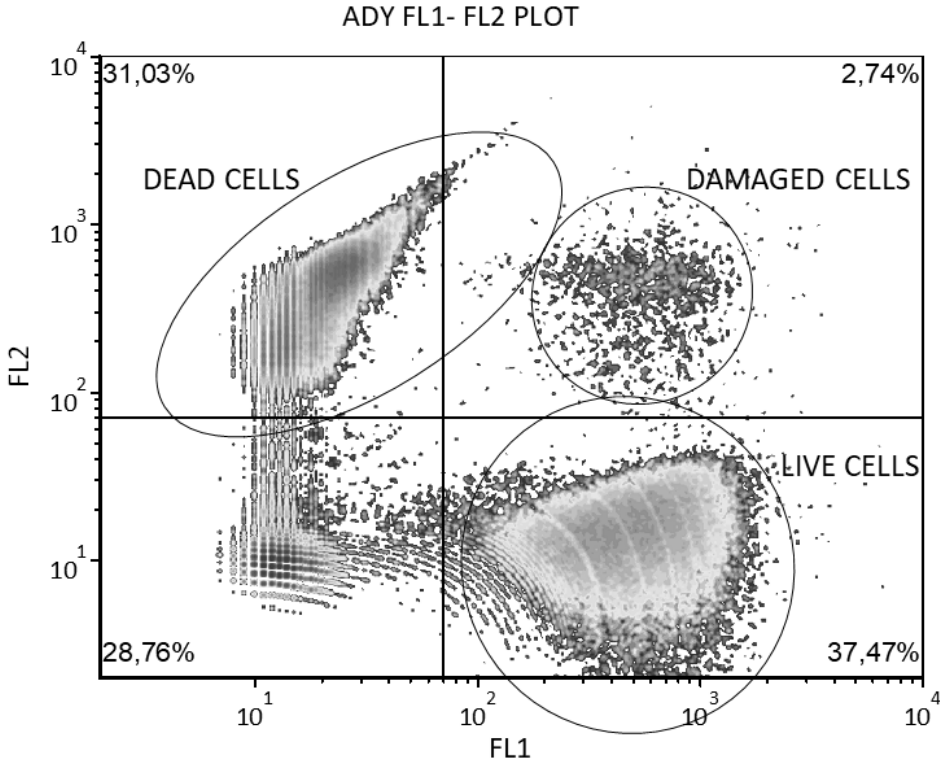


Figure 2. Graphique par points FL1 (530 nm)/FL2 (630 nm) montrant les fenêtres d'acquisition contenant la population d'évènements correspondant aux cellules de S. cerevisiae vivantes (LIVE), mortes (DEAD) et stressées, mais viables (DAMAGED).



Méthode OIV-MA-AS5-01 Méthode Type IV

Différentiation des mistelles des vins de liqueur doux

1. Principe des méthodes

1.1. *Méthode de triage*

La définition donnée par l'O.I.V. (*Code international des pratiques œnologiques*) pour les produits, imposant pour les vins de liqueur 4% vol. au moins d'alcool acquis naturel de fermentation et tolérant pour les mistelles 1% vol. au plus d'alcool acquis, leur différentiation peut être faite par la mise en évidence par la chromatographie en phase gazeuse des substances se formant au cours de la fermentation alcoolique.

Cette méthode n'est applicable que si l'alcool utilisé pour l'élaboration des mistelles est neutre comme le prévoit leur définition.

1.2. *Recherche de l'acide citramalique par chromatographie sur couche mince.*

La présence d'acide citramalique caractérise les vins de liqueur doux. Sa recherche s'effectue par chromatographie sur couche mince après séparation des sucres à l'aide d'une colonne échangeuse d'ions.

2. Méthode de triage

2.1. *Appareillage*

Chromatographe en phase gazeuse avec :
- détecteur à ionisation de flamme,
- colonne inox 3 m, 2 mm de diamètre intérieur,
- phase stationnaire : Carbowax 20 M 20%,
- support: Chromosorb W 60/80 mesh.

Conditions de la chromatographie :
- températures:

injecteur: 210°C
détecteur: 250°C

four isotherme à 70°C pendant 6 min.; puis programmation de 6°C/min.; température limite supérieure: 170°C

D'autres types de colonnes peuvent être utilisés.
Le mode opératoire décrit ci-dessous est donné à titre d'exemple.

2.2. *Mode opératoire*

2.2.1. Préparation de l'échantillon

Procéder à une démixion dans les conditions suivantes : 25 ml d'échantillon (mistelle ou vin de liqueur) sont additionnés de 7 ml d'éthanol et de 15 g de

sulfate d'ammonium, $(NH_4)_2SO_4$, agiter. Laisser reposer pour obtenir la séparation des phases.

2.2.2 *Chromatographie*

Injecter 2 µl de la phase organique et procéder à la chromatographie dans les conditions indiquées ci-dessus.

Le chromatogramme d'un vin de liqueur se différencie par la présence des pics dus aux produits secondaires de la fermentation alcoolique.

3. Recherche de l'acide citramalique par chromatographie en couche mince

3.1 *Appareillage*

3.1.1 Colonne de verre de 300 mm environ de longueur et de 10-11 mm de diamètre intérieur munie d'un régulateur de débit (robinet) :

3.1.2 Évaporateur rotatif sous vide,

3.1.3 Étuve à 100 °C,

3.1.4 Cuve à chromatographie

3.1.5 Seringue micrométrique ou micro-pipette.

3.2 *Réactifs*

3.2.1 Solution d'acide formique 4 M, contenant 150,9 ml d'acide formique (ρ_{20} = 1,227 g/ml) pour un litre.

3.2.2 Plaques pour la chromatographie prêtes à l'emploi avec couche de poudre de cellulose (par exemple MN 300) (20 x 20 cm).

3.2.3 Solvant:

alcool isopropylique contenant 1 g/l de bleu bromophénol	5 vol.
eucalyptol	5 vol.
acide formique (ρ_{20}= 1,227 g/ml)	2 vol.

Saturer le solvant avec de l'eau et laisser au repos pendant 24 h avant emploi.

3.2.4. Solutions étalons.

Préparer des solutions aqueuses :

acide citramalique	0,25 g/l
acide lactique	0,5 g/l
acide citrique	0,5 g/l
acide tartrique	1,0 g/l
acide malique	1,0 g/l

3.3. *Mode opératoire*

3.3.1 Préparation de la colonne d'échangeur d'ions.

Voir chapitre *Acide tartrique*, Méthode usuelle en 3.3.1.

3.3.2 Isolement des acides organiques dont l'acide citramalique

Opérer comme il est indiqué au chapitre *Acide tartrique*, méthode usuelle en 3.3.2. pour la fixation des acides organiques sur l'échangeur d'ions.

Éluer ensuite les acides fixés en utilisant la solution 4 M d'acide formique (100 ml), et en recueillant l'éluat dans un ballon jaugé de 100 ml.

Concentrer cet éluat à sec dans un évaporateur rotatif à 40°C et reprendre le résidu par A ml d'eau distillée.

3.3.3 Chromatographie

La plaque de cellulose doit être activée par passage à l'étuve à 100°C pendant 2 heures.

Déposer sur la ligne de départ sous forme de d'un trait de 2 cm de largeur, 10 µl de cette solution sur la plaque de cellulose ainsi que 10 µl des solutions étalons d'acide citramalique et des autres acides organiques.

Placer la plaque dans la cuve à chromatographie, au-dessus du solvant, pendant 45 minutes.

Procéder au développement et laisser migrer le solvant sur une hauteur de 15 cm.

3.3.4 Révélation du chromatogramme

Maintenir la plaque à la température ordinaire sous un courant d'air, jusqu'à élimination de l'acide formique du solvant. Des taches jaunes apparaissent sur un fond bleu, indiquant la présence des acides.

Détecter la présence ou l'absence d'acide citramalique dans le produit analysé en comparant les spots de son chromatogramme aux spots des solutions étalons d'acide citramalique et des autres acides organiques.

BIBLIOGRAPHIE

Méthode de triage :
HARVALIA A., *F.V., O.I.V.,* 1980, n° 728 bis.

Chromatographie de l'acide citramalique:
DIMOTAKI-KOURAKOU V., *Ann. Fals. Exp. Chim.,* 1960, **53,** 149.
DIMOTAKI-KOURAKOU V., *C. R. Ac. Sci.,* Paris 1962, **254,** 4030.
CARLES J., LAMAZOU-BETBEDER M. & PECH M., *C. R. Ac. Sci.,* Paris 1958, **246,** 2160.
CASTINO M., *Riv. Vit. Enol.,* 1967, **6,** 247.
KOURAKOU V., *F.V., O.I.V.,* 1977, n° 642.
JUNGE Ch *F.V., O.I.V.,* 1978, n° 679.
ROUEN J., *F.V., O.I.V.,* 1979, n° 691.

Annexe B

Modèles de certificats d'analyse

Paramètres analytiques communément utilisés pour les vins et les vins mousseux

(Résolution AG 2/88-OEN ; OIV-OENO 712A-2024)

A. Domaine d'application

Présenter des recommandations pour les certificats d'analyse portant sur certains aspects des vins et des vins spéciaux comme indiqué au point C du présent document.

B. Règles d'application des méthodes d'analyse

Les méthodes d'analyse utilisées pour la détermination des paramètres devront par priorité être :

1. celles adoptées par l'OIV et publiées dans le Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts de l'OIV ;
2. celles adoptées par l'Organisation internationale de normalisation (ISO) ;
3. celles adoptées par d'autres organisations de normalisation.

C. Paramètres analytiques communément utilisés pour les vins et les vins mousseux

Les paramètres analytiques communément utilisés pour les vins et les vins mousseux sont les paramètres analytiques essentiels permettant de garantir de manière satisfaisante que les caractéristiques du produit sont conformes aux définitions et pratiques œnologiques de l'OIV. Ces paramètres peuvent servir de base aux échanges commerciaux.

D'autres paramètres peuvent être utilisés par les États membres en fonction de leurs propres exigences.

D. Paramètres analytiques

Les paramètres analytiques communément utilisés pour les vins et les vins mousseux sont notamment les suivants :

- Densité à 20 °C (g/cm³)
- Titre alcoométrique volumique à 20 °C (% vol.)
- Somme du glucose et du fructose (g/L)

- Dioxyde de soufre total (mg/L)
- Acidité totale (mEq/L) ou (g d'acide tartrique/L) ou (g d'acide sulfurique/L)[13]
- Acidité volatile (mEq/L) ou (g d'acide sulfurique/L) ou (g d'acide acétique/L)[14]
- pH
- Mesure de la surpression du dioxyde de carbone dans les vins mousseux (bar)
- Saccharose dans les vins mousseux et pétillants (g/L)

[13] Comme indiqué dans la méthode OIV-MA-AS313-01 Acidité totale.
[14] 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, comme indiqué dans la méthode OIV-MA-AS313-02 Acidité volatile.

Annexe C

Limites maximales acceptables de divers éléments

Limites maximales acceptables de divers éléments dans le vin

(édition 2023)

Acide citrique :	1 g/l

Acidité volatile :	20 milliéquivalents/l L'acidité volatile de certains vins vieux d'élaboration particulière (vins soumis à une législation particulière et contrôlés par le gouvernement) peut dépasser cette limite.

Argent (145/2009)	0,1 mg/l

Arsenic :	0,2 mg/l

Bore :	80 mg/l (exprimé en acide borique).

Brome :	1 mg/l (limite dépassée exceptionnellement dans des vins provenant de certains vignobles à sous-sol saumâtre).

Cadmium :	0,01 mg/l

Cuivre :	1 mg/l 2mg/l pour les vins de liqueur élaborés à partir de moût de raisin non fermenté ou peu fermenté

Diéthylène glycol :	≤ 10 mg/l, à la limite de quantification

Diglucoside de malvidol :	15 mg/l (déterminé par la méthode quantitative décrite dans le *Recueil*).

Dioxyde de soufre total au moment de la vente au consommateur: (oeno 9/98)	- 0,150 g/l pour les vins rouges contenant au plus 4 g/l de matières réductrices, - 0,200 g/l pour les vins blancs et rosés contenant au plus 4 g/l de matières réductrices, - 0,300 g/l pour les vins rouges, blancs et rosés contenant plus de 4 g/l de matières réductrices, - 0,400 g/l pour certains vins blancs doux spéciaux.

Etanediol/Ethylène glycol	≤ 10 mg/l

Fluor (oeno 8/91)	1 mg/l sauf pour les vins issus de vignobles traités à la cryolithe, conformément à la loi nationale ; dans ce cas, la teneur en fluor ne doit pas être supérieure à 3 mg/l

Méthanol (Oeno 19/2004):	400 mg/l pour les vins rouges 250 mg/l pour les vins blancs et rosés

Ochratoxine A (CST 1/2002):	2 µg/l (pour les vins obtenus à compter de la récolte 2005)

Plomb (oeno 638/19):	0,10 mg/L pour les vins produits à partir de la campagne 2019 0,15 mg/L pour les vins de liqueur produits à partir de la campagne 2019[15]

Propane-1,2- diol / Propylène glycol (oeno 20/2003)	Vins tranquilles: = 150 mg/l. Vins mousseux: = 300 mg/l.

[15] Pour les vins de liqueur sujets à des périodes de vieillissement prolongées, la limite applicable est celle en vigueur à la date de leur élaboration

Sodium excédentaire (Oeno 09/2007)	: 80 mg/l

Sulfates : (exprimés en sulfate de potassium)	1 g/l Toutefois cette limite est portée :	
	- pour les vins ayant fait l'objet d'une période de vieillissement en fûts de 2 ans au moins - pour les vins édulcorés - pour les vins obtenus par adjonction à des moûts ou à des vins d'alcool ou d'eau de vie	à 1,5 g/l
	- pour les vins additionnés de moûts concentrés - pour les vins naturellement doux	à 2 g/l
	- pour les vins obtenus "sous voile"	à 2,5 g/l

Zinc :	5 mg/l

Annexe D

Avis

Acide gluconique

(Résolution OENO 4/91)

AVIS

L'acide gluconique est toujours présent dans les moûts et dans les vins.

Dans les vins, issus d'une vendange saine arrivée à maturité, sa teneur ne dépasse pas 200-300 mg/l.

L'acide gluconique augmente par surmaturation par passerillage et surtout par l'intervention de *Botrytis cinerea*.

Sa présence en quantité élevée dans les vins - mis à part les vins issus de pourriture noble dont elle constitue une caractéristique - ne peut pas être considérée comme un signe de mauvaise qualité liée à la mise en oeuvre d'une vendange atteinte de pourriture grise, ce qui doit être démontré par ailleurs.
En effet, par des techniques appropriées de vinification, il est possible d'obtenir dans ce cas des vins de qualité satisfaisante.

Quant à la fraude par addition d'acide gluconique, elle est sans motif.

Caractérisation des vins issus du surpressurage

(Résolution OENO 5/91)

AVIS

Au vu des résultats et des discussions concernant les essais de CARACTERISATION DES VINS ISSUS DU SURPRESSURAGE, les experts ont constaté que, pour l'ensemble des tests effectués, le comportement des vins est très différent en fonction du cépage, ce qui rend impossible toute interprétation concernant les vins issus de plusieurs cépages.

De plus, doivent être pris en compte les effets des différents modes de pressurage et de techniques de vinification, telle la macération préfermentaire.

Des études doivent être poursuivies pour mettre en évidence les vins issus d'un pressurage excessif et pour rechercher une définition du surpressurage.

Teneur en ions chlorure et en ions sodium des vins

(Résolution OENO 6/91)

AVIS

La teneur en ions Cl^- et en ions Na^+ des vins dépend essentiellement des conditions géographiques, géologiques et climatiques de culture de la vigne.

En règle générale, ces teneurs sont faibles.

Les teneurs en ces éléments s'élèvent dans les vins provenant de vignobles établis au bord de la mer, à sous-sols saumâtre, sur des terres arides avec irrigation avec des eaux salines et le rapport molaire Cl^-/Na^+ varie alors de manière importante et peut même prendre une valeur proche de 1 faisant penser à l'adjonction de sel (Na Cl) au vin.

Lorsque le vin contient du sodium excédentaire (sodium excédentaire égal à la teneur en ions sodium moins la teneur en ions chlorures exprimées en sodium), il est en règle générale inférieur à 60 mg/l, limite qui peut être exceptionnellement dépassée.

Les laboratoires et les services officiels de contrôle, devant des teneurs élevées en Cl^- et/ou Na^+, doivent prendre en compte les conclusions ci-dessus et éventuellement s'informer auprès des services officiels du pays d'origine avant d'éliminer ces vins.

Extrait sec
(Extrait sec total, extrait sec sans sucre ou extrait résiduel)

(OIV-CST 668-2022)

Extrait sec (extrait sec total aussi appelé matière sèche totale, extrait sec sans sucre aussi appelé extrait non réducteur, extrait résiduel)

L'extrait sec comprend toutes les matières non volatiles lorsqu'elles sont mesurées dans des conditions physiques spécifiées. Ces conditions physiques doivent être telles que la matière constituant l'extrait sec subisse le moins d'altération possible pendant la réalisation de l'analyse.

L'extrait sec total, l'extrait sec sans sucre et l'extrait résiduel sont définis et mesurés comme décrit dans le *Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts* de l'OIV dans les méthodes OIV-MA-AS2-03A et OIV-MA-AS2-03B.

La valeur obtenue pour l'extrait sec dépend uniquement de la mesure physique de composants non volatils des moûts et des vins (sucres, acides, minéraux…) qui varie d'une vendange à l'autre, d'un lieu de récolte à l'autre et peut être impacté par des conditions météorologiques saisonnières et régionales et les pratiques d'irrigation, et est également influencée par les processus de vinification, y compris l'utilisation d'additifs autorisés.

Il n'est donc pas possible d'établir des valeurs de référence fixes qui permettent la détection ou la confirmation de certaines fraudes du vin par la seule mesure de l'extrait sec total, matières sèches totales, de l'extrait sec sans sucre ou de l'extrait résiduel, alors qu'il peut être utilisé en association avec d'autres paramètres pour évaluer une éventuelle fraude.

L'OIV déclare que la seule mesure de l'extrait sec total, de la matière sèche totale, de l'extrait sec sans sucre ou de l'extrait résiduel n'est pas suffisante pour la détection d'éventuelles fraudes.

Annexe E

Assurance qualité dans les laboratoires

Principe de validation des méthodes usuelles par rapport aux méthodes de référence

Résolution OENO 7/98

L'OIV reconnaît l'existence, à côté des méthodes d'analyse des vins décrites dans le Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts, de méthodes usuelles le plus souvent automatisées. Ces méthodes sont économiquement et commercialement importantes car elles permettent d'assurer un encadrement analytique complet et efficace autour de la production et de la mise en marché des vins. Par ailleurs, ces méthodes permettent la mise en oeuvre des moyens modernes d'analyse et le développement et l'adaptation des techniques d'analyse.

Afin de permettre aux laboratoires d'utiliser ces méthodes et d'assurer leur raccordement aux méthodes décrites dans le Recueil, l'OIV décide la mise en place d'un protocole d'évaluation et de validation par un laboratoire d'une méthode usuelle alternative, automatisée ou non par rapport à une méthode référentielle décrite dans le Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts.

Ce principe, qui sera adapté au cas particulier de l'analyse des vins et des moûts s'inspirera des normes internationales en vigueur et permettra au laboratoire d'évaluer et de valider sa méthode alternative.

Étude collaborative

L'étude collaborative a pour but de donner une indication quantitative sur *l'exactitude* d'une méthode d'analyse, exprimée par la répétabilité *r* et la reproductibilité R.

La ***répétabilité*** représente la valeur au-dessous de laquelle est située, avec une probabilité spécifiée, la valeur absolue de la différence de deux résultats individuels obtenus à partir de mesures effectuées dans les mêmes conditions (même opérateur, même appareil, même laboratoire, et un court intervalle de temps).

La ***reproductibilité*** représente la valeur au-dessous de laquelle est située, avec une probabilité spécifiée, la valeur absolue de la différence de deux résultats individuels obtenus dans des conditions différentes (opérateurs différents, appareillages différents, et/ou laboratoires différents, et/ou époques différentes).

Le terme "résultat individuel" est la valeur obtenue lorsqu'on applique, une fois et complètement, la méthode d'essai normalisée sur un seul échantillon. En l'absence d'indication, la probabilité est de 95%.

Principes généraux

- La méthode soumise à l'essai doit être *normalisée*, c'est-à-dire choisie parmi les méthodes existantes comme convenant le mieux pour être appliquée ultérieurement de façon générale.
- Le protocole doit être clair et précis.
- Le nombre des laboratoires participant doit être de 10 au moins.
- Les essais doivent être effectués sur des lots prélevés dans un lot homogène du matériau.
- Les teneurs en substance à analyser doivent couvrir les concentrations généralement rencontrées.
- Les participants doivent avoir une bonne expérience de la technique employée.
- Toutes les expériences doivent être effectuées à l'intérieur d'un même laboratoire par le même analyste.
- La méthode doit être suivie de façon aussi rigoureuse que possible. Toute déviation de la méthode décrite doit être indiquée.
- Les valeurs expérimentales doivent être déterminées dans des conditions strictement identiques : sur le même type d'appareil, etc.
- Elles doivent être déterminées indépendamment les unes des autres, l'une immédiatement après l'autre.
- Les résultats doivent être exprimés par tous les laboratoires avec la même unité, le même nombre de chiffre après la virgule, à savoir un chiffre de plus qu'à l'ordinaire.

- Il faut déterminer cinq valeurs expérimentales exemptes de valeurs aberrantes. S'il y a une valeur expérimentale aberrante selon le test de Grubbs, il faut refaire trois mesures supplémentaires.

Modèle statistique

Les méthodes statistiques exposées dans ce document sont données pour un niveau (concentration, échantillon). S'il y a différents niveaux, l'évaluation statistique doit se faire séparément pour chaque niveau.

Si l'on trouve une relation linéaire ($y = bx$ or $y = a + bx$) entre la répétabilité (r) ou la reproductibilité (R) et la concentration ($\bar{\bar{x}}$), une régression de r (ou R) en fonction de $\bar{\bar{x}}$ peut être effectuée.

Les méthodes statistiques données ci-dessous présupposent des valeurs aléatoires normalement distribuées.

Les étapes à suivre sont les suivantes :

A/ Élimination des valeurs aberrantes au sein d'un même laboratoire par le test de Grubbs. Les valeurs aberrantes sont celles qui s'écartent si fortement des autres valeurs expérimentales que ces écarts ne peuvent être considérés comme fortuits et que les causes de ces écarts ne peuvent être déterminées.

B/ Examiner si tous les laboratoires travaillent avec la même précision en effectuant une comparaison des variances par le test de Bartlett et le test de Cochran. Éliminer les laboratoires pour lesquels on obtient des valeurs statistiquement aberrantes.

C/ Dépister les erreurs systématiques des laboratoires restants par une analyse de variance et préciser par le test de Dixon les valeurs extrêmes aberrantes. Éliminer les laboratoires pour lesquels on obtient des valeurs statistiquement aberrantes.

D/ A partir des résultats restants, calculer l'écart-type de répétabilité s_r et la répétabilité r, l'écart-type de reproductibilité S_R et la reproductibilité R.

Notation :

Les désignations suivantes ont été choisies.

M	Nombre de laboratoires
$i (i = 1, 2... m)$	Indice (n°. du laboratoire)
n_i	Nombre des valeurs individuelles du i-ème laboratoire
$N=\sum_{i=1}^{m} n_i$	Nombre total des valeurs individuelles
$x (i = 1, 2... n_i)$	Valeur individuelle du $i^{ème}$ laboratoire
$\bar{x}_i=\frac{1}{n_i}\sum_{i=1}^{n_i} x_i$	Valeur moyenne du $i^{ème}$ laboratoire

$\bar{\bar{x}} = \frac{1}{N}\sum_{i=1}^{m}\sum_{i=1}^{n_i} x_i$ Valeur moyenne totale

$s_i = \sqrt{\frac{1}{n_i - 1}\sum_{i=1}^{n_i}\left(x_i - \bar{x}_i\right)^2}$ Ecart-type du i^{ème} laboratoire

A/ *Vérification des valeurs aberrantes au sein d'un laboratoire*

Après avoir déterminé 5 valeurs individuelles x_i, on exécute au laboratoire le test de Grubbs pour dépister les valeurs aberrantes.

On teste l'hypothèse nulle selon laquelle la valeur expérimentale ayant le plus grand écart absolu par rapport à la moyenne n'est pas une observation aberrante.

On calcule PG = $\frac{\left| x_i^* - \bar{x}_i \right|}{s_i}$

x_i^* = valeur suspecte.

On compare PG avec la valeur correspondante indiquée au tableau 1 pour P = 95%.

Si PG < valeur lue, la valeur x_i^* n'est pas une valeur aberrante et on peut calculer s_i.

Si PG > valeur lue, la valeur x_i^* est probablement une valeur aberrante et on refait trois déterminations supplémentaires.

On calcule à nouveau pour x_i^* le test de Grubbs avec les huit déterminations.

Si PG > valeur correspondante pour P = 99%, on considère x_i^* comme une valeur aberrante et on calcule s_i sans x_i^*.

B/ *Comparaison des variances entre les différents laboratoires*
- Test de Bartlett

Le test de Bartlett permet d'examiner aussi bien les grandes variances que les petites. Il sert à tester l'hypothèse nulle de l'égalité des variances dans tous les laboratoires par opposition avec l'hypothèse alternative selon laquelle les variances sont inégales pour quelques laboratoires au moins.

Il a pour condition qu'il y ait au moins 5 valeurs individuelles par laboratoire.

On calcule la statistique du test :

$$PB = \frac{1}{C}\left[(N-m) \ln s_1^2 - \sum_{i=1}^{m} f_i \ln s_i^2 \right]$$

$$C = \frac{\sum_{i=1}^{m} \frac{1}{f_i} - \frac{1}{N-m}}{3\,(m-1)} + 1$$

$$s_1^* = \frac{\sum_{i=1}^{m} f_i s_1^2}{N-m}$$

$f_i = n_i$ - 1 degrés de liberté de s_i.

On compare PB avec la valeur indiquée au tableau 2 à la distribution de x^2 avec m - 1 degrés de liberté.

Si PB > à la valeur du tableau, il y a des différences entre les variances.

A l'aide du *test de Cochran,* on peut vérifier que la variance d'un laboratoire est plus grande que celle d'autres laboratoires.

On calcule la statistique du test :

$$PC = \frac{s_i^2\ max}{\sum_{i=1}^{m} s_i^2}$$

On compare PC avec la valeur indiquée au tableau 3 pour m et n_i à P = 99%.

Si PC > à la valeur du tableau, la variance est significativement plus grande que les autres.

S'il y a un résultat significatif du test de Bartlett ou du test de Cochran, on peut éliminer la variance aberrante et calculer le test statistique à nouveau.

A défaut d'une méthode statistique appropriée au test simultané de plusieurs valeurs aberrantes, l'application répétée des tests est proposée comme un moyen utile. Cependant, les tests n'ont pas été prévus dans cet objectif et il faut prendre beaucoup de précautions lors des conclusions.

Si les laboratoires présentent des variances divergeant fortement les unes des autres, il faut effectuer une analyse pour en détecter les causes et décider si les valeurs expérimentales trouvées par ces laboratoires doivent être éliminées ou non. Dans cette éventualité, il faut étudier la question de la représentativité des laboratoires restants.

Si le résultat indique qu'il y a des variances différentes, ceci montre que les laboratoires ont exécuté méthodes avec une précision différente. De grandes dispersions peuvent être dues par exemple à l'insuffisance de pratique ou aussi au manque de clarté ou à l'insuffisance de la description de la méthode d'analyse.

C/ *Erreurs systématiques*

On examine si les laboratoires ont fait des erreurs systématiques par la méthode d'analyse de variance selon R.A. Fischer ou par le test de Dixon.

Analyse de variance selon R. A. Fischer

Ce test s'applique aux valeurs expérimentales restantes des laboratoires ayant une variance identique.

On teste si la dispersion des valeurs moyennes des laboratoires est fortement plus grande que celle des valeurs individuelles exprimées par la variance entre les laboratoires (s_z^2) et la variance au sein des laboratoires (s_r^2).

On calcule la statistique du test :

$$PF = \frac{s_z^2}{s_1^2}$$

$$s_z^2 = \frac{1}{m-1} \sum_{i=1}^{m} n_i \left(\bar{x}_i - \bar{\bar{x}} \right)^2$$

$$s_1^2 = \frac{1}{N-m} \sum_{i=1}^{m} \sum_{i=1}^{n_i} \left(x_i - \bar{x}_i \right)^2$$

On compare PF avec la valeur correspondante indiquée dans le tableau (distribution de F) avec $f_1 = f_Z = m - 1$ et $f_2 = f_1 = N - m$ degrés de liberté.

Si PF > à la valeur du tableau, on peut conclure à la présence de différences entre les moyennes, c'est-à-dire à la présence d'erreurs systématiques.

Test de Dixon

Ce test permet de vérifier que la moyenne d'un laboratoire est plus grande ou plus petite que celle des autres laboratoires.

Soit une série de données Z(h), h = 1,2,3...H, rangées par ordre croissant.

On calcule la statistique du test :

3 à 7	$Q_{10} = \frac{Z(2) - Z(1)}{Z(H) - Z(1)}$	ou	$\frac{Z(H) - Z(H-1)}{Z(H) - Z(1)}$
8 à 12	$Q_{11} = \frac{Z(2) - Z(1)}{Z(H-1) - Z(1)}$	ou	$\frac{Z(H) - Z(H-1)}{Z(H) - Z(2)}$

13 ou plus $Q_{22}=\dfrac{Z(3)-Z(1)}{Z(H-2)-Z(1)}$ ou $\dfrac{Z(H)-Z(H-2)}{Z(H)-Z(3)}$

On compare la valeur plus grande de la fonction Q avec les valeurs critiques indiquées dans le tableau 5.

Si la statistique est > à la valeur du tableau à P = 95%, la moyenne x_i examinée peut être considérée comme valeur aberrante.

S'il y a un résultat significatif dans l'analyse de variance selon R.A. Fischer ou au test de Dixon, on élimine l'une des valeurs extrêmes et on calcule la statistique du test de nouveau par les valeurs restantes. En ce qui concerne l'application répétée des tests : voir les explications du paragraphe B.

Si les laboratoires font des erreurs systématiques, les valeurs expérimentales correspondantes en cause ne doivent en aucun cas être prises en considération dans les calculs ultérieurs. Il faut analyser les causes de l'erreur systématique.

D/ *Calcul de la répétabilité (r) et de la reproductibilité (R).*

A partir des résultats restants après élimination des valeurs aberrantes, on calcule l'écart-type de répétabilité s_r et la répétabilité r, ainsi que l'écart-type de reproductibilité s_R et la reproductibilité R, qui sont indiqués comme valeurs caractéristiques de la méthode d'analyse.

$$s_r = \sqrt{\frac{1}{N-m}\sum_{i=1}^{m} f_i s_i^2} \qquad r = s_r \cdot 2\sqrt{2}$$

$$s_R = \sqrt{\frac{1}{a}\left[s_Z^2 + (a-1)s_1^2\right]} \qquad R = s_R \cdot 2\sqrt{2}$$

$$a = \frac{1}{m-1}\left[\left(N - \sum_{i=1}^{m}\frac{n_i^2}{n}\right)\right]$$

S'il n'y a pas de différence entre les moyennes des laboratoires, il n'y a pas non plus de différence entre s_r et s_R et entre r et R. Cependant, si l'on a constaté des écarts entre les moyennes des laboratoires, qui peuvent toutefois être tolérés pour des considérations d'ordre pratique, il faut indiquer s_r et s_R, r et R.

BIBLIOGRAPHIE

AFNOR, norme NFX06041, *Fidélité des méthodes d'essai. Détermination de la répétabilité et de la reproductibilité par essais interlaboratoires.*

DAVIES O. L., GOLDSMITH P.l., *Statistical Methods in Research and Production,* Oliver and Boyd, Edinburgh, 1972.

GOETSCH F. H., KRÖNERT W., OLSCHIMKE D., OTTO U., VIERKÖTTER S., *Meth. An.,* 1978, No 667.

GOTTSCHALK G., KAISER K. E., *Einführung in die Varianzanalyse und Ringversuche,* B-1 Hochschultaschenbücher, Band 775, 1976.

GRAF, HENNING, WILRICH, *Statistische Methoden bei textilen Untersuchungen,* Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1974.

GRUBBS F. E., *Sample Criteria for Testing Outlying Observations,* The Annals of Mathematical Statistics, 1950, vol. 21, p 27-58.

GRUBBS F. E., *Procedures for Detecting Outlying Observations in Samples,* Technometrics, 1969, vol. 11, No 1, p 1-21.

GRUBBS F. E. and BECK G., *Extension of Sample Sizes and Percentage Points for Significance Tests of Outlying Observations,* Technometrics, 1972, vol. 14, No 4, p 847-854.

ISO, norme 5725.

KAISER R., GOTTSCHALK G., *Elementare Tests zur Beurteilung von Messdaten,* B-I Hochschultaschenbücher, Band 774, 1972.

LIENERT G. A., *Verteilungsfreie Verfahren in der Biostatistik,* Band I, Verlag Anton Haine, Meisenheim am Glan, 1973.

NALIMOV V. V., *The Application of Mathematical Statistics to Chemical Analysis,* Pergamon Press, Oxford, London, Paris, Frankfurt, 1963.

SACHS L., *Statistische Auswertungsmethoden,* Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1968.

Tableau 1 - Valeurs critiques pour le test de Grubbs

n_i	P = 95%	P 99%
3	1,155	1,155
4	1,481	1,496
5	1,715	1,764
6	1,887	1,973
7	2,020	2,139
8	2,126	2,274
9	2,215	2,387
10	2,290	2,482
11	2,355	2,564
12	2,412	2,636

Tableau 2 – Valeurs critiques pour le test de Bartlett (P = 95%)

f(m - 1)	X^2	*f(m - 1)*	X^2
1	3,84	21	32,7
2	5,99	22	33,9
3	7,81	23	35,2
4	9,49	24	36,4
5	11,07	25	37,7
6	12,59	26	38,9
7	14,07	27	40,1
8	15,51	28	41,3
9	16,92	29	42,6
10	18,31	30	43,8
11	19,68	35	49,8
12	21,03	40	55,8
13	22,36	50	67,5
14	23,69	60	79,1
15	25,00	70	90,5
16	26,30	80	101,9
17	27,59	90	113,1
18	28,87	100	124,3
19	30,14		
20	31,41		

Tableau 3 – Valeurs critiques pour le test de Cochran

m	n_i = 2		n_i = 3		n_i = 4		n_i = 5		n_i = 6	
	99%	95%	99%	95%	99%	95%	99%	95%	99%	95%
2	-	-	0,995	0,975	0,979	0,939	0,959	0,906	0,937	0,877
3	0,993	0,967	0,942	0,871	0,883	0,798	0,834	0,746	0,793	0,707
4	0,968	0,906	0,864	0,768	0,781	0,684	0,721	0,629	0,676	0,590
5	0,928	0,841	0,788	0,684	0,696	0,598	0,633	0,544	0,588	0,506
6	0,883	0,781	0,722	0,616	0,626	0,532	0,564	0,480	0,520	0,445
7	0,838	0,727	0,664	0,561	0,568	0,480	0,508	0,431	0,466	0,397
8	0,794	0,680	0,615	0,516	0,521	0,438	0,463	0,391	0,423	0,360
9	0,754	0,638	0,573	0,478	0,481	0,403	0,425	0,358	0,387	0,329
10	0,718	0,602	0,536	0,445	0,447	0,373	0,393	0,331	0,357	0,303
11	0,684	0,570	0,504	0,417	0,418	0,348	0,366	0,308	0,332	0,281
12	0,653	0,541	0,475	0,392	0,392	0,326	0,343	0,288	0,310	0,262
13	0,624	0,515	0,450	0,371	0,369	0,307	0,322	0,271	0,291	0,246
14	0,599	0,492	0,427	0,352	0,349	0,291	0,304	0,255	0,274	0,232
15	0,575	0,471	0,407	0,335	0,332	0,276	0,288	0,242	0,259	0,220
16	0,553	0,452	0,388	0,319	0,316	0,262	0,274	0,230	0,246	0,208
17	0,532	0,434	0,372	0,305	0,301	0,250	0,261	0,219	0,234	0,198
18	0,514	0,418	0,356	0,293	0,288	0,240	0,249	0,209	0,223	0,189
19	0,496	0,403	0,343	0,281	0,276	0,230	0,238	0,200	0,214	0,181
20	0,480	0,389	0,330	0,270	0,265	0,220	0,229	0,192	0,205	0,174
21	0,465	0,377	0,318	0,261	0,255	0,212	0,220	0,185	0,197	0,167
22	0,450	0,365	0,307	0,252	0,246	0,204	0,212	0,178	0,189	0,160
23	0,437	0,354	0,297	0,243	0,238	0,197	0,204	0,172	0,182	0,155
24	0,425	0,343	0,287	0,235	0,230	0,191	0,197	0,166	0,176	0,149
25	0,413	0,334	0,278	0,228	0,222	0,185	0,190	0,160	0,170	0,144
26	0,402	0,325	0,270	0,221	0,215	0,179	0,184	0,155	0,164	0,140
27	0,391	0,316	0,262	0,215	0,209	0,173	0,179	0,150	0,159	0,135
28	0,382	0,308	0,255	0,209	0,202	0,168	0,173	0,146	0,154	0,131
29	0,372	0,300	0,248	0,203	0,196	0,164	0,168	0,142	0,150	0,127
30	0,363	0,293	0,241	0,198	0,191	0,159	0,164	0,138	0,145	0,124
31	0,355	0,286	0,235	0,193	0,186	0,155	0,159	0,134	0,141	0,120
32	0,347	0,280	0,229	0,188	0,181	0,151	0,155	0,131	0,138	0,117
33	0,339	0,273	0,224	0,184	0,177	0,147	0,151	0,127	0,134	0,114
34	0,332	0,267	0,218	0,179	0,172	0,144	0,147	0,124	0,131	0,111
35	0,325	0,262	0,213	0,175	0,168	0,140	0,144	0,121	0,127	0,108
36	0,318	0,256	0,208	0,172	0,165	0,137	0,140	0,119	0,124	0,106
37	0,312	0,251	0,204	0,168	0,161	0,134	0,137	0,116	0,121	0,103
38	0,306	0,246	0,200	0,164	0,157	0,131	0,134	0,113	0,119	0,101
39	0,300	0,242	0,196	0,161	0,154	0,129	0,131	0,111	0,116	0,099
40	0,294	0,237	0,192	0,158	0,151	0,126	0,128	0,108	0,114	0,097

Tableau 4 – Valeurs critiques pour le F-Test (P=99%)

f_2 \ f_1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	4052	4999	5403	5625	5764	5859	5928	5981	6023	6056	6083	6106	6126	6143	6157
2	98,5	99,0	99,2	99,3	99,3	99,3	99,4	99,4	99,4	99,4	99,4	99,4	99,4	99,4	99,4
3	34,1	30,8	29,4	28,7	28,2	27,9	27,7	27,5	27,3	27,2	27,1	27,1	27,0	26,9	26,9
4	21,2	18,0	16,7	16,0	15,5	15,2	15,0	14,8	14,7	14,5	14,5	14,4	14,3	14,2	14,2
5	16,3	13,3	12,1	11,4	11,0	10,7	10,5	10,3	10,2	10,1	9,96	9,89	9,82	9,77	9,72
6	13,7	10,9	9,78	9,15	8,75	8,47	8,26	8,10	7,98	7,87	7,79	7,72	7,66	7,60	7,56
7	12,2	9,55	8,45	7,85	7,46	7,19	6,99	6,84	6,72	6,62	6,54	6,47	6,41	6,36	6,31
8	11,3	8,65	7,59	7,01	6,63	6,37	6,18	6,03	5,91	5,81	5,73	5,67	5,61	5,56	5,52
9	10,6	8,02	6,99	6,42	6,06	5,80	5,61	5,47	5,35	5,26	5,18	5,11	5,05	5,01	4,96
10	10,0	7,56	6,55	5,99	5,64	5,39	5,20	5,06	4,94	4,85	4,77	4,71	4,65	4,60	4,56
11	9,64	7,20	6,21	5,67	5,31	5,07	4,88	4,74	4,63	4,54	4,46	4,39	4,34	4,29	4,25
12	9,33	6,93	5,95	5,41	5,06	4,82	4,64	4,50	4,39	4,30	4,22	4,16	4,10	4,05	4,01
13	9,07	6,70	5,74	5,21	4,86	4,62	4,44	4,30	4,19	4,10	4,02	3,96	3,90	3,86	3,82
14	8,86	6,51	5,56	5,04	4,69	4,46	4,28	4,14	4,03	3,94	3,86	3,80	3,75	3,70	3,66
15	8,68	6,36	5,42	4,89	4,56	4,32	4,14	4,00	3,89	3,80	3,73	3,67	3,61	3,56	3,52
16	8,53	6,23	5,29	4,77	4,44	4,20	4,03	3,89	3,78	3,69	3,62	3,55	3,50	3,45	3,41
17	8,40	6,11	5,18	4,67	4,34	4,10	3,93	3,79	3,68	3,59	3,52	3,46	3,40	3,35	3,31
18	8,29	6,01	5,09	4,58	4,25	4,01	3,84	3,71	3,60	3,51	3,43	3,37	3,32	3,27	3,23
19	8,18	5,93	5,01	4,50	4,17	3,94	3,77	3,63	3,52	3,43	3,36	3,30	3,24	3,19	3,15
20	8,10	5,85	4,94	4,43	4,10	3,87	3,70	3,56	3,46	3,37	3,29	3,23	3,18	3,13	3,09
21	8,02	5,78	4,87	4,37	4,04	3,81	3,64	3,51	3,40	3,31	3,24	3,17	3,12	3,07	3,03
22	7,95	5,72	4,82	4,31	3,99	3,76	3,59	3,45	3,35	3,26	3,18	3,12	3,07	3,02	2,98
23	7,88	5,66	4,76	4,26	3,94	3,71	3,54	3,41	3,30	3,21	3,14	3,07	3,02	2,97	2,93
24	7,82	5,61	4,72	4,22	3,90	3,67	3,50	3,36	3,26	3,17	3,09	3,03	2,98	2,93	2,89
25	7,77	5,57	4,68	4,18	3,85	3,63	3,46	3,32	3,22	3,13	3,06	2,99	2,94	2,89	2,85
26	7,72	5,53	4,64	4,14	3,82	3,59	3,42	3,29	3,18	3,09	3,02	2,96	2,90	2,86	2,81
27	7,68	5,49	4,60	4,11	3,78	3,56	3,39	3,26	3,15	3,06	2,99	2,93	2,87	2,82	2,78
28	7,64	5,45	4,57	4,07	3,75	3,53	3,36	3,23	3,12	3,03	2,96	2,90	2,84	2,79	2,75
29	7,60	5,42	4,54	4,04	3,73	3,50	3,33	3,20	3,09	3,00	2,93	2,87	2,81	2,77	2,73
30	7,56	5,39	4,51	4,02	3,70	3,47	3,30	3,17	3,07	2,98	2,91	2,84	2,79	2,74	2,70
40	7,31	5,18	4,31	3,83	3,51	3,29	3,12	2,99	2,89	2,80	2,73	2,66	2,61	2,56	2,52
50	7,17	5,06	4,20	3,72	3,41	3,19	3,02	2,89	2,78	2,70	2,62	2,56	2,51	2,46	2,42
60	7,07	4,98	4,13	3,65	3,34	3,12	2,95	2,82	2,72	2,63	2,56	2,50	2,44	2,39	2,35
70	7,01	4,92	4,07	3,60	3,29	3,07	2,91	2,78	2,67	2,59	2,51	2,45	2,40	2,35	2,31
80	6,96	4,88	4,04	3,56	3,25	3,04	2,87	2,74	2,64	2,55	2,48	2,42	2,36	2,31	2,27
90	6,92	4,85	4,01	3,53	3,23	3,01	2,84	2,72	2,61	2,52	2,45	2,39	2,33	2,29	2,24
100	6,89	4,82	3,98	3,51	3,21	2,99	2,82	2,69	2,59	2,50	2,43	2,37	2,31	2,27	2,22
200	6,75	4,71	3,88	3,41	3,11	2,89	2,73	2,60	2,50	2,41	2,34	2,27	2,22	2,17	2,13
500	6,69	4,65	3,82	3,36	3,05	2,84	2,68	2,55	2,44	2,36	2,29	2,22	2,17	2,12	2,07
∞	6,63	4,61	3,78	3,32	3,02	2,80	2,64	2,51	2,41	2,32	2,25	2,18	2,13	2,08	2,04

Tableau 4 – Valeurs critiques pour le F-Test (P=99%) (Suite)

f_2 \ f_1	16	17	18	19	20	30	40	50	60	70	80	100	200	500	∞
1	6169	6182	6192	6201	6209	6261	6287	6303	6313	6320	6326	6335	6350	6361	6366
2	99,4	99,4	99,4	99,4	99,5	99,5	99,5	99,5	99,5	99,5	99,5	99,5	99,3	99,5	99,5
3	26,8	26,8	26,8	26,7	26,7	26,5	26,4	26,4	26,3	26,3	26,3	26,2	26,2	26,1	26,1
4	14,2	14,1	14,1	14,0	14,0	13,8	13,7	13,7	13,7	13,6	13,6	13,6	13,5	13,5	13,5
5	9,68	9,64	9,61	9,58	9,55	9,38	9,29	9,24	9,20	9,18	9,16	9,13	9,08	9,04	9,02
6	7,52	7,48	7,45	7,42	7,40	7,23	7,14	7,09	7,06	7,03	7,01	6,99	6,93	6,90	6,88
7	6,28	6,24	6,21	6,18	6,16	5,99	5,91	5,86	5,82	5,80	5,78	5,75	5,70	5,67	5,65
8	5,48	5,44	5,41	5,38	5,36	5,20	5,12	5,07	5,03	5,01	4,99	4,96	4,91	4,88	4,86
9	4,92	4,89	4,86	4,83	4,81	4,65	4,57	4,52	4,48	4,46	4,44	4,41	4,36	4,33	4,31
10	4,52	4,49	4,46	4,43	4,41	4,25	4,17	4,12	4,08	4,06	4,04	4,01	3,96	3,93	3,91
11	4,21	4,18	4,15	4,12	4,10	3,94	3,86	3,81	3,77	3,75	3,73	3,70	3,65	3,62	3,60
12	3,97	3,94	3,91	3,88	3,86	3,70	3,62	3,57	3,54	3,51	3,49	3,47	3,41	3,38	3,36
13	3,78	3,74	3,72	3,69	3,66	3,51	3,42	3,37	3,34	3,32	3,30	3,27	3,22	3,19	3,17
14	3,62	3,59	3,56	3,53	3,51	3,35	3,27	3,22	3,18	3,16	3,14	3,11	3,06	3,03	3,00
15	3,49	3,45	3,42	3,40	3,37	3,21	3,13	3,08	3,05	3,02	3,00	2,98	2,92	2,89	2,87
16	3,37	3,34	3,31	3,28	3,26	3,10	3,02	2,97	2,93	2,91	2,89	2,86	2,81	2,78	2,75
17	3,27	3,24	3,21	3,19	3,16	3,00	2,92	2,87	2,83	2,81	2,79	2,76	2,71	2,68	2,65
18	3,19	3,16	3,13	3,10	3,08	2,92	2,84	2,78	2,75	2,72	2,70	2,68	2,62	2,59	2,57
19	3,12	3,08	3,05	3,03	3,00	2,84	2,76	2,71	2,67	2,65	2,63	2,60	2,55	2,51	2,49
20	3,05	3,02	2,99	2,96	2,94	2,78	2,69	2,64	2,61	2,58	2,56	2,54	2,48	2,44	2,42
21	2,99	2,96	2,93	2,90	2,88	2,72	2,64	2,58	2,55	2,52	2,50	2,48	2,42	2,38	2,36
22	2,94	2,91	2,88	2,85	2,83	2,67	2,58	2,53	2,50	2,47	2,45	2,42	2,36	2,33	2,31
23	2,89	2,86	2,83	2,80	2,78	2,62	2,54	2,48	2,45	2,42	2,40	2,37	2,32	2,28	2,26
24	2,85	2,82	2,79	2,76	2,74	2,58	2,49	2,44	2,40	2,38	2,36	2,33	2,27	2,24	2,21
25	2,81	2,78	2,75	2,72	2,70	2,54	2,45	2,40	2,36	2,34	2,32	2,29	2,23	2,19	2,17
26	2,78	2,75	2,72	2,69	2,66	2,50	2,42	2,36	2,33	2,30	2,28	2,25	2,19	2,16	2,13
27	2,75	2,71	2,68	2,66	2,63	2,47	2,38	2,33	2,29	2,27	2,25	2,22	2,16	2,12	2,10
28	2,72	2,68	2,65	2,63	2,60	2,44	2,35	2,30	2,26	2,24	2,22	2,19	2,13	2,09	2,06
29	2,69	2,66	2,63	2,60	2,57	2,41	2,33	2,27	2,23	2,21	2,19	2,16	2,10	2,06	2,03
30	2,66	2,63	2,60	2,57	2,55	2,39	2,30	2,25	2,21	2,18	2,16	2,13	2,07	2,03	2,01
40	2,48	2,45	2,42	2,39	2,37	2,20	2,11	2,06	2,02	1,99	1,97	1,94	1,87	1,85	1,80
50	2,38	2,35	2,32	2,29	2,27	2,10	2,01	1,95	1,91	1,88	1,86	1,82	1,76	1,71	1,68
60	2,31	2,28	2,25	2,22	2,20	2,03	1,94	1,88	1,84	1,81	1,78	1,75	1,68	1,63	1,60
70	2,27	2,23	2,20	2,18	2,15	1,98	1,89	1,83	1,78	1,75	1,73	1,70	1,62	1,57	1,54
80	2,23	2,20	2,17	2,14	2,12	1,94	1,85	1,79	1,75	1,71	1,69	1,65	1,58	1,53	1,49
90	2,21	2,17	2,14	2,11	2,09	1,92	1,82	1,76	1,72	1,68	1,66	1,62	1,55	1,50	1,46
100	2,19	2,15	2,12	2,09	2,07	1,89	1,80	1,74	1,69	1,66	1,63	1,60	1,52	1,47	1,43
200	2,09	2,06	2,03	2,00	1,97	1,79	1,69	1,63	1,58	1,55	1,52	1,48	1,39	1,33	1,28
500	2,04	2,00	1,97	1,94	1,92	1,74	1,63	1,56	1,52	1,48	1,45	1,41	1,31	1,23	1,16
∞	2,00	1,97	1,93	1,90	1,88	1,70	1,59	1,52	1,47	1,43	1,40	1,36	1,25	1,15	1,00

Tableau 5 – Valeurs critiques pour le test de Dixon

Critères du test		Valeurs critiques	
	m	95%	99%
$Q_{10} = \frac{Z(2) - Z(1)}{Z(H) - Z(1)}$ ou $\frac{Z(H) - Z(H-1)}{Z(H) - Z(1)}$ La plus grande de ces deux valeurs	3	0,970	0,994
	4	0,829	0,926
	5	0,710	0,821
	6	0,628	0,740
	7	0,569	0,680
$Q_{11} = \frac{Z(2) - Z(1)}{Z(H-1) - Z(1)}$ ou $\frac{Z(H) - Z(H-1)}{Z(H) - Z(2)}$ La plus grande de ces deux valeurs	8	0,608	0,717
	9	0,564	0,672
	10	0,530	0,635
	11	0,502	0,605
	12	0,479	0,579
$Q_{22} = \frac{Z(3) - Z(1)}{Z(H-2) - Z(1)}$ ou $\frac{Z(H) - Z(H-2)}{Z(H) - Z(3)}$ La plus grande de ces deux valeurs	13	0,611	0,697
	14	0,586	0,670
	15	0,565	0,647
	16	0,546	0,627
	17	0,529	0,610
	18	0,514	0,594
	19	0,501	0,580
	20	0,489	0,567
	21	0,478	0,555
	22	0,468	0,544
	23	0,459	0,535
	24	0,451	0,526
	25	0,443	0,517
	26	0,436	0,510
	27	0,429	0,502
	28	0,423	0,495
	29	0,417	0,489
	30	0,412	0,483
	31	0,407	0,477
	32	0,402	0,472
	33	0,397	0,467
	34	0,393	0,462
	35	0,388	0,458
	36	0,384	0,454
	37	0,381	0,450
	38	0,377	0,446
	39	0,374	0,442
	40	0,371	0,438

Tableau 6 – Feuille de résultats d'étude collaborative

Analyse										Echantillon				
Lab n°	Valeurs individuelles x_I													
	1	2	3	4	5	6	7	8		n_1	x_1	s_1	s^2_1	
1	548	556	558	553	542					5	551	6,47	41,8	
2	300	299	304	308	300					5	302	3,83	14,7	$x_{I,} < x$
3	567	558	563	532*	560	560	563	567		7	563	3,51	12,3	
4	557	550	555	560	551					5	555	4,16	17,3	
5	569	575	565	560	572					5	568	5,89	34,7	
6	550	546	549	557	588	570	576	568		8	563	14,92	222,6	$s_I > s_I$
7	557	560	560	552	547					5	555	5,63	31,7	
8	548	543	560	551	548					5	550	6,28	39,5	
9	558	563	551	555	560					5	556	5,63	31,7	
10	554	559	551	545	557					5	553	5,5	30,2	

Données statistiques :

Au sein de laboratoires : $s_1 = \pm 5.37$ $f_1 = 34$

Entre les laboratoires : $s_z = \pm 13.97$ $fz = 7$

$s_r = \pm 5.37$ $r = 15$ $s_R = \pm 7.78$ $R = 22$

Test de Bartlett :

PB = 3.16 < 15.51 (95%; $f = 8$)

L'analyse de variance :

PF = 6.76 > 3.21 (99%; $f_1 = 7$; $f_2 = 34$)

Fidélité des méthodes analytiques

(Résolution OENO 5/99)

Les données concernant la fidélité des méthodes analytiques déterminées par des études collaboratives sont applicables dans les cas suivants :

1) Vérification de l'acceptabilité des résultats obtenus par un Laboratoire avec une méthode de référence.
2) Évaluation des résultats analytiques démontrant qu'une limite légale a été dépassée.
3) Comparaison des résultats obtenus par deux ou plusieurs laboratoires, et comparaison des ces résultats avec une valeur de référence.
4) Evaluation des résultats obtenus avec des méthodes non validées.

1) Vérification de l'acceptabilité des résultats obtenus avec une méthode de référence.

La validité des résultats d'une analyse dépend des points suivants :

- Le laboratoire devra accomplir les analyses dans les conditions d'un système d'assurance qualité approprié, couvrant la structure, l'organisation, les responsabilités, les procédures, etc.
- Faisant partie du système d'assurance qualité, le laboratoire devra opérer avec une procédure de Contrôle de Qualité interne.
- Les résultats devront avoir été obtenus sous les critères d'acceptabilité décrits dans la procédure de Contrôle de Qualité interne.

Le Contrôle de Qualité interne sera établi suivant les normes internationalement reconnues comme par exemple, celles figurant dans le document IUPAC "Harmonized Guidelines for International Quality Control in Analytical Laboratories".

Le Contrôle de Qualité implique l'analyse de matériels de référence.

Les matériels de référence sont constitués de la même matrice que les échantillons à analyser, et ils contiennent une concentration appropriée et connue de l'analyte, semblable à celle trouvée dans l'échantillon.

Les matériels de référence seront autant que possible des matériels certifiés par une organisation internationalement reconnue.

Cependant, pour beaucoup d'analyses, les matériels de référence certifiés appropriés n'existent pas. Dans ce cas, on peut utiliser, par exemple, un matériel analysé par plusieurs laboratoires dans un essai de compétence, en considérant la moyenne des résultats comme la valeur assignée pour l'analyte.

On peut aussi préparer un matériel de référence par formulation (solution modèle de composition connue), ou en ajoutant une quantité connue de l'analyte à un

matériel qui ne le contient pas, ou encore, en faisant un essai de récupération (ajout dosé) sur un des échantillons à analyser.

Le Contrôle de Qualité est mis en oeuvre en insérant dans chaque série d'échantillons, des matériels de référence, et en analysant des doubles, soit des matériels de référence, soit des échantillons essai. C'est une vérification de l'exécution correcte de la méthode, elle doit être indépendante de la calibration et du protocole analytique, puisque son but est de les vérifier.

On entend par "série" un nombre d'échantillons analysés sous conditions de répétabilité. Le contrôle interne sert à vérifier que le niveau d'incertitude approprié n'est pas dépassé.

Si l'on considère les résultats analytiques pour le matériel de contrôle comme faisant partie d'une population normale de moyenne m et d'écart type s, seulement autour de 0,3% des résultats seront hors des limites m ± 3s. Lorsque l'on obtient des résultats aberrants (hors des limites), le système est considéré hors de contrôle statistique (données non fiables)

Le contrôle est effectué graphiquement avec les Cartes de Contrôle de Shewhart. Pour obtenir ces graphiques, les valeurs mesurées pour le matériel de référence sont portées sur l'axe vertical, et le numéro de série sur l'axe horizontal. La carte comporte également des lignes horizontales, représentant la moyenne, m, m ± 2s (limites d'attention, s = écart type) et m ± 3s (limites d'action).(Figure 1).

Pour estimer l'écart type, un matériel de contrôle doit être analysé en double, au moins à 12 reprises. Chaque double analyse doit être faite sous conditions de répétabilité, insérée de manière aléatoire dans une série d'échantillons. Des analyses seront dupliquées des jours différents pour refléter les changements raisonnables d'une série à l'autre. Les variations peuvent avoir plusieurs causes : la modification de la composition des réactifs, les recalibrations des instruments, et éventuellement le travail d'opérateurs différents. Après avoir éliminé les données aberrantes au moyen du Test de Grubbs, on peut calculer l'écart type pour construire les graphiques de Shewhart. Cet écart type est comparé avec celui de la méthode de référence. Si l'on n'arrive pas à la précision publiée pour la méthode de référence, les causes devront être recherchées.

Les limites de précision du laboratoire doivent être révisées périodiquement, en répétant la procédure indiquée.

Une fois que la Carte de Contrôle est construite, on porte sur le graphique les données obtenues dans chaque série pour le matériel de contrôle.

Une série est considérée hors de contrôle statistique lorsque :

I) Une valeur dépasse la limite d'action.

II) La valeur actuelle et la précédente sont hors de la limite d'attention, tout en étant situées à l'intérieur de la limite d'action.

III) Neuf valeurs successives se trouvent du même coté de la moyenne.

Le laboratoire doit répondre à une condition de "hors de contrôle", en rejetant les résultats de la série, en faisant des essais pour identifier les causes et en prenant des actions pour les remédier.
Une Carte de Contrôle de Shewhart peut être faite également pour les différences entre doubles analyses d'un même échantillon, spécialement quand des matériels de référence n'existent pas. Dans ce cas, la différence absolue entre deux analyses d'un même échantillon, est portée sur le graphique. La ligne inférieure de la carte est 0, la limite d'attention est 1,128 S_w, et la limite d'action est 3,686 S_w, pour S_w = écart type dans une série.

Ce type de graphique ne rend compte que de la répétabilité. Elle ne doit pas être supérieure à la répétabilité publiée pour la méthode.

En absence de matériels de contrôle, il faut, de temps en temps, vérifier que la limite de reproductibilité de la méthode de référence n'est pas dépassée par comparaison des résultats analytiques avec les résultats obtenus sur le même échantillon par un laboratoire expérimenté :

On fait une double détermination dans chaque laboratoire, et on applique la formule :

$$C_r D_{95}(\bar{y}_1 - \bar{y}_2) = \sqrt[2]{R^2 - \frac{r^2}{2}}$$

C_rD_{95} = Différence critique (P=0,95)
$\bar{y}_1$ = Moyenne de deux résultats obtenus par le laboratoire 1
$\bar{y}_2$ = Moyenne de deux résultats obtenus par le laboratoire 2
R = Reproductibilité de la méthode de référence.
r = Répétabilité de la méthode de référence.

Si la différence critique est dépassée on doit en trouver la cause, et l'expérience sera répétée dans un délai d'un mois.

2) Evaluation des résultats analytiques démontrant qu'une limite légale a été dépassée.

Quand un résultat analytique montre qu'une limite a été dépassée, on applique la procédure suivante :

1) Lorsque il s'agit d'un résultat individuel, faire une seconde analyse dans des conditions de répétabilité. S'il n'est pas possible de faire une seconde analyse sous conditions de répétabilité, mettre en oeuvre une double analyse sous conditions de répétabilité et utiliser ces dernières données pour évaluer la différence critique.
2) Déterminer la valeur absolue de la différence entre la moyenne des résultats obtenus sous conditions de répétabilité et la limite légale. Une valeur absolue de la différence plus grande que la différence critique montre que l'échantillon ne s'ajuste pas aux spécifications.

$$C_r D_{95}(\bar{y} - m_0) = \frac{1}{\sqrt[2]{2}} \sqrt[2]{R^2 - r^2 \frac{n-1}{n}}$$

La différence critique est calculée par la formule :

$\bar{y}$ = Moyenne des résultats obtenus
m_0 = Limite
n = Nombre d'analyses
R = Reproductibilité
r = Répétabilité

Autrement dit, si c'est une limite maximale, la moyenne des résultats ne doit pas être supérieure à

$$m_0 + C_r D_{95} (\bar{y} - m_0)$$

Si la limite est un minimum, la moyenne des résultats ne doit pas être inférieure à

$$m_0 - C_r D_{95} (\bar{y} - m_0)$$

3) Comparaison des résultats obtenus par deux ou plusieurs laboratoires et comparaison de ces résultats avec une valeur de référence.

Pour décider si les données provenant de deux laboratoires sont en accord, on calcule la différence absolue entre les deux résultats et on compare avec la différence critique

$$C_r D_{95}(\bar{y}_1 - \bar{y}_2) = \sqrt{R^2 - r^2\left(1 - \frac{1}{2n_1} - \frac{1}{2n_2}\right)}$$

$\bar{y}_1$ = Moyenne des résultats au laboratoire nº 1
$\bar{y}_2$ = Moyenne des résultats au laboratoire nº 2
n_1 = Nombre d'analyses/échantillon au laboratoire nº 1
n_2 = Nombre d'analyses/échantillon au laboratoire nº 2
R = Reproductibilité
r = Répétabilité

Si les résultats sont la moyenne de deux déterminations, la formule se simplifie à :

$$C_r D_{95}(\bar{y}_1 - \bar{y}_2) = \sqrt{R^2 - \frac{r^2}{2}}$$

Si les données sont des résultats individuels, la différence critique est R.

Si la différence critique n'est pas dépassé, on conclut que les résultats des deux laboratoires sont en concordance.

- Comparaison des résultats obtenus par plusieurs laboratoires avec une valeur de référence.

Supposons p laboratoires, ayant fait n_1 déterminations, de moyenne $\bar{y}_i$ pour chaque laboratoire, et avec une moyenne totale

La moyenne de tous les laboratoires est comparée avec la valeur de référence. Si la différence absolue dépasse la différence critique, calculé selon la formule suivante, on conclut que les résultats ne sont pas en accord avec la valeur de référence.

$$C_rD_{95} = \sqrt{\quad} \sqrt{\quad}$$

C_rD_{95} = Différence critique, calculée comme indiqué au point 2, pour la méthode de référence.

La valeur de référence peut être, par exemple, la valeur assignée à un matériel de référence, ou la valeur obtenue par un autre ou le même Laboratoire avec une méthode différente.

4) Evaluation des résultats analytiques obtenus avec des méthodes non validées.

Une valeur provisoire de la reproductibilité pour une méthode non validée peut être établie par comparaison avec un second laboratoire :

$$R_{prov} = \sqrt[2]{(\bar{y}_1 - \bar{y}_2)^2 + \frac{r^2}{2}}$$

$\bar{y}_1$ = Moyenne des résultats obtenus par le laboratoire nº 1
$\bar{y}_2$ = Moyenne des résultats obtenus par le laboratoire nº 2
r = Répétabilité provisoire déterminée dans le laboratoire

La reproductibilité provisoire peut être utilisée pour calculer la différence critique.

Si la reproductibilité provisoire est inférieure a deux fois la répétabilité, elle devra être fixée à 2r.

Une reproductibilité supérieure à trois fois la répétabilité ou à deux fois la valeur calculée par l'équation de Horwitz, n'est pas acceptable.

Équation de Horwitz :

$$RSD_R\% = 2^{1-0,5\log_{10}C}$$

$RSD_R\%$ = Ecart type relatif de la reproductibilité (exprimé comme pourcentage de la moyenne).
C = Concentration exprimée comme fraction décimale : exemple $10_g/100_g=0,1$

Cette équation fut obtenue empiriquement à partir de plus de 3000 études collaboratives comprenant une grande diversité d'analytes, matrices et techniques de

mesure. En absence d'autre information, des valeurs de la RSD_R inférieures ou égales à la RSD_R calculée par l'équation de Horwitz peuvent être considérées comme acceptables.

Valeurs de RSD_R % calculées par l'équation de Horwitz

Concentration	RSD_R %
10^{-9}	45
10^{-8}	32
10^{-7}	23
10^{-6}	16
10^{-5}	11
10^{-4}	8
10^{-3}	5,6
10^{-2}	4
10^{-1}	2,8
1	2

Si un résultat analytique obtenu avec une méthode non validée est proche d'une limite spécifiée par la législation, la limite de décision considérée sera, pour le cas d'une limite supérieure :

$$S = m_0 + \{(R_{rout}/R_{ref})-1\} \times C_rD_{95}$$

et pour une limite inférieure :

$$S = m_0 - \{(R_{rout}/R_{ref})-1\} \times C_rD_{95}$$

S = limite de décision
m_0 = limite légale
R_{rout} = Reproductibilité provisoire estimée pour la méthode non validée.
R_{ref} = Reproductibilité de la méthode de référence.
C_rD_{95} = Différence critique, calculée comme indiqué au point 2, pour la méthode de référence.

Un résultat dépassant la limite de décision doit être remplacé par un résultat final obtenu avec la méthode de référence.

Différences critiques pour les niveaux de probabilité autres que 95%

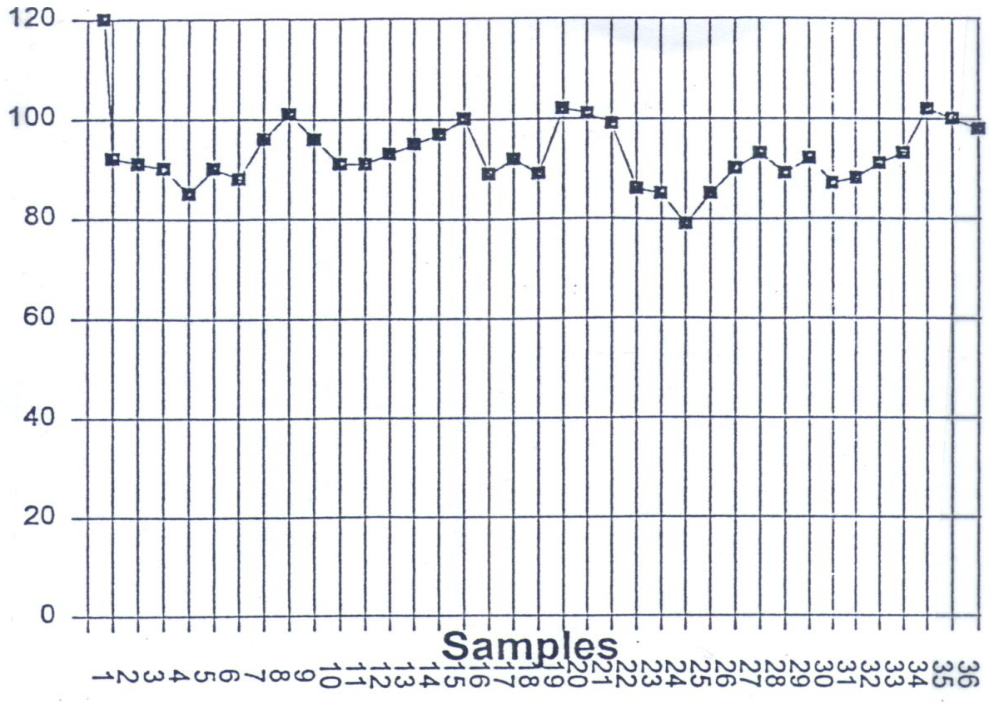
Ces différences peuvent être obtenues en multipliant les différences critiques au niveau 95% par les coefficients donnés dans la table 1.

Table 1 - Coefficients multiplicateurs permettant de calculer les différences critiques pour des niveaux de probabilité autres que 95%

Niveau de probabilité P	Coefficient multiplicateur
90	0,82
95	1,00

98	1,16
99	1,29
99,5	1,40

CARTE DE CONTROLE DE SHEWHART



BIBLIOGRAPHIE

- "Harmonized Guidelines for Internal Quality Control in Analytical Chemistry Laboratories". IUPAC. Pure and App. Chem. Vol 67, nº 4, 649-666, 1995
- "Shewhart Control Charts" ISO 8258. 1991.
- "Precision of test methods - Determination of repeatability and reproducibility for a standard test method by inter-laboratory tests". ISO 5725, 1994.
- "Draft Commission Regulation of establishing rules for the application of reference and routine methods for the analysis and quality evaluation of milk and milk products". Commission of the European Communities, 1995.

- "Harmonized protocols for the adoption of standardized analytical methods and for the presentation of their performance characteristics". IUPAC. Pure an App. Chem., Vol. 62, nº 1, 149-162. 1990.

Protocole pour la planification, la conduite et l'interprétation des études de performance des méthodes d'analyse

(Résolution OENO 6/2000)

INTRODUCTION

Après un certain nombre de rencontres et d'ateliers, un groupe de représentants de 27 organisations a adopté par consensus un "Protocole pour la planification, la conduite et l'interprétation des études collaboratives", publié dans Pure & Appl. Chem. 60, 855-864, (1998). Un certain nombre d'organisations ont accepté et utilisé ce protocole. En se basant sur leur expérience et les recommandations du "Codex Committee on Methods of Analysis and Sampling" (programme commun FAO/WHO pour Food Standards. Rapport de la Dix huitième Session, 9-13 Novembre 1992; FAO, Rome, Italie, ALINORM 92/93, sections 34-39), il a été recommandé d'inclure 3 révisions mineures au protocole original. Ce sont : (1) Enlever le plan avec **double division** des niveaux de teneurs (en anglais : double split level) parce que le terme d'interaction qu'il génère dépend du choix des niveaux et si l'interaction a une signification statistique, elle ne peut pas être interprétée d'un point de vue physique (2). Développer la définition de "matériau" (3). Faire passer de 1 à 2,5 % le critère utilisé pour éliminer un résultat aberrant.

Le protocole révisé qui inclut ces changements est reproduit ci-dessous. Quelques révisions dans la rédaction ont aussi été faites pour améliorer la lecture. Le vocabulaire et les définitions du document "Nomenclature des Etudes Inter-laboratoires (Recommandations 1994)" *[publié dans Pure Applied Chem., 66, 1903-1911 (1994)]* ont été inclus dans cette révision, ainsi que, autant que possible, les termes appropriés de l'International Organization for Standardization (ISO) modifiés pour les appliquer à la chimie analytique.

PROTOCOLE

1. Travail préliminaire

Les études (collaboratives) de performance des méthodes exigent un effort considérable et devraient être entreprises seulement pour des méthodes qui ont reçu ou subi un test préliminaire adéquat. Ce test interne au laboratoire, devrait inclure si possible (quand cela est applicable), l'information sur les points suivants :

1.1. *Estimation préliminaire de la fidélité*

Estimation de l'écart-type total des résultats analytiques intralaboratoire sur l'intervalle de concentration intéressant, étudié au moins à la limite supérieure et à la limite inférieure de l'intervalle de concentration, avec une insistance particulière sur la valeur standard ou la valeur de la spécification.

NOTE 1 : L'écart-type total intralaboratoire est une mesure du manque de fidélité plus globale que celle de l'écart-type de répétabilité de l'ISO, §3.3 ci-dessous. Cet écart-type représente la variation intralaboratoire la plus grande qui peut être attendue des performances de la méthode; elle inclut au moins la variabilité entre jours différents et aussi de préférence entre droites d'étalonnage différentes. Elle inclut les variations entre-séries (entre-lots) et intra-série, (intra-lot). En ce sens elle peut être considérée comme une mesure de la reproductibilité à l'intérieur du laboratoire. Si cette valeur est vraiment dans les limites acceptables, il ne faut pas s'attendre à ce que l'écart type entre laboratoires (écart-type de reproductibilité) soit meilleur. Cette fidélité n'est pas estimée à partir de l'étude minimum décrite dans ce protocole.

NOTE 2 : L'écart-type total intralaboratoire peut aussi être estimé à partir d'essais de robustesse qui indiquent avec quelle rigueur les facteurs expérimentaux doivent être contrôlés et quelles sont les limites de variations autorisées. Ces limites déterminées expérimentalement devraient être incluses dans la description de la méthode.

1.2. *Erreurs systématique (biais)*

Estimations de l'erreur systématique des résultats analytiques sur l'intervalle de concentration et pour les substances à analyser, étudiées au minimum aux limites supérieure et inférieure de l'intervalle de concentration, avec une insistance particulière sur la valeur standard ou de la valeur de la spécification. Les résultats obtenus en appliquant la méthode aux matériaux de référence adéquats doivent être notés.

1.3. *Recouvrement*

Recouvrement d' »ajouts » effectués sur des matériaux vrais, sur des extraits, sur les solutions de digestion, ou d'autres solutions issues de leur traitement.

1.4. *Domaine d'application*

Possibilité qu'a la méthode d'identifier et de mesurer les formes physiques et chimiques de l'analyte susceptibles d'être présentes dans les matériaux, en tenant compte des effets de matrice.

1.5. *Interférence*

Effet des autres constituants qui sont susceptibles d'être présents à des concentrations appréciables dans les matrices considérées et qui peuvent interférer sur le dosage.

1.6. *Comparaison de méthode*

Résultats de comparaison de la méthode à des méthodes existantes testées et destinées à des usages similaires.

1.7. *Procédures d'étalonnage*

Les procédures spécifiées pour l'étalonnage et la correction de blanc ne doivent pas introduire de biais important dans les résultats.

1.8. *Description de méthode*

La méthode doit être écrite de façon claire et sans ambiguïté.

1.9. *Chiffres significatifs*

Le laboratoire qui initie l'étude devrait indiquer le nombre de chiffres significatifs qui doit être reporté en se basant sur les données sortant de l'instrument de mesure.

NOTE : En faisant des calculs statistiques à partir des données, il faut utiliser pleinement la puissance du calculateur ou de l'ordinateur et ne pas arrondir ou tronquer les résultats avant de donner la moyenne finale ou les écarts-type. Arrivé à ce stade, les écarts-type sont arrondis à deux chiffres significatifs et les moyennes et déviations correspondantes sont arrondies pour fournir les chiffres significatifs de l'écart-type. Par exemple, si s_R = 0,012, x est reporté comme 0,147 et non pas comme 0,1473 ou 0,15 et le coefficient de variation donné est 8,2 % (les symboles sont définis dans l'Appendice 1). Si les calculs d'écarts-type doivent être établis manuellement par étapes avec transfert des résultats intermédiaires, le nombre de chiffres significatifs à retenir pour les nombres au carré devrait être au moins 2 fois le nombre de chiffres fournis par les données plus 1.

2. Plan d'étude de performance de la méthode

2.1. *Nombre de matériaux*

Pour un type unique de substance, il faut utiliser au moins 5 matériaux (matériaux d'essai); ce nombre minimum peut être réduit à 3, seulement si un niveau unique est spécifié pour une matrice unique. Pour ce paramètre du plan d'expériences, les deux parties provenant d'un niveau de teneurs (en anglais : split level) divisé et les deux parties individuelles de répliques effectuées en aveugle (en anglais : blind duplicate) par laboratoire, sont considérées comme un matériau unique.

NOTE 1 : Un matériau est une combinaison "analyte/matrice/concentration" à laquelle s'appliquent les paramètres de performance de la méthode. Ce paramètre détermine l'applicabilité d'une méthode. Pour appliquer la méthode à un certain nombre de substances différentes, un nombre suffisant de matrices et de niveaux devrait être choisi pour tenir compte des interférences potentielles et de la concentration la plus utilisée.

NOTE 2 : Les matériaux d'essai répliqués en "aveugle" ou en "non aveugle" en nombre égal ou supérieur à 2 constituent d'un point de vue statistique un seul matériau (ils ne sont pas indépendants).

NOTE 3 : Un niveau divisé une fois (paire de Youden) analysé en statistique comme une paire constitue un seul matériau; si l'analyse statistique est effectuée et reportée en considérant que les échantillons sont indépendants, ils

constituent 2 matériaux. De plus, la paire peut être utilisée pour calculer l'écart-type intralaboratoire s_r :

$s_r = \sqrt{(\sum di^2)\ /\ 2n}$ (pour essais dupliqués, en aveugle ou non)

$s_r = \sqrt{(\sum di^2)\ /\ 2(n-1)}$ (pour paire de Youden)

où d_i est la différence entre 2 valeurs individuelles à partir du niveau divisé pour chaque laboratoire et n le nombre de laboratoires. Dans ce cas particulier l'écart-type entre laboratoires s_R est seulement la moyenne des deux valeurs de s_R calculées à partir des composantes individuelles du niveau divisé et est utilisé seulement pour vérifier les calculs.

NOTE 4 : Le blanc ou contrôle négatif peut être un matériau ou non selon la finalité de l'analyse. Par exemple, dans l'analyse de traces où il y a des niveaux très faibles (proches de la limite et quantification), les blancs sont considérés comme des matériaux et sont nécessaires pour déterminer les "limites de mesure". Cependant si le blanc est seulement un contrôle de procédure en macro analyse (par ex., la matière grasse dans le fromage) il ne serait pas considéré comme un matériau.

2.2. *Nombre de laboratoires*

Au moins 8 laboratoires doivent reporter les résultats pour chaque matériau; dans le cas où il n'est pas possible d'obtenir ce nombre (par ex., appareillage très cher ou laboratoires spécialisés requis) l'étude peut être conduite avec un nombre moins important de laboratoires, mais avec un minimum de 5 laboratoires. Si l'étude est réalisée pour une utilisation internationale de la méthode, les laboratoires de différents pays doivent y participer. Dans le cas de méthodes exigeant l'utilisation d'appareils spécialisés, l'étude pourrait inclure l'ensemble des laboratoires disponibles. Dans de tels cas, "n" est utilisé au dénominateur pour calculer l'écart-type au lieu de "n-1". Les laboratoires qui participent par la suite à l'étude doivent démontrer qu'ils peuvent réaliser les analyses aussi bien que les laboratoires participants d'origine.

2.3. *Nombre de répliques*

Les paramètres de répétabilité doivent être estimés en utilisant l'une des combinaisons suivantes (listées dans l'ordre approximatif de préférence) :

2.3.1. Niveau divisé

Pour chaque niveau qui est divisé et constitue seulement un matériau unique d'un point de vue plan et analyse statistique, utiliser 2 matériaux d'essai presque identiques différant seulement légèrement dans leur concentration en analyte (par exemple de moins de 1 à 5 %). Chaque laboratoire doit analyser chaque matériau d'essai une fois et seulement une fois.

NOTE : Le critère statistique qui doit être satisfait pour qu'une paire d'échantillons à analyser constitue un niveau divisé est que l'écart-type de reproductibilité des 2 parties du niveau divisé une fois doit être égal.

2.3.2. Combinaison de répliques en aveugle et de niveau divisé

Utiliser des niveaux divisés pour quelques matériaux et des répliques en aveugle pour d'autres matériaux dans la même étude (valeurs uniques pour chaque matériau d'essai soumis).

2.3.3. Répliques en aveugle

Pour chaque matériau, utiliser des répliques en aveugle identiques; quand les données ne peuvent être censurées (par ex., entrée, calcul et impression automatique), il est possible d'utiliser des répliques identiques non réalisées en aveugle.

2.3.4. Répliques connues

Pour chaque matériau, utiliser des répliques connues (au moins 2 analyses de prises d'essai issues d'un même matériau d'essai), mais seulement lorsque l'utilisation de l'un des plans précédents n'est pas pratique.

2.3.5. Analyses indépendantes

Utiliser seulement une prise d'essai unique de chaque matériau (c'est-à-dire, ne pas réaliser des analyses multiples) dans l'étude, mais compenser l'impossibilité de calculer les paramètres de répétabilité par l'étude des paramètres de contrôle de qualité ou les autres données intralaboratoires obtenues indépendamment de l'étude de performance de la méthode.

3. Analyse statistique (voir diagramme, A.4.1.)

Pour l'analyse statistique des données, les procédures statistiques requises listées ci-dessous doivent être réalisées et les résultats reportés. Les procédures supplémentaires, additionnelles, ne sont pas écartées.

3.1. *Données valides*

Seuls les résultats valides devraient être reportés et soumis au traitement statistique. Les données valides sont les données résultant de performance normale des analyses de laboratoire; elles ne sont pas entachées par des déviations de méthode, de mauvais fonctionnement des instruments, d'événements inattendus pendant la réalisation de la méthode ou par des erreurs d'écriture, de typographie et d'arithmétique.

3.2. An*alyse de variance à un facteur*

L'analyse de variance à un facteur et le traitement des valeurs aberrantes doivent être appliqués séparément à chaque matériau (matériau d'essai) pour estimer les composantes de la variance et les paramètres de répétabilité et reproductibilité.

3.3. *Estimation initiale*

Calculer la moyenne x (= la moyenne des moyennes des laboratoires), le coefficient de variation de répétabilité, RSD_r, et le coefficient de variation de reproductibilité, RSD_R sans enlever les valeurs aberrantes, mais en utilisant seulement les données valides.

3.4. *Traitement des valeurs aberrantes*

Les paramètres estimés de fidélité qui doivent être aussi reportés sont basés sur les données initiales débarrassées de toutes les valeurs aberrantes signalées par la procédure harmonisée de 1994 d'élimination des valeurs aberrantes. Cette procédure consiste essentiellement à appliquer les tests de Cochran et de Grubbs (au seuil de probabilité P de 2,5 %, unilatéral pour le Cochran et bilatéral pour le Grubbs) jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de valeurs aberrantes indiquées, ou jusqu'à ce que le nombre initial des laboratoires fournissant des résultats valides chute de 22,2 % (= 2/9).

NOTE : Une consultation rapide du laboratoire qui reporte des valeurs suspectes peut permettre de corriger des fautes ou de découvrir les conditions qui ont conduit aux données invalides, 3.1. Il est préférable de reconnaître des fautes et des résultats invalides per se que de se baser sur des tests statistiques pour enlever des valeurs qui s'écartent.

3.4.1. Test de Cochran

D'abord appliquer le test de Cochran des résultats aberrants (test unilatéral à P = 2,5 %) et enlever tout laboratoire dont la valeur critique excède la valeur tabulée pour le nombre de laboratoires et de répliques considérées, Appendice A.3.1,3.4.2.

3.4.2. Tests de Grubbs

Appliquer le test de Grubbs bilatéral aux valeurs uniques et enlever tout laboratoire aberrant. Si aucun laboratoire n'est signalé aberrant, appliquer alors les tests de Grubbs pour les valeurs par paire (bilatéral), P = 2,5 % au total. Enlever tout(s) laboratoire(s) signalé(s) par ces tests dont la valeur critique excède la valeur tabulaire donnée dans la colonne appropriée de la table, Appendice A.3.3. Arrêter quand l'application suivante du test signale plus de 22,2 % (2 sur 9) des laboratoires comme aberrants.

NOTE : Les tests de Grubbs doivent être appliqués sur un matériau à la fois, aux séries des moyennes répliquées de tous les laboratoires, et non aux valeurs individuelles obtenues à partir de plans répliqués, parce que la distribution de toutes les valeurs prises ensemble est multimodale, non Gaussienne, c'est-à-dire que leurs différences à partir de la moyenne générale pour ce matériau ne sont pas indépendantes.

3.4.3. Estimation finale

Recalculer les paramètres comme dans le § 3.3. après avoir enlevé les laboratoires signalés par le calcul précédent. Si aucune des données aberrantes n'a été enlevée par la séquence Cochran-Grubbs terminer le test. Sinon, appliquer à nouveau la séquence Cochran-Grubbs aux données débarrassées des résultats aberrants signalés, jusqu'à ce qu'il n'y en ait plus de signalés ou jusqu'à ce que plus de 22,2 % (2 laboratoires sur 9) soient enlevés dans le cycle suivant. Voir le diagramme A.3.4.

4. Rapport final

Le rapport final doit être publié et inclure tous les résultats valides. Les autres informations et les paramètres doivent être reportés dans un format similaire (pour chaque sujet reporté) à celui indiqué ici, quand cela est possible.

Tests de performance de méthode [x] réalisés au niveau international en [année(s)] par [organisation] dans laquelle [y et z] laboratoires ont participé, chacun réalisant [k] répliques, ont donné les résultats statistiques suivants :

TABLEAU DES PARAMETRES DE PERFORMANCE DES METHODES

Analyte; Résultats exprimés en [unités]
Matériau [Description et liste en colonnes dans un tableau par ordre croissant de grandeur des moyennes]
Nombre de laboratoires retenus après élimination des résultats aberrants.
Nombre de laboratoires aberrants
Code (ou désignation) des laboratoires aberrants
Nombre de résultats acceptés
Moyenne
Valeur vraie ou acceptée comme vraie, si connue
Ecart-type de répétabilité (s_r)
Coefficient de variation de répétabilité (RSD_r)
Limite de répétabilité, r (2,8 x s_r)
Ecart-type de reproductibilité (s_R)
Ecart-type de reproductibilité (RSD_R)
Ecart-type de reproductibilité, R (2,8 x s_R)

4.1. *Symboles*

Une série de symboles à utiliser dans les rapports et publications est jointe dans l'Appendice 1 (A.1.).

4.2. *Définitions*

Une série de définitions à utiliser dans les rapports d'étude et les publications est donnée dans l'Appendice 2 (A.2.).

4.3. *Divers*

4.3.1. Recouvrement

Le recouvrement d'un analyte ajouté pour contrôler la méthode ou le biais d'un laboratoire doit être calculé comme indiqué ici :

Recouvrement [Marginal], % =
(Analyte total trouvé - analyte présent originellement) x 100/(analyte ajouté)

Bien que l'analyte puisse être exprimé en concentration ou en quantité, les unités doivent être partout identiques. Quand la quantité d'analyte est déterminée par analyse, elle doit être déterminée partout de la même manière.

Les résultats analytiques pour le recouvrement doivent être reportés sans correction. Reporter les recouvrements séparément.

4.3.2. Quand sL est négatif

Par définition s_R est plus grand ou égal à s_r dans les études de performance de la méthode; il peut arriver parfois que l'estimation de s_r soit supérieure à l'estimation de s_R (la variance des répliques est supérieure à la variance entre laboratoires et la valeur calculée s_L^2 est alors négative). Quand cela arrive, mettre $s_L = 0$ et $s_R = s_r$.

5. Références

Horwitz, W. (1988) Protocol for the design, conduct, and interpretation of method-performance studies. Pure & Appl. Chem. **60**, 855-864.

Pocklington, W.D. (1990) Harmonized protocol for the adoption of standardized analytical methods and for the presentation of their performance characteritics. Pure and Appl. Chem. **62**, 149-162.

International Organization for Standardization. International Standard 5725-1986. Under revision in 6 parts; individual parts may be available from National Standards member bodies.

A. Apendices

APPENDICE 1. - SYMBOLES

Utiliser les séries de symboles et termes suivants pour désigner les paramètres développés par une étude de performance de méthode.

Moyenne (des moyennes de laboratoires)	x
Ecarts-type	s (estimation)
Répétabilité	s_r
"Pur" interlaboratoire	s_L
Reproductibilité	s_R
Variances : $s_R^2 = s_L^2 + s_r^2$	s^2 (avec les indices r, L et R)
Coefficient de variation	RSD (avec les indices r, L et R)
Différences maximales (comme définies par l'ISO 5725-1986) ; Voir A.2.4. et A.2.5.)	
Limite de répétabilité	$r = 2,8 \times S_r$)
Limite de reproductibilité	$R = (2,8 \times S_R)$
Nombre de répliques par laboratoire	k (général)
Nombre moyen de répliques par laboratoire i	k_i (pour un plan équilibré)
Nombre de laboratoires	L
Nombre de matériaux (matériaux d'essai)	m
Nombre total de résultats d'essai	n (= kL pour un plan équilibré)
Nombre total de valeurs pour une étude donnée	N (=kLm pour un plan totalement équilibré).

Si d'autres symboles sont utilisés, il faut expliquer totalement leur relation avec les symboles recommandés.

APPENDICE 2. - DEFINITIONS

Utiliser les définitions suivantes. Les trois premières définitions utilisent le document de l'IUPAC "Nomenclature of Interlaboratory Studies" (approuvé pour publication en 1994). Les deux définitions suivantes sont issues des données de l'ISO 3534-1 : 1993. Tous les résultats des essais sont supposés être indépendants c'est-à-dire, "obtenus sans avoir subi l'influence d'un résultat quelconque précédent sur le même matériau ou sur un matériau d'essai similaire. Les mesures quantitatives de fidélité dépendent de façon critique des conditions stipulées. Les conditions de répétabilité et de reproductibilité constituent des ensembles particuliers de conditions extrêmes stipulées".

A.2.1. Etude de performance de méthode

Une étude interlaboratoire dans laquelle tous les laboratoires suivent le même protocole écrit et utilisent le même méthode à tester pour mesurer une quantité dans les séries d'articles identiques à tester [échantillons, matériaux d'essai]. Les résultats reportés sont utilisés pour estimer les caractéristiques de performance de la méthode. Habituellement ces caractéristiques sont la fidélité intralaboratoire et interlaboratoire, et si nécessaire et possible, d'autres caractéristiques pertinentes comme l'erreur systématique, le recouvrement, les paramètres du contrôle interne de qualité, la sensibilité, la limite de quantification, et le domaine d'application.

A.2.2. Etude de performance du laboratoire

Une étude interlaboratoire qui consiste en un nombre d'analyses ou de mesures supérieur à un, réalisé en utilisant la méthode choisie ou utilisée par chaque laboratoire. Les résultats reportés sont comparés à ceux d'autres laboratoires ou à une valeur connue ou assignée comme référence, avec en général l'objectif d'évaluer ou d'améliorer la performance d'un laboratoire.

A.2.3. Etude de la certification d'un matériau

Une étude interlaboratoire qui assigne une valeur de référence ("valeur vraie") à une quantité (concentration ou propriété) dans un article à tester, en indiquant habituellement une incertitude déclarée.

A.2.4. Limite de répétabilité (r)

Quand la moyenne des valeurs obtenues à partir de deux déterminations indépendantes avec la même méthode sur des articles identiques dans le même laboratoire par le même opérateur utilisant le même appareil dans un court intervalle de temps se situe dans l'intervalle des valeurs moyennes citées dans le Rapport Final, 4.0., la différence absolue entre deux résultats d'essais devrait être inférieure ou égale à la limite de répétabilité (r) = [2, 8 x s_r] qui peut être généralement déduite par interpolation linéaire de s_r à partir du Rapport.

NOTE : Cette définition, et la définition correspondante de limite de reproductibilité, ont été obtenues à partir de cinq termes découlant les uns de autres; ces définitions ont été étendues pour permettre de les appliquer par interpolation à un article à tester dont la moyenne n'est pas la même que celle utilisée pour établir les paramètres d'origine, ce qui est le cas habituel quand on applique ces définitions. Le terme "limite de répétabilité [et reproductibilité]" est appliqué spécifiquement à une probabilité de 95 % et est pris comme 2,8 x s_r [ou s_R]. Le terme général pour ce concept statistique appliqué à toute mesure de tendance (par exemple, la médiane) et avec d'autres probabilités (par exemple, 99%) est "différence critique de répétabilité [et reproductibilité]".

A.2.5. Limite de reproductibilité (R)

Quand la moyenne des valeurs obtenues à partir de deux dosages uniques avec la même méthode sur des articles à tester identiques dans différents laboratoires avec différents opérateurs utilisant un équipement différent, se situe dans l'intervalle des valeurs moyennes citées dans le Rapport Final, 4.0., la différence absolue entre deux résultats d'essai doit être inférieure ou égale à la limite de reproductibilité (R) [=2,8 x s_R] qui peut être généralement déduite par l'interpolation linéaire s_R à partir du Rapport.

NOTE 1 : Quand les résultats du test interlaboratoire le permettent, les valeurs r et R peuvent être indiquées comme des valeurs relatives (par exemple, pourcentage de la valeur moyenne déterminée) au lieu de valeurs absolues.

NOTE 2 : Quand le résultat final reporté dans l'étude est une moyenne obtenue à partir de plus d'une valeur, c'est-à-dire k plus grand que 1, la valeur de R doit être ajustée selon la formule suivante avant d'utiliser R pour comparer les résultats d'analyse de routine réalisées en simple exemplaire entre deux laboratoires :

$$R' = \{R^2 + r^2 (1 - [1/k])\}^{1/2}$$

Il faut réaliser des ajustements similaires dans le cas de résultats répétés constituants les valeurs finales pour s_R et RSD_R s'ils doivent être des paramètres reportés pour le contrôle de qualité.

NOTE 3 : La limite de répétabilité, r, peut être interprétée comme le degré d'accord à l'intérieur duquel deux résultats d'essai individuels d'un laboratoire doivent se trouver dans 95 % des cas. La limite de reproductibilité, R, peut être interprétée comme le degré d'accord à l'intérieur duquel deux résultats d'essai individuels réalisés dans différents laboratoires doivent se trouver dans 95 % des cas.

NOTE 4 : Les estimations de s_R peuvent être obtenues seulement à partir d'une étude de performance de méthode planifiée et organisée; les estimations de s_r peuvent être obtenues à partir du travail de routine dans un laboratoire en utilisant des cartes de contrôle. Pour des analyses occasionnelles, en l'absence de carte de contrôle, la fidélité intralaboratoire peut être évaluée approximativement comme la moitié de s_R (Pure and Appl. Chem., 62, 149-162 (1990), Sec. I.3. Note.).

A.2.6. Analyse de variance à un facteur

L'analyse de variance à un facteur est le procédé statistique pour obtenir des estimations de la variabilité intralaboratoire et interlaboratoire, matériau par matériau. Des exemples de calculs pour les plans à niveau unique et à niveau unique divisé une fois peuvent être trouvés dans la norme ISO 5725-1986.

APPENDICE 3. - VALEURS CRITIQUES

A.3.1. Valeurs critiques pour le rapport maximum des variances de Cochran au niveau de rejet 2,5 % (test unilatéral), exprimé en pourcentage de la variance la plus haute par rapport à la variance totale ; r = nombre de répétitions.

Nombre de lab.	r=2	r = 3	r=4	r = 5	r = 6
4	94.3	81.0	72.5	65.4	62.5
5	88.6	72.6	64.6	58.1	53.9
6	83.2	65.8	58.3	52.2	47.3
7	78.2	60.2	52.2	47.3	42.3
8	73.6	55.6	47.4	43.0	38.5
9	69.3	51.8	43.3	39.3	35.3
10	65.5	48.6	39.9	36.2	32.6
11	62.2	45.8	37.2	33.6	30.3
12	59.2	43.1	35.0	31.3	28.3
13	56.4	40.5	33.2	29.2	26.5
14	53.8	38.3	31.5	27.3	25.0
15	51.5	36.4	29.9	25.7	23.7
16	49.5	34.7	28.4	24.4	22.0
17	47.8	33.2	27.1	23.3	21.2
18	46.0	31.8	25.9	22.4	20.4
19	44.3	30.5	24.8	21.5	19.5
20	42.8	29.3	23.8	20.7	18.7
21	41.5	28.2	22.9	19.9	18.0
22	40.3	27.2	22.0	19.2	17.3
23	39.1	26.3	21.2	18.5	16.6
24	37.9	25.5	20.5	17.8	16.0
25	36.7	24.8	19.9	17.2	15.5
26	35.5	24.1	19.3	16.6	15.0
27	34.5	23.4	18.7	16.1	14.5
28	33.7	22.7	18.1	15.7	14.1
29	33.1	22.1	17.5	15.3	13.7
30	32.5	21.6	16.9	14.9	13.3
35	29.3	19.5	15.3	12.9	11.6
40	26.0	17.0	13.5	11.6	10.2
50	21.6	14.3	11.4	9.7	8.6

Les tableaux A.3.1. et A.3.3. ont été calculés par R. Albert (Octobre 1993) par simulation à l'ordinateur avec plusieurs passages d'environ 7000 cycles chacun pour chaque valeur, et ont été ensuite lissés. Bien que le tableau A.3.1. ne soit strictement applicable qu'à un plan équilibré (même nombre de répétitions pour

tous les laboratoires) il peut être appliqué à un plan non équilibré sans trop d'erreurs, s'il y a seulement quelques déviations.

A.3.2. Calcul du rapport de variance maximum de Cochran pour rejeter les résultats aberrants

Entrer dans l'ordinateur la variance intralaboratoire pour chaque laboratoire et diviser la plus grande de ces variances par la somme de toutes les variances et multipliez par 100. Le quotient résultant est la statistique de Cochran qui indique la présence d'un résultat aberrant à retirer si ce quotient excède la valeur critique indiquée dans la table de Cochran donnée ci-dessus pour le nombre de répétitions et laboratoires spécifiés.

A.3.3. Valeurs critiques pour les tests des résultats aberrants de Grubbs au niveau de rejet 2,5 % (test bilatéral), 1,25 % (test unilatéral), exprimé par le pourcentage de diminution des écart-type résultant de l'enlèvement de la (des) valeurs(s) suspectes.

Nombre de Laboratoires	Une valeur, la plus haute ou la plus basses	Deux valeurs, les plus hautes ou les plus basses	Une valeur la plus haute et une la plus basse
4	86.1	98.9	99.1
5	73.5	90.9	92.7
6	64.0	81.3	84.0
7	57.0	73.1	76.2
8	51.4	66.5	69.6
9	46.8	61.0	64.1
10	42.8	56.4	59.5
11	39.3	52.5	55.5
12	36.3	49.1	52.1
13	33.8	46.1	49.1
14	31.7.	43.5	46.5
15	29.9	41.2	44.1
16	28.3	39.2	42.0
17	26.9	37.4	40.1
18	25.7	35.9	38.4
19	24.6	34.5	36.9
20	23.6	33.2	35.4
21	22.7	31.9	34.0
22	21.9	30.7	32.8
23	21.2	29.7	31.8
24	20.5	28.8	30.8
25	19.8	28.0	29.8
26	19.1	27.1	28.9
27	18.4	26.2	28.1
28	17.8	25.4	27.3
29	17.4	24.7	26.6
30	17.1	24.1	26.0

40	13.3	19.1	20.5
50	11.1	16.2	17.3

A.3.4. Calcul des valeurs du test de Grubbs

Pour calculer la statistique du test de Grubbs pour les valeurs uniques, entrer dans l'ordinateur la moyenne de chaque laboratoire et calculer l'écart-type (SD) de ces L moyennes (désigné par s à l'origine). Calculer l'écart-type de l'ensemble des moyennes en enlevant la moyenne la plus haute (s_H) ; calculer l'écart-type de l'ensemble des moyennes en enlevant la moyenne la plus basse (S_L). Le calcul de la diminution de l'écart-type en pourcentage, pour les deux est :

$$100 \times [1 - (s_L/s] \text{ et } 100 \times [1 - s_H/s]$$

La diminution la plus forte obtenue pour ces deux calculs est la statistique de Grubbs pour les valeurs uniques, qui signale la présence d'un résultat aberrant qu'il faut enlever pour un niveau P = 2,5 %, en test bilatéral, si sa valeur excède la valeur critique tabulée dans la colonne 2 de la table A.3.3., pour le nombre de moyennes de laboratoire utilisé pour calculer la valeur d'origine s.

Pour calculer la statistique dans le test de Grubbs pour les paires, calculer le pourcentage de diminution de l'écart-type en enlevant les deux moyennes les plus hautes, et aussi les plus basses, comme ci-dessus. Comparer le pourcentage de changement de l'écart-type le plus élevé avec les valeurs tabulées de la colonne 3 et procédez selon (1) ou (2) :

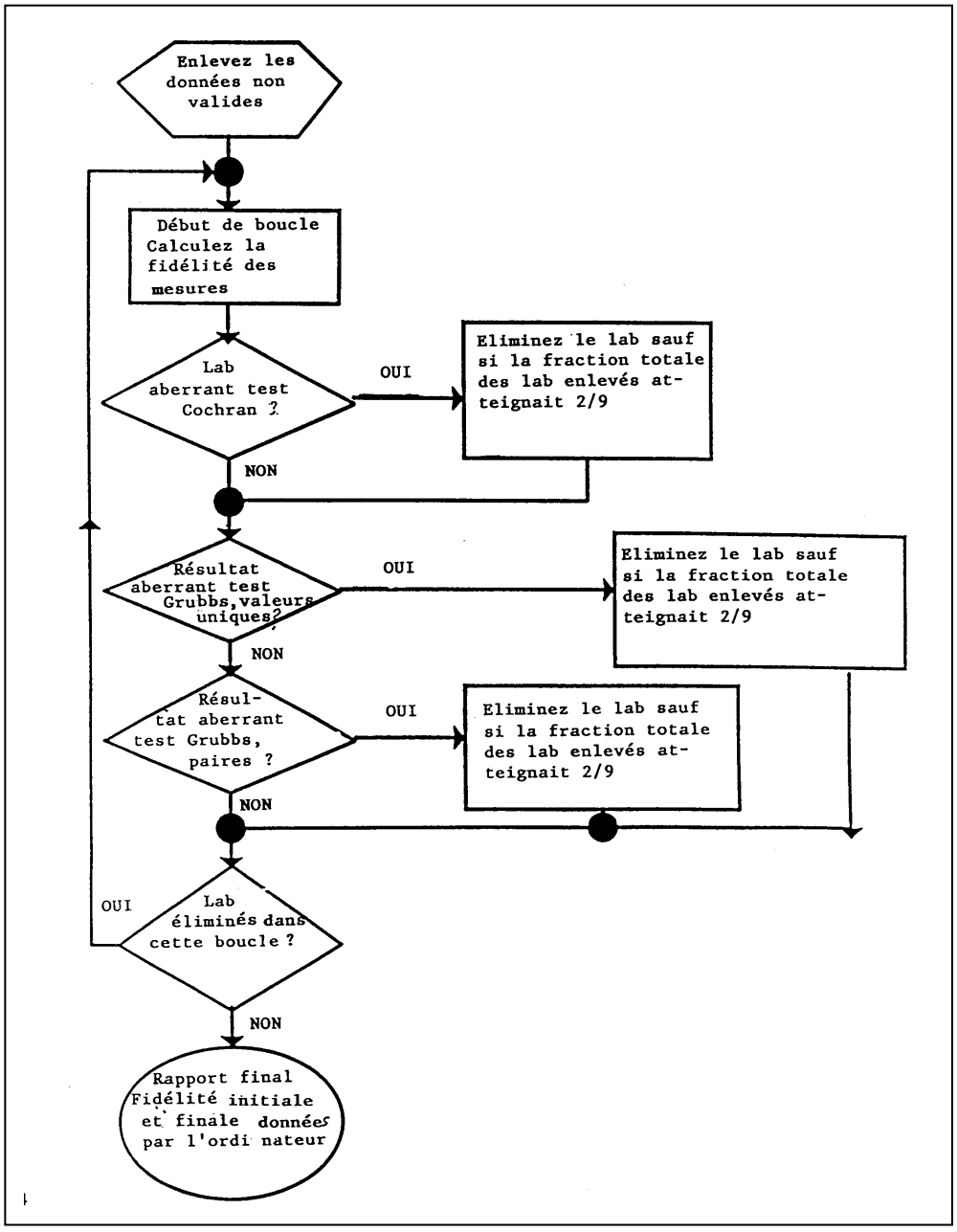
(1) Si la valeur tabulée est dépassée, enlevez la paire responsable. Recommencer le cycle en partant au début avec le test de Cochran de variance extrême, le test de Grubbs de la valeur extrême, et le test de Grubbs de la valeur extrême pour les paires.

(2) Quand les valeurs suivantes ne sont plus enlevées, calculer le pourcentage de changement de l'écart-type obtenu en rejetant à la fois et ensemble la valeur extrême la plus haute et la valeur extrême la plus basse et comparer avec les valeurs tabulées de la dernière colonne de A.3.3. Si la valeur tabulée est dépassée, enlevez la paire haute-basse des moyennes, et recommencer le cycle avec le test de Cochran jusqu'à ce que des valeurs suivantes ne soient plus enlevées. Dans tous les cas, arrêter le test des résultats aberrants lorsque plus de 22,2 % (2/9) des moyennes sont enlevées.

APPENDICE 4

A.4.1. Diagramme pour enlever les valeurs aberrantes

IUPAC 1994 PROCEDURE STATISTIQUE HARMONISÉE



Estimation de la limite de détection et de quantification d'une méthode d'analyse

(Résolution OENO 7/2000)

1 - Objet : établir la limite de détection et la limite de quantification d'une méthode.

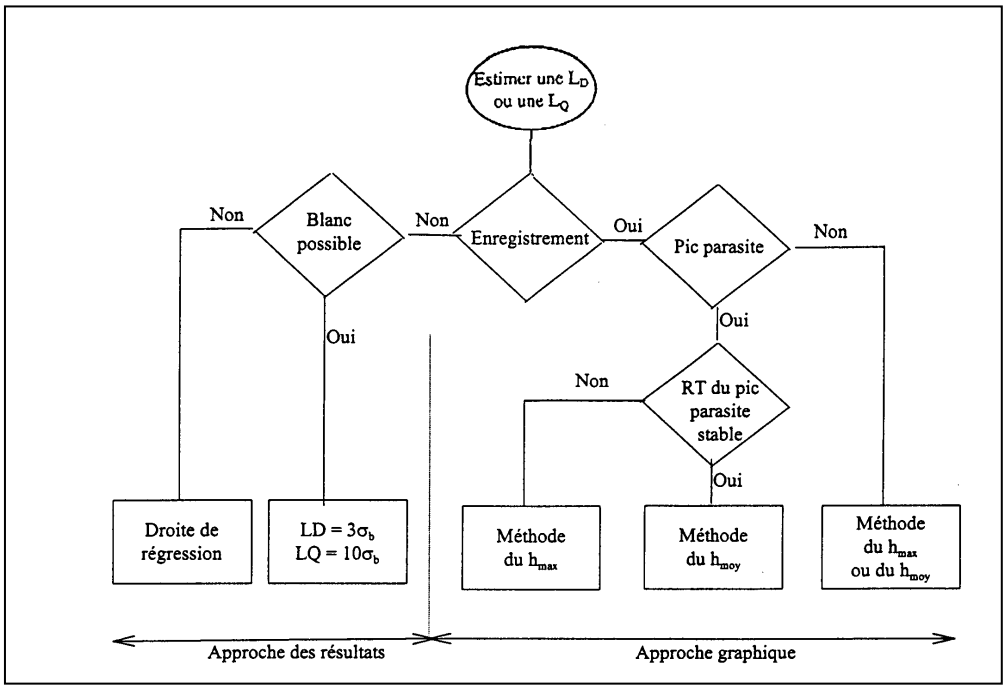
Remarque : Le calcul proposé établit des valeurs « limites de détection et de quantification » relatives à la réponse instrumentale. Pour une méthode donnée, le calcul final de ces valeurs doit prendre en compte les facteurs provenant de la préparation de l'échantillon

2 - Définitions :

- la limite de détection est la plus petite concentration ou teneur de l'analyte pouvant être détectée, avec une incertitude acceptable, mais non quantifiée dans les conditions expérimentales décrites de la méthode ;

- la limite de quantification est la plus petite concentration ou teneur de l'analyte pouvant être quantifiée, avec une incertitude acceptable, dans les conditions expérimentales décrites de la méthode.

3 - Logigramme de décision



4 - Méthodologie

4 1. *Approche "résultats"*

Quand la méthode d'analyse ne fournit pas un enregistrement graphique, mais seulement des valeurs chiffrées (ex colorimétrie); la limite de détection (L_D) et la limite de quantification (L_Q), sont estimées à l'aide d'une des deux méthodes ci-dessous.

4.1.1. Méthode 1 :

Lecture directe de n mesures (réponse ou grandeur de l'analyte) de blancs d'analyse indépendants sur des échantillons contenant l'ensemble des constituants, à l'exception de la substance à rechercher.

$$L_D = m_{blanc} + 3\ S_{blanc,}\ \text{et}$$
$$L_Q = m_{blanc} + 10\ S_{blanc,}\ \text{avec}$$

où m_{blanc} et S_{blanc} la moyenne et l'écart-type sur les n mesures de blancs.

Note : Le facteur multiplicatif 3 correspond à un risque de 0,13 % de conclure à la présence de la substance recherchée alors qu'elle est absente ; celui de 10, à 0,5°/oo.

4.1.2 - Méthode 2 :

Utilisation de la droite d'étalonnage : $Y = a + b\ X$

La limite de détection est la plus petite concentration que l'on peut distinguer du blanc avec un risque de 0,13 % de garder des échantillons ne contenant rien. C'est-à-dire la valeur à partir de laquelle un test statistique de comparaison de la réponse à la valeur 0 devient significatif avec un risque d'erreur α de 0,13 %. D'où :

$$Y_{LD} = a + 3\ S_a$$
$$X_{LD} = (a + 3\ S_a) / b$$

avec S_a l'écart-type sur l'ordonnée à l'origine de la droite de régression. Le raisonnement est le même pour L_Q où le facteur de mutiplication est 10 (risque a de 0,5°/oo).

4.2 - *approche "graphique"*

Pour la méthode d'analyse qui fournit un enregistrement graphique (ex : chromatographie) ; la limite de détection est estimé à partir du bruit de fond de l'enregistrement de blanc d'analyse sur un échantillon.

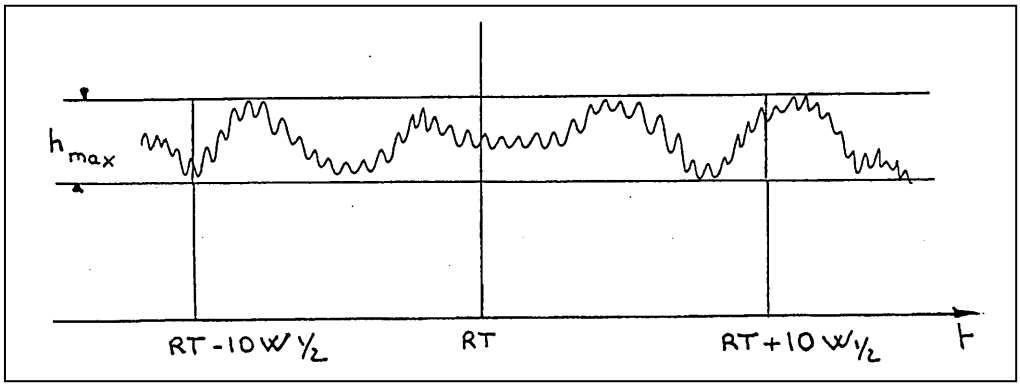
$L_D = 3 \times h \times R$ (le rique associé reste inférieur à 0,13 %), et
$L_Q = 10 \times h \times R$ (le rique associé reste inférieur à 0,5°/oo), avec

- h l'amplitude moyenne ou maximum du signal sur une fenêtre correspondant à 10 largeurs du pic à mi-hauteur de part et d'autre du temps de rétention selon la stabilité.

- R le facteur de réponse quantité/signal, exprimée en quantité matière/hauteur.

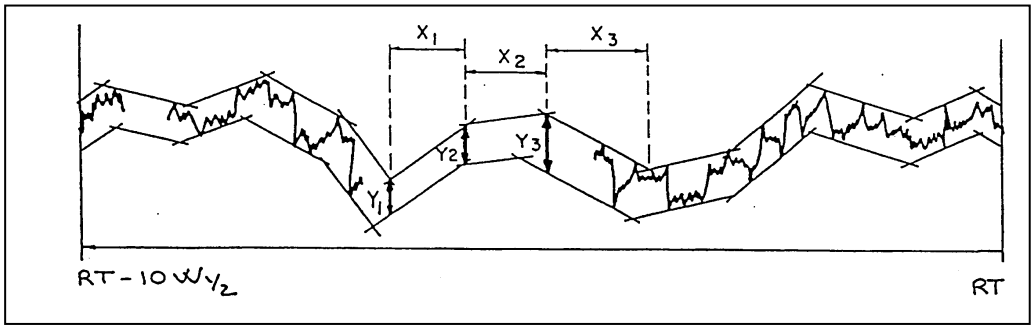
A chaque fois, trois séries de trois injections sont réalisées sur des blancs à plusieurs jours d'intervalle.

4.2.1 - méthode du h_{max}



- agrandir au maximum le bruit de fond (figure 1 ci-dessus) ;
- centrer sur le temps de rétention du produit (RT) ;
- dessiner une fenêtre de 10 largeurs du pic à mi-hauteur (W ½) de part et d'autre du RT;
- tracer deux parallèles passant l'une par le sommet du pic le plus élevé, l'autre par la base de la vallée la plus profonde;
- évaluer la hauteur $\rightarrow h_{max}$;
- calculer le facteur de réponse (facteur R) ;
- $L_{Dmax} = 3 \times h_{max} \times R$.
- $L_{Qmax} = 10 \times h_{max} \times R$

4.2.2 - méthode du h_{moyen}



- agrandir au maximum le bruit de fond (figure 2 ci-dessus) ;

- centrer sur le temps de rétention du produit (RT);
- prendre une fenêtre de 10 largeurs de pic à mi-hauteur de part et d'autre du RT;
- découper en 20 tranches égales (x) ;
- tracer deux parallèles, dans chaque bloc, l'une passant par le sommet du pic le plus élevé, l'autre par la base de la vallée la plus profonde ;
- mesurer les hauteurs y ;
- calculer la moyenne ($\overline{y} = h_{moyen}$) ;
- calculer le facteur de réponse (Facteur R) ;
- $L_{Dmoy} = 3 \times h_{moy} \times R$.
- $L_{Qmoy} = 10 \times h_{moy} \times R$.

Ces estimations peuvent elles-mêmes être validées en injectant des quantités de soluté proches des limites calculées (Figures n°3 et 4).

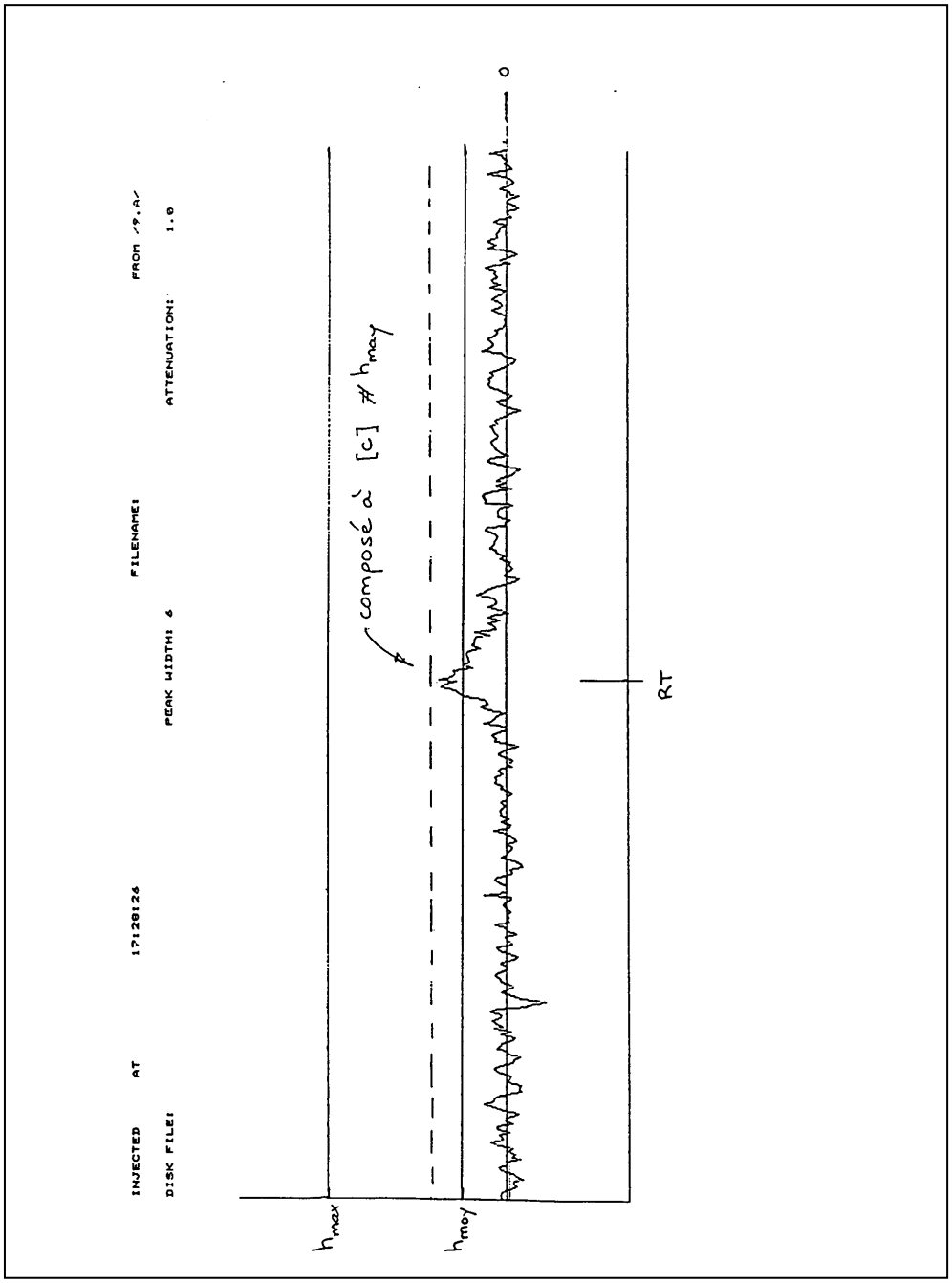


Figure n°3 : validation des calcul de limitesconcentration du composé proche du H_{moy}

NOTE : La ligne pointillée correspond à la valeur réelle injectée.

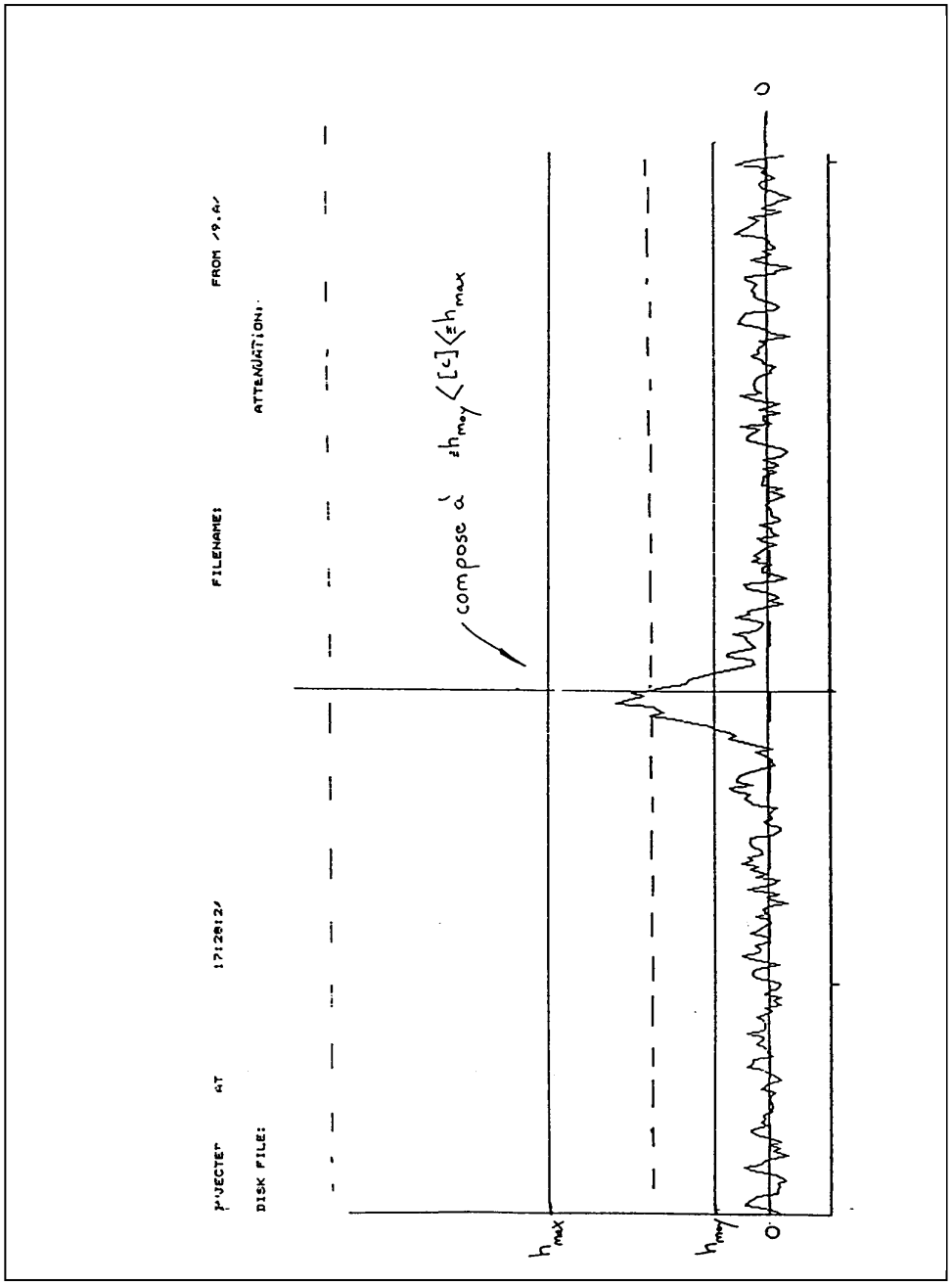


Figure n°4 : validation des calcul de limites concentration du composé comprise entre le H_{moy} et le H_{max}

NOTE : La ligne pointillée correspond à la valeur réelle injectée.

Recommandations harmonisees pour le contrôle interne de qualité dans les laboratoires d'analyse

(Résolution OENO 19/2002)

CONTENU

1. INTRODUCTION
- **1.1 Concepts de base**
- **1.2. Domaine d'application de ce document**
- **1.3. CIQ et incertitude**

2. DEFINITIONS
- **2.1. Définitions internationales**
- **2.2. Définitions de termes spécifiques à ce document**

3. PRATIQUES DE L'ASSURANCE DE QUALITE ET DU CONTROLE INTERNE DE QUALITE
- **3.1. Assurance de qualité**
- **3.2. Choix de la méthode analytique**
- **3.3. Contrôle de qualité et tests d'aptitude**

4. PROCEDURES DE CONTROLE INTERNE DE QUALITE
- **4.1. Introduction**
- **4.2. Approche générale. Contrôle statistique**
- **4.3. CIQ et adéquation au but recherché**
- **4.4. Nature des erreurs**

5. CIQ ET FIDELITE INTRA-SERIE
- **5.1. Fidélité et duplication**
- **5.2. Interprétation de données dupliquées**

6. MATERIAUX DE CONTROLE DANS LE CIQ
- **6.1. Introduction**
- **6.2. Rôle des matériaux de référence certifiés**
- **6.3. Préparation des matériaux de contrôle**
- **6.4. Détermination des blancs**
- **6.5. Traçabilité des surcharges et vérification des recouvrements**

7. RECOMMANDATIONS

8. CONCLUSIONS

9. REFERENCES

APPENDICE 1. CARTES DE CONTROLE DE SHEWHART

1. INTRODUCTION

1.1 Concepts de base.

Ce document donne des recommandations permettant de mettre en oeuvre le contrôle interne de qualité (CIQ) dans les laboratoires d'analyse. Le CIQ est l'une des mesures parmi un ensemble de mesures que les analystes peuvent prendre pour s'assurer que les résultats produits dans le laboratoire conviennent à l'usage auquel ils sont destinés. En pratique, cette adéquation à l'usage est déterminée en comparant l'exactitude obtenue dans un laboratoire à un temps donné au niveau requis d'exactitude. Le contrôle interne de qualité comprend donc les procédures pratiques de routine qui permettent à l'analyste d'accepter un résultat ou un groupe de résultats comme adapté à l'usage, ou de rejeter les résultats et répéter l'analyse. Ainsi, le CIQ est un facteur important de la qualité des résultats d'analyse et reconnu en tant que tel par les organismes d'accréditation.

Le CIQ est réalisé en incluant des matériaux de référence particuliers, ici appelés "matériaux de contrôle" dans la séquence analytique et en dupliquant les analyses. Les matériaux de contrôle devraient, si possible, être représentatifs des matériaux à analyser d'un point de vue composition de la matrice, état de préparation physique et être situés dans la gamme de concentration de l'analyte. Comme les matériaux de contrôle sont traités exactement de la même manière que les matériaux à analyser, ils sont considérés comme des substituts qui peuvent être utilisés pour caractériser la performance du système analytique, à la fois à un temps donné et sur des périodes de temps plus longues.

Le CIQ est une vérification finale de l'exécution correcte de toutes les procédures (y compris l'étalonnage) qui sont prescrites dans le protocole d'analyse et de toutes les autres mesures d'assurance de qualité qui sous entendent une bonne pratique d'analyse. Le CIQ est donc nécessairement rétrospectif. Il est aussi exigé qu'il soit autant que possible indépendant du protocole analytique et en particulier de l'étalonnage qu'il a pour but de tester.

De façon idéale, les matériaux de contrôle et ceux utilisés pour l'étalonnage devraient être tous deux raccordés à des matériaux de référence certifiés appropriés ou à une méthode de référence basée sur l'expérience. Quand cela n'est pas possible, les matériaux de contrôle devraient être raccordés au moins à un matériau de pureté garantie ou à tout autre matériau bien caractérisé. Mais, les deux voies de raccordement ne doivent pas se rejoindre à une étape trop lointaine dans le processus analytique. Par

exemple, si les matériaux de contrôle et les étalons étaient préparés à partir d'une seule solution mère d'analyte, le CIQ ne détecterait pas une inexactitude provenant d'une préparation incorrecte de la solution mère.

Il est commun d'analyser plusieurs ou peut-être de nombreux matériaux d'essais similaires ensemble et d'inclure des matériaux de contrôle dans la série. Souvent les dosages seront dupliqués en analysant des prises d'essai du même matériau. Dans ce document, un tel groupe de matériaux sera appelé "série" analytique. (Les mots "séquence", "ensemble" ou "lot" ont été aussi utilisés comme synonymes de "série"). Ces séries sont considérées comme si elles étaient analysées dans des conditions effectivement constantes. Les lots de réactifs, réglages de l'appareillage, l'analyste et l'environnement du laboratoire resteront dans des conditions idéales, inchangées au cours de l'analyse d'une série. Les erreurs systématiques devraient donc rester constantes ainsi que les valeurs des paramètres qui décrivent les erreurs aléatoires, pendant l'analyse d'une série. Tant qu'il s'agit de suivre ces erreurs, la "série" est l'unité opérationnelle de base du CIQ.

On considère qu'une série est effectuée dans des conditions de répétabilité, c'est-à-dire que les erreurs aléatoires de mesure sont de l'ordre de grandeur de celles qui seraient rencontrées dans une courte période de temps. En pratique, l'analyse d'une série peut prendre suffisamment de temps pour que de petites erreurs systématiques se produisent. Par exemple, les réactifs peuvent se dégrader, les appareils peuvent dériver, des ajustages mineurs des valeurs instrumentales peuvent être nécessaires, ou la température du laboratoire peut s'élever. Cependant, ces effets systématiques sont dans le cadre du CIQ englobés dans les variations de répétabilité. En plaçant les matériaux constituant une série dans un ordre aléatoire les effets de la dérive sont transformés en erreur aléatoire.

1.2 Domaine d'application de ce document.

Ce document est une harmonisation des procédures de CIQ qui se sont développées dans divers domaines de l'analyse, notamment en biochimie clinique, géochimie et dans les études environnementales, l'hygiène professionnelle et l'analyse alimentaire[3-9]. Il y a beaucoup de points de base communs dans les procédures utilisées dans ces divers domaines. La chimie analytique recouvre d'ailleurs un domaine d'activités encore plus large et les principes de base du CIQ devraient être capables de les englober toutes. Ce document fournit les recommandations qui seront applicables dans la plupart des cas. Cette politique exclut nécessairement

un certain nombre de pratiques réservées à des secteurs particuliers de la communauté analytique. De plus, dans quelques secteurs il est commun de combiner le CIQ tel qu'il est défini ici avec d'autres aspects de la pratique de l'assurance de qualité. Il n'y a pas de danger dans une telle combinaison, mais les aspects essentiels du CIQ doivent rester clairs.

Pour réaliser une harmonisation et fournir un guide de base sur le CIQ, quelques types d'activité analytique ont été exclus de ce document. Les points spécifiquement exclus sont :

(i) *Le contrôle de qualité de l'échantillonnage.* Tandis qu'il est reconnu que la qualité du résultat analytique peut être inférieure à celle de l'échantillon, le contrôle de qualité de l'échantillonnage constitue un sujet séparé et dans beaucoup de domaines n'est pas pleinement développé. De plus, dans de nombreux cas, les laboratoires d'analyse n'ont pas de contrôle sur la pratique et la qualité de l'échantillonnage.

(ii) *L'analyse en ligne et suivi continu.* Dans ce type d'analyse il n'est pas possible de répéter la mesure, et le concept de CIQ tel qu'il est utilisé dans ce document n'est pas applicable.

(iii) *Le CIQ multivarié*. Les méthodes multivariées en CIQ sont encore un sujet de recherche et ne peuvent être considérées comme suffisamment établies pour être incluses ici. Le document actuel considère les données "multianalyses" comme exigeant une série de tests de CIQ univariés. Il faudra faire attention à l'interprétation de ce type de données pour éviter un rejet fréquent inapproprié des données.

(iv) *Exigences statutaires et contractuelles*.

(v) Les *mesures d'assurance de qualité* telles que les vérifications de la stabilité des instruments avant et pendant l'analyse, l'étalonnage en longueur d'onde, l'étalonnage de la balance, les tests de résolution des colonnes chromatographiques et le diagnostic
des problèmes ne sont pas inclus. Dans le cadre envisagé, ils sont considérés comme faisant partie du protocole d'analyse, et le CIQ teste leur efficacité en même temps que les autres aspects de la méthodologie.

1.3 CIQ et incertitude.

Un pré-requis de la chimie analytique est de reconnaître l'adéquation au but recherché, le niveau d'exactitude requis pour une utilisation efficace des données analytiques. Ce niveau est atteint en considérant les usages prévus des données, bien qu'il soit rarement possible de prévoir la totalité des applications potentielles futures des résultats analytiques. Pour cette raison et pour éviter une interprétation inappropriée, il est important que les résultats analytiques soient accompagnés de leur incertitude ou qu'elle soit facilement disponible pour ceux qui veulent utiliser les données.

A strictement parler, un résultat d'analyse ne peut pas être interprété sauf s'il est accompagné de son incertitude associée à un niveau de confiance donné. Un simple exemple démontre ce principe. Supposons qu'il y ait une exigence statutaire disant qu'un aliment ne doit pas contenir plus que 10 $\mu g.g^{-1}$ d'un constituant particulier. Un fabricant analyse un lot et obtient un résultat de 9 $\mu g.g^{-1}$ de ce constituant. Si l'incertitude du résultat exprimée en demi-intervalle (en présumant qu'il n'y a pas d'erreur d'échantillonnage) est de 0,1 $\mu g.g^{-1}$ (c'est-à-dire que le résultat se situe avec une probabilité élevée dans l'intervalle 8,9 - 9,1), on peut alors supposer que la limite légale n'est pas dépassée. Si au contraire l'incertitude est de 2 $\mu g.g^{-1}$ il n'y a pas une telle assurance. L'interprétation et l'usage qui peuvent être faits de la mesure dépendent de l'incertitude qui lui est associée.

Les résultats analytiques devront donc être accompagnés d'une incertitude si on doit leur attacher un sens défini ou si on doit faire une interprétation documentée. Si cette exigence ne peut pas être satisfaite, l'utilisation des résultats est limitée. Il faudra aussi tester que l'incertitude de mesure requise est atteinte en routine, la qualité des données pouvant varier à la fois dans un même laboratoire au cours du temps et entre différents laboratoires. Le CIQ inclut le processus de vérification que l'incertitude exigée est accomplie dans une série.

2. DEFINITIONS

2.1. Définitions internationales.

Assurance de qualité : toutes les actions planifiées et systématiques nécessaires pour fournir la confiance adéquate qu'un produit ou service satisfera aux exigences données de qualité(10).

Justesse : étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une grande série de résultats expérimentaux d'un test et une valeur acceptée comme valeur de référence(11).

Fidélité : étroitesse de l'accord entre les résultats d'essais indépendants obtenus dans des conditions prescrites(12).

Biais : différence entre l'espérance de résultats d'essai et une valeur acceptée comme référence.

Exactitude : étroitesse d'accord entre le résultat d'un mesurage et une valeur vraie du mesurande(13).

Note 1. L'exactitude est un concept qualitatif.
Note 2. Le terme *"précision"* ne doit pas être utilisé pour *"exactitude"*.

Erreur : résultat d'un mesurage moins une valeur vraie du mesurande(13).

Conditions de répétabilité : conditions où des résultats d'essai sont obtenus avec la même méthode sur des échantillons d'essai identiques dans le même laboratoire par le même opérateur utilisant le même appareillage, dans un court intervalle de temps(11).

Incertitude de mesure : paramètre, associé avec le résultat d'une mesure, qui caractérise la dispersion des valeurs qui pourraient être raisonnablement attribuées au mesurande(14).

Note 1. Le paramètre peut être, par exemple un écart-type (ou un multiple de celui-ci) ou la demi-largeur d'un intervalle à un niveau de confiance déterminé.

Note 2. L'incertitude de mesure comprend en général plusieurs composantes. Certaines peuvent être évaluées à partir de la distribution statistique des résultats d'une série de mesurages et peuvent être caractérisées par des écarts-types expérimentaux. Les autres composantes qui peuvent aussi être caractérisées par des écarts-types, sont évaluées à partir de distributions présumées de probabilité basées sur l'expérience acquise ou sur d'autres informations.

Note 3. Il est entendu que le résultat d'un mesurage est la meilleure estimation de la valeur d'un mesurande et que toutes les composantes de l'incertitude, y compris celles qui proviennent d'effets systématiques, telles que les composantes associées aux corrections et aux étalons de référence, contribuent à la dispersion.

Traçabilité : propriété du résultat d'un mesurage ou d'un étalon tel qu'il puisse être relié à des références déterminées, généralement des étalons nationaux ou internationaux par l'intermédiaire d'une chaîne ininterrompue de comparaisons ayant toutes des incertitudes déterminées.

Matériau de référence : matériau ou substance dont une ou plusieurs valeurs de la (des) propriété(s) est (sont) suffisamment homogène(s) et bien définie(s) pour permettre de l'utiliser pour l'étalonnage d'un appareil, l'évaluation d'une méthode de mesurage, ou l'attribution de valeurs aux matériaux.

Matériau de référence certifié : matériau de référence, accompagné d'un certificat, dont une (ou plusieurs) valeur(s) de la (des) propriété(s) a une réalisation exacte de l'unité dans laquelle les valeurs de propriété sont exprimées et pour laquelle chaque valeur certifiée est accompagnée d'une incertitude à un niveau de confiance indiqué.

2.2 Définitions de termes spécifiques à ce document.

Contrôle interne de qualité : ensemble de procédures entreprises par le personnel du laboratoire pour suivre en continu les opérations et les résultats de mesurages afin de décider si les résultats sont suffisamment fiables pour être délivrés.

Matériau de contrôle : matériau utilisé pour le contrôle de qualité interne et soumis à tout ou partie de la même procédure de mesurage que celle utilisée pour les matériaux à analyser.

Série (série analytique) : ensemble de mesurages réalisés dans des conditions de répétabilité.

Adéquation à l'usage : degré auquel les données produites par un processus de mesurage permet à l'utilisateur de prendre des décisions correctes d'un point de vue technique et administratif pour un usage indiqué.

Système analytique : ensemble de circonstances qui contribuent à la qualité des données analytiques, y compris l'appareillage, les réactifs, procédures, matériaux d'analyse, personnel, environnement et mesure de l'assurance qualité.

3. PRATIQUES DE L'ASSURANCE DE QUALITE ET DU CONTROLE INTERNE DE QUALITE

3.1 Assurance de qualité

L'assurance de qualité est l'infrastructure d'organisation essentielle qui assure que toutes les mesures analytiques sont fiables. Elle a pour rôle de réaliser des niveaux de qualité appropriés dans des domaines comme la formation et la gestion du personnel, l'adéquation de l'environnement du laboratoire, la sécurité, le stockage, l'intégrité et l'identité des échantillons, la conservation des enregistrements, la maintenance et l'étalonnage des instruments, et l'utilisation de méthodes techniquement validées et convenablement documentées. Une défaillance dans l'un de ces secteurs pourrait anéantir des efforts importants faits par ailleurs pour atteindre la qualité désirée des données. Ces pratiques ont été récemment codifiées et reconnues formellement comme essentielles. En effet la prédominance de ces circonstances favorables ne permet en aucun cas d'assurer que la qualité des données a été atteinte, à moins que le CIQ ne soit effectué.

3.2 Choix de la méthode analytique.

Il est important que les laboratoires limitent leur choix aux méthodes qui ont été caractérisées comme adaptées à la matrice et l'analyte considéré. Le laboratoire doit posséder la documentation décrivant les caractéristiques de performance de la méthode, estimées dans des conditions appropriées.

L'emploi d'une méthode ne garantit pas en lui-même que les caractéristiques de performances établies soient achevées. Une méthode donnée a seulement un potentiel pour atteindre un certain degré de fiabilité quand la méthode est appliquée dans un ensemble particulier de circonstances. C'est l'ensemble de ces circonstances, appelé "système analytique" qui est responsable de l'exactitude des données analytiques. Il est donc important de suivre le "système analytique" pour qu'il ait un fonctionnement adapté à l'usage. C'est le but des mesures du CIQ entreprises dans un laboratoire.

3.3 Contrôle de qualité et test d'aptitude.

Le test d'aptitude est une vérification périodique de la performance de laboratoires individuels ou de groupes de laboratoires. Il est réalisé par un organisme spécialisé indépendant qui distribue des matériaux types à des participants pour qu'ils les analysent sans supervision(2). La participation à des tests d'aptitude, bien qu'elle soit importante ne saurait se substituer à des mesures de CIQ ou vice versa.

Les tests d'aptitude peuvent être regardés comme normaux mais les contrôles sur les erreurs analytiques sont relativement rares. Sans le support d'un bon système de CIQ, la valeur de la participation à un test d'aptitude est insignifiante. Il est probable que l'effet bénéfique principal des tests d'aptitude est qu'il encourage les participants à installer des systèmes de contrôle de qualité. Il a été prouvé que les laboratoires avec des systèmes de CIQ avaient de meilleurs résultats dans les tests d'aptitude.

4. PROCEDURES DE CONTROLE INTERNE DE QUALITE

4.1. Introduction.

Le contrôle interne de qualité implique les étapes pratiques entreprises pour s'assurer que les erreurs dans les données analytiques sont d'un ordre de grandeur approprié à leur utilisation. La pratique du CIQ dépend de l'utilisation de 2 stratégies : l'analyse de matériaux de référence pour suivre la justesse et le contrôle statistique, et la duplication pour suivre la fidélité.

L'approche de base vers le CIQ implique l'analyse de matériaux de contrôle parallèlement aux matériaux d'essais à analyser. Le résultat des analyses de contrôle forme la base de la décision d'accepter les données de l'essai. Deux points clés doivent être notés dans ce contexte.

(i) L'interprétation des données du contrôle doit être basée sur des critères documentés, objectifs, et sur des principes statistiques quand cela est possible.

(ii) Les résultats des analyses de contrôle doivent être considérés en premier lieu comme des indicateurs de la performance du système analytique, et seulement ensuite comme un guide vers les erreurs associées aux résultats d'essais individuels. Des changements substantiels dans l'exactitude des dosages du contrôle peuvent quelquefois être pris comme indicateurs de changements similaires dans les données des matériaux d'essai analysés en parallèle mais ne peuvent être acceptés pour corriger des données analytiques.

4.2. Approche générale. Contrôle statistique.

L'interprétation des résultats des analyses du CIQ dépend beaucoup du concept de contrôle statistique, qui correspond à la stabilité de l'ensemble de l'opération. Le contrôle statistique implique qu'un résultat x de CIQ peut être considéré de manière indépendante et aléatoire comme provenant d'une population normale de moyenne μ et de variance $\sigma 2$.

Avec ces contraintes, seulement 0,27 % des résultats (x) se situeraient en dehors des limites $\mu \pm 3\sigma$. Quand on rencontre ces résultats extrêmes, on considère qu'ils sont "hors contrôle" et que le système analytique commence à se comporter différemment. La perte du contrôle implique que l'exactitude des données produites par le système n'est pas connue et que l'on ne peut se baser sur ces données. Le système analytique doit être

examiné et doit être soumis à une action correctrice avant de réaliser d'autres analyses. La maitrise du contrôle statistique peut être suivie graphiquement avec les cartes de contrôle de Shewhart (voir appendice 1). Il est aussi possible d'utiliser une approche numérique équivalente, qui consiste à comparer les valeurs de $z = (x-\mu)/\sigma$ aux valeurs appropriées de l'écart-type normal.

4.3 CIQ et adéquation au but recherché.

Le processus du CIQ est en grande partie basé sur une description en terme de paramètres statistiques d'un système d'analyse fonctionnant dans des conditions opératoires normales. Les limites de contrôle sont donc basées sur les valeurs estimées de ces paramètres plutôt que sur des mesures dérivées de considérations d'adéquation à l'emploi. Les limites de contrôle doivent être plus étroites que les exigences de l'adéquation à l'emploi sinon l'analyse serait vaine.

Le concept de contrôle statistique n'est cependant pas approprié quand l'analyse dite *ad hoc* doit être entreprise. Dans l'analyse *ad hoc* les matériaux d'essai peuvent ne pas être familiers ou peuvent être rarement rencontrés, et les séries sont souvent constituées seulement de quelques matériaux d'essai. Dans ce cas, il n'y a pas de base statistique pour construire des cartes de contrôle. L'analyste doit utiliser les critères d'adéquation à l'emploi, les résultats historiques ou la conformité d'aspect du matériau d'essai pour juger de l'acceptabilité des résultats obtenus.

De toutes façons, il serait souhaitable d'avoir des méthodes agréées pour établir des critères quantitatifs permettant de caractériser l'adéquation à l'emploi. Malheureusement, c'est un des aspects les moins développés du C.I.Q. Dans des domaines d'application spécifiques, des recommandations peuvent émerger par consensus. Par exemple, dans les études de l'environnement il est généralement reconnu que des incertitudes relatives inférieures à 10 % en concentration d'analyte trace portent rarement à conséquence. En analyse alimentaire, la courbe d'Horwitz[16] est quelquefois utilisée comme appropriée pour établir le critère d'adéquation à l'usage. De tels critères ont été définis pour l'analyse clinique[17, 18]. Dans quelques domaines de géochimie appliquée, une approche systématique a permis d'établir des critères d'adéquation à l'emploi pour les fidélités d'échantillonnage et d'analyse. Cependant, il n'est pas possible de donner ici des recommandations dans ces domaines, et d'avancer des principes généraux répondant à des applications spécifiques.

4.4 Nature des erreurs.

On reconnait deux catégories principales d'erreurs analytiques, les erreurs aléatoires et les erreurs sur une longue période de temps qui affecte tous les résultats. Il est important de classer ces erreurs en catégories car elles ont des origines, des remèdes et des conséquences différentes pour interpréter les données.

Les erreurs aléatoires déterminent la fidélité des mesurages. Elles peuvent causer des déviations aléatoires positives et négatives des résultats autour de la valeur moyenne sous-jacente. *Les erreurs systématiques* correspondent à l'écart entre la valeur moyenne d'un grand nombre de déterminations et la valeur vraie. En ce qui concerne le CIQ, 2 niveaux d'erreurs systématiques doivent être considérés :

(i) Le *biais persistant* qui affecte le système analytique (pour un type donné de matériau d'essai) sur une longue période de temps et affecte tous les résultats. Un biais, s'il est petit par rapport à l'erreur aléatoire, peut être identifié seulement si le système analytique a fonctionné pendant longtemps. On peut tolérer un biais s'il reste dans des limites prescrites.

(ii) L'*effet de série* qui peut être mis en évidence par exemple par une déviation du système analytique pendant une série particulière. Cet effet, quand il est suffisamment grand, sera identifié par le contrôle de qualité, quand il se produit , comme une condition hors contrôle.

La division conventionnelle des erreurs entre erreurs aléatoires et erreurs systématiques dépend de l'échelle de temps sur laquelle on examine le système. Les effets de série d'origine inconnue peuvent être regardés à long terme comme la manifestation d'un processus aléatoire. La même variation pourra être considérée à court terme comme un changement assimilable à un biais qui affecte une série particulière.

Le modèle statistique utilisé pour le CIQ dans ce document est le suivant[16]. La valeur de mesurage (x) dans une série particulière est donnée par :

x = valeur vraie + biais persistant + effet de série + erreur aléatoire (+ erreur grossière).

[16] Le modèle pourrait être étendu si nécessaire pour inclure d'autres traits caractéristiques du système analytique.

La variance de x (σ^2_x) en l'absence d'erreurs grossières est donnée par :

$$\sigma^2_x = \sigma^2_0 + \sigma^2_1$$

avec

σ^2_0 = variance de l'erreur aléatoire (intra-série)

σ^2_1 = variance de l'effet de série

Les variances de la valeur vraie et du biais persistant sont toutes deux nulles. Un système analytique sous contrôle est entièrement décrit par σ^2_0, σ^2_1 et la valeur du biais persistant. Les erreurs grossières sont impliquées quand le système analytique ne correspond pas à ces conditions.

5. CIQ ET FIDELITE INTRA-SERIE

5.1 Fidélité et duplication.

Un contrôle limité de la fidélité intra-série est effectué en dupliquant les mesures faites sur les matériaux d'essai dans une séquence. L'objectif est de s'assurer que les différences entre des paires de résultats sont cohérentes ou meilleures que le niveau impliqué par la valeur $\sigma 0$ utilisée par un laboratoire pour le CIQ[17]. Ce test alerte l'utilisateur sur l'éventualité d'une fidélité intra-série faible et fournit une information supplémentaire pour interpréter les cartes de contrôle. La méthode est utile en particulier pour les analyses ad hoc où l'attention est concentrée sur une série unique et où l'information obtenue à partir des matériaux de contrôle n'est probablement pas complètement satisfaisante.

Comme approche générale, tous les matériaux d'essai ou une sélection aléatoire de ces matériaux, sont analysés en double. Les différences absolues | d | = | x1 - x2 | entre les résultats analytiques dupliqués x1 et x2

[17] Il n'est pas envisagé ici d'estimer l'écart-type de répétabilité σ r , à partir des données du CIQ ou de comparer les estimations : il y aurait en général trop peu de résultats pour un aboutissement satisfaisant. Si une telle estimation est nécessaire la formule $sr = \sqrt{\Sigma\ d^2} / 2n$ peut être utilisée.

sont testés par rapport à une limite supérieure de contrôle basée sur une valeur appropriée de $\sigma 0$. Par contre, si les matériaux d'essai dans la série couvrent un grand intervalle de concentration en analyte, une valeur unique de $\sigma 0$ ne peut être établie (19).

Les essais dupliqués pour le CIQ doivent refléter autant que possible la gamme de variation de la série. Ils ne doivent pas être analysés côte à côte dans la série, car ils mettraient en évidence seulement la plus petite mesure de variabilité analytique. La meilleure façon de placer les essais dupliqués est de les répartir de façon aléatoire dans chaque série. La duplication réalisée pour le CIQ exige l'analyse complète et indépendante (de préférence en aveugle) de prises d'essai de l'échantillon du matériau d'essai; une duplication de la mesure instrumentale d'une seule solution d'essai serait inefficace parce que les variations introduites par le traitement chimique préliminaire du matériau d'essai ne sont pas incluses.

5.2 Interprétation de données dupliquées.

5.2.1 *Intervalle étroit de concentration*.
Dans la situation la plus simple, les matériaux d'essai dans la série recouvrent un petit intervalle de concentration d'analyte de telle sorte qu'un écart-type commun σ_0 intra-série peut être appliqué.

Une valeur de ce paramètre doit être estimée pour fournir une limite de contrôle. La limite supérieure de $|d|$ pour 95 % est de $2\sqrt{2}\ \sigma_0$ et en moyenne seulement 3 résultats sur 1000 devraient dépasser $3\sqrt{2}\,\sigma_0$. Un groupe de n résultats dupliqués peuvent être interprétés de différentes façons.

Par exemple, la différence standardisée

$$z_d = \mathrm{d} / \sqrt{2}\,\sigma_0$$

devrait avoir une distribution normale avec une moyenne égale à zéro et un écart-type égal à l'unité. La somme d'un groupe de n résultats aurait un écart type $\sqrt{\mathrm{n}}$, et seulement 3 séries sur 1000 produiraient une valeur $|\Sigma z_d| > 3\sqrt{\mathrm{n}}$. Alternativement un groupe de *n* valeurs de z_d à partir d'une série peut être combiné pour former Σz^2_{d} et le résultat interprété comme un échantillon issu d'une distribution de χ^2 avec *n* degrés de liberté, (χ^2_{n}). Il faut cependant utiliser ce type de statistique avec précaution car elle est insensible aux résultats aberrants.

5.2.2 Large intervalle de concentration.
Si les matériaux d'essai constituant une série couvrent un large intervalle de concentration en analyte, un écart-type commun de fidélité (σ_0) ne peut être estimé; σ_0 doit être exprimé comme une relation qui dépend de la concentration. Pour un matériau particulier, la valeur de concentration utilisée est prise comme égale à $(x_1 + x_2)/2$, et une valeur appropriée de σ_0 est obtenue à partir de la relation fonctionnelle, dont les paramètres doivent être estimés à l'avance.

6. MATERIAUX DE CONTROLE DANS LE CIQ

6.1. Introduction.

Les matériaux de contrôle sont des substances caractérisées qui sont insérées dans la séquence à côté des matériaux d'essais et soumis exactement au même traitement. Un matériau de contrôle doit contenir une concentration appropriée de l'analyte, et une valeur de cette concentration doit être attribuée au matériau. Les matériaux de contrôle agissent comme des substituts pour les matériaux d'essai et doivent être donc représentatifs, c'est-à-dire devraient être soumis aux mêmes sources potentielles d'erreur. Pour être totalement représentatif, un matériau de contrôle doit avoir la même matrice en terme de composition globale, y compris les constituants mineurs qui peuvent avoir une influence sur l'exactitude. Il devrait être dans une forme physique c'est-à-dire état de division similaire aux

matériaux d'essais. Il y a d'autres caractéristiques essentielles pour un matériau de contrôle. Il doit être suffisamment stable sur la période de temps considérée. Il doit pouvoir être divisé en portions réellement identiques pour l'analyse. Il est souvent requis en grande quantité pour permettre son utilisation sur une période de temps étendue.

Les matériaux de référence en CIQ sont utilisés en association avec les cartes de contrôle qui permettent de rendre compte à la fois du biais persistant et des effets de série. Le biais persistant est mis en évidence par une déviation significative de la ligne centrale par rapport à la valeur assignée. La variation due à l'effet de série peut être prédite en terme d'écart-type quand le système est sous contrôle statistique, et cet écart-type est utilisé pour définir les limites d'action et d'alerte à partir d'un certain éloignement de la valeur vraie.

6.2 Rôle des matériaux de référence certifiés.

Les matériaux de référence certifiés (MRC) tels qu'il sont définis dans la section 2 (c'est-à-dire, avec indication de l'incertitude et de la traçabilité), quand ils sont disponibles et de composition appropriée, constituent les matériaux de contrôle idéaux parce que, d'un point de vue de traçabilité, ce sont les étalons ultimes de justesse(20). Dans le passé les MRC étaient considérés seulement à des fins de référence et non pour un usage de routine. Une approche plus actuelle est de les traiter comme produits de consommation et donc adaptés au CIQ.

Un tel emploi des MRC est cependant sujet à de nombreuses contraintes.

(i) Malgré un éventail sans cesse croissant de MRC disponibles, il n'existe pas de MRC disponibles bien adaptés pour la majorité des analyses.

(ii) Bien que le coût des MRC ne soit pas prohibitif par rapport au coût total des analyses, il peut être impossible pour un laboratoire ayant un grand éventail d'activités d'avoir en stock toutes les sortes de matériaux de référence nécessaires.

(iii) Le concept de matériau de référence n'est pas applicable aux matériaux si la matrice ou l'analyte sont instables.

(iv) Les MRC ne sont pas nécessairement disponibles en quantité suffisante pour approvisionner le CIQ sur de longues périodes de temps.

(v) Il doit être rappelé que tous les matériaux de références apparemment certifiés n'ont pas une qualité égale. Il est recommandé d'être prudent quand l'information portée sur le certificat est inadéquate.

Si pour une des raisons évoquées ci-dessus l'emploi d'un MRC n'est pas approprié, il incombe aux laboratoires individuels ou à des groupes de laboratoires de préparer leurs propres matériaux de contrôle et leur assigner des valeurs de concentration en analyte traçables[18] . Ces matériaux sont quelques fois appelés "matériaux de référence maison" (MRM). Une liste de suggestions pour préparer ces MRM est indiquée dans la section 6.3. Toutes les moyens décrits ne sont pas applicables à toutes les situations analytiques.

6.3 Préparation des matériaux de contrôle

6.3.1 Assignement d'une valeur vraie par analyse. En principe une valeur de travail peut être assignée à un matériau de référence stable simplement en effectuant une analyse soigneuse. Il sera nécessaire de prendre des précautions pour éviter que la valeur assignée soit biaisée. Cela nécessite une forme quelconque de vérification indépendante, par exemple l'analyse des matériaux par un certain nombre de laboratoires et l'utilisation si possible de méthodes basées sur des principes physico-chimiques différents. Le manque d'attention à une validation indépendante de matériaux de contrôle a été souligné comme une faiblesse des systèmes de CIQ(15).

Un moyen d'établir une valeur assignée traçable pour un matériau de contrôle est d'analyser avec répétition et dans un ordre aléatoire une série comprenant le matériau candidat et une sélection de MRC adaptés. Ce type d'action n'est approprié que si des quantités limitées de MRC sont disponibles. La composition de la matrice et les concentrations en analyte des MRC doivent être appropriées. Les MRC sont utilisésdirectement pour étalonner la procédure analytique et analyser le matériau de contrôle. Une méthode d'analyse appropriée est un pré-requis pour cette approche. Il serait dangereux, par exemple, qu'une fraction mineure et variable de l'analyte soit extraite pour la mesure. Il faut aussi considérer l'incertitude introduite dans la valeur assignée.

[18] Quand un MCR n'est pas disponible la traçabilité seulement à une méthode de référence ou à un lot de réactif fourni par un fabricant peut être nécessaire.

6.3.2 Des matériaux validés dans un test d'aptitude constituent une source valable de matériaux de contrôle. Ils correspondent à des matériaux analysés par de nombreux laboratoires utilisant diverses méthodes. Sauf contre-indications, telles qu'un biais évident ou une distribution de fréquence des résultats inhabituelle, le consensus des laboratoires pourrait être considéré comme une valeur assignée validée à laquelle il est possible d'attacher une incertitude fondée. (Il est possible que le consensus puisse souffrir d'un biais significatif, mais cette potentialité est toujours présente dans des valeurs de référence). Il y aurait un problème théorique pour établir la traçabilité d'une telle valeur, mais cela ne retire pas la validité de la procédure proposée. L'éventail de tels matériaux disponibles serait limité mais les organisateurs de tests d'aptitude pourraient assurer un approvisionnement important en préparant des lots de matériaux dépassant les exigences immédiates de l'analyse circulaire. Il faudrait prouver que les exigences normales de stabilité seront respectées.

6.3.3 Assignement d'une valeur vraie par formulation. Dans des cas favorables un matériau de contrôle peut être préparé simplement par mélange des constituants de pureté connue en quantités pré déterminées. Cette approche serait par exemple souvent satisfaisante dans le cas où le matériau de contrôle est une solution. Des problèmes sont souvent rencontrés dans la formulation pour produire des matériaux de contrôle solides dans un état physique satisfaisant ou pour assurer que la spéciation et la distribution physique de l'analyte dans la matrice sont réalistes. Il faut démontrer que les constituants sont mélangés de façon adéquate.

6.3.4 Matériaux de contrôle dopés.
Le "dopage" est un moyen de créer un matériau de contrôle dans lequel une valeur est assignée en combinant formulation et analyse. Cette méthode est faisable quand un matériau d'essai dépourvu totalement d'analyte est disponible. Après des vérifications analytiques exhaustives pour s'assurer que le niveau bruit de fond est suffisamment bas, le matériau est dopé avec une quantité connue d'analyte. L'échantillon de référence ainsi préparé a la même matrice que les matériaux d'essais à analyser et a un niveau d'analyte connu; l'incertitude dans la concentration qui lui est assignée est limitée seulement par l'erreur de dosage de l'échantillon non dopé. Cependant, il peut être difficile de s'assurer que la spéciation, la liaison et la forme physique de l'analyte sont identiques à celles de l'analyte sous sa forme native et que le mélange est adéquat.

6.3.5. Vérification de recouvrement.
Si l'emploi d'un matériau de référence n'est pas réalisable, il est possible d'utiliser un test de recouvrement pour vérifier de façon limitée le biais. Ceci est particulièrement utile quand les analytes ou matrices ne peuvent pas être stabilisés ou quand l'analyse *ad hoc* est exécutée. Une portion du matériau d'essai est dopée avec une quantité connue de l'analyte et analysée à côté du matériau d'essai d'origine. Le recouvrement d'analyte ajouté (appelé "recouvrement marginal") est la différence entre les deux mesures divisée par la quantité ajoutée. Les avantages évidents sont que la matrice est représentative et que l'approche est largement applicable - la plupart des matériaux d'essais peuvent être dopés par un moyen quelconque. Cependant la vérification du recouvrement souffre du désavantage déjà noté concernant la spéciation, liaison et distribution physique de l'analyte; en outre, l'hypothèse d'un recouvrement équivalent de l'analyte ajouté par dopage et de l'analyte natif peut ne pas être valide. On peut cependant normalement supposer qu'une mauvaise performance dans une vérification de recouvrement indique fortement une performance similaire ou plus mauvaise pour l'analyte natif dans le matériau d'essai.

Les tests de dopage et de recouvrement comme méthode du CIQ doivent être distingués de la méthode des ajouts dosés qui est un procédé de mesure; une seule surcharge pour le dopage ne peut être utilisée pour remplir les rôles à la fois de mesure et de CIQ.

6.4 Détermination des blancs

La détermination des blancs constitue presque toujours une partie essentielle du processus d'analyse et peut être effectuée sans inconvénient parallèlement au protocole de CIQ. La forme la plus simple du blanc est le "blanc réactif" où la procédure d'analyse est exécutée entièrement à l'exception de l'addition de l'échantillon. Ce type de blanc, en fait, teste plus que la pureté des réactifs; il peut par exemple détecter la contamination du système analytique quelle que soit son origine, (par exemple celle due à la verrerie et à l'atmosphère); il est donc mieux décrit comme un "blanc de la procédure". Dans quelques cas, les déterminations du blanc sont mieux réalisées en utilisant un matériau d'essai simulé. Le simulant pourrait être un matériau d'essai réel connu pour être virtuellement dépourvu d'analyte, ou un substitut (par exemple, un papier filtre sans cendre utilisé au lieu d'un matériau végétal). Quand il peut être

pratiqué, le meilleur type de blanc est le "blanc de terrain" qui est une matrice type avec une concentration nulle en analyte.

Une série incohérente de blancs dans une séquence suggère une contamination sporadique et peut être un argument de poids supplémentaire qui s'ajoute aux données du CIQ, suggérant le rejet de résultats. Quand un protocole d'analyse prescrit la soustraction d'une valeur de blanc, la valeur du blanc doit être également soustraite des résultats des matériaux de contrôle avant de les utiliser en CIQ.

6.5 Traçabilité des surcharges et vérification des recouvrements

Il faut se protéger des problèmes potentiels de traçabilité des réactifs utilisés pour les surcharges et vérifications de recouvrement. Quand les MRC ne sont pas disponibles, la traçabilité peut souvent être établie seulement sur le lot d'analyte fourni par le fabricant. Il faut alors confirmer l'identité et vérifier la pureté avant utilisation. Une précaution supplémentaire est que les étalons et la surcharge ne soient pas raccordés à la même solution mère d'analyte ou au même analyste. S'il existait une telle traçabilité commune, les sources d'erreur correspondantes ne seraient pas détectées par le CIQ.

7. RECOMMANDATIONS

Les recommandations suivantes représentent des approches intégrées au CIQ qui conviennent à beaucoup de types d'analyse et domaines d'application. Les directeurs de système de qualité du laboratoire devront adapter ces recommandations à leurs propres exigences particulières. Cette adaptation pourrait consister, par exemple, à ajuster le nombre d'échantillons dupliqués et de matériaux de contrôle insérés dans une série, ou à inclure des mesures supplémentaires pour un champ d'application particulier. La procédure finalement choisie et les règles de décision qui l'accompagnent doivent être codifiées dans un CIQ qui est séparé du protocole du système analytique.

L'approche pratique du contrôle de qualité est déterminée par la fréquence de réalisation du mesurage et la taille et nature de chaque série. Les recommandations suivantes sont donc faites. L'emploi de cartes de contrôle et de règles de décision sont données dans l'Appendice 1.

Dans chacun des cas suivants l'ordre dans lequel les divers matériaux sont analysés dans la séquence doit être aléatoire si possible. Un manquement à cet

ordre aléatoire peut donner lieu à une sous-estimation des diverses composantes de l'erreur.

(i) Séries courtes (par exemple , n < 20) et fréquentes de matériaux similaires. Ici l'intervalle de concentration d'analyte dans la série est relativement faible, aussi une valeur commune d'écart-type peut être présumée.

Insérez un matériau de contrôle au moins une fois par série. Portez soit les valeurs individuelles obtenues soit la valeur moyenne, sur une carte de contrôle appropriée. Analysez en double au moins la moitié des matériaux d'essais, choisis au hasard. Insérez au moins une détermination de blanc tous les dix échantillons d'essai.

(ii) Séries plus longues (par exemple n > 20) et fréquentes de matériaux similaires. Un écart type commun est également présumé.

Insérez les matériaux de contrôle à une fréquence d'environ 1 pour 10 matériaux d'essai. Si la taille de la série risque de varier d'une série à l'autre il est plus facile de standardiser avec un nombre fixe d'insertions par série et de porter la valeur moyenne sur une carte de contrôle de moyennes. Sinon reportez les valeurs individuelles. Analysez en double au moins 5 des matériaux d'essais choisis au hasard. Insérez une détermination de blanc tous les dix matériaux d'essai.

(iii) Séries fréquentes contenant des matériaux similaires mais ayant un grand intervalle de concentration en analyte. Ici nous ne pouvons pas présumer qu'une valeur unique d'écart-type est applicable.

Insérez les matériaux de contrôle en nombre total approximativement égal à ceux recommandés ci-dessus. De plus, il doit y avoir au moins deux niveaux d'analyte représentés, un proche du niveau médian des matériaux d'essai type, et l'autre situé à environ plus ou moins 10 % selon le cas. Entrez les valeurs pour les deux matériaux de contrôle sur des cartes de contrôle séparées. Analysez en double au moins cinq matériaux d'essai et insérez un blanc procédure pour dix matériaux d'essai.

(iv) Analyse ad hoc. Ici le concept de contrôle statistique n'est pas applicable. Il est supposé cependant que les matériaux dans la série sont d'un seul type, c'est-à-dire suffisamment similaires pour tirer des conclusions générales similaires sur les erreurs.

Réalisez les analyses en double sur tous les matériaux d'essais. Réalisez des surcharges ou des tests de recouvrement ou utilisez un matériau de contrôle

formulé, avec un nombre approprié d'insertions (voir ci-dessus) et avec différentes concentrations d'analyte si approprié. Réalisez des déterminations de blanc. Comme des limites de contrôle ne sont pas disponibles, comparez le biais et la fidélité à l'adéquation aux limites pour l'usage visé ou pour d'autres critères établis.

8. CONCLUSION

Le CIQ est un aspect essentiel pour s'assurer que les résultats donnés par un laboratoire conviennent à leur usage. Si elles sont convenablement exécutées, les méthodes de contrôle de qualité peuvent suivre les divers aspects de contrôle des données de série-à-série. Dans les séries où la performance tombe en dehors des limites acceptables, les données produites peuvent être rejetées et, après avoir apporté une action curative au système analytique, l'analyse peut être répétée.
Il doit être souligné cependant que le CIQ n'est pas à l'abri de dérèglement même s'il est exécuté convenablement. Bien entendu il est sujet à des "erreurs de deux types", c'est-à-dire que les séries sous contrôle seront occasionnellement rejetées et les séries non contrôlées seront occasionnellement acceptées.

Il est plus important de noter que le CIQ ne peut pas habituellement identifier des erreurs grossières sporadiques ou des anomalies à court terme dans le système analytique qui affectent les résultats pour des matériaux d'essai individuels. De plus, les conclusions basées sur les résultats du CIQ sont applicables seulement aux matériaux d'essai qui tombent dans l'objectif de la validation de méthode d'analyse. En dépit de ces limitations, que l'expérience professionnelle et la diligence peuvent alléger à un certain point, le CIQ est le principal recours disponible pour s'assurer que seules des données de qualité convenable sont délivrées par un laboratoire. Quand il est correctement exécuté il est très efficace.

Finalement, il faut se rendre compte qu'une exécution de pure forme de n'importe quel système de contrôle de qualité ne garantit pas la production de données de qualité adéquate. Il faut documenter et agir sur les procédures correctes de retour, d'action corrective et de motivation du personnel. En d'autres mots, il faut qu'il y ait une implication à la source dans la qualité à l'intérieur d'un laboratoire pour que le programme de CIQ réussisse, c'est-à-dire qu'il faut que le CIQ constitue une part d'un système d'organisation de la qualité totale.

9. REFERENCES

1 "Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method Performance Studies", Edited W. Horwitz, Pure Appl. Chem., 1988, 60, 855-864 (Revision in press).

2 "The International Harmonised Protocol for the Proficiency Testing of (Chemical) Analytical Laboratories", Edited M. Thompson and R. Wood, Pure Appl. Chem., 1993, 65, 2123-

2144. (Also published in J. AOAC International, 1993, 76, 926-940.

3 "IFCC approved recommendations on quality control in clinical chemistry. Part 4 : internal quality control", J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 1980, 18, 534-541.

4 S. Z. Cekan, S. B. Sufi and E. W. Wilson, "Internal quality control for assays of reproductive hormones : Guidelines for laboratories". WHO, Geneva, 1993.

5 M. Thompson, "Control procedures in geochemical analysis", in R J Howarth (Ed), "Statistics and data analysis in geochemical prospecting", Elsevier, Amsterdam, 1983.

6 M. Thompson, "Data quality in applied geochemistry : the requiremetns and how to achieve them", J. Geochem. Explor., 1992, 44, 3-22.

7 Health and Safety Executive, "Analytical quality in workplace air monitoring", London, 1991.

8 "A protocol for analytical quality assurance in public analysts' laboratories", Association of Public Analysts, 342 Coleford Road, Sheffield S9 5PH, UK, 1986.

9 "Method evaluation, quality control, proficiency testing" (AMIQAS PC Program), National Institute of Occupational Health, Denmark, 1993.

10 ISO 8402 : 1994. "Quality assurance and quality management - vocabulary".

11 ISO 3434 - 1 : 1993 (E/F). "Statistics, vocabulary and symbols - Part I : Probability and general statistical terms".

12 ISO Guide 30 : 1992. "Terms and definitions used in connections with reference materials"

13 "International vocabulary for basic and general terms in metrology", 2nd Edition, 1993, ISO, Geneva.

14 "Guide to the expression of uncertainty in measurement", ISO, Geneva, 1993.

15 M. Thompson and P. J. Lowthian, Analyst, 1993, 118, 1495-1500.

16 W. Horwitz, L. R. Kamps and K. W. Boyer, J. Assoc. Off. Anal. Chem., 1980, 63, 1344.

17 D. Tonks, Clin. Chem., 1993, 9, 217-223.

18 G. C. Fraser, P. H. Petersen, C. Ricos and R. Haeckel, "Proposed quality specifications for the imprecision and inaccuracy of analytical systems for clinical chemistry", Eur. J. Clin. Chem. 1992, 30, 311-317.

19 M. Thompson, Analyst, 1988, 113, 1579-1587.

20 ISO Guide 33 : 1989, "Uses of Certified Reference Materials", Geneva.

APPENDICE 1. CARTES DE CONTROLE DE SHEWHART.

1. INTRODUCTION

La théorie, la construction et l'interprétation de la carte[1] de Shewhart sont détaillées dans de nombreux textes sur le processus du contrôle de qualité et statistiques appliquées, et dans plusieurs standards ISO[2-5]. Il y a beaucoup de littérature sur l'utilisation de la carte de contrôle en chimie clinique[6, 7]. Westgard et ses collaborateurs ont formulé de multiples règles pour interpréter ces cartes de contrôle[8] et la puissance de ces résultats a été étudiée en détail[9-10]. Dans cet appendice les cartes de Shewhart simples sont seulement considérées.

Dans le CIQ, une carte de contrôle de Shewart est obtenue quand les valeurs de concentration mesurées sur un matériau de contrôle dans des séries successives sont portées sur un axe vertical en fonction du nombre de séries sur l'axe horizontal. Si dans une série plusieurs analyses d'un matériau de contrôle particulier sont effectuées, soit les résultats individuels x ou valeur moyenne x peuvent être utilisés pour former une carte de contrôle. La carte est complétée par des lignes horizontales dérivées de la distribution normale $N(\mu,\sigma^2)$ qui est utilisée pour décrire les variations aléatoires dans les valeurs portées. Les lignes choisies pour le contrôle sont $\mu \pm 2\sigma$ et $\mu \pm 3\sigma$. Différentes valeurs de σ sont nécessaires pour les cartes des valeurs individuelles et des moyennes. Pour un système sous contrôle statistique, en moyenne environ une valeur sur vingt tombent en dehors des lignes $\mu \pm 2\sigma$, appelées des "limites d'alerte" et seulement trois sur mille tombent en dehors des lignes $\mu \pm 3\sigma$ appelées " limites d'action". En pratique, les valeurs estimées et s des paramètres μ et σ sont utilisées pour construire la carte. Un biais persistant est indiqué par une différence significative entre et la valeur assignée.

2. ESTIMATION DES PARAMETRES μ et σ

Un système analytique sous contrôle montre deux sources de variations aléatoires, la variation intra-série caractérisée par la variance σ_0^2 et la variation entre-séries caractérisée par la variance σ_1^2. La grandeur de ces deux variances est souvent

comparable. L'écart type σ_x utilisé dans une carte des valeurs individuelles est donné par :

$$\sigma_x = (\sigma_0^2 + \sigma_1^2)^{1/2}$$

tandis que pour une carte de contrôle de valeurs moyennes, l'écart type est donné par :

$$\sigma_{\bar{x}} = (\sigma_0^2/n + \sigma_1^2)^{1/2}$$

Avec *n* nombre de mesures de contrôle dans une série à partir de laquelle la moyenne est calculée. La valeur de *n* donc doit être constante d'une série à l'autre, sinon les limites de contrôle seraient impossibles à définir. S'il n'est pas possible de garantir une valeur fixe de répétitions d'un matériau de contrôle par série (par exemple si les longueurs de séries étaient variables) les cartes de valeurs individuelles doivent être utilisées. De plus, l'équation indique que σ_x ou $\sigma_{\bar{x}}$ doivent être soigneusement estimées. Si une estimation était réalisée sur des valeurs répétées à partir d'une seule série, des limites trop étroites de contrôle seraient obtenues.

Les valeurs estimées doivent donc inclure la composante entre-séries de la variance. Si l'emploi d'une valeur particulière de *n* peut être déterminée au départ, $\sigma_{\bar{x}}$ peut être estimé directement à partir des

moyennes de *m* $\bar{x}_i = \sum_{j=1}^{n} x_{ij} / n$

(i = 1, ..., *m*), des *n* répétitions dans chacune des *m* séries successives. Donc la valeur estimée de μ est: $\bar{\bar{x}} = \sum_i \bar{x}_i / m$

et la valeur estimée de $\sigma_{\bar{x}}$ est :

$$s_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{\sum_i (\bar{x}_i - \bar{\bar{x}})^2}{m-1}}$$

Si la valeur de *n* n'est pas déterminée à l'avance, il est possible d'obtenir des estimations séparées de σ_o and σ_1 par une analyse de variance unilatérale. Si les carrés moyens intra et inter-groupes sont MS_w et MS_b respectivement,

σ^2_0 est estimé par MS_w et

σ^2_1 est estimé par $(MS_b - MS_w) / n$

Souvent en pratique, il est nécessaire de commencer une carte de contrôle avec les données collectées à partir d'un petit nombre de séries, qui peuvent ne pas être représentatives à un certain degré, car les valeurs estimées des écarts-types sont très variables sauf si un grand nombre d'observations est utilisé. De plus, pendant la période initiale, il est plus probable d'avoir des conditions hors contrôle qu'en temps normal, ce qui produit des valeurs aberrantes. De telles valeurs biaiseraient et augmenteraient *s*. Il est donc conseillé de recalculer et *s* après une période d'installation.

L'une des méthodes pour éviter les effets des valeurs aberrantes dans le calcul consiste à rejeter ces valeurs après avoir appliqué le test de Dixon Q ou Grubbs[11] et ensuite d'utiliser les statistiques classiques données ci-dessus. Il est également possible d'appliquer aux données les méthodes de statistiques robustes [12, 13].

3. L'INTERPRETATION DES CARTES DE CONTROLE

Les règles simples suivantes peuvent être appliquées aux cartes de contrôle des résultats individuels ou des moyennes.

Carte de contrôle unique. Une condition hors contrôle dans le système analytique est signalée si un des faits suivants se produit.

(i) La valeur actuelle reportée tombe en dehors des limites d'action.
(ii) La valeur actuelle et la valeur précédente reportée tombent en dehors des limites d'alerte mais à l'intérieur des limites d'action.
(iii) Neuf valeurs successives reportées tombent du même côté de la ligne moyenne.

Deux cartes de contôle. Quand deux matériaux de contrôle différents sont utilisés dans chaque série, les cartes de contrôle respectives sont considérées en même temps. Ceci augmente la chance d'une erreur de type 1 (rejet d'une série fondée) mais diminue la chance d'une erreur de type 2 (acceptation d'une série erronée). Une condition hors contrôle est indiquée si l'un des faits suivants se produit.

(i) Au moins l'une des valeurs reportées tombe en dehors des actions limites.
(ii) Les deux valeurs reportées sont en dehors des limites d'alerte.
(iii) La valeur actuelle et la valeur précédente reportées sur la même carte de contrôle tombent toutes deux en dehors des limites d'alerte.
(iv) Les cartes de contrôle montrent toutes les deux à la fois que quatre valeurs successives reportées sont du même côté de la ligne moyenne.
(v) Une des cartes montre neuf valeurs successives portées tombant du même côté que la ligne moyenne.

Un traitement plus complet de la carte de contrôle peut être obtenu en appliquant dans leur totalité les règles de Westgard illustrées dans la figure 2.

L'analyste devrait répondre à une condition hors contrôle en arrêtant l'analyse en attendant les tests de diagnostic et l'action curative, puis en rejetant les résultats de la série et en procédant à une nouvelle analyse des matériaux d'essai.

4. REFERENCES

1 W. A. Shewhart, *"Economic control of quality in manufactured product"*, Van Nostrand, New York, 1931.

2 ISO 8258 : 1991. *"Shewhart control charts"*.

3 ISO 7873 : 1993.*"Control charts for arithmetic means with warning limits"*.

4 ISO 7870 : 1993. *"Control charts - general guide and introduction"*.

5 ISO 7966 : 1993. *"Acceptance control charts"*.

6 S. Levey and E. R. Jennings, *Am. J. Clin. Pathol.*, 1950, **20**, 1059-1066.

7 A. B. J. Nix, R. J. Rowlands, K. W. Kemp, D. W. Wilson and K. Griffiths, *Stat. Med.*, 1987, **6**, 425-440.

8 J. O. Westgard, P. L. Barry and M. R. Hunt, *Clin. Chem*., 1981, **27**, 493, 501.

9 C. A. Parvin, *Clin. Chem*., (in press).

10 J. Bishop and A. B. J. Nix, *Clin. Chem*., 1993, **39**, 1638-1649.

11 W. Horwitz, *Pure Appl. Chem*., (in press).

12 Analytical Methods Committee, *Analyst*, 1989, **114**, 1693-1697.

13 Analytical Methods Committee, *Analyst*, 1989, **114**, 1699-1702.

Rapport technique résultant du Symposium sur l'Harmonisation des Systèmes d'Assurance Qualité pour les Laboratoires d'Analyse, Washington DC, USA, 22-23 Juillet 1993 sponsorisé par l'IUPAC, l'ISO et AOAC International

Préparé pour publication par MICHAEL THOMPSON[1] et ROGER WOOD[2]

[1]Department of Chemistry, Birkbeck College (University of London), London WC1H OPP, UK

[2]MAFF Food Science Laboratory, Norwich Research Park, Colney, Norwich NR4 7UQ, UK

Groupe de Travail de 1991-95 :
Chairman : M. Parkany (Suisse) ; Membres : T. Anglov (Danemark) ; K. Bergknut (Norvège et Suède) ; P. De Bièvre (Belgique) ; K.-G. von Boroviczény (Allemagne) ; J.M. Christensen (Danemark) ; T.D. Geary (South Australia) ; R. Greenhalgh (Canada) ; A.J. Head (Royaume Uni) ; P.T. Holland (Nouvelle Zélande) ; W. Horwitz (USA) . A. Kallner (Suède; J. Kristiansen (Danemark) ; S.H.H. Olrichs (Pays Bas) ; N. Palmer (USA) . M. Thompson (Royaume Uni) ; M.J. Vernengo (Argentine) ; R. Wood (Royaume Uni).

Guide pratique pour la validation, le contrôle qualité, et l'estimation de l'incertitude d'une méthode d'analyse œnologique alternative

(Résolution OENO 10/2005)

Sommaire

1. OBJET 5

2. PRÉAMBULE ET CHAMP D'APPLICATION 5

3. VOCABULAIRE GÉNÉRAL 6

4. PRINCIPES GÉNÉRAUX 12

4.1. MÉTHODOLOGIE 12
4.2. DÉFINITION DE L'ERREUR DE MESURE 13

5. VALIDATION D'UNE MÉTHODE 14

5.1. MÉTHODOLOGIE 14
5.2. PREMIÈRE ÉTAPE : CHAMPS D'APPLICATION DE LA MÉTHODE 15
5.2.1. Définition des matrices analysables 15
5.2.2. Limite de détection et de quantification 16
5.2.2.1. Définition normative 16
5.2.2.2. Documentation de référence 16
5.2.2.3. Application 16
5.2.2.4. Mode opératoires 17
5.2.2.4.1. Détermination sur blanc 17
5.2.2.4.1.1. Champs d'application 17
5.2.2.4.1.2. Protocole de base et calculs 17
5.2.2.4.2. Approche par l'étude de linéarité 18
5.2.2.4.2.1. Champs d'application 18
5.2.2.4.2.2. Protocole de base et calculs 19
5.2.2.4.3. Approche graphique issue du bruit de fond de l'enregistrement 20
5.2.2.4.3.1. Champs d'application 20
5.2.2.4.3.2. Protocole de base et calcul 20
5.2.2.4.4. Vérification d'une limite de quantification prédéterminée 21
5.2.2.4.4.1. Champs d'application 21
5.2.2.4.4.2. Protocole de base et calcul 21
5.2.3. Robustesse 23
5.2.3.1. Définition 23
5.2.3.1. Détermination 23
5.3. SECONDE PARTIE : ÉTUDE DE L'ERREUR SYSTÉMATIQUE 24
5.3.1. Etude de linéarité 24

5.3.1.1. Définition normative 24
5.3.1.2. Documents de référence 24
5.3.1.3. Application 24
5.3.1.4. Approche type ISO 11095 25
5.3.1.4.1. Protocole de base 25
5.3.1.4.2. Calculs et résultats 26
5.3.1.4.2.1. Définition du modèle de régression 26
5.3.1.4.2.2. Estimation des paramètres 27
5.3.1.4.2.3. Représentations graphiques 27
5.3.1.4.2.4. Test de l'hypothèse de linéarité 29
5.3.1.4.2.4.1. Définitions des erreurs liées à l'étalonnage 29
5.3.1.4.2.4.2. Test de Fischer-Snedecor 31
5.3.1.5. Approche ISO 8466 32
5.3.1.5.1.Protocole de base 32
5.3.1.5.2.Calculs et résultats 33
5.3.1.5.2.1. Définition du modèle de régression linéaire 33
5.3.1.5.2.2. Définition du modèle de régression polynomial 33
5.3.1.5.2.3. Comparaison des écarts types résiduels 35
5.3.2. Spécificité *36*
5.3.2.1. Définition normative 36
5.3.2.2. Application 37
5.3.2.3. Modes opératoires 37
5.3.2.3.1. Test des ajouts dosés 37
5.3.2.3.1.1. Champ d'application 37
5.3.2.3.1.2. Protocole de base 37
5.3.2.3.1.3. Calculs et résultats 38
5.3.2.3.2. Etude de l'influence d'autres composés sur le résultat du mesurage 41
5.3.2.3.2.1. Champ d'application 41
5.3.2.3.2.2. Protocole de base et calculs 41
5.3.2.3.2.3. Interprétation 42
5.3.3. Etude de la justesse de la méthode *43*
5.3.3.1. Présentation de l'étape 43
5.3.3.1.1. Définition 43
5.3.3.1.2. Principes généraux 44
5.3.3.1.3.Documents de référence 44
5.3.3.2. Comparaison de la méthode alternativeà la méthode de référence OIV44
5.3.3.2.1. Champs d'application 44
5.3.3.2.2. Justesse de la méthode alternativepar rapport à la méthode de référence 45
5.3.3.2.2.1. Définition 45
5.3.3.2.2.2. Domaine d'application 45
5.3.3.2.2.3. Protocole de base et calculs 45
5.3.3.2.2.4. Interprétation 46
5.3.3.3. Comparaison par essais interlaboratoires 48

5.3.3.3.1. Domaine d'application 48
5.3.3.3.2.Protocole de base et calculs 48
5.3.3.3.3. Interprétation 49
5.3.3.4. Comparaison à des matériaux de référence 50
5.3.3.4.1. Domaine d'application 50
5.3.3.4.2. Protocole de base et calculs 50
5.3.3.4.3.Interprétation 51
5.4. TROISIÈME PARTIE : ÉTUDE DE L'ERREUR ALÉATOIRE 52
5.4.1. Principe général *52*
5.4.2. Documents de référence *53*
5.4.3. Fidélité de la méthode *53*
5.4.3.1. Définition 53
5.4.3.2. Champs d'application 53
5.4.3.3. Cas théorique général 54
5.4.3.3.1. Protocole de base et calculs 54
5.4.3.3.1.1. Calculs avec plusieurs matériaux d'essai 54
5.4.3.3.1.2. Calculs avec 1 matériau d'essai 56
5.4.3.4. Répétabilité 57
5.4.3.4.1. Définitions 57
5.4.3.4.2. Champs d'application 58
5.4.3.4.3. Protocole de base et calculs 58
5.4.3.4.3.1.Cas général 58
5.4.3.4.3.2. Cas particulier applicable à 1 seule répétition 58
5.4.3.4.4. Comparaison des répétabilités 60
5.4.3.4.4.1. Détermination des répétabilités des deux méthodes 60
5.4.3.4.4.2. Test de Fischer-Snedecor 60
5.4.3.5. Reproductibilité intralaboratoire 61
5.4.3.5.1.Définition 61
5.4.3.5.2. Champs d'application 62
5.4.3.5.3. Protocole de base et calculs 62

6. CONTRÔLE QUALITÉ DES MÉTHODES D'ANALYSE (CIQ) 64

6.1. DOCUMENTS DE RÉFÉRENCE 64
6.2. PRINCIPES GÉNÉRAUX 64
6.3. LES MATÉRIAUX DE RÉFÉRENCE 64
6.4. CONTRÔLE DES SÉRIES ANALYTIQUES 66
6.4.1. Définition *66*
6.4.2. Contrôle de justesse à partir de matériaux de référence *66*
6.4.3. Fidélité intrasérie *66*
6.4.4. Etalon interne *67*
6.5. CONTRÔLE DU SYSTÈME D'ANALYSE 67
6.5.1. Définition *67*
6.5.2.Carte de Shewhart *67*
6.5.2.1. Acquisition des données 67

6.5.2.2. Présentation des résultats et définition des limites 68
6.5.2.3. Exploitation de la carte de Shewhart 69
6.5.3. Comparaison interne des systèmes d'analyse 70
6.5.4. Comparaison externe du système d'analyse 70
6.5.4.1. Chaîne d'analyse de comparaison interlaboratoires 70
6.5.4.2. Comparaison à des matériaux de référence externes 70
6.5.4.2.1. Incertitude type du matériau de référence 71
6.5.4.2.2. Définition des limites de validité d'un mesurage du matériau de référence 71

7. ESTIMATION DE L'INCERTITUDE DE MESURE 72

7.1. DÉFINITION 72
7.2. DOCUMENTS DE RÉFÉRENCE 72
7.3. DOMAINE D'APPLICATION 73
7.4. MÉTHODOLOGIE 74
7.4.1. Définition du mesurande, et description de la méthode d'analyse quantitative 74
7.4.2. Analyse critique du processus de mesure 74
7.4.3. Calculs d'estimation de l'incertitude type (démarche intralaboratoire) 75
7.4.3.1. Principe 75
7.4.3.2. Calcul de l'écart type de reproductibilité intralaboratoire 78
7.4.3.3. Estimation de sources d'erreurs systématiques typiques non prises en compte dans les conditions de reproductibilité 78
7.4.3.3.1. Erreur de calibrage (ou d'étalonnage) 78
7.4.3.3.1.1. Mode opératoire 78
7.4.3.3.1.2.Calculs et résultats 79
7.4.3.3.1.3. Estimation de l'incertitude type associée à la droite de calibrage (ou d'étalonnage) 80
7.4.3.3.2. Erreur de biais 81
7.4.3.3.2.1. Méthodes ajustées avec seul un matériau de référence certifié 81
7.4.3.3.2.2. Méthodes ajustées avec plusieurs matériaux référents (gammes de calibrages…) 81
7.4.3.3.3. Effet matrice 82
7.4.3.3.3.1 .Définition 82
7.4.3.3.4. Effet échantillons 84
7.4.4. Estimation de l'incertitude type par essais interlaboratoires 84
7.4.4.1. Principe 84
7.4.4.2. Utilisation de l'écart type de reproductibilité interlaboratoire et intraméthode SR_{inter}(méthode) 85
7.4.4.3. Utilisation de l'écart type de reproductibilité interlaboratoire et interméthode SR_{inter} 86
7.4.4.4. Autres composantes au budget d'incertitude 86
7.5. Expression de l'incertitude élargie 86

1. Objet

Le présent guide a pour but d'accompagner les laboratoires d'œnologie pratiquant l'analyse en série dans leurs démarches de validation, de contrôle qualité interne et d'estimation de l'incertitude des méthodes alternatives qu'ils mettent en œuvre.

2. Préambule et champ d'application

La norme internationale ISO 17025, définissant « les prescriptions générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais », précise que les laboratoires accrédités doivent, lorsqu'ils mettent en œuvre une méthode analytique usuelle, s'assurer de la qualité des résultats obtenus. Pour cela, elle indique plusieurs étapes. La première consiste à définir les exigences de la clientèle concernant le paramètre considéré, afin de déterminer, par la suite, si la méthode utilisée répond bien à celles-ci. La seconde étape intègre, pour des méthodes non normalisées, modifiées ou développées par le laboratoire, une validation initiale. Une fois la méthode mise en application, les laboratoires doivent employer des moyens de contrôle et de raccordement qui permettent de surveiller la qualité des résultats obtenus. Enfin, ils doivent estimer l'incertitude associée aux résultats obtenus.

Afin de répondre à ces exigences, les laboratoires disposent d'un référentiel important constitué de nombreux guides et normes internationaux. Cependant, dans la pratique, l'application de ces textes s'avère délicate car, s'adressant à toutes les catégories de laboratoires d'étalonnage et d'essais, ils restent très généralistes et supposent, de la part du lecteur, des connaissances approfondies des règles mathématiques s'appliquant au traitement statistique des données.

Le présent guide a été rédigé à partir de ce référentiel international en prenant en compte les particularités propres aux laboratoires d'œnologie pratiquant, en routine, des analyses sur des séries d'échantillons de vin ou de moût. Le champ d'application étant ainsi délimité, un choix adapté et pertinent a pu être fait afin de ne conserver que les outils les plus adaptés à celui-ci. Le guide, issu du référentiel international, reste donc strictement en conformité avec celui-ci. Le lecteur aura cependant toute possibilité, d'approfondir tel ou tel point du guide en se référant aux normes et guides internationaux dont les références sont données dans chaque chapitre.

Les rédacteurs ont choisi de regrouper les différents outils permettant de répondre aux exigences de la norme ISO 17025 car il existe une évidente solution de continuité dans leur application et les données obtenues par les uns, peuvent souvent être utilisées pour les autres. En outre les moyens mathématiques mis en œuvre sont souvent proches.

Les différents chapitres incluent des exemples d'applications, pris dans des laboratoires d'œnologie utilisant ces outils.

Il est important de préciser que ce guide n'a pas la prétention d'être exhaustif. Il vise seulement à présenter, de façon aussi claire et applicable que possible, le contenu des exigences de la norme ISO 17025 et des moyens de base pouvant être mis en œuvre dans un laboratoire de routine pour y répondre. Chaque laboratoire reste parfaitement libre de compléter ces outils ou de les remplacer par d'autres qu'il jugerait plus performants ou plus adaptés.

Enfin, il convient d'attirer l'attention des utilisateurs sur le fait que les outils présentés ne constituent pas une fin en soi et que leur utilisation, de même que l'interprétation des résultats auxquels ils conduisent doivent toujours faire l'objet d'une approche critique. Ce n'est que dans ces conditions que leur pertinence sera assurée et que le laboratoire pourra les utiliser comme outils de progrès de la qualité des analyses qu'il réalise.

3. Vocabulaire général

Les définitions indiquées ci-dessous sont à l'usage de ce document et sont issues des références normatives données en bibliographie.

Analyte
Objet de la méthode d'analyse

Blanc
Essai réalisé en l'absence de matrice (blanc réactif) ou sur une matrice qui ne contient pas l'analyte (blanc matrice).

Biais
Différence entre l'espérance de résultats d'essai et une valeur acceptée comme référence.

Budget d'incertitude
Liste des sources d'incertitude et de leurs incertitudes types associées, établie en vue d'évaluer l'incertitude type composée associée à un résultat de mesure.

Calibrage (d'un instrument de mesure) *(Gauging en anglais)*
Positionnement matériel de chaque repère (éventuellement de certains repères principaux seulement) d'un instrument de mesure en fonction de la valeur correspondante du mesurande.

NOTE Ne pas confondre « calibrage » et « étalonnage »

Condition de répétabilité
Conditions où les résultats d'essai indépendants sont obtenus par la même méthode sur des individus d'essai identiques dans le même laboratoire, par le même opérateur, utilisant le même équipement et pendant un court intervalle de temps.

Condition de reproductibilité (intralaboratoire)
Conditions où les résultats d'essai sont obtenus par la même méthode sur des individus d'essais identiques, dans le même laboratoire, avec le même ou différents opérateurs et utilisant des calibrages différents, à des jours différents.

Ecart type expérimental
Pour une série de n mesurages du même mesurande, grandeur s caractérisant la dispersion des résultats, donnée par la formule :

$$s=\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(x_i-\bar{x})^2}{n-1}}$$

x_i étant le résultat du $i^{éme}$ mesurage et $\bar{x}$ la moyenne arithmétique des n résultats considérés.

Ecart-type de répétabilité
Ecart-type de nombreuses répétitions obtenues dans un seul laboratoire par un même opérateur sur un même instrument, c'est-à-dire dans des conditions de répétabilité.

Ecart-type de reproductibilité interne (ou variabilité intralaboratoire totale)
Ecart-type de répétitions obtenues dans un seul laboratoire avec la même méthode, en faisant intervenir plusieurs opérateurs ou instruments et, en particulier, en effectuant les mesures à des dates différentes, c'est-à-dire, dans des conditions de reproductibilité.

Erreur aléatoire
Résultat d'un mesurage moins la moyenne d'un nombre infini de mesurages du même mesurande, effectués dans les conditions de répétabilité.

Erreur de mesure
Résultat d'un mesurage moins une valeur vraie du mesurande.

Erreur systématique
moyenne qui résulterait d'un nombre infini de mesurages du même mesurande, effectués dans des condition de répétabilités, moins une valeur vraie du mesurande.

NOTE La notion d'erreur est une notion toute théorique dans la mesure où elle fait appel à des grandeurs qui ne sont pas accessibles dans la pratique, notamment les valeurs vraies des mesurandes. Par principe l'erreur est inconnue

Espérance mathématique
Pour une série de ***n*** mesurages du même mesurande, si ***n*** tend vers l'infini, la moyenne $\bar{x}$ tend vers l'espérance ***E(x)***.

$$E(x)=\lim_{n\to\infty}\frac{\sum_{i=1}^{n}x_i}{n}$$

Etalonnage *(Calibration en anglais)*
Ensemble des opérations établissant dans des conditions spécifiées, la relation entre les valeurs de la grandeur indiquée par un appareil de mesure ou un système de mesure, ou les valeurs représentées par une mesure matérialisée, ou par un matériau de référence, et les valeurs correspondantes de la grandeur réalisées par des étalons.

Evaluation intralaboratoire d'une méthode d'analyse
Action de soumettre une méthode d'analyse à une étude statistique intralaboratoire, fondée sur un protocole normalisé et/ou reconnu, et apportant la preuve que dans son domaine d'application, la méthode d'analyse satisfait à des critères de performance préétablis.
Dans le cadre du présent document, l'évaluation d'une méthode s'appuie sur une étude intralaboratoire qui comprend la comparaison à une méthode de référence.

Fidélité
Etroitesse d'accord entre des résultats d'essai indépendants obtenus sous des conditions stipulées

NOTE 1 La fidélité dépend uniquement de la distribution des erreurs aléatoires et n'a aucune relation avec la valeur vraie ou spécifiée.
NOTE 2 La mesure de fidélité est exprimée à partir de l'écart type des résultats d'essais.
NOTE 3 Le terme "résultats d'essai indépendants" signifie des résultats obtenus d'une façon non influencée par un résultat précédent sur le même matériau d'essai ou similaire. Les mesures quantitatives de la fidélité dépendent de façon critique des conditions stipulées. Les conditions de répétabilité et de reproductibilité sont des ensembles particuliers de conditions extrêmes.

Grandeur (mesurable)
Attribut d'un phénomène, d'un corps ou d'une substance, qui est susceptible d'être distingué qualitativement et déterminé quantitativement.

Incertitude de mesure
Paramètre associé au résultat d'un mesurage, qui caractérise la dispersion des valeurs qui pourraient raisonnablement être attribuées au mesurande.

Incertitude type ($u(x_i)$)
Incertitude du résultat d'un mesurage exprimée sous la forme d'un écart type.

Justesse
Etroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une large série de résultats d'essais et une valeur de référence acceptée.

NOTE La mesure de la justesse est généralement exprimée en termes de biais.

Limite de détection
Plus petite quantité d'un analyte à examiner dans un matériau d'essai, pouvant être détectée et considérée comme différente de la valeur du blanc (avec une probabilité donnée), mais non nécessairement quantifiée. En fait, il faut prendre en compte deux risques :

le risque α de considérer la substance présente dans le matériau d'essai alors que sa grandeur est nulle ;
le risque β de considérer absente une substance alors que sa grandeur n'est pas nulle.

Limite de quantification
Plus petite grandeur d'un analyte à examiner dans un matériau d'essai pouvant être déterminée quantitativement dans des conditions expérimentales décrites dans la méthode avec une variabilité définie (coefficient de variation déterminé).

Linéarité
Capacité d'une méthode d'analyse, à l'intérieur d'un certain intervalle, à fournir une valeur d'information ou des résultats proportionnels à la quantité en analyte à doser dans le matériau d'essai pour laboratoire.
Cette proportionnalité s'exprime au travers d'une expression mathématique définie à priori.
Les limites de linéarité sont les limites expérimentales de grandeurs entre lesquelles un modèle d'étalonnage linéaire peut être appliqué avec un niveau de confiance connu (généralement pris égal à 1 %).

Matériau d'essai
Matériau ou substance sur lequel peut être appliqué un mesurage avec la méthode d'analyse considérée.

Matériau de référence
Matériau ou substance dont une ou plusieurs valeurs de la (des) propriété(s) est (sont) suffisamment homogène(s) et bien définie(s) pour permettre de l'utiliser pour l'étalonnage de l'appareil, l'évaluation d'une méthode de mesurage, ou l'attribution de valeurs aux matériaux.

Matériau de référence certifié
Matériau de référence, accompagné d'un certificat, dont une (ou plusieurs) valeur(s) de la (des) propriété(s) a une réalisation exacte de l'unité dans laquelle les valeurs de propriété sont exprimés et pour laquelle chaque valeur certifiée est accompagnée d'une incertitude à un niveau de confiance indiqué.

Matrice
Ensemble des constituants du matériau d'essai autres que l'analyte.

Méthode d'analyse
Procédure écrite décrivant l'ensemble des moyens et modes opératoires nécessaires pour effectuer l'analyse de l'analyte, c'est-à-dire : domaine d'application, principe et/ou réactions, définitions, réactifs, appareillage, modes opératoires, expression des résultats, fidélité , rapport d'essai.

AVERTISSEMENT Les expressions "méthode de dosage" et "méthode de détermination" sont parfois employées comme synonymes de l'expression "méthode d'analyse". Ces deux expressions ne doivent pas être employées dans ce sens.

Méthode d'analyse quantitative
Méthode d'analyse permettant de mesurer la quantité d'analyte présente dans le matériau d'essai pour laboratoire.

Méthode d'analyse de référence (méthode de type I ou de type II)
Méthode qui donne la valeur de référence acceptée de la grandeur de l'analyte à mesurer.

Méthode d'analyse alternative (non classifiée)
Méthode d'analyse de routine utilisée par le laboratoire et non considérée comme méthode de référence.

NOTE Une méthode d'analyse alternative peut consister en une simplification de la méthode de référence.

Mesurage
Ensemble d'opérations ayant pour but de déterminer une valeur d'une grandeur.

NOTE Le déroulement des opérations peut être automatique.

Mesurande
Grandeur particulière soumise au mesurage.

Moyenne
Pour une série de ***n*** mesurages du même mesurande, valeur moyenne, donnée par la formule :

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^{n} x_i}{n}$$

x_i étant le résultat du $i^{éme}$ mesurage.

Résultat d'un mesurage
Valeur attribuée à un mesurande, obtenue par mesurage

Sensibilité
Rapport de la variation de la valeur d'information de la méthode d'analyse à la variation de la grandeur en analyte.
La variation de la grandeur en analyte est généralement obtenue en préparant différentes solutions étalons, ou en effectuant des ajouts de l'analyte dans une matrice.

NOTE 1 Il convient d'éviter de définir, par extension, la sensibilité d'une méthode comme sa capacité à détecter de faibles grandeurs.
NOTE 2 Une méthode est dite « sensible » si une faible variation de la grandeur ou de la quantité d'analyte entraîne une variation importante de la valeur d'information.

Signal de mesure
Grandeur qui représente le mesurande, et qui lui est fonctionnellement lié.

Spécificité
Propriété d'une méthode d'analyse de convenir exclusivement à la détermination de la grandeur de l'analyte considéré, avec la garantie que le signal mesuré provient seulement de l'analyte.

Tolérance

Ecart par rapport à la valeur de référence, défini par la laboratoire pour un niveau donné, dans lequel une valeur mesurée d'un matériau de référence sera acceptée.

Valeur d'une grandeur
Expression quantitative d'une grandeur particulière, généralement sous la forme d'une unité de mesure multipliée par un nombre.

Valeur vraie d'une grandeur
Valeur compatible avec la définition d'une grandeur particulière donnée.

NOTE 1 C'est une valeur qu'on obtiendrait par un mesurage parfait
NOTE 2 Toute valeur vraie est par nature indéterminée

Valeur de référence acceptée
Valeur qui sert de référence, agréée pour une comparaison, et qui résulte :

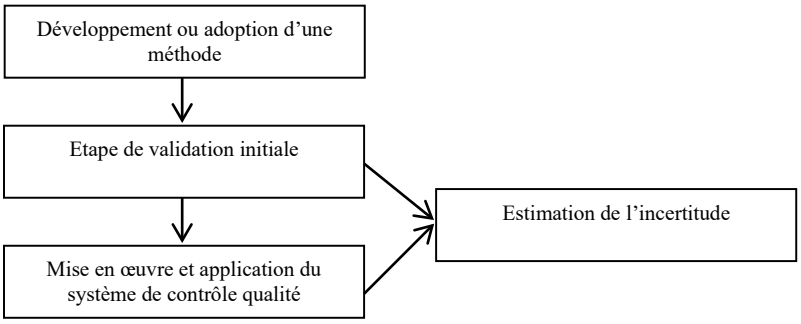
a) d'une valeur théorique ou établie, fondée sur des principes scientifiques ;
b) d'une valeur assignée ou certifiée, fondée sur les travaux expérimentaux d'une organisation nationale ou internationale ;
c) d'une valeur de consensus ou certifiée, fondée sur un travail expérimental en collaboration et placé sous les auspices d'un groupe scientifique ou technique ;
Dans le cadre particulier du présent document, la valeur de référence acceptée (ou valeur conventionnellement vraie) du matériau d'essai est fournie par la moyenne arithmétique des valeurs de mesures répétées selon la méthode de référence.

Variance
Carré de l'écart type.

4. Principes généraux

4.1. Méthodologie

Lors de la mise en place d'une nouvelle méthode usuelle, le laboratoire met en œuvre un protocole qui comprend plusieurs étapes. La première étape, appliquée une seule fois de façon initiale, ou de façon périodique, est la validation de la méthode. Celle-ci est suivie d'un contrôle qualité permanent. L'ensemble des données acquises lors de ces deux étapes permettent d'évaluer la qualité de la méthode. **Les données acquises lors de ces deux étapes sont utilisées pour l'estimation de l'incertitude de mesure**. Celle-ci, évaluée régulièrement, constitue un indicateur de la qualité des résultats obtenus par la méthode concernée.



Toutes ces étapes sont liées et constituent une démarche globale qui permet d'évaluer et de contrôler les erreurs de mesure.

4.2. Définition de l'erreur de mesure

Tout mesurage réalisé à l'aide de la méthode étudiée donne un résultat. Celui-ci est inévitablement associé à une erreur de mesure, définie comme la différence entre le résultat obtenu et la valeur vraie du mesurande. Dans la pratique, **la valeur vraie du mesurande est inaccessible**, et on est amené à utiliser une valeur conventionnellement acceptée comme telle.

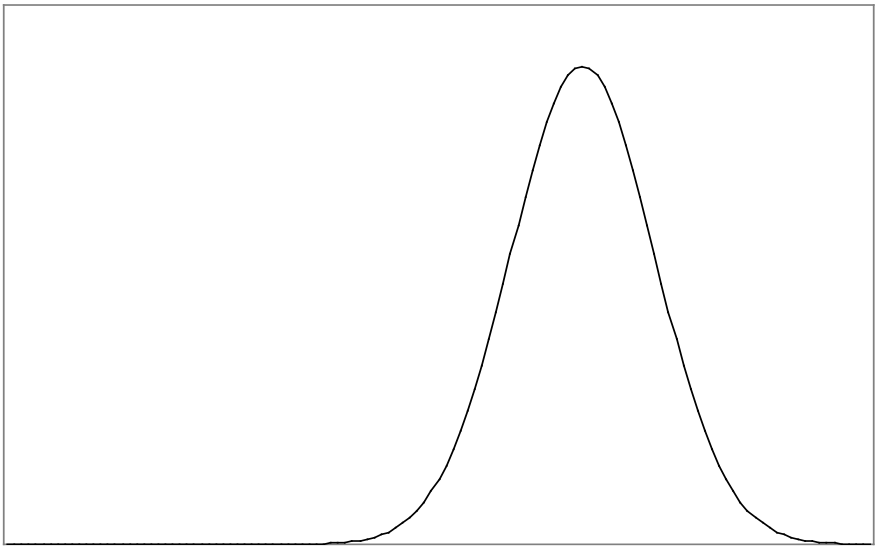
L'erreur de mesure comprend deux composantes :

Erreur de mesure

Valeur vraie = Résultat de l'analyse + Erreur systématique + Erreur aléatoire

L'erreur systématique se traduit en pratique par un biais par rapport à la valeur vraie, l'erreur aléatoire est l'ensemble des erreurs qui accompagnent l'application de la méthode.

La représentation de ces erreurs peut se faire graphiquement de la façon suivante :



Les outils de validation et de contrôle qualité permettent d'évaluer les erreurs systématiques et les erreurs aléatoires, et de surveiller leurs évolutions dans le temps.

5. Validation d'une méthode

5.1. Méthodologie

La mise en œuvre de la validation passe par 3 étapes, dans lesquelles figurent des objectifs. Pour remplir ces objectifs, le laboratoire dispose d'outils de validation. Ces outils sont parfois multiples pour un objectif donné, et sont adaptés à différentes situations. Il incombe au laboratoire de faire le choix pertinent des outils, les plus adaptés à la méthode à valider.

Etapes	Objectifs	Outils de validation
Champs d'application		
	-Définir les matrices analysables	
	-Définir la gamme analysable	Limite de détection et de quantification Etude de robustesse
Erreur systématique		
ou biais	-Réponse linéaire dans l'échelle de valeurs analysables	Etude de linéarité
	-Spécificité de la méthode	Etude de spécificité
	-Justesse de la méthode	Comparaison à une méthode de référence Comparaison à des matériaux de référence Comparaison interlaboratoire
Erreur aléatoire		
	-Fidélité de la méthode	Etude de répétabilité Etude de reproductibilité intralaboratoire

5.2. Première étape : champs d'application de la méthode

5.2.1. Définition des matrices analysables

La matrice est l'ensemble des constituants du matériau d'essai autres que l'analyte. Dans le cas où ces constituants peuvent avoir une influence sur le résultat d'un mesurage, il convient que le laboratoire définisse les matrices sur lesquelles la méthode est applicable.

Par exemple, en œnologie, le dosage de certains paramètres peut être influencé par les diverses matrices possibles (vins, moûts, vins liquoreux…).

En cas de doute sur un effet matrice, des études plus approfondies pourront être réalisées dans le cadre de l'étude de spécificité.

5.2.2. Limite de détection et de quantification

Cette étape n'est évidemment pas applicable, et pas nécessaire pour les méthodes dont la limite basse ne tend pas vers 0, par exemple le titre alcoométrique volumique dans les vins, l'acidité totale dans les vins, le pH…

5.2.2.1. Définition normative

La limite de détection est la plus petite quantité du composé à doser pouvant être détectée mais non nécessairement quantifiée comme exacte. La limite de détection est un paramètre des essais limites.

La limite de quantification est la plus petite quantité du composé pouvant être dosé par la méthode.

5.2.2.2. Documentation de référence

Norme NF V03-110, procédure de validation intralaboratoire d'une méthode alternative par rapport à une méthode de référence.
Recueil international des méthodes d'analyse – OIV, Estimation de la limite de détection et de quantification d'une méthode d'analyse (Résolution oeno 7/2000).

5.2.2.3. Application

Le plus souvent dans la pratique, la limite de quantification est plus pertinente que la limite de détection, cette dernière étant par convention 1/3 de la première.

Il existe plusieurs approches permettant d'estimer les limites de détection et de quantification :

- Détermination sur blanc
- Approche par l'étude de linéarité
- Approche graphique

Ces méthodes s'adaptent à diverses situations, mais il s'agit dans tous les cas d'approches mathématiques donnant des résultats n'ayant qu'une valeur informative. Il apparaît important, lorsque cela est possible, d'introduire une vérification de la valeur obtenue, par l'une de ces approches, ou estimée empiriquement, en utilisant le protocole de vérification d'une limite de quantification prédéterminée.

5.2.2.4. Mode opératoires

5.2.2.4.1. Détermination sur blanc

5.2.2.4.1.1. Champs d'application

Cette méthode peut s'appliquer quand l'analyse de blancs donne des résultats présentant un écart type non nul. L'opérateur pourra juger de l'opportunité d'utiliser des blancs réactifs, ou des blancs matrice.

Si le blanc, pour des raisons liées à un prétraitement non maîtrisé du signal, est parfois non mesurable ou n'offre pas de variation enregistrable (écart type de 0), la démarche peut être effectuée sur une très faible concentration en analyte, proche du blanc.

5.2.2.4.1.2. Protocole de base et calculs

Procéder à l'analyse de ***n*** matériaux d'essai assimilés à des blancs, ***n*** étant supérieur ou égal à 10.

- Calculer la moyenne des résultats x_i obtenus :

$$\overline{x}_{blanc} = \frac{\sum_{i=1}^{n} x_i}{n}$$

- Calculer l'écart type des résultats x_i obtenus :

$$S_{blanc} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} \left(x_i - \overline{x}_{blanc}\right)^2}{n-1}}$$

- A partir de ces résultats on définit conventionnellement la limite de détection par la formule :

$$L_d = \overline{x}_{blanc} + (3.S_{blanc})$$

- A partir de ces résultats on définit conventionnellement la limite de quantification par la formule :

$$L_q = \overline{x}_{blanc} + (10.S_{blanc})$$

Exemple : Le tableau ci-dessous donne quelques résultats obtenus lors de la détermination de la limite de détection pour le dosage usuel du Dioxyde de soufre libre.

N° du matériau d'essai	X (en mg/l)
1	0
2	1
3	0
4	1.5
5	0
6	1
7	0.5
8	0
9	0
10	0.5
11	0
12	0

Les valeurs calculées sont les suivantes :

q = 12

$\mathbf{M_{blanc}}$ = 0,375

$\mathbf{S_{blanc}}$ = 0,528 mg/l

LD = 1.96 mg/l

LQ = 5.65 mg/l

5.2.2.4.2. Approche par l'étude de linéarité

5.2.2.4.2.1. Champs d'application

Cette méthode peut s'appliquer dans tous les cas, et obligatoirement quand la méthode d'analyse ne présente pas de bruit de fond. Elle utilise les données calculées lors de l'étude de linéarité.

NOTE Cette approche statistique peut être biaisée et donner des résultats pessimistes lorsque la linéarité est calculée sur une échelle très large de valeurs de matériaux de référence, et dont

les résultats des mesures présentent des écarts types variables. Dans un tel cas, une étude de linéarité restreinte à une échelle de valeurs basses, proche de 0 et de dispersion plus homogène permettra une estimation plus pertinente.

5.2.2.4.2.2. Protocole de base et calculs

Utiliser les résultats obtenus lors de l'étude de linéarité qui ont permis de calculer les paramètres de la fonction d'étalonnage $y = a + b.x$

Les données à récupérer de l'étude de linéarité sont (voir chapitre 5.3.1, étude de linéarité) :

- pente de la droite de régression :

$$b = \frac{\sum_{i=1}^{n}(x_i - M_x)(y_i - M_y)}{\sum_{i=1}^{n}(x_i - M_x)^2}$$

- écart type résiduel :

$$S_{res} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}\sum_{j=1}^{p}(y_{i,j} - \hat{y}_{i,j})^2}{pn - 2}}$$

- écart type sur l'ordonnée à l'origine (à calculer) :

$$S_a = S_{res}\sqrt{\left(\frac{1}{np} + \frac{M_x^2}{\sum_{i=1}^{n} p(x_i - M_x)^2}\right)}$$

Les estimations de la limite de détection **LD**, et de la limite de quantification **LQ** se calculent selon les formules suivantes :

$LD = \frac{3 \times S_a}{b}$ Limite de détection estimée

$LQ = \frac{10 \times S_a}{b}$ Limite de quantification estimée

Exemple : Estimation des limites de détection et de quantification du dosage de l'acide sorbique par électrophorèse capillaire, à partir de données de linéarité acquises sur une gamme de 1 à 20 $mg.L_{-1}$.

X (ref)	Y1	Y2	Y3	Y4
1	1.9	0.8	0.5	1.5
2	2.4	2	2.5	2.1
3	4	2.8	3.5	4
4	5.3	4.5	4.7	4.5
5	5.3	5.3	5.2	5.3
10	11.6	10.88	12.1	10.5
15	16	15.2	15.5	16.1
20	19.7	20.4	19.5	20.1

Nombre de matériaux de référence
n = 8
Nombre de répliques
p = 4
Droite (y = a + b*x)
b = 0.9972
a = 0.51102
écart type résiduel:
Sres = 0.588
Ecart type sur l'ordonnée à l'origine
Sa = 0.1597

La limite de détection estimée est $LD = 0.48\ mg.L^{-1}$
La limite de quantification estimée est $LQ = 1.6\ mg.L^{-1}$

5.2.2.4.3. Approche graphique issue du bruit de fond de l'enregistrement

5.2.2.4.3.1. Champs d'application

Cette démarche peut s'appliquer pour les méthodes d'analyse qui fournissent un enregistrement graphique (chromatographie…) présentant un bruit de fond. Les limites sont estimées à partir d'une étude du bruit de fond.

5.2.2.4.3.2. Protocole de base et calcul

Procéder à l'enregistrement de blancs réactifs en procédant par 3 séries de 3 injections à plusieurs jours d'intervalle.

Déterminer les valeurs suivantes :

h_{max} plus grand écart d'amplitude en ordonnée du signal observé entre deux points d'acquisition, hors dérive, sur une distance égale à vingt fois la largeur à mi-hauteur du pic correspondant à la substance à rechercher, centrée sur le temps de rétention du composé étudié.
R le facteur de réponse quantité / signal, exprimé en hauteur.

La limite de détection **LD**, et la limite de quantification **LQ** se calculent selon les formules suivantes :

$LD = 3\ h_{max}\ R$ $\qquad$ $LQ = 10\ h_{max}\ R$

5.2.2.4.4. Vérification d'une limite de quantification prédéterminée

Cette approche permet de valider une valeur de quantification obtenue par approche statistique, ou éventuellement empiriquement.

5.2.2.4.4.1. Champs d'application

Cette méthode permet de vérifier qu'une limite de quantification donnée *a priori* est acceptable. Elle est applicable quand le laboratoire a la capacité de disposer d'au moins 10 matériaux d'essai comportant des quantités d'analyte connues, se situant au niveau de la limite de quantification estimée.
Dans le cas de méthodes au signal spécifique, non sensibles aux effets matrice, ces matériaux pourront être des solutions synthétiques dont la valeur de référence est obtenue par formulation.
Dans les autres cas, il sera utilisé des vins (ou des moûts), dont la valeur du mesurande, obtenue par méthode de référence, sera égale à la limite à étudier. Il va de soit que dans ce cas, la limite de quantification de la méthode de référence doit être inférieure à cette valeur.

5.2.2.4.4.2. Protocole de base et calcul

Analyser ***n*** matériaux d'essai indépendants dont la valeur acceptée est égale à la limite de quantification à vérifier, ***n*** doit être au moins égal à 10.
- Calculer la moyenne des ***n*** mesurages :

$$\overline{x}_{LQ} = \frac{\sum_{i=1}^{n} x_i}{n}$$

- Calculer l'écart type des ***n*** mesurages :

$$S_{LQ}=\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}\left(xi-\overline{x}_{LQ}\right)^2}{n-1}}$$

avec x_i résultats du mesurage du **i^{ème}** matériau d'essai.

Les deux conditions suivantes doivent être respectées :

a) S'assurer que la grandeur moyenne mesurée $\overline{x}_{LQ}$ n'est pas différente de la limite de quantification prédéterminée *LQ* :

$$\frac{\left|LQ-\overline{x}_{LQ}\right|}{\frac{S_{LQ}}{\sqrt{n}}}$$

Si < 10 alors la limite de quantification *LQ* est jugée valable.
NOTE 10 est une valeur purement conventionnelle relative au critère de la LQ.

b) S'assurer que la limite de quantification est différentes de 0 :

Si $5\,^{S_{LQ}} < LQ$ alors la limite de quantification est différente de 0.

La valeur 5 correspond à une valeur approchée d'élargissement de l'écart type en tenant compte du risque α et du risque β pour s'assurer que la LQ est différente de 0.
Cela revient à vérifier que le coefficient de variation pour *LQ* est inférieur à 20%.

NOTE1 Il est rappelé que la limite de détection est obtenue en divisant la limite de quantification par 3.
NOTE2 Il convient de vérifier que la valeur de S_{LQ} n'est pas trop grande (ce qui produirait un test artificiellement positif), et correspond effectivement à un écart type raisonnable de la variabilité des résultat au niveau considéré. C'est au laboratoire qu'il incombe de faire cette appréciation critique de la valeur de S_{LQ}.

Exemple : Vérification de la limite de quantification du dosage de l'acide malique par méthode enzymatique.

Limite de quantification estimée : 0.1 $g.L^{-1}$

Vin	Valeurs
1	0.1
2	0.1
3	0.09
4	0.1
5	0.09
6	0.08
7	0.08
8	0.09
9	0.09
10	0.08

Moyenne :*0.090*
Ecart type :*0.008*

$$\frac{\left|LQ-\bar{x}_{LQ}\right|}{\frac{S_{LQ}}{\sqrt{n}}}=3.87<10$$

Première condition : La limite de quantification à 0.1 est jugée valable.

Seconde condition : $5.S_{LQ}=0.04<0.1$ La limite de quantification est jugée significativement différente de 0.

5.2.3. Robustesse

5.2.3.1. Définition

La robustesse est la capacité, pour une méthode, de donner des résultats proches en présence de faibles changements de conditions expérimentales susceptibles de se produire dans l'utilisation de la procédure.

5.2.3.1. Détermination

Si un doute existe sur l'influence de la variation de paramètres opératoires, le laboratoire mettra en œuvre l'application scientifique des plans d'expérience qui permettra de faire jouer ces paramètres opératoires critiques dans le champ de variation susceptible d'être rencontré dans les conditions de la pratique. Ces tests sont dans la pratique lourds à mettre en oeuvre.

5.3. Seconde partie : étude de l'erreur systématique

5.3.1. Etude de linéarité

5.3.1.1. Définition normative

La linéarité d'une méthode est sa capacité à l'intérieur d'un certain intervalle, à fournir une valeur d'information ou des résultats proportionnels à la quantité en analyte à doser dans le matériau d'essai.

5.3.1.2. Documents de référence

Norme NF V03-110, procédure de validation intralaboratoire d'une méthode alternative par rapport à une méthode de référence.
Norme ISO 11095, Etalonnage linéaire utilisant des matériaux de référence.
Norme ISO 8466-1 Qualité de l'eau – Etalonnage et évaluation des méthodes d'analyse et estimation des caractères de performance

5.3.1.3. Application

L'étude de linéarité permet de définir un domaine de linéarité, et de le valider.

Cette étude est possible lorsque le laboratoire peut disposer de matériaux de référence stables dont les valeurs acceptées ont été acquises avec certitude (en théories ces valeurs devraient avoir une incertitude égale à 0). Il pourra donc s'agir de matériaux de référence interne dosés avec du matériel étalonné, de vins ou de moûts dont la valeur est donnée par la moyenne d'au moins 3 répétitions de la méthode de référence, de matériaux de référence externes, ou de matériaux de référence externes certifiés.
Dans ce dernier cas, et uniquement dans ce cas, cette étude permet également le raccordement de la méthode. Le plan d'expérience mené ici pourra alors être considéré comme un étalonnage.

Dans tous les cas, il convient de s'assurer que la matrice du matériau de référence est compatible avec la méthode.

Enfin, les calculs doivent être mis en œuvre avec le résultat final du mesurage, et non pas avec la valeur du signal.

Deux approches sont proposées ici :

Approche type ISO 11095 dont le principe consiste à comparer l'erreur résiduelle à l'erreur expérimentale grâce à un test de Fischer. Cette démarche est surtout

valable pour des gammes de travail relativement étroite (où le mesurande ne varie pas plus d'un facteur 10). D'autre part, dans des conditions expérimentales générant une erreur de reproductibilité faible, le test deviendra excessivement sévère. A contrario, dans le cas de conditions expérimentales médiocres, le test sera facilement positif et perdra également sa pertinence. Cette approche demande une bonne homogénéité du nombre des mesures sur toute la gamme étudiée.

Approche type ISO 8466, dont le principe consiste à comparer l'erreur résiduelle produite par la régression linéaire, à l'erreur résiduelle produite par une régression polynomiale (d'ordre 2 par exemple) réalisée à partir des mêmes données. Si le modèle polynomial donne une erreur résiduelle significativement plus faible on pourra conclure à la non linéarité. Cette approche est indiquée notamment lorsqu'il existe un risque de grande dispersion expérimentale à l'une des deux extrémités du domaine. Elle est donc naturellement bien adaptée aux méthodes d'analyse des traces. Il n'est pas utile de travailler avec une homogénéité du nombre de mesure sur toute la gamme de travail, et il est même recommandé de renforcer le nombre de mesures aux extrémités du domaine.

5.3.1.4. Approche type ISO 11095

5.3.1.4.1. Protocole de base

Il convient de mettre en œuvre un nombre ***n*** de matériaux de référence. Ce nombre sera supérieur à 3, il n'est cependant pas nécessaire d'aller au-delà de 10. Les matériaux de référence seront mesurés ***p*** fois, dans **des conditions de reproductibilité**, ***p*** sera supérieur à 3, un nombre de 5 étant généralement conseillé. Les valeurs acceptées de matériaux de référence devront être réparti de façon régulière sur l'échelle de valeurs étudiée. Le nombre de mesure doit être le même pour tous les matériaux de référence.

NOTE Il est important que les conditions de reproductibilité fassent intervenir le maximum de sources potentielles de variabilité, au risque que le test conclue à la non-linéarité de façon excessive.

Les résultats sont consignés dans un tableau de la forme suivante :

Matériaux de référence	Valeur acceptée du matériau de référence	Valeurs mesurées				
		Réplique 1	…	Réplique j	…	Réplique p
1	x1	y11	…	y1j	…	y1p
…	…	…	…	…	…	…
i	xi	yi1	…	yij	…	yip
…	…	…	…	…	…	…
n	xn	yn1	…	ynj	…	ynp

5.3.1.4.2. Calculs et résultats

5.3.1.4.2.1. Définition du modèle de régression

Le modèle à calculer et à tester est le suivant :

$$y_{ij} = a + b.x_i + \varepsilon_{ij}$$

où

y_{ij} est la $j^{ième}$ réplique du $i^{ième}$ matériau de référence.

x_i est la valeur acceptée du $i^{iéme}$ matériau de référence.

b est la pente de la droite de régression.

a est l'ordonnée à l'origine de la droite de régression.

$a+b.x_i$ représente l'espérance de la valeur du mesurage du $i^{ième}$ matériau de référence.

ε_{ij} est l'écart entre y_{ij} et l'espérance de la valeur du mesurage du $i^{ième}$ matériau de référence.

5.3.1.4.2.2. Estimation des paramètres

Les paramètres de la droite de régression sont obtenus à partir des formules suivantes :

- moyenne des ***p*** mesurages du ***i*ème** matériau de référence $yi = \frac{1}{p}\sum_{j=1}^{p} y_{ij}$

- moyenne de toutes les valeurs acceptées des *n* matériaux de référence

$M_x = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} x_i$

- moyenne de tous les mesurages $My = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} y_i$

- estimation pente ***b*** $b = \frac{\sum_{i=1}^{n}(x_i - M_x)(y_i - M_y)}{\sum_{i=1}^{n}(x_i - M_x)^2}$

- estimation ordonnée à l'origine ***a*** $a = M_y - b \times M_x$

- valeur de régression associée au ***i*ème** matériau de référence $\hat{y}_i$

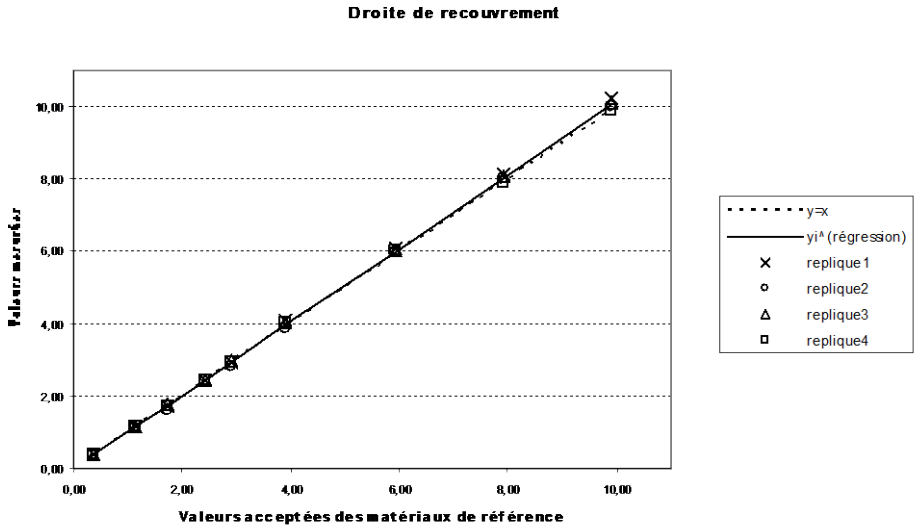
$$\hat{y}_i = a + b \times x_i$$

- résidu e_{ij} $e_{ij} = y_{ij} - \hat{y}_i$

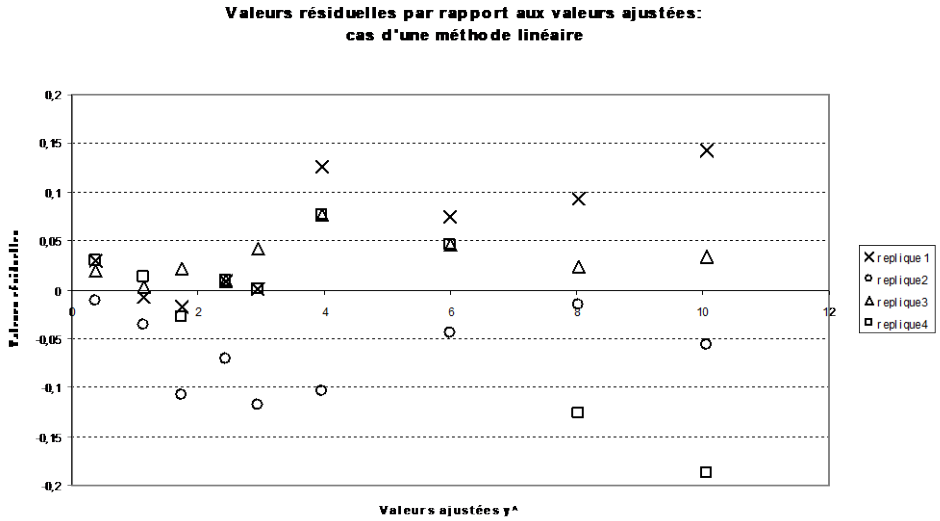
5.3.1.4.2.3. Représentations graphiques

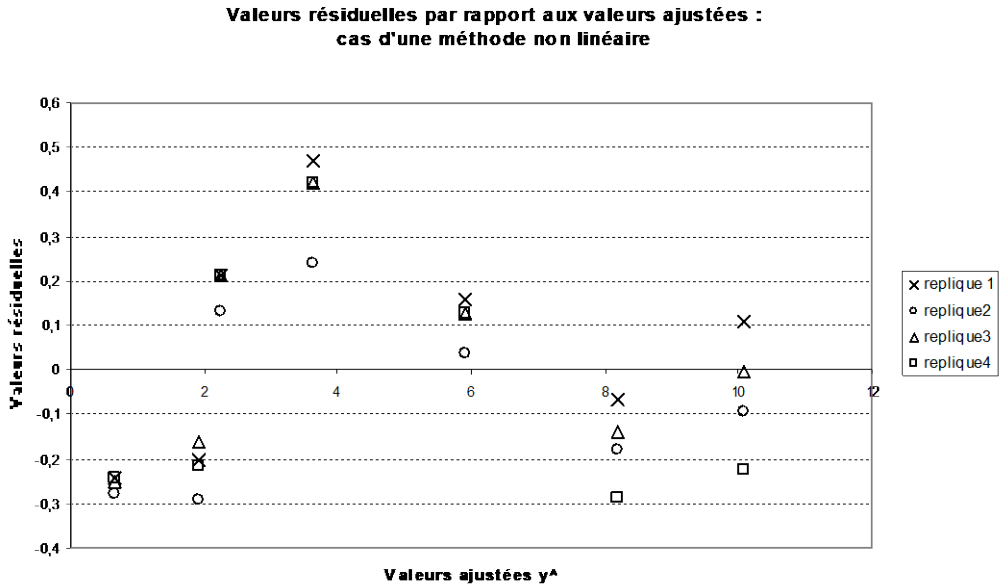
Les résultats peuvent être présentés et analysés sous forme graphique. Deux types de représentations graphiques sont utilisés.

-Le premier type de graphique est la représentation des valeurs mesurées en fonction des valeurs acceptées de matériaux de référence. Il est également porté la droite de recouvrement calculée.



- Le second graphique réalisé est la représentation des valeurs résiduelles en fonction des valeurs estimées des matériaux de référence ($\hat{y}$) par la droite de recouvrement.
Ce graphique est un bon indicateur de l'écart par rapport à l'hypothèse de linéarité : le domaine de linéarité est valide si les valeurs résiduelles sont équitablement réparties entre les valeurs positives et les valeurs négatives.





En cas de doute sur la linéarité de la régression, un test de Fischer-Snedecor peut être appliqué pour tester l'hypothèse : « Le domaine de linéarité n'est pas valide », en plus de l'analyse graphique.

5.3.1.4.2.4. Test de l'hypothèse de linéarité

Il convient d'abord de définir plusieurs valeurs d'erreurs liées à l'étalonnage, que l'on pourra estimer à partir des données acquises au cours de l'expérience. A partir de ces résultats il est mis alors en œuvre un test statistique permettant de tester l'hypothèse de non validité du domaine de linéarité : il s'agit du test de Fischer-Snedecor.

5.3.1.4.2.4.1. Définitions des erreurs liées à l'étalonnage

Ces erreurs sont données sous la forme d'un écart type, constitué de la racine carrée d'un rapport entre une somme de carrée et un degré de liberté.

Erreur résiduelle

L'erreur résiduelle correspond à l'erreur entre les valeurs mesurées et la valeur donnée par la droite de régression.

La somme des carrés de l'erreur résiduelle est la suivante :

$$Q_{res} = \sum_{i=1}^{n}\sum_{j=1}^{p}(y_{ij} - \hat{y}_i)^2$$

Le nombre de degrés de liberté est *np-2*.

L'écart type résiduel est alors estimé par la formule :

$$S_{res} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}\sum_{j=1}^{p}(y_{ij} - \hat{y}_i)^2}{np - 2}}$$

Erreur expérimentale

L'erreur expérimentale correspond à l'écart type de reproductibilité de l'expérimentation.

La somme des carrés de l'erreur expérimentale est la suivante :

$$Q_{\exp} = \sum_{i=1}^{n}\sum_{j=1}^{p}(y_{ij} - y_i)^2$$

Le nombre de degrés de liberté est *np-n*.

L'écart type expérimental (reproductibilité) est alors estimé par la formule :

$$S_{\exp} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}\sum_{j=1}^{p}(y_{ij} - y_i)^2}{np - n}}$$

NOTE Cette grandeur est parfois notée également S_R.

Défaut d'ajustement

L'erreur du défaut d'ajustement est l'erreur résiduelle retranchée de l'erreur expérimentale.

La somme des carrés du défaut d'ajustement est :

$$Q_{def} = Q_{res} - Q_{\exp}$$

ou encore

$$Q_{def} = \sum_{i=1}^{n}\sum_{j=1}^{p}(y_{ij} - \hat{y}_i)^2 - \sum_{i=1}^{n}\sum_{j=1}^{p}(y_{ij} - y_i)^2$$

Le nombre de degrés de liberté est n-2

L'écart type du défaut d'ajustement est estimé par la formule :

$$S_{def} = \sqrt{\frac{Q_{res} - Q_{\exp}}{n - 2}}$$

ou encore

$$S_{def} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}\sum_{j=1}^{p}(y_{ij} - \hat{y}_i)^2 - \sum_{i=1}^{n}\sum_{j=1}^{p}(y_{ij} - y_i)^2}{n - 2}}$$

5.3.1.4.2.4.2. Test de Fischer-Snedecor

Le rapport $F_{obs} = \frac{S_{def}^2}{S_{\exp}^2}$ suit la loi de Fischer-Snedecor avec les degrés de liberté *n-2, np-n*.

La valeur expérimentale calculée F_{obs} est comparée à la valeur limite : $F_{1-\alpha}(n-2,np-n)$, tirée de la table de la loi de Snedecor. La valeur de α généralement utilisée en pratique est de 5%.

Si $F_{obs} \geq F_{1-\alpha}$ l'hypothèse de non validité du domaine de linéarité est acceptée *(avec un risque d'erreur α de 5%).*

Si $F_{obs} < F_{1-\alpha}$ l'hypothèse de non validité du domaine de linéarité est refusée

Exemple : Etude de linéarité du dosage de l'acide tartrique par électrophorèse capillaire. 9 matériaux de référence sont utilisés, il s'agit de solutions synthétiques d'acide tartrique, titrées à partir d'une balance raccordée à des masses étalon.

Matériau ref.	Ti (ref)	Y1	Y2	Y3	Y4
1	0.38	0.41	0.37	0.4	0.41
2	1.15	1.15	1.12	1.16	1.17
3	1.72	1.72	1.63	1.76	1.71
4	2.41	2.45	2.37	2.45	2.45
5	2.91	2.95	2.83	2.99	2.95
6	3.91	4.09	3.86	4.04	4.04
7	5.91	6.07	5.95	6.04	6.04
8	7.91	8.12	8.01	8.05	7.9
9	9.91	10.2	10	10.09	9.87

Droite de régression
Droite (y = a + b*x)
b = 1.01565
a = - 0.00798

Erreurs liées à l'étalonnage
Ecart type résiduel Sres= 0.07161
Ecart type reproductibilité expérimentale Sexp = 0.07536

Ecart type du défaut d'ajustement Sdef = 0.0548

Interprétation, test de Fischer-Snedecor
Fobs = 0.53 < F1-α = 2.37
L'hypothèse de non validité du domaine de linéarité est refusée

5.3.1.5. Approche ISO 8466

5.3.1.5.1.Protocole de base

Il convient de mettre en œuvre un nombre ***n*** de matériaux de référence. Ce nombre sera supérieur à 3, il n'est cependant pas nécessaire d'aller au-delà de 10. Les matériaux de référence seront mesurés plusieurs fois, dans **des conditions de reproductibilité**, ce nombre de mesures peut être faible au centre du domaine de l'étude (minimum = 2) et doit être plus élevé aux extrémités du domaine où un nombre de 4 minimum est généralement conseillé. Les valeurs acceptées de matériaux de référence devront être réparties de façon régulière sur l'échelle de valeurs étudiée.

NOTE Il est important que les conditions de reproductibilité fassent intervenir le maximum de sources potentielles de variabilité.

Les résultats sont consignés dans un tableau de la forme suivante :

Matériaux de référence	Valeur acceptée du matériau de référence	Valeurs mesurées				
		Réplique 1	Réplique 2	Réplique j	…	Réplique p
1	x1	y11	y12	y1j	…	y1p
…	…	…	…	…	…	
i	xi	yi1	yi2			
…	…	…	…	…	…	
n	xn	yn1	…	ynj	…	ynp

5.3.1.5.2.Calculs et résultats

5.3.1.5.2.1. Définition du modèle de régression linéaire

Calculer le modèle de régression linéaire selon les calculs précédemment détaillés.

Il sera ensuite calculé l'écart type d'erreur résiduelle du modèle linéaire S_{res}, selon les calculs indiqués au § 5.3.1.4.2.4.1

5.3.1.5.2.2. Définition du modèle de régression polynomial

Est ici donné le calcul du modèle polynomial d'ordre 2

Il convient de déterminer les paramètres du modèle de régression polynomial d'ordre 2 applicable aux données du plan d'expérience.

$$y = a\chi^2 + b\chi + c$$

Il s'agit de déterminer les paramètres a, b, et c. Cette détermination est généralement automatisable dans les tableurs et logiciels de statistiques.

Les formules d'estimation de ces paramètres sont les suivantes :

$$a = \frac{\sum_i x_i^2 y_i \left(N\sum_i x_i^2 - \left[\sum_i xi\right]^2 \right) - \sum_i x_i^3 \left(N\sum_i x_i y_i - \sum_i x_i \sum_i y_i \right) + \sum_i x_i^2 \left(\sum_i x_i y_i \sum_i x_i - \sum_i y_i \sum_i x_i^2 \right)}{\sum_i x_i^4 \left(N\sum_i x_i^2 - \left[\sum_i xi\right]^2 \right) - \sum_i x_i^3 \left(N\sum_i x_i^3 - \sum_i x_i^2 \sum_i x_i \right) + \sum_i x_i^2 \left(\sum_i x_i \sum_i x_i^3 - \left[\sum_i x_i^2\right]^2 \right)}$$

$$b = \frac{\sum_i x_i^4 \left(N\sum_i x_i y_i - \sum_i x_i \sum_i y_i \right) - \sum_i x_i^2 y_i \left(N\sum_i x_i^3 - \sum_i x_i^2 \sum_i x_i \right) + \sum_i x_i^2 \left(\sum_i y_i \sum_i x_i^3 - \sum_i x_i y_i \sum_i x_i^2 \right)}{\sum_i x_i^4 \left(N\sum_i x_i^2 - \left[\sum_i xi\right]^2 \right) - \sum_i x_i^3 \left(N\sum_i x_i^3 - \sum_i x_i^2 \sum_i x_i \right) + \sum_i x_i^2 \left(\sum_i x_i \sum_i x_i^3 - \left[\sum_i x_i^2\right]^2 \right)}$$

$$c = \frac{\sum_i x_i^4 \left(\sum_i x_i^2 \sum_i y_i - \sum_i x_i \sum_i x_i y_i \right) - \sum_i x_i^3 \left(\sum_i x_i^3 \sum_i y_i - \sum_i x_i^2 \sum_i x_i y_i \right) + \sum_i x_i^2 y_i \left(\sum_i x_i \sum_i x_i^3 - \left[\sum_i x_i^2\right]^2 \right)}{\sum_i x_i^4 \left(N\sum_i x_i^2 - \left[\sum_i xi\right]^2 \right) - \sum_i x_i^3 \left(N\sum_i x_i^3 - \sum_i x_i^2 \sum_i x_i \right) + \sum_i x_i^2 \left(\sum_i x_i \sum_i x_i^3 - \left[\sum_i x_i^2\right]^2 \right)}$$

Une fois le modèle établi on calculera les valeurs suivantes :

- valeur de régression associée au ième matériau de référence $\hat{y}'_i$

$$\hat{y}'_i = a\,\chi^2 + b\chi + c$$

- résidu eij

$$e'_{ij} = y_{ij} - \hat{y}'_i$$

L'écart type résiduel du modèle polynomial

$$S'_{res} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}\sum_{j=1}^{p}(y_{ij} - \hat{y}'_i)^2}{np-2}}$$

5.3.1.5.2.3. Comparaison des écarts types résiduels

On calcule

$$DS^2 = (N-2)S^2_{res} - (N-3)S'^2_{res}$$

Puis

$$PG = \frac{DS^2}{S'^2_{res}}$$

La valeur PG est comparée à la valeur limite $F_{1-\alpha}$ donnée par la table de Fischer-Snedecor pour un niveau de confiance 1-α et pour degré de liberté 1 et (N-3).

NOTE En général le risque α utilisé est 5%. Le test dans certains cas peut être optimiste et un risque de 10 % pourra s'avérer plus réaliste.

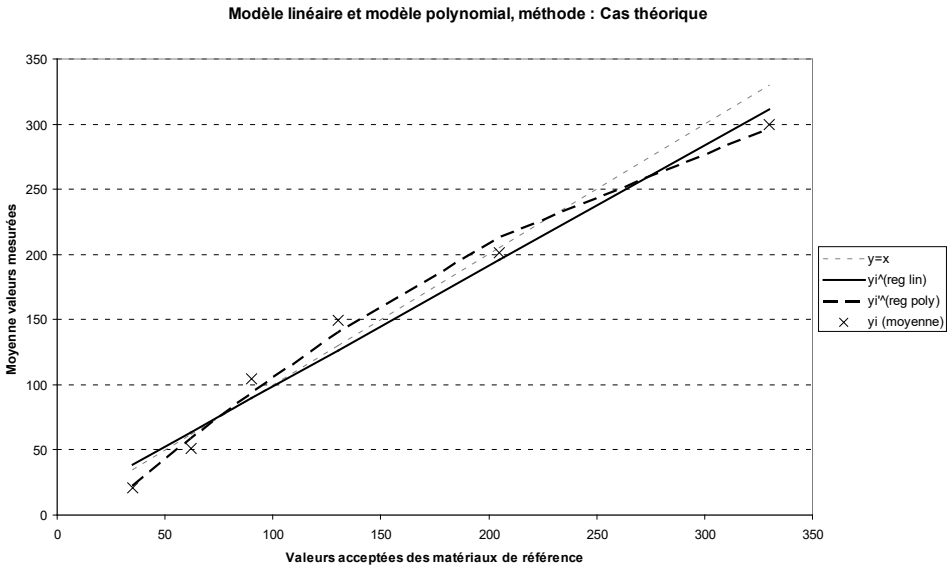
Si PG ≤ $F_{1-\alpha}$: la fonction d'étalonnage non linéaire ne donne pas un ajustement amélioré ; par exemple, la fonction d'étalonnage est linéaire.

Si PG > $F_{1-\alpha}$: l'étendue de travail doit être réduite le plus possible pour obtenir une fonction d'étalonnage linéaire : sinon, les valeurs d'information provenant des

échantillons analysés doivent être évalués en utilisant une fonction d'étalonnage non linéaire.

Exemple : Cas théorique.

	Ti (ref)	Y1	Y2	Y3	Y4
1	35	22,6	19,6	21,6	18,4
2	62	49,6	49,8	53	
3	90	105,2	103,5		
4	130	149	149,8		
5	205	203,1	202,5	197,3	
6	330	297,5	298,6	307,1	294,2



Régression linéaire
$y = 1.48.x – 0.0015$
$S_{res} = 13.625$

Régression polynomiale
$y = - 0,0015x^2 + 1,485x - 27,2701$
S'res=7,407

Test de Fischer

PG=10,534 > F(5%)=10,128
PG>F la fonction d'étalonnage linéaire ne peut être retenue

5.3.2. Spécificité

5.3.2.1. Définition normative

La spécificité d'une méthode est sa capacité à ne mesurer que le composé recherché.

5.3.2.2. Application

S'il existe un doute sur la spécificité de la méthode testée, le laboratoire pourra mettre en œuvre des plans d'expérience visant à vérifier la spécificité. Sont ici proposés deux types d'expériences complémentaires qui pourront répondre à un grand nombre de cas rencontrés en oenologie.

-Le premier test est le test des ajouts dosés. Il permet de vérifier que la méthode mesure l'intégralité de l'analyte.

-Le second test permet de vérifier l'influence d'autres composés sur le résultat du mesurage.

5.3.2.3. Modes opératoires

5.3.2.3.1. Test des ajouts dosés

5.3.2.3.1.1. Champ d'application

Ce test permet de vérifier que la méthode mesure l'intégralité de l'analyte.
Le plan d'expérience se base sur des ajouts dosés du composé recherché. Il ne peut s'appliquer que sur les méthodes n'étant pas sensibles aux effets matrices.

5.3.2.3.1.2. Protocole de base

Il s'agit de retrouver de façon significative les grandeurs ajoutées sur des matériaux d'essai analysés avant et après les ajouts.

Effectuer des ajouts dosés variables sur ***n*** matériaux d'essai. La concentration initiale en analyte des matériaux d'essai, et les ajouts dosés sont choisis de façon à couvrir le domaine d'application de la méthode. Ces matériaux d'essais doivent être constitués des types de matrices appelées à être analysées en routine. Il est conseillé d'utiliser au minimum 10 matériaux d'essai.

Les résultats sont consignés dans un tableau de la forme suivante :

Matériau d'essai	Grandeur avant ajout (x)	Grandeur ajoutée (v)	Grandeur après ajout (w)	Grandeur retrouvée (r)
1	x1	v1	w1	r1 = w1 – x1
...	...	...	...	...
i	xi	vi	wi	ri = wi – xi
...	...	...	...	...
n	Xn	Vn	wn	rp = wn – xn

NOTE 1 Un ajout est réalisé avec une solution étalon pure. Il est conseillé de choisir cet ajout du même ordre que la grandeur du matériau d'essai sur lequel il est effectué. C'est pourquoi les matériaux d'essai les plus concentrés doivent être dilués pour rester dans le domaine d'application de la méthode.
NOTE 2 Il est conseillé de préparer les ajouts à partir de solutions étalons indépendantes, de façon à éviter toute erreur systématique.
NOTE 3 La qualité des valeurs *x* et *w* peuvent être améliorées en utilisant plusieurs répétitions.

5.3.2.3.1.3. Calculs et résultats

Le principe de la mesure de la spécificité consiste à étudier la droite de régression ***r = a + b.v*** et vérifier que la pente ***b*** est équivalente à 1 et que l'ordonnée à l'origine ***a*** est équivalente à 0.

Etude de la droite de régression ***r = a + b.v***

Les paramètres de la droite de régression sont obtenus à partir des formules suivantes :

- moyenne des grandeurs ajoutées $\bar{v}$ $$\bar{v} = \frac{\sum_{i=1}^{n} v_i}{n}$$

- moyenne des grandeurs retrouvées $\bar{r}$

$$\bar{r} = \frac{\sum_{i=1}^{n} r_i}{n}$$

- estimation pente ***b***

$$b = \frac{\sum_{i=1}^{n} (v_i - \bar{v})(r_i - \bar{r})}{\sum_{i=1}^{n} (v_i - \bar{v})^2}$$

- estimation ordonnée à l'origine ***a***

$$a = \bar{r} - b.\bar{v}$$

- valeur de régression associée au ***i**ème* matériau de référence $\hat{y}_i$

$$\hat{r}_i = a + b \times v_i$$

- écart type résiduel

$$S_{res} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} (r_i - \hat{r}_i)^2}{n-2}}$$

- écart type sur la pente

$$S_b = S_{res} \sqrt{\left(\frac{1}{\sum_{i=1}^{n} (v_i - \bar{v})^2} \right)}$$

- écart type sur l'ordonnée à l'origine

$$S_a = S_{res} \sqrt{\left(\frac{1}{n} + \frac{\bar{v}^2}{\sum_{i=1}^{n} (v_i - \bar{v})^2} \right)}$$

5.3.2.3.1.3.2. Exploitation des résultats

Il s'agit de conclure à l'absence d'interférences et à une spécificité acceptable. Ceci est vrai si la droite de recouvrement $r = a + bv$ est équivalente à la droite $y=x$.

Pour cela, deux tests sont réalisés :

-Test de l'hypothèse de la pente b de la droite de recouvrement équivalente à 1.
-Test de l'hypothèse de l'ordonnée à l'origine a équivalente à 0.

Ces hypothèses sont testées à l'aide d'un test de Student associé au risque d'erreur de 1% en général. Un risque de 5 % peut dans certains cas se révéler plus réaliste.

Soit $T_{critique,\ bilatérale}$[ddl ; 1%] correspondant à une variable bilatérale de Student associé au risque d'erreur de 1% pour un nombre ddl de degrés de liberté.

Etape 1 : calculs

Calcul du critère de comparaison sur la pente à 1 $T_{obs}=\frac{|b-1|}{S_b}$

Calcul du critère de comparaison sur l'ordonnée à l'origine à 0 $T_{obs}=\frac{|a|}{S_a}$

Calcul de la valeur critique de Student : $T_{critique,\ bilatérale}$[p-2 ; 1%]

Etape 2 : interprétation

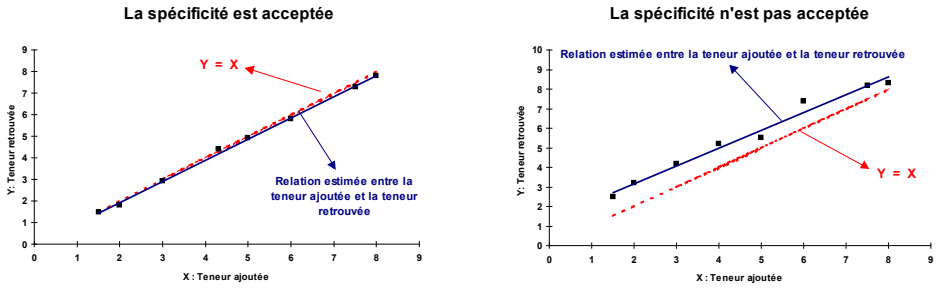
Si T_{obs} est inférieur à $T_{critique}$ alors la pente de la droite de régression est équivalente à 1
Si T'_{obs} est inférieur à $T_{critique}$ alors l'ordonnée à l'origine de la droite de régression est équivalente à 0.
Si les deux conditions sont vérifiées alors la droite de recouvrement est équivalent = $y=x$, et la méthode est considérée spécifique.

NOTE 1 À partir de ces résultats, un taux de recouvrement moyen permettant de quantifier la spécificité pourrait être calculé. En aucun cas, il ne peut être employé pour "corriger" les résultats. En effet, si un biais significatif est mis en évidence, la méthode alternativene peut pas être validée par rapport un rendement de 100%.

NOTE 2 Puisque le principe du test consiste à calculer une droite, il est important de prendre au moins trois niveaux d'ajout et de choisir correctement leur valeur afin d'obtenir un étalement optimal des points.

5.3.2.3.1.3.3. Représentation graphique de la droite de recouvrement

Exemple de spécificité



5.3.2.3.2. Etude de l'influence d'autres composés sur le résultat du mesurage

5.3.2.3.2.1. Champ d'application

Dans le cas où le laboratoire suspecte l'interaction de composés autres que celui analysé, un plan d'expérience pourra être mis en place pour tester l'influence de différents composés. Le plan d'expérience proposé ici permet la recherche de l'influence de composé définis *a priori* : par sa connaissance du process analytique, et son savoir faire, la laboratoire doit être à même de définir un certain nombre de composés susceptibles de se retrouver dans le vin, et pouvant influencer le résultat analytique.

5.3.2.3.2.2. Protocole de base et calculs

Analyser ***n*** vins en double, avant et après l'apport du composé suspecté d'avoir une influence sur le résultat analytique, ***n*** doit être au moins égal à 10.

On calculera les valeurs moyennes $\boldsymbol{Mx_i}$ des 2 mesures $\boldsymbol{x_i}$ et $\boldsymbol{x'_i}$ effectuées avant apport et les valeurs moyennes $\boldsymbol{My_i}$ des 2 mesures $\boldsymbol{y_i}$ et $\boldsymbol{y'_i}$ effectuées après apport, puis la différence $\boldsymbol{d_i}$ entres les valeurs $\boldsymbol{Mx_i}$ et $\boldsymbol{My_i}$.

Les résultats de l'expérience pourront être consignés dans le tableau suivant :

	x : Avant apport		y : Après apport		Moyennes		Différence
Echantillons	Rep1	Rep2	Rep1	Rep2	x	y	d
1	x1	x'1	y1	y'1	Mx1	My1	d1=Mx1-My1
…	…	…	…	…	…	…	…
i	xi	x'i	yi	y'i	Mxi	Myi	di=Mxi-Myi
…	…	…	…	…	…	…	…
n	xn	x'n	yn	y'n	Mxn	Myn	dn= Mxn-Myn

La moyenne des résultats avant apport $\boldsymbol{M_x}$

$$M_x = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} Mx_i$$

La moyenne des résultats après apport $\boldsymbol{M_y}$

$$M_y = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} My_i$$

Calculer la moyenne des différences M_d

$$M_d = \sum_{i=1}^{n} \frac{d_i}{n} = My - Mx$$

Calculer l'écart type des différences $\boldsymbol{S_d}$

$$S_d = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(d_i - M_d)^2}{n-1}}$$

Calculer le Z-score

$$Z_{score} = \frac{|M_d|}{S_d}$$

5.3.2.3.2.3. Interprétation

Si Z_{score} est inférieur ou égal à 2, on peut considérer avec un risque de 5% que l'influence du composé ajouté est négligeable sur le résultat d'analyse.
Si Z_{score} est supérieur à 2, on peut considérer avec un risque de 5% que le composé ajouté a une influence sur le résultat d'analyse.

NOTE L'interprétation du Z_{score} est possible dans la mesure où il est fait l'hypothèse que les écarts suivent une loi normale avec 95% de confiance.
Exemple : Etude de l'interaction de composés susceptibles de se trouver dans les échantillons, sur le dosage du glucose fructose dans les vins par un calibrage infrarouge à transformée de Fourier (IRTF).

	Avant apport		+ 250 mg.L^{-1} sorbate de potassium		+ 1 g.L^{-1} acide salicylique		Différences	
vin	rep1	rep2	rep1	rep2	rep1	rep2	diff sorbate	diff salicylique
1	6.2	6.2	6.5	6.3	5.3	5.5	0.2	-0.8
2	1.2	1.2	1.3	1.2	0.5	0.6	0.05	-0.65
3	0.5	0.6	0.5	0.5	0.2	0.3	-0.05	-0.3
4	4.3	4.2	4.1	4.3	3.8	3.9	-0.05	-0.4
5	12.5	12.6	12.5	12.7	11.5	11.4	0.05	-1.1
6	5.3	5.3	5.4	5.3	4.2	4.3	0.05	-1.05
7	2.5	2.5	2.6	2.5	1.5	1.4	0.05	-1.05
8	1.2	1.3	1.2	1.1	0.5	0.4	-0.1	-0.8
9	0.8	0.8	0.9	0.8	0.2	0.3	0.05	-0.55
10	0.6	0.6	0.5	0.6	0.1	0	-0.05	-0.55

Sorbate de potassium	Md =	0.02	
	Sd =	0.086	
	Z_{score} =	0.23	<2
Acide salicylique	Md =	-0.725	
	Sd =	0.282	
	Z_{score} =	2.57	>2

En conclusion, on peut dire que le sorbate de potassium n'influence pas le dosage du glucose fructose par le calibrage IRTF étudiée ici. Par contre, l'acide salicylique présente une influence, et il conviendra de veiller à ce que les échantillons ne contiennent pas d'acide salicylique, pour rester dans le cadre de validité de le calibrage étudié.

5.3.3. Etude de la justesse de la méthode

5.3.3.1. Présentation de l'étape

5.3.3.1.1. Définition

Etroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une large série de résultats d'essais et une valeur de référence acceptée

5.3.3.1.2. Principes généraux

Lorsque la valeur de référence est issue d'un système certifié, l'étude de justesse pourra être considérée comme un raccordement. Il s'agira notamment de deux cas précis :

-Raccordement à des matériaux de référence certifiés : dans ce cas, cette étude de justesse pourra être menée conjointement avec l'étude de linéarité et d'étalonnage, en utilisant le plan d'expérience décrit pour cette dernière étude.

-Raccordement à une chaîne certifiée d'analyse de comparaison interlaboratoire.

Les autres cas qui utilisent des références non issues de systèmes certifiés, sont les plus courants dans les laboratoires d'œnologie de routine. Il conviendra alors de parler de comparaisons :

-Comparaison à une méthode de référence

-Comparaison aux résultats d'une chaîne non certifiée d'analyse de comparaison interlaboratoires.

-Comparaison à des matériaux de référence internes, ou externes non certifiés

5.3.3.1.3.Documents de référence

Norme NF V03-110, Procédure de validation intralaboratoire d'une méthode alternative par rapport à une méthode de référence.
Norme NF V03-115, Guide pour l'utilisation des matériaux de référence.
Norme ISO 11095, Etalonnage linéaire utilisant des matériaux de référence.
Norme ISO 8466-1, Qualité de l'eau – Etalonnage et évaluation des méthodes d'analyse et estimation des caractères de performance
Norme ISO 57025, Exactitude des résultats et méthodes de mesure

5.3.3.2. Comparaison de la méthode alternativeà la méthode de référence OIV

5.3.3.2.1. Champs d'application

Cette méthode s'appliquera dans le cas où le laboratoire pratique la méthode de référence OIV, ou éventuellement une méthode, raccordée, validée, et dont la qualité des performances sont connues et répondent aux besoins des clients du laboratoire.

Pour étudier la justesse entre les deux méthodes, il convient au préalable de s'assurer de la qualité de la répétabilité de la méthode à valider et la comparer à la méthode de référence. La méthodologie pour réaliser la comparaison des répétabilité est décrite dans le chapitre traitant de la répétabilité.

5.3.3.2.2. Justesse de la méthode alternativepar rapport à la méthode de référence

5.3.3.2.2.1. Définition

La justesse sera définie comme l'étroitesse de l'accord entre les valeurs obtenues par la méthode de référence et celle obtenue par la méthode usuelle, indépendamment des erreurs de fidélité des deux méthodes.

5.3.3.2.2.2. Domaine d'application

La justesse de la méthode alternativepar rapport à la méthode de référence s'établit sur un domaine d'application où les répétabilités des deux méthodes sont constantes.

Dans la pratique, il conviendra donc souvent de diviser la gamme de valeurs analysable en plusieurs tronçons ou « niveaux de gamme » (2 à 5), dans lesquels il pourra être raisonnablement estimé que les répétabilités des méthodes sont assimilables à une constante.

5.3.3.2.2.3. Protocole de base et calculs

Dans chaque niveau de gamme, la justesse sera déterminée à partir d'une série de n matériaux d'essai présentant des valeurs de concentration en analyte couvrant le niveau de gamme considéré. Un nombre minimum de 10 matériaux d'essai est nécessaire pour obtenir des résultats significatifs.

Chaque matériau d'essai sera analysé en double par les deux méthodes dans des conditions de répétabilité.

On calculera les valeurs moyennes Mx_i des 2 mesures x_i et x'_i effectuées par la méthode alternativeet les valeurs moyennes My_i des 2 mesures y_i et y'_i effectuées par la méthode de référence, puis la différence d_i entres les valeurs Mx_i et My_i.

Les résultats de l'expérience pourront être consignés dans le tableau suivant :

Matériau d'essai	x : Méthode usuelle		y : Méthode de référence		Moyennes		Différence
	Rep1	Rep2	Rep1	Rep2	x	y	d
1	x1	x'1	y1	y'1	Mx1	My1	d1=Mx1 - My1
…	…	…	…	…	…	…	…

i	xi	x'i	yi	y'i	Mxi	Myi	di=Mxi - Myi
…	…	…	…	…	…	…	…
n	x_n	x'_n	y_n	y'_n	Mx_n	My_n	$d_n = Mx_n - My_n$

Les calculs suivants seront mis en œuvre

- La moyenne des résultats de la méthode alternative $\boldsymbol{M_x}$

$$M_x = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} Mx_i$$

- La moyenne des résultats de la méthode de référence $\boldsymbol{M_y}$

$$M_y = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} My_i$$

- Calculer la moyenne des différences $\boldsymbol{M_d}$

$$M_d = \sum_{i=1}^{n} \frac{d_i}{n} = Mx - My$$

- Calculer l'écart type des différences $\boldsymbol{S_d}$

$$S_d = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(d_i - M_d)^2}{n-1}}$$

- Calculer le $\boldsymbol{Z_{score}}$

$$Z_{score} = \frac{|M_d|}{S_d}$$

5.3.3.2.2.4. Interprétation

- Si $\boldsymbol{Z_{score}}$ est **inférieur** ou égal à 2.0, on peut conclure que la justesse d'une méthode par rapport à l'autre est satisfaisante, dans le niveau de gamme considéré, avec un risque d'erreur $\alpha = 5\%$.

- Si $\boldsymbol{Z_{score}}$ est **supérieur** à 2.0, on peut conclure que la méthode n'est pas juste par rapport à la méthode de référence, dans le niveau de gamme considéré, avec un risque d'erreur $\alpha = 5\%$.

NOTE L'interprétation du Z_{score} est possible dans la mesure où il est fait l'hypothèse que les écarts suivent une loi normale avec 95% de confiance.

Exemple : Etude de la justesse d'un calibrage IRTF pour le dosage du glucose et fructose par rapport à la méthode enzymatique. Le premier niveau de gamme couvre l'échelle de 0 à 5 $g.L^{-1}$ et le second niveau de gamme couvre une échelle de 5 à 20 $g.L^{-1}$.

Vin	IRTF 1	IRTF2	Enz 1	Enz 2	di
1	0	0.3	0.3	0.2	-0.1
2	0.2	0.3	0.1	0.1	0.2
3	0.6	0.9	0.0	0.0	0.7
4	0.7	1	0.8	0.7	0.1
5	1.2	1.6	1.1	1.3	0.2
6	1.3	1.4	1.3	1.3	0.0
7	2.1	2	1.9	2.1	0.0
8	2.4	0	1.1	1.2	0.1
9	2.8	2.5	2.0	2.6	0.3
10	3.5	4.2	3.7	3.8	0.1
11	4.4	4.1	4.1	4.4	0.0
12	4.8	5.4	5.5	5.0	-0.2

Md	0.13	
Sd	0.23	
Z_{score}	0.55	< 2

Vin	IRTF 1	IRTF2	Enz 1	Enz 2	di
1	5.1	5.4	5.1	5.1	0.1
2	5.3	5.7	5.3	6.0	-0.2
3	7.7	7.6	7.2	7.0	0.6
4	8.6	8.6	8.3	8.5	0.2
5	9.8	9.9	9.1	9.3	0.6
6	9.9	9.8	9.8	10.2	-0.1
7	11.5	11.9	13.3	13.0	-1.4
8	11.9	12.1	11.2	11.4	0.7
9	12.4	12.5	11.4	12.1	0.7
10	16	15.8	15.1	15.7	0.5
11	17.7	18.1	17.9	18.3	-0.2
12	20.5	20.1	20.0	19.1	0.7

Md =	0.19	
Sd =	0.63	
Z_{score} =	0.30	< 2

Pour les deux niveaux de gamme, le Z_{score} est inférieur à 2. Le calibrage IRTF pour le dosage du glucose fructose étudiée ici, peut être considérée comme juste par rapport à la méthode enzymatique.

5.3.3.3. Comparaison par essais interlaboratoires

5.3.3.3.1. Domaine d'application

Les essais interlaboratoire sont de deux types :

1. Les **études collaboratives** qui sont relatives à une seule méthode. Ces études sont réalisées pour la validation initiale d'une nouvelle méthode afin d'en définir principalement l'écart type de reproductibilité interlaboratoire SR_{inter}***(méthode)***. La moyenne ***m*** pourra également être donnée.

2. Les chaînes de comparaison interlaboratoire, ou **essais d'aptitude**. Ces essais sont réalisés pour la validation d'une méthode adoptée par le laboratoire, et le contrôle qualité en routine (voir § 5.3.3.3). La valeur fournie est la moyenne interlaboratoire ***m***, ainsi que l'écart type de reproductibilité interlaboratoire et interméthode SR_{inter}.

Dans le cadre de sa participation à une chaîne d'analyse, ou dans une étude collaborative, le laboratoire peut exploiter les résultats pour étudier la justesse d'une méthode afin d'assurer initialement sa validation, et son contrôle qualité en routine.

Si les essais interlaboratoire se font dans le cadre d'une organisation certifiée, ce travail de comparaison pourra permettre le raccordement de la méthode.

5.3.3.3.2.Protocole de base et calculs

Pour obtenir une comparaison suffisante, il convient d'utiliser un nombre minimum de 5 matériaux d'essai sur la période.

Pour chaque matériau d'essai, sont fournis deux résultats :

-La moyenne de tous les laboratoires ayant produits des résultats significatifs ***m***

-L'écart type de reproductibilité interlaboratoire
$S_{R\text{-}inter}$

Les matériaux d'essai sont analysés avec ***p*** répliques par le laboratoire, ces répliques étant réalisées dans des conditions de répétabilité. ***p*** doit être au moins égal à 2.

D'autre part, le laboratoire pourra vérifier que la variabilité intralaboratoire (reproductibilité intralaboratoire) est inférieure à la variabilité interlaboratoire (reproductibilité interlaboratoire) donnée par la chaîne d'analyse.

Pour chaque matériau d'essai, le laboratoire calcule le Z_{score}, donné par la formule suivante :

$$Z_{score} = \frac{|m_{lab} - m|}{S_{R-inter}}$$

Les résultats pourront être consignés dans le tableau suivant :

Matériau d'essai	Rep 1	…	Rep j	…	Rep p	Moyenne labo	Moyenne chaîne	Ecart-type	Zscore
1	x11	…	x1j	…	x1p	$m_{lab_1} = \frac{\sum_{j=1}^{p} x_{1j}}{p}$	m1	SR-inter(1)	$Z_{score_1} = \frac{\lvert m_{lab_1} - m_1 \rvert}{S_{R-inter(1)}}$
…	…	…	…	…	…	…	…	…	…
i	xi1	…	xij	…	xip	$m_{lab_i} = \frac{\sum_{j=1}^{p} x_{ij}}{p}$	mi	SR-inter(i)	$Z_{score_i} = \frac{\lvert m_{lab_i} - m_i \rvert}{S_{R-inter(i)}}$
…	…	…	…	…	…	…	…	…	…
n	xn1	…	xnj	…	xnp	$m_{lab_n} = \frac{\sum_{j=1}^{p} x_{nj}}{p}$	mn	SR-inte(n)	$Z_{score_n} = \frac{\lvert m_{lab_n} - m_n \rvert}{S_{R-inter(n)}}$

5.3.3.3.3. Interprétation

Si tous les Z_{score} sont inférieurs à 2, les résultats de la méthode étudiée pourront être jugés identiques à ceux obtenus par les laboratoires ayant donné des résultats significatifs.

NOTE L'interprétation du Z_{score} est possible dans la mesure où il est fait l'hypothèse que les écarts suivent une loi normale avec 95% de confiance.

Exemple : Une chaîne d'analyse interlaboratoire rend les résultats suivants pour le paramètre dioxyde de soufre libre, sur deux échantillons.

Echantillons	x_1	x_2	x_3	x_4	Moyenne labo	Moyenne chaîne	Ecart-type	Z_{score}
1	34	34	33	34	33.75	32	6	0.29 <2
2	26	27	26	26	26.25	24	4	0.56 <2

On peut conclure que sur ces deux échantillons, la comparaison à la chaîne d'analyse est satisfaisante.

5.3.3.4. Comparaison à des matériaux de référence

5.3.3.4.1. Domaine d'application

Dans les situations où il n'existe pas de méthode de référence (ni d'autres méthodes) pour un paramètre donné, et que ce paramètre n'est pas traité par les chaînes d'analyse, la seule possibilité restante est la comparaison des résultats de la méthode à valider avec les valeurs acceptées de matériaux de référence internes ou externes.

Les matériaux de référence pourront par exemple être des solutions synthétiques établies avec une verrerie de classe A, et/ou du matériel de métrologie étalonné.

Dans le cas de matériaux de référence certifiés, la comparaison aura valeur de raccordement, et pourra être menée de pair avec l'étude d'étalonnage et de linéarité.

5.3.3.4.2. Protocole de base et calculs

Il convient de disposer de ***n*** matériaux de référence pour un niveau de gamme donné, dans lequel il pourra être raisonnablement estimé que la répétabilité est assimilable à une constante, ***n*** doit être au moins égal à 10.

Analyser en double chaque matériau de référence.

On calculera les valeurs moyennes Mx_i des 2 mesures x_i et x'_i effectuées par la méthode usuelle.

On définit $\mathbf{T_i}$ la valeur acceptée du i^{eme} matériau de référence.

Les résultats pourront être consignés dans le tableau suivant :

Matériau de référence	x : Méthode usuelle			T: Valeur acceptée du matériau de référence	Différence d
	Rep1	Rep2	Moyenne x		
1	x1	x'1	Mx1	T1	d1=Mx1-T1
…			…	…	…
i	xi	x'i	Mxi	Ti	di=Mxi-Ti
…			…	…	…
n	xn	x'n	Mxn	Tn	dn= Mxn-Tn

La moyenne des résultats de la méthode alternative $\boldsymbol{M_x}$

$$M_x = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} Mx_i$$

La moyenne des valeurs acceptées des matériaux de référence $\boldsymbol{M_T}$

$$M_T = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} T_i$$

Calculer la moyenne des différences M_d

$$M_d = \sum_{i=1}^{n} \frac{d_i}{n} = Mx - M_T$$

Calculer l'écart type des différences $\boldsymbol{S_d}$

$$S_d = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(d_i - M_d)^2}{n-1}}$$

Calculer le Z-score

$$Z_{score} = \frac{|M_d|}{S_d}$$

5.3.3.4.3.Interprétation

- Si Z_{score} est **inférieur** ou égal à 2.0, on peut conclure que la justesse de la méthode alternative par rapport aux valeurs acceptées du matériau de référence est bonne sur le niveau de gamme considéré.

- Si Z_{score} est **supérieur** à 2.0, on peut conclure que la méthode alternative n'est pas juste par rapport aux valeurs acceptées des matériaux de référence dans le niveau de gamme considéré.

NOTE L'interprétation du Z_{score} est possible dans la mesure où il est fait l'hypothèse que les écarts suivent une loi normale avec 95% de confiance.

Exemple : Il n'existe pas de méthode de référence pour comparer les résultats de l'analyse du Ethyl-4 Phénol (4-EP) par Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS). Les résultats sont comparés aux valeurs acceptées de matériaux de référence constitués par des solutions synthétiques formulées par du matériel raccordé.

Matériau d'essai	Ti (ref)	Y1	Y2	Y3	Y4	My	di
1	4.62	6.2	6.56	4.9	5.7	5.8	1.2
2	12.3	15.1	10.94	12.3	11.6	12.5	0.2
3	24.6	24.5	18	25.7	27.8	24.0	-0.6
4	46.2	48.2	52.95	46.8	35	45.7	-0.5
5	77	80.72	81.36	83.2	74.5	79.9	2.9
6	92.4	97.6	89	94.5	99.5	95.2	2.8
7	123.2	126.6	129.9	119.6	126.9	125.8	2.6
8	246.4	254.1	250.9	243.9	240.4	247.3	0.9
9	385	375.8	366.9	380.4	386.9	377.5	-7.5
10	462	467.5	454.5	433.3	457.3	453.2	-8.9

Md = -0.7
Sd =. 4.16
Zscore = 0.16

A la vue de ces résultats, les valeurs obtenues par la méthode d'analyse du 4-EP par GC-MS peuvent être considérées comme juste par rapport aux valeurs acceptées des matériaux de référence.

5.4. Troisième partie : étude de l'erreur aléatoire

5.4.1. Principe général

L'erreur aléatoire est approchée à partir des études de fidélité. La fidélité est calculée selon une méthodologie pouvant s'appliquer dans diverses conditions expérimentales, comprises entre celles de la répétabilité, et celles de la reproductibilité, qui constituent les conditions extrêmes de sa mesure.
L'étude de fidélité est un des éléments indispensable à l'étude de l'incertitude de mesure.

5.4.2. Documents de référence

Norme ISO 5725, Exactitude des résultats et méthodes de mesure
Norme NF V03-110, procédure de validation intralaboratoire d'une méthode alternative par rapport à une méthode de référence.

5.4.3. Fidélité de la méthode

5.4.3.1. Définition

Etroitesse d'accord entre des résultats d'essai indépendants obtenus sous des conditions stipulées.

NOTE 1 La fidélité dépend uniquement de la distribution des erreurs aléatoires et n'a aucune relation avec la valeur vraie ou spécifiée.
NOTE 2 La mesure de fidélité est exprimée à partir de l'écart type des résultats d'essais.
NOTE 3 Le terme "résultats d'essai indépendants" signifie des résultats obtenus d'une façon non influencée par un résultat précédent sur le même matériau d'essai ou similaire. Les mesures quantitatives de la fidélité dépendent de façon critique des conditions stipulées. Les conditions de répétabilité et de reproductibilité sont des ensembles particuliers de conditions extrêmes.

Dans la pratique, on parlera de fidélité pour toutes les conditions expérimentales comprises entre les conditions de répétabilité et celles de reproductibilité.

5.4.3.2. Champs d'application

Sont ici détaillés les protocoles et les calculs depuis le cas théorique général, jusqu'aux cas particuliers de répétabilité et de reproductibilité. Cette approche exhaustive doit permettre d'appliquer l'étude de fidélité dans la grande majorité des situations des laboratoires.

L'étude de fidélité peut a priori s'appliquer sans difficulté à toutes les méthodes quantitatives.

Dans de nombreux cas, la fidélité n'est pas constante sur toute la gamme de validité de la méthode. Il convient alors de définir plusieurs tronçons ou « niveaux de gamme », dans lesquels il pourra être raisonnablement considéré que la fidélité est assimilable à une constante. Le calcul de fidélité sera alors réitéré pour chaque niveau de gamme.

5.4.3.3. Cas théorique général

5.4.3.3.1. Protocole de base et calculs

5.4.3.3.1.1. Calculs avec plusieurs matériaux d'essai

n matériaux d'essais sont analysés sur une période de temps assez longue avec plusieurs répliques, p_i étant le nombre de répliques du $i^{ème}$ matériau d'essai. Les matériaux d'essai doivent conserver des propriétés constantes au cours de la période considérée.
A chaque réplique, la mesure peut être réalisée avec ***k*** répétitions, (on ne considère pas ici le cas où le nombre de répétitions ***k*** peut être variable d'un matériau d'essai à l'autre, ce qui compliquerait encore plus les calculs).

Le nombre total des répliques devra être supérieur à 10, réparti sur l'ensemble des matériaux d'essai.

Les résultats pourront être consignés dans le tableau suivant, (cas où ***k*** = 2)

Répliques Matériaux d'essai.	1		…		j		p1		pi		pn	
1	x11	x'11	…	…	x1j	x'1j	x1p1	x'1p1				
…												
i	xi1	x'i1	…	…	xij	x'ij	…	…	xipi	x'ipi		
…												
n	xn1	x'n1	…	…	xnj	x'nj	…	…	…	…	xpnn	x'pnn

Dans cette situation, l'écart type de variabilité totale (ou écart type de fidélité S_v) est donnée par l'expression générale :

$$S_v = \sqrt{Var(\bar{x}_{ij}) + (1 - \frac{1}{k}) Var(répet)}$$

avec :

$Var(\bar{x}_{ij})$ variance de la moyenne des répétions des répliques de tous les matériaux d'essais.

$Var(répet)$ variance de la répétabilité de toutes les répétitions.

- Dans le cas où les matériaux d'essais ont été analysés en double à chaque réplique (***k*** = 2), l'expression devient :

$$S_v = \sqrt{Var(\bar{x}_{ij}) + \frac{Var(répet)}{2}}$$

- Lorsqu'une seule mesure du matériau d'essai a été réalisée à chaque réplique (***k*** = 1), la variance de répétabilité est nulle, l'expression devient :

$$S_v = \sqrt{Var(\bar{x}_{ij})}$$

- Calcul de $Var(\bar{x}_{ij})$

La moyenne des deux répliques x_{ij} et x'_{ij} est : $\bar{x}_{ij} = \frac{x_{ij} + x'_{ij}}{2}$

Pour chaque matériau d'essai, la moyenne des ***n*** répliques est calculée : **Erreur ! Des objets ne peuvent pas être créés à partir des codes de champs de mise en forme.**

Le nombre de mesures différentes ***N*** est la somme des p_i

$$N = \sum_{i=1}^{n} p_i$$

La variance $Var(\bar{x}_{ij})$ est alors donnée par l'équation suivante

$$Var(x_{ij}) = \frac{\sum_{i=1}^{n}\sum_{j=1}^{p_i}(\bar{x}_{ij} - M_{x_i})^2}{N-n}$$

NOTE Cette variance peut également être calculée à partir des variances de variabilité de chacun des matériaux d'essai : $Var_i(x_{ij})$. On emploie alors la relation suivante qui est strictement équivalente à la relation précédente :

$$Var(x_{ij}) = \frac{\sum_{i=1}^{n}(p_i - 1).Var_i(x_j)}{N-n}$$

-Calcul de $Var(répet)$

La variance de répétabilité est calculée comme une répétabilité classique avec ***N*** matériaux d'essai en double. Selon le calcul de répétabilité exposé dans le chapitre « répétabilité », pour ***k = 2*** la variance de répétabilité est :

$$Var(répet) = \frac{\sum_{i=1}^{p}\sum_{j=1}^{n_i} w_{ij}^{\ 2}}{2N} \qquad \text{avec} \qquad w_{ij} = x_{ij} - x'_{ij}$$

La fidélité ***v*** est calculée selon la formule :

$$v = 2\sqrt{2}.S_v = 2.8.S_v$$

La valeur de fidélité ***v*** signifie que dans 95% des cas, l'écart entre deux valeurs obtenues par la méthode, dans les conditions définies sera inférieur ou égal à ***v***.

NOTE 1 L'emploi et l'interprétation de ces résultats est possible dans la mesure où il est fait l'hypothèse que les écarts suivent une loi normale avec 95% de confiance.

NOTE 2 On peut également définir une fidélité à 99 % avec $v=2.58\sqrt{2}.S_v=3.65.S_v$

5.4.3.3.1.2. Calculs avec 1 matériau d'essai

Dans cette situation, les calculs se simplifient. Il convient de procéder à ***p*** répliques de mesure du matériau d'essai, éventuellement avec une répétition de la mesure à chaque réplique. ***p*** doit être au moins égal à 10.

Dans les calculs suivants, on considère que la mesure se fait en double à chaque réplique.

- La variance $Var(\overline{x}_{ij})$ est alors donnée par l'équation suivante :

$$Var(x_{ij}) = \frac{\sum_{i=1}^{p}(\overline{x}_i - M_x)^2}{p-1}$$

avec :

$\overline{x}i$	moyenne des deux répétitions de la réplique ***i***
p	nombre de répliques
M_x	moyenne de toutes les répliques

- La variance $Var(répet)$ est alors donnée par l'équation suivante :

$$Var(répet) = \frac{\sum_{i=1}^{p} w_i^2}{2p}$$

avec w_i *: différence entre les deux répétitions de la réplique* ***i***

5.4.3.4. Répétabilité

5.4.3.4.1. Définitions

La répétabilité est l'étroitesse de l'accord entre les résultats d'analyse indépendants entre eux obtenus avec la méthode considérée sur un même vin, dans le même laboratoire, avec le même opérateur utilisant le même matériel, dans un court intervalle de temps.

Ces conditions expérimentales seront appelées conditions de répétabilité.

La valeur de répétabilité **r** est la valeur en dessous de laquelle on peut estimer que se situe la différence absolue entre deux résultats d'analyse unique, obtenus dans les conditions de répétabilité définies ci-dessus, et ce, avec un niveau de confiance de 95 %.

L'écart type de répétabilité **Sr** est l'écart type des résultats obtenus dans les conditions de la répétabilité. C'est un paramètre de la dispersion des résultats, obtenu dans les conditions de la répétabilité.

5.4.3.4.2. Champs d'application

L'étude de répétabilité peut a priori s'appliquer sans difficulté à toutes les méthodes quantitatives, dans la mesure où les conditions de répétabilité peuvent être respectées.

Dans de nombreux cas, la répétabilité n'est pas constante sur toute la gamme de validité de la méthode. Il convient alors de définir plusieurs tronçons ou « niveaux de gamme », dans lesquels il pourra être raisonnablement considéré que la répétabilité est assimilable à une constante. Le calcul de répétabilité sera alors réitéré à chaque niveau de gamme.

5.4.3.4.3. Protocole de base et calculs

5.4.3.4.3.1.Cas général

Le nombre matériaux d'essai pourra être variable en fonction du nombre de répétitions. Dans la pratique on considèrera que le nombre de mesures tous matériaux d'essai confondus, devra être supérieur à 20. Il n'est pas nécessaire que les conditions de répétabilité soit maintenues d'un matériau d'essai à l'autre, mais toutes les répliques réalisées sur un même matériau d'essai devront être réalisés dans ces conditions de répétabilité.

La répétabilité reste un cas particulier du calcul de la fidélité $S_v = \sqrt{Var(\bar{x}_{ij}) + \frac{Var(répet)}{2}}$. La partie $Var(répet)$ est naturellement égale à 0 (une seule mesure à chaque réplique), et le calcul se résume au calcul de $Var(x_{ij})$

$$S_r = \sqrt{Var(x_{ij})} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}\sum_{j=1}^{p_i}(\bar{x}_{ij} - M_{x_i})^2}{N-n}}$$

La valeur ***r*** signifie que dans 95% des cas, l'écart entre deux valeurs acquises dans des conditions de répétabilité sera inférieur ou égal à ***r***.

5.4.3.4.3.2. Cas particulier applicable à 1 seule répétition

En pratique la situation la plus courante pour les systèmes automatisés est l'analyse de matériaux d'essai avec une seule répétition. Il convient d'utiliser au moins 10 matériaux de façon à atteindre les 20 mesures nécessaires. Les deux répliques de mesure d'un même matériau d'essai devront être réalisées dans des conditions de répétabilité.

Dans ce cas précis, le calcul de S_r se simplifie et devient :

$$S_r = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{q} w_i^2}{2p}}$$

dans laquelle :

$\boldsymbol{S_r}$ = écart type de répétabilité
$\boldsymbol{p}$ = nombre de matériaux d'essai analysés en double
$\boldsymbol{w_i}$ = différences absolues entre doubles

La répétabilité **r** est calculée selon la formule :

r = 2,8 Sr

Exemple : Pour la méthode alternative de dosage du Dioxyde de soufre libre envisagée, et pour une gamme de mesure de 0 à 50 mg/l, l'opérateur cherchera au moins 10 échantillons présentant des concentrations comprises entre ces valeurs et régulièrement réparties.

N° de l'échantillon	xi (en mg/l)	x'i (en mg/l)	Wi (valeur absolue)
1	14	14	0
2	25	24	1
3	10	10	0
4	2	3	1
5	35	35	0
6	19	19	0
7	23	23	0
8	27	27	0
9	44	45	1

10	30	30	0
11	8	8	0
12	48	46	2

Exemple : En reprenant les valeurs données dans le tableau ci-dessus, les résultats suivants sont obtenus :

q = 12

Sr = 0,54 mg/l

r = 1,5 mg/l

Ce résultat permet d'affirmer que, avec une probabilité de 95%, les résultats obtenus par la méthode à l'étude auront une répétabilité inférieure à 1,5 mg/l.

5.4.3.4.4. Comparaison des répétabilités

5.4.3.4.4.1. Détermination des répétabilités des deux méthodes

Pour estimer les performances d'une méthode, il peut être utile de comparer sa répétabilité à celle d'une méthode de référence.

Soit $S_{r\text{-}alt}$ l'écart type de répétabilité de la méthode usuelle, et $S_{r\text{-}ref}$ l'écart type de la répétabilité de la méthode de référence.

La comparaison est directe. Si la valeur de répétabilité de la méthode alternative est inférieure ou égale à celle de la méthode de référence, le résultat est favorable. Si elle est plus élevée, le laboratoire devra s'assurer que ce résultat reste conforme au cahier des charges qu'il a accepté pour la méthode concernée. Dans ce dernier cas, il pourra aussi appliquer un test de Fischer-Snedecor pour savoir si la valeur trouvée pour la méthode alternative est significativement supérieure à celle de la méthode de référence.

5.4.3.4.4.2. Test de Fischer-Snedecor

On calculera le rapport :

$$F_{obs} = \frac{S_{r_{alt}}^{\ 2}}{S_{r_{ref}}^{\ 2}}$$

On utilisera la valeur critique de Snedecor avec un risque **α** égal à 0,05 correspondant à la variable de Fischer au niveau de confiance 1- α, avec ν_1=N(x)-n, et ν_2=N(z)-m degrés de liberté : F(N(x)-n, N(y)-m, 1- α). Dans le cas d'une répétabilité calculée avec une seule répétition sur *p* matériaux d'essai pour la méthode alternative et *q* matériaux d'essai pour la méthode de référence, la variable de Fischer aura pour degré de liberté ν_1=*p*, et ν_2=*q*, soit : F(p, q, 1- α).

Interprétation du test :

1/ $\mathbf{F_{obs} > F_{1-\square}}$ **α**, la valeur de la répétabilité de la méthode alternative est significativement supérieure à celle de la méthode de référence**.**

2/ $\mathbf{F_{obs} < F_{1-\square}}$ **α**, on ne peut affirmer que la valeur de la répétabilité de la méthode alternative soit significativement supérieure à celle de la méthode de référence**.**

Exemple : La valeur de l'écart type de répétabilité trouvée pour la méthode de dosage du Dioxyde de soufre libre est :

Sr = 0,54 mg/l

Le laboratoire a effectué le dosage sur les mêmes matériaux d'essai par la méthode de référence OIV. La valeur de l'écart type de répétabilité trouvée dans ce cas est :

Sréf = 0,39 mg/l

$$F_{obs} = \frac{0.54^2}{0.39^2} = \frac{0,29}{0,15} = 1,93$$

ν 2 = 12
ν 1 = 12
F1-α = 2,69 > 1.93

La valeur F_{obs} obtenue est inférieure à la valeur $\mathbf{F_{1-\alpha}}$; on ne peut affirmer que la valeur de la répétabilité de la méthode alternative soit significativement supérieure à celle de la méthode de référence**.**

5.4.3.5. Reproductibilité intralaboratoire

5.4.3.5.1.Définition
La reproductibilité intralaboratoire est l'étroitesse de l'accord entre les résultats d'analyse obtenus avec la méthode considérée sur un même vin, dans le même

laboratoire, avec le même opérateur ou des opérateurs différents utilisant des courbes de calibrages différents, à des jours différents.

5.4.3.5.2. Champs d'application

Les études de reproductibilité peuvent être mises en œuvre sur les méthodes quantitatives, si le temps d'analyse est raisonnablement limité, s'il existe la capacité de détenir au moins un matériau d'essai stable dans le temps.

Dans de nombreux cas, la reproductibilité n'est pas constante sur toute la gamme de validité de la méthode. Il convient alors de définir plusieurs tronçons ou « niveaux de gamme », dans lesquels il pourra être raisonnablement considéré que la reproductibilité est assimilable à une constante. Le calcul de reproductibilité sera alors réitéré à chaque niveau de gamme.

5.4.3.5.3. Protocole de base et calculs

Le laboratoire choisira un ou plusieurs matériaux d'essais stables. Il appliquera la méthode régulièrement pendant une période au moins égale à un mois et conservera les résultats obtenus ($\mathbf{X_{ij}}$, **matériau *i*, réplique *j***). Un minimum de 5 répliques est souhaitable pour chaque matériau d'essai le nombre total minimum de répliques étant de 10. Les répliques pourront être analysées en double.

Le calcul de la fidélité s'applique intégralement pour le calcul de reproductibilité, en intégrant $Var(répet)$ si les mesures ont été réalisées en double.

La reproductibilité ***R*** est calculée selon la formule :

$R = 2{,}8\ S_R$

La valeur ***R*** signifie que dans 95% des cas, l'écart entre deux valeurs acquises dans des conditions de reproductibilité sera inférieur ou égal à ***R***.

Exemple : Etude de reproductibilité du dosage de l'acide sorbique dans les vins par entraînement à la vapeur et lecture par absorption à 256 nm.
Deux vins sorbatés différents ont été conservés pendant une période de 3 mois. Le dosage de l'acide sorbique a été réalisé à intervalles réguliers sur cette période, avec une répétition à chaque mesure.

	Matériau d'essai 1		Matériau d'essai 2	
Répliques	x1	x2	x1	x2
1	122	125	140	139
2	123	120	138	137
3	132	130	139	141
4	121	115	143	142
5	130	135	139	139
6	135	142	135	138
7	137	135	139	139
8	130	125	145	145
9	123	130	138	137
10	112	115	135	134
11	131	128	146	146
12			137	138
13			146	147
14			145	148
15			130	128

$n = 2$
$p_1 = 11$
$p_2 = 15$
$N = 26$

$Var(x_{ij}) = 37.8$
$Var(repet) = 5.01$
$S_R = 6.35$
$R = 17.8$

6. Contrôle qualité des méthodes d'analyse (CIQ)

6.1. Documents de référence

- Résolution OIV Œno 19/2002 : Recommandations harmonisées pour le contrôle interne de qualité dans les laboratoires d'analyse.
- CITAC / EURACHEM : Guide pour la qualité en chimie analytique, Edition 2002
- Norme NF V03-115, Guide pour l'utilisation des matériaux de référence

6.2. Principes généraux

Il est rappelé qu'un résultat d'analyse est entaché de deux types d'erreur : l'erreur systématique traduite en terme de biais, et l'erreur aléatoire. Pour les analyses en séries, un autre type d'erreur peut être défini, qui peut tenir à la fois de l'erreur systématique et de l'erreur aléatoire : il s'agit de l'effet de série, illustré par exemple par la déviation du système de mesure au cours d'une série.

Le CIQ visera à la surveillance et à la maîtrise de ces trois erreurs.

6.3. Les matériaux de référence

Le CIQ se base essentiellement sur l'exploitation des résultats de mesurage de matériaux de référence. Le choix et la constitution de ceux-ci sont donc des étapes essentielles qu'il convient de maîtriser de façon à assurer un socle performant au système.

Un matériau de référence est défini par deux paramètres :

-Sa matrice
-L'assignation de sa valeur de référence

Plusieurs cas de figure sont possibles ; les cas rencontrés en œnologie sont regroupés dans le tableau à double entrée suivant :

Matrice Valeur de référence	Solution synthétique Les solutions synthétiques permettent de constituer assez facilement des matériaux de référence. Elles ne sont pas compatibles avec les méthodes dont le signal n' est pas spécifiques, et qui sont sensibles aux effets matrice	Matrice naturelle (vin…) Les matrices naturelles constituent les matériaux de référence les plus intéressant à priori car elles assurent d' éviter tout risque d' effet matrice pour les méthodes qui ne sont pas parfaitement spécifiques.	Vin dopé Un vin dopé est un vin ayant reçu un apport artificiel d' un analyte.
Valeur obtenue par formulation	Il convient que la solution soit réalisée selon les règles de métrologie. Il est rappelé que la valeur de formulation obtenue est sujette à une incertitude. L' application d' un tel cas de figure permet de surveiller la fidélité de la méthode, ainsi que sa justesse en un point par rapport à une référence étalonnée.	Sans objet	Cette méthode est applicable quand le vin de base est totalement dépourvu de l' analyte. Ces types de matériaux sont bien adaptés pour les adjuvants œnologiques non natifs dans le vin. Si le dopage est appliqué avec un constituant natif du vin, on ne peut plus considérer la matrice comme naturelle. Le dopage doit être réalisé selon les règles de métrologie. La valeur obtenue est sujette à une incertitude. Ce cas de figure permet de suivre la fidélité de la méthode, ainsi que sa justesse en un point. Il peut être appliqué aux méthodes sensibles aux effets matrice pour les composés non natifs du vin, mais pas dans le cas de composés natifs du vin.
Valeur externe au laboratoire	L' organisme fournisseur de la solution devra apporter des garanties de qualité et si possible être certifié. Les valeurs de référence seront accompagnées d' une valeur d' incertitude à un niveau de confiance indiqué. Ce cas de figure permet de suivre la fidélité d' une méthode, et de vérifier sa justesse en un point par rapport à la valeur externe. Ceci a valeur de raccordement en ce point si l' organisme fournisseur est accrédité pour la préparation du matériau de référence en question. Il ne peut pas être appliqué aux méthodes sensibles aux effets matrice.	La valeur externe a été déterminée sur le vin par une chaîne d' analyse interlaboratoires. Certains organismes proposent des échantillons conditionnés de vins dont les valeurs ont été ainsi déterminées. Cependant, dans certains cas, les vins ainsi présentés peuvent avoir été dopés et/ou stabilisés chimiquement. La matrice peut alors être affectée. Ce cas de figure permet de suivre la fidélité d' une méthode, et de vérifier sa justesse en un point par rapport à la valeur externe. Ceci a valeur de raccordement en ce point si la l' organisme fournisseur fait l' objet d' une accréditation pour la préparation du matériau de référence en question. Il ne peut pas être appliqué aux méthodes sensibles aux effets matrice	Il s' agit en pratique d' échantillons conditionnés de vins dopés et/ou chimiquement stabilisés proposés par des organismes. Ces matériaux ne peuvent pas prétendre constituer une matrice naturelle. Les valeurs de référence sont généralement générées par une chaîne d' analyse. Ce cas de figure permet de suivre la fidélité de la méthode, ainsi que sa justesse en un point par rapport à l' étalon externe. Ceci a valeur de raccordement en ce point si la l' organisme fournisseur fait l' objet d' une accréditation pour la préparation du matériau de référence en question. Il ne peut pas être appliqué aux méthodes sensibles aux effets matrice
Valeur obtenue par une méthode de référence	Dans le cas où la solution synthétique n' est pas obtenue avec un matériel étalonné. La valeur de référence peut-être déterminée par l' analyse de la solution synthétique par méthode de référence. La mesure est réalisée au moins 3 fois. La valeur retenue est la moyenne des 3 résultats, dans la mesure où ils restent dans un intervalle inférieur à la répétabilité de la méthode. Le cas échéant, l' opérateur peut vérifier la cohérence du résultat obtenu avec la valeur de formulation de la solution. Ce cas de figure permet de suivre la fidélité d' une méthode, et de vérifier sa justesse en un point par rapport à la méthode de référence. Il ne peut pas être appliqué aux méthodes sensibles aux effets matrice.	La mesure est réalisée 3 fois avec la méthode de référence, la valeur retenue est la moyenne des 3 résultats, dans la mesure où ils restent dans un intervalle inférieur à la répétabilité de la méthode. Ce cas de figure permet de suivre la fidélité d' une méthode, et de vérifier sa justesse en un point par rapport à la méthode de référence. Il peut être appliqué aux méthodes sensibles aux effets matrice.	La mesure est réalisée 3 fois avec la méthode de référence, la valeur retenue est la moyenne des 3 résultats, dans la mesure où ils restent dans un intervalle inférieur à la répétabilité de la méthode. Ce cas de figure permet de suivre la fidélité d' une méthode, et de vérifier sa justesse en un point par rapport à la méthode de référence. Il peut être appliqué aux méthodes sensibles aux effets matrice pour les composés non natifs du vin, mais pas dans le cas de composés natifs du vin.
Valeur obtenue par la méthode à contrôler L' utilisation de la valeur instrument comme valeur de référence ne permet pas de contrôler la justesse. Une approche alternative devra alors être mise en place.	La valeur de référence est mesurée par la méthode à contrôler. Le matériau est mesuré avec 10 répétitions, il sera vérifié que les écarts entre ces valeurs sont inférieurs à la valeur de répétabilité ; les valeurs les plus extrêmes peuvent éventuellement être retirées, sans dépasser deux valeurs retirées. Pour assurer la cohérence des valeurs obtenues lors des 10 répétitions, cette série sera contrôlée par des matériaux de contrôle établis lors d' une session précédente, placés en début et en fin de série. Ce cas de figure ne permet de suivre que la fidélité de la méthode, la justesse doit être suivie par une autre démarche.	La valeur de référence est mesurée par la méthode à contrôler. Le matériau est mesuré avec 10 répétitions, il sera vérifié que les écarts entre ces valeurs sont inférieurs à la valeur de répétabilité ; les valeurs les plus extrêmes peuvent éventuellement être retirées, sans dépasser deux valeurs retirées. Pour assurer la cohérence des valeurs obtenues lors des 10 répétitions, cette série sera contrôlée par des matériaux de contrôle établis lors d' une session précédente, placés en début et en fin de série. La valeur obtenue pourra également être comparée avec la valeur obtenue par la méthode de référence (au cours de 3 répétitions par exemple). L' écart entre les deux valeurs devra rester inférieur à la justesse calculée de la méthode alternative par rapport à la méthode de référence. Ce cas de figure a un intérêt notamment quand une méthode produit une erreur aléatoire reproductible propre à chaque échantillon, notamment en raison de la non spécificité du signal mesuré. Cette erreur est souvent minime et inférieure à l' incertitude, mais peut générer une erreur systématique si la méthode est ajustée sur une seule valeur. Ceci permet de suivre la fidélité de la méthode, la justesse devra être suivie par une autre approche. C' est la cas très notable de l' IRTF.	La valeur de référence est mesurée par la méthode à contrôler. Le matériau est mesuré avec 10 répétitions, il sera vérifié que les écarts entre ces valeurs sont inférieurs à la valeur de répétabilité ; les valeurs les plus extrêmes peuvent éventuellement être retirées, sans dépasser deux valeurs retirées. Pour assurer la cohérence des valeurs obtenues lors des 10 répétitions, cette série sera contrôlée par des matériaux de contrôle établis lors d' une session précédente, placés en début et en fin de série. Ce cas de figure ne permet que de suivre la fidélité de la méthode, la justesse doit être suivie par une autre démarche. Il peut être appliqué aux méthodes sensibles aux effets matrice pour les composés non natifs du vin, mais pas dans le cas de composés natifs du vin.

6.4. Contrôle des séries analytiques

6.4.1. Définition

Une série analytique est un ensemble de mesurages réalisés dans des conditions de répétabilité.

Pour un laboratoire qui utilise majoritairement le mode d'analyse par série analytique il est nécessaire de vérifier le bon ajustement instantané de l'instrument de mesure et sa stabilité au cours de la série analytique.

Deux approches complémentaires sont possibles :

- l'utilisation de matériaux de référence (souvent appelés par extension « matériaux de contrôle »)
- l'utilisation d'un étalon interne notamment pour les méthodes séparatives.

6.4.2. Contrôle de justesse à partir de matériaux de référence

L'erreur systématique sera contrôlée par l'introduction de matériaux de référence, dont la valeur de référence a été assignée à partir de moyens externes à la méthode contrôlée.

La valeur mesurée du matériau de référence est associée à une tolérance, à l'intérieur de laquelle on accepte la valeur mesurée comme valide. Le laboratoire définit des valeurs de tolérance pour chaque paramètre et pour chaque système analytique. **Ces valeurs sont propres au laboratoire**.

Les matériaux de contrôle devront être choisis de façon à ce que leurs valeurs de référence correspondent aux niveaux de valeurs habituellement rencontrés pour un paramètre donné. Dans le cas où l'échelle de mesure est large, et où l'incertitude de mesure n'est pas constante sur l'échelle, il convient d'utiliser plusieurs matériaux de contrôle pour couvrir les différents niveaux de gamme.

6.4.3. Fidélité intrasérie

Lorsque les séries analytiques sont assez longues, il existe un risque de dérive du système analytique. Il convient alors de contrôler la fidélité intrasérie par l'utilisation d'un même matériau de référence positionné à intervalles réguliers dans la série. Les mêmes matériaux de contrôle que ceux utilisés pour la justesse pourront être exploités.

Il convient que l'écart des valeurs mesurées du même matériau de référence au cours de la série soit inférieur à la valeur de répétabilité r calculée pour un niveau de confiance de 95%.

NOTE Pour un niveau de confiance de 99% on pourra utiliser comme valeur $3.65.S_r$.

6.4.4. Etalon interne

Certaines méthodes séparatives permettent l'introduction d'un étalon interne dans le produit à analyser.
Il convient alors de procéder à l'introduction d'un étalon interne avec du matériel étalonné dont l'incertitude de mesure est connue.
L'étalon interne permet à la fois un contrôle de la justesse et un contrôle de la fidélité intrasérie. Il est à noter qu'une dérive affecte dans des proportions égales les signaux de l'analyte et de l'étalon interne, la valeur de l'analyte étant calculé avec la valeur du signal de l'étalon interne, l'effet de la dérive est annulé.
La série sera validée si les étalons internes sont à l'intérieur des tolérances définies.

6.5. Contrôle du système d'analyse

6.5.1. Définition

Il s'agit d'un contrôle complémentaire au contrôle des séries. Il s'en différencie par le fait que sont compilées des valeurs acquises sur des échelles de temps longues, et/ou comparées avec des valeurs issues d'autres systèmes d'analyse.

Nous développerons deux applications :
- Cartes de Shewhart pour le suivi de la stabilité du système d'analyse
- Comparaison interne et externe du système d'analyse

6.5.2.Carte de Shewhart

Les cartes de Shewhart sont des outils statistiques graphiques qui permettent de surveiller les dérives des systèmes de mesure, par l'analyse régulière, en pratique dans des conditions de reproductibilité, de matériaux de référence stables.

6.5.2.1. Acquisition des données

Un matériau de référence stable est mesuré pendant une période suffisamment longue, à des intervalles réguliers définis. Ces mesurages sont enregistrés et consignés dans les cartes de contrôle. Ils sont réalisés dans des conditions de

reproductibilité, et sont de fait exploitables pour le calcul de reproductibilité, et au-delà pour l'estimation de l'incertitude de mesure.

Les valeurs des paramètres analytiques des matériaux de référence choisis doivent se situer dans celles des gammes de mesure valide.

Les matériaux de référence sont analysés au cours d'une série analytique, si possible routinière, avec une position variable dans la série d'une fois à l'autre. En pratique, il est parfaitement possible d'utiliser les mesurages des matériaux de contrôle des séries pour alimenter les cartes de contrôle.

6.5.2.2. Présentation des résultats et définition des limites

Les résultats individuels sont comparés à la valeur acceptée du matériau de référence, et à l'écart type de reproductibilité du paramètre considéré, au niveau de gamme considéré.

Deux types de limites sont définis dans les cartes de Shewhart, les limites associées aux résultats individuels, et les limites associées à la moyenne.

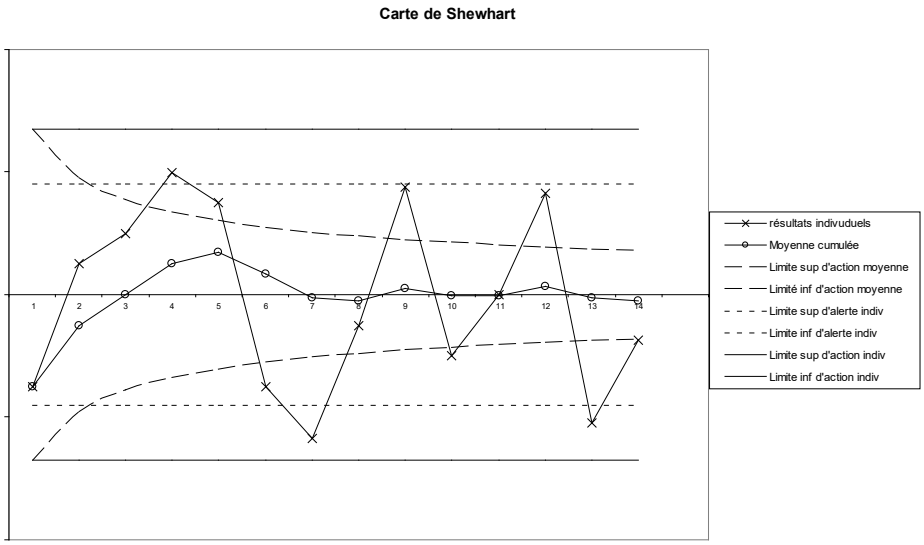
Les limites définies pour les résultats individuels sont habituellement fondées sur les valeurs d'écart type de reproductibilité intralaboratoire pour le niveau de gamme considéré, elles sont de deux types :

- La limite d'alerte : $+/-2.S_R$.
-La limite d'action : $+/-3.S_R$.

La limite définie pour la moyenne cumulée est d'autant plus étroite que le nombre de mesures est élevé.

- Cette limite est une limite d'action : $+/-\frac{3.S_R}{\sqrt{n}}$. ***n*** étant le nombre de mesures portées sur la carte.

NOTE Par soucis de lisibilité, la limite d'alerte de la moyenne cumulée ne figure que rarement sur la carte de contrôle, celle-ci aurait pour valeur $+/-\frac{2.S_R}{\sqrt{n}}$.



6.5.2.3. Exploitation de la carte de Shewhart

Nous donnons ci-dessous les critères d'exploitation les plus souvent utilisés. C'est aux laboratoires de définir plus précisément les critères qu'ils appliquent.

Une action corrective sur la méthode (ou l'appareil) sera engagée :

a) si un résultat individuel est à l'extérieur des limites d'action des résultats individuels.
b) si deux résultats individuels consécutifs sont situés à l'extérieur des limites d'alerte des résultats individuels.
c) si de plus, l'analyse *a posteriori* des cartes de contrôle révèlent des dérives de la méthode dans trois cas de figure:
- neuf points de résultats individuels consécutifs sont situés d'un même côté de la droite des valeurs de référence.
- six points de résultats individuels successifs montent ou descendent.
- deux points sur trois successifs sont situés entre la limite d'alerte et la limite d'action.
d) si la moyenne arithmétique des ***n*** résultats enregistrés est au-delà d'une des limites d'action de la moyenne cumulée (ce qui met en évidence une déviation systématique des résultats).

NOTE : La carte de contrôle doit être reprise à **n**=*1 dès qu'une action corrective a été effectuée sur la méthode.*

6.5.3. Comparaison interne des systèmes d'analyse

Dans un laboratoire qui dispose de plusieurs méthodes d'analyse pour un paramètre donné, il est intéressant de réaliser des mesurages de mêmes matériaux d'essai de façon à comparer les résultats. L'accord des résultats est jugé satisfaisant entre les deux méthodes si leur écart reste inférieur à 2 fois l'écart type de différence calculé en validation, et ce, avec un niveau de confiance de 95%.

NOTE Cette interprétation est possible dans la mesure où il est fait l'hypothèse que les écarts suivent une loi normale avec 95% de confiance.

6.5.4. Comparaison externe du système d'analyse

6.5.4.1. Chaîne d'analyse de comparaison interlaboratoires

L'organisation des essais et des calculs est donnée dans le chapitre « comparaison à une chaîne d'analyse interlaboratoire ».

Au-delà de la vérification de la justesse par le Z_{score} les résultats pourront être analysés plus finement, notamment en ce qui concerne la position des valeurs du laboratoire par rapport à la moyenne. Si elles sont systématiquement d'un même côté de la moyenne pour plusieurs chaînes d'analyse successives, cela peut justifier pour le laboratoire la mise en œuvre d'actions correctives, même si le Z_{score} reste inférieur à la valeur critique.

NOTE L'interprétation du Z_{score} est possible dans la mesure où il est fait l'hypothèse que les écarts suivent une loi normale avec 95% de confiance.

Dans le cas où la chaîne d'intercomparaison fait l'objet d'une accréditation, ce travail de comparaison à valeur de raccordement.

6.5.4.2. Comparaison à des matériaux de référence externes

Le mesurage à intervalles réguliers de matériaux de référence externes permet également de surveiller l'apparition d'une erreur systématique (biais).

Le principe est de procéder au mesurage de matériaux de référence externes, et d'accepter ou de refuser la valeur en fonction de limites de tolérance. Ces limites

sont définies à partir de la combinaison des incertitudes de la méthode contrôlée et de la valeur de référence du matériau de référence.

6.5.4.2.1. Incertitude type du matériau de référence

Les valeurs de référence de ces matériaux sont accompagnées d'intervalles de confiance. Le laboratoire doit déterminer la nature de cette donnée, et en tirer le valeur de l'incertitude type de la valeur de référence S_{ref} ; en effet, plusieurs cas se présentent et doivent être distingués :

- Cas où l'incertitude ***a*** est donnée sous la forme d'un intervalle de confiance à 95% (incertitude élargie). Ceci signifie qu'on se place dans le cadre d'une loi normale. a constitue donc une « incertitude élargie » et correspond à 2 fois l'écart type S_{ref} de l'incertitude type des valeurs de référence des matériaux fournis

$$S_{ref} = \frac{a}{2}$$

- Cas de certificat, ou autre spécification, donnant des limites +/- ***a*** sans spécifier le niveau de confiance. On se place alors dans le cadre d'une dispersion rectangulaire, la valeur du mesurage X a la même chance de pendre une quelconque valeur dans l'intervalle ***ref+/- a***.

$$S_{ref} = \frac{a}{\sqrt{3}}$$

- Cas particulier de verrerie donnant des limites +/- ***a***. On se place dans le cadre d'une dispersion triangulaire.

$$S_{ref} = \frac{a}{\sqrt{6}}$$

6.5.4.2.2. Définition des limites de validité d'un mesurage du matériau de référence

A l'incertitude type S_{ref} de la valeur du matériau de référence externe, s'ajoute l'incertitude type de la méthode du laboratoire à contrôler, $S_{méthode}$. Ces deux sources de variabilité doivent être prises en compte pour la détermination des limites.

$S_{méthode}$ est calculée à partir de l'incertitude élargie de la méthode du laboratoire de la façon suivante :

$$S_{méthode} = \frac{incertitude}{2}$$

La limite de validité du résultat (avec un niveau de confiance à 95%) =

valeur de référence $+/-2.\sqrt{S_{ref}^{\ 2} + S_{méthode}^{\ 2}}$

Exemple : Une solution tampon pH 7 est utilisée pour le contrôle d'un pH-mètre. L'intervalle de confiance donné par la solution pH est +/- 0.01, il est indiqué que cet intervalle de confiance correspond à l'incertitude élargie avec un niveau de confiance de 95%. Par ailleurs l'incertitude élargie du pH-mètre est de 0.024.

Les limites seront $+/-2\sqrt{(\frac{0.01}{2})^{2} + (\frac{0.024}{2})^{2}}$

soit **+/- 0.026** par rapport à la valeur de référence, et ce avec un niveau de confiance de 95%.

7. Estimation de l'Incertitude de mesure

7.1. Définition

Paramètre, associé au résultat d'un mesurage, qui caractérise la dispersion des valeurs qui pourraient raisonnablement être attribuées au mesurande.

En pratique, l'incertitude est exprimée sous la forme d'un écart type appelé incertitude type ***u(x)***, ou sous une forme élargie (avec k=2 généralement)
U =+/- k.u

7.2. Documents de référence

- Norme AFNOR ENV 13005 : 1999 – Guide pour l'expression de l'incertitude de mesure
- EURACHEM, 2000, Quantifying Uncertainty in Analytical Measurment, , *EURACHEM second edition 2000*
- Norme ISO 5725 :1994 – Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure
- Norme ISO 21748 :2004 – Lignes directrices relatives à l'utilisation d'estimation de la répétabilité, de la reproductibilité et de la justesse dans l'évaluation de l'incertitude de mesure

- Perruchet C. et Priel M., Estimer l'incertitude, *Editions AFNOR, 2000*

7.3. Domaine d'application

L'incertitude apporte deux types d'information.

- D'une part, celle destinée aux clients du laboratoire en indiquant les écarts potentiels à prendre en compte pour interpréter un résultat d'analyse. Il convient de préciser cependant que cette information ne peut être utilisée comme un moyen d'évaluation externe du laboratoire.

- D'autre part, elle constitue un outil interne dynamique d'évaluation de la qualité des résultats d'analyse du laboratoire. Dans la mesure où son évaluation est régulière et effectuée à partir d'une méthodologie fixe et bien définie, elle permet de savoir si les écarts présentés par une méthode évoluent favorablement ou défavorablement (dans le cas de l'estimation à partir de données intralaboratoire exclusivement).

Le présent guide se restreint ici à apporter une méthodologie pratique dans le cadre de laboratoires d'œnologie traitant des analyses en série. Ces laboratoires disposent de données en nombre leur conférant une dimension statistique significative.

L'estimation des incertitudes peut ainsi se réaliser dans la majorité des cas à partir des données acquises dans le cadre des travaux de validation et de contrôle qualité (notamment avec les données des cartes de Shewhart). Ces données pourront être complétées par des plans d'expérience, notamment pour déterminer les erreurs systématiques.

Les référentiels décrivent deux grandes approches de la détermination de l'incertitude : l'approche intralaboratoire et l'approche interlaboratoire. Chacune fournit des résultats naturellement et significativement différents. Leur signification et leur interprétation ne peuvent pas être identiques.

- **l'approche intralaboratoire** fournit un résultat propre à la méthode considérée, dans le laboratoire considéré. L'incertitude qui en résulte est un indicateur de la performance du laboratoire pour la méthode considérée. Elle répond à la question suivante du client : « quelle dispersion de résultat puis-je attendre de la part du laboratoire pratiquant la méthode».

– **l'approche interlaboratoire** utilise des résultats issus d'essais interlaboratoire, qui apportent une information de performance globale relative à la méthode.

Les laboratoires pourront utiliser les deux approches conjointement. Il sera alors intéressant de vérifier que les résultats obtenus en approche intralaboratoire donnent des valeurs inférieures aux valeurs de l'approche interlaboratoire.

7.4. Méthodologie

Le travail d'estimation de l'incertitude se déroule en 3 étapes fondamentales.
- Définition du mesurande, et description de la méthode d'analyse quantitative
- Analyse critique du processus de mesure
- Estimation de l'incertitude.

7.4.1. Définition du mesurande, et description de la méthode d'analyse quantitative

Il convient dans un premier temps de :

- Préciser clairement l'objet de la mesure
- Définir la grandeur mesurée
- Dans le cas où le mesurande serait obtenu par calcul à partir de grandeurs mesurées, on exprimera si possible la relation mathématique les reliant.
- Indiquer toutes les conditions opératoires.

Ces éléments figurent en principe dans les procédures du système qualité du laboratoire.

L'expression de la relation mathématique entre le mesurande et les grandeurs peut être dans certains cas (méthodes physiques…) très complexe, et il n'est pas forcément pertinent ni possible de les détailler intégralement.

7.4.2. Analyse critique du processus de mesure

Il convient de recenser les sources d'erreur influençant le résultat final pour constituer le budget d'incertitude. On pourra estimer l'importance de chaque source, de façon à éliminer celles qui n'ont qu'une influence mineure négligeable. Cela se fait par estimation :

- du degré de gravité de la dérive engendrée par une mauvaise maîtrise du facteur en question

- de la fréquence des problèmes potentiels
- de leur détectabilité.

Cette analyse critique pourra par exemple se faire selon la méthode des « 5M ».

Main d'œuvre ;
Effet opérateur

Matière :
Effet échantillon (stabilité, homogénéité, effets matrice), et consommables (réactifs, produits, solutions, matériaux de référence),…

Matériel :
Effet équipement (réponse, sensibilité, modes d'intégration, etc…), et matériel de laboratoire (balance, verrerie…),…

Méthode :
Effet application du mode opératoire (conditions opératoires, succession des opérations,…),…

Milieu :
Conditions ambiantes (température, pression, éclairage, vibration, rayonnement, humidité…),…

7.4.3. Calculs d'estimation de l'incertitude type (démarche intralaboratoire)

7.4.3.1. Principe

Dans le cas de laboratoires travaillant des séries importantes d'échantillons avec un nombre de méthode limité, une approche statistique basée sur la reproductibilité intralaboratoire, complémentée avec le calcul de sources d'erreurs non prises en compte dans les conditions de reproductibilité intralaboratoire, apparaît être l'approche la plus adaptée.

Un résultat d'analyse s'écarte de la valeur vraie sous l'effet de deux sources d'erreur. Les erreurs systématiques et les erreurs aléatoires.

Résultat de l'analyse = Valeur vraie + Erreur systématique + Erreur aléatoire

L'incertitude va caractériser la dispersion du résultat de l'analyse. Ceci se traduit sous la forme d'un écart type.

Variabilité (résultat d'analyse) = incertitude

Variabilité (valeur vraie) = 0

Variabilité (Erreur systématique) = $\sqrt{\sum S^2_{erreurs_systématiques}}$

Variabilité (Erreur aléatoire) = $\boldsymbol{S_R}$ (Ecart type de reproductibilité intralaboratoire)

Les écarts type s'additionnant au carré, l'estimation de l'incertitude type ***u(x)*** prend la forme suivante :

$$u(x) = \sqrt{\sum u^2_{(erreurs_systématiques)} + S^2_R}$$

Les sources d'erreurs non intégrables dans les conditions de reproductibilité intralaboratoire, c'est à dire les erreurs systématiques, doivent être déterminées sous forme d'écart type pour être combinées entre elles et à l'écart type de reproductibilité.

Le laboratoire pourra agir de façon à ce que les conditions de reproductibilité appliquées permettent d'englober le maximum de sources d'erreurs. Ceci s'obtient notamment en constituant des matériaux d'essais stables sur une période suffisamment longue, pendant laquelle le laboratoire veille à faire varier tous les facteurs expérimentaux possibles. Ainsi $\boldsymbol{S_R}$ couvrira le plus grand nombre de sources possibles d'erreurs (aléatoires), et le travail d'estimation des erreurs systématiques, souvent plus complexe à réaliser, sera minimisé.

Il convient de noter ici que le guide EURACHEM/CITAC « Quantifier l'incertitude dans les mesures analytiques » rappelle que « En général, le Guide ISO exige que les corrections soient appliqués pour tous les effets systématiques identifiés et significatifs ». Dans une méthode « sous contrôle », les erreurs systématiques devraient donc constituer une part mineure de l'incertitude.

Ce tableau, non exhaustif, donne des exemples de sources d'erreur types et propose une approche d'estimation pour chacune d'entre elle, en utilisant, autant que possible l'intégration dans les conditions de reproductibilité.

Source d'erreur	*Type d'erreur*	*Commentaire*	*Méthode d'estimation*
Echantillonnage (constitution de l'échantillon)	Aléatoire	L'échantillonnage est un des « métiers » définis dans la norme ISO 17025. Les laboratoires déclarant ne pas faire l'échantillonnage, n'incluent pas cette source d'erreur dans l'estimation de l'incertitude.	Possibilité d'inclure à la reproductibilité intralaboratoire en incluent l'échantillonnage dans la manipulation.
Sous échantillonnage (prélèvement d'une quantité d'échantillon pour la réalisation de l'essai)	Aléatoire	Est significatif si l'échantillon n'est pas homogène. Cette source d'erreur reste mineure pour le vin.	Inclus dans les conditions de reproductibilité intralaboratoire dans la mesure ou le matériau d'essai utilisé est similaire aux matériaux d'essais de routine.
Stabilité de l'échantillon	Aléatoire	Fonction des conditions de conservation de l'échantillon. Sur les vins, les laboratoires pourront prêter une attention particulière aux déperditions de dioxyde de soufre et d'éthanol.	Les éventuelles évolutions de l'échantillon peuvent être intégrées aux conditions de reproductibilité. Cette source d'incertitude sera alors évaluée globalement.
Etalonnage de l'appareillage	Systématique / Aléatoire Cette erreur est systématique si l'étalonnage est établi pour une durée longue, et devient aléatoire si l'étalonnage est régulièrement effectué dans une échelle de temps intégrée dans les conditions de reproductibilité	Source d'erreur à prendre en compte dans les méthodes absolues.	Erreur de droite d'étalonnage § 7.4.2.4.1 Pris en compte dans les conditions de reproductibilité si étalonnage régulièrement révisé.
Effet de contamination ou de mémoire	Aléatoire	Cet effet sera minimisé par une bonne conception des instruments de mesures et des opérations de rinçage adaptées	Les conditions de reproductibilité prennent en compte cet effet, à conditions d'intercaler les matériaux de référence à divers positionnement dans les séries d'analyse.
Fidélité des automates	Aléatoire	Il s'agira notamment des dérives intrasérie possibles. Ces dernières seront notamment contrôlées par le positionnement de matériaux de contrôle dans le cadre du CQI	Les conditions de reproductibilité prennent en compte cet effet à condition d'intercaler les matériaux de référence à divers positionnement dans les séries d'analyse.
Pureté des réactifs	Aléatoire	La pureté des réactifs n'aura que très peu d'effet sur les méthodes relatives, dans la mesure où le calibrage et les analyses sont réalisées avec les mêmes lots de réactifs. Cet effet à prendre en compte dans les méthodes absolues.	A intégrer dans les conditions de reproductibilité en utilisant différents lots de réactifs.
Conditions de mesure	Aléatoire	Effets de la température, de l'humidité…	Typiquement pris en compte dans des conditions de reproductibilité
Effet matrice	Aléatoire d'un échantillon à l'autre, systématique sur un même échantillon	Ces effets sont à prendre en compte sur les méthodes dont le signal mesuré n'est pas parfaitement spécifique.	Si cet effet est considéré comme significatif, un plan d'expérience spécifique pourra être mis en œuvre pour estimer l'incertitude due à cet effet. § 7.4.2.4.3 Cet effet n'est pas intégré dans les conditions de reproductibilité.
Effet de calibrage	Systématique si calibrage constant Aléatoire si calibrage est régulièrement renouvelé		Pris en compte dans les conditions de reproductibilité si le calibrage est régulièrement renouvelé. Si le calibrage utilisé reste le même (à l'échelle des périodes considérées dans le cadre des conditions de reprodcutiblité), il convient de mettre en œuvre un plan d'expérience pour l'estimation de l'erreur de la droite de calibration § 7.4.2.4.1
Effet opérateur	Aléatoire		A prendre en compte dans les conditions de reproductibilité en prenant soin de faire intervenir tous les opérateurs habilités.
Biais	Systématique	Doit être minimisée par le travail de contrôle qualité du laboratoire.	Effet systématique pouvant être estimée à partir de références certifiées.

7.4.3.2. Calcul de l'écart type de reproductibilité intralaboratoire

L'écart type de reproductibilité S_R est calculée selon le protocole décrit dans le chapitre « Reproductibilité intralaboratoire » (cf. § 5.4.3.5).

Ce calcul pourra être réalisé à partir de plusieurs matériaux d'essai. Dans le cas notable où S_R est proportionnel à la grandeur du mesurande, il n'est pas souhaitable de combiner les données acquises sur plusieurs matériaux d'essai à grandeurs différentes, mais S_R sera alors exprimée en valeur relative (%).

7.4.3.3. Estimation de sources d'erreurs systématiques typiques non prises en compte dans les conditions de reproductibilité

7.4.3.3.1. Erreur de calibrage (ou d'étalonnage)

Dans les cas où le calibrage d'un instrument (ou étalonnage d'une méthode absolue) est n'est pas régulièrement refait, il ne peut pas être intégré dans la reproductibilité. Un plan d'expérience doit être mené pour son estimation par l'erreur résiduelle de la régression.

7.4.3.3.1.1. Mode opératoire

La démarche est similaire à celle réalisée dans l'étude de linéarité de la méthode.

Il convient de mettre en œuvre un nombre ***n*** de matériaux de référence. Ce nombre sera supérieur à 3, il n'est cependant pas nécessaire d'aller au-delà de 10. Les matériaux de référence seront mesurés ***p*** fois en condition de fidélité intralaboratoire, ***p*** sera supérieur à 3, un nombre de 5 étant généralement conseillé. Les valeurs acceptées de matériaux de référence devront être réparti de façon régulière sur l'échelle de valeurs étudiée. Le nombre de mesure doit être le même pour tous les matériaux de référence.

Les résultats sont consignés dans un tableau de la forme suivante :

Matériaux de référence	Valeur acceptée du matériau de référence	Valeurs mesurées				
		Réplique 1	…	Réplique j	…	Réplique p
1	x1	y11	…	y1j	…	y1p
…	…	…	…	…	…	…
i	xi	yi1	…	yij	…	yip
…	…	…	…	…	…	…
n	xn	yn1	…	ynj	…	ynp

7.4.3.3.1.2.Calculs et résultats

On calcule le modèle de régression linéaire.

$$y_{ij} = a + b.x_i + \varepsilon_{ij}$$

où

y_{ij}	est la jième réplique du iième matériau de référence.
x_i	est la valeur acceptée du iiéme matériau de référence.
b	est la pente de la droite de régression.
a	est l'ordonnée à l'origine de la droite de régression.

$a + b.x_i$ représente l'espérance de la valeur du mesurage du $i^{ième}$ matériau de référence.

ε_{ij} est l'écart entre y_{ij} et l'espérance de la valeur du mesurage du $i^{ième}$ matériau de référence.

Les paramètres de la droite de régression sont obtenus à partir des formules suivantes :

- moyenne des ***p*** mesurages du ***i*^ème^** matériau de référence

$$yi = \frac{1}{p}\sum_{j=1}^{p} y_{ij}$$

- moyenne de toutes les valeurs acceptées des *n* matériaux de référence

$$M_x = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} x_i$$

- moyenne de tous les mesurages

$$My = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} y_i$$

- estimation pente ***b***

$$b = \frac{\sum_{i=1}^{n}(x_i - M_x)(y_i - M_y)}{\sum_{i=1}^{n}(x_i - M_x)^2}$$

- estimation ordonnée à l'origine ***a***

$$a = M_y - b \times M_x$$

- valeur de régression associée au ***i**ème* matériau de référence $\hat{y}_i$

$$\hat{y}_i = a + b \times x_i$$

- résidu e_{ij}

$$e_{ij} = y_{ij} - \hat{y}_i$$

7.4.3.3.1.3. Estimation de l'incertitude type associée à la droite de calibrage (ou d'étalonnage)

Dans le cas où les erreurs dues à la droite de régression sont constantes sur l'ensemble du domaine, l'incertitude type est estimée de façon globale et unique par l'écart type résiduel global.

$$u_{(calibrage)} = S_{res} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}\sum_{j=1}^{p}(y_{ij} - \hat{y}_i)^2}{np - 2}}$$

Dans le cas où les erreurs dues à la droite de régression ne sont pas constantes sur l'ensemble du domaine, l'incertitude type est estimée pour un niveau donné par l'écart type résiduel de ce niveau.

$$u_{(calibrage),i} = S_{res,i} = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^{p}(y_{ij} - \hat{y}_i)^2}{p - 1}}$$

NOTE Ces estimations d'écarts types sont exploitables si le modèle de régression linéaire et le domaine de calibrage (ou étalonnage) sont validés (voir § 5.3.1)

7.4.3.3.2. Erreur de biais

Selon le guide EURACHEM, *« Quantifier l'incertitude dans les mesures analytiques »,* il est rappelé que le guide ISO exige en général que les corrections soient appliquées pour tous les effets systématiques significatifs identifiés. Il en va ainsi pour les biais de méthodes pour lesquels le laboratoire met en œuvre son système de contrôle qualité (voir §6), et qui tendent vers 0 pour des méthodes « sous contrôle ».

En pratique, deux cas peuvent être distingués :

7.4.3.3.2.1. Méthodes ajustées avec seul un matériau de référence certifié

Le biais est en permanence ajusté avec un même matériau de référence.

Le matériau de référence certifié (MRC) assure le raccordement métrologique de la méthode. Une valeur de référence a été attribuée au MRC accompagnée de son incertitude type u_{ref}. Cette incertitude type du MRC est combinée à l'incertitude composée de la méthode, u_{comp}, pour déterminer l'incertitude type globale de la méthode du laboratoire $u(x)$.

L'incertitude type globale de la méthode ajustée avec le MRC considéré est ainsi :

$$u(x) = \sqrt{u_{ref}^{\ 2} + u_{comp}^{\ 2}}$$

NOTE 1 La méthodologie est identique dans le cas de méthodes ajustées avec les résultats d'une chaîne de comparaison interlaboratoires.
NOTE 2 Il convient de bien noter la différence entre un MRC servant à ajuster le biais d'une méthode, et dont l'incertitude de la valeur de référence se combine à cette de la méthode, et un MRC servant à contrôler une méthode ajustée par ailleurs (cf. § 6.5.4.2). Dans ce second cas, l'incertitude du MRC ne doit pas être utilisée pour l'estimation de l'incertitude de la méthode.

7.4.3.3.2.2. Méthodes ajustées avec plusieurs matériaux référents (gammes de calibrages…)

Il n'y a pas d'ajustement particulier du biais en dehors du travail de calibrage.

Il est bien entendu que chaque calibrant apporte une incertitude de biais. Il existe donc une incertitude théorique globale de biais qui combine les incertitudes des calibrants. Cette incertitude est très délicate à estimer, mais elle se révèle

généralement suffisamment faible pour être négligée, notamment dans le cas où le laboratoire veille à la qualité de ses calibrants, et de l'incertitude de leurs valeurs de référence.

Sauf cas particulier, l'incertitude du biais sera ici négligée.

7.4.3.3.3. Effet matrice

7.4.3.3.3.1 .Définition

L'effet matrice produit une source d'erreur répétable pour un échantillon donné, mais aléatoire d'un échantillon à l'autre. Cette erreur est liée à l'interaction des composés présents dans le produit à analyser sur le mesurage de l'analyte recherché. L'effet matrice se manifeste dans les méthodes présentant un signal non spécifique.

L'effet matrice constitue une part souvent faible d'incertitude, notamment dans les méthodes séparatives. Mais dans certaines méthodes, dont les techniques infrarouges, il est une composante importante de l'incertitude.

> **Exemple :** Estimation de l'effet matrice sur IRTF
>
> Le signal de l'IRTF, le spectre infrarouge, n'est pas un signal spécifique à chacun des composés qui sont mesurés par cette technique. Le modèle statistique de calibrage permet de traiter l'information spectrale non spécifique, et bruitée, en une estimation suffisamment exacte de la valeur du mesurande. Ce modèle intègre des influences des autres composés du vin, qui variant d'un vin à l'autre et introduisent une erreur dans le résultat. En amont du travail d'analyse en routine, un travail particulier est apporté par les développeurs de calibrage pour minimiser cet effet matrice et rendre les calibrages robustes, c'est-à-dire capables d'intégrer ces variations sans les répercuter sur le résultat. Néanmoins l'effet matrice est toujours présent et constitue une source d'erreur à l'origine d'une partie importante de l'incertitude d'une méthode IRTF.
>
> En toute rigueur, cette erreur d'effet matrice peut être estimée en comparant, d'une part, les moyennes d'un grand nombre de répliques de mesurages IRTF, obtenus sur plusieurs matériaux de référence (au moins 10), dans des conditions de reproductibilité, et les valeurs vraies des matériaux de référence présentant une matrice de vin naturel d'autre part. L'écart type des différences donne alors cette variabilité de calibration (à condition que la calibration ait été préalablement ajustée (biais = 0)).
>
> Cette approche théorique n'est pas réalisable en pratique, car les valeurs vraies ne sont jamais connues, mais il est expérimentalement possible de s'en approcher suffisamment :

- Au préalable, la calibration IRTF doit être ajustée statistiquement (biais = 0) par rapport à une méthode de référence à partir d'au moins 30 échantillons. Ceci permet d'éliminer les effets de biais dans les mesures qui suivent.

- Les matériaux de référence doivent être des vins naturels. Il convient d'utiliser au moins 10 matériaux de référence différents, dont les valeurs sont situées à l'intérieur d'un niveau de gamme où l'incertitude peut être considérée comme constante.

- Une valeur de référence acceptable est acquise à partir de la moyenne de plusieurs mesurages par la méthode de référence, effectués dans des conditions de reproductibilité. Ceci permet en effet de baisser l'incertitude de la valeur de référence : si pour la méthode de référence utilisée, toutes les sources d'incertitude importantes sont comprises dans les conditions de reproductibilité, la multiplication du nombre p de mesurages réalisés dans les conditions de reproductibilité, permet à l'incertitude associée à leur moyenne d'être divisé par $\sqrt{p}$. La moyenne obtenue à partir d'un nombre suffisant de mesurages aura alors une incertitude faible, voire négligeable par rapport à l'incertitude de la méthode alternative ; et pourra donc être utilisée comme valeur de référence. p doit être au moins égal à 5.

- Les matériaux de référence sont analysés par la méthode IRTF, avec plusieurs répliques, acquises dans des conditions de reproductibilité. Le fait de multiplier le nombre de mesurages q en conditions de reproductibilité sur la méthode IRTF permet de diminuer la variabilité liée à la fidélité de la méthode (erreur aléatoire). La valeur moyenne de ces mesurage aura un écart type de variabilité divisée par $\sqrt{q}$. Cette erreur aléatoire peut devenir alors négligeable par rapport à la variabilité liée à la calibration (effet matrice) que nous cherchons à estimer ici. q doit être au moins égal à 5.

L'exemple suivant est appliqué au dosage de l'acide acétique par une calibration IRTF. Les valeurs de référence sont données par 5 mesurages en conditions de reproductibilité sur 7 matériaux d'essai stables. Le nombre de 7 matériaux est en principe insuffisant, mais les données n'ont ici que valeur d'exemple.

	Méthode de référence						IRTF						
Matériaux	1	2	3	4	5	Moy Ref	1	2	3	4	5	Moy IRTF	Diff
1	0.30	0.32	0.31	0.30	0.31	0.308	0.30	0.31	0.31	0.30	0.30	0.305	-0.004
2	0.31	0.32	0.32	0.32	0.31	0.316	0.31	0.32	0.30	0.31	0.31	0.315	-0.006
3	0.38	0.39	0.39	0.38	0.38	0.384	0.37	0.37	0.37	0.37	0.36	0.37	-0.016
4	0.25	0.25	0.25	0.24	0.25	0.248	0.26	0.26	0.26	0.25	0.26	0.26	0.01
5	0.39	0.39	0.40	0.40	0.39	0.394	0.43	0.42	0.43	0.42	0.42	0.425	0.03
6	0.27	0.26	0.26	0.26	0.26	0.262	0.25	0.26	0.25	0.25	0.26	0.255	-0.008

7		0.37	0.37	0.37	0.37	0.36	0.368	0.37	0.36	0.36	0.35	0.36	0.365	-0.008

Calul des différences : diff = Moy IRTF – Moy Ref.

Il est vérifié que la moyenne des différences Md = 0.000 (bon ajustement de l'IRTF par rapport à la méthode de référence)

L'écart-type des différences, Sd = 0.015. C'est cet écart-type qui permet d'estimer la variabilité générée par la calibration, et on peut donc dire que :

$$Uf = 0.015$$

NOTE Il convient de noter que la valeur de Uf peut être surestimée par cette approche. Si le laboratoire considère que la valeur est significativement excessive dans les conditions opératoires définies ici, il pourra augmenter le nombre de mesurages sur la méthode de référence et/ou sur la méthode IRTF.

Les conditions de reproductibilité englobent toutes les autres sources significatives d'erreur, SR a été calculé par ailleurs : SR = 0.017

L'incertitude du dosage de l'acide acétique par cette application IRTF est :

$$+/-2*\sqrt{0.015^2+0.017^2}$$ soit +/- 0.045 g.L-1

7.4.3.3.4. Effet échantillons

Dans certains cas, les plans d'expériences pour l'estimation de l'incertitude sont réalisés à partir de matériaux d'essai synthétiques. Dans une telle situation, l'estimation ne couvrira pas l'effet l'échantillon (homogénéité). Les laboratoires devront alors estimer cet effet.

Il convient de noter cependant que cet effet est souvent négligeable dans les laboratoires d'œnologie, qui utilisent des échantillons homogènes de petite taille.

7.4.4. Estimation de l'incertitude type par essais interlaboratoires

7.4.4.1. Principe

L'approche interlaboratoire fait intervenir les données issues d'essais interlaboratoire à partir desquelles est calculée un écart type de reproductibilité interlaboratoire, selon les principes donnés au §5.4.3. Les statisticiens en charge du

calcul des résultats des essais interlaboratoire peuvent identifier des résultats ou des laboratoires « aberrants », en utilisant des tests décrits dans la norme ISO 5725 (test de Cochran). La mise à l'écart de ces résultats pourra alors être réalisé après accord entre les statisticiens et les analystes.

Pour l'estimation de l'incertitude par approche interlaboratoire les principes de base énoncés dans la norme ISO 21748 sont les suivants :

1. L'écart type de reproductibilité (interlaboratoire) obtenu dans une étude collaborative est une base valide pour l'évaluation de l'incertitude de mesure

2. Les effets qui ne sont pas observés dans le cadre de l'étude collaborative doivent être manifestement négligeables ou pris en compte explicitement.

Les essais interlaboratoire sont de deux types :

1. Les études collaboratives qui sont relatives à une seule méthode. Ces études sont réalisées pour la validation initiale d'une nouvelle méthode afin d'en définir l'écart type de reproductibilité interlaboratoire $SR_{inter}(méthode)$.

2. Les chaînes de comparaison interlaboratoire, ou essais d'aptitude. Ces essais sont réalisés pour la validation d'une méthode adoptée par le laboratoire, et le contrôle qualité en routine (voir § 5.3.3.3). Les données sont traités globalement et intègrent toutes les méthodes d'analyses employées par les laboratoires participants. Les résultats sont la moyenne interlaboratoire m, et l'écart type de reproductibilité interlaboratoire et interméthode SR_{inter}.

7.4.4.2. Utilisation de l'écart type de reproductibilité interlaboratoire et intraméthode $SR_{inter}(méthode)$

L'écart type de reproductibilité intralaboratoire $SR_{inter}(méthode)$ prend en compte les variabilités intralaboratoires et la variabilité interlaboratoire totale liées à la méthode.

Il convient de prendre ensuite en compte le fait que la méthode d'analyse puisse produire une biais systématique par rapport à la valeur vraie.

Dans le cadre d'une étude collaborative, et lorsque cela est possible, l'erreur produite par ce biais pourra être estimé en utilisant des matériaux de référence certifiés, dans les mêmes conditions que décrites dans le § 7.4.3.3.2, et ajoutées à SR_{inter}***(méthode)***

7.4.4.3. Utilisation de l'écart type de reproductibilité interlaboratoire et interméthode SR_{inter}

L'écart type de reproductibilité intralaboratoire SR_{inter} prend en compte les variabilités intralaboratoires et la variabilité interlaboratoire pour le paramètre étudié.

Le laboratoire doit vérifier sa justesse par rapport à ces résultats (voir § 5.3.3).

Il n'y a pas lieu d'ajouter de composante associée à la justesse de la méthode au budget d'incertitude, car dans les essais d'aptitude « multi-méthodes » on peut considérer que les erreurs de justesse sont prises en compte dans SR_{inter}

7.4.4.4. Autres composantes au budget d'incertitude

Dans la mesure où les matériaux d'essais utilisés pour les essais interlaboratoires sont représentatifs des échantillons classiques analysés par les laboratoires, et qu'ils suivent l'ensemble de la procédure analytique (sous-échantillonnage, extraction, concentration, dilution, distillation…), $S_{R\text{-}inter}$ représente l'incertitude type ***u(x)*** de la méthode, au sens interlaboratoire.

Les erreurs non prises en compte dans les essais interlaboratoire devront alors être étudiées pour en estimer leur incertitude type composée qui sera combinée à l'incertitude type composée des essais interlaboratoire.

7.5. Expression de l'incertitude élargie

L'incertitude s'exprime en pratique sous sa forme élargie qui est donnée de façon absolue pour les méthodes dans lesquelles l'incertitude est stable dans le domaine de travail, ou de façon relative quand l'incertitude varie proportionnellement à la grandeur du mesurande :

Incertitude absolue : $U = +/- 2.u(x)$

Incertitude relative (en %) : $U = +/- \frac{2.u(x)}{\bar{x}}.100$ avec $\bar{x}$ moyenne des résultats de reproductibilité.

NOTE Cette expression de l'incertitude est possible dans la mesure où il est fait l'hypothèse que les écarts suivent une loi normale avec 95% de confiance.

Ces expressions induisent une valeur d'incertitude donnée avec un niveau de confiance de **95%**

REFERENCES

(1) OIV Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts ; *OIV Ed., Paris.*

(2) OIV, 2002 – Recommandations harmonisées pour le contrôle interne de qualité dans les laboratoires d'analyse ; *OIV résolution œno 19/2002., Paris.*

(3) Norme ISO 5725 : 1994 – Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure, *indice de classement X 06-041-1*

(4) IUPAC, 2002 – Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis ;*Pure Appl. Chem., Vol. 74; N°5, pp. 835-855.*

(5) Norme ISO 11095 : 1996 – Etalonnage linéaire utilisant des matériaux de référence, *Numéro de référence ISO 11095 :1996*

(6) Norme ISO 21748 : 2004 – Lignes directrices relatives à l'utilisation d'estimation de la répétabilité, de la reproductibilité et de la justesse dans l'évaluation de l'incertitude de mesure, *Numéro de référence ISO ISO/TS 21748 :2004*

(7) Norme AFNOR V03-110 : 1998 – Procédure de validation intralaboratoire d'une méthode alternative par rapport à une méthode de référence, *indice de classement V03-110*

(8) Norme AFNOR V03-115 : 1996 – Guide pour l'utilisation des matériaux de référence, *indice de classement V03-115*

(9) Norme AFNOR X 07-001 : 1994 – Vocabulaire international des termes fondamentaux et généraux de métrologie, *indice de classement X07-001*

(10) Norme AFNOR ENV 13005 : 1999 – Guide pour l'expression de l'incertitude de mesure

(11) AFNOR, 2003, - Métrologie dans l'entreprise, outil de la qualité 2ème édition, *Edition AFNOR 2003*

(12) EURACHEM, 2000, - Quantifying Uncertainty in Analytical Measurment, , *EURACHEM second edition 2000*

(13) CITAC / EURACHEM, 2000 - Guide pour la qualité en chimie analytique, , *EURACHEM édition 2002*

(14) Bouvier J.C., 2002 - Calcul de l'incertitude de mesure – Guide pratique pour les laboratoires d'analyse œnologique, *Revue Française d'œnologie n°197, nov-dec 2002, pp : 16-21*

(15) Snakkers G. et Cantagrel R., 2004 - Utilisation des données des circuits de comparaison interlaboratoires pour apprécier l'exactitude des résultats d'un laboratoire Estimation d'une incertitude de mesure - *Bull OIV, Vol. 77 857-876, Jan – Fév 2004, pp : 48-83*

(16) Perruchet C. et Priel M, 2000 - Estimer l'incertitude, *Editions AFNOR*

(17) Neuilly (M.) et CETAMA, 1993 - Modélisation et estimation des erreurs de mesures, *Lavoisier Ed, Paris*

Annexe N°1

Table A - Loi de SNEDECOR

La table donne les valeurs de F en fonction de ν1 et ν2 pour un risque α de 0,05

P=0,950

ν1 ν2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	ν1 ν2
1	161,4	199,5	215,7	224,6	230,2	234,0	236,8	238,9	240,5	241,9	1
2	18,51	19,00	19,16	19,25	19,30	19,33	19,35	19,37	19,38	19,40	2
3	10,13	9,55	9,28	9,12	9,01	8,94	8,89	8,85	8,81	8,79	3
4	7,71	6,94	6,59	6,39	6,26	6,16	6,09	6,04	6,00	5,96	4
5	6,61	5,79	5,41	5,19	5,05	4,95	4,88	4,82	4,77	4,74	5
6	5,99	5,14	4,76	4,53	4,39	4,28	4,21	4,15	4,10	4,06	6
7	5,59	4,74	4,35	4,12	3,97	3,87	3,79	3,73	3,68	3,64	7
8	5,32	4,46	4,07	3,84	3,69	3,58	3,50	3,44	3,39	3,35	8
9	5,12	4,26	3,86	3,63	3,48	3,37	3,29	3,23	3,18	3,14	9
10	4,96	4,10	3,71	3,48	3,33	3,22	3,14	3,07	3,02	2,98	10
11	4,84	3,98	3,59	3,36	3,20	3,09	3,01	2,95	2,90	2,85	11
12	4,75	3,89	3,49	3,26	3,11	3,00	2,91	2,85	2,80	2,75	12
13	4,67	3,81	3,41	3,18	3,03	2,92	2,83	2,77	2,71	2,67	13
14	4,60	3,74	3,34	3,11	2,96	2,85	2,76	2,70	2,65	2,60	14
15	4,54	3,68	3,29	3,06	2,90	2,79	2,71	2,64	2,59	2,54	15
16	4,49	3,63	3,24	3,01	2,85	2,74	2,66	2,59	2,54	2,49	16
17	4,45	3,59	3,20	2,96	2,81	2,70	2,61	2,55	2,49	2,45	17
18	4,41	3,55	3,16	2,93	2,77	2,66	2,58	2,51	2,46	2,41	18
19	4,38	3,52	3,13	2,90	2,74	2,63	2,54	2,48	2,42	2,38	19
20	4,35	3,49	3,10	2,87	2,71	2,60	2,51	2,45	2,39	2,35	20
21	4,32	3,47	3,07	2,84	2,68	2,57	2,49	2,42	2,37	2,32	21
22	4,30	3,44	3,05	2,82	2,66	2,55	2,46	2,40	2,34	2,30	22
23	4,28	3,42	3,03	2,80	2,64	2,53	2,44	2,37	2,32	2,27	23
24	4,26	3,40	3,01	2,78	2,62	2,51	2,42	2,36	2,30	2,25	24
25	4,24	3,39	2,99	2,76	2,60	2,49	2,40	2,34	2,28	2,24	25
26	4,23	3,37	2,98	2,74	2,59	2,47	2,39	2,32	2,27	2,22	26
27	4,21	3,35	2,96	2,73	2,57	2,46	2,37	2,31	2,25	2,20	27
28	4,20	3,34	2,95	2,71	2,56	2,45	2,36	2,29	2,24	2,19	28
29	4,18	3,33	2,93	2,70	2,55	2,43	2,35	2,28	2,22	2,18	29
30	4,17	3,32	2,92	2,69	2,53	2,42	2,33	2,27	2,21	2,16	30
40	4,08	3,23	2,84	2,61	2,45	2,34	2,25	2,18	2,12	2,08	40
60	4,00	3,15	2,76	2,53	2,37	2,25	2,17	2,10	2,04	1,99	60
120	3,92	3,07	2,68	2,45	2,29	2,17	2,09	2,02	1,96	1,91	120
∞	3,84	3,00	2,60	2,37	2,21	2,10	2,01	1,94	1,88	1,83	∞
ν2 ν1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	ν2 ν1

Annexe N°2

Table B - Loi de STUDENT

La table donne les valeurs de t en fonction de P et de ν

P / ν	0,55	0,60	0,65	0,70	0,75	0,80	0,85	0,90	0,95	0,975	0,990	0,995	0,9995	P / ν
1	0,158	0,325	0,510	0,727	1,000	1,376	1,963	3,078	6,314	12,706	31,821	63,657	636,619	1
2	0,142	0,289	0,445	0,617	0,816	1,061	1,386	1,886	2,920	4,303	6,965	9,925	31,598	2
3	0,137	0,277	0,424	0,584	0,765	0,978	1,250	1,638	2,353	3,182	4,541	5,841	12,929	3
4	0,134	0,271	0,414	0,569	0,741	0,941	1,190	1,533	2,132	2,776	3,747	4,604	8,610	4
5	0,132	0,267	0,408	0,559	0,727	0,920	1,156	1,476	2,015	2,571	3,365	4,032	6,869	5
6	0,131	0,265	0,404	0,553	0,718	0,906	1,134	1,440	1,943	2,447	3,143	3,707	5,959	6
7	0,130	0,263	0,402	0,549	0,711	0,896	1,119	1,415	1,895	2,365	2,998	3,499	5,408	7
8	0,130	0,262	0,399	0,546	0,706	0,889	1,108	1,397	1,860	2,306	2,896	3,355	5,041	8
9	0,129	0,261	0,398	0,543	0,703	0,883	1,100	1,383	1,833	2,262	2,821	3,250	4,781	9
10	0,129	0,260	0,397	0,542	0,700	0,879	1,093	1,372	1,812	2,228	2,764	3,169	4,587	10
11	0,129	0,260	0,396	0,540	0,697	0,876	1,088	1,363	1,796	2,201	2,718	3,106	4,437	11
12	0,128	0,259	0,395	0,539	0,695	0,873	1,083	1,356	1,782	2,179	2,681	3,055	4,318	12
13	0,128	0,259	0,394	0,538	0,694	0,870	1,079	1,350	1,771	2,160	2,650	3,012	4,221	13
14	0,128	0,258	0,393	0,537	0,692	0,868	1,076	1,345	1,761	2,145	2,624	2,977	4,140	14
15	0,128	0,258	0,393	0,536	0,691	0,866	1,074	1,341	1,753	2,131	2,602	2,947	4,073	15
16	0,128	0,258	0,392	0,535	0,690	0,865	1,071	1,337	1,746	2,120	2,583	2,921	4,015	16
17	0,128	0,257	0,392	0,534	0,689	0,863	1,069	1,333	1,740	2,110	2,567	2,898	3,965	17
18	0,127	0,257	0,392	0,534	0,688	0,862	1,067	1,330	1,734	2,101	2,552	2,878	3,922	18
19	0,127	0,257	0,391	0,533	0,688	0,861	1,066	1,328	1,729	2,093	2,539	2,861	3,883	19
20	0,127	0,257	0,391	0,533	0,687	0,860	1,064	1,325	1,725	2,086	2,528	2,845	3,850	20
21	0,127	0,257	0,391	0,532	0,686	0,859	1,063	1,323	1,721	2,080	2,518	2,831	3,819	21
22	0,127	0,256	0,390	0,532	0,686	0,858	1,061	1,321	1,717	2,074	2,508	2,819	3,792	22
23	0,127	0,256	0,390	0,532	0,685	0,858	1,060	1,319	1,714	2,069	2,500	2,807	3,767	23
24	0,127	0,256	0,390	0,531	0,685	0,857	1,059	1,318	1,711	2,064	2,492	2,797	3,745	24
25	0,127	0,256	0,390	0,531	0,684	0,856	1,058	1,316	1,708	2,060	2,485	2,787	3,725	25
26	0,127	0,256	0,390	0,531	0,884	0,856	1,058	1,315	1,706	2,056	2,479	2,779	3,707	26
27	0,127	0,256	0,389	0,531	0,684	0,855	1,057	1,314	1,703	2,052	2,473	2,771	3,690	27
28	0,127	0,256	0,389	0,530	0,683	0,855	1,056	1,313	1,701	2,048	2,467	2,763	3,674	28
29	0,127	0,256	0,389	0,530	0,683	0,854	1,055	1,311	1,699	2,045	2,462	2,756	3,659	29
30	0,127	0,256	0,389	0,530	0,683	0,854	1,055	1,310	1,697	2,042	2,457	2,750	3,646	30
40	0,126	0,255	0,388	0,529	0,681	0,851	1,050	1,303	1,684	2,021	2,423	2,704	3,551	40
60	0,126	0,254	0,387	0,527	0,679	0,848	1,046	1,296	1,671	2,000	2,390	2,660	3,460	60
120	0,126	0,254	0,386	0,526	0,677	0,845	1,041	1,289	1,658	1,980	2,358	2,617	3,373	120
∞	0,126	0,253	0,385	0,524	0,674	0,842	1,036	1,282	1,645	1,960	2,326	2,576	3,291	∞
ν / P	0,55	0,60	0,65	0,70	0,75	0,80	0,85	0,90	0,95	0,975	0,990	0,995	0,9995	ν / P

Recommandations harmonisées pour la validation des methodes d'analyse par un seul laboratoire (rapport technique)

(Résolution OENO 8/2005)

Synthèse

La validation de méthode figure parmi les mesures universellement reconnues comme faisant nécessairement partie d'un système exhaustif d'assurance qualité dans le domaine de la chimie analytique. L' ISO, l'UICPA (Union internationale de chimie pure et appliquée) et AOAC INTERNATIONAL ont coopéré afin de produire des protocoles accordés ou des recommandations sur la Conduite et interprétation des études de performance de méthodes"[1] , sur la Vérification de l'Aptitude des Laboratoires de chimie analytique[2] , sur le Contrôle interne de Qualité dans les Laboratoires de Chimie Analytique"[3] et sur l'Utilisation des données de recouvrement dans les Mesures Analytiques)".[4] Le Groupe de Travail ayant formulé ces protocoles/recommandations a été mandaté par l' UICPA pour préparer des recommandations sur la validation des méthodes d'analyse par un seul laboratoire. Ces recommandations précisent les bases des procédures qui devraient être utilisées pour assurer une validation adéquate des méthodes d'analyse.

Un projet de recommandations a été discuté au cours d'un Symposium international sur l'harmonisation des systèmes d'assurance qualité dans les laboratoires d'analyse chimique dont les actes ont été publiés par la Royal Society of Chemistry du Royaume-Uni.

TABLE DES MATIERES

1 INTRODUCTION
1.1 Contexte
1.2 Protocoles, normes et guides existants

2 DEFINITIONS ET TERMINOLOGIE
2.1 Définitions générales
2.2 Définitions utilisées uniquement dans ce document

3 Validation des méthodes, incertitude et assurance qualité

4 PRINCIPES DE BASE DE LA VALIDATION DES METHODES
4.1 Spécification et portée de la validation
4.2 Hypothèses des essais
4.3 Sources d'erreur en Analyse
4.4 Effets liés à la méthode et au laboratoire

5 Conduite des Etudes de Validation

6 Portée des études de validation
6.1 Le laboratoire est tenu d'utiliser une méthode "entièrement" validée
6.2 Le laboratoire doit utiliser une méthode entièrement validée mais avec une nouvelle matrice
6.3 Le laboratoire doit utiliser une méthode bien établie mais qui n'a pas fait l'objet d'une étude collaborative
6.4 La méthode a fait l'objet d'une publication dans la littérature scientifique celle-ci fournissant quelques caractéristiques analytiques
6.5 La méthode a fait l'objet d'une publication dans la littérature scientifique, mais sans précision sur les caractéristiques, ou bien la méthode a été développée en interne
6.6 La méthode est empirique
6.7 L'analyse est "ad hoc"
6.8 Changements concernant le personnel et l'équipement

7 RECOMMANDATIONS

8 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXE A: NOTES SUR LES CONDITIONS REQUISES POUR L'ETUDE DES CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE DE LA METHODE.

A1 Domaine d'application

A2 Spécificité

A3 Etalonnage et linéarité
A3.1 Linéarité et ordonnée à l'origine
A3.2 Etude de l'effet matrice
A3.3 Procédure finale d'étalonnage

A4 Justesse
A4.1 Evaluation de la justesse
A4.2 Conditions à appliquer pour les expériences de justesse
A4.3 Valeurs de référence à utiliser pour les expériences de justesse
A4.3.1 Matériaux de référence certifiés (MRC)
A4.3.2 Matériaux de référence
A4.3.3 Utilisation d'une méthode de référence
A4.3.4 Utilisation des ajouts dosés / recouvrement

A5 Fidélité

A6 Recouvrement

A7 Domaine de validité

A8 Limite de détection

A9 Limite de détermination ou limite de quantification

A10 Sensibilité

A11 Robustesse

A12 Aptitude l'essai

A13 Variation de matrice

A14. Incertitude de mesure

ANNEXE B. CONSIDERATIONS SUPPLEMENTAIRES POUR L'ESTIMATION DE L'INCERTITUDE DANS LES ETUDES DE VALIDATION

B1 Analyse de la sensibilité

B2 Jugement

1. INTRODUCTION

1.1 Contexte

Des méthodes d'analyse fiables sont requises pour assurer la conformité avec les réglementations nationales et internationales dans tous les domaines d'analyse. Par conséquent, il est reconnu partout dans le monde qu'un laboratoire doit prendre les dispositions appropriées pour s'assurer qu'il est en mesure de fournir (et de fournir effectivement) des données du niveau de qualité requis. De telles dispositions comprennent:

- L'utilisation de méthodes d'analyse validées;
- L'utilisation de procédures de contrôle interne de qualité;
- La participation à des programmes d'essai d'aptitude technique; et
- L'obtention d'une accréditation selon une Norme Internationale, généralement ISO/CEI 17025.

Notons que l'accréditation ISO/CEI 17025 porte plus particulièrement sur la mise en place de la traçabilité des mesurages, tout en requérant un ensemble d'exigences techniques et de gestion, qui comprennent notamment celles figurant dans la liste ci-dessus.

La validation de méthode est ainsi une composante essentielle des mesures qu'un laboratoire devrait mettre en œuvre pour lui permettre de produire des données analytiques fiables. D'autres aspects du sujet ont été abordés par le Groupe de Travail Interdivisionnel de l' UICPA sur l'Harmonisation des Programmes d'Assurance Qualité pour les Laboratoires d'Analyse, tout particulièrement en élaborant des Protocoles/ Recommandations sur les études de performance des méthodes interlaboratoires,[1] sur les essais d'aptitude technique [2], et sur le contrôle qualité interne. [3]

Dans certains domaines, notamment en matière d'analyse alimentaire, la législation en vigueur exige l'utilisation de méthodes ayant été " complètement validées". [5,6] Il est généralement attendu que la validation " complète" d'une méthode d'analyse comprenne l'examen des caractéristiques de la méthode dans le cadre d'une étude interlaboratoire des performances de celle-ci (également appelée étude collaborative ou essai interlaboratoire). Des protocoles acceptés partout dans le monde ont été établis pour la validation "complète" d'une méthode d'analyse par un essai interlaboratoires, notamment par le Protocole Harmonisé international[1] et par la procédure de l' ISO.[7] Ces protocoles / normes exigent la participation d'un

nombre minimum de laboratoires et de matériaux d'essais soumis à l'étude interlaboratoires pour valider complètement la méthode d'analyse. Toutefois, il n'est pas toujours évident dans la pratique ou nécessaire de parvenir à la validation complète d'une méthode d'analyse. Dans ce cas, une "validation interne de méthode" (effectuée par un seul laboratoire) peut être appropriée.

La validation de méthode par un seul laboratoire est adéquate dans plusieurs situations, notamment dans les circonstances suivantes :

- pour s'assurer de la viabilité de la méthode avant de s'engager dans l'exercice onéreux de l'essai interlaboratoires formel;
- pour fournir la preuve de la fiabilité d'une méthode d'analyse lorsque des données d'essai interlaboratoires ne sont pas disponibles ou lorsque l'organisation d'un essai interlaboratoires formel n'est pas possible ;
- pour s'assurer que des méthodes validées "prêtes à l'emploi" sont utilisées correctement.

Lorsqu'il s'agit de déterminer en interne les caractéristiques d'une méthode, il est important que le laboratoire définisse précisément, en accord avec son client, les caractéristiques à évaluer. Cependant, dans certaines circonstances, ces caractéristiques peuvent être imposées par la législation en vigueur (par exemple pour les résidus de médicaments vétérinaires dans l'alimentation ou encore pour les pesticides dans le secteur alimentaire). La portée de l'évaluation entreprise par un laboratoire doit répondre aux exigences définies par la législation.

Cependant, dans certains domaines d'analyse, la même méthode analytique est utilisée par un grand nombre de laboratoires pour déterminer les composants chimiques stables dans des matrices bien définies. Il faut souligner que lorsque l'on peut mettre à la disposition de tous ces laboratoires une méthode appropriée étudiée collectivement, le poids financier de l'essai interlaboratoires venant valider cette méthode peut tout à fait se justifier. L'utilisation d'une méthode étudiée en interlaboratoire diminue de façon importante les efforts qu'un laboratoire doit engager dans un travail de validation approfondi avant d'utiliser une méthode en routine. Un laboratoire qui utilise une méthode étudiée en interlaboratoire, et qui a été reconnue comme étant adaptée à l'utilisation prévue, n'a plus qu'à prouver qu'il peut obtenir les niveaux de performance spécifiées pour la méthode. Une telle vérification du bon usage de la méthode coûte bien moins cher qu'une validation interne complète. Il revient généralement moins cher à la Communauté Analytique de valider une méthode grâce à un essai interlaboratoires dans un premier temps, puis dans une deuxième temps de vérifier les niveaux de performance dans les différents laboratoires souhaitant utiliser cette méthode, que d'assurer indépendamment dans de nombreux laboratoires une validation interne de cette

même méthode.

1.2 Protocoles, Normes et Guides existants

Un certain nombre de protocoles et de recommandations[8-19] sur la validation de méthode et sur l'incertitude ont été élaborés, notamment dans AOAC INTERNATIONAL, dans la Conférence Internationale sur l' Harmonisation (CIH) et dans les documents Eurachem :

- Le Manuel de Statistiques de l' AOAC, qui comprend des recommandations sur les études internes (un seul laboratoire) précédant des études collaboratives[13]
- Le texte de la CIH[15] et sa méthodologie,[16] qui établissent des exigences minimales pour les études de validation quand il s'agit de test utilisés pour motiver une demande d'autorisation de mise sur le marché.
- The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics (1998)[12]
- Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement (2000)[9]

La validaton de méthode a été également largement débattue lors d'une Consultation Conjointe d'Experts FAO/IAEA en Décembre 1997, sur la Validation des Méthodes Analytiques pour les Contrôles Alimentaires; le rapport de cette consultation est disponible[19].

Les présentes "recommandations" regroupent les principes scientifiques essentiels des documents mentionnés ci-dessus, ceci afin de fournir les informations ayant été soumises à l'approbation internationale, et surtout afin d'indiquer la marche à suivre pour la meilleure pratique de la validation interne d'une méthode (validation effectuée par un seul laboratoire).

2 DEFINITIONS ET TERMINOLOGIE

2.1 Définitions Générales

Les termes utilisés dans ce document respectent les définitions ISO et UICPA lorsqu'elles sont disponibles. Les documents suivants contiennent les définitions pertinentes:

i) IUPAC: Compendium of chemical terminology, 1987

ii) International vocabulary of basic and general terms in metrology. ISO 1993

2.2 Définitions utilisees uniquement dans ce document :

Incertitude relative : Incertitude exprimée comme un écart-type relatif.

Domaine de validité : La partie d'un domaine de concentration d'une méthode d'analyse qui a été soumise à la validation.

3 Validation des Méthodes, Incertitude et Assurance Qualité

La validation de méthode utilise un ensemble de tests qui vérifient à la fois les hypothèses de base de la méthode d'analyse et établissent et documentent les caractéristiques de performance d'une méthode; ce faisant, elle démontre si une méthode est adaptée à son emploi analytique. Les caractéristiques de performance habituelles des méthodes d' analyse sont : définition du champs d'application; la spécificité; l'étalonnage (linéarité); la justesse; la fidélité; la gamme de validité; la limite de quantification; la limite de détection; la sensibilité et la robustesse. On peut y ajouter l'incertitude de la mesure et l'aptitude-à l'essai.

Stricto sensu, la validation devrait faire référence à un 'système d'analyse' plutôt qu'à une 'méthode d'analyse', le système comprenant la définition d'un protocole de méthode, d'un domaine de concentration de l'analyte et la spécification de la nature du matériau d'essai. Pour les besoins de ce document, une référence à la 'validation de méthode' s'entendra comme faisant référence à un système d'analyse dans son ensemble. Quand on fera référence à la procédure d'analyse en tant que telle, on parlera du 'protocole'.

Dans ce document la validation de méthode est considérée comme étant distincte des activités continues telles que le contrôle interne de qualité (CIQ) ou les essais d'aptitude technique. La validation de méthode est réalisé une seule fois, ou à intervalles relativement espacés tout au long de la durée d'utilisation de la méthode; elle nous renseigne sur la performance que l'on est en droit d'attendre d'une méthode à l'avenir. Le contrôle interne de qualité (CIQ) nous renseigne sur les performances de la méthode dans le passé. Le CIQ est par conséquent abordé comme étant une activité distincte dans le Programme d'Harmonisation de l' UICPA.[3]

Dans la validation de méthode les caractéristiques quantitatives présentant un intérêt sont celles concernant le degré de précision du résultat que l'on est susceptible d'obtenir. Par conséquent on peut considérer de manière générale que la

validation de méthode revient à évaluer l'incertitude de la mesure. Au fil des ans et à des fins de validation est née l'habitude qui consiste à représenter divers aspects de la performance de la méthode en faisant référence aux différents éléments énoncés ci-dessus; et d'ailleurs les recommandations présentes s'inscrivent dans cette tendance dans une large mesure. Cependant avec la confiance croissante portée sur l'incertitude de la mesure comme indicateur clé à la fois de l'aptitude-à l'essai et de la fiabilité des résultats; les analystes feront de plus en plus appel à la validation des mesures pour étayer leur évaluation de l'incertitude, et certains souhaiteront recourir à cette pratique immédiatement. Par conséquent l'incertitude de la mesure est abordée brièvement dans l'Annexe A comme une caractéristique de la performance d'une méthode d'analyse, tandis que l' Annexe B fournit des recommandations supplémentaires sur certaines procédures non abordées ailleurs.

4 PRINCIPES DE BASE DE LA VALIDATION DE METHODE

4.1 Spécification et portee de la validation

La validation s'applique selon un protocole bien défini, à la quantification, dans un cadre donné, d'un analyte spécifié associé à un domaine de concentration, se trouvant dans un matériau d'essai. D'une façon générale, la validation devrait vérifier que les performances de la méthode répondent aux besoins dans tout le domaine de concentration de l'analyte et pour tous les matériaux d'essai auxquels elle s'applique. Il s'en suit que ces données devraient être parfaitement précisées avant de procéder à une quelconque validation et être accompagnées d'une énonciation de tout critère d'aptitude-à l'essai

4.2 Hypothèses des essais

Les études de validation fournissent des données de performance qui renseignent sur l'aptitude–à l'essai et qui prennent le pas aujourd'hui sur l'utilisation pratique faite des données de validation. De plus, les études de validation constituent un test objectif des hypothèses de départ sur lesquelles toute méthode d'analyse est fondée. Par exemple, si un résultat est obtenu à partir d'une simple droite d'étalonnage, on suppose implicitement que l'analyse est exempte de tout biais significatif, que la réponse est proportionnelle à la concentration de l'analyte et que la dispersion des erreurs aléatoires s'effectue de manière constante sur tout la domaine de concentration qui nous intéresse. Dans la plupart des cas, de telles hypothèses sont formulées sur la base de l'expérience accumulée tout au long du développement de la méthode, ou sur le plus long terme encore; elles sont par conséquent raisonnablement fiables. Néanmoins, les bonnes pratiques en matière de science de la mesure reposent sur des hypothèses *testées*. C'est pourquoi de très nombreuses études de validation se fondent sur des tests d'hypothèses statistiques, l'objectif

étant de vérifier rapidement que les hypothèses raisonnables formulées concernant les principes de la méthode ne sont pas gravement erronées.

Cette remarque apparemment abstraite a une importante conséquence pratique. Il est plus facile de vérifier que l'on s'éloigne grandement d'une hypothèse fiable que de 'prouver' qu'une hypothèse donnée est correcte. Ainsi, lorsque l'on utilise depuis longtemps et avec succès une technique d'analyse particulière (par exemple l'analyse chromatographique en phase gazeuse ou encore les méthodes de digestion acide) pour un ensemble d'analytes et de matrices, les vérifications de validation se résument à juste titre à des tests relativement simples pour apporter des garanties sur la méthode. À l'inverse, lorsque l'on dispose de peu d'expérience, l'étude de validation doit apporter des preuves solides de l'adéquation des hypothèses retenues dans le cas particulier à l'étude; il est alors généralement nécessaire d'étudier tous les cas de figure dans le détail. Il s'en suit que l'ampleur requise d'une étude de validation dans un cas donné dépendra en partie de l'expérience accumulée concernant la technique d'analyse utilisée.

Dans l'exposé suivant, on considérera comme allant de soi que le laboratoire a une longue pratique de la technique concernée, et que l'objectif de tout test statistique de signification est de s'assurer qu'il n'existe aucune preuve solide allant à l'encontre des hypothèses sur lesquelles le protocole en question repose. Le lecteur se souviendra que des vérifications plus strictes peuvent se révéler nécessaires pour des techniques de mesure mal connues ou moins bien établies.

4.3 Sources d'Erreur en Analyse

Les erreurs de mesures en analyse proviennent de différentes sources[*] et à des niveaux d'organisation différents. On peut utilement représenter ces différentes sources (pour une concentration précise de l'analyte) de la manière suivante[+24]:

- Erreurs aléatoires de la mesure (répétabilité);

[*] On ne tient pas compte dans le document présent de l'incertitude d'échantillonnage, au sens strict d'incertitude due à la préparation de l'échantillon de laboratoire à partir du volume d'origine. L'incertitude liée au prélèvement sur l'échantillon de laboratoire d'une prise d'essai fait intégralement partie de l'incertitude de la mesure et donc est automatiquement incluse aux différents niveaux de l'analyse suivante.

[+] Plusieurs groupes alternatifs ou 'partitions d'erreur' sont possibles et peuvent être utiles lors de l'étude plus approfondie de sources d'erreur bien spécifiques ou pour un ensemble différent de situations. Par exemple, le modèle statistique ISO 5725 combine généralement les effets de l'expérience et du laboratoire, tandis que la procédure d'évaluation de l'incertitude de ISO GUM se prête bien à l'estimation de l'influence sur le résultat de chaque élément distinct et mesurable.

- Erreur systématique (biais) de série;
- Erreur systématique (biais) de laboratoire;
- Erreur systématique (biais) de méthode;
- Effet de variation de la matrice.

Bien que ces différentes sources ne soient pas nécessairement indépendantes, cette liste constitue une manière utile de vérifier les domaines dans lesquels une étude de validation donnée doit chercher les sources d'erreur.

La répétabilité intra-série comprend des contributions de toutes les étapes de la procédure qui varient au cours d'une série, ceci comprend les contributions dues aux erreurs bien connues, gravimétriques et volumétriques, à l'hétérogénéité du matériau d'essai et à une variation dans les étapes de la chimie de l'analyse; on l'observe facilement à partir de la dispersion d'analyses répétées. L'effet de série explique les variations supplémentaires quotidiennes du système analytique, comme un changement de l'analyste, des lots, des réactifs, du réétalonnage des instruments, ainsi que de l'environnement du laboratoire (par ex. des changements de température). Lors d'une validation par un seul laboratoire, l'effet de série s'évalue habituellement en procédant à des répliques d'analyse d'un matériau approprié au cours de plusieurs séries distinctes. La variation inter-laboratoires s'explique par différents facteurs, tels que des variations dans les normes d'étalonnage, des différences dans les interprétations d'un protocole d'un endroit à l'autre, des changements dans l' équipement ou dans les réactifs utilisés, ou encore des facteurs environnementaux , par exemple des conditions climatiques moyennes différentes. La variation inter-laboratoires apparaît très clairement dans les résultats d'essais interlaboratoires (études de performance de la méthode) et de tests de compétence technique; parfois, on peut discerner la variation inter-méthode dans les résultats de ces derniers.

Généralement, la répétabilité, l'effet de série et l'effet de laboratoire sont d'amplitude comparable, on ne peut par conséquent en négliger aucun sans risque lors d'une validation. Dans le passé, on a eu tendance à négliger certains aspects, surtout quand il s'agissait d'évaluer et de faire état des informations concernant l'incertitude, avec pour conséquence des intervalles d'incertitude trop étroits. Par exemple, l'essai interlaboratoires tel qu' il se pratique normalement ne donne pas l'ensemble des informations car la contribution sur l'incertitude du biais de la méthode et des variations de la matrice n'y sont pas pris en compte, et doivent donc être abordées par ailleurs (habituellement lors d'études internes préalables). La validation interne présente quant à elle un danger particulier: le biais de laboratoire risque d' être négligé , or cette source d'erreur est généralement le premier pourvoyeur d'incertitude de la liste ci-dessus. Il faut donc porter une attention toute

particulière au biais de laboratoire lors d'une validation interne.

En plus des problèmes évoqués ci-dessus, la validation d'une méthode se limite à la portée de son application, c'est-à-dire à la méthode appliquée à une catégorie bien particulière de matériau d'essai. S'il existe des variations importantes du type de matrice à l'intérieur d'une catégorie définie, intervient alors une source supplémentaire de variation due aux effets de matrice intra-catégorie. Bien évidemment, si la méthode est ultérieurement utilisée pour des matériaux d'essai hors de la catégorie définie (c'est-à-dire hors de la portée de la validation), le système analytique ne peut pas être considéré comme étant validé: en effet une erreur supplémentaire d'ampleur inconnue est introduite dans le processus de mesure.

Il est également important que les analystes tiennent compte des variations de la performance d'une méthode en fonction de la concentration de l'analyte. Dans la plupart des cas la dispersion des résultats augmente avec la concentration et le recouvrement peut être très différent à forte et à faible concentrations. L'incertitude de la mesure associée aux résultats dépend par conséquent souvent de ces deux effets et d'autres facteurs dépendants de la concentration. Heureusement, il est souvent raisonnable de supposer qu'il existe une relation simple entre la performance et la concentration de l'analyte; couramment les erreurs sont proportionnelles à la concentration de l'analyte.[*] Cependant, dans les cas où l'on s'intéresse à la performance de la méthode à des concentration très différentes, il est important de vérifier la relation supposée entre la performance et la concentration de l'analyte. Cela se fait habituellement en vérifiant la performance aux extrémités du domaine d'application probable ou bien à quelques niveaux sélectionnés. Des contrôles de linéarité fournissent également des informations du même ordre.

4.4 EFFETS LIES A LA METHODE ET AU LABORATOIRE

Il est d'une importance critique lors d'une validation interne de méthode de tenir compte du biais de la méthode et du biais du laboratoire. Il existe quelques laboratoires aux équipements particuliers dans lesquels de tels biais peuvent être considérés comme étant négligeables, mais il s'agit là d'une situation tout à fait exceptionnelle.(Cependant dans le cas où un seul laboratoire pratiquerait une analyse spécifique, le biais de la méthode et le biais du laboratoire revêtent une signification particulière). Généralement, les effets liés à la méthode et au laboratoire doivent être inclus dans le budget d'incertitude, mais souvent ils sont plus difficiles à traiter que l'erreur de répétabilité et que l'effet de série. En règle générale, pour pouvoir évaluer les incertitudes respectives, il est nécessaire d'utiliser des informations indépendantes du laboratoire. Généralement parlant, les

[*] Cela peut ne pas s'appliquer à des concentrations en deçà de dix fois la limite de détection.

sources d'informations indépendantes les plus utiles sont (i) les statistiques provenant d'essais inter-laboratoires (données souvent non disponibles dans les cas de validation interne de la méthode), (ii) de statistiques provenant d'essais d'aptitude technique, et (iii) des résultats provenant de l'analyse des matériaux de référence certifiés.

Les essais inter-laboratoires évaluent directement la variance des biais inter-laboratoires. Bien qu'il puisse exister des lacunes théoriques dans la conception de tels essais, ces estimations de variance sont adaptées à de nombreux usages pratiques. Par conséquent il est toujours instructif de tester les validations internes en comparant les estimations d'incertitude avec les estimations de reproductibilité provenant des essais inter-laboratoires. Si le résultat de la validation interne est nettement le plus petit, il est fort probable que des sources importantes d'incertitude ont été négligées. (Il peut arriver qu'un laboratoire particulier travaille en fait à un degré moindre d'incertitude que ce que l'on trouve dans les essais inter-laboratoires : dans ce cas, ce laboratoire devrait mettre en place des mesures spécifiques pour justifier de sa situation). Si aucun essai inter-laboratoires n'a été effectué sur la combinaison méthode/matériau d'essai considérée, une estimation de l'écart type de reproductibilité pour une concentration c de l'analyte supérieure à 120 ppb environ peut généralement être obtenue en utilisant la fonction de Horwitz, $=$, les deux variables étant exprimées comme des fractions de la masse. (L'estimation de Horwitz varie normalement du simple au double par rapport aux résultats observés lors d'études collaboratives). On a observé que la fonction de Horwitz est incorrecte pour des concentrations inférieures à 120 ppb environ, et dans ce cas une fonction modifiée est plus appropriée.[21, 25] Toutes ces informations peuvent être intégrées au domaine de la validation interne avec des changements minimes.

Les statistiques provenant des essais d'aptitude technique sont tout particulièrement intéressantes parce qu'elles fournissent des informations d'ordre général sur l'ampleur des biais combinés de laboratoire et de méthode; dans certains cas spécifiques, le participant obtient, quant à lui, des informations sur l'erreur totale. Des statistiques telles que l'écart type consolidé des résultats des participants, pour un analyte au cours d'un service d'essai inter-laboratoire peuvent en principe être utilisées de la même façon que l'écart type de reproductibilité inter-laboratoire, par exemple, pour obtenir une valeur raisonnable de l'incertitude globale à comparer avec des estimations individuelles provenant de validations internes. En pratique il peut être plus difficile d'avoir accès aux statistiques provenant des essais d'aptitude technique car elles ne sont pas systématiquement répertoriées et publiées, comme c'est le cas lors d'essais inter-laboratoires (souvent elles ne sont disponibles que pour les participants). Bien sûr, si l'on doit utiliser de

telles statistiques il faut qu'elles fassent référence à la matrice et à la concentration de l'analyte appropriées. Les différents participants à des programmes d'essais d'aptitude technique peuvent également évaluer la validité de leur estimation de l'incertitude en comparant leurs résultats avec les valeurs assignées de plusieurs séries successives[26]. Cependant il s'agit là d'une activité continue, qui par conséquent ne ressort pas stricto sensu du domaine de compétence de la validation interne (qui est un événement singulier).

Si un matériau de référence certifié (MRC) est disponible, un test interne permet au laboratoire d'évaluer les biais combinés du laboratoire et de la méthode en analysant le MRC un certain nombre de fois. L'estimation du biais combiné est la différence entre la moyenne des résultats et la valeur certifiée.
Les matériaux de référence certifiés adéquats ne sont pas toujours disponibles, aussi peut-on se trouver dans l'obligation d'utiliser d'autres matériaux. Parfois des matériaux restant après des essais d'aptitude technique sont utilisés à cet effet et, même si les grandeurs assignées à ces matériaux peuvent présenter des incertitudes sur les valeurs desquelles on peut s'interroger, leur utilisation permet cependant une vérification du biais global. De façon spécifique, les valeurs assignées aux essais d'aptitude technique sont généralement choisies pour fournir une estimation avec le minimum de biais, par conséquent un test du biais à partir d'un tel matériau est une pratique tout à fait raisonnable. Il existe aussi la possibilité d'utiliser des informations à partir de tests d'ajouts dosés et de recouvrement,[4] pour fournir des estimations de ces biais, même s'il peut y avoir des sources d'incertitude non mesurées par ces techniques.

Couramment l'effet le moins reconnu en matière de validation est celui dû à la variation des matrices à l'intérieur de la catégorie de matériau d'essai défini. L'exigence théorique pour pouvoir estimer ce composant de l'incertitude serait d'analyser en une seule fois un ensemble représentatif des matériaux d'essai, en évaluant leurs biais individuels et en calculant la variance de ces biais. (Le fait d'analyser en une seule fois signifie que des biais de plus hauts niveaux n'ont pas d'incidence sur la variance. Si un large intervalle de concentration est concerné, il faut prendre en considération l'évolution du biais en fonction de la concentration).
Si les matériaux représentatifs sont des matériaux de référence certifiés, les biais peuvent être directement évalués comme étant les différences entre les résultats et les valeurs de référence, et toute la procédure est directe. Dans le cas plus probable où le nombre de matériaux de référence disponibles est insuffisant, on doit parfois faire appel à des tests de recouvrement avec une gamme de matériaux d'essais types, en procédant avec tout le soin

que cela mérite. Actuellement il existe fort peu de données quantitatives quant à l'ordre de grandeur des incertitudes provenant de cette source, même si dans certains cas on suspecte qu'elles sont importantes.

5 CONDUITE DES ETUDES DE VALIDATION

La conception détaillée et la réalisation des études de validation de méthode sont des sujets traités de façon approfondie dans d'autres documents, et ils ne seront donc pas repris ici. Cependant, les principes les plus importants qui sont pertinents, sont pris en considération ci-dessous:

Il est essentiel que des études de validation soient représentatives. C'est-à-dire que, dans la mesure du possible, les études devraient être conduites pour fournir une représentation réaliste du nombre et et de l'étendue des effets intervenants lors de l'utilisation normale de la méthode, et conduite également pour couvrir les domaines de concentration et les types d'échantillons inclus dans le champ d'application de la méthode. Lorsqu'un facteur (ex : la température ambiante) a varié significativement et de manière aléatoire au cours d'une étude de fidélité, par exemple, les effets de ce facteur apparaissent directement dans la variance observée et ne nécessitent pas d'étude supplémentaire, sauf si une optimisation de la méthode est souhaitable par la suite.

Dans le contexte de la validation de méthode, la "variation représentative" signifie que le facteur observé doit présenter une distribution de valeurs en accord avec le domaine de variation attendu du paramètre en question. Pour des paramètres mesurables en continu, il peut s'agir d'un domaine de variation autorisé, d'une incertitude déclarée ou d'un domaine de variation attendu ; pour des facteurs discontinus, ou pour des facteurs avec des effets imprévisibles comme la matrice d'échantillon, un intervalle représentatif correspond à la diversité des types ou "niveaux de facteur" autorisés ou rencontrés lors de l'utilisation normale de la méthode. Idéalement, la représentativité ne s'applique non pas seulement à la fourchette de valeurs mais aussi à leur distribution. Malheureusement, il est souvent trop onéreux de mettre en place la variation totale de nombreux facteurs à de nombreux niveaux. Cependant, dans la plupart des cas pratiques, le minimum acceptable est de mettre en place des essais basés sur les points extrêmes de l'intervalle attendu, ou sur un intervalle plus large que celui prévu dans la méthode.

Lorsque l'on choisit des facteurs de variation, il est important de s'assurer que les effets les plus importants sont le plus étudiés possible. Par exemple, quand la variation d'un jour à l'autre (pouvant être due aux effets de réétalonnage) est importante comparée à la répétabilité, deux déterminations par jour pendant cinq jours fourniront une meilleure estimation de la fidélité intermédiaire que cinq déterminations par jour pendant seulement deux jours. Dix déterminations individuelles sur plusieurs jours distincts seraient préférables encore, à condition d'exercer un contrôle suffisant, même si cela ne fournit pas d'information

supplémentaire sur la répétabilité observée au cours d'une même journée.

Il est évident que lorsque l'on prévoit des tests d'hypothèse, toute étude devrait être capable de détecter de tels effets avant qu'ils ne deviennent importants pratiquement parlant (c'est-à-dire comparables à la plus grande composante de l'incertitude).

De plus, les considérations suivantes peuvent se révéler importantes:

- Lorsque l'on sait ou suspecte que des facteurs interagissent entre eux, il est important de s'assurer que l'effet de l'interaction est pris en compte. Pour ce faire, on peut soit procéder à une sélection aléatoire à différents niveaux des paramètres qui interagissent, soit concevoir avec une attention particulière un système adapté à l'obtention des effets d''interaction' ou des informations sur la covariance.
- Lorsque l'on procède à des études du biais global, il est important que les matériaux de référence et les valeurs soient en rapport avec les matériaux soumis aux essais de routine.

6 PORTEE DES ETUDES DE VALIDATION

La portée souhaitable de la validation par un laboratoire donné d'une méthode nouvelle, modifiée ou mal connue, dépend en partie du statut actuel de la méthode et de la compétence du laboratoire. Ci-dessous nous émettons des suggestions sur la portée de la validation et des mesures de vérification dans diverses situations. Nous supposons dans l'ensemble que la méthode en question est destinée à une utilisation de routine, sauf exception clairement indiquée.

6.1 Le laboratoire est tenu d'utiliser une methode "entierement" validee

La méthode a été étudiée lors d'un essai interlaboratoires et le laboratoire se doit donc de vérifier qu'il est en mesure d'obtenir les caractéristiques de performance de la méthode ayant été publiées (ou sinon qu'il est capable de répondre aux exigences de la tâche analytique). Le laboratoire devrait entreprendre des études de fidélité, des études de biais (y compris des études de variation de la matrice), et éventuellement des études de linéarité, certains essais néanmoins, et par exemple celui de la robustesse pouvant être laissés de côté.

6.2 Le laboratoire doit utiliser une methode entierement validee mais avec une nouvelle matrice

La méthode a été étudiée lors d'un essai interlaboratoires et le laboratoire se doit donc de vérifier que la nouvelle matrice n'introduit pas de nouvelles sources d'erreur dans le système. La même portée de l'étude de validation que précédemment est requise.

6.3 Le laboratoire doit utiliser une methode bien etablie mais qui n'a pas fait l'objet d'une etude collaborative

La même portée de l'étude de validation que précédemment est requise.

6.4 La methode a fait l'objet d'une publication dans la litterature scientifique celle-ci fournissant quelques caracteristiques analytiques

Le laboratoire devrait entreprendre des études de fidélité, des études de biais (incluant des études de variation de la matrice), ainsi que des études de robustesse et de linéarité.

6.5 La methode a fait l'objet d'une publication dans la litterature scientifique, mais sans precision sur les caracteristiques, ou bien la methode a été developpee en interne

Le laboratoire devrait entreprendre des études de fidélité, des études de biais (incluant des études de variation de la matrice), ainsi que des études de robustesse et de linéarité.

6.6 la methode est empirique

Dans une méthode empirique la quantité estimée est tout simplement le résultat obtenu en suivant la procédure spécifiée. Elle diffère des mesurages visant à évaluer des grandeurs indépendantes de la méthode, comme la concentration d'un analyte donné dans un échantillon, dans le fait que le biais de la méthode est conventionnellement nul et que la variation de la matrice (dans la catégorie définie) n'est pas à considérer. Le biais de laboratoire quant à lui ne peut pas être ignoré, mais il a tendance à être difficilement évalué au moyen d'une étude intra-laboratoire. De plus, les matériaux de référence sont rarement disponibles. En l'absence de données provenant d'étude collaborative, on peut évaluer la fidélité inter laboratoire en utilisant une étude de robustesse spécialement conçue à cet effet ou en utilisant la fonction de Horwitz.

6.7 l'analyse est "ad hoc"

On a parfois besoin de recourir à une analyse "ad hoc" pour estimer une valeur de

façon peu précise à moindre frais et sans exigence poussée. L'effort dispensé à des fins de validation est par conséquent strictement limité. Les biais devraient être étudiés par des méthodes comme l'estimation du recouvrement ou des ajouts dosés, de plus la fidélité peut être étudiée par réplique de plusieurs mesures.

6.8 changements de personnel et d' equipement

On peut donner des exemples importants suivants: changements concernant les principaux instruments; nouveaux lots de réactifs pouvant fortement varier (par exemple les anticorps polyclonaux); changements touchant les locaux du laboratoire; méthodes utilisées pour la première fois par un nouveau personnel ; ou bien une méthode validée, employée après une période de mise en sommeil. Il s'agit alors et avant tout de prouver qu'aucune modification délétère n'est survenue. La vérification minimale requise est une simple étude de biais basée sur une étude de type "avant et après" sur des matériaux d'essai types ou sur des matériaux de contrôle. En général, les tests effectués devraient mettre en évidence l'impact possible du changement sur la procédure analytique.

7 RECOMMANDATIONS

Les recommandations suivantes sont formulées pour l'utilisation de la validation intra-laboratoire de la méthode:

- A chaque fois que cela est possible et pertinent, un laboratoire devrait utiliser une méthode d'analyse dont les caractéristiques de performance ont été évaluées lors d'un essai interlaboratoires conforme à un protocole international.
- Quand de telles méthodes ne sont pas disponibles, une méthode doit être validée en interne avant d'être utilisée pour produire des données analytiques pour un client.
- Pour une validation interne, il faut que le laboratoire choisisse des caractéristiques d'évaluation adéquates dans la liste suivante: domaine d'application, spécificité, étalonnage, justesse, fidélité, domaine de validité, limite de quantification, limite de détection, sensibilité, robustesse et adéquation à l'usage prévu. Le laboratoire doit tenir compte des besoins du client lors du choix des caractéristiques à déterminer.
- On doit fournir aux clients du laboratoire la preuve que ces caractéristiques ont bien été évaluées s'ils en font la demande.

8 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. *"Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method Performance Studies"*, W Horwitz, *Pure Appl. Chem*., 1988, **60**, 855 864, révisé W. Horwitz, *Pure Appl. Chem.,* 1995, **67**, 331-343.

2. *"The International Harmonised Protocol for the Proficiency Testing of (Chemical) Analytical Laboratories",* M Thompson et R Wood, *Pure Appl. Chem.,* 1993, **65**, 2123-2144. (également publié dans *J. AOAC International*, 1993, **76**, 926-940.

3. *"Harmonised Guidelines For Internal Quality Control in Analytical Chemistry Laboratories"*, Michael Thompson et Roger Wood, J. Pure & Applied Chemistry, 1995, 67(4), 49-56.

4. *"Harmonised Guidelines for the Use of Recovery Information in Analytical Measurement",* Michael Thompson, Stephen Ellison, Ales Fajgelj, Paul Willetts et Roger Wood, J. Pure & Applied Chemistry, 1999, 71(2), 337-348.

5. *"Council Directive 93/99/EEC on the Subject of Additional Measures Concerning the Official Control of Foodstuffs"*, J. O., 1993, L290.

6. *"Procedural Manual of the Codex Alimentarius Commission, 10th Edition"*, FAO, Rome, 1997.

7. "*Precision of Test Methods"*, Genève, 1994, ISO 5725, Editions précédentes en 1981 et 1986.

8. *"Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement"*, ISO, Genève, 1993.

9. *"Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement"*, EURACHEM Secretariat, Laboratory of the Government Chemist, Teddington, Royaume-Uni, 1995, EURACHEM Guide (en cours de révision).

10. *"International vocabulary of basic and general terms in metrology"* ISO, Genève 1993

11. *"Validation of Chemical Analytical Methods"*, NMKL Secretariat, Finlande, 1996, NMKL Procedure No. 4.
12. *"EURACHEM Guide: The fitness for purpose of analytical methods. A*

Laboratory Guide to method validation and related topics", LGC, Teddington 1996. Egalement disponible auprès du Secrétariat de EURACHEM et sur leur site web.

13. *"Statistics manual of the AOAC"*, AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, Maryland, USA, 1975

14. *"An Interlaboratory Analytical Method Validation Short Course developed by the AOAC INTERNATIONAL"*, AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, Maryland, USA, 1996.

15. *"Text on validation of analytical procedures"* International Conference on Harmonisation. Federal Register, Vol. 60, 1 Mars 1, 1995, pages 11260

16. *"Validation of analytical procedures: Methodology"* Conférence Internationale sur l' Harmonisation. Registre Fédéral Federal Register, Vol. 62, No. 96, 19 Mai 1997, pages 27463-27467.

17. *"Validation of Methods"*, Inspectorate for Health Protection, Rijswijk, Pays-Bas, Rapport 95-001.

18. *"A Protocol for Analytical Quality Assurance in Public Analysts' Laboratories"*, Association of Public Analysts, 342 Coleford Road, Sheffield S9 5PH, Royaume-Uni, 1986.

19. *"Validation of Analytical Methods for Food Control"*, Rapport d'une Consultation Conjointe d'Experts FAO/IAEA, Décembre 1997, FAO Food and Nutrition Paper No. 68, FAO, Rome, 1998

20. *"Estimation and Expression of Measurement Uncertainty in Chemical Analysis"*, Secrétariat NMKL, Finlande, 1997, Procédure NMKL No. 5.

21. M Thompson, PJ Lowthian, *J AOAC Int*, 1997, **80**, 676-679

22. Recommandation IUPAC: *"Nomenclature in evaluation of analytical methods, including quantification and detection capabilities" Pure and Applied Chem."* 1995, **67** 1699-1723

23. ISO 11843. "*Capability of detection*." (Plusieurs parties). International Standards Organisation, Genève.

24. M. Thompson, *Analyst*, 2000, **125**, 2020-2025

25. *"Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing"* M Thompson, *Analyst*, 2000, **125**, 385-386.

26. *"How to combine proficiency test results with your own uncertainty estimate - the zeta score"*, Analytical Methods Committee of the Royal Society of Chemistry, AMC Technical Briefs, publié par M. Thompson, *AMC Technical Brief No. 2, www.rsc.org/lap/rsccom/amc*

ANNEXE A: NOTES SUR LES CONDITIONS REQUISES POUR L'ETUDE DES CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE D'UNE METHODE

Les conditions générales requises pour les caractéristiques individuelles de performance d'une méthode sont les suivantes.

A1 Domaine d'application

Après validation, la documentation devrait fournir, en plus de toute spécification de la performance, les informations suivantes:

- l'identification de l'analyte, y compris la spécification si nécessaire (Exemple: 'arsenic total');
- le domaine de concentration couvert par la validation (Exemple: '0-50 ppm');
- la spécification des types de matrices du matériau d'essai couverte par la validation (Exemple: 'vin rouge sec');
- un protocole décrivant l'équipement, les réactifs, la procédure (y compris la variation autorisée dans les instructions spécifiées, par ex. 'chauffer à 100 ± 5° pendant 30 ± 5 minutes'), l'étalonnage et les procédures qualité, ainsi que toute mesure de précaution ou de sécurité éventuellement nécessaire;
- l'application prévue et ses exigences critiques d'incertitude (Exemple: 'L'analyse alimentaire à des fins de sélection rapide. L'incertitude normale (standard) $u(c)$ du résultat c devrait être inférieure à $0.1 \times c$.').

A2 Spécificité

La spécificité se définit comme étant le niveau de capacité d'une méthode à quantifier l'analyte exactement en présence d'interférents. Dans l'idéal, on devrait évaluer la spécificité pour chaque interférent important susceptible d'être présent. Il est particulièrement important de vérifier les interférents susceptibles, sur la base de principes chimiques, de donner une réponse à l'essai. Par exemple, on peut raisonnablement s'attendre à ce que des réactions colorimétriques pour l'ammoniac répondent aux amines aliphatiques primaires. Il peut se révéler peu ou pas pratique de tenir compte et d'évaluer chaque interférent potentiel; dans ce cas, on recommande d'envisager les situations les plus défavorables susceptibles de se produire. Le principe général est que la spécificité devrait être suffisamment bonne pour ne pas avoir à se préoccuper des interférences.

Dans de nombreux types d'analyses, la spécificité est essentiellement une évaluation qualitative fondée sur la réponse, significative ou non, des tests appropriés pour les études des interférences. Cependant, il existe des mesures quantitatives utiles. Par exemple l'indice de spécificité b_{an}/b_{int}, où b_{an} représente la sensibilité de la méthode (pente de la droite d'étalonnage) et où b_{int} représente la pente de la réponse produite indépendamment par un interférent potentiel; cet indice fournit une mesure quantitative de l'interférence. On peut déterminer b_{int} de façon approximative en exécutant la procédure sur un blanc matrice et sur le même blanc supplémenté avec l'interférent potentiel à une concentration donnée adaptée. Si aucun blanc matrice n'est disponible et qu'on utilise à la place un matériau type, on ne peut estimer b_{int} à partir d'une expérience aussi simple que si l'on supposait que les effets mutuels de matrice sont absents. Notons qu'il est plus facile de déterminer b_{int} en l'absence de l'analyte, car il existe le risque de confondre son effet avec un autre genre d'interférence lorsque la sensibilité du dosage de l'analyte est elle même affectée par l'interférent (effet matrice).

A3 Etalonnage et linearite

Si l'on exclut les erreurs grossières de préparation des étalons, les erreurs d'étalonnage constituent généralement (mais pas toujours) une composante mineure du budget total de l'incertitude, et l'on peut en général raisonnablement les répartir dans diverses catégories que l'on estime par des méthodes dites "descendantes". Par exemple, les erreurs aléatoires résultant de l'étalonnage font partie du biais de série, qui est évalué de manière globale, tandis que des erreurs systématiques provenant de cette source peuvent se retrouver dans le biais du laboratoire, évalués eux aussi de manière globale. Néanmoins, il est utile de connaître certaines caractéristiques de l'étalonnage dès le départ de la validation de la méthode, car elles ont une incidence sur la stratégie à adopter pour la réalisation optimale de la procédure. Dans cette catégorie il est question de savoir s'il est plausible que la fonction d'étalonnage (a) soit linéaire, (b) passe par l'origine et (c) ne soit pas affectée par la matrice du matériau d'essai. Les procédures décrites dans le présent document s'appliquent aux études d'étalonnage dans le cadre d'une validation, celles-ci sont nécessairement plus exigeantes que celles appliquées à l'étalonnage réalisé lors d'analyses de routine. Par exemple, une fois que l'on a établi lors de la validation que la fonction d'étalonnage est linéaire et passe par l'origine, on peut instaurer une stratégie d'étalonnage beaucoup plus simple au moment de l'utilisation en routine (par exemple, un plan d'expérience avec deux points répétés). Normallement, les erreurs provenant de cette méthode simplifiée d'étalonnage se répartissent dans le cadre de la validation, dans des niveaux d'erreurs supérieurs.

A3.1 Linéarité et ordonnée à l'origine

On peut tester la linéarité de manière informelle en examinant la représentation graphique des erreurs résiduelles produites par la régression linéaire des réponses sur les concentrations dans un ensemble d'étalonnage approprié. Tout graphe en forme de courbe suggère un manque d'ajustement dû à une fonction d'étalonnage non linéaire. Un test statistique de signification peut être entrepris en comparant la variance de l'erreur d'ajustement avec celle due à l'erreur pure. Cependant il existe d'autres causes d'erreur d'ajustement que la non linéarité, et qui se produisent lors de certains types d'étalonnages analytiques ; il faut donc utiliser le test statistique de signification en conjonction avec la représentation graphique des erreurs résiduelles. Bien que largement utilisé comme indicateur de la qualité de l'ajustement, le coefficient de corrélation porte à confusion; il n'est pas approprié comme test de linéarité et ne devrait pas être utilisé.

Le plan d'expérience est de la plus grande importance pour les études d'erreur d'ajustement, car il est facile de confondre la non linéarité avec la dérive. Des mesures répétées sont nécessaires pour fournir une estimation de l'erreur pure s'il n'y a pas d'estimation indépendante. En l'absence de spécifications, les consignes suivantes devraient être appliquées:

- Il devrait y avoir au moins six calibrants;
- Les calibrants devraient être placés à intervalles réguliers sur toute la gamme de concentration étudiée;
- La gamme devrait englober 0-150% ou 50-150% de la concentration susceptible d'être rencontrée, selon le pourcentage le plus approprié;
- Les calibrants devraient être analysés deux fois au minimum et de préférence trois fois ou plus, dans un ordre aléatoire.

Après un premier essai d'ajustement à partir d'une régression linéaire simple, les erreurs résiduelles devraient être examinées pour trouver les modèles adaptés. L' hétéroscédasticité est assez fréquente dans l'étalonnage analytique et un modèle la suggérant signifie que les données de l'étalonnage doivent de préférence être traitées au moyen de la régression pondérée. Le non recours à la régression pondérée dans ces circonstances pourrait occasionner des erreurs exagérées dans la partie inférieure de la courbe d'étalonnage.

L'étude de l'erreur d'ajustement peut être effectuée en utilisant soit la régression simple soit la régression pondérée. Une étude de l'ordonnée à l'origine testant si elle est significativement différente de zéro peut également être effectué sur cette donnée s'il n'y a pas d'erreur d'ajustement significative.

A3.2 Etude de l'effet matrice

L'étalonage se trouve grandement simplifié si les étalons peuvent être préparés à partir d'une solution simple de l'analyte. Les effets d'une possible erreur de matrice doivent être évalués lors de la validation si cette stratégie est adoptée. On peut tester les effets matrice en appliquant la méthode des ajouts d'analyte (appelée aussi "ajouts de standard") à une solution d'essai dérivée d'un matériau d'essai type. Il faudrait effectuer l'essai de façon à obtenir la même dilution finale que la procédure normale, et la gamme des ajouts devrait recouvrir la même fourchette que celle de la validation de l'étalonnage définie par la procédure. Si l'étalonnage est linéaire, la pente de la fonction habituelle d'étalonnage peut être comparée à la pente de la représentation graphique des ajouts dosés, pour rechercher une différence significative. L'absence de signification indique qu'il n'existe pas d'effet matrice détectable. Si l'étalonnage n'est pas linéaire on a besoin d'une méthode plus complexe avec un test statistique de signification, mais une comparaison visuelle à des concentrations égales pourra généralement suffire. L'absence de signification dans cet essai indique souvent que l'effet de variation de la matrice [Section A13] est aussi absent.

A3.3 Procédure finale d'étalonnage

On peut être amené à valider séparément la stratégie d'étalonnage telle qu'elle est définie dans la procédure, bien que les erreurs impliquées contribuent à des incertitudes estimées conjointement. Il est important de noter ici que les incertitudes estimées à partir des plans d'expérience spécifiques pour la linéarité etc,.. seront plus petites que celles issues de l'étalonnage simple, défini dans le protocole de la procédure

A4 Justesse

A4.1 Evaluation de la justesse

La justesse est le degré de concordance entre le résultat d'un essai et la valeur de référence acceptée du paramètre mesuré. La justesse s'exprime quantitativement en termes de "biais"; plus le biais est petit, plus la justesse est grande. Le biais est typiquement déterminé en comparant la réponse de la méthode à un matériau de référence présentant une valeur connue affectée. Le test statistique de signification est recommandé. Quand l'incertitude de la valeur de référence n'est pas négligeable, l'évaluation des résultats devrait tenir compte de l'incertitude liée au matériau de référence ainsi que de la variabilité statistique.

A4.2 Conditions à appliquer pour les expériences de justesse

Des biais peuvent apparaître à différents niveaux d'organisation dans un système analytique, par exemple, le biais de série, le biais de laboratoire et le biais de la méthode. Il est important de savoir quel biais est traité par les différentes méthodes d'étude des biais. En particulier:

- La moyenne d'une série de mesurages d'un matériau de référence, réalisés ensemble au cours de la même série, donne des informations sur la somme des effets de méthode, de laboratoire et de série pour cette série en particulier. Puisque l'on suppose que l'effet de série est aléatoire d'une série à l'autre, la variation du résultat d'une série à l'autre sera plus importante que celle que l'on pourrait attendre à partir de la dispersion observable des résultats; il faut en tenir compte dans l'évaluation des résultats (par exemple, en comparant le biais mesuré avec l'écart type entre séries déterminé par ailleurs).
- La moyenne des analyses d'un matériau de référence, répétées sur plusieurs séries permet d'estimer les effets combinés des biais produits par la méthode et par le laboratoire pour un laboratoire donné (sauf quand la valeur est attribuée en utilisant la méthode en question).

A4.3 Valeurs de référence à utiliser pour les expériences de justesse

A4.3.1 Matériaux de Référence Certifiés (MRC)

Les MRC sont raccordés aux étalons internationaux, avec une incertitude connue, et peuvent, par conséquent, être utilisés pour aborder simultanément tous les aspects des biais (méthode, laboratoire, et intra-laboratoire), en supposant qu'il n'y a pas d'erreur lié à la matrice. En conséquence, on devrait faire usage des MRC pour la validation de la justesse, lorsque cela est possible en pratique. Il faut s'assurer que les incertitudes des valeurs certifiées sont suffisamment petites pour permettre la détection d'un biais de grande ampleur. Quand elles ne le sont pas, on recommande malgré tout l'utilisation des MRC, mais des vérifications supplémentaires doivent être effectuées.

Une expérience de justesse type engendre une réponse moyenne pour un matériau de référence. Au moment de l'interprétation du résultat , il faut prendre en considération l'incertitude associée à la valeur certifiée ainsi que l'incertitude due à la variation statistique dans le laboratoire. Ce dernier élément peut être fondé sur l'écart type intra-série, inter-séries, ou sur une estimation de l'écart type inter-laboratoires; tout dépendra alors du but de l'expérience (statistique ou matériaux). Quand l'incertitude de valeur certifiée est petite, un test de Student- *t* est

généralement pratiqué, en utilisant le niveau de confiance approprié.

Lorsque cela se révèle nécessaire et possible en pratique, on devrait examiner un certain nombre de MRC appropriés, avec les matrices et les concentrations d'analyte adéquates. Quand c'est le cas, et que les incertitudes des valeurs certifiées sont inférieures à celles des résultats d'analyse, il serait raisonnablement bon d'utiliser la régression simple pour évaluer les résultats. Ainsi on pourrait exprimer le biais en fonction de la concentration et il pourrait se révéler comme étant une ordonnée à l'origine différente de zéro ("biais transitionnel ou constant") ou comme étant une pente différente de 1 (biais "de rotation" or proportionnel). Il faut faire preuve de prudence lors de l'interprétation des résultats lorsque la gamme de matrices est importante.

A4.3.2 Matériaux de référence :

Quand des *Matériaux de Référence Certifiés* (MRC) ne sont pas disponibles, ou en complément des MCR, on peut faire usage de tout matériau suffisamment caractérisé pour le besoin présent (un matériau de référence[10]), en ne perdant jamais de vue que, si un biais insignifiant n'est pas une preuve de l'absence de biais, en revanche un biais significatif sur quelque matériau que ce soit doit être étudié de façon approfondie. Les matériaux de référence comprennent par exemple: des matériaux caractérisés par un fournisseur de matériaux de référence, mais dont les valeurs ne sont pas accompagnées par des données d'incertitude ou sont qualifiées autrement; des matériaux caractérisés par un fabricant du matériau; des matériaux caractérisés dans le laboratoire pour être utilisés comme matériaux de référence; des matériaux soumis à un essai comparatif restreint, ou distribués lors d'un test d'aptitude technique. Même si la traçabilité de ces matériaux n'est pas parfaite, il est nettement préférable de les utiliser plutôt que de ne procéder à aucune évaluation des biais. Ces matériaux seront utilisés autant que possible de la même manière que des MRC, cependant, en l'absence de données d'incertitude, tout test statistique de signification reposera entièrement sur la fidélité observable des résultats.

A4.3.3 Utilisation d'une méthode de référence

On peut en principe utiliser une méthode de référence pour tester les biais d'une autre méthode en cours de validation. C'est une possibilité très utile quand on veut vérifier une alternative à /ou une modification d'une méthode courante établie déjà validée et utilisée par le laboratoire. Les deux méthodes sont utilisées pour analyser un certain nombre de matériaux d'essais types, recouvrant de façon bien répartie de préférence, un domaine de concentration pertinent. Une comparaison des résultats

sur le domaine à l'aide d'une méthode statistique appropriée (par exemple un test-*t bilatéral*, avec les vérifications nécessaires d'homogénéité de variance et de normalité) mettrait en évidence tout biais entre les méthodes.

A4.3.4 Utilisation des ajouts dosés / recouvrement

En l'absence de matériaux de référence, ou pour étayer les études à partir de matériaux de référence, le biais peut être étudié grâce à des ajouts dosés et à l'étude de recouvrement. Un matériau d'essai type est analysé par la méthode à valider à la fois dans son état d'origine et après ajout dosé d'une masse connue de l'analyte. La différence entre les deux résultats, exprimée en proportion de la masse ajoutée est appelée recouvrement de substitution ou parfois recouvrement marginal. Des recouvrements sensiblement différents de 1 indiquent qu'un biais affecte la méthode. Au sens strict, les études de recouvrement ici décrites n'évaluent que le biais dû aux effets s'exerçant sur l'analyte ajouté; les mêmes effets ne s'appliquent pas nécessairement dans la même mesure à l'analyte natif, et des effets supplémentaires peuvent s'appliquer sur lui. Les études d'ajouts dosés et de recouvrements sont par conséquent fortement sujettes à l'observation suivante: même si un bon recouvrement n'est pas une garantie de justesse, un mauvais recouvrement est certainement une indication d'un manque de justesse. Des méthodes concernant la manipulation des données de l'ajout dosé/recouvrement ont été traitées en détail ailleurs.[4]

A5 Fidelite

La fidélité est l'étroitesse d'accord entre des résultats d'essais indépendants obtenus dans des conditions bien stipulées. Elle est généralement définie en termes d'écart type ou de coefficient de variation. La distinction entre la fidélité et le biais est fondamentale, mais dépend du niveau auquel le système analytique est considéré. Ainsi, du point de vue d'une détermination donnée, toute déviation affectant l'étalonnage de la série serait perçue comme un biais. Du point de vue de l'analyste passant en revue une année de travail, le biais de série sera différent chaque jour et agira comme une variable aléatoire avec une fidélité associée. Les conditions stipulées pour l'évaluation de la fidélité tiennent compte de cette différence de point de vue.

Pour la validation interne, deux types de conditions sont pertinents: (a) la fidélité dans des conditions de répétabilité, décrivant les variations observées pendant une seule série d'analyse présentant une espérance statistique de 0 et un écart type , et (b) la fidélité inter-séries décrivant les variations du biais de série δ_{run} avec une

espérance de 0 et un écart type . Généralement ces deux sources d'erreurs affectent les résultats d'analyse individuels, qui par conséquent ont une fidélité combinée $= \left(/ + \right)^{/}$, avec *n* nombre de résultats répétés obtenus à l'intérieur d'une même série exprimés sous la forme de leur moyenne dans les rapports d'étude. Les deux estimations de la fidélité peuvent être obtenues plus simplement en analysant le matériau d'essai sélectionné en double pendant un certain nombre de séries successives. Les divers composants de la variance peuvent alors être calculés en appliquant une analyse unidirectionnelle de la variance. Chaque analyse dupliquée doit être issue d'une mise en oeuvre de la procédure de façon indépendante, que l'on applique à un échantillon indépendant du matériau d'essai. Par une autre approche, la fidélité combinée peut être directement évaluée en procédant à l'analyse du matériau d'essai une seule fois au cours de séries successives, et en estimant l'écart type à partir de l'équation classique. (Notons que les écart types observés portent généralement le symbole *s*, pour les distinguer des écarts types vrais σ).

Il est important que les valeurs de fidélité soient représentatives des conditions d'essai probables. Premièrement, la variation dans les conditions au cours des séries doit refléter ce qui se passerait normalement dans le laboratoire dans les conditions de l'utilisation en routine de la méthode. Par exemple, des variations dans les lots de réactifs, dans les analystes et les instruments devraient être représentatives. Deuxièmement, le matériau d'essai employé devrait être typique, en termes de matrice et (idéalement) d'état de fractionnement, des matériaux susceptibles d'être rencontrés dans l'application en routine. Il en résulte que des matériaux d'essai vrais ou, à un degré moindre, des matériaux de référence correspondants à la matrice seraient adéquats, mais les solutions synthétiques ne le seraient pas. Notons également que les MRC et les matériaux de référence préparés sont fréquemment beaucoup plus homogènes que des matériaux d'essai typiques, et la fidélité calculée à partir de leur analyse peut par conséquent sous-estimer la variation que l'on observera pour les matériaux d'essai.

La fidélité varie souvent en fonction de la concentration de l'analyte. On suppose généralement que i) il n'y a pas de changement de la fidélité en fonction du niveau de l'analyte, ou ii) l'écart type est proportionnel à, ou dépend linéairement du niveau de l'analyte. Dans les deux cas, il faut vérifier la supposition de départ si l'on s'attend à ce que le niveau de l'analyte varie de façon substantielle (c'est-à-dire de plus de 30% environ par rapport à sa valeur centrale). L'expérience la plus économique est probablement de procéder à une simple évaluation de la fidélité au niveau des, ou proche des, points extrêmes du domaine d'application, en l'accompagnant d'un test statistique approprié appliqué sur la différence de

variance. Le test F est adapté lorsque l'erreur suit une distribution normale.

Des données sur la fidélité peuvent être obtenues à partir d'un grand nombre d'ensembles de conditions différents, en plus des conditions les plus simples qui sont celles de la répétabilité et celles inter-séries, stipulées ici, il peut être pertinent d'acquérir des informations supplémentaires. Par exemple, il peut être utile, pour l'évaluation des résultats, ou pour améliorer le mesurage, d'avoir des indications séparées sur les effets des séries et des opérateurs, d'un jour à l'autre ou au cours d'une même journée ou sur la fidélité à laquelle on peut prétendre en utilisant un ou plusieurs instruments. Une gamme de différents plans d'expérience et de différentes techniques d'analyse statistique est disponible, et l'on recommande fortement de toujours bien choisir son plan d'expérience pour de telles études.

A6 RECOUVREMENT

Des méthodes d'évaluation du recouvrement sont traitées dans le chapitre consacré aux méthodes d'évaluation de la justesse (ci-dessus).

A7 Domaine de validité

Le domaine de validité est l'intervalle de concentration de l'analyte à l'intérieur duquel la méthode peut être considérée comme étant valide. Il est important de bien comprendre que ce domaine n'est pas nécessairement identique au domaine utile de l'étalonnage. Tandis que l'étude d'étalonnage peut recouvrir un large domaine de concentration, le restant de la validation (qui représente généralement une partie beaucoup plus importante en termes d'incertitude) recouvrira un domaine plus restreint. Dans la pratique, la plupart des méthodes ne seront validées qu'à un ou deux niveaux de concentration. On peut considérer le domaine de validité comme une extrapolation raisonnable de ces points sur l'échelle de concentration.

Quand l'utilisation de la méthode se focalise sur une concentration donnée bien supérieure à la limite de détection, une validation proche de ce niveau critique précis serait appropriée. Il est impossible de définir une extrapolation générale sûre de ce résultat à d'autres concentrations de l'analyte, car beaucoup d'éléments dépendent du système analytique individuel. Par conséquent le rapport de l'étude de validation devrait préciser l'intervalle autour de la valeur critique, dans lequel, la personne qui procède à la validation, en recourant à un jugement professionnel, considère que l'incertitude estimée est vraisemblable.

Quand le domaine de concentration étudié s'approche de zéro, ou de la limite de détection, il est incorrect de faire l'hypothèse soit d'une incertitude absolue constante soit d'une incertitude relative constante. On peut procéder à une approximation utile de cette situation courante en posant l'hypothèse d'une relation fonctionnelle linéaire, avec une ordonnée à l'origine positive, entre l'incertitude *u* et la concentration *c*, de la forme suivante

$$= \quad +$$

où représente l'incertitude relative estimée pour une concentration bien supérieure à la limite de détection. u_0 représente l'incertitude type estimée pour une concentration nulle, ce que dans certains cas pourrait être estimée comme étant $c_L / 3$. Il serait alors raisonnable de considérer que le domaine de validité s'étend de zéro à un petit multiple entier du point de validation supérieur. Encore une fois il s'agira de recourir au jugement professionnel.

A8 limite de détection

En termes généraux la limite de détection est la plus petite quantité ou concentration de l'analyte dans l'échantillon d'essai que l'on peut distinguer de zéro de façon fiable.[22,23] La limite de détection ne doit pas nécessairement faire partie d'une validation pour les systèmes analytiques dans lesquels le domaine de validation ne l'inclut pas, ni ne s'en approche.

L'idée peut paraître simple, mais toute la question de la limite de détection est en proie aux problèmes énoncés ci-dessous:

- Il existe plusieurs approches conceptuelles sur le sujet, chacune donne une définition quelque peu différente de la limite. Les essais de clarification du sujet semble encore plus confus.
- Bien que chacune de ces approches dépende d'une estimation de la fidélité, à ou près d'une concentration nulle, on ne sait pas clairement si l'on doit appliquer des conditions de répétabilité ou quelque autre condition pour l'estimation.
- Sauf dans les cas où l'on a accès à une quantité exceptionnelle de données, les estimations de la limite de détection seront sujettes à une variation aléatoire assez importante.
- Les estimations de la limite de détection tendent souvent à être sous évaluées à cause de facteurs opérationnels.
- Des interférences statistiques liées à la limite de détection dépendent de

l'hypothèse de répartition normale des résultats, ce qui est pour le moins douteux aux faibles concentrations.

A des fins pratiques, en matière de validation de méthode, il semble préférable de choisir une définition simple, conduisant à une estimation rapidement mise en œuvre que l'on utilisera seulement à caractère indicatif à des fins utiles pour la méthode. Il faut cependant reconnaître que la limite de détection telle qu'on l'estime lors de la mise au point de méthode peut ne pas être identique sur le plan du concept ou numériquement à la limite utilisée pour caractériser une méthode analytique complète. Par exemple la "limite de détection instrumentale", telle qu'on la trouve dans la littérature ou dans les brochures accompagnant les instruments et qui est ensuite ajustée pour la dilution, se trouve être souvent très inférieure à une limite "pratique" de détection; elle se révèle donc inadaptée pour la validation de méthode.

Par conséquent, pour la validation de méthode, on recommande de fonder l'estimation de fidélité utilisée ( ) sur au moins 6 déterminations complètes et indépendantes de la concentration de l'analyte dans un blanc matrice type ou avec un matériau de faible concentration, sans censurer les résultats zéro ou négatifs; on calcule alors la limite de détection approximative comme . Notons qu'avec le nombre minimal recommandé de degrés de liberté, cette valeur est assez incertaine, et peut facilement être erronée d'un facteur de deux. Quand on requiert des estimations plus rigoureuses (par exemple pour étayer des décisions prises sur la base de la détection ou non d'un matériau), certaines références bibiolgrapliques devraient apporter des recommandations adaptées (voir par exemple les références 22-23).

A9 Limite de determination ou limite de quantification

Il est parfois utile de déterminer une concentration en dessous de laquelle la méthode analytique ne peut pas fonctionner avec un degré acceptable de fidélité. On définit parfois arbitrairement cette fidélité comme étant 10% de l'ecart-type de l'erreur de la méthode, parfois la limite est tout aussi arbitrairement définie comme un multiple fixe (généralement 2) de la limite de détection. Bien qu'il soit dans une certaine mesure rassurant d'opérer au delà d'une telle limite, nous devons reconnaître qu'il s'agit là d'une délimitation assez artificielle de l'échelle de concentration: des mesurages inférieurs à une telle limite ne sont pas dépourvues d'informations et peuvent répondre à l'attente que l'on fait d'eux. C'est pourquoi l'utilisation de ce type de limite pour la validation n'est pas recommandée ici. Il est préférable d'essayer d'exprimer l'incertitude de la mesure en tant que fonction de la concentration, et de comparer cette fonction avec un critère d'aptitude à l'essai issu d'un accord entre le laboratoire et le client ou l'utilisateur final des données.

A10 Sensibilité

La sensibilité d'une méthode est la pente de la fonction d'étalonnage. Comme elle est souvent arbitraire, dépendant du paramétrage de l'instrument, la sensibilité n'est pas utile en validation, (elle peut néanmoins être utile dans les procédures d'assurance qualité, pour vérifier si la performance d'un instrument se situe à un niveau constant et satisfaisant.).

A11 Robustesse

La robustesse d'une méthode d'analyse est la résistance au changement des résultats qu'elle produit quand des modifications mineures ont lieu par rapport aux conditions expérimentales décrites dans la procédure. Les limites pour des paramètres expérimentaux devraient être stipulées dans le protocole de la méthode (même si cela n'a pas toujours été fait dans le passé); et de telles modifications acceptées, séparément ou sous quelque combinaison possible, ne devraient pas produire de changement significatif dans les résultats produits. (Un "changement significatif" se traduit par le fait que la la méthode ne pouvait pas fonctionner sans franchir des limites d'incertitude adoptées qui définissent l'aptitude à l'essai.). Les aspects de la méthode susceptibles d'avoir une incidence sur les résultats devraient être identifiés, et leur influence sur la performance de la méthode devrait être évaluée en ayant recours à des études de robustesse.

La robustesse d'une méthode est testée en introduisant délibérément de légères variations dans la procédure et en observant les effets sur les résultats. Il peut être nécessaire de tenir compte d'un certain nombre d'aspects de la méthode, mais comme la plupart d'entre eux ont un effet négligeable, on peut généralement en faire varier plusieurs à la fois. Youden[13] a décrit une expérience économique basée sur des modèles factoriels fractionnés. Par exemple, il est possible de formuler une approche en utilisant 8 combinaisons de 7 facteurs variables, c'est-à-dire d'observer les résultats de sept paramètres à l'aide de seulement huit résultats analytiques. Les approches univariées sont également possibles quand une seule variable à la fois est modifiée.

Les exemples de paramètres que pourrait traiter un test de robustesse sont les suivants : changements d'instrument, d'opérateur ou de marque de réactif; concentration d'un réactif; pH d'une solution; température d'une réaction; temps imparti à l'achèvement du processus etc…

A12 Aptitude A L'ESSAI

L'aptitude à l'essai, c'est le domaine à l'intérieur duquel la performance d'une méthode répond aux critères qui, d'accord entre l'analyste et l'utilisateur final des données, décrivent les besoins de l'utilisateur final. Par exemple, les erreurs dans les données ne devraient pas être d'une ampleur telle qu'elles suscitent des décisions incorrectes plus souvent qu'une petite probabilité définie; mais ces erreurs ne devraient pas être rendues faibles au point que des dépenses inutiles soient demandées à l'utilisateur final. On peut fonder les critères d'aptitude à l'essai sur quelques unes des caractéristiques décrites dans cette annexe, mais en fin de compte ces critères s'expriment en terme d'incertitude totale acceptable.

A13 variation de matrice

Dans de nombreux domaines, la variation de matrice est l'une des sources d'erreurs les plus importantes mais les moins reconnues en matière de mesures analytiques. Lorsque nous définissons le système analytique à valider en précisant, entre autres choses, la matrice du matériau d'essai, des variations considérables peuvent exister à l'intérieur de la catégorie définie. Pour donner un exemple extrême, un échantillon de la catégorie "sol" peut être
composé d'argile, de sable, de craie, de latérite (principalement Fe_2O_3 et Al_2O_3), de tourbe, etc.

ou d'un mélange de ceux ci. On peut aisément imaginer que chacun de ces types produira un effet matrice singulier (unique) sur une méthode d'analyse comme que la spectrophotométrie d'absorption atomique. Si nous ne disposons pas d'informations au sujet du type de sols que nous analysons, il se produira une incertitude supplémentaire dans les résultats, du fait de cet effet matrice variable.

Il convient de quantifier séparément les incertitudes liées aux variations de matrice car elles ne sont prises en compte nulle part ailleurs dans le processus de validation. On acquiert cette information en recueillant un ensemble représentatif des matrices susceptibles d'être rencontrées à l'intérieur de la catégorie définie, toutes ayant des concentrations d'analytes dans le domaine approprié. Les matériaux sont analysés conformément au protocole, et l'on estime les biais dans les résultats. Sauf quand les matériaux de test sont des MRC, il faut généralement procéder à l'estimation des biais en utilisant les ajouts dosés et l'estimation du recouvrement. L'incertitude est estimée par l'écart type des biais. (Note: cette estimation renfermera également une contribution à la variance venant de l'analyse

répétée. L'ampleur de celle-ci sera de si l'ajout dosé a été employé. Si l'on exige un budget d'incertitude strict, ce terme devrait être déduit de la variance de la

variation de matrice pour éviter de le comptabiliser deux fois.)

A14 Incertitude de Mesure réf. roger wood

L'approche formelle de l'estimation de l'incertitude de mesure calcule une estimation de l'incertitude de la mesure à partir d'une équation, ou modèle mathématique. Les procédures décrites pour la validation de méthode sont conçues pour assurer que l'équation utilisée pour évaluer le résultat, prenant en compte les erreurs aléatoires de tous genres, soit une expression valable qui englobe tous les effets reconnus et significatifs sur le résultat. Il s'en suit, à une réserve près détaillée ci-après, que l'équation ou 'modèle' soumis à une validation peut être utilisé(e) directement pour estimer l'incertitude de mesure. Pour ce faire on suit des principes bien établis, fondés sur la 'loi de propagation de l'incertitude' qui, pour des effets d'entrée indépendants s'écrit:

$$u(y(x_1,x_2,\ldots)) = \sqrt{\sum_{i=1,n} c_i^2 u(x_i)^2}$$

où $y(x_1,x_2,....x_n)$ est une fonction de plusieurs variables indépendantes $x_1,x_2...$, et c_i un coefficient de sensibilité évalué par l'expression $c_i=\partial y/\partial x_i$, la différentielle partielle de y par rapport à x_i.$u(x_i)$ et $u(y)$ sont des *incertitudes type*, c'est-à-dire des incertitudes de mesure exprimées sous la forme d'écart-type. Puisque $u(y(x_1,x_2,\ldots))$ est fonction de plusieurs estimations d' incertitudes distinctes, on y réfère comme étant *l' incertitude type combinée*.

Ainsi, pour estimer l'incertitude de mesure à partir de l'équation $y=f(x_1,x_2...)$ utilisée pour calculer le résultat, il faut, premièrement établir les incertitudes $u(x_i)$ pour chacun des termes x_1, x_2 etc…, et deuxièmement combiner ceux-ci avec les termes supplémentaires nécessaires pour représenter les effets aléatoires tels qu'ils sont trouvés en validation; et enfin il faut tenir compte de tous les effets supplémentaires. Dans la discussion de la fidélité figurant ci-dessus, le modèle statistique est:

$$y=f(x_1,x_2...) + \delta_{run} + e$$

où e représente l'erreur aléatoire pour un résultat donné. Puisque δ_{run} et e ont respectivement des écarts types et σ_r qui sont connus à partir des expériences de fidélité, ces écarts type, (ou, strictement parlant, leurs estimations s_{run} et s_r) constituent les incertitudes associées à ces termes supplémentaires. Quand on fait la moyenne des résultats individuels intra-série, l'incertitude combinée associée à ces deux termes est (comme donné précédemment) $s_{tot} = \left(s_r^2 / n + s_{run}^2\right)^{1/2}$. Notons que lorsqu'il est démontré que les termes de fidélité varient avec le niveau d'analyte, l'estimation d'incertitude pour un résultat donné

doit utiliser le terme de fidélité approprié pour le niveau donné. Par conséquent, la base servant à estimer l'incertitude découle directement du modèle statistique posé comme hypothèse et testé en validation. Il faut ajouter à cette estimation tous les termes supplémentaires nécessaires pour tenir compte (notamment) du manque d'homogénéité et de l'effet matrice (voir section A13). Enfin, l'incertitude type calculée est multipliée par un 'facteur de couverture', *k*, pour fournir une incertitude élargie, c'est-à-dire "un intervalle attendu couvrant une large fraction de la dispertion des valeurs que l'on peut attribuer au mesurande"[8]. Quand le modèle statistique est bien établi, la distribution reconnue comme étant normale et le nombre de degrés de liberté associés avec l'estimation est élevé, alors on choisit généralement *k* comme étant égal à 2. L'incertitude élargie correspond alors approximativement à un intervalle de confiance de 95%.

Il faut ici ajouter une réserve importante. Quand on teste le modèle statistique posé comme hypothèse, des essais imparfaits sont utilisés par la force des choses. Il a déjà été signalé que ces essais ne prouvent pas que quelque effet que ce soit fût identique à zéro ; ils ne peuvent montrer seulement qu'un effet est trop petit pour être détecté à l'intérieur de l'incertitude associée au test statistique de signification en question. Un exemple particulièrement important est le test statistique de signification du biais de laboratoire. D'évidence, s'il s'agit là du seul test effectué pour confirmer la justesse, il doit rester une incertitude résiduelle sur l'absence véritable et effective de biais dans la méthode. Il s'en suit que quand de telles incertitudes sont significatives par rapport à l'incertitude calculée jusqu'alors, il conviendrait de les prendre en compte.

Dans le cas d'une valeur de référence présentant une incertitude, le plus simple est de prendre en compte l'incertitude stipulée pour le matériau, combinée avec l'incertitude statistique de la méthode utilisée. Une discussion exhaustive de ce point dépasse la portée du texte ici présent ; la référence biobliographique 9 fournit des détails supplémentaires. Cependant, il est important de noter que, si l'incertitude estimée directement à partir du modèle statistique posé comme hypothèse constitue l'incertitude *minimale* qui peut être associée au résultat analytique, elle sera presque sûrement toujours sous estimée; de même, une incertitude élargie fondée sur les mêmes considérations et utilisant k=2 ne constituera pas un intervalle de confiance suffisant.

Le Guide ISO[8] recommande que, pour augmenter l'intervalle de confiance, plutôt que d'additionner des termes de façon arbitraire, la valeur de *k* devrait être augmentée si besoin est. L'expérience pratique suggère que, pour des estimations de l'incertitude fondées sur un modèle statistique validé, et alors qu'il n'existe aucune preuve au delà des études de validation qui renforce la confiance qu'on a dans ce modèle, *k* ne devrait pas être inférieur à 3. Quand on a de fortes raisons de soupçonner que l'étude de validation n'est pas exhaustive, *k* devrait être encore

augmenté si nécessaire.

ANNEXE B. CONSIDERATIONS SUPPLEMENTAIRES POUR L'EVALUATION DE L'INCERTITUDE DANS LES ETUDES DE VALIDATION

B1 Analyse de la Sensibilité

L'expression de base utilisée pour l'évaluation de l'incertitude

$$u(y(x_1,x_2,\ldots)) = \sqrt{\sum_{i=1,n} c_i^2 u(x_i)^2}$$

requiert les 'coefficients de sensibilité' c_i. Il est courant au cours de l'évaluation de l'incertitude d'observer que, alors qu'un facteur d'influence donné x_i a une incertitude connue $u(x_i)$, le coefficient c_i n'est pas suffisamment caractérisé ou pas immédiatement disponible à partir de l' équation d'expression du résultat. Ceci est particulièrement courant dans les cas où un effet n'est pas inclus dans l'équation d'expression de mesure parce qu'il n'est pas normalement significatif, ou parce que la relation n'est pas suffisamment expliquée pour justifier une correction. Par exemple, l'effet de la température d'une solution T_{sol} sur une procédure d'extraction à température ambiante est rarement établi dans le détail.
Quand on désire évaluer l'incertitude relative à un résultat soumi à un tel effet, on peut déterminer le coefficient de façon expérimentale. Cela peut être fait très simplement en changeant x_i et en observant l'effet sur le résultat, d'une façon très semblable aux essais de robustesse de base. Dans la plupart des cas, il suffit en premier lieu de choisir tout au plus deux valeurs pour x_i en dehors de la valeur nominale, et de calculer une pente approximative à partir des résultats observés. Cette pente nous fournit une valeur approximative pour c_i. Le terme $c_i.u(x_i)$ peut alors être déterminé. (Notons qu'il s'agit là d'une méthode pratique pour démontrer la signification ou l'absence de signification d'un effet possible sur les résultats).

Lors d'une telle expérience, il est important que le changement de résultat observé soit suffisant pour permettre un calcul fiable de c_i. Cela est difficile à prévoir à l'avance. Cependant, pour un intervalle donné où varie la grandeur d'influence x_i, ou alors pour une incertitude élargie relative à cette grandeur, dans lesquels on s'attend à voir produire un changement insignifiant sur le résultat, il est évidemment important d'évaluer c_i à partir d'un plus grand intervalle. Par conséquent on recommande, pour une grandeur d'influence avec un intervalle attendu de $\pm a$, (où $\pm a$ peut être, par exemple : l'intervalle autorisé, l'intervalle

d'incertitude élargi ou un intervalle de confiance à 95%), que l'expérience de sensibilité utilise dans la mesure du possible un changement d'au moins 4*a* pour garantir des résultats fiables.

B2 Jugement

Il n'est pas rare d'observer que même si un effet est reconnu et peut être significatif, il n'est pas toujours possible d'obtenir une estimation fiable de l'incertitude. Dans de telles circonstances, le Guide ISO dit assez clairement qu'une estimation de l'incertitude effectuée par le professionnel est préférable au fait de négliger l'incertitude. Ainsi, quand on ne dispose pas d'une estimation de l'incertitude pour un effet potentiellement important, l'analyste devrait se fier à son meilleur jugement pour évaluer l'incertitude probable et l'appliquer à l'estimation de l'incertitude combinée. La référence 8 donne des indications supplémentaires sur l'utilisation du jugement en matière d'évaluation de l'incertitude.

Recommandations sur l'incertitude de mesure

(Résolution OENO 9/2005)

INTRODUCTION

Il est important que les analystes soient conscients de l'incertitude associée à chaque résultat d'analyse et qu'ils estiment cette incertitude. L'incertitude de la mesure peut être déterminée par plusieurs méthodes. Il est demandé aux laboratoires d'analyse de denrées alimentaires répondant aux exigences de contrôle d'utiliser des méthodes ayant fait l'objet d'analyses inter-laboratoires lorsqu'elles existent et de vérifier leur application avant de les utiliser comme méthodes usuelles. Ces laboratoires devraient donc avoir à leur disposition une série de données analytiques pour estimer.

TERMINOLOGIE

La définition acceptée de l'incertitude de mesure[19] est la suivante:
"paramètre, associé avec le résultat d'un mesurage, qui caractérise la dispersion des valeurs qui pourraient être raisonnablement attribuées au mesurande.

NOTES:

1. Le paramètre peut être par exemple un écart-type (ou un multiple de celui-ci) ou la demi largeur d'un intervalle à un niveau de confiance déterminé.

2. L'incertitude de mesure comprend en général plusieurs composantes; certaines peuvent être évaluées à partir de la distribution statistique des résultats d'une série de mesurages et peuvent être caractérisées par des écarts-types expérimentaux. Les autres composantes qui peuvent être aussi caractérisées par des écarts-types, sont évaluées à partir de distributions présumées de probabilité basées sur l'expérience acquise ou sur d'autres informations.

3. Il est entendu que le résultat d'un mesurage est la meilleure estimation de

[19] [Il est reconnu que le terme "incertitude de mesure" est le plus largement utilisé par les organisations internationales et les agences d'accréditation. Cependant, la Commission du Codex Alimentarius sur les méthodes d'analyse et d'échantillonnage a observé à plusieurs reprises que l'expression "incertitude de mesure" avait une connotation négative dans le contexte légal et a donc pris note du fait qu'on pouvait utiliser une expression alternative équivalente, "fidélité (ou fiabilité) de mesure".]

la valeur d'un mesurande et que toutes les composantes de l'incertitude, y compris celles qui proviennent d'effets systématiques, telles que les composantes associées aux corrections et aux étalons de référence, contribuent à la dispersion.

RECOMMANDATIONS

Les recommandations suivantes sont adressées aux gouvernements :

1. Aux fins de l'OIV, le terme "incertitude de mesure" ou "fiabilité de mesure" devra être utilisé.

2. L'incertitude de mesure ou "fiabilité de mesure" associée à tous les résultats analytiques doit être estimée et doit, sur demande, être mise à la disposition de l'utilisateur (client) des résultats.

3. L'incertitude de mesure ou "fiabilité de mesure" d'un résultat analytique peut être estimée par différentes méthodes, en particulier celles décrites par l'ISO[1] et EURACHEM[2]. Ces documents recommandent des méthodes basées sur une approche composant par composant, les données concernant la validation des méthodes, le contrôle de qualité interne et les tests de compétence. Il n'est pas nécessaire d'entreprendre une estimation de l'incertitude des mesures ou "fiabilité des mesures" en utilisant l'approche ISO composant par composant si d'autres formes de données sont disponibles et utilisées pour estimer l'incertitude ou la fiabilité. Dans de nombreux cas, l'incertitude globale peut être déterminée par une étude inter-laboratoires collaborative par un certain nombre de laboratoires et de matrices en utilisant les protocoles IUPAC/ISO/AOAC INTERNATIONAL[3] ou ISO 5725[4].

RÉFÉRENCES

1. "Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement", ISO, Geneva, 1993.

2. EURACHEM/CITAC Guide Quantifying Uncertainty In Analytical Measurement (Second Edition), EURACHEM Secretariat, HAM, Berlin, 2000. Ce guide est disponible et librement téléchargeable à partir du site internet http://www.vtt.fi/ket/eurachem.

3. "Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method Performance Studies", ed. W. Horwitz, Pure Appl. Chem., 1995, 67, 331-343.

4. "Precision of Test Methods", Geneva, 1994, ISO 5725, Les éditions précédentes ont été publiées en 1981 and 1986.

Recommandations sur le taux de recouvrement

(Résolution OIV/OENO 392/2009)

"L'OIV recommande la procédure suivante en ce qui concerne les comptes-rendus relatifs à la taux de recouvrement de résultats analytiques.

- Les résultats analytiques doivent être corrigés, le cas échéant, sur la base d'un taux de recouvrement et qui doivent être signalée si tel est le cas.

- Si un résultat a été corrigé en fonction du taux de recouvrement, il convient de citer la méthode de calcul du taux de recouvrement. Le taux de recouvrement doit être indiqué dans la mesure du possible.

- Lors de l'établissement de dispositions pour des normes, il conviendra de préciser si le résultat obtenu à l'aide d'une méthode utilisée pour l'analyse dans le cadre de contrôles de conformité sera ou non exprimé avec correction en fonction du taux de recouvrement."

Annexe F

Méthodes Spécifiques pour l'Analyse du Sucre de Raisin (Mout de Raisin Concentrés Rectifiés)

Méthode OIV-MA-F1-01 Méthode Type IV

Conductivité

(OIV-OENO 419A-2011)

1. Principe

Mesure de la conductivité électrique d'une colonne de liquide, délimitée par deux électrodes de platine maintenues parallèles, constituant l'une des branches d'un pont de Wheatstone.

La conductivité varie avec la température. Elle est exprimée à 20 °C.

2. Réactifs

Utilisez seulement un produit chimique de qualité « réactif ».

2.1 Eau déminéralisée pour laboratoires de conductivité spécifique inférieure à 2 microsiemens par cm à 20 C, par exemple une eau de type II EN ISO 3696.

2.2 Solution de chlorure de potassium de référence.

Dissoudre 0,581 g de chlorure de potassium, KCl, préalablement séché jusqu'à masse constante à la température de 105 °C, dans de l'eau déminéralisée (point 2.1). Compléter à 1 litre avec de l'eau déminéralisée (point 2.1). Cette solution a une conductivité de 1 000 microsiemens par cm à 20 °C. Sa durée de conservation est limitée à 3 mois.

On peut utiliser une préparation achetée dans le commerce

3. Appareil

3.1 Conductimètre permettant des mesures de conductivité dans un domaine compris entre 1 et 1000 microsiemens par cm ($\mu S\ cm^{-1}$).

3.2 Bain d'eau permettant d'amener la température des échantillons à analyser à environ 20 C (20 ± 2 C).

4. Mode opératoire

4.1 Préparation de l'échantillon à analyser

Utiliser une solution dont la teneur en sucres totaux est de 25 ± 0,5 % (m/m) (25° Brix) : peser une masse égale à 2500/P et compléter à 100g avec l'eau (point 2.1), avec P = teneur pour 100 (m/m) en sucres totaux du moût concentré rectifié.

4.2 Détermination de la conductivité

Amener l'échantillon à analyser à 20 °C par immersion dans un bain d'eau. Contrôler la température à 0,1 °C près.

Rincer deux fois la cellule de mesure du conductimètre avec la solution à examiner.

Mesurer la conductivité exprimée en microsiemens par centimètre.

5. Expression des résultats

La conductivité est exprimée en microsiemens par centimètre (µS cm^{-1}) à 20 °C, sans décimale, pour la solution à 25 pour 100 (m/m) (25° Brix) du moût concentré rectifié.

5.1 Calculs

Si l'appareil n'est pas pourvu d'un compensateur de température, corriger la conductivité mesurée au moyen du tableau I. Si la température est inférieure à 20 °C, ajouter la correction; si la température est supérieure à 20 °C, soustraire la correction.

6. Caractéristiques de la méthode

Répétabilité (r)

r = *3 µS/cm;*

Reproductibilité (R)

R = *16 µS/cm*

TABLEAU I

Corrections de conductivité pour températures différentes de 20 °C en microsiemens cm^{-1}

Conductivité	Températures (ºC)									
	20,2 19,8	20,4 19,6	20,6 19,4	20,8 19,2	21,0 19,0	21,2 18,8	21,4 18,6	21,6 18,4	21,8 18,2	22,0([1]) 18,0([2])
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
50	0	0	1	1	1	1	1	2	2	2
100	0	1	1	2	2	3	3	3	4	4
150	1	1	2	3	3	4	5	5	6	7
200	1	2	3	3	4	5	6	7	8	9
250	1	2	3	4	6	7	8	9	10	11
300	1	3	4	5	7	8	9	11	12	13
350	1	3	5	6	8	9	11	12	14	15
400	2	3	5	7	9	11	12	14	16	18
450	2	3	6	8	10	12	14	16	18	20
500	2	4	7	9	11	13	15	18	20	22
550	2	5	7	10	12	14	17	19	22	24
600	3	5	8	11	13	16	18	21	24	26

([1]) Soustraire la correction.

([2]) Ajouter la correction.

Méthode OIV-MA-F1-02 Méthode Type IV

HYDROXYMETHYLFURFURAL (HMF) par la méthode par chromatographie liquide haute performance

(OIV-OENO 419A-2011)

1. Principe de la méthode

Méthode par chromatographie liquide haute performance

Séparation sur colonne en phase inversée et détermination à 280nm

2. Réactifs

2.1 Eau distillée pour usage en laboratoire de norme qualité EN ISO 3696

2.2 Méthanol, CH_3OH distillé ou de qualité HPLC. – Numéro CAS 67-59-1

2.3 Acide acétique, CH_3COOH (ρ_{20} = 1,05 g/ml). – Numéro CAS 64-19-7

2.4 Phase mobile: eau (point 2.1) méthanol (point 2.2) acide acétique (point 2.3) préalablement filtrés sur membrane (0,45 µm), (40: 9:1 v/v).

Cette phase mobile doit être préparée chaque jour et dégazée avant utilisation.

2.5. Solution de référence d'hydroxyméthylfurfural à 25 mg/l (m/v).

Placer, dans une fiole jaugée de 100 ml, 25 mg exactement pesés d'hydroxyméthylfurfural, $C_6H_3O_6$ et compléter au volume avec du

méthanol (point 2.2). Diluer cette solution au 1/10^{e} avec du méthanol (point 2.2) et la filtrer sur membrane (0,45 µm).

Cette solution, placée au réfrigérateur en flacon de verre brun, hermétiquement fermé, se conserve 2 à 3 mois.

(la concentration de la solution de référence est donnée à titre indicatif)

3. Matériel

3.1 Equipement

3.1.1 Chromatographie en phase liquide haute performance équipée :

– d'un injecteur à boucle de 5 ou 10 µl (à titre indicatif),

– d'un détecteur spectrophotomètre permettant des mesures à 280 nm,

– d'une colonne de silice greffée octadécyl (*par exemple: Bondapak C_{18} — Corasil, Waters Ass.*),

– d'un enregistreur, et si nécessaire, d'un intégrateur.

– Débit de la phase mobile : 1,5 ml/minute (à titre indicatif),.

3.1.2 Dispositif de filtration sur membrane (0,45 µm)

4. Mode opératoire

4.1 Préparation de l'échantillon

Utiliser la solution obtenue en diluant le moût concentré rectifié à 40 pour 100 (m/v) (introduire 200 g de moût concentré rectifié exactement pesé dans un ballon jaugé de 500 ml, compléter au trait avec de l'eau et homogénéiser), et la filtrer sur membrane (0,45 µm).

4.2 Détermination chromatographique

Injecter dans le chromatographe 5 (ou 10) µl de l'échantillon préparé comme indiqué au point 4.1 et 5 (ou 10) µl de solution de référence d'hydroxyméthylfurfural (point 3.2.5). Enregistrer le chromatogramme.

Le temps de rétention de l'hydroxyméthylfurfural est voisin de 6 - 7 minutes.

Le volume injecté et la séquence sont donnés à titre indicatif. On peut aussi procéder à la détermination chromatographique avec une courbe d'étalonnage

5. Expression des résultats

La teneur en hydroxyméthylfurfural des moûts concentrés rectifiés est exprimée en milligrammes par kilogramme de sucres totaux.

5.1 Mode de calcul

Soit C mg/l, la teneur en hydroxyméthylfurfural de la solution de moût concentré rectifié à 40 pour 100 (m/v).

Teneur en hydroxyméthylfurfural en milligrammes par kilogramme de sucres totaux:

250 * C/P

P = teneur pour 100 (m/m) en sucres totaux du moût concentré rectifié.

6. Caractéristiques de la méthode

Répétabilité (r)

r = 0.5 mg/kg sucres totaux

Reproductibilité (R)

R = 3.0 mg/kg sucres totaux

Méthode OIV-MA-F1-03 Méthode Type IV

Détermination du titre alcoométrique volumique acquis(TAV) des mouts concentrés (MC) et du sucre du raisin (MOUTS CONCENTRES RECTIFIES, MCR)

(OIV-OENO 419A-2011)

1. Introduction

Les moûts concentrés et le sucre de raisin (or MCR) sont des produits visqueux renfermant de faibles teneurs en alcool; la détermination de leur TAV acquis nécessite l'utilisation d'une méthode dont les performances (linéarité, répétabilité, reproductibilité, spécificité, limites de détection et de quantification) permettent de mesurer des teneurs en alcool inférieures à 1%vol.

2. Domaine d'application

La méthode s'applique aux moûts concentrés et au sucre de raisin.

3. Principe

Une masse connue de moût concentré (MC) ou de sucre de raisin est alcalinisée par une suspension d'hydroxyde de calcium puis distillée. Le titre alcoométrique volumique du distillat est déterminé par densimétrie électronique ou par densimétrie utilisant une balance hydrostatique.

4. Réactifs

- Suspension d'hydroxyde de calcium 2M de qualité analytique, obtenue en versant avec précaution un litre d'eau chaude (60 à 70°C) sur environ 120 g de chaux vive (CaO).

- Solution d'anti-mousse obtenue par dilution de 2 ml d'anti-mousse silicone concentrée dans 100 ml d'eau.

- Eau purifiée pour laboratoire de qualité EN ISO 3696.

5. Matériel

- Matériel courant de laboratoire dont une fiole de 200 ml.

- Balance analytique permettant d'effectuer des pesées à 0,1 g près.

- On peut employer tout type de distillation ou d'hydrodistillation pourvu qu'elle soit conforme au test suivant :

Distiller un mélange eau-éthanol d'un TAV de 10% cinq fois de suite. Le distillat doit avoir un TAV d'au moins 9,9%vol. Après la cinquième distillation, la perte d'alcool ne devra pas excéder 0,02% à chaque distillation.

- Densimètre électronique utilisant un résonateur de flexion ou un densimètre utilisant une balance hydrostatique.

6. Mode opératoire

- Homogénéiser l'échantillon par retournements successifs du flacon.
- Dans une fiole jaugée de 500 ml, peser environ 200 g de moût concentré ou de moût concentré rectifié (jusqu'à 0.1 g). Noter le poids (PE) de cet

échantillon test. Remplir jusqu'à la graduation avec de l'eau déminéralisée. Cette solution a un m/v en moût de 40%.

Obtention du distillat

- Transférer 250 ml de solution à 40% dans la fiole de distillation, ajouter dans le ballon environ 10ml de suspension d'hydroxyde de calcium, environ 5 ml de solution anti-mousse et, éventuellement, un régulateur d'ébullition (morceaux de porcelaine par exemple)
- Porter doucement à ébullition.
- Récupérer le distillat dans une fiole jaugée de 100 ml (environ 90 ml).
- Laisser le distillat revenir à température ambiante, puis compléter au trait de jauge avec de l'eau purifiée.

Mesure du TAV

Elle s'effectue par densimétrie électronique ou par balance hydrostatique.

7. Calcul

$$\text{Titre alcoométrique volumique acquis} = \frac{\text{TAV mesuré X 200 X MV}}{\text{PE}}$$

TAV mesuré = teneur en alcool donnée par le densimètre, en % vol
PE = prise d'essai de moût concentré ou sucre de raisin, en poids.
MV= densité de moût concentré ou de moût concentre rectifié en g/ml

Les résultats sont exprimés avec 2 chiffres après la virgule et arrondis à 0,05%vol près.

8. Caractéristiques de la méthode

8.1 Linéarité de la réponse

La linéarité du densimètre pour des faibles valeurs de TAV est un des paramètres critiques de cette méthode, une gamme étalon de 10 solutions

hydroalcooliques de TAV compris entre 0 et 5 %vol. a été préparée. Chaque solution a été analysée 3 fois.

La réponse du densimètre est parfaitement linéaire dans ce domaine comme le montre la droite d'étalonnage de la figure 1.

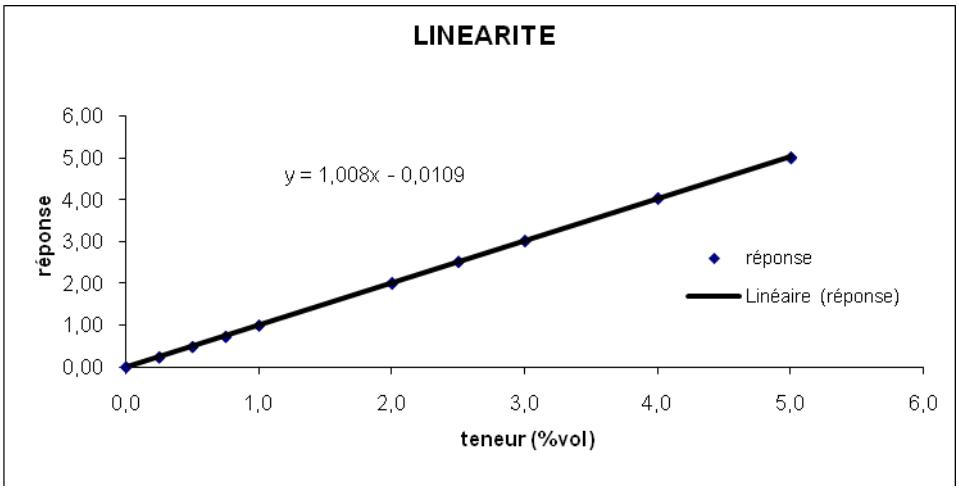


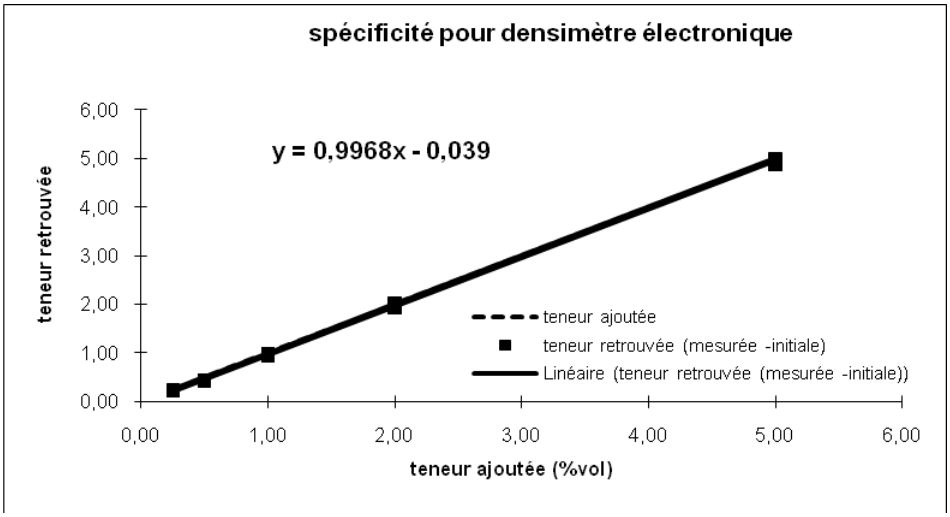
Figure 1 : Linéarité de la détermination du TAV par densimétrie électronique entre 0 et 5%vol.

8.2 Spécificité de la méthode

Le second point critique de cette méthode est la distillation de moûts visqueux renfermant de petites quantités d'alcool. Afin de vérifier la spécificité, des quantités connues d'éthanol (de 0,25 %vol à 5%vol) ont été ajoutées à des MC et du sucre de raisin. Les échantillons supplémentés ont été distillés dans les conditions précédemment définies puis les distillats ont été analysés par densimétrie électronique ou par balance hydrostatique.
Les résultats sont présentés dans le tableau 1, le taux de récupération est satisfaisant, il est compris entre 88 % et 99 %. Comme le montre la droite de la figure 2, la méthode est spécifique (pente voisine de 1, ordonnée à l'origine voisine de 0).

Echantillon	Teneur initiale (%vol.)	Teneur ajoutée (%vol.)	Teneur retrouvée (%vol.)	Taux de récupération (%)
MC 1	0,00	0,25	0,22	88
MC 1	0,00	1,00	0,98	98
sucre de raisin (MCR) 1	0,00	1,00	0,94	94
sucre de raisin (MCR) 1	0,00	2,00	1,97	99
MC 2	0,00	0,50	0,44	88
sucre de raisin (MCR) 2	0,00	5,00	4,94	99

Tableau 1 : Taux de récupération de la détermination du TAV acquis des MC et sucre de raisin



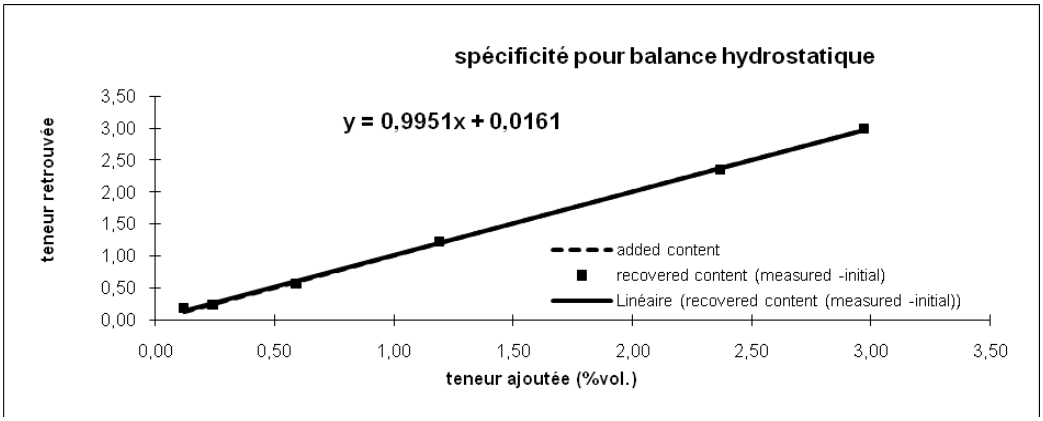


Figure 2 : Spécificité de la détermination du TAV acquis des MC et sucre de raisin

8.3 Répétabilité

La répétabilité de la méthode a été déterminée à partir de 20 échantillons de MC ou de sucre de raisin supplémentés ou non en alcool. Chaque échantillon a été analysé 3 fois de suite, de façon à être dans des conditions identiques. Les limites de répétabilité obtenues sont les suivantes :

Répétabilité pour la densimétrie électronique	valeur calculée
écart-type	0,009
CV ou RSD en %	0,9 %
limite r	0,024 %vol.
limite r en %	**3 %**
Répétabilité avec la balance hydrostatique	Valeur calculée
Ecart-type	0,013
CV ou RSD en %	1,7%
limite r	0,038 %vol.
limit r en %	**5,3%**

Tableau 2 : Répétabilité de la détermination du TAV acquis des MC et sucre de raisin

8.4 Reproductibilité

La reproductibilité des résultats est déterminée en analysant le même moût en double, à différentes dates pendant une période donnée. Les résultats sont donnés dans le tableau 3.

Reproductibilité pour la densimétrie électronique	valeur calculée
écart-type	0,043
CV ou RSD en %	3 %
limite R	0,12%vol
limite R en %	**9 %**
Reproductibilité avec la balance hydrostatique	Valeur calculée
Ecart-type	0,026
CV ou RSD en %	3,4%
limite R	0,076%vol.
limit R en %	**10,6%**

Tableau 3 - Reproductibilité de la détermination du TAV acquis des MC et sucre de raisin

8.5 Limites de détection et de quantification

Les limites de détection (LD) et de quantification (LQ) estimées à partir de l'étude de linéarité sont les suivantes :

LD = 0,01 %vol. **LQ = 0,05%vol.**

La limite de quantification a été vérifiée par l'analyse de moûts dont le TAV est à un niveau de concentration de 0,05%vol.

8.6 Incertitude

L'incertitude a été évaluée à partir de l'écart-type de reproductibilité, elle est de 0,10%vol.

Méthode OIV-MA-F1-04 Méthode Type IV

Saccharose (chromatographie liquide a haute performance)

(OIV-OENO 419A-2011)

1. Principe

Méthode de recherche et de dosage par chromatographie liquide haute performance. Le saccharose est séparé sur colonne de silice greffée alkylamine et détecté par réfractométrie. La quantification se fait par rapport à un étalon externe analysé dans les mêmes conditions.

Remarques : l'authenticité d'un moût ou d'un vin peut être contrôlée en appliquant méthode par RMN du deutérium décrite pour la détection de l'enrichissement des moûts, des moûts concentrés rectifiés et des vins.

Les conditions chromatographiques sont données à titre d'exemple.

2. Réactifs

2. 1 Eau distillée pour usage en laboratoire de norme qualité EN ISO 3696.

2. 2 Acétonitrile (CH_3 CN) de qualité HPLC -N° CAS 75-05-8

2.3 Saccharose Numéro CAS 57-50-1.

2.4 *Phase mobile :* acétonitrile-eau, (80:20 v/v) préalablement filtrée sur membrane (0,45 µm), (La composition de la phase mobile est donnée à titre indicatif.)

Cette phase mobile doit être dégazée avant utilisation.

2.5 Solution de référence : solution aqueuse de saccharose à 1,2 g/l. Filtrer cette solution sur une membrane (0,45 µm). (La concentration de la solution standard est donnée à titre indicatif.)

3. Matériel

3.1 *Chromatographe en phase liquide haute performance équipé*

1) d'un injecteur à boucle de 10 µl (à titre indicatif)

2) d'un détecteur, réfractomètre différentiel ou réfractomètre interféromètre;

3) d'une colonne de silice greffée alkylamine (25 mm de longueur et 4 mm de diamètre interne) (à titre indicatif)

4) d'une pré colonne remplie de la même phase) (à titre indicatif)

5) d'un dispositif d'isolation ou de thermostatisation (30 °C) de la pré colonne et des colonnes d'analyse

6) d'un enregistreur, éventuellement, d'un intégrateur;

7) débit de la phase mobile: 1 ml/min. (à titre indicatif)

3.1.2 Dispositif de filtration sur membrane (0,45 µm)

4. Mode opératoire

4.1 Préparation de l'échantillon
Utiliser la solution obtenue en diluant le moût concentré rectifié à 40 pour 100 (m/v) comme il est indiqué dans l'Annexe H «Acidité totale» en 5.1 et la filtrer sur membrane (0,45 µm).

4.2 Détermination chromatographique

Injecter successivement dans le chromatographe 10µl de la solution de référence et 10 µl de l'échantillon préparé comme indiqué en 4.1.

Répéter ces injections dans le même ordre.

Enregistrer le chromatogramme.

Le temps de rétention du saccharose est voisin de 10 minutes.

Le volume de ltention du saccharose est voisin de 10 minutes. On peut aussi procéder à la détermination chromatographique avec une courbe d'étalonnage.

5. Calculs

Utiliser pour le calcul la moyenne des deux réponses pour la solution de référence et pour l'échantillon.

Soit C g/l, la teneur en saccharose de la solution de moût concentré rectifié à 40 pour 100 (m/v).

Teneur en saccharose en grammes par kilogramme de moût concentré rectifié :

2,5 x C

6. Expression des résultats

La teneur en saccharose est exprimée en grammes par kilogramme avec une décimale.

7. Caractéristiques de la méthode

Répétabilité (r)

r = 1,1 g/kg moût

Méthode OIV-MA-F1-05 Méthode Type IV

Acidité totale

(OIV-OENO 419A-2011)

1. Définition

L'acidité totale d'un moût concentré rectifié 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

2.1. Titrage potentiométrique ou titrage en présence de bleu de bromothymol comme indicateur de fin de réaction par comparaison à un étalon de coloration.

3. Réactifs

3.1 Solutions tampons

3.1.1 pH 7,0:

Phosphate monopotassique KH_2PO_4: 107,3 g

Solution M d'hydroxyde de sodium (NaOH): 500 ml

Eau q.s.p.: 1 000ml.

3.1.2 pH 4,0 :

Solution 0,05 M de phtalate acide de potassium. Solution contenant

10,211 g/l de phtalate acide de potassium ($C_8H_5KO_4$), à 20 °C.

Les solutions tampons de référence du commerce détectables par le SI peuvent également être utilisées.

Par exemple: pH 1,679 ±0,01 at 25°C

pH 4,005 ±0,01 at 25°C

pH 7,000 ±0,01 at 25°C

3.2 Solution 0,1 M d'hydroxyde de sodium (NaOH).

3.3 Solution de bleu de bromothymol à 4 g/l.

Bleu de bromothymol ($C_{27}H_{28}Br_2O_5S$) …..... 4g

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) environ 7,5 ml
Eau q.s.p. ……. 1000 ml

4. Appareillage

4.1 Potentiomètre à échelle étalonnée en unités pH et électrodes.

A titre indicatif, 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. Une électrode combinée est le plus souvent employée, la conserver dans l'eau distillée.

4.2 Vases cylindriques de 100 ml de capacité.

5. Mode opératoire

5.1 Préparation de l'échantillon

Introduire 200 g de moût concentré rectifié exactement pesé dans un ballon jaugé de 500 ml. Compléter au trait avec de l'eau. Homogénéiser.

5.2 Titrage potentiométrique

5.2.1 Mise à zéro de l'appareil

La mise à zéro s'effectue avant toute mesure, en suivant les indications données pour l'appareil utilisé.

5.2.2 Étalonnage du pH mètre

Le pH-mètre doit être étalonné à 20° en utilisant des solutions tampons standard connectées au SI. Les valeurs de pH sélectionnées doivent comprendre une gamme de valeurs que l'on peut rencontrer dans les moûts. Si le pH-mètre utilisé n'est pas compatible avec l'étalonnage pour des valeurs suffisamment faibles, on pourra procéder à une vérification en utilisant une solution tampon standard reliée au SI et dont la valeur pH sera proche des valeurs rencontrées dans les moûts.

5.2.3 Méthode de mesure

Dans un vase cylindrique (4.4) placer un volume d'échantillon 50 ml, 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 (3.2) jusqu'à ce que le pH soit égal à 7 à 20 °C. L'addition de d'hydroxyde de sodium 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 du point de virage

Dans un vase cylindrique (4.4), placer 25 ml d'eau distillée bouillie, 1 ml de solution de bleu de bromothymol (3.3) et un volume de 50 ml préparé comme indiqué en 5.1. Ajouter la solution 0,1 M d'hydroxyde de sodium (3.2) jusqu'à obtention d'une coloration bleu-vert. Ajouter 5 ml de la solution tampon pH 7 (3.1).

5.3.2 Dosage

Dans un vase cylindrique (4.4), placer 30 ml d'eau distillée bouillie, 1ml de solution de bleu de bromothymol (3.3), un volume d'échantillon 50ml préparé comme indiqué en 5.1. Ajouter la solution 0,1M d'hydroxyde de sodium (3.2) jusqu'à obtention d'une coloration identique à celle obtenue à l'essai préalable (5.3.1). Soit n le nombre de millilitres de solution d'hydroxyde de sodium 0,1M versés.

6. Expression des résultats

6.1 Mode de calcul

Acidité totale exprimée en milliéquivalents par kilogramme de moût concentré rectifié:

$A = 5 \times n$

Acidité totale exprimée en milliéquivalents par kilogramme de sucres totaux :

$A = (500 \times n)/P$

P = teneur pour 100 (m/m) en sucres totaux.

Elle est exprimée avec 1 décimale.

7. Caractéristiques de la méthode

Répétabilité (r)

r = 0,4 meq /kg sucres totaux

Reproductibilité (R)

R = 2,4 meq /kg sucres totaux

Méthode OIV-MA-F1-06 Méthode Type IV

pH

(OIV-OENO 419A-2011)

1. Principe

Mesure de la différence de potentiel entre deux électrodes plongées dans le liquide étudié. 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. Réactifs

2.1 Solutions tampons:

2.1.1 Solution saturée de tartrate acide de potassium. Solution contenant au moins 5,7 g/l de tartrate acide de potassium ($C_4H_5KO_6$), à 20 °C. Cette solution peut se conserver 2 mois en présence de 0,1 g de thymol pour 200ml).

Rapport pH/température
3,57 à 20 °C
3,56 à 25 °C
3,55 à 30 °C

2.1.2 Solution 0,05 M de phtalate acide de potassium. Solution contenant 10,211 g/l de phtalate acide de potassium ($C_8H_5KO_4$), à 20 °C. (Durée maximale de conservation: 2 mois).

Rapport pH/température

3,999 à 15 °C

4,003 à 20 °C

4,008 à 25 °C

4,015 à 30 °C

2.1.3 Solution contenant :

Phosphate monopotassique, KH_2PO_4 …..... 3,402 g

Phosphate dipotassique, K_2HPO_4 …..... 4,354 g

Eau q.s.p. …..... 1 000 ml

(Durée maximale de conservation : 2 mois)

Rapport pH/température

6,90 à 15 °C

6,88 à 20 °C

6,86 à 25 °C

6,85 à 30 °C

Remarque : Les solutions tampons de référence du commerce détectables par le SI peuvent également 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

3. Appareils

3.1 pH mètre étalonné en unités pH permettant des mesures à 0,01 unité près au moins.

3.2 Électrodes:

3.2.1 Électrode de verre.

3.2.2 Électrode de référence au calomel-chlorure de potassium saturé.

3.2.3 Ou électrode combinée.

4. Mode opératoire

4.1 Préparation de l'échantillon à analyser

Diluer le moût concentré rectifié avec de l'eau pour obtenir une concentration de 25 ± 0,5 pour 100 (m/m) en sucres totaux (25° Brix). Si P est la teneur pour 100 (m/m) en sucres totaux du moût concentré rectifié, peser une masse égale à 2 500 P et compléter à 100 g avec de l'eau. L'eau utilisée doit avoir une conductivité inférieure à 2 microsiemens par centimètre.

4.2 Mise au zéro de l'appareil

La mise au zéro s'effectue avant toute mesure, en suivant les indications données pour l'appareil utilisé.

4.3 Étalonnage du pH mètre

Le pH-mètre doit être étalonné à 20° en utilisant des solutions tampons standard connectées au SI. Les valeurs de pH sélectionnées doivent comprendre une gamme de valeurs que l'on peut rencontrer dans les moûts. Si le pH-mètre utilisé n'est pas compatible avec l'étalonnage pour des valeurs suffisamment faibles, on pourra

procéder à une vérification en utilisant une solution tampon standard reliée au SI et dont la valeur pH sera proche des valeurs rencontrées dans les moûts.

4.4 Mesure

Plonger l'électrode dans l'échantillon analysé 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 échantillon.

Prendre comme résultat la moyenne arithmétique des deux déterminations.

5. Expression des résultats

Le pH de la solution à 25 pour 100 (m/m) (25 ° Brix) du moût concentré rectifié est exprimé avec 2 décimales.

6. Caractéristiques de la méthode

Répétabilité (r)

r = 0,07

Reproductibilité (R)

R = 0,07

Méthode OIV-MA-F1-07 Méthode Type IV

Dioxyde de soufre

(OIV-OENO 419A-2011)

1. Definitions

On appelle dioxyde de soufre, le dioxyde de soufre présent dans le moût ou le vin sous les formes suivantes: H_2SO_3, HSO_3 dont l'équilibre est fonction du pH et de la température:

$$H_2SO_3 \rightleftharpoons H^+ + HSO_3^-$$

H_2SO_3 représente le dioxyde de soufre moléculaire.

On appelle dioxyde de soufre total l'ensemble des différentes formes de dioxyde de soufre présentes dans le vin à l'état libre ou combiné à ses constituants.

2. Matériels

Le dioxyde de soufre total est extrait par entraînement à chaud (100 °C environ) du moût concentré rectifié préalablement dilué.

2.1 Réactifs

2.1.1 Acide phosphorique, 85 % (H_3PO_4) (ρ_{20} = 1,71 g/ml)

2.1.2 Solution de peroxyde d'hydrogène, 9,1 g H_2O_2/litre (3 volumes).

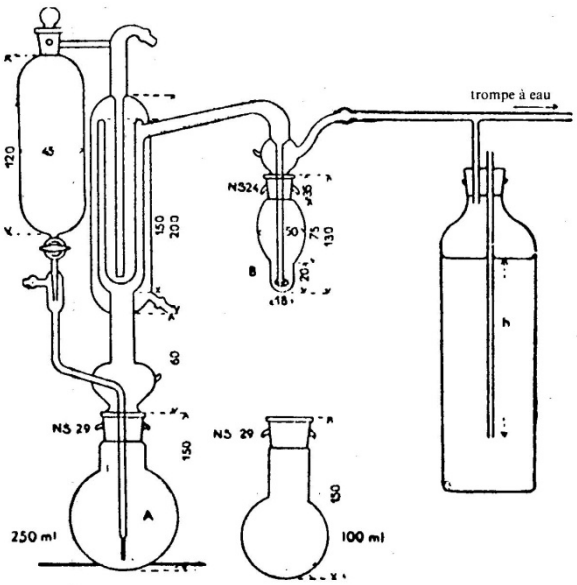
2.1.3 Réactifs indicateurs

100 mg

50 mg

100 ml

2.1. 1.



2.2

2.2.1 L'appareil utilisé doit être conforme au schéma ci-dessous, principalement en ce qui concerne le réfrigérant.

Figure 1

Les dimensions sont indiquées en millimètres. Les diamètres internes des 4 tubes concentriques qui constituent le réfrigérant sont: 45, 34, 27 et 10 mm.

Le tube d'amenée des gaz dans le barboteur B est terminé par une petite sphère de 1 cm de diamètre comportant sur son grand cercle horizontal 20 trous de 0,2 mm de diamètre. On peut également le terminer par une plaque de verre fritté assurant la formation d'un grand nombre de très petites bulles réalisant un bon contact des phases gazeuse et liquide.

Le débit gazeux qui doit parcourir l'appareil doit être de 40 l/h environ. Le flacon placé à la droite de l'appareil est destiné à limiter de 20 à 30 cm d'eau la dépression produite par la trompe à eau. Pour pouvoir régler cette dépression de manière que le débit soit correct, il y a avantage à placer un débitmètre à tube semi-capillaire entre le barboteur et le flacon.

2.2.2 Microburette.

3. Mode opératoire

3.1 Dans le cas des moûts concentrés rectifiés, utiliser la solution obtenue en diluant l'échantillon à analyser à 40 pour 100 (m/v) comme il est indiqué au chapitre «Acidité totale» en 5.1. Dans le ballon A de 250ml de l'appareil à entraînement, introduire 50 ml de cette solution et 5ml d'acide phosphorique (2.2.1). Mettre en place le ballon.

3.2 Placer dans le barboteur B 2 à 3 ml de solution de peroxyde d'hydrogène (2.2.2), la neutraliser avec la solution d'hydroxyde de sodium 0,01 M (2.2.4), porter le moût contenu dans le ballon A à l'ébullition au moyen d'une petite flamme de 4 à 5 cm de haut qui doit lécher directement le fond du ballon. Ne pas placer sous le ballon une toile métallique, mais le poser sur un disque percé d'un trou de 30 mm de diamètre. On évite ainsi la pyrogénation des matières extractives de l'échantillon sur les parois du ballon.

Maintenir l'ébullition pendant le passage du courant d'air (ou d'azote). En 15 minutes, le dioxyde de soufre total a été entraîné et oxydé. Doser l'acide sulfurique formé par la solution 0,01 M d'hydroxyde de sodium (2.2.4).

Soit n le nombre de millilitres versés.

4. Calcul

Dioxyde de soufre en milligrammes par kilo de sucres totaux (prise d'essai 50ml d'échantillon préparé) (3.1) :

$(1600 \times n)/P$

P = teneur pour 100 (m/m) en sucres totaux

5. Expression des résultats

Le total de dioxyde de soufre est exprimé en mg/kg de sucre total.

6. Caractéristiques de la méthode

Répétabilité (r)
Teneur < 50 mg/l (prise d'essai de 50 ml), r = 1x 250/P mg/kg de sucre total

Reproductibilité (R)
Teneur < 50 mg/l (prise d'essai de 50 ml), R= 9x250/P mg/kg de sucre total

Méthode OIV-MA-F1-08 Méthode Type IV

Caractéristiques chromatiques

(OIV-OENO 419A-2011)

1. Principe

Mesure de l'absorbance, à 425 nm sous 1 cm d'épaisseur, du moût concentré rectifié dont la concentration en sucres a été ramenée à 25 pour 100 (m/m) (25 ° Brix).

2. Appareils

2. 1. Spectrophotomètre permettant des mesures entre 300 et 700 nm.

2.2. Cuves de verre, de trajet optique égal à 1 cm.

2.3. Filtre à membrane de porosité 0,45 µm.

3. Mode opératoire

3.1 Préparation de l'échantillon

Utiliser la solution dont le titre en sucres est de 25 pour 100 (m/m) (25 ° Brix) préparée comme il est indiqué au chapitre «pH», en 4.1. La filtrer sur un filtre à membrane de porosité 0,45µm.

3.2 Détermination de l'absorbance

Régler l'absorbance zéro pour la longueur d'onde 425 nm sur une cuve de 1cm de trajet optique contenant de l'eau distillée.

Relever l'absorbance A à cette longueur d'onde, de la solution à 25 pour 100 de sucres (25 ° Brix) obtenue en 3.1, placée dans une cuve de 1cm de trajet optique.

4. Expression des résultats

L'absorbance à 425nm du moût concentré rectifié en solution à 25 pour 100 (m/m) de sucres (25 ° Brix) est exprimée avec 2 décimales.

Répétabilité (r)

r = *0,01 AU à 25° Brix*

Méthode OIV-MA-F1-09 Méthode type I

Les méthodes spécifiques pour l'analyse du sucre de raisin

(OIV-OENO 419B-2012)

ANNEXE A: CATIONS TOTAUX

1. PRINCIPE

La prise d'essai est traitée par un échangeur de cations fortement acide. Les cations sont échangés contre H^+. Ils sont exprimés par la différence entre l'acidité totale de l'effluent et celle de la prise d'essai.

2. APPAREILLAGE

2.1. Colonne de verre de 300 mm environ de longueur et de 10-11 mm de diamètre intérieur, munie d'un robinet.

2.2. pH-mètre gradué au moins en dixièmes d'unités pH.

2.3. 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

3.1. Échangeur de cations fortement acide, en forme H^+. Préalablement à son emploi, faire gonfler la résine par immersion dans de l'eau pendant une nuit.

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

3.3. Papier indicateur de pH.

3.4. L'eau utilisée doit être une eau purifiée pour laboratoires, avec une conductivité spécifique inférieure à 2 µS cm-1 à 20°C, par exemple une eau de type II EN ISO 3696.

4. MODE OPÉRATOIRE

Le pH-mètre doit être calibré selon la méthode OIV-MA-AS313-15

4.1. Préparation de l'échantillon

Utiliser la solution obtenue en diluant le moût concentré rectifié à 40 pour 100 (m/v). Introduire 200 g de moût concentré rectifié exactement pesé. Compléter au trait avec 500 mL d'eau. Homogénéiser.

4.2 Acidité totale du moût concentré rectifié

Titrer l'acidité du moût concentré sur 100 ml d'échantillon préparé en 4.1 par 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 l'échantillon constamment agité. Soit n1 mL le volume de solution 0,1 M d'hydroxyde de sodium versé.

4.3. Préparation de la colonne d'échangeur d'ions

Introduire dans la colonne environ 10 mL d'échangeur d'ions préalablement gonflé en forme H^+; rincer la colonne avec de l'eau distillée jusqu'à élimination de l'acidité que l'on contrôle avec le papier indicateur.

4.4. Échange d'ions

Faire passer à travers la colonne 100 mL de la solution de moût concentré rectifié, préparée comme indiqué au point 4.1, à raison de 1 goutte par seconde. Recueillir l'effluent dans un vase

cylindrique. Rincer la colonne avec 50 mL d'eau distillée. Titrer l'acidité de l'effluent (y compris l'eau de rinçage) par 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 l'échantillon constamment agité. Soit n2 mL le volume de solution 0,1 M d'hydroxyde de sodium versé.

5. EXPRESSION DES RÉSULTATS

Les cations totaux sont exprimés en milliéquivalents par kilogramme de sucres totaux avec 1 décimale.

5.1. Calculs

– Acidité totale du moût concentré rectifié en milliéquivalents par kilogramme : a = 2,5 n1

– Acidité de l'effluent exprimée en milliéquivalents par kilogramme de moût concentré rectifié:

E = 2,5 n2.

– Cations totaux en milliéquivalents par kilogramme de sucres totaux:

$$((n2 - n1) / (P)) * 250$$

P = teneur pour 100 (m/m) en sucres totaux.

5.2. Répétabilité (r)

r = 0,3

Méthode OIV-MA-F1-10 Méthode type IV

Les méthodes spécifiques pour l'analyse du sucre de raisin

(OIV-OENO 419B-2012)

ANNEXE D 1 : MÉTAUX LOURDS

D.1 DÉTERMINATION DE LA TENEUR EN PLOMB PAR ETAAS

Sont décrites en détail les étapes de la préparation des échantillons de sucre de raisin (moûts concentrés et moûts concentrés rectifié MCR) pour la détermination de la teneur en plomb.
L'instrumentation et les outils informatiques utilisés dans les laboratoires d'essai varient et évoluent.
En conséquence, des critères généraux pour l'étalonnage et le mesurage, sont spécifiés.

1. Avertissement

PRÉCAUTIONS DE SÉCURITÉ — Il convient, lors de la manipulation des acides, que les opérateurs protègent leurs mains et leurs yeux. La manipulation des acides doit être effectuée sous une hotte appropriée.

2. Domaine d'application

La présente méthode spécifie une méthode par spectrométrie d'absorption atomique électrothermique (ETAAS) pour la détermination de la teneur en plomb dans les moûts concentrés rectifiés entre 10 µg/kg et 200 µg/kg.

3. Références normatives

ISO 3696, Eau pour laboratoire à usage analytique — Spécification et méthodes d'essai

4. Principe

En spectrométrie d'absorption atomique électrothermique (ETAAS), un volume d'échantillon est introduit dans un tube de graphite qui peut être chauffé à plus de 2800°C. Lorsque la température est augmentée progressivement, les processus de séchage, de décomposition thermique de la matrice et de dissociation thermique en atomes libres ont lieu.. Pour la plupart des éléments, la hauteur du pic est proportionnelle à la concentration de l'élément dans la solution, bien que, dans un très grand nombre de cas, il soit préférable de travailler avec l'aire des pics.

5. Réactifs et solutions

Sauf indications contraires, utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue, ne contenant pas de plomb.

5.1 Eau déminéralisée, ultra pure avec une résistivité supérieure à 18 MΩ, conformément à la norme ISO 3696

5.2 Acide nitrique de concentration supérieure à 60 % (de qualité Normapur)

5.3 Dihydrogéno-phosphate d'ammonium $NH_4H_2PO_4$

5.4 Modificateur de matrice : $NH_4H_2PO_4$ à 6 %

Introduire 3 g de $NH_4H_2PO_4$ dans une fiole jaugée de 50 ml ; dissoudre et compléter avec de l'eau déminéralisée

5.5 Nitrate de magnésium $Mg(NO_3)_2$ à 6 molécules d'eau

5.6 Solution de nitrate de magnésium à 0,5 % (conserver cette solution au réfrigérateur)

Introduire 0,5 g de nitrate de magnésium dans une fiole jaugée de 100 ml ; dissoudre et compléter avec de l'eau déminéralisée. Conserver cette solution au réfrigérateur, 15 à 20 jours maximum

5.7 Solution(s) certifiée(s) mono élémentaire en plomb (à 1000 mg/l)

5.8 Solution de plomb à 10 mg/l

Placer 1 ml de la solution-mère (5.7) et 10 mL d'acide nitrique (5.2) dans une fiole de 100 ml; compléter au volume avec de l'eau ultra-pure (5.1)

5.9 Solution de plomb à 100 µg/l :

Placer 1 ml de la solution de plomb (5.8) dans une fiole de 100 ml ; ajouter 10 ml d'acide nitrique (5.2); compléter au volume avec de l'eau ultra-pure (5.1)

5.10 Triton X-100 (1% v/v)

5.11 Blanc analytique : acide nitrique à 10 %

Préparation de la gamme d'étalonnage

Le nombre des solutions d'étalonnage dépend de la fidélité requise. Au moins cinq étalons sont nécessaires. La fidélité ainsi que la justesse des résultats peuvent être vérifiées en analysant un échantillon de contrôle.

Il convient de souligner que la linéarité de la courbe d'étalonnage est souvent limitée.

Corriger les valeurs d'absorbance des solutions d'étalonnage en soustrayant la valeur d'absorbance du blanc d'étalonnage. Pour tracer une courbe d'étalonnage ou pour calculer la fonction d'étalonnage, utiliser les valeurs obtenues ainsi que les concentrations en analyte des solutions d'étalonnage.

En fonction du type d'appareil, il est possible de travailler avec un échantillonneur automatique permettant d'injecter directement des volumes prédéterminés à partir de la solution à 100 µg/l de façon à avoir une gamme d'étalonnage allant de 0 à 100 µg/l (ex :0 ; 10 ; 25 ; 50 ; 100 µg/l). Il est également possible de préparer séparément les solutions d'étalonnage

Note 1 : pour la détermination de teneur en plomb supérieure à 100 µg/L, un plus faible volume de prise d'essai pourra être utilisé.

6. Appareil et équipement

6.1 **Spectromètre d'absorption atomique** équipé d'un atomiseur électrothermique, d'une lampe à cathode creuse adaptée au plomb fonctionnant avec le courant recommandé pour la lampe par le fabricant de l'appareil, d'un dispositif de correction automatique du bruit de fond et d'un système informatique de lecture ou d'un enregistreur de graphique à grande vitesse. Une correction du bruit de fond doit être utilisée avec la spectrométrie d'absorption atomique électrothermique, la spécification technique minimale acceptable étant basée sur le deutérium. Une correction du bruit de fond Zeeman est préférable si le signal de bruit de fond est élevé. Pour augmenter le rapport signal de l'analyte à signal du bruit de fond, il est recommandé d'utiliser un tube de graphite avec une plate-forme pyrolytique

Note 2 : une longueur d'onde de 217,0 nm peut être utilisée pour le plomb, la sensibilité étant environ deux fois plus élevée que celle obtenue à 283,3 nm. Toutefois, le bruit étant plus élevé et le risque d'interférences plus grand, il sera nécessaire de travailler avec un système de correction du bruit de fond de type Zeeman

6.2 Balance de précision à 0,1 mg près

6.3 Pipettes graduées de classe A de 0,5 ml, 1 ml, 5 ml

6.4 Fioles jaugées de 50 ml et 100 ml de classe A

Note 3 : *le matériel en contact avec l'échantillon doit rester au moins pendant 12 heures, dans une solution d'acide nitrique (5.2) à une concentration de 10 %, et doit ensuite être rincé plusieurs fois avec de l'eau déminéralisée (5.1).*

7. Echantillonnage

Préparation de l'échantillon pour l'essai

Dans une fiole de 50 ml (6.4), introduire 10 g à 0,1 mg près d'échantillon ; 5 ml d'acide nitrique (5.2), 0,5 ml de triton X-100 (1% v/v) (5.10) et compléter à 50 ml avec de l'eau déminéralisée (5.1) et homogénéiser.

8. Mode opératoire

Régler les paramètres instrumentaux et aligner l'atomiseur électrothermique conformément aux instructions du fabricant pour tirer pleinement profit du système de correction du bruit de fond. Régler l'échantillonneur de la même manière. Déterminer les paramètres optimaux de l'atomiseur électrothermique pour le type d'atomiseur et le volume d'échantillon particuliers, comme recommandé par le fabricant de l'appareil, afin de couvrir l'étendue de mesure optimale. Régler la ligne de base de l'appareil à zéro. Vérifier la stabilité du zéro dans le système d'atomisation en exécutant le programme de température prédéfini pour la chauffe à blanc de l'atomiseur graphite. Les paramètres de four suivants peuvent être utilisés :

phase	température (°C)	palier (s)	montée (rampe) (°C/s)	type de gaz	débit du gaz (l/mn)	lecture
1	130	15	10	argon	0,2	non
2	350	5	25	argon	0,2	non
3	500	5	50	argon	0,2	non
4	750	10	100	argon	0,2	non
5	1900	3	0	argon	arrêt	oui
6	2500	3	0	argon	0,2	non
7	100	10	0	argon	0,2	non

A l'aide d'un échantillonneur automatique, injecter un volume fixe de solution. Ajouter un volume fixe de solution de modificateur et atomiser le blanc analytique (5.11), les solutions d'étalonnage et les solutions d'échantillon pour essai diluées dans l'ordre de réponse croissante de l'appareillage. Si la hauteur du pic (ou l'aire du pic) de la prise d'essai dépasse la valeur de la solution d'étalonnage ayant la concentration la plus élevée, un plus faible volume de prise d'essai doit être utilisé.

Etalonnage externe

Le programme suivant pour l'échantillonneur est donné à titre d'exemple (volume en µL) pour la détermination de la teneur en plomb par étalonnage externe.

	blanc	échantillon	étalon 1 10 µg/l	étalon 2 25 µg/l	étalon 3 50 µg/l	étalon 4 100 µg/l
blanc (HNO_3 10 %)	5,0					
diluant (HNO_3 10 %)			4,5	3,7	2,5	0
échantillon		5,0				
solution-mère (Pb 100 µg/L)			0,5	1,3	2,5	5,0
$NH_4H_2PO_4$ 6 %	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
$Mg(NO_3)_2$ 0,5 %	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
volume total	11,0	11,0	11,0	11,0	11,0	11,0

Atomiser chaque solution au moins deux fois et, si la reproductibilité est acceptable conformément au système de contrôle de la qualité utilisé dans le laboratoire, calculer la moyenne des lectures. Si nécessaire, remettre à zéro la ligne de base.

Technique des ajouts dosés

Il est également possible de travailler par ajouts dosés pour réduire l'effet des interférences non spectrales entre les étalons et les échantillons à condition que la courbe d'étalonnage soit linéaire dans la plage d'absorbance utilisée. Transférer des volumes identiques de l'échantillon pour essai dans trois récipients (par exemple, coupelles d'un échantillonneur automatique). Ajouter une faible quantité de solution étalon à deux des récipients, calculée de manière à obtenir une concentration dans les échantillons respectivement supérieure d'environ 100 % et 200 % à la concentration prévue dans l'échantillon d'origine. Ajouter la même quantité d'eau dans le troisième récipient. Mélanger soigneusement les solutions. Mesurer l'absorbance intégrée de chaque solution et tracer une courbe en reportant en abscisse la

concentration ajoutée et en ordonnée l'absorbance mesurée. Déterminer la concentration en analyte de la solution de blanc de réactifs ou de la solution d'essai à blanc de la même manière.

Le programme suivant pour l'échantillonneur est donné à titre d'exemple (volume en µl) pour la détermination de la teneur en plomb par la technique des ajouts dosés

	blanc	échantillon	ajout dosé 1 25 µg/l	ajout dosé 2 50 µg/l
blanc (HNO_3 10 %)	5,0			
diluant (HNO_3 10 %)	2,5	2,5	1,2	0
échantillon		5,0	5,0	5,0
solution-mère (Pb 100 µg/L)			1,3	2,5
$NH_4H_2PO_4$ 6 %	1,0	1,0	1,0	1,0
$Mg(NO_3)_2$ 0,5 %	2,0	2,0	2,0	2,0
volume total	10,5	10,5	10,5	10,5

9. Calcul

Le logiciel de l'appareil établit le graphe d'étalonnage (absorbance en fonction de la concentration en plomb en µg/l) ; il donne la concentration en plomb des échantillons. Tenir compte d'une éventuelle dilution le cas échéant

10. Paramètres de fidélité

Pour une concentration en plomb inférieure à 150 µg/kg :
r (Répétabilité) = 15 µg/kg
R (Reproducibilité)= 25 µg/kg

11. Bibliographie

13.1 Laboratoire SCL33. *Détermination du plomb dans le vin par spectrométrie d'absorption atomique (four-graphite)*. Manuel d'instructions, 2010.

13.2 Laboratoire SCL33. *Détermination du plomb dans les aliments solides par spectrométrie d'absorption atomique (four-graphite)*. Manuel d'instructions, 2010.

13.3 Rodriguez Garcia J.C. *Desarrollo de metodologías para la determinación de metales en miel mediante ETAAS y estudio quimiométrico de su empleo como bioindicador*. Universidad de Santiago de Compostela, Facultad de Ciencias, Campus de Lugo, 2006.

Méthode OIV-MA-F1-11 Méthode type IV

Les méthodes spécifiques pour l'analyse du sucre de raisin

(OIV-OENO 419B-2012)

ANNEXE D 2 : MÉTAUX LOURDS

Détermination de la teneur en plomb par spectrométrie de masse à plasma couplé inductivement (ICP-MS)

L'analyse du plomb dans les moûts de vin concentrés rectifiés peut également être réalisée en appliquant la **méthode OIV/OENO 344/2010** (Analyse multi-élémentaire par ICP-MS), avec la modification suivante ajoutée à la fin du point 5 (Préparation de l'échantillon) :

5. PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON

Cette méthode peut également être appliquée à l'analyse du plomb dans les moûts de vin concentrés rectifiés. À cet effet, une minéralisation préalable de l'échantillon est requise. Il est recommandé de pratiquer à une digestion des échantillons par micro-ondes à système fermé. La procédure suivante est fournie à titre d'exemple :

Ajouter 1 g de moût , 2 ml d'acide nitrique (3.4) et 8 ml d'eau (3.1) dans une cuve micro-ondes et appliquer le programme de digestion par micro-ondes suivant :

Phase	Palier	ºC	Temps de maintien
1	20 min	200	20 min

Une fois que les échantillons ont été digérés, les transférer dans un tube à essai en plastique de 50 ml (4.6), diluer avec de l'eau (3.1) jusqu'à 30 g et homogénéiser.

Méthode OIV-MA-F1-12 Méthode type II

Les méthodes spécifiques pour l'analyse du sucre de raisin

OIV-OENO 419C-2015

Dosage du méso-inositol, du scyllo-inositol et du saccharose

1. *PRINCIPE*

Le moût concentré rectifié (MCR) est principalement composé des sucres, des polyalcools et de l'eau contenus dans les raisins. Tous les autres composés organiques et minéraux sont éliminés au cours du processus de rectification.

Le méso-inositol, le scyllo-inositol et le saccharose sont dosés par chromatographie en phase gazeuse après la silanisation.

Le saccharose possiblement présent en faibles quantités dans le MCR est stable pour plusieurs mois, l'hydrolyse étant fortement ralentie par l'absence d'acidité due à l'élimination des acides organiques et minéraux lors du processus de rectification, par la teneur en eau extrêmement faible ainsi que par les teneurs élevées en fructose et glucose.

2. *RÉACTIFS*

2.1. Xylitol (n° CAS 87-99-0)

Étalon interne : solution aqueuse de concentration connue avec exactitude d'environ 10 g/L préparée sur le moment ;

2.2. Méso-inositol ($C_6H_{12}O_6$) (n° CAS 87-89-8) ;

2.3. Scyllo-inositol ($C_6H_{12}O_6$) (n° CAS 488-59-5) ;

2.4. Glucose ($C_6H_{12}O_6$), fructose ($C_6H_{12}O_6$), saccharose ($C_{12}H_{22}O_{11}$) ;

2.5. Bistriméthylsilyltrifluoroacétamide - BSTFA - ($C_8H_{18}F_3NOSi_2$) (n° CAS 25561-30-2)

Avertissement : ce produit est inflammable et dangereux. Les liquides et vapeurs inflammables peuvent provoquer des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves. Porter des vêtements/gants de protection. Protéger les yeux et le visage ;

2.6 Triméthylchlorosilane (C_3H_9ClSi) - (TMCS) - (n° CAS 75-77-4)

Avertissement : ce produit est inflammable et dangereux. Nocif pour la peau. Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves. Toxique en cas d'inhalation. Peut irriter les voies respiratoires. Maintenir éloigné des sources de chaleur/étincelles/flammes nues/surfaces chaudes. Ne pas fumer. Éviter toute inhalation des vapeurs. Porter des vêtements/gants de protection. Protéger les yeux et le visage ;

2.7 Pyridine p.a. (C_5H_5N) (n° CAS 110-86-1)

Avertissement : ce produit est inflammable et dangereux. Nocif en cas d'inhalation, de contact avec la peau ou d'ingestion ;

2.8 Éthanol absolu (C_2H_6O) (n° CAS 64-17-5)

Avertissement : ce produit est inflammable et dangereux. Le liquide et les vapeurs sont facilement inflammables. Maintenir éloigné des sources de chaleur/étincelles/flammes nues/surfaces chaudes. Ne pas fumer ;

2.9 Eau de type 1 conforme à la norme ISO 3696 ou eau déionisée d'une résistivité ≥ 18 MΩ cm ;

2.10 Le réactif de silanisation peut également être trouvé prêt à l'emploi sous forme de kit (par ex. HMDS+TMCS+Pyridine 3:1:9 Supelco cod. 33038) ;

2.11 Gaz techniques : azote, hydrogène, hélium et air pour le chromatographe en phase gazeuse et pour les phases de déshydratation.

3. MATÉRIEL ET APPAREILLAGE

3.1. Chromatographe en phase gazeuse

3.2. Colonne capillaire capable de garantir une efficacité minimale de 250 000 plaques/colonne pour le saccharose à 1 g/L.

Par exemple, OV-1 (25 m x 0,30 mm x 0,15 µm) ou DB-5 (60 m x 0,25 mm x 0,10 µm).

Conditions opératoires (à titre d'exemple) :

– gaz vecteur : hydrogène ou hélium pur pour chromatographie en phase gazeuse,

Hydrogène - Avertissement : il s'agit d'un gaz extrêmement inflammable. Stocker dans un conteneur placé dans un endroit bien aéré et maintenir éloigné de toute flamme ou étincelle. Ne pas fumer. Éviter l'accumulation de charges électrostatiques.

- débit du gaz vecteur : 2 mL/min environ,
- température de l'injecteur : 250 °C,
- température du détecteur à ionisation de flamme (FID) : 300 °C,
- programmation de température : 1 minute à 160 °C, 4 °C/minute jusqu'à 260 °C, isotherme à 260 °C pendant 15 minutes,
- rapport de dissociation : 1 à 20 environ,
- gaz auxiliaires : hydrogène pur et air pour chromatographie en phase gazeuse.

3.3. Intégrateur

3.4. Seringue micrométrique 10 µL

3.5. Micropipettes de 10, 100, 400 et 1000 µL

3.6. Flacons de 2 mL avec un bouchon en téflon

3.7. Étuve

3.8. Balance technique, balance analytique capable de garantir une exactitude de ± 1 mg

3.9. Fioles jaugées de 50 et 100 mL

3.10 Séchoir

4. MODE OPÉRATOIRE

4.1. Préparation de l'échantillon

Dans une fiole de 50 mL, peser une quantité « p » de moût concentré rectifié située entre 4,9 et 5,1 g, en notant la masse de la substance avec une précision de ±0,1 mg.

Puis additionner 1 mL de solution-étalon de xylitol (2.1) et mettre à niveau avec de l'eau (2.9).

4.2. Déshydratation de l'échantillon

Après homogénéisation, prélever 100 µL de solution et l'introduire dans un flacon (3.6) et la laisser sécher dans un léger courant d'azote.

Il est possible d'additionner 100 µL d'éthanol absolu (2.8) afin de faciliter l'évaporation.

Remarque 1 : si une dose de saccharose précise est souhaitée, la solution diluée doit être préparée juste avant la silanisation afin de limiter l'hydrolyse du saccharose dans la solution aqueuse diluée.

Remarque 2 : les mesures successives de la teneur en saccharose doivent être réalisées sur des solutions diluées préparées systématiquement avant chaque silanisation.

4.3. Dérivatisation

Dissoudre soigneusement le résidu dans 100 µL de pyridine (2.7), ajouter 100 µL de bistriméthylsilyltrifluoroacétamide (2.5) et 10 µL de triméthylchlorosilane (2.6). Fermer le flacon avec le bouchon de téflon et placer en étuve à 70 °C pendant 70 minutes.

Extraire les flacons bouchés de l'étuve et laisser refroidir dans un séchoir, à l'obscurité et à température ambiante, pendant une heure avant injection dans le chromatographe en phase gazeuse.

La substance silanisée conservée dans les flacons bouchés et maintenue à l'obscurité et à température ambiante est stable pour trois jours.

Remarque 3 : *en cas d'utilisation du kit de silanisation, utiliser 400 µL de réactif pour chaque 100 µL d'échantillon dilué et déshydraté conformément au paragraphe 4.1.*

Remarque 4 : la silanisation est considérée comme atteinte si la solution se présente en une seule phase limpide ou laisse un léger résidu blanc. Aucun résidu foncé ne devrait être présent, car cela indiquerait un excès de sucres non dérivés ou une substance de silanisation âgée.

Remarque 5 : en cas de présence d'une suspension blanche, attendre jusqu'à ce que la matière solide se dépose au fond de la fiole sans centrifugation.

4.4. Analyse chromatographique en phase gazeuse

Prélever 1 µL avec une seringue (3.4) et injecter dans le chromatographe avec le rapport de dissociation susmentionné.

Le chromatogramme ne doit pas présenter une superposition des pics (signe d'une silanisation incorrecte), mais des pics caractéristiques similaires à ceux illustrés dans les figures jointes (fig.9-fig.12).

4.5. Critères d'intégration des pics

Intégrer les pics chromatographiques en phase gazeuse par rapport à ligne de base. En cas de pics non parfaitement définis, tracer la ligne de base à partir des vallées les plus profondes qui délimitent le pic en question. Tracer une ligne verticale vers le bas à partir de la vallée des pics jusqu'à la ligne de base afin d'identifier l'aire du pic.

Ne pas utiliser la méthode vallée à vallée.

Un exemple d'application de ces critères est fourni dans la figure 10 pour l'étalon interne, dans la figure 11 pour les inositols et dans la figure 12 pour le saccharose.

Remarque 6 : si une dose de saccharose précise est souhaitée, il s'avère important de respecter les critères d'intégration indiqués au paragraphe 4.4 et présentés dans la figure 12.

5. CALCULS

5.1. Calcul des facteurs de réponse

Note : Une courbe d'étalonnage peut être utilisée en alternative au calcul des facteurs de réponse.

5.1.1 Préparer une solution contenant :

- 60 g/L de glucose,
- 60 g/L de fructose
- 1 g/L de méso-inositol,
- 1 g/L de saccharose,

peser 60 g de glucose et 60 g de fructose avec une fidélité de ± 0,1 g, puis 1 g de méso-inositol et 1 g de saccharose avec une précision de ± 0,1 mg et porter enfin le volume à 1 L avec de l'eau.

5.1.2 Silanisation de la solution de référence

Réaliser les opérations décrites au paragraphe 4.1 en commençant avec 5 mL de cette solution au lieu des 5 g de MCR

Prélever 5 mL de cette solution et procéder conformément au paragraphe 4.

5.1.3 Facteurs de réponse chromatographique en phase gazeuse

À partir du chromatogramme obtenu, calculer les facteurs de réponse du méso-inositol et du saccharose par rapport au xylitol.

Pour le scyllo-inositol, dont le temps de rétention est compris entre le dernier pic des formes anomériques du glucose et celui du méso-inositol (voir figure 11), utiliser le même facteur de réponse que celui du méso-inositol.

Où : $A_{méso\text{-}inositol}$ = aire du pic de méso-inositol ; $A_{saccharose}$ = aire du pic de saccharose ; A_{iei}= aire du pic de l'étalon interne ; $C_{méso\text{-}inositol}$ = concentration du méso-inositol en mg/L ; $C_{saccharose}$ = concentration du saccharose en mg/L ; C_{ei}= concentration de l'étalon interne en mg/L, résultant en la formule suivante :

$$FR_{méso-inositol} = \frac{A_{méso-inositol}}{A_{ei}} \times \frac{C_{ei}}{C_{méso-inositol}}$$

$$FR_{saccharose} = \frac{A_{saccharose}}{A_{ei}} \times \frac{C_{ei}}{C_{saccharose}}$$

La solution pour le calcul des facteurs de réponse doit être préparée et analysée le même jour (voir remarque 1 au paragraphe 4.1).

5.2. Expression des résultats

Le méso-inositol, le scyllo-inositol et le saccharose sont exprimés en milligrammes par kilogrammes de sucres totaux (mg/kg ST), avec au moins deux chiffres significatifs et sans décimale.

5.2.1 Concentrations exprimées en mg/L pour la solution de MCR à 10 % (m/v) (4.1) :

$$C_{méso-inositol}\left(\frac{mg}{l}\right) = \frac{C_{ei}}{FR_{méso-inositol}} \times \frac{A_{méso-inositol}}{A_{ei}}$$

$$C_{saccharose}\left(\frac{mg}{l}\right) = \frac{C_{ei}}{FR_{saccharose}} \times \frac{A_{saccharose}}{A_{ei}}$$

5.2.2 Concentrations exprimées en mg/kg de sucres totaux (mg/kg ST) pour le méso-inositol, le scyllo-inositol et le saccharose dans le MCR.

Avec « i » correspondant à l'un ou l'autre des trois composés :

$$CONC_i \left(\frac{mg}{kg\ ST}\right) = C_i \times \frac{5000}{p \times G}$$

Où « p » est le poids en g du MCR et « G » la teneur en sucres du MCR exprimée en °Brix [o % (m/m) of sucrose]. La teneur en sucres de l'échantillon de MCR doit être mesurée en suivant la méthode OIV-MA-AS2-02.

6. *CARACTÉRISTIQUES DE LA MÉTHODE*

6.1. Points critiques

Cette méthode se rapporte à l'analyse des sucres et des polyalcools présents en quantités extrêmement faibles dans une matrice de glucose et fructose en concentrations très élevées. Il s'avère donc nécessaire de contrôler la capacité de la méthode à fournir des réponses linéaires dans l'intervalle de concentration proposé et avec une exactitude suffisante par rapport aux valeurs connues.

D'autre part, la méthode permet l'analyse chromatographique en phase gazeuse des substances silanisées obtenues par dérivation des sucres. Ces composés sont sensibles à l'humidité et tendent à se détériorer avec le temps. Il s'avère donc important de contrôler le respect des instructions en termes de conservation et de manipulation de ces composés.

Enfin, le saccharose est sujet à une hydrolyse en raison de la quantité d'eau résiduelle contenue dans le MCR (entre 30 et 45 %). Néanmoins, la faible acidité de la matrice et la concentration élevée en glucose et fructose ralentit le processus d'hydrolyse et permet de procéder à des mesures exactes. Il s'avère donc important de contrôler que les temps d'analyse soient rapides par rapport au processus d'hydrolyse afin de permettre de procéder à des mesures répétées du saccharose.

6.2. Linéarité

Une série de six échantillons synthétiques ont été préparés (blanc compris), contenant une matrice de glucose et de fructose obtenue en

pesant des quantités similaires des deux sucres par rapport à une teneur en sucres totaux de 60 % (m/m) dans le MCR initial.

Des quantités précises et croissantes de méso-inositol et de saccharose ont été additionnées *à cinq de ces échantillons synthétiques afin d'atteindre les concentrations indiquées dans le tableau suivant :*

concentration additionnée		
n°	méso-inositol	saccharose
	(mg/kg ST)	(mg/kg ST)
1	0 (blanc)	0 (blanc)
2	214,7	427,3
3	420,0	857,7
4	840,2	1675,8
5	1727,0	3338,0
6	2514,0	6719,0

Les échantillons ont été ensuite dilués (4.1), la solution diluée déshydratée (4.2), silanisée (4.3) et analysée par CPG (4.4 et 4.5).

Les échantillons ont été ensuite silanisés et analysés par CPG. Les résultats ont été contrôlés en termes de linéarité ; le graphique suivant montre le rapport entre les aires des pics de méso-inositol et celles de l'étalon interne ($A_{méso}/A_{ei}$), ainsi que le rapport entre les concentrations (en mg/L) en méso-inositol et celles de l'étalon interne en ($C_{méso}/C_{ei}$). L'analyse CPG a été réalisée en double, les données présentées ci-après correspondant à la moyenne des deux valeurs.

Le même traitement a été appliqué au saccharose, avec pour résultat le graphique correspondant.

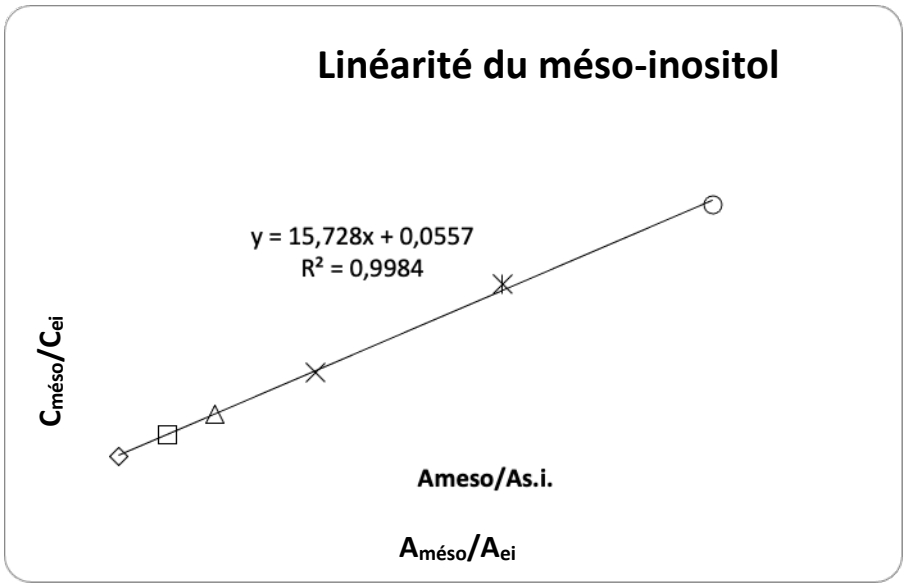


Fig 1 : Linéarité du méso-inositol

La linéarité du méso-inositol est hautement satisfaisante (R>0,998) sur l'ensemble de l'intervalle de concentration étudié.

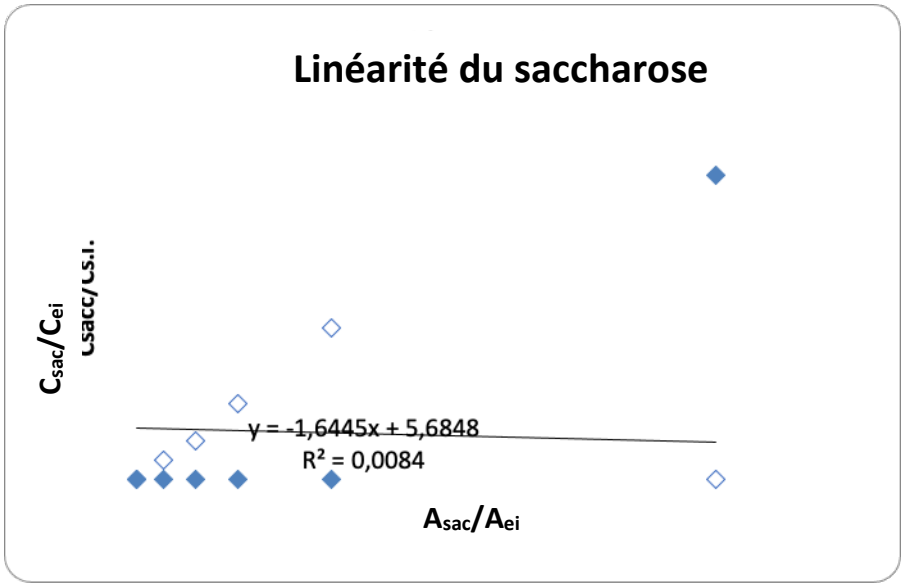


Fig 2: Linéarité du saccharose

Dans le cas du saccharose, la relation linéaire supposée sur l'ensemble de l'intervalle de concentration étudié ne s'est pas traduite par une corrélation satisfaisante (R = 0,967) ; cependant, la corrélation devient comparable à celle obtenue pour le méso-inositol (R > 0,997) si l'on restreint le champ de linéarité à l'échantillon synthétique nº 5.

Les facteurs de réponse suivants ont été obtenus en suivant les instructions du paragraphe 5.1 :

FR rel. méso-inositol / e.i. de xylitol	FR rel. saccharose / e.i. de xylitol
1,04 ± 0,03 (moyenne ± σ ; n = 4)	0,36 ± 0,06 (moyenne ± σ ; n = 4)

6.3 Spécificité

La relation entre le méso-inositol additionné et celui déterminé par CPG est linéaire sur l'ensemble de l'intervalle de mesure étudié, et la pente de la droite est très proche de un et l'intersection est très proche de 0.

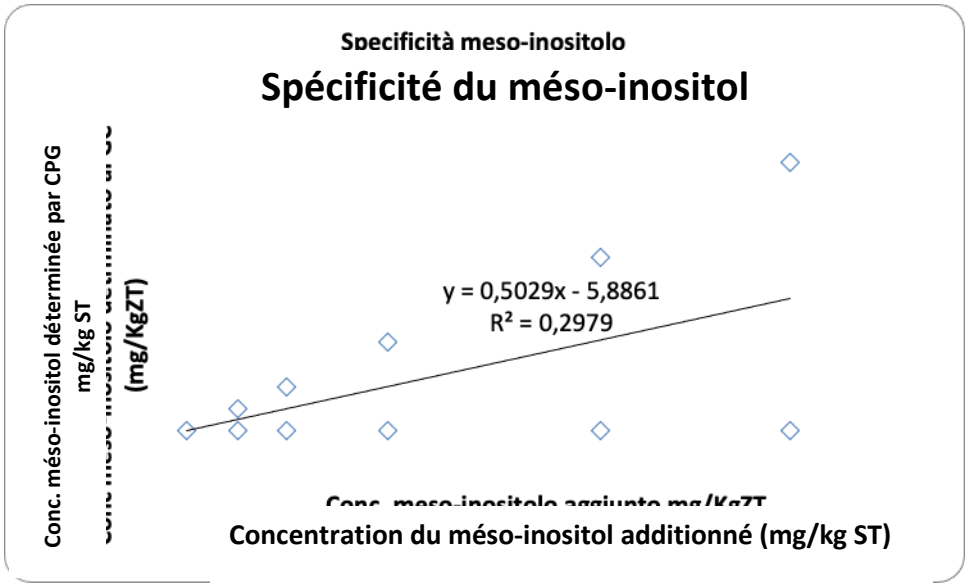


Fig 3 : Spécificité du méso-inositol

De même, le taux de recouvrement est satisfaisant, entre 95 et 105 %, comme indiqué dans le tableau suivant :

$C_{méso}$ additionnée (mg/kg ST)	$C_{méso}$ déterminée par CPG ± σ (n = 2) (mg/kg ST)	Recouvrement (%)
0	0	-
214,7	213 ± 2	99 %
420,0	419 ± 3	100 %
840,2	852 ± 20	102 %
1727,0	1668 ± 214	100 %
2514,0	2587 ± 36	99 %

En ce qui se réfère à la spécificité du saccharose, les concentrations obtenues à partir du calcul du saccharose additionné et celles déterminées par CPG concordent et présentent une relation linéaire, avec une pente de un et une intersection proche de zéro (à condition cependant de restreindre davantage l'intervalle de concentration par rapport à celui objet de l'étude).

Le graphique suivant montre que la relation linéaire ne s'étend pas jusqu'à la dernière concentration s'élevant à environ 6700 mg/kg ST.

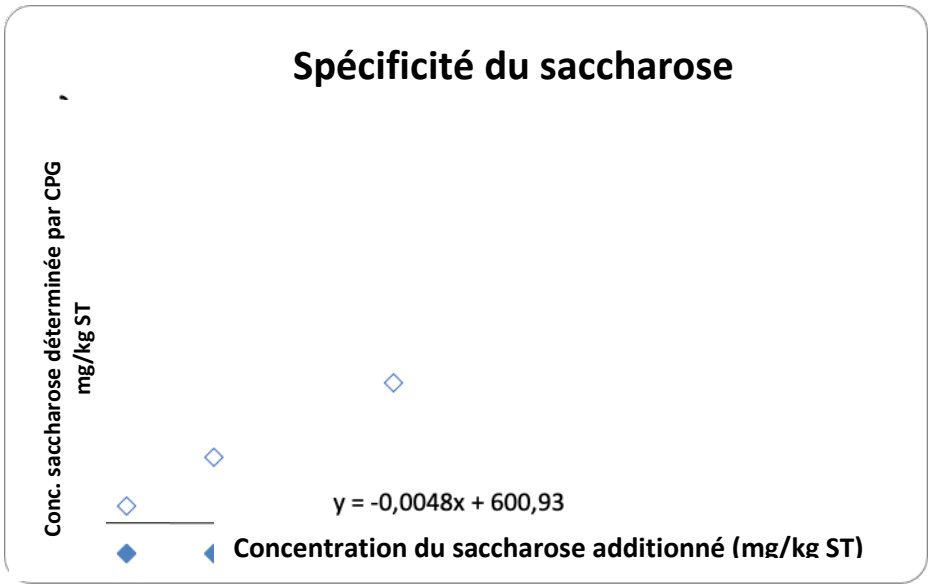


Fig 4 : Spécificité du saccharose

De même, le taux de recouvrement est satisfaisant, entre 90 et 110 %, comme indiqué dans le tableau suiv*ant :*

$C_{saccharose}$ additionnée (mg/kg ST)	$C_{saccharose}$ déterminée par CPG ±σ (n = 2) (mg/kg ST)	Recouvrement (%)
0	0	-
427,3	423 ± 16	99 %
857,7	913 ± 37	107 %
1675,8	1852 ± 344	111 %
3338,0	3297 ± 284	99 %

6719,0	*9220 ± 19*	*137 %*

6.3 Stabilité du saccharose dans le moût concentré rectifié

Un échantillon de MCR additionné de saccharose a été conservé à température ambiante et analysé à intervalles temporels réguliers afin d'observer l'incidence du phénomène d'hydrolyse du saccharose dans le MCR.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

	t = 0 jour	t = 9 jours	t = 53 jours
Méso-inositol (mg/kg ST)	2227	2100	2052
Scyllo-inositol (mg/kg ST)	424	430	394
Saccharose (mg/kg ST)	4631	5108	4969

Ni le méso-inositol, ni le scyllo-inositol, ni le saccharose ne montrent de variations de concentration significatives par rapport à la valeur initiale jusqu'à 53 jours après la préparation de l'échantillon.

Cela est parfaitement illustré au sein du graphique suivant :

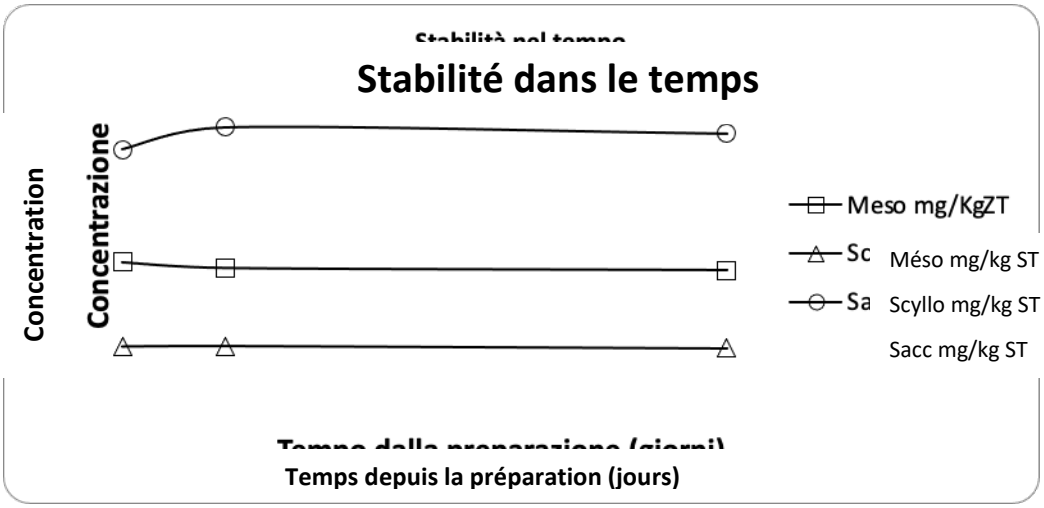


Fig 5 : Stabilité dans le temps

6.4 Stabilité de la substance silanisée

La substance silanisée obtenue conformément aux indications du paragraphe 4.2 a été conservée dans les conditions qui y sont décrites. Elle a ensuite été analysée par chromatographie en phase gazeuse à intervalles de 24 heures en suivant la procédure indiquée aux paragraphes 4.3 et suivants.

Les résultats sont indiqués dans le tableau suivant :

	t = 0 moyenne ± SD (n=3)	t = 24 h moyenne ± SD (n=3)	t = 48 h moyenne ± SD (n=3)	t = 72 h moyenne ± SD (n=3)	t = 96 h moyenne ± SD (n=3)
Méso-inositol (mg/kg ST)	2424 ± 109	2347 ± 44	2358 ± 17	2453 ± 39	2478 ± 15
Scyllo-inositol (mg/kg ST)	261 ± 7	254 ± 2	256 ± 4	257 ± 3	264 ± 1
Saccharose (mg/kg ST)	6233 ± 971	6500 ± 200	6633 ± 58	6733 ± 321	6600 ± 436

Il n'existe aucune différence significative entre les résultats obtenus pour le même échantillon de substance silanisée jusqu'à 4 jours après la silanisation, en adoptant les mesures de conservation décrites au paragraphe 4.2.

Cela est parfaitement illustré au sein des graphiques suivants :

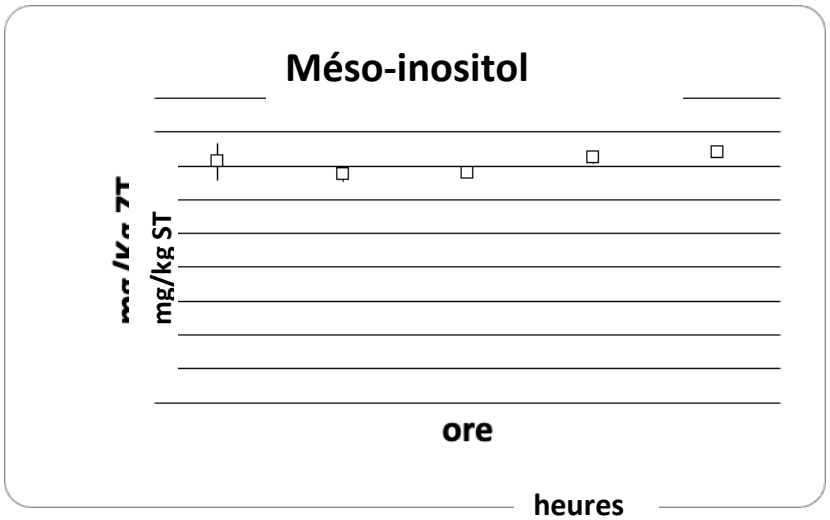


Fig 6 : stabilité du méso-inositol

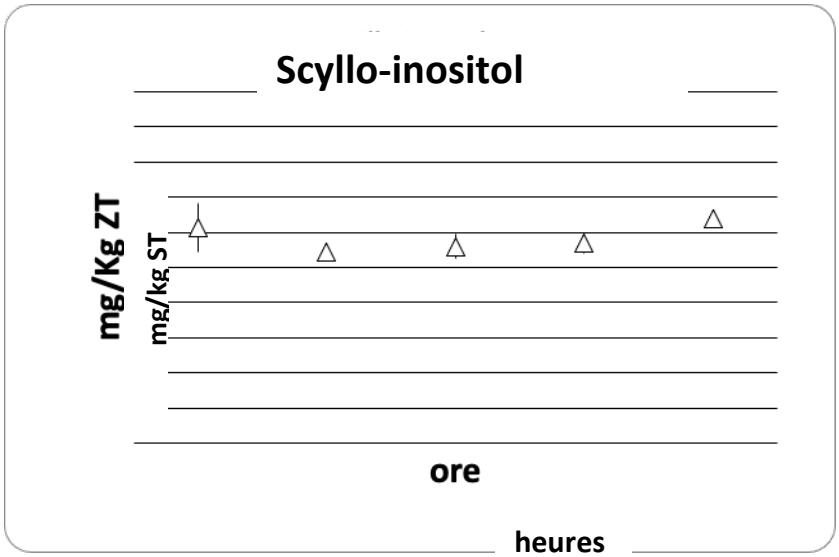


Fig 7 : stabilité du Scyllo-inositol

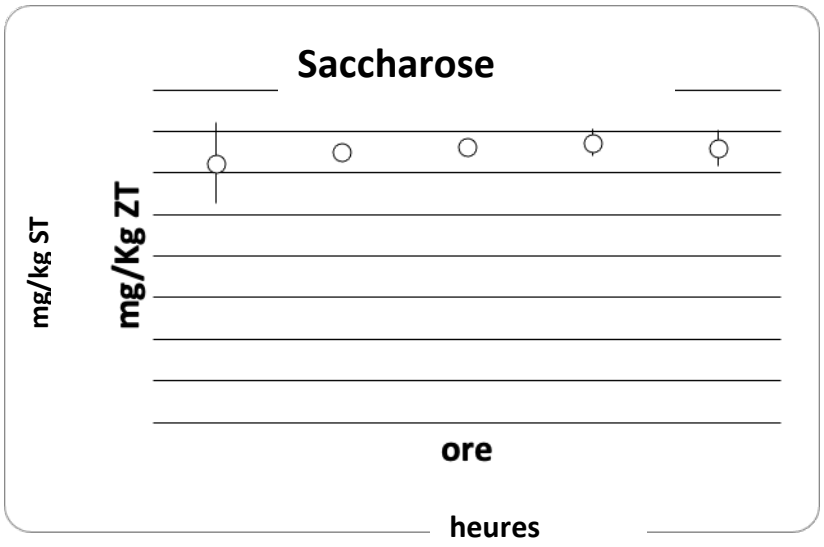


Fig 8 : stabilité du Saccharose

6.6 Fidélité

Paramètres de fidélité obtenus au cours de l'essai interlaboratoires conduit en avril 2014 entre 8 laboratoires italiens. Le programme de comparaison entre laboratoires a été conduit avec un échantillon supplémentaire de saccharose d'une concentration de 1 g de saccharose pour 1 kg de MCR.

	saccharose	méso-inositol	scyllo-inositol
Nombre de laboratoires participants	8	8	8
Nombre de résultats d'essais valides	23	23	23
Valeurs moyennes (mg/kg ST échantillon)	1665	954	145
Répétabilité			
Écart type de répétabilité (S_r)	78	52	11
Écart type de répétabilité relative (%RSD_r)	4,7	5,4	7,3
Limite de répétabilité (r)	219	146	29
HORRAT r = RSD_r / RSD(R) Horwitz	0,9	1,0	1,0

Reproductibilité			
Écart type de reproductibilité (SR)	122	76	19
Écart type de reproductibilité relative (%RSD_R)	7,4	8,0	13
Limite de reproductibilité (R)	343	213	55
RSD(R) Horwitz %	5,2	5,7	7,6
HORRAT R = RSD_R / RSD(R) Horwitz	1,4	1,4	1,8
S_r/S_R	0,64	0,68	0,58

7. BIBLIOGRAPHIE

7.1 Versini G., Dalla Serra A., et Margheri G. (1984). *Polialcooli e zuccheri minori nei mosti concentrati rettificati. Possibili parametri di genuinità?* Vignevini, 11(3), 41-47

7.2 Monetti A., Versini G., Dalpiaz G. et Raniero F. (1996). *Sugar adulterations control in concentrated rectified grape musts by finite mixture distribution analysis of the myo-inositol and scyllo-insitol content and the D/H methyl ratio of fermentative ethanol*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44-8: 2194-2210.

8. *FIGURES*

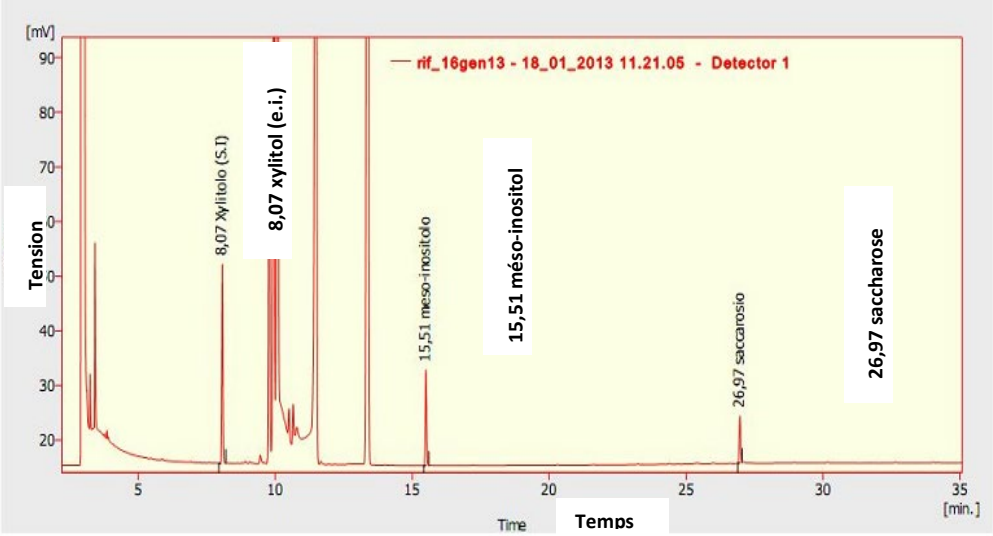


Fig.9 Chromatogramme de la solution de référence pour le calcul des facteurs de réponse

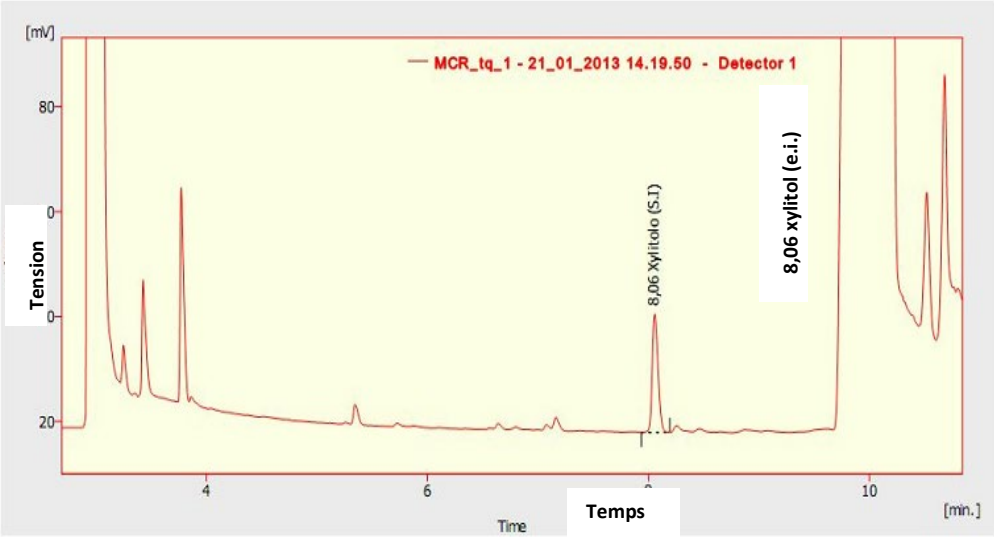


Fig. 10 Chromatogramme d'un échantillon de MCR - Zone « étalon interne »

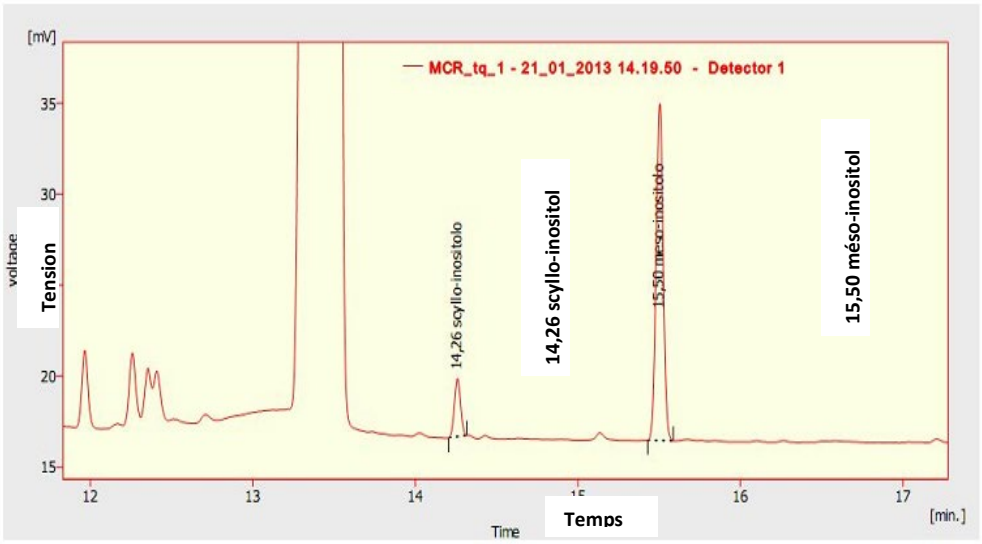


Fig. 11 Chromatogramme d'un échantillon de MCR - Zone « Inositol »

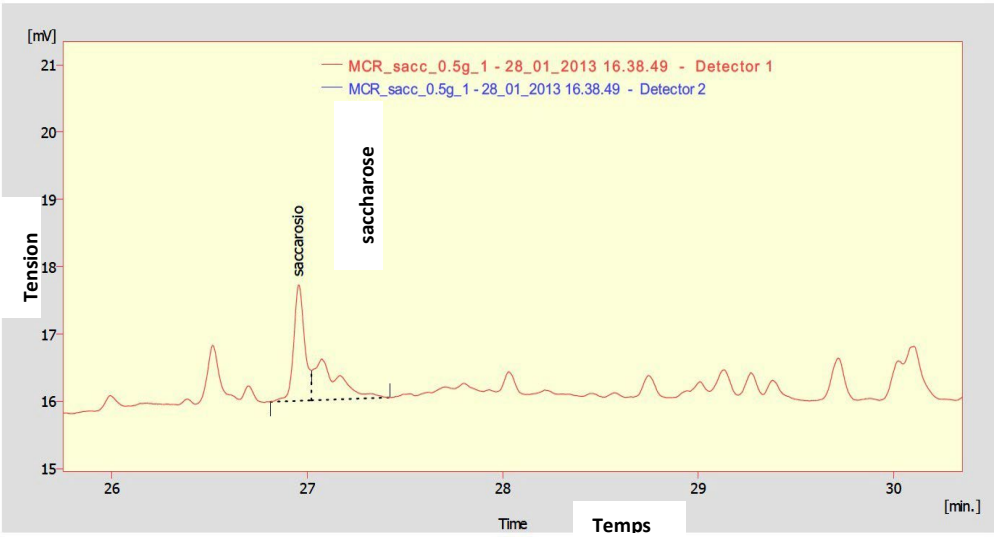


Fig. 12 Chromatogramme d'un échantillon de MCR - avec addition de 0,5 g/kg de saccharose

Méthode OIV-MA-F1-13 Méthode type II

Les méthodes spécifiques pour l'analyse du sucre de raisin

OIV-OENO 419D-2015

Indice de Folin-Ciocalteu

1. DÉFINITION

L'indice de Folin-Ciocalteu (IFC) est le résultat obtenu par application de la méthode décrite ci-dessous.

Cette méthode s'applique aux moûts concentrés rectifiés (MCR).

2. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Tous les composés phénoliques des MCR sont oxydés par le réactif de Folin-Ciocalteu. Dans les MCR, d'autres substances réductrices peuvent interférer, comme par exemple les sucres et le dioxyde de soufre. Cette interférence peut être évaluée en mesurant un « blanc » dépourvu de substances phénoliques, préparé en traitant l'échantillon correspondant au charbon actif.

Le réactif de Folin-Ciocalteu est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$) qui, lors de l'oxydation des substances réductrices présentes dans le MCR, est réduit 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.

3. RÉACTIFS

Ils doivent être de qualité analytique.

L'eau utilisée doit être distillée ou d'une pureté équivalente.

3.1. Substances chimiques

3.1.1 Tungstate de sodium dihydraté, $Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$ (n° CAS : 10213-10-2) ;

3.1.2 Molybdate de sodium dihydraté, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ (n° CAS : 10102-40-6) ;

3.1.3 Solution d'acide phosphorique à 85 %m dans du H_2O, H_3PO_4, ρ_{20} = 1,71 g/ml (n° CAS : 7664-38-2) ;

3.1.4 Chlorure d'hydrogène, HCl, ρ_{20} = 1,2 g/ml (n° CAS : 7647-01-0) ;

3.1.5 Sulfate de lithium monohydraté, $Li_2SO_4 \cdot H_2O$ (n° CAS : 10102-25-7) ;

3.1.6 Brome, Br_2 (n° CAS : 7726-95-6) ;

3.1.7 Carbonate de sodium anhydride, Na_2CO_3 (n° CAS : 497-19-8) ;

3.1.8 Charbon actif décolorant (n° CAS : 7440-44-0).

3.2. Réactif de Folin-Ciocalteu

Ce réactif est disponible dans le commerce prêt à l'emploi.

Il peut être préparé de la façon suivante : dissoudre 100 g de tungstate de sodium ($Na_2WO_4.2H_2O$) et 25 g de molybdate de sodium ($Na_2MoO_4.2H_2O$) dans 700 mL d'eau distillée. Ajouter 50

mL d'acide phosphorique à 85 % (ρ_{20} = 1,71 g/mL) et 100 mL d'acide hydrochlorique concentré (ρ_{20} = 1,19 g/mL). Porter à ébullition sous reflux durant 10 heures. Ajouter ensuite 150 g de sulfate de lithium ($Li_2SO_4.H_2O$) et quelques gouttes de brome et porter à nouveau à ébullition durant 15 min. Laisser refroidir et compléter à 1 litre avec de l'eau distillée.

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

4. APPAREILLAGE

Matériel de laboratoire courant, et notamment :

4.1. Fioles jaugées de 100 mL ;

4.2. Spectrophotomètre permettant de travailler à 750 nm ;

4.3. Balance technique (± 0.01 g) ;

4.4. Éprouvette cylindrique graduée de 50 mL;

4.5. Bécher de 50 mL ;

4.6. Agitateur magnétique ;

4.7. Filtre papier à filtration rapide ;

4.8. Pipette graduée de 5 mL ;

4.9. Cuvette en verre optique ;

4.10 Bain à ultrasons.

5. MODE OPÉRATOIRE

Une bonne répétabilité des résultats est obtenue en utilisant un appareillage (fioles jaugées et cuves du spectrophotomètre) rigoureusement propre.

5.1. Préparation de l'échantillon

Soit un pourcentage P (m/m) P de sucres totaux dans le moût concentré rectifié.

Diluer le MCR avec de l'eau distillé jusqu'à obtenir une concentration en sucres totaux dans la solution de de 25 ± 0,5 % (m/m) (25 °Brix) : peser une masse en g égale à 2500/P dans une fiole jaugée (4.1) et compléter à 100 g avec de l'eau.

5.2. Préparation d'un blanc

Prélever 10 mL de la solution 5.1 à l'aide de l'éprouvette cylindrique graduée (4.4) et les introduire dans un bécher (4.5), puis ajouter 0,5 g de charbon actif (3.1.8).

Laisser au contact pendant 15 minutes à l'aide d'un agitateur magnétique (4.6), puis filtrer la solution au travers d'un filtre papier à filtration rapide (4.7).

5.3. Réaction colorée

5.3.1 Développement de la couleur dans l'échantillon

Introduire les réactifs ou solutions suivants dans une fiole jaugée de 100 mL (4.1), en respectant strictement l'ordre indiqué :

- 5 mL de l'échantillon (5.1) à l'aide d'une pipette (4.8),
- 50 mL d'eau distillée au moyen de l'éprouvette cylindrique graduée (4.4),

- 5 mL du réactif de Folin-Ciocalteu (3.2) à l'aide d'une pipette (4.8),
- 20 mL de la solution de carbonate de sodium (3.3) au moyen de l'éprouvette cylindrique graduée (4.4).

Ajuster à 100 mL avec de l'eau distillée. Agiter pour homogénéiser. Attendre 30 minutes afin que la réaction se stabilise.

Durant cette période, les fioles doivent être placées dans un bain à ultrasons (4.10) pendant 15 minutes afin d'éliminer toute bulle susceptible de perturber la mesure spectrophotométrique.

5.3.2 Développement de la couleur dans le blanc

Procéder tel qu'indiqué au point 5.3.1 en remplaçant l'échantillon (5.1) par un blanc (5.2).

5.4. Mesures

Déterminer l'absorbance à 750 au travers d'une cuvette en verre d'un trajet optique de 1 cm par rapport à un blanc (5.2).

Si la valeur d'absorbance n'est pas proche de 0,3, il convient de procéder à une dilution appropriée jusqu'à ce que l'absorbance mesurée retombe aux alentours de 0,3.

6. EXPRESSION DES RÉSULTATS

6.1. Mode de calcul

Le résultat est exprimé sous forme d'un indice obtenu en multipliant l'absorbance par 16 avec une décimale.

La valeur de l'IFC calculée doit être corrigée pour le blanc conformément à la formule suivante :

$$\text{IFC mesuré à } 25°\text{Brix} = 16\ d\ (A - A_{blanc})$$

où :

A = absorbance à 750 nm mesurée dans l'échantillon à 25 ± 0,5 % (m/m) (5.1)

A_{blanc} = absorbance à 750 nm mesurée dans le blanc (5.2)

d = un facteur approprié en cas de dilution (5.4)

7. CARACTERISTIQUES DE LA MÉTHODE

La méthode a été contrôlée dans le laboratoire de l'ICQRF de Conegliano (Italie) en analysant deux échantillons de MCR. Chaque échantillon a de nouveau été enrichi avec du SO_2 à une concentration de 5 mg/kg ST (mg/kg de sucres totaux). Les échantillons ont été analysés à trois reprises :

Échantillons	Indice de FC à 25 °Brix			Moyenne	SD	r=2,8xSD
MCR 1	5,4	4,9	5,3	5,2	0,3	0,8
MCR 2	2,2	2,4	1,9	2,2	0,2	0,7

Des données complémentaires ont été fournies par le laboratoire de l'ASAE (Portugal) :

Nombre d'échantillons	Plage de concentration	Sr	r	SR	R
21	De 1 à 5,3	0,25	0,7		
21	De 1 à 5,0			0,91	2,5

Annexe G

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

Méthode OIV-MA-G1-01 Méthode Type IV

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 chromatographie liquide à haute performance avec détection fluorimétrique

(OIV-OENO 662A-2022)

1. Domaine d'application

Ce document décrit la méthode utilisée pour le dosage de l'ochratoxine A (OTA) dans le jus de raisin, le jus de raisin reconstitué, le jus de raisin concentré et le nectar de raisin à des concentrations allant de 0,2 μg/L à 10 μg/L.

2. Principe

La présente méthode utilise une colonne d'immunoaffinité et une chromatographie liquide à haute performance (CLHP). L'OTA est éluée avec du méthanol et quantifiée par CLHP en phase inverse avec une détection fluorimétrique.

3. Réactifs et matériels

3.1. Réactifs pour la séparation de l'OTA sur colonne d'immunoaffinité. Les réactifs indiqués ci-dessous le sont à titre d'exemple. En effet, les fournisseurs des colonnes d'immunoaffinité peuvent proposer des solutions de dilution et des éluants adaptés à leurs produits. Il est alors souhaitable d'utiliser leurs produits.

3.1.1. Hydrogénophosphate de disodium dihydraté ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$) (n° CAS : 10028-24-7)

3.1.2. Dihydrogénophosphate de sodium monohydraté ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$) (n° CAS : 10049-21-5)

3.1.3. Chlorure de sodium (NaCl) (n° CAS : 7647-14-5)

3.1.4. Eau purifiée pour laboratoire, par exemple de qualité EN ISO 3696

3.1.5. Tampon phosphate (solution de dilution)

Dissoudre 60,0 g de $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ (3.1.1) et 8,8 g de $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ (3.1.2) dans 950 mL d'eau (3.1.4) et compléter à 1 L avec de l'eau

3.1.6. Tampon phosphate salin (solution de lavage)

Dissoudre 2,85 g de $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ (3.1.1), 0,55 g de $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ (3.1.2) et 8,70 g de NaCl (3.1.3) dans 950 mL d'eau (3.1.4) et compléter à 1 L avec de l'eau.

3.1.7. Méthanol (pureté $\geq$ 99,9 %) (CH_3OH) (n° CAS : 67-56-1).

3.2. Réactifs pour la CLHP

3.2.1. Acétonitrile qualité CLHP (CH_3CN) (n° CAS : 75-05-8).

3.2.2. Acide acétique (pureté = 100 %) (CH_3COOH) (n° CAS : 64-19-7).

3.2.3. Phase mobile : eau:acétonitrile:acide acétique (99:99:2, v/v/v) (proportions approximatives)

Mélanger 990 mL d'eau (3.1.4) avec 990 mL d'acétonitrile (3.2.1) et 20 mL d'acide acétique (3.2.2). En cas de présence de composés non solubilisés, filtrer sur filtre 0,45 µm. Dégazer (par exemple à l'hélium) sauf si le matériel CLHP utilisé comporte une étape de dégazage.

3.3. Réactifs pour la préparation de la solution mère d'OTA

3.3.1. Toluène ($C_6H_5CH_3$) (n° CAS : 108-88-3).

3.3.2. OTA (pureté $\geq$ 99,5 %) (n° CAS : 303-47-9).

3.3.3. Mélange de solvants (toluène:acide acétique, 99:1, v/v).

Mélanger 99 parties en volume de toluène (3.3.1) avec une partie en volume d'acide acétique (3.2.2).

Une solution commerciale de concentration connue (environ 50 µg/mL), avec un certificat d'analyse précisant la valeur de référence et l'incertitude de la concentration, est à préférer par rapport à l'OTA sous forme solide.

3.4. Solution mère d'OTA

Dissoudre 1 mg d'OTA ou le contenu équivalent d'une ampoule (si l'OTA a été obtenue sous forme de pellicule après évaporation) dans le mélange de solvants (3.3.3) pour obtenir une solution contenante approximativement 20 à 30 µg/mL d'OTA.

Pour déterminer la concentration exacte (le cas échéant), enregistrer le spectre d'absorption de la solution entre 300 et 370 nm dans une cuve en quartz de 1 cm de chemin optique en se servant du mélange de solvants (3.3.3) comme blanc.

Identifier le maximum d'absorption et calculer la concentration d'OTA (C_{OTA}) en µg/mL à l'aide de l'équation suivante :

$$C_{OTA} = A_{MAX} \times M \times 100 / \varepsilon \times \delta$$

où :

A_{MAX} = Absorption déterminée à la longueur d'onde maximale (à environ 333 nm),

M = masse molaire de l'OTA = 403,8 g/mol,

ε = coefficient d'extinction molaire de l'OTA dans le mélange de solvants (3.3.3) (ε = 544 m^2/mol),

δ = chemin optique (cm).

Cette solution est stable à -18 °C pour au moins 4 ans.

3.5. Solution étalon d'OTA à 2 µg/mL (toluène:acide acétique, 99:1, v/v)

Diluer la solution mère (3.4) avec le mélange de solvants (3.3.3) pour obtenir une solution étalon d'OTA à une concentration de 2 µg/mL.

Cette solution peut être conservée à +4 °C au réfrigérateur. La stabilité devrait être testée à l'usage.

4. Appareillage

Équipement usuel de laboratoire, comprenant notamment :

4.1. Tubes de verre (4 mL)
4.2. Balance analytique
4.3. Fioles jaugées
4.4. Pipettes jaugées
4.5. Micropipettes jaugées
4.6. Système d'extraction en phase solide (SPE) pour les colonnes d'immunoaffinité
4.7. Réservoir et tube d'écoulement adaptés aux colonnes d'immunoaffinité
4.8. Filtres en microfibre de verre
4.9. Colonne d'immunoaffinité spécifique pour l'OTA

La colonne devrait avoir une capacité de liaison totale au moins égale à 100 ng d'OTA, permettant un rendement de purification d'au moins 85 % quand on y fait passer une solution diluée de l'échantillon contenant 100 ng d'OTA.

4.10. Chromatographe liquide, avec pour la phase mobile, une pompe capable d'atteindre un débit constant de 1 mL/min en isocratique. Système d'injection équipé d'une boucle de 100 µL.

4.11. Colonne de CLHP analytique en acier 150 × 4,6 mm (d.i.), remplie avec une phase stationnaire C_{18} (5 µm) précédée d'une pré-colonne ou d'un pré-filtre (0,5 µm) contenant une phase appropriée. Des colonnes de dimensions différentes peuvent être utilisées, pourvu qu'elles assurent une bonne ligne de base et un bruit de fond permettant de détecter le pic d'OTA parmi les autres pics

4.12. Détecteur de fluorescence relié à la colonne et dont la longueur d'onde d'excitation est fixée à 333 nm et la longueur d'onde d'émission à 460 nm

4.13. Système d'acquisition des données

4.14. Spectromètre UV

5. Préparation des échantillons (donné à titre d'exemple)

5.1. Pour le jus de raisin, le jus de raisin reconstitué et le nectar de raisin

Verser 10 mL de l'échantillon dans une fiole conique (erlenmeyer) de 100 mL. Ajouter 10 mL de la solution de dilution (3.1.5). Mélanger vigoureusement. Filtrer sur filtre en microfibre de verre (4.8). La filtration est nécessaire pour les solutions troubles ou en cas de présence d'un précipité après dilution.

5.2. Pour le jus de raisin concentré

Diluer d'abord les jus cinq fois (m/m) avec de l'eau (3.1.4). Tenir compte de cette dilution dans le calcul final de la concentration en OTA (point 8). Puis verser 10 mL de l'échantillon dilué dans une fiole conique (erlenmeyer) de 100 mL. Ajouter 10 mL de la solution de dilution (3.1.5). Mélanger vigoureusement. Filtrer sur filtre en microfibre de verre (4.8). La filtration est nécessaire pour les solutions troubles ou en cas de présence d'un précipité après dilution.

6. Mode opératoire

6.1. Purification sur colonne d'immunoaffinité (à titre d'exemple)

Diluer les échantillons avec un solvant approprié conforme aux instructions du fabricant du kit. Filtrer cette solution et la purifier au travers d'une colonne d'immunoaffinité. Monter la colonne d'immunoaffinité (4.9) sur le système d'extraction en phase solide (4.6) et y fixer le réservoir (4.7).

Ajouter 10 mL (équivalent de 5 mL d'échantillon) de la solution diluée dans le réservoir et la faire passer dans la colonne d'immunoaffinité avec un débit d'environ 1 goutte par seconde. Il faut éviter que la colonne d'immunoaffinité soit à sec. Laver la colonne d'immunoaffinité avec 5 mL de la solution de lavage (3.1.6) puis avec 5 mL d'eau (3.1.4.) à un débit de 1 à 2 gouttes par seconde. Sécher la colonne en y faisant passer de l'air. Éluer l'OTA dans un tube de verre (4.1) avec 2 mL de méthanol (3.1.7) à un débit de 1 goutte par seconde. Évaporer l'éluat à sec à 50 °C sous azote. Redissoudre immédiatement dans 250 µL de la phase mobile de la CLHP (3.2.3) et stocker à 4 °C jusqu'à l'analyse par CLHP.

6.2. Analyse par CLHP

Injecter 100 µL de l'extrait reconstitué~~)~~ dans le chromatographe à l'aide de la boucle d'injection.

Conditions opératoires (à titre d'exemple) :

Débit : 1 mL/min

Phase mobile : acétonitrile:eau:acide acétique (99:99:2, v/v/v) (3.2.3)

Détection fluorimétrique :

- **longueur d'onde d'excitation = 333 nm**
- **longueur d'onde d'émission = 460 nm**

Volume d'injection : 100 µL

7. Dosage de l'ochratoxine A (OTA)

Le dosage de l'OTA devrait être réalisé en mesurant les aires sous courbe (ou à défaut les hauteurs de pics) au temps de rétention de l'OTA par comparaison avec la courbe d'étalonnage.

7.1. Gamme d'étalonnage (à titre d'exemple)

Préparer une gamme d'étalonnage chaque jour d'analyse ou chaque fois que les conditions chromatographiques changent. Mesurer 0,5 mL de la solution étalon d'OTA (3.5) à 2 µg/mL dans un tube en verre (4.1) et faire évaporer le solvant sous azote. Redissoudre dans 10 mL de phase mobile de la CLHP (3.2.3) qui a été filtrée préalablement sur filtre de 0,45 µm. Ceci donne une solution d'OTA à 100 µg/L. Préparer au moins 6 solutions étalons CLHP dans 5 fiolesjaugées de 5 mL suivant le tableau 1 (à titre d'exemple).

Compléter chaque solution étalon à 5 mL avec la phase mobile de la CLHP (3.2.3).

Injecter 100 µL de chaque solution dans la CLHP.

Tableau 1. Gamme d'étalonnage

Solutions étalons	Sol. 1	Sol. 2	Sol. 3	Sol. 4	Sol. 5	Sol.6
µL de phase mobile CLHP filtrée (3.2.3)	4990	4975	4950	4900	4770	4500
µL de solution d'OTA à 100 µg/L	10	25	50	100	250	500
Concentration en OTA (µg/L)	0,2	0,5	1,0	2,0	5,0	10
OTA injectée (ng)	0,02	0,05	0,10	0,20	0,50	1,00

REMARQUES *:*

1. Si la quantité d'OTA dans les échantillons se situe en dehors de la gamme d'étalonnage, une dilution appropriée sera réalisée. Dans ces cas, le calcul de la concentration finale (8) devra être réexaminé au cas par cas.
2. Consulter le Guide concernant les points critiques de la méthode de détermination de l'ochratoxine A par colonne d'immunoaffinité (annexe III – méthode OIV-MA-AS315-10).

8. Calculs

Calculer la quantité d'OTA dans la partie aliquote de la solution test injectée dans la colonne de CLHP.

Calculer la concentration d'OTA ($\overline{C_{OTA}}$) en µg/L à l'aide de la formule suivante :

$$\overline{C_{OTA}} = MA \times F/V_1 \times V_3/V_2$$

où :

- MA est la masse d'ochratoxine A (en µg) dans la partie aliquote de matrice injectée sur la colonne et déterminée à partir de la courbe d'étalonnage,
- F est le facteur de dilution,
- V_1 est le volume d'échantillon à analyser (0,01 L),
- V_2 est le volume de la solution test injectée dans la colonne (100 µL),

- V_4 est le volume de solution utilisée pour redissoudre l'éluat sec (250 µL).

Le taux de recouvrement des colonnes d'immunoaffinité est à prendre en considération dans le cas d'étalonnage direct par solutions synthétiques.

9. Expression des résultats

La teneur d'OTA est exprimée en microgrammes par litre (µg/L) avec deux chiffres significatifs tenant compte de l'incertitude.

10. Caractéristiques de la méthode

La méthode a fait l'objet d'une étude de validation interne afin d'évaluer sa pertinence pour les jus de raisin, en tenant compte de la linéarité, des limites de détection et de quantification, et de l'exactitude de la méthode. Ce dernier paramètre a été déterminé en définissant le niveau de fidélité et de justesse de la méthode.

10.1. Linéarité de la méthode

Sur la base des résultats obtenus grâce à l'analyse de régression linéaire, la méthode s'est révélée linéaire pour les plages indiquées sur la figure 1 et dans le tableau 2.

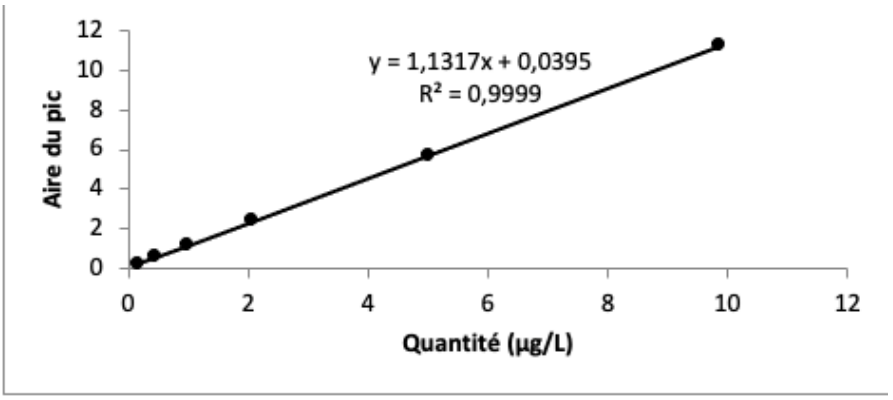


Figure 1. Courbe d'étalonnage de l'OTA

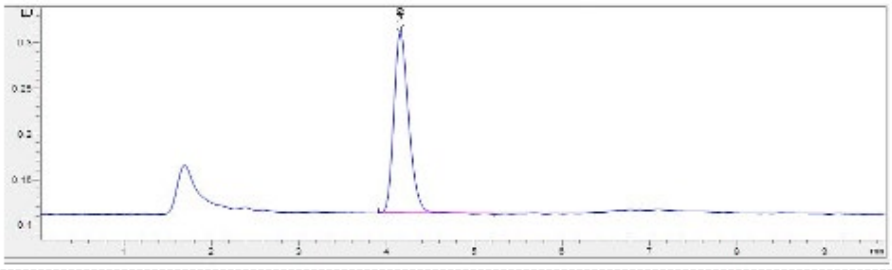


Figure 2. Chromatogramme d'une solution étalon de 2,0 Figure 2. Chromatogramme d'une solution étalon de 2,0 µg/L d'OTA

10.2. Limite de détection et limite de quantification

La limite de détection (LD) et la limite de quantification (LQ) ont été calculées à partir de huit répétitions analytiques d'un jus de raisin surchargé avec 0,10 µg/L d'OTA et sont égales à trois fois l'écart type pour la LD et dix fois l'écart type pour la LQ (tableau 2).

10.3. Fidélité de la méthode

Les paramètres pris en considération sont la répétabilité et la reproductibilité. Le tableau 2 indique les valeurs de ces paramètres. La répétabilité est exprimée par les écarts types relatifs des mesures répétées avec différentes concentrations relevées sur le jus de raisin. La reproductibilité est exprimée par la moyenne des écarts types relatifs des mesures réalisées sur le même échantillon de jus de raisin par différents opérateurs.

10.4. Justesse de la méthode

Le pourcentage de recouvrement a été déterminé en utilisant un échantillon de jus de raisin surchargé avec six concentrations différentes d'OTA, allant de 0,10 µg/L à 10 µg /L. Chaque niveau de concentration a été analysé 5 fois. Un exemple de chromatogramme de recouvrement est présenté en figure 3.

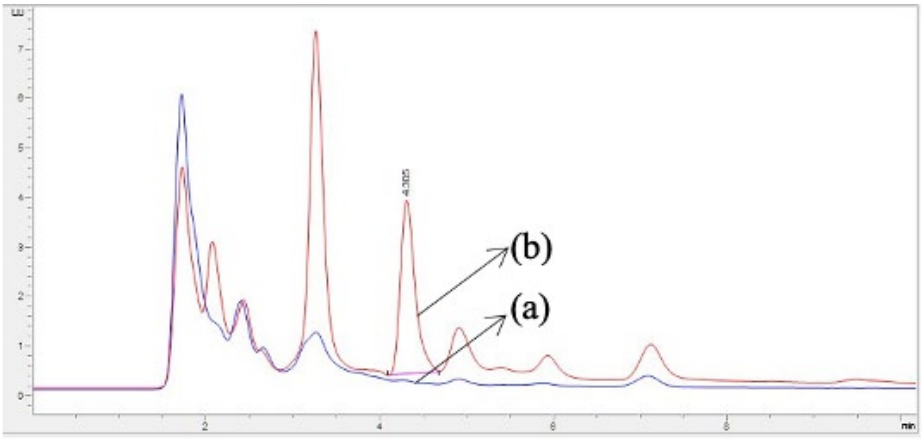


Figure 3. Exemple de chromatogramme de recouvrement d'un jus de raisin (a) ***et d'un jus de raisin surchargé avec 2 µg/L d'OTA (b)***

Tableau 2. Caractéristiques de la méthode

Plage de linéarité (µg/L)	Coefficient de détermination (r^2)	LD (µg/L)	LQ (µg/L)	Répétabilité (n=7) RSD%	Reproductibilité (n=7) RSD%	Recouvrement (%)
0,20-10	0,9999	0,12	0,22	4,79	5,17	104,2 ± 2,9

11. **Bibliographie**

- OIV. Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts. Méthode OIV-MA-AS315-10.
- EN ISO 3696. Eau destinée à un emploi en laboratoire d'analyse — Spécifications et méthodes des tests (ISO 3696:1995).

Méthode OIV-MA-G1-02 Méthode Type IV

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)

1. Domaine d'application

La présente méthode s'applique à la 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 par titrage, dans la plage de concentrations de 0,11 g/L à 1,09 g/L d'acide acétique indiquée.

2. Définition

L'acidité volatile résulte des acides appartenant à la série acétique qui se trouvent dans le jus de raisin, le jus de raisin reconstitué, le jus de raisin concentré et le nectar de raisin à son état libre et à son état salifié.

3. Principe

Les acides volatils sont séparés du jus de raisin, jus de raisin reconstitué, jus de raisin concentré* et du nectar de raisin par entraînement à la vapeur d'eau, puis titrés à l'aide de la solution d'hydroxyde de sodium dont la concentration est connue. 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 qui a pu être ajouté au jus de raisin, au jus de raisin reconstitué, au jus de raisin concentré et au nectar de raisin doit également être retranchée.

Remarque : Une partie de l'acide salicylique utilisé pour stabiliser les jus de raisins avant analyse est présente dans le distillat. Celle-ci doit être déterminée et retranchée de l'acidité comme indiqué à la section 7.3.

4. Réactifs et matériels

4.1. Réactifs

4.1.1. Acide tartrique à 99,5 % ($C_4H_6O_6$) (n° CAS : 87-69-4)

4.1.2. Hydroxyde de sodium (NaOH) (n° CAS : 1310-73-2) solution de 0,1 M

4.1.3. Phénolphtaléine à 98 % ($C_{20}H_{14}O_4$) (n° CAS : 77-09-8)

4.1.4. Acide chlorhydrique à 37 % (HCl) (n° CAS : 7647-01-0)
4.1.5. Iode (I_2) (n° CAS : 7553-56-2) solution de 0,005 M
4.1.6. Iodure de potassium à 99 % (KI) (n° CAS : 7681-11-0)
4.1.7. Amidon $(C_6H_{10}O_5)_n$ (n° CAS : 9005-84-9)
4.1.8. Tétraborate de sodium 99,5 % ($Na_2B4O_7 \cdot 10H_2O$) (n° CAS : 1303-96-4)
4.1.9. Acide acétique 99,8 % (CH_3COOH) (n° CAS : 64-19-7)] solution de 0,1 M.
4.1.10. Acide lactique 85 % ($C_3H_6O_3$) (n° CAS : 50-21-5)
4.1.11. Chlorure de sodium 99,0 % (NaCl) (n° CAS : 7647-14-5)
4.1.12. Thiosulfate de sodium 99,5 % ($Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$) (n° CAS : 10102-17-7) solution de 0,1 M ou une solution commerciale
4.1.13. Sulfate d'ammonium ferrique 99,0 % ($Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$) (n° CAS : 7783-83-7) 10 % (m/v)
4.1.14. Salicylate de sodium 99,5 % ($NaC_7H_5O_3$) (n° CAS : 54-21-7) solution de 0,01 M
4.1.15. Éthanol 96 % (C_2H_6O) (n° CAS : 64-17-5)
4.1.16. Eau de type 1 (EN ISO 3696) ou équivalente ultra pure

4.2. Préparation des solutions
4.2.1. Solution de phénolphtaléine 1 % m/v

Mélanger 1 g de phénolphtaléine (4.1.3) dans 100 mL d'éthanol (4.1.15).

Une solution commerciale peut être utilisée.

4.2.2. Solution d'indicateur d'amidon 5 g/L

Délayer 5 g d'amidon (4.1.7) dans 500 mL d'eau environ (4.1.16). Porter au point d'ébullition en agitant continuellement et maintenir l'ébullition pendant 10 min. Ajouter 200 g de chlorure de sodium (4.1.11). Porter à 1 L d'eau après refroidissement (4.1.16).

4.2.3. Solution saturée de tétraborate de sodium soit environ 55 g/L

Mélanger 55 g de tétraborate de sodium (4.1.8) dans 1 Ld'eau (4.1.16).

4.2.4. Acide lactique solution de 1 M-90 g/L

Diluer 100 mL d'acide lactique (4.1.10) dans 400 mL d'eau (4.1.16). Placer par exemple cette solution dans une capsule d'évaporation et la chauffer pendant 4 heures au-dessus d'un bain d'eau bouillant, en complétant de temps en temps le volume avec de l'eau (4.1.16) . Porter à 1 L d'eau après refroidissement (4.1.16). Titrer l'acide lactique dans 10 mL avec une solution d'hydroxyde de sodium (4.1.2). Ajuster la concentration d'acide lactique (solution pour 90 g/L).

5. Appareillage

5.1. Appareil d'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 distillée exempte de CO_2. Recueillir 250 mL de distillat et les additionner de 0,1 mL de solution d'hydroxyde de sodium (4.1.2) et de deux gouttes de la solution de phénolphtaléine (4.2.1). La coloration rose doit être stable pendant au moins 10 secondes (indiquant que la vapeur d'eau est exempte de dioxyde de carbone).

(b) Placer dans le barboteur 20 mL de solution d'acide acétique (4.1.9). Recueillir 250 mL de distillat et titrer avec la solution d'hydroxyde de sodium (4.1.2) et deux gouttes de solution de phénolphtaléine (4.2.1). Le volume versé doit être au moins égal à 19,9 mL (acide acétique entraîné par la vapeur ≥ 99,5 %).

(c) Placer dans le barboteur 20 mL de solution d'acide lactique (4.2.4). Recueillir 250 mL de distillat et titrer l'acidité avec la solution d'hydroxyde de sodium (4.1.2) et deux gouttes de solution de phénolphtaléine (4.2.1). Le volume de solution d'hydroxyde de sodium (4.1.2) versé doit être inférieur ou égal à 1,0 mL (acide lactique distillé ≤ 0,5 %).

Tout appareil (automatique ou non) ou toute technique qui satisfait à ces essais répond aux exigences des appareils ou techniques internationales officielles.

5.2. Matériel volumétrique
5.3. Balance analytique vérifiée et étalonnée
5.4. Pipettes jaugées de 10 et 20 mL
5.5. Burette jaugée
5.6. Bain d'eau

6. Mode opératoire

6.1. Préparation de l'échantillon

Pour éliminer le CO_2 des jus de raisin gazéifiés :

mettre environ 50 mL de jus de raisin, de jus de raisin reconstitué ou de nectar de raisin dans une fiole à vide ; appliquer le vide dans ladite fiole avec la pompe à eau pendant une à deux minutes tout en agitant continuellement. D'autres systèmes d'élimination du CO_2 peuvent être utilisés si l'élimination du CO_2 est garantie.

6.2. Entraînement à la vapeur d'eau

Placer 20 mL de jus de raisin, jus de raisin reconstitué, jus de raisin concentré* ou nectar de raisin dans le barboteur. Ajouter 0,5 g environ d'acide tartrique (4.1.1). Recueillir au moins 250 mL de distillat.

* Le jus de raisin concentré doit être dilué (200 g dans 500 mL, par exemple) et le résultat multiplié par le facteur de dilution (F = 2,5 pour l'exemple donné).

6.3. Titrage

Titrer par la solution d'hydroxyde de sodium (4.1.2) en présence de deux gouttes de solution de phénolphtaléine (4.2.1) comme indicateur ; soit *n* le volume de solution d'hydroxyde de sodium (4.1.2) employé (en mL). Ajouter 4 gouttes d'acide chlorhydrique (4.1.4) dilué au 1:4 (v/v) dans l'eau (4.1.16), 2 mL d'empois d'amidon (4.2.2) et quelques cristaux d'iodure de potassium (4.1.6). Titrer le dioxyde de soufre libre par la solution d'iode (4.1.5) ; soit *n'* le volume employé (en mL). Ajouter la solution saturée de tétraborate de sodium (4.2.3) jusqu'à réapparition de la coloration rose. Titrer le dioxyde de soufre combiné par la solution d'iode (4.1.5) ; soit *n''* le volume employé (en mL).

7. Calcul (Résultats)

7.1. Méthode de calcul

L'acidité volatile, exprimée en milliéquivalents par litre avec une décimale, sera :

$$5(n - 0.1n' - 0.05n)$$

L'acidité volatile, exprimée en grammes d'acide acétique par litre avec deux décimales, sera :

$$0.30(n - 0.1n' - 0.05n'')$$

n = volume (mL) de solution d'hydroxyde de sodium (4.1.2) utilisé

n' = volume (ml) de solution d'iode (4.1.5) utilisé pour le titrage du dioxyde de soufre libre

n'' = volume (mL) de solution d'iode (4.1.5) utilisé pour le titrage du dioxyde de soufre combiné

Remarque : Dans le cas du jus de raisin concentré, multiplier le résultat par le facteur de dilution (F).

7.2. Échantillons contenant de l'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 milliéquivalents ou de 0,053 g d'acide acétique et connaissant la teneur en acide sorbique (mg/L), déterminée par ailleurs.

7.3. Échantillons contenant de l'acide salicylique

7.3.1. Identification de l'acide salicylique dans le distillat d'acidité volatile

Immédiatement après avoir déterminé l'acidité volatile et la correction correspondant au dioxyde de soufre libre et combiné, verser dans une fiole conique (erlenmeyer) 0,5 mL d'acide chlorhydrique (4.1.4), 3 mL de la solution de thiosulfate de sodium (4.1.12) et 1 mL de celle de sulfate d'ammonium ferrique (4.1.13). Si de l'acide salicylique est présent, une coloration violette apparaît.

7.3.2. Détermination de l'acide salicylique

Sur l'erlenmeyer mentionné ci-dessus, indiquer le volume du distillat en y faisant une marque de référence. Vider et rincer l'erlenmeyer. Soumettre un nouvel échantillon test de 20 mL de jus de raisin, de jus de raisin reconstitué, de jus de raisin concentré (cf. point 6.2) ou de nectar de raisin au processus d'entraînement à la vapeur d'eau puis recueillir le distillat dans l'erlenmeyer jusqu'à la marque de référence. S'assurer que le même volume de distillat est collecté qu'au point 7.3.3. Ajouter 0,3 mL d'acide chlorhydrique (4.1.4) et 1 mL de la solution de sulfate d'ammonium ferrique (4.1.13). Le contenu de l'erlenmeyer vire au violet. Dans un erlenmeyer identique à celui portant la marque, verser de l'eau distillée (4.1.16) jusqu'au même niveau que le distillat. Ajouter 0,3 mL d'acide chlorhydrique (4.1.4) et 1 mL de la solution de sulfate d'ammonium ferrique (4.1.13). Titrer l'eau distillée dans l'erlenmeyer avec une solution de salicylate de sodium (4.1.14) jusqu'à ce que la coloration violette obtenue soit de la même intensité que celle dans l'erlenmeyer contenant le distillat. Soit n'' le volume de solution versé depuis la burette (en mL).

7.3.3. Correction de l'acidité volatile

Soustraire le volume 0,1 x n''' (en mL) du volume *n* (en mL) de solution d'hydroxyde de sodium (4.1.2) utilisée pour titrer l'acidité du distillat lors de la détermination de l'acidité volatile.

8. Caractéristiques indicatives de la méthode

La méthode a fait l'objet d'une étude de validation avec du jus de raisin afin d'évaluer sa pertinence pour les matrices en question, en tenant compte de la linéarité, des limites de détection et de quantification, et de l'exactitude de la méthode. Ce dernier paramètre a été déterminé en définissant le niveau de fidélité et de justesse de la méthode.

8.1. Linéarité de la méthode

La méthode s'est révélée linéaire pour la plage allant de 0,11 g/L à 1,09 g/L indiquée dans le tableau 1.

8.2. Limite de détection et limite de quantification

La limite de détection (LD) et la limite de quantification (LQ) ont été calculées à partir de sept répétitions analytiques d'une solution aqueuse de 0,11 g/L d'acide acétique, et sont égales à trois fois l'écart type pour la LD et dix fois l'écart type pour la LQ (tableau 1).

8.3. Fidélité de la méthode

Les paramètres pris en considération sont la répétabilité et la reproductibilité. Le tableau 1 indique les valeurs de ces paramètres. La répétabilité est exprimée par les écarts types relatifs (RSD%) des mesures répétées avec différentes concentrations relevées sur le jus de raisin. La reproductibilité est exprimée par la moyenne des écarts types relatifs (RSD%) des mesures réalisées sur le même échantillon de jus de raisin par différents opérateurs.

8.4. Justesse de la méthode

Le pourcentage de recouvrement a été déterminé en utilisant un échantillon de jus de raisin dopé avec six concentrations différentes d'acide acétique, allant de 0,11 g/L à 1,09 g/L.

Tableau 1. Caractéristiques de la méthode

Plage de linéarité (g/L) de l'acide acétique	**Coefficient de corrélation (r^2)**	**LD (g/L) de l'acide acétique**	**LQ (g/L de l'acide acétique**	**Répétabilité (n=7)** **RSD%**	**Reproductibilité (n=7)** **RSD%**	**Recouvrement moyen (%)**
0,11-1,09	**0,9905**	**0,09**	**0,16**	**2,75**	**3,15**	**103,63**

9. Bibliographie

- OIV. *Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts*. Méthode OIV-MA-AS313-02:R2015.

- BS EN ISO 3696, Eau pour laboratoire à usage analytique -. Spécification et méthodes d'essai, 1995.

Méthode OIV-MA-G1-03 Méthode Type IV

Méthode de détermination du rapport isotopique 18O/16O de l'eau dans le jus de raisin

(OIV-OENO 662H-2022)

1. Domaine d'application

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

2. Définitions

Le rapport isotopique $^{18}O/^{16}O$ est utilisé pour identifier l'eau additionnée au jus de raisin.

3. Principe

La présente méthode est fondée sur l'équilibrage entre le CO_2 et l'eau dans le jus de raisin 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 à l'état gazeux est utilisé pour une analyse par spectrométrie de masse de rapport isotopique (SMRI), où le rapport isotopique $^{18}O/^{16}O$ est déterminé dans le CO_2 résultant de l'équilibrage.

4. Réactifs et matériaux

Les matériaux et consommables sont fonction de la méthode employée. Les systèmes généralement utilisés sont fondés sur l'équilibrage de l'eau dans le jus de raisin avec du CO_2.

Les matériaux de référence, étalons de travail et consommables suivants peuvent être utilisés :

4.1. Matériaux de référence

Nom	Éditeur/Auteur	$\delta^{18}O$ par rapport au V-SMOW
VSMOW2	NIST/IAEA	0 ‰
GISP	NIST	-24,78 ‰
SLAP	NIST/IAEA	-55,5 ‰

4.2. Étalons de travail

4.2.1. Dioxyde de carbone utilisé pour l'équilibrage ; dans le cas d'un système de cylindres à flux continu, un mélange gazeux d'hélium et de dioxyde de carbone peut aussi être utilisé.

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

4.3. Consommables

Hélium pour analyse (n° CAS : 07440-59-7)

Dioxyde de carbone pour analyse, utilisé comme gaz de référence (n° CAS : 00124-38-9)

5. Appareillage

L'appareillage et les interfaces dépendent de la méthode utilisée et peuvent être utilisés comme décrit ci-après.

5.1. Spectromètre de masse de rapport isotopique (SMRI)

Le spectromètre de masse isotopique (SMRI) permet de déterminer les teneurs relatives en ^{18}O du CO_2 en abondance naturelle avec une précision interne de 0,05 ‰, ou préférablement exprimées en valeurs relatives. Le spectromètre de masse utilisé pour mesurer les rapports isotopiques est généralement équipé d'un collecteur triple afin de mesurer simultanément les intensités pour m/z = 44, 45 et 46.

5.2. Équipement et matériel

L'équipement et le matériel doivent satisfaire aux exigences de la méthode ou de l'appareillage utilisé (spécifiées par le fabricant). Cependant, tous les équipements et le matériel pourront être remplacés par des éléments aux performances analogues.

5.2.1. Fioles avec des septums adaptés au système employé

5.2.2. Pipettes volumétriques avec des cônes adaptés

5.2.3. Système thermiquement régulé pour effectuer l'équilibrage à température constante, généralement à ±1 °C

5.2.4. Pompe à vide (si le système employé l'exige)

5.2.5. Passeur d'échantillons (si le système employé l'exige)

5.2.6. Seringues pour l'échantillonnage (si le système employé l'exige)

5.2.7. Colonne CG pour séparer le CO_2 d'autres gaz élémentaires (si le système employé l'exige)

5.2.8. Dispositif d'extraction de l'eau (par exemple membrane perméable sélective)

6. Préparation des échantillons

Les échantillons de jus et matériaux de référence sont utilisés pour l'analyse sans prétraitement. Il convient d'éviter une éventuelle fermentation ; pour ce faire, additionner les échantillons d'acide benzoïque (ou tout autre inhibiteur de fermentation) ou les filtrer au travers d'une membrane d'une porosité de 0,22 μm.

7. Mode opératoire

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 puis mesure par SMRI. Ces procédures peuvent être adaptées en fonction des modifications apportées aux matériels et instruments par les fabricants, différents dispositifs d'équilibrage étant disponibles, exigeant différentes conditions de fonctionnement. Deux principales procédures techniques peuvent être utilisées pour introduire le CO_2 dans le SMRI, soit par un système à double entrée, soit par l'utilisation d'un système à flux continu. Les systèmes techniques ainsi que les conditions de fonctionnement correspondantes sont fournis à titre d'exemple.

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.

7.1. 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 de tubes capillaires 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, généralement à 25 °C ($\pm$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 du système à double entrée. Les mesures sont prises en comparant plusieurs fois les rapports entre le CO_2 contenu côté échantillon et côté étalon (gaz étalon de référence : CO_2) du système à double entrée.

Cette approche est répétée jusqu'à ce que le dernier échantillon de la séquence ait été mesuré.

7.2. 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 de tubes capillaires 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 $\pm$1 °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 (par 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 à double entrée. Les mesures sont prises en comparant plusieurs fois les rapports entre le CO_2 contenu côté échantillon et côté étalon (gaz étalon de référence : CO_2) du système à double entrée.

Cette approche est répétée jusqu'à ce que le dernier échantillon de la séquence ait été mesuré.

7.3. Préparation manuelle, équilibrage manuel et automatique et analyse par SMRI à double entrée

Un volume défini de l'échantillon/étalon (200 µL 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 utilisé pour l'équilibrage (4.2.1). Après plusieurs purges pour éliminer toute trace d'air, les fioles sont fermées et placées sur le 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 puis transféré du côté échantillon du système à double entrée. Les mesures sont prises en comparant plusieurs fois les pourcentages de CO_2 contenu du côté échantillon et du côté étalon (gaz étalon de référence : CO_2) du système à double entrée.

Cette approche est répétée jusqu'à ce que le dernier échantillon de la séquence ait été mesuré.

7.4. 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.

La température et le temps nécessaires à l'équilibrage doivent être spécifiés sur la base des caractéristiques techniques des fabricants et/ou déterminés de manière expérimentale. L'équilibre est généralement atteint à une température de 25 ±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.

8. Calculs

Les intensités pour m/z = 44, 45, 46 sont consignées pour chaque échantillon et pour les matériaux de référence analysés. Les rapports isotopiques $^{18}O/^{16}O$ sont ensuite calculés par l'ordinateur et le logiciel du SMRI. Dans la pratique, les rapports isotopiques $^{18}O/^{16}O$ sont mesurés par rapport à un étalon de travail préalablement étalonné par rapport au V-SMOW. De légères variations peuvent se produire pendant la mesure en ligne du fait de modifications des 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 étalonnée 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).

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

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

$$\delta^{18}O_{V-SMOW/SLAP} = \left[\frac{\delta^{18}O_{échantillon} - \delta^{18}O_{V-SMOW}}{\delta^{18}O_{V-SMOW} - \delta^{18}O_{SLAP}}\right] \times 55{,}5[\%]$$

9. Caractéristiques de la méthode

La méthode a fait l'objet d'une étude de validation afin d'évaluer sa pertinence pour les matrices en question, en tenant compte de la linéarité, des limites de détection et de quantification, et de l'exactitude de la méthode. Ce dernier paramètre a été déterminé en définissant le niveau de fidélité et de justesse de la méthode.

9.1. Fidélité de la méthode

Les paramètres pris en considération sont la répétabilité et la reproductibilité intralaboratoire. Le tableau 1 indique les valeurs de ces paramètres. La répétabilité est exprimée par le ‰ des mesures répétées dans les mêmes conditions et le même jour pour tous les jus de raisin, et la reproductibilité est exprimée par la moyenne des ‰ des mesures réalisées sur le même échantillon de jus de raisin par deux opérateurs.

9.2. Justesse de la méthode

Le pourcentage de recouvrement a été déterminé en utilisant un échantillon de jus de raisin surchargé avec six concentrations d'eau du robinet, allant de 20 % à 99,5 %. Chaque niveau de concentration a été analysé cinq fois. La justesse est également exprimée en termes de biais en utilisant un matériel de référence et en calculant l'erreur relative.

Tableau 1. Caractéristiques de la méthode

Coefficient de corrélation (r^2)	Répétabilité (n=16) ‰	Reproductibilité (n=7) ‰	Recouvrement (%)± DS	Justesse (MR) (‰)
0,998	0,20	3,12	101 ± 2,16	0,17

10. Bibliographie

- OIV. Méthode de détermination du rapport isotopique $^{18}O/^{16}O$ de l'eau dans le vin et le moût. Méthode OIV-MA-AS2-12.

Méthode OIV-MA-G1-04 **Méthode de type I**

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)

1. Domaine d'application

Le présent document décrit la méthode utilisée pour le dosage des matières solides solubles dans le jus de raisin, le jus de raisin reconstitué, le jus de raisin concentré et le nectar de raisin dans une plage de concentration allant de 10,0 °Bx à 69,2 °Bx.

2. Principe

La teneur en matières solides solubles de l'échantillon, estimée à partir de son indice de réfraction à 20 °C et exprimée soit en valeur absolue, soit en pourcentage en masse de saccharose (degrés Brix), est reportée dans le tableau II pour obtenir la teneur en sucre en grammes par litre et en grammes par kilogramme pour le jus de raisin, jus de raisin reconstitué, jus de raisin concentré ou nectar de raisin.

3. Appareillage

3.1. Réfractomètre du type Abbe.

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 quatre 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.

Remarque : Un réfractomètre électronique peut également être utilisé. Dans ce cas, une correction n'est pas nécessaire pour les appareils qui prennent automatiquement la température en compte.

3.2. Balance analytique contrôlée et étalonnée d'une précision minimum de 0,01 g.

4. Préparation de l'échantillon

Passer l'échantillon à travers un papier filtre ou une gaze sèche pliée en quatre et, après avoir éliminé les premières gouttes de filtrat, procéder à la détermination sur le produit filtré.

Dans le cas du jus de raisin concentré, et en fonction de sa concentration, utiliser soit directement l'échantillon, soit préparer une diution en pesant 200 g de jus et en portant à 500 g (F = 2,5) avec de l'eau purifiée de laboratoire (EN ISO 3696).

5. Mode opératoire

Porter 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. Effectuer la mesure conformément aux instructions opératoires du fabricant de l'appareil utilisé. Lire le pourcentage en masse de saccharose à une décimale près ou relever l'indice de réfraction avec quatre décimales. Effectuer au moins deux déterminations sur le même échantillon préparé. Relever la température t (en °C).

6. Calculs

6.1. Correction de température

- Appareils gradués en % en masse de saccharose : utiliser la table I pour la correction de température.

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													
	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
				RÉFÉRENCE										
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.

- Appareils gradués en indices de réfraction : reporter l'indice de réfraction mesuré (2ème colonne) dans le tableau II pour obtenir (colonne 1) la valeur correspondante du pourcentage en masse de saccharose (1ère colonne). Cette valeur est corrigée de la température et exprimée à 20 °C au moyen de la table I.

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 est également donnée.

Saccharose (%(m/m)	Indice de réfraction à 20 °C	Masse volumique à 20 °C	Sucres (g/L)	Sucres (g/kg)	TAV (% v/v) 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

Saccharose (%(m/m)	Indice de réfraction à 20 °C	Masse volumique à 20 °C	Sucres (g/L)	Sucres (g/kg)	TAV (% v/v) à 20 °C
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

Saccharose (%(m/m)	Indice de réfraction à 20 °C	Masse volumique à 20 °C	Sucres (g/L)	Sucres (g/kg)	TAV (% v/v) à 20 °C
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
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

Saccharose (%(m/m)	Indice de réfraction à 20 °C	Masse volumique à 20 °C	Sucres (g/L)	Sucres (g/kg)	TAV (% v/v) à 20 °C
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
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

Saccharose (%(m/m)	Indice de réfraction à 20 °C	Masse volumique à 20 °C	Sucres (g/L)	Sucres (g/kg)	TAV (% v/v) à 20 °C
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
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

Saccharose (%(m/m)	Indice de réfraction à 20 °C	Masse volumique à 20 °C	Sucres (g/L)	Sucres (g/kg)	TAV (% v/v) à 20 °C
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
30.0	1.38115	1.1287	308.9	273.7	18.36
30.1	1.38133	1.1292	310.1	274.6	18.43

Saccharose (%(m/m)	Indice de réfraction à 20 °C	Masse volumique à 20 °C	Sucres (g/L)	Sucres (g/kg)	TAV (% v/v) à 20 °C
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

Saccharose (%(m/m)	Indice de réfraction à 20 °C	Masse volumique à 20 °C	Sucres (g/L)	Sucres (g/kg)	TAV (% v/v) à 20 °C
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
35.0	1.39032	1.1537	370.5	321.1	22.02
35.1	1.39051	1.1542	371.8	322.1	22.10
35.2	1.39070	1.1547	373.0	323.0	22.17
35.3	1.39088	1.1552	374.3	324.0	22.24
35.4	1.39107	1.1557	375.5	324.9	22.32
35.5	1.39126	1.1563	376.8	325.9	22.39
35.6	1.39145	1.1568	378.0	326.8	22.46
35.7	1.39164	1.1573	379.3	327.8	22.54
35.8	1.39182	1.1578	380.6	328.7	22.62
35.9	1.39201	1.1583	381.8	329.6	22.69
36.0	1.39220	1.1588	383.1	330.6	22.77
36.1	1.39239	1.1593	384.4	331.5	22.84
36.2	1.39258	1.1598	385.6	332.5	22.92
36.3	1.39277	1.1603	386.9	333.4	22.99
36.4	1.39296	1.1609	388.1	334.4	23.06
36.5	1.39314	1.1614	389.4	335.3	23.14
36.6	1.39333	1.1619	390.7	336.3	23.22
36.7	1.39352	1.1624	392.0	337.2	23.30
36.8	1.39371	1.1629	393.2	338.1	23.37
36.9	1.39390	1.1634	394.5	339.1	23.45
37.0	1.39409	1.1640	395.8	340.0	23.52
37.1	1.39428	1.1645	397.0	341.0	23.59
37.2	1.39447	1.1650	398.3	341.9	23.67
37.3	1.39466	1.1655	399.6	342.9	23.75
37.4	1.39485	1.1660	400.9	343.8	23.83
37.5	1.39504	1.1665	402.1	344.7	23.90
37.6	1.39524	1.1671	403.4	345.7	23.97
37.7	1.39543	1.1676	404.7	346.6	24.05
37.8	1.39562	1.1681	406.0	347.6	24.13
37.9	1.39581	1.1686	407.3	348.5	24.21

Saccharose (%(m/m)	Indice de réfraction à 20 °C	Masse volumique à 20 °C	Sucres (g/L)	Sucres (g/kg)	TAV (% v/v) à 20 °C
38.0	1.39600	1.1691	408.6	349.4	24.28
38.1	1.39619	1.1697	409.8	350.4	24.35
38.2	1.39638	1.1702	411.1	351.3	24.43
38.3	1.39658	1.1707	412.4	352.3	24.51
38.4	1.39677	1.1712	413.7	353.2	24.59
38.5	1.39696	1.1717	415.0	354.2	24.66
38.6	1.39715	1.1723	416.3	355.1	24.74
38.7	1.39734	1.1728	417.6	356.0	24.82
38.8	1.39754	1.1733	418.8	357.0	24.89
38.9	1.39773	1.1738	420.1	357.9	24.97
39.0	1.39792	1.1744	421.4	358.9	25.04
39.1	1.39812	1.1749	422.7	359.8	25.12
39.2	1.39831	1.1754	424.0	360.7	25.20
39.3	1.39850	1.1759	425.3	361.7	25.28
39.4	1.39870	1.1765	426.6	362.6	25.35
39.5	1.39889	1.1770	427.9	363.6	25.43
39.6	1.39908	1.1775	429.2	364.5	25.51
39.7	1.39928	1.1780	430.5	365.4	25.58
39.8	1.39947	1.1786	431.8	366.4	25.66
39.9	1.39967	1.1791	433.1	367.3	25.74
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

Saccharose (%(m/m)	Indice de réfraction à 20 °C	Masse volumique à 20 °C	Sucres (g/L)	Sucres (g/kg)	TAV (% v/v) à 20 °C
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
45.0	1.40978	1.2065	500.9	415.1	29.77
45.1	1.40998	1.2071	502.2	416.1	29.85
45.2	1.41018	1.2076	503.6	417.0	29.93
45.3	1.41039	1.2082	504.9	417.9	30.01
45.4	1.41059	1.2087	506.3	418.9	30.09
45.5	1.41079	1.2093	507.7	419.8	30.17
45.6	1.41099	1.2098	509.0	420.7	30.25
45.7	1.41120	1.2104	510.4	421.7	30.33

Saccharose (%(m/m)	Indice de réfraction à 20 °C	Masse volumique à 20 °C	Sucres (g/L)	Sucres (g/kg)	TAV (% v/v) à 20 °C
45.8	1.41140	1.2109	511.7	422.6	30.41
45.9	1.41160	1.2115	513.1	423.5	30.49
46.0	1.41181	1.2120	514.5	424.5	30.58
46.1	1.41201	1.2126	515.8	425.4	30.65
46.2	1.41222	1.2131	517.2	426.3	30.74
46.3	1.41242	1.2137	518.6	427.3	30.82
46.4	1.41262	1.2142	519.9	428.2	30.90
46.5	1.41283	1.2148	521.3	429.1	30.98
46.6	1.41303	1.2154	522.7	430.1	31.06
46.7	1.41324	1.2159	524.1	431.0	31.15
46.8	1.41344	1.2165	525.4	431.9	31.22
46.9	1.41365	1.2170	526.8	432.9	31.31
47.0	1.41385	1.2176	528.2	433.8	31.39
47.1	1.41406	1.2181	529.6	434.7	31.47
47.2	1.41427	1.2187	530.9	435.7	31.55
47.3	1.41447	1.2192	532.3	436.6	31.63
47.4	1.41468	1.2198	533.7	437.5	31.72
47.5	1.41488	1.2204	535.1	438.5	31.80
47.6	1.41509	1.2209	536.5	439.4	31.88
47.7	1.41530	1.2215	537.9	440.3	31.97
47.8	1.41550	1.2220	539.2	441.3	32.04
47.9	1.41571	1.2226	540.6	442.2	32.13
48.0	1.41592	1.2232	542.0	443.1	32.21
48.1	1.41612	1.2237	543.4	444.1	32.29
48.2	1.41633	1.2243	544.8	445.0	32.38
48.3	1.41654	1.2248	546.2	445.9	32.46
48.4	1.41674	1.2254	547.6	446.8	32.54
48.5	1.41695	1.2260	549.0	447.8	32.63
48.6	1.41716	1.2265	550.4	448.7	32.71
48.7	1.41737	1.2271	551.8	449.6	32.79
48.8	1.41758	1.2277	553.2	450.6	32.88
48.9	1.41779	1.2282	554.6	451.5	32.96
49.0	1.41799	1.2288	556.0	452.4	33.04
49.1	1.41820	1.2294	557.4	453.4	33.13
49.2	1.41841	1.2299	558.8	454.3	33.21
49.3	1.41862	1.2305	560.2	455.2	33.29
49.4	1.41883	1.2311	561.6	456.2	33.38
49.5	1.41904	1.2316	563.0	457.1	33.46
49.6	1.41925	1.2322	564.4	458.0	33.54

Saccharose (%(m/m)	Indice de réfraction à 20 °C	Masse volumique à 20 °C	Sucres (g/L)	Sucres (g/kg)	TAV (% v/v) à 20 °C
49.7	1.41946	1.2328	565.8	458.9	33.63
49.8	1.41967	1.2333	567.2	459.9	33.71
49.9	1.41988	1.2339	568.6	460.8	33.79
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

Saccharose (%(m/m)	Indice de réfraction à 20 °C	Masse volumique à 20 °C	Sucres (g/L)	Sucres (g/kg)	TAV (% v/v) à 20 °C
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
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

Saccharose (%(m/m)	Indice de réfraction à 20 °C	Masse volumique à 20 °C	Sucres (g/L)	Sucres (g/kg)	TAV (% v/v) à 20 °C
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
60.0	1.44193	1.2937	716.6	553.9	42.59
60.1	1.44216	1.2943	718.1	554.8	42.68
60.2	1.44238	1.2949	719.6	555.7	42.77
60.3	1.44261	1.2956	721.1	556.6	42.85
60.4	1.44284	1.2962	722.7	557.5	42.95
60.5	1.44306	1.2968	724.2	558.4	43.04
60.6	1.44329	1.2974	725.7	559.4	43.13
60.7	1.44352	1.2980	727.3	560.3	43.22
60.8	1.44375	1.2986	728.8	561.2	43.31
60.9	1.44398	1.2993	730.3	562.1	43.40
61.0	1.44420	1.2999	731.8	563.0	43.49
61.1	1.44443	1.3005	733.4	563.9	43.59
61.2	1.44466	1.3011	734.9	564.8	43.68
61.3	1.44489	1.3017	736.4	565.7	43.76

Saccharose (%(m/m)	Indice de réfraction à 20 °C	Masse volumique à 20 °C	Sucres (g/L)	Sucres (g/kg)	TAV (% v/v) à 20 °C
61.4	1.44512	1.3024	738.0	566.6	43.86
61.5	1.44535	1.3030	739.5	567.6	43.95
61.6	1.44558	1.3036	741.1	568.5	44.04
61.7	1.44581	1.3042	742.6	569.4	44.13
61.8	1.44604	1.3049	744.1	570.3	44.22
61.9	1.44627	1.3055	745.7	571.2	44.32
62.0	1.44650	1.3061	747.2	572.1	44.41
62.1	1.44673	1.3067	748.8	573.0	44.50
62.2	1.44696	1.3074	750.3	573.9	44.59
62.3	1.44719	1.3080	751.9	574.8	44.69
62.4	1.44742	1.3086	753.4	575.7	44.77
62.5	1.44765	1.3092	755.0	576.6	44.87
62.6	1.44788	1.3099	756.5	577.5	44.96
62.7	1.44811	1.3105	758.1	578.5	45.05
62.8	1.44834	1.3111	759.6	579.4	45.14
62.9	1.44858	1.3118	761.2	580.3	45.24
63.0	1.44881	1.3124	762.7	581.2	45.33
63.1	1.44904	1.3130	764.3	582.1	45.42
63.2	1.44927	1.3137	765.8	583.0	45.51
63.3	1.44950	1.3143	767.4	583.9	45.61
63.4	1.44974	1.3149	769.0	584.8	45.70
63.5	1.44997	1.3155	770.5	585.7	45.79
63.6	1.45020	1.3162	772.1	586.6	45.89
63.7	1.45043	1.3168	773.6	587.5	45.98
63.8	1.45067	1.3174	775.2	588.4	46.07
63.9	1.45090	1.3181	776.8	589.3	46.17
64.0	1.45113	1.3187	778.3	590.2	46.25
64.1	1.45137	1.3193	779.9	591.1	46.35
64.2	1.45160	1.3200	781.5	592.0	46.44
64.3	1.45184	1.3206	783.0	592.9	46.53
64.4	1.45207	1.3213	784.6	593.8	46.63
64.5	1.45230	1.3219	786.2	594.7	46.72
64.6	1.45254	1.3225	787.8	595.6	46.82
64.7	1.45277	1.3232	789.3	596.5	46.91
64.8	1.45301	1.3238	790.9	597.4	47.00
64.9	1.45324	1.3244	792.5	598.3	47.10
65.0	1.45348	1.3251	794.1	599.3	47.19
65.1	1.45371	1.3257	795.6	600.2	47.28
65.2	1.45395	1.3264	797.2	601.1	47.38

Saccharose (%(m/m)	Indice de réfraction à 20 °C	Masse volumique à 20 °C	Sucres (g/L)	Sucres (g/kg)	TAV (% v/v) à 20 °C
65.3	1.45418	1.3270	798.8	602.0	47.47
65.4	1.45442	1.3276	800.4	602.9	47.57
65.5	1.45466	1.3283	802.0	603.8	47.66
65.6	1.45489	1.3289	803.6	604.7	47.76
65.7	1.45513	1.3296	805.1	605.6	47.85
65.8	1.45537	1.3302	806.7	606.5	47.94
65.9	1.45560	1.3309	808.3	607.4	48.04
66.0	1.45584	1.3315	809.9	608.3	48.13
66.1	1.45608	1.3322	811.5	609.2	48.23
66.2	1.45631	1.3328	813.1	610.1	48.32
66.3	1.45655	1.3334	814.7	611.0	48.42
66.4	1.45679	1.3341	816.3	611.9	48.51
66.5	1.45703	1.3347	817.9	612.8	48.61
66.6	1.45726	1.3354	819.5	613.7	48.70
66.7	1.45750	1.3360	821.1	614.6	48.80
66.8	1.45774	1.3367	822.7	615.5	48.89
66.9	1.45798	1.3373	824.3	616.3	48.99
67.0	1.45822	1.3380	825.9	617.2	49.08
67.1	1.45846	1.3386	827.5	618.1	49.18
67.2	1.45870	1.3393	829.1	619.0	49.27
67.3	1.45893	1.3399	830.7	619.9	49.37
67.4	1.45917	1.3406	832.3	620.8	49.46
67.5	1.45941	1.3412	833.9	621.7	49.56
67.6	1.45965	1.3419	835.5	622.6	49.65
67.7	1.45989	1.3425	837.1	623.5	49.75
67.8	1.46013	1.3432	838.7	624.4	49.84
67.9	1.46037	1.3438	840.3	625.3	49.94
68.0	1.46061	1.3445	841.9	626.2	50.03
68.1	1.46085	1.3451	843.6	627.1	50.14
68.2	1.46109	1.3458	845.2	628.0	50.23
68.3	1.46134	1.3464	846.8	628.9	50.33
68.4	1.46158	1.3471	848.4	629.8	50.42
68.5	1.46182	1.3478	850.0	630.7	50.52
68.6	1.46206	1.3484	851.6	631.6	50.61
68.7	1.46230	1.3491	853.3	632.5	50.71
68.8	1.46254	1.3497	854.9	633.4	50.81
68.9	1.46278	1.3504	856.5	634.3	50.90
69.0	1.46303	1.3510	858.1	635.2	51.00
69.1	1.46327	1.3517	859.8	636.1	51.10

Saccharose (%(m/m)	Indice de réfraction à 20 °C	Masse volumique à 20 °C	Sucres (g/L)	Sucres (g/kg)	TAV (% v/v) à 20 °C
69.2	1.46351	1.3524	861.4	636.9	51.19
69.3	1.46375	1.3530	863.0	637.8	51.29

7. Expression des résultats

Les résultats sont exprimés en pourcentage en masse de saccharose m/m (degrés Brix) avec deux décimales sur la base de la moyenne de deux déterminations. Dans le cas du jus de raisin concentré, multiplier le résultat par le facteur de dilution (F = 2,5).

8. Caractéristiques indicatives de la méthode

La méthode a fait l'objet d'une étude de validation afin d'évaluer sa pertinence pour la matrice jus de raisin, en tenant compte de la linéarité, des limites de détection et de quantification, et de l'exactitude de la méthode. Ce dernier paramètre a été déterminé en définissant le niveau de fidélité et de justesse de la méthode.

8.1. Linéarité de la méthode

Sur la base des résultats obtenus grâce à l'analyse de régression linéaire, la méthode s'est révélée linéaire pour les plages entre 10,0 °Bx et 69,2 °Bx indiquées dans le tableau III.

8.2. Limite de détection et limite de quantification

La limite de détection (LD) et la limite de quantification (LQ) ont été calculées à partir d'un jus de raisin dilué et analysé, et sont égales à trois fois l'écart type pour la LD et dix fois l'écart type pour la LQ (tableau III).

8.3. Fidélité de la méthode

Les paramètres pris en considération sont la répétabilité et la reproductibilité. Le tableau III indique les valeurs de ces paramètres. La répétabilité est exprimée par l'écart type de répétabilité (Sr) de sept mesures pour les concentrations suivantes : 15,9 °Bx et 69,2 °Bx.

La fidélité intermédiaire (FI) est exprimée par l'écart type (SFI) des mesures réalisées sur le même échantillon de jus de raisin par différents opérateurs.

Tableau III. Caractéristiques de la méthode.

Plage de linéarité (°Bx)	Coefficient de corrélation (r^2)	LD (°Bx)	LQ (°Bx)	Écart type de répétabilité (n = 7) S_r	Écart type de fidélité intermédiaire (FI) (n = 14) S_{FI}
10,0-69,2	0,9999	0,5	1,7	0,03 °Bx	0,04 °Bx

9. Bibliographie

- OIV. Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts. Méthode OIV-MA-AS2-02.
- BS EN ISO 3696, Eau pour laboratoire à usage analytique - Spécification et méthodes d'essai, 1995.

Méthode OIV-MA-G1-05

Méthode horizontale pour le dénombrement des coliformes — Méthode par comptage des colonies

(OIV-OENO 662M-2023)

Méthode microbiologique pour les jus de raisin, jus de raisin concentrés, jus de raisin reconstitués et nectars de raisin – référence à la norme ISO 4832:2006

Avant-propos

L'ISO (Organisation internationale de normalisation) est une fédération mondiale d'organismes nationaux de normalisation (comités membres de l'ISO). L'élaboration des Normes internationales est en général confiée aux comités techniques de l'ISO. Chaque comité membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du comité technique créé à cet effet. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO participent également aux travaux. L'ISO collabore étroitement avec la Commission électrotechnique internationale (CEI) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les Normes internationales sont rédigées conformément aux règles données dans les Directives ISO/CEI, Partie 2.

La tâche principale des comités techniques est d'élaborer les Normes internationales. Les projets de Normes internationales adoptés par les comités techniques sont soumis aux comités membres pour vote. Leur publication comme Normes internationales requiert l'approbation de 75 % au moins des comités membres votants.

L'attention est appelée sur le fait que certains des éléments du présent document peuvent faire l'objet de droits de propriété intellectuelle. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété intellectuelle.

L'ISO 4832 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, Produits alimentaires, sous-comité SC 9, Microbiologie.

Cette troisième édition de l'ISO 4832 annule et remplace l'ISO 4832:1991 et l'ISO 5541-1:1986. Les modifications sont les suivantes :

- la méthode alternative d'incubation à 35 LC a été supprimée (voir 4.2),
- un test de confirmation sur bouillon lactosé bilié au vert brillant a été introduit (voir 5.4 et 9.4).

Étant donné la nature des modifications par rapport à l'édition précédente de la présente Norme internationale, il est considéré que cette révision n'a pas de

conséquences sur la validation des méthodes alternatives basées sur l'ISO 4832:1991.

Introduction

En raison de la grande variété des produits alimentaires et des produits pour animaux, la méthode horizontale peut ne pas être totalement appropriée pour certains produits. Dans ce cas, des méthodes différentes spécifiques à ces produits peuvent être utilisées si cela est absolument nécessaire pour des raisons techniques justifiées. Néanmoins, tous les efforts doivent être faits pour appliquer cette méthode horizontale autant que faire se peut.

Lorsque la présente Norme internationale sera réexaminée, il sera tenu compte de tous les renseignements disponibles à ce moment-là, à savoir dans quelle mesure cette méthode horizontale a été suivie et les raisons pour lesquelles il aura été nécessaire d'y déroger dans le cas de produits particuliers.

L'harmonisation des méthodes d'essai ne peut pas être immédiate et, pour certains groupes de produits, des Normes internationales et/ou des normes nationales qui ne sont pas en conformité avec cette méthode horizontale peuvent exister. Il est souhaitable que, lorsqu'elles viendront en révision, elles soient alignées sur la présente Norme internationale pour que, finalement, les seules divergences restantes soient celles qui sont nécessaires pour des raisons techniques bien établies.

La technique décrite dans la présente Norme internationale est plus précise que celle décrite dans l'ISO 48316[1], mais elle ne permet pas d'effectuer un examen microbiologique sur une prise d'essai aussi importante. C'est donc la méthode à utiliser de préférence lorsqu'un grand nombre de coliformes est présent. D'autre part, la définition des « coliformes » adoptée dans les deux documents étant différente, on ne dénombre pas nécessairement les mêmes microorganismes. Pour chaque produit particulier, le choix de la technique sera précisé dans la Norme internationale concernant ce produit.

Pour les besoins d'une méthode d'essai efficace, la définition des « coliformes » donnée dans l'Article 3 et servant de base à la technique n'est pas nécessairement identique aux définitions correspondantes données dans d'autres textes publiés. La méthode décrite dans la présente Norme internationale ne détectera, en moyenne, qu'environ 90 % des souches de microorganismes désignés dans d'autres publications, sous le nom de « coliformes (présumés) » (par exemple certaines souches de Citrobacter, d'Enterobacter et de Klebsiella) (voir Référence [2]).

1. Domaine d'application

La présente Norme internationale donne des directives générales pour le dénombrement des coliformes. La présente Norme internationale s'applique à :

- des produits destinés à la consommation humaine et à l'alimentation des animaux, et à
- des échantillons environnementaux au voisinage de la production et de la manipulation des aliments,

par comptage des colonies après incubation à 30 °C ou 37 °C en milieu solide.

NOTE : Cette température faisant l'objet d'un accord entre les parties concernées. Dans le cas du lait et des produits laitiers, la température d'incubation est 30 °C.

Cette méthode est recommandée lorsque le nombre attendu est supposé être supérieur à 100 par millilitre ou par gramme d'échantillon testé.

2. Références normatives

Les documents de référence suivants sont indispensables pour l'application du présent document. Pour les références datées, seule l'édition citée s'applique. Pour les références non datées, la dernière édition du document de référence s'applique (y compris les éventuels amendements).

- ISO 6887 (toutes les parties), Microbiologie des aliments — Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique
- ISO 7218:—1), Microbiologie des aliments — Recommandations et règles générales pour les examens microbiologiques
- ISO 8261, Lait et produits laitiers — Lignes directrices générales pour la préparation des échantillons pour essai, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique
- ISO/TS 11133-1, Microbiologie des aliments — Guide pour la préparation et la production des milieux de culture — Partie 1 : Guide général pour l'assurance de la qualité pour la préparation des milieux de culture en laboratoire
- ISO/TS 11133-2:2003, Microbiologie des aliments — Guide pour la préparation et la production des milieux de culture — Partie 2 : Guide général pour les essais de performance des milieux de culture

3. Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions suivants s'appliquent.

3.1. Coliformes

Bactéries qui, à la température spécifiée (c'est-à-dire 30 °C ou 37 °C, selon accord), forment des colonies caractéristiques en gélose lactosée biliée au cristal

violet et au rouge neutre et qui, lors de l'essai de confirmation, fermentent le lactose avec production de gaz, lorsque l'essai est effectué dans les conditions spécifiées dans la présente Norme internationale.

Seules les parties informatives des normes sont consultables gratuitement. Pour un accès au contenu intégral, veuillez acquérir la norme de l'ISO.

Bibliographie

- [1] ISO 4831, Microbiologie des aliments — Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement des coliformes — Technique du nombre le plus probable.
- [2] EDWARDS, P.R. et EWING, W. H. Identification of Enterobacteriaceae, 3ème édition, Burgess Publishing Company, Minneapolis, Minnesota, États-Unis, 1972.
- [3] COWELL et MORISETTI. J. Sci. Food Agric. 20, 1969, pp. 573.
- [4] PITON et GRAPPIN. J. Assoc. of Anal. Chem. 74, 1991, pp. 92-103.
- [5] ALDRIDGE et al., « Report of the ministry of Agriculture, Fish and Food », Norwich, NR47UQ, Angleterre, 1993.

Méthode OIV-MA-G1-06

Méthode horizontale pour le dénombrement des Escherichia coli bêta-glucuronidase positive

(OIV-OENO 662N-2023)

Méthode microbiologique pour les jus de raisin, jus de raisin concentrés, jus de raisin reconstitués et nectars de raisin – référence à la norme ISO 16649-2:2001

Avant-propos

L'ISO (Organisation internationale de normalisation) est une fédération mondiale d'organismes nationaux de normalisation (comités membres de l'ISO). L'élaboration des Normes internationales est en général confiée aux comités techniques de l'ISO. Chaque comité membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du comité technique créé à cet effet. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO participent également aux travaux. L'ISO collabore étroitement avec la Commission électrotechnique internationale (CEI) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les Normes internationales sont rédigées conformément aux règles données dans les Directives ISO/CEI, Partie 3.

Les projets de Normes internationales adoptés par les comités techniques sont soumis aux comités membres pour vote. Leur publication comme Normes internationales requiert l'approbation de 75 % au moins des comités membres votants.

L'attention est appelée sur le fait que certains des éléments de la présente partie de l'ISO 16649 peuvent faire l'objet de droits de propriété intellectuelle. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété intellectuelle.

La Norme internationale ISO 16649-2 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, Produits alimentaires, sous-comité SC 9, Microbiologie.

L'ISO 16649 comprend les parties suivantes, présentées sous le titre général Microbiologie des aliments — Méthode horizontale pour le dénombrement des Escherichia coli β-glucuronidase positive :

- Partie 1 : Technique de comptage des colonies à 44 °C au moyen de membranes et de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-glucuronate
- Partie 2 : Technique de comptage des colonies à 44 °C au moyen de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-glucuronate
- Partie 3 : Technique du nombre le plus probable

Partie 2 : Technique de comptage des colonies à 44 °C au moyen de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-glucuronate

Introduction

En raison de la diversité des produits alimentaires et des produits pour animaux, il est possible que la présente méthode horizontale ne soit pas applicable dans tous ses détails à certains d'entre eux. Dans ce cas, des méthodes différentes, spécifiques à ces produits, pourront être utilisées si cela s'avère absolument nécessaire pour des raisons techniques justifiées. Néanmoins, tous les efforts doivent être faits pour appliquer cette méthode horizontale chaque fois que possible.

Lors du prochain réexamen périodique de la présente partie de l'ISO 16649, il sera tenu compte de toutes les évolutions intervenues depuis sa publication et, notamment, dans quelle mesure la présente méthode horizontale aura été suivie ainsi que les raisons des dérogations dans le cas de produits particuliers.

L'harmonisation de toutes les méthodes d'essai ne peut être réalisée de façon immédiate ; de ce fait, il peut déjà exister des Normes internationales et/ou nationales pour certains groupes de produits, qui ne concordent pas avec la présente méthode horizontale. Lorsque de telles normes viendront en révision, il serait souhaitable de les aligner avec les exigences de la présente partie de l'ISO 16649 et de ne conserver que les seules divergences justifiées indispensables pour des raisons techniques.

La présente Norme internationale décrit deux méthodes horizontales (ISO 16649-1 et ISO 16649-2) pour le dénombrement des Escherichia coli β-glucuronidase positive.

L'utilisateur peut choisir aussi bien l'ISO 16649-1 que l'ISO 16649-2. Les deux parties sont d'application générale. Toutefois, il est recommandé d'utiliser l'ISO 16649-1 pour les produits susceptibles de contenir des bactéries sévèrement stressées.

1. Domaine d'application

La présente partie de l'ISO 16649 spécifie une méthode horizontale pour le dénombrement des Escherichia coli β-glucuronidase positive dans des produits alimentaires destinés à la consommation humaine ou à l'alimentation des animaux. Elle utilise une technique de comptage des colonies après incubation à 44 °C sur un milieu solide contenant un substrat chromogénique pour la détection de l'enzyme β-glucuronidase.

AVERTISSEMENT — Certaines souches d'Escherichia coli qui ne poussent pas à 44 °C et, en particulier, celles qui sont β-glucuronidase négative, telles que les Escherichia coli O157, ne peuvent pas être mises en évidence.

2. Références normatives

Les documents normatifs suivants contiennent des dispositions qui, par suite de la référence qui y est faite, constituent des dispositions valables pour la présente partie de l'ISO 16649. Pour les références datées, les amendements ultérieurs ou les révisions de ces publications ne s'appliquent pas. Toutefois, les parties prenantes aux accords fondés sur la présente partie de l'ISO 16649 sont invitées à rechercher la possibilité d'appliquer les éditions les plus récentes des documents normatifs indiqués ci-après. Pour les références non datées, la dernière édition du document normatif en référence s'applique. Les membres de l'ISO et de la CEI possèdent le registre des Normes internationales en vigueur.

- ISO 6887-1, Microbiologie des aliments — Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologiqu
- Partie 1 : Règles générales pour la préparation de la suspension mère et des dilutions décimales.
- ISO 7218, Microbiologie des aliments — Règles générales pour les examens microbiologiques.

3. Termes et définitions

Pour les besoins de la présente partie de l'ISO 16649, les termes et définitions suivants s'appliquent.

3.1. Escherichia coli β-glucuronidase positive

Bactéries qui, à 44 °C, forment des colonies bleues caractéristiques sur le milieu tryptone-bile-glucuronide (TBX), dans les conditions spécifiées dans la présente partie de l'ISO 16649.

3.2. Dénombrement des Escherichia coli β-glucuronidase positive

Détermination du nombre d'unités formant colonie (UFC) d'Escherichia coli β-glucuronidase positive, par millilitre ou par gramme d'échantillon, lorsque l'essai et les calculs sont effectués selon la méthode spécifiée dans la présente partie de l'ISO 16649.

Seules les parties informatives des normes sont consultables gratuitement. L'accès au contenu intégral de la norme est payant. Pour acquérir la norme, cliquez sur « Acheter ».

Bibliographie

- [1] BLAZKO, N., « Evaluation of the β-glucuronidase substrate 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide in a 24 hour direct plating method for Escherichia coli », J. Food Protection, 51, pp. 402.
- [2] DAMARE, J.M., CAMPBELL, D.F. et JOHNSON, R.W., « Simplified direct plating method for enhanced recovery of Escherichia coli in food », Journal of Food Science, 50, 1985, pp. 1736-1737, 1746.
- [3] DELISLE, G.L. et LEY, A., « Rapid detection of Escherichia coli in urine samples by a new chromogenic β-glucuronidase assay », J. Clin. Microbiol., 27, 1989, pp. 778-779.
- [4] KILIAN, M. et BULOW, P., « Rapid diagnosis of Enterobacteriaceae. Detection of bacterial glycosidases », Acta Pathol. Microbiol. Scand., Sect. B, 84, 1976, pp. 245-251.
- [5] KILIAN, M. et BULOW, P., « Rapid identification of Enterobacteriaceae. Use of a β-glucuronidase detecting agar medium (PGUA agar) for the identification of Escherichia coli in primary cultures of urine samples », Acta Pathol. Microbiol. Scand., Sect. B, 87, 1979, pp. 271-276.
- [6] LEY, A.N., BOWERS, R.J. et WOLFE, S., « Indoxyl-β-D-glucuronide, a novel chromogenic reagent for the specific detection and enumeration of Escherichia coli in environmental sample », Canadian Journal of Microbiology, 34, 1988, pp. 690-693.
- [7] MANAFI, M. et KNEIFEL, W., « A combined chromogenic-fluorogenic medium for the simultaneous detection of total coliforms and E. coli in water », Zentralbl. Hyg., 189, 1989, pp. 225-234.
- [8] OGDEN, I.D. et WATT, A.J., « An evaluation of fluorogenic and chromogenic assays for the direct enumeration of Escherichia coli », Letters in Applied Microbiology, 13, 1991, pp. 212-215.
- [9] RESTAINO, L., FRAMPTON, E.W. et LYON, R.H., « Use of chromogenic substrate 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide (X-GLUC) for enumeration of Escherichia coli on 24 hours from ground beef », J. Food Protection, 53 (6), 1990, pp. 508-510.
- [10] WATKINS, W.D., RIPPEY, S.C., CLAVET, C.R., KELLY-REITZ, D.J. et BURKHARDT W., « Novel compound for identifying Escherichia coli », Applied Enviromental Microbiology, 54, 1988, pp. 1874-1875.

Méthode OIV-MA-G1-07

Méthode horizontale pour le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive

(OIV-OENO 662O-2023)

Méthode microbiologique pour les jus de raisin, jus de raisin concentrés, jus de raisin reconstitués et nectars de raisin – référence à la norme ISO 6888-2:2021

Avant-propos

L'ISO (Organisation internationale de normalisation) est une fédération mondiale d'organismes nationaux de normalisation (comités membres de l'ISO). L'élaboration des Normes internationales est en général confiée aux comités techniques de l'ISO. Chaque comité membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du comité technique créé à cet effet. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO participent également aux travaux. L'ISO collabore étroitement avec la Commission électrotechnique internationale (CEI) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les procédures utilisées pour élaborer le présent document et celles destinées à sa mise à jour sont décrites dans les Directives ISO/CEI, Partie 1. Il convient, en particulier de prendre note des différents critères d'approbation requis pour les différents types de documents ISO. Le présent document a été rédigé conformément aux règles de rédaction données dans les Directives ISO/CEI, Partie 2 (voir www.iso.org/directives).

L'attention est attirée sur le fait que certains des éléments du présent document peuvent faire l'objet de droits de propriété intellectuelle. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété intellectuelle. Les détails concernant les références aux droits de propriété intellectuelle identifiés lors de l'élaboration du document sont indiqués dans l'Introduction et/ou dans la liste des déclarations de brevets reçues par l'ISO (voir www.iso.org/brevets).

Les appellations commerciales éventuellement mentionnées dans le présent document sont données pour information, par souci de commodité, à l'intention des utilisateurs et ne sauraient constituer un engagement.

Pour une explication de la nature volontaire des normes, la signification des termes et expressions spécifiques de l'ISO liés à l'évaluation de la conformité, ou pour toute information au sujet de l'adhésion de l'ISO aux principes de l'Organisation mondiale du commerce (OMC) concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir le lien suivant : www.iso.org/iso/fr/avant-propos.

Le présent document a été élaboré par le comité technique ISO/TC 34, Produits alimentaires, sous-comité SC 9, Microbiologie, en collaboration avec le comité technique CEN/TC 463, Microbiologie de la chaîne alimentaire, du Comité européen de normalisation (CEN), conformément à l'Accord de coopération technique entre l'ISO et le CEN (Accord de Vienne).

Cette seconde édition annule et remplace la première édition (ISO 6888-2:1999), qui a fait l'objet d'une révision technique. Elle intègre également l'Amendement de l'ISO 6888-2:1999/Amd 1:2003. Les principales modifications par rapport à l'édition précédente sont les suivantes :

- le titre a été modifié pour faire référence à la « chaîne alimentaire » ;
- le statut de l'ISO 6888-1 et du présent document a été clarifié ;
- le document a été aligné sur l'ISO 7218:2007, c'est-à-dire qu'il indique de verser le milieu gélosé fondu à une température comprise entre 44 °C et 47 °C ;
- toutes les occurrences de « 35 °C ou 37 °C », le cas échéant, ont été remplacées par « entre 34 °C et 38 °C » ;
- toutes les occurrences des durées d'incubation « 18 h à 24 h », le cas échéant, ont été remplacées par « 24 h ± 2 h » ;
- des exigences ont été ajoutées pour utiliser l'ISO 11133 ;
- toutes les normes disponibles concernant les techniques de prélèvement ont été mises à jour ;
- le mode opératoire sous forme de logigramme à l'Annexe A a été mis à jour ;
- les milieux de culture et les réactifs avec essais de performance ont été ajoutés et déplacés à l'Annexe B ;
- les essais de performance pour le milieu gélosé au plasma de lapin et au fibrinogène (RPFA) ont été ajoutés ;
- les résultats de l'étude interlaboratoires (selon les données de fidélité de l'ISO 6888-2:1999/Amendement 1:2003) ont été mis à jour;
- la Bibliographie a été mise à jour.

Une liste de toutes les parties de la série ISO 6888 se trouve sur le site web de l'ISO.

Il convient que l'utilisateur adresse tout retour d'information ou toute question concernant le présent document à l'organisme national de normalisation de son pays. Une liste exhaustive desdits organismes se trouve à l'adresse www.iso.org/fr/members.html.

Introduction

L'ISO 6888-1, le présent document et l'ISO 6888-3 décrivent trois méthodes horizontales pour la détection et le dénombrement de staphylocoques à coagulase

positive parmi lesquels se trouvent les souches entérotoxinogènes. Il s'agit principalement de Staphylococcus aureus, mais également de S. intermedius et de certaines souches de S. hyicus.

Pour les besoins du présent document, la caractérisation des staphylocoques repose sur une réaction positive à la coagulase, mais il est reconnu que certaines souches de Staphylococcus aureus donnent une réaction faiblement positive à la coagulase. Ces dernières souches peuvent être confondues avec d'autres bactéries, mais elles peuvent être distinguées en utilisant des essais complémentaires non inclus dans le présent document, tels que la sensibilité à la lysostaphine, et pour la production d'hémolysine, de nucléase thermostable et d'acide à partir de mannitol (voir l'ISO 7218 et la Référence [13]).

Les principales modifications techniques listées dans l'avant-propos qui ont été apportées au présent document par rapport à la précédente édition sont considérées comme mineures (voir l'ISO 17468). Elles ont un impact mineur sur les caractéristiques de performance de la méthode.

Les résultats de l'étude interlaboratoires et les échantillons soumis à essai sont décrits à l'Annexe C.

AVERTISSEMENT : Afin de préserver la santé du personnel de laboratoire, il est essentiel que les essais de dénombrement des staphylocoques ne soient effectués que dans des laboratoires correctement équipés, sous la surveillance d'un microbiologiste expérimenté, et qu'un grand soin soit apporté à l'élimination de tous les matériaux incubés. Il convient que les utilisateurs du présent document maîtrisent les pratiques courantes de laboratoire. Le présent document ne prétend pas aborder la totalité des aspects liés à la sécurité qui pourraient découler de son utilisation. Il incombe à l'utilisateur de ce document d'établir des pratiques appropriées en matière d'hygiène et de sécurité.

1. Domaine d'application

Le présent document spécifie une méthode horizontale de dénombrement des staphylocoques à coagulase positive par comptage des colonies obtenues en milieu solide (milieu gélosé au plasma de lapin et au fibrinogène) après incubation en aérobiose entre 34 °C et 38 °C (voir la Référence [10]).

Le présent document s'applique aux :

- produits destinés à la consommation humaine ;
- produits destinés à l'alimentation des animaux ;
- échantillons environnementaux prélevés dans les secteurs de la production et de la distribution des aliments et des aliments pour animaux; et
- échantillons prélevés au stade de production primaire.

Cette méthode horizontale a été élaborée à l'origine pour l'examen de tous les échantillons appartenant à la chaîne alimentaire.

En raison de la grande diversité des produits de la chaîne alimentaire, il est possible que cette méthode horizontale ne soit pas entièrement appropriée à tous les produits. Néanmoins, il est attendu que les modifications requises soient réduites le plus possible afin de ne pas s'écarter de manière significative de cette méthode horizontale.

D'après les informations disponibles au moment de la publication du présent document, cette méthode n'est pas considérée comme étant (complètement) adaptée à l'examen des produits fermentés ou d'autres produits contenant une flore technologique fondée sur Staphylococcus spp. (par exemple, S. xylosus) (tels que les fromages à base de lait cru et certains produits à base de viande crue) susceptibles d'être contaminés par :

- des staphylocoques formant des colonies non caractéristiques sur un milieu gélosé de Baird-Parker ;
- une flore annexe pouvant masquer les colonies recherchées.

Néanmoins, l'ISO 6888-1 et le présent document bénéficient d'un statut équivalent.

2. Références normatives

Les documents suivants sont cités dans le texte de sorte qu'ils constituent, pour tout ou partie de leur contenu, des exigences du présent document. Pour les références datées, seule l'édition citée s'applique. Pour les références non datées, la dernière édition du document de référence s'applique (y compris les éventuels amendements).

- ISO 6887 (toutes les parties), Microbiologie de la chaîne alimentaire — Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique
- ISO 7218, Microbiologie des aliments — Exigences générales et recommandations
- ISO 11133, Microbiologie des aliments, des aliments pour animaux et de l'eau — Préparation, production, stockage et essais de performance des milieux de culture

3. Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions suivants s'appliquent.

L'ISO et la CEI tiennent à jour des bases de données terminologiques destinées à être utilisées en normalisation, consultables aux adresses suivantes :

- Plateforme de consultation en ligne de l'ISO : disponible à l'adresse https://www.iso.org/obp ;
- Electropedia de la CEI : disponible à l'adresse http://www.electropedia.org/.

3.1. Staphylocoques à coagulase positive

Bactéries formant des colonies caractéristiques dans un milieu de culture sélectif (milieu gélosé au plasma de lapin et au fibrinogène).

Note 1 à l'article : Les colonies caractéristiques sont décrites en 9.3.

3.2. Dénombrement des staphylocoques à coagulase positive

Détermination du nombre de staphylocoques à coagulase positive (3.1) par gramme, millilitre, centimètre carré ou dispositif de prélèvement/zone de prélèvement

Note 1 à l'article : Une zone de prélèvement est une zone qui n'est pas définie par une taille numérique, par exemple un robinet d'eau chaude ou une poignée de porte.

Seules les parties informatives des normes sont consultables gratuitement. L'accès au contenu intégral de la norme est payant. Pour acquérir la norme, cliquez sur « Acheter ».

Bibliographie

- [1] ISO 707, Lait et produits laitiers — Lignes directrices pour l'échantillonnage
- [2] ISO 6888-1, Microbiologie de la chaîne alimentaire — Méthode horizontale pour le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive (Staphylococcus aureus et autres espèces) — Partie 1 : Technique utilisant le milieu gélosé de Baird-Parker
- [3] ISO 6888-3, Microbiologie des aliments — Méthode horizontale pour le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive (Staphylococcus aureus et autres espèces) — Partie 3 : Recherche et méthode NPP pour les faibles nombres
- [4] ISO 13307, Microbiologie des aliments — Stade de production primaire — Techniques de prélèvement
- [5] ISO 16140:2003, Microbiologie des aliments — Protocole pour la validation des méthodes alternatives
- [6] ISO 17604, Microbiologie de la chaîne alimentaire — Prélèvement d'échantillons sur des carcasses en vue de leur analyse microbiologique

- [7] ISO 17468, Microbiologie de la chaîne alimentaire — Exigences et recommandations techniques pour le développement ou la révision d'une méthode de référence normalisée
- [8] ISO/TS 17728, Microbiologie de la chaîne alimentaire — Techniques de prélèvement pour l'analyse microbiologique d'échantillons d'aliments
- [9] ISO 18593, Microbiologie de la chaîne alimentaire — Méthodes horizontales pour les prélèvements de surface
- [10] FIL 145A:1997, Lait et produits à base de lait — Dénombrement des staphylocoques coagulase-positifs — Technique de comptage des colonies
- [11] Boothby, J., Genigeorgis, C. et Fanelli, M.J., « Tandem Coagulase / Thermonuclease Agar Method for the Detection of Staphylococcus aureus », Appl. and Environmental microbiology, 1979, Vol. 37, pp. 298-302.
- [12] De Buyser, M.L., Lombard, B., Schulten, S.M., In't Veld, P.H., Scotter, S.L., Rollier, P. et Lahellec, C., "Validation of EN ISO standard methods 6888 part 1 and part 2:1999, Enumeration of coagulase-positive staphylococci in foods", Int. J. Food Microbiol., 2003, 83(2), pp. 185-194.
- [13] Kloos ,W.E., « Systematics and the natural history of staphylococci », Staphylococci, J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl., 1990, 69, pp. 25 s-37 s; et Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2eme édition, Vol 3, 2009, pp. 372-421.

Méthode OIV-MA-G1-08

Méthode horizontale pour le dénombrement des microorganismes

(OIV-OENO 662P-2023)

Méthode microbiologique pour les jus de raisin, jus de raisin concentrés, jus de raisin reconstitués et nectars de raisin – référence à la norme ISO 4833-1:2013 et ISO 4833-2:2013

Avant-propos

L'ISO (Organisation internationale de normalisation) est une fédération mondiale d'organismes nationaux de normalisation (comités membres de l'ISO). L'élaboration des Normes internationales est en général confiée aux comités techniques de l'ISO. Chaque comité membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du comité technique créé à cet effet. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO participent également aux travaux. L'ISO collabore étroitement avec la Commission électrotechnique internationale (CEI) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les procédures utilisées pour élaborer le présent document et celles destinées à sa mise à jour sont décrites dans les Directives ISO/CEI, Partie 1. Il convient, en particulier, de prendre note des différents critères d'approbation requis pour les différents types de documents ISO. Le présent document a été rédigé conformément aux règles de rédaction données dans les Directives ISO/CEI, Partie 2, www.iso.org/directives.

L'attention est appelée sur le fait que certains des éléments du présent document peuvent faire l'objet de droits de propriété intellectuelle. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété intellectuelle. Les détails concernant les références aux droits de propriété intellectuelle ou autres droits analogues identifiés lors de l'élaboration du document sont indiqués dans l'Introduction et/ou sur la liste ISO des déclarations de brevets reçues, www.iso.org/brevets.

Les éventuelles appellations commerciales utilisées dans le présent document sont données pour information à l'intention des utilisateurs et ne constituent pas une approbation ou une recommandation.

Le comité chargé de l'élaboration du présent document est l'ISO/TC 34, Produits alimentaires, sous-comité SC 9, Microbiologie.

Cette première édition, conjointement avec l'ISO 4833-2, annule et remplace l'ISO 4833:2003.

L'ISO 4833 comprend les parties suivantes, présentées sous le titre général Microbiologie de la chaîne alimentaire — Méthode horizontale pour le dénombrement des microorganismes :

- Partie 1 : Comptage des colonies à 30 °C par la technique d'ensemencement en profondeur
- Partie 2 : Comptage des colonies à 30 °C par la technique d'ensemencement en surface

Partie 1 : Comptage des colonies à 30 °C par la technique d'ensemencement en profondeur

1. Domaine d'application

La présente partie de l'ISO 4833 spécifie une méthode horizontale de dénombrement des microorganismes capables de se développer et de former des colonies dans un milieu solide après incubation aérobie à 30 °C. La méthode est applicable :

a. aux produits destinés à la consommation humaine et aux aliments pour animaux ;
b. aux échantillons d'environnement dans le domaine de la production et de la manipulation d'aliments destinés à l'homme ou aux animaux.

La présente partie de l'ISO 4833 est applicable :

1. aux produits qui exigent un comptage fiable lorsqu'une limite de détection basse est spécifiée (inférieure à 102/g ou 102/mL pour des échantillons liquides ou inférieure à 103/g pour des échantillons solides) ;
2. aux produits supposés contenir des colonies envahissantes qui masquent les colonies d'autres organismes, par exemple le lait et les produits laitiers susceptibles de contenir diverses espèces envahissantes de Bacillus.

La présente partie de l'ISO 4833 peut ne pas être adaptée à l'analyse de certains aliments fermentés et aliments pour animaux et d'autres milieux ou conditions d'incubation peuvent être plus appropriés. Toutefois, cette méthode peut être appliquée à de tels produits même si elle ne détecte pas efficacement les microorganismes présents en majorité dans ces produits.

Pour certaines matrices, la méthode spécifiée dans la présente partie de l'ISO 4833 peut donner des résultats différents de ceux obtenus avec la méthode spécifiée dans l'ISO 4833-2.

2. Références normatives

Les documents suivants, en tout ou partie, sont référencés de manière normative dans le présent document et sont indispensables pour son application. Pour les

références datées, seule l'édition citée s'applique. Pour les références non datées, la dernière édition du document de référence s'applique (y compris les éventuels amendements).

- ISO 6887 (toutes les parties), Microbiologie des aliments — Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique
- ISO 7218, Microbiologie des aliments — Exigences générales et recommandations
- ISO 11133, Microbiologie des aliments, des aliments pour animaux et de l'eau — Préparation, production, stockage et essais de performance des milieux de culture

3. Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions suivants s'appliquent.

3.1. Microorganisme

Entité de taille microscopique, comprenant les bactéries, les champignons, les protozoaires et les virus.

[SOURCE :ISO/TS 11139:2006,3 2.26]

Note 1 à l'article : Pour les besoins de la présente partie de l'ISO 4833, les microorganismes sont des bactéries, levures et moisissures capables de produire des colonies dans les conditions spécifiées dans la présente partie de l'ISO 4833.

Seules les parties informatives des normes sont consultables gratuitement. L'accès au contenu intégral de la norme est payant. Pour acquérir la norme, cliquez sur « Acheter ».

Bibliographie

- [1] ISO 835, Verrerie de laboratoire — Pipettes graduées
- [2] ISO 8655-2, Appareils volumétriques à piston — Partie 2 : Pipettes à piston
- [3] ISO/TS 11139:2006, Stérilisation des produits de santé — Vocabulaire
- [4] Piton, C. et Grappin, R., « A model for statistical evaluation of precision parameters of microbiological methods: Application to dry rehydratable film methods and IDG reference methods for enumeration of total aerobic mesophilic flora and coliforms in raw milk », J. Assoc. Off. Anal. Chem., 1991, 74, pp. 92-103.
- [5] Scotter, S., Aldridge, M., Back, J. et Wood R., « Validation of European Community methods for microbiological and chemical analysis of raw and heat-treated milk « J. Assoc. Public Anal., 1993, 29, pp. 1-32.

- [6] Dahms, S. et Weiss, H., « Estimation of precision values for microbiological reference methods: Standardized pour plate technique », Milchwissenschaft, 1988, 53, pp. 555-559.
- [7] WORLD DATA CENTRE FOR MICROORGANISMS, Reference strain catalogue pertaining to organisms for performance testing culture media. Disponible (consulté le 2013-03-06) à l'adresse : http://www.wfcc.info/pdf/WDCM_Reference_Strain_Catalogue.pdf

Partie 2 : Comptage des colonies à 30 °C par la technique d'ensemencement en surface

1. Domaine d'application

La présente partie de l'ISO 4833 spécifie une méthode horizontale de dénombrement des microorganismes capables de se développer et de former des colonies à la surface d'un milieu solide après incubation aérobie à 30 °C. La méthode est applicable :

a. aux produits destinés à la consommation humaine ou aux aliments pour animaux ;

b. aux échantillons d'environnement dans le domaine de la production et la manipulation d'aliments destinés à l'homme ou aux animaux.

La présente partie de l'ISO 4833 est applicable :

3. aux produits contenant des organismes sensibles à la chaleur susceptibles de former une partie significative de l'ensemble de la flore (par exemple des organismes psychrotrophes présents dans des aliments réfrigérés et congelés, des aliments secs, d'autres aliments pouvant contenir des organismes sensibles à la chaleur) ;
4. aux produits contenant des bactéries aérobies strictes susceptibles de former une partie significative de l'ensemble de la flore (par exemple Pseudomonas spp.) ;
5. aux produits contenant de petites particules qu'il peuvent se révéler difficile de distinguer des colonies dans une boîte ensemencée en profondeur ;
6. aux produits dont la couleur intense empêche la reconnaissance des colonies dans une boîte ensemencée en profondeur ;
7. aux produits pour lesquels il est nécessaire de faire la différence entre les différents types de colonies dans le cadre de l'évaluation de la qualité des aliments.

En plus de la technique d'ensemencement en surface manuelle, la présente partie de l'ISO 4833 spécifie également l'utilisation d'un dispositif d'ensemencement en spirale, méthode rapide de dénombrement des colonies en surface (Annexe A).

La présente partie de l'ISO 4833 peut ne pas être adaptée à l'analyse de certains aliments fermentés et aliments pour animaux et d'autres milieux ou conditions d'incubation peuvent être plus appropriés. Toutefois, cette méthode peut être appliquée à de tels produits, même si elle ne détecte pas efficacement les microorganismes présents en majorité dans ces produits.

Pour certaines matrices, la méthode décrite dans la présente partie de l'ISO 4833 peut donner des résultats différents de ceux obtenus avec la méthode décrite dans l'ISO 4833-1.

2. Références normatives

Les documents ci-après, dans leur intégralité ou non, sont des références normatives indispensables à l'application du présent document. Pour les références datées, seule l'édition citée s'applique. Pour les références non datées, la dernière édition du document de référence s'applique (y compris les éventuels amendements).

- ISO 6887 (toutes les parties), Microbiologie des aliments — Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique
- ISO 7218, Microbiologie des aliments — Exigences générales et recommandations
- ISO 11133, Microbiologie des aliments, des aliments pour animaux et de l'eau — Préparation, production, stockage et essais de performance des milieux de culture

3. Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions suivants s'appliquent.

3.1. Microorganisme

Entité de taille microscopique, comprenant les bactéries, les champignons, les protozoaires et les virus.

[SOURCE :ISO/TS 11139:2006,3 2.26]

Note 1 à l'article : Pour les besoins de la présente partie de l'ISO 4833, les microorganismes sont des bactéries, levures et moisissures capables de produire des colonies dans les conditions spécifiées dans la présente partie de l'ISO 4833.

Seules les parties informatives des normes sont consultables gratuitement. L'accès au contenu intégral de la norme est payant. Pour acquérir la norme, cliquez sur « Acheter ».

Bibliographie

- [1] ISO 835, Verrerie de laboratoire — Pipettes graduées
- [2] ISO 8655-2, Appareils volumétriques à piston — Partie 2 : Pipettes à piston
- [3] ISO/TS 11139:2006, Stérilisation des produits de santé — Vocabulaire
- [4] ISO 17410, Microbiologie des aliments — Méthode horizontale pour le dénombrement des micro-organismes psychrotrophes
- [5] BS 4285-2.3:19841, Microbiological examination for dairy purposes. Methods of general application for enumeration of microorganisms. Enumeration of microorganisms by surface plate technique for colony count
- [6] AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, Standard methods for the examination of dairy products. APHA, Washington, DC, 17ème édition, 2004.
- [7] AOAC INTERNATIONAL, 977.27 Spiral Plate method., Official methods of analysis, Gaithersburg, MD, AOAC, 19ème édition, 2012.
- [8] Roberts, D. et Greenwood, M., « Enumeration of microorganisms. In: Practical food microbiology », Blackwell, Oxford, 3ème édition, 2003, pp. 105-29.
- [9] Maturin, L. et Peeler, J. T, « Aerobic plate count », Bacteriological analytical manual, Silver Spring, MD, US Food and Drug Administration, 2001, chapitre 3. Disponible à l'adresse (consulté le 2012-07-13) : http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm063346.htm
- [10] Greenwood, M.H., Coetzee, E.F.C., Ford, B.M., Gill, P., Hooper, W.L., Matthews, S.C. et al., « The microbiology of selected retail food products with an evaluation of viable counting methods », J. Hyg. (Lond.), 1984, 92, pp. 67-77.
- [11] INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS, Microorganisms in foods. 1 Their significance et methods of enumeration, University of Toronto Press, Londres, 2ème edition, 1978.
- [12] Gilchrist, J.E., Donnelly, C.B., Peeler, J.T.et Campbell, J.E., « Collaborative study comparing the spiral plate and aerobic plate count methods », J. Assoc. Off. Anal. Chem., 1977, 60, pp. 807-812.
- [13] Jarvis, B., Lach, V.H. et Wood, J.M., « Evaluation of the spiral plate maker for the enumeration of microorganisms in foods », J. Appl. Bacteriol., 1977, 43, pp. 149-157.
- [14] Kramer, J.M. et Gilbert R.J., « Enumeration of micro-organisms in food: A comparative study of five methods », J. Hyg. (Lond.), 1978, 81, pp. 151-159.

- [15] WORLD DATA CENTRE FOR MICROORGANISMS, Reference strain catalogue pertaining to organisms for performance testing culture media. Disponible à l'adresse (2012-07-13) : http://www.wfcc.info/pdf/WDCM_Reference_Strain_Catalogue.pdf

Méthode OIV-MA-G1-09 **Méthode de type IV**

Dosage des éléments minéraux des jus de raisin, jus de raisin reconstitués, jus de raisin concentrés et nectars de raisin par ICP/AES (spectrométrie d'émission atomique à plasma à couplage inductif)

(OIV-OENO 662K-2024)

1. Avertissement

PRÉCAUTIONS DE SÉCURITÉ — Il convient, lors de la manipulation des acides, que les opérateurs protègent leurs mains et leurs yeux. La manipulation des acides doit être effectuée sous une hotte appropriée.

2. Domaine d'application

La présente méthode spécifie une méthode de spectrométrie d'émission atomique à plasma à couplage inductif (ICP-AES) pour la détermination de la teneur des éléments suivants dans les jus de raisin, jus de raisin reconstitués, jus de raisin concentrés et nectars de raisin :

Éléments minéraux majeurs :

- Potassium (jusqu'à 3000 mg/L),
- Calcium (jusqu'à 800 mg/L),
- Magnésium (jusqu'à 1080 mg/L),
- Sodium (jusqu'à 40 mg/L).

Éléments minéraux mineurs :

- Fer (0,2 mg/L à 10,0 mg/L),
- Cuivre (0,1 mg/L à 5,0 mg/L),
- Zinc (0,5 mg/L à 10,0 mg/L),
- Strontium (0,1 mg/L à 3,0 mg/L),
- Aluminium (0,2 mg/L à 5 mg/L),
- Baryum (0,1 mg/L à 5,0 mg/L).

3. Principe

3.1. Analyse simultanée des éléments majeurs et mineurs

La préparation des échantillons proposée dans cette méthode est une dilution au 1/5 de façon à pouvoir analyser aussi bien les éléments majeurs que les éléments mineurs.

La gamme d'étalonnage contient de l'acide nitrique (HNO_3 à 1 %, v/v) qui permet de stabiliser les solutions. Dans la présente méthode, il est recommandé d'utiliser les raies Sc 335,372 (scandium à 5 mg/L) et Cs 697,327 (césium à 1 %, m/v, sous forme de $CsNO_3$) comme étalon interne afin de minimiser l'impact des autres interférences non spectrales.

D'autres étalons internes, choisis judicieusement, peuvent également être utilisés afin d'optimiser la méthode, tel que $Y_{371,029}$.

Le césium, sous forme de $CsNO_3$, utilisé comme étalon interne a également un rôle de tampon ionique. La présence de ce tampon fixe ainsi les équilibres d'ionisation des autres constituants. Le chlorure de césium, CsCl, peut également être utilisé comme tampon ionique.

Les étalons internes et le tampon ionique sont préparés dans une même fiole et ainsi conduits jusqu'à l'échantillon par l'ajout d'une troisième voie au niveau de la pompe péristaltique avant de parvenir en un mélange homogène jusqu'au nébuliseur.

3.2. Analyse des éléments majeurs uniquement

L'analyse seule des éléments majeurs est également réalisable en procédant à une dilution au 1/50ème de l'échantillon. De l'acide nitrique (HNO_3 à 1 %, v/v) est ajouté dans les étalons et dans les échantillons afin de stabiliser les solutions.

Compte-tenu de la dilution effectuée, les effets de matrice sont considérés comme négligeables. Il ne sera pas nécessaire d'utiliser des étalons internes.

4. Réactifs et matériaux

Sauf indications contraires, utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue

4.1. Eau ultra pure ou de qualité équivalente, conformément à la norme ISO 3696
4.2. Solution(s) certifiée(s) mono élémentaire(s) (à 1000 mg/L ou 10 000 mg/L) pour les éléments minéraux ainsi que pour l'étalon interne (scandium par exemple)
4.3. Contrôle interne : matériau de référence certifié (jus de raisin, jus de raisin reconstitué, jus de raisin concentré et nectar de raisin) ou échantillon issu d'un programme d'essais d'aptitude, comportant les éléments analysés
4.4. Acide nitrique de concentration supérieure à 60 % (pour analyse de traces) (n° CAS : 7697-37-2)
4.5. Solution d'acide nitrique à 1 % (v/v)

Préparer une solution d'acide nitrique à 1 % : introduire de l'eau (4.1) dans la fiole jaugée, ajouter 10 mL d'acide nitrique (4.4) dans une fiole de 1000 mL (5.3) et compléter au volume avec de l'eau (4.1).

Pour préparer une solution d'acide nitrique à 1 %, introduire de l'eau (4.1) dans la fiole jaugée.

4.6. Solution d'acide nitrique à 10 %

Préparer une solution d'acide nitrique à 10 % (v/v) : introduire de l'eau (4.1) dans la fiole jaugée, ajouter 100 mL d'acide nitrique (4.4) dans une fiole de 1000 mL (5.3) et compléter au volume avec de l'eau (4.1).

4.7. Argon, d'une pureté minimale de 99,999 %

5. Appareillage

5.1. Spectromètre d'émission optique avec excitation en plasma argon induit et système dispersif (pour les longueurs d'onde d'analyse, voir le tableau de la section 7) à visée axiale, radiale ou duale et à détecteur de préférence séquentiel de type PM, CCD, CID ou SCCD

Note 1 : Si un étalon interne est utilisé dans la méthode, il est fortement recommandé de procéder à l'analyse multi-élémentaire au moyen d'un spectromètre de type simultané**.**

Note 2 : D'autres systèmes d'introduction d'échantillon peuvent être utilisés afin d'augmenter la sensibilité et la robustesse de la méthode [système par injection en flux continu, désolvatation par micro-onde (MWDS), etc.].

5.2. Micropipettes jaugées permettant des prises de volume de 200 µL à 5 mL et/ou pipettes volumétriques de 1, 5 et 10 mL

5.3. Fioles jaugées

Note 3 : Tout le matériel utilisé pour le dosage doit être immergé dans une solution d'acide nitrique (4.6) pendant 12 heures, et doit ensuite être rincé plusieurs fois avec de l'eau (4.1). Des précautions appropriées doivent être prise pour éviter toute contamination.

Afin d'évaluer la robustesse de la méthode sur l'appareil utilisé, il est conseillé de calculer le rapport d'intensité de Mg 279,800/Mg 285,213. Mg 285,213 étant une raie atomique et Mg 279,800 étant une raie ionique.

6. Préparation de l'échantillon

6.1. Préparation de la gamme d'étalonnage

Le nombre des solutions d'étalonnage dépend de la fidélité requise. Au moins cinq solutions d'étalonnage sont nécessaires. La justesse des résultats peut être vérifiée en analysant un matériau de référence.

La gamme sera choisie en fonction de la dilution de l'échantillon effectuée. Elle devra couvrir le domaine d'applications des différents éléments. Il est important que la concentration en acide nitrique soit la même dans les étalons et dans les échantillons.

6.1.1. Préparation d'une solution étalon pour l'analyse simultanée des éléments majeurs et des éléments mineurs (dilution 1/5)

Dans une fiole de 100 mL (5.3), introduire avec une micropipette (5.2) le volume d'étalon requis pour atteindre la concentration souhaitée dans la solution finale et 1 mL d'acide nitrique (4.4), compléter à 100 mL avec de l'eau (4.1) et homogénéiser.

6.1.2. Préparation d'une solution étalon pour l'analyse des éléments majeurs uniquement (dilution 1/50)

Dans une fiole de 100 mL (5.3), introduire avec une micropipette (5.2) le volume d'étalon requis pour atteindre la concentration souhaitée dans la solution finale, compléter à 100 mL avec la solution d'acide nitrique (4.5) et homogénéiser.

6.2. Préparation de l'échantillon pour l'essai

6.2.1. Préparation des échantillons d'essai pour l'analyse simultanée des éléments majeurs et des éléments mineurs (dilution 1/5)

Dans une fiole de 50 mL (5.3), introduire avec une pipette volumétrique ou une micropipette (5.2) 10 mL d'échantillon et 1 mL d'acide nitrique (4.4), compléter à 50 mL avec de l'eau (4.1) et homogénéiser.

Une minéralisation, par exemple par digestion micro-onde dans l'acide nitrique, permet la destruction des composés organiques. Si la concentration en certains éléments est trop élevée (valeur supérieure à celle de la solution d'étalonnage la plus concentrée), une dilution plus importante est requise.

Note 4 : En fonction de la robustesse de l'appareil utilisé et compte-tenu de l'utilisation du tampon ionique et des étalons internes, il est possible de travailler avec un facteur de dilution 1/2 afin d'améliorer la sensibilité de la méthode pour les éléments traces. Il faudra modifier en conséquence, les gammes d'étalonnage et éventuellement les paramètres expérimentaux (puissance, etc.)

6.2.2. Préparation des échantillons d'essai pour l'analyse des éléments majeurs uniquement (dilution 1/50)

Dans une fiole de 50 mL (5.3), introduire avec une pipette volumétrique ou une micropipette (5.2) 1 mL d'échantillon et 0,5 mL d'acide nitrique (4.4), compléter à 50 mL avec de l'eau (4.1) et homogénéiser.

Remarque : Pour le jus de raisin concentré, diluer le jus cinq fois (m/m) avec de l'eau avant procéder aux points 6.2.1 ou 6.2.2 ci-avant. Prendre en compte cette dilution dans les calculs finaux (point 8).

7. Mode opératoire

7.1. Paramètres expérimentaux

Les paramètres de l'appareil décrits ci-après sont présentés à titre d'exemple, et peuvent être modifiés en fonction de l'appareil utilisé.

- Puissance : 1,3 kW
- Débit gaz plasmagène (plasma gas flow) : 15 L/min
- Débit gaz auxiliaire : 1,5 L/min
- Pression de nébulisation : 200 kPa
- Délai de stabilisation : 20 s
- Temps de lecture par réplique : 5 s
- Vitesse de pompe : 15 tour/min
- Temps de rinçage : 30 s
- Diamètre interne tuyau étalon interne : 0,51 mm
- Diamètre interne tuyau échantillon : 0,8 mm
- Mettre l'appareil en marche (pompe en fonctionnement et plasma allumé) et nettoyer le système pendant au moins 20 minutes avec de l'acide nitrique (4.5) à 1 %.

Analyser un blanc puis la série des étalons dans l'ordre croissant des concentrations. Un échantillon de référence peut être utilisé comme contrôle qualité interne (4.3) pour vérifier l'étalonnage. Analyser ensuite à nouveau le blanc pour s'assurer de l'absence d'effet-mémoire. Procéder ensuite à l'analyse des échantillons en intercalant un contrôle qualité tous les 10 échantillons et à la fin de la série d'analyse (à titre d'exemple).

Une carte de contrôle peut être établie à partir des résultats obtenus sur l'échantillon de contrôle afin de définir des critères d'acceptation et des actions à entreprendre en cas de dérive. Les analyses se feront pour chaque élément avec un minimum de 3 répliques. Les raies pouvant être utilisées pour les différents éléments sont fournies à titre d'exemple dans le tableau I (d'autres raies peuvent être utilisées en fonction de l'équipement) :

Tableau I. Éléments minéraux et leurs raie principale, raie secondaire et étalons internes associés respectifs

Éléments	Raie principale *($E_{sum} = E_{exc} + E_{ion}$)*	Étalon interne pouvant être associé	Raie secondaire *($E_{sum} = E_{exc} + E_{ion}$)*	Étalon interne pouvant être associé
K	769,897 (I) *(1,6 eV)*	Cs 697,327	766,491 (I) *(1,6 eV)*	Cs 697,327
Ca	317,933 (II) *(10 eV)*	Sc 335,372	315,887 (II) *(10,1 eV)*	Sc 335,372
Mg	285,213 (I) *(4,3 eV)*	Cs 697,327	279,800 (II) *(10,6 eV)*	Sc 335,372
Na	589,592 (I) *(2,1 eV)*	Cs 697,327		
Fe	259,940 (II) *(12,7 eV)*	Sc 335,372	239,563 (II) *(11,4 eV)*	Sc 335,372
Cu	327,395 (I) *(3,8 eV)*	Cs 697,327	324,754 (I) (3,8 eV)	Cs 697,327
Zn	213,857 (I) *(5,8 eV)*	Cs 697,327	206,200 (II) *(12,2 eV)*	Sc 335,372
Mn	257,61 (II) *(12,3 eV)*	Sc 335,372	260,568 (II) *(11 eV)*	Sc 335,372
Sr	421,552 (II) *(8,6 eV)*	Sc 335,372	407,771 (II) *(8,7 eV)*	Sc 335,372
Al	396,152 (I) *(3,1 eV)*	Cs 697,327	167,019 (I) *(7,4 eV)*	Cs 697,327
Rb	780,026 (I) *(1,6 eV)*	Cs 697,327		
Li	670,783 (I) *(1,9 eV)*	Cs 697,327		
Ba	455,403 (II) *(7,9 eV)*	Sc 335,372		
Sc	335,372 (II) *(10,3 eV)*			
Cs	697,327 (I) *(1,8 eV)*			

8. Calculs et expression des résultats

Calculer la concentration des éléments dans l'échantillon en utilisant l'équation suivante :

$$C = \frac{Cm \times Vt}{Vm}$$

où :

C : concentration de l'élément dans l'échantillon (mg/L)

Cm : concentration de l'élément dans la solution diluée (mg/L)

Vt : volume de la fiole de dilution (mL) (ici V=50 mL)

Vm : volume d'échantillon prélevé pour la dilution (mL) (ici V=1 ou 10 mL)

Les résultats sont exprimés en mg/L avec une décimale.

9. Caractéristiques de la méthode

Une étude de validation a été menée pour évaluer la pertinence de la méthode pour le jus de raisin, en prenant en compte l'exactitude de la méthode, déterminée en définissant ses niveaux de fidélité et de justesse.

L'acquisition des données a été réalisée en utilisant des matériaux de référence correspondant à chacun des éléments minéraux (solutions synthétiques et échantillons fortifiés) distribués dans la plage couvrant le domaine d'application des méthodes en termes de concentration. Chacun des n=5 matériaux a été analysé, en double, sous conditions de reproductibilité et dans les limites temporelles de stabilité de chaque matériau pour le paramètre considéré.

9.1. Résultats de fidélité

Les résultats de fidélité de chaque élément minéral sont présentés ci-après au sein des tableaux II à XI, dans lesquels Sr correspond à l'écart-type de répétabilité, r à la répétabilité, FI à l'écart-type de fidélité intermédiaire et $\%CV_r$ au coefficient de variation de fidélité.

Tableau II – Données de fidélité pour le potassium à 766,4 nm (mg/L)

Fidélité	**Matériau 1** (solution synthétique)	**Matériau 2** (jus de raisin)	**Matériau 3** (jus de raisin)	**Matériau 4** (jus de raisin)	**Matériau 5** (jus de raisin)
Valeur cible	100,00	750,00	1500,00	2250,00	3000,00
Moyenne	104,97	800,80	1600,30	2345,90	3146,00
Sr	1,58	17,67	22,25	68,14	51,49
r	4,44	49,44	62,31	190,81	144,19

FI	5,55	46,74	88,32	148,47	201,42
$\%CV_r$ (k=2)	10,58	11,67	11,04	12,66	12,80

Tableau III – Données de fidélité pour le calcium à 317,9 nm (mg/L)

Fidélité	**Matériau 1** (solution synthétique)	**Matériau 2** (jus de raisin)	**Matériau 3** (jus de raisin)	**Matériau 4** (jus de raisin)	**Matériau 5** (jus de raisin)
Valeur cible	2,00	200,00	400,00	600,00	800,00
Moyenne	2,10	201,25	402,40	590,10	770,10
Sr	0,16	3,82	5,60	7,19	12,21
r	0,46	10,70	15,93	20,13	34,18
FI	0,20	3,08	8,92	11,5	17,85
$\%CV_r$ (k=2)	19,30	3,06	4,43	3,90	4,64

Tableau IV – Données de fidélité pour le magnésium à 279,0 nm (mg/L)

Fidélité	**Matériau 1** (solution synthétique)	**Matériau 2** (jus de raisin)	**Matériau 3** (jus de raisin)	**Matériau 4** (jus de raisin)	**Matériau 5** (jus de raisin)
Valeur cible	5,00	270,00	540,00	810,00	1080,00
Moyenne	5,34	279,90	540,20	779,40	997,80
Sr	0,34	4,50	4,63	7,45	14,37
r	0,95	12,61	12,95	20,87	40,24
FI	0,63	6,58	11,60	20,52	37,84
$\%CV_r$ (k=2)	23,79	4,70	4,29	5,27	7,59

Tableau V – Données de fidélité pour le sodium à 588,9 nm (mg/L)

Fidélité	**Matériau 1** (solution synthétique)	**Matériau 2** (jus de raisin)	**Matériau 3** (jus de raisin)	**Matériau 4** (jus de raisin)	**Matériau 5** (jus de raisin)
Valeur cible	6,00	10,00	20,00	30,00	40,00
Moyenne	5,99	10,08	17,35	27,47	40,92
Sr	0,04	0,13	0,29	0,63	0,22
r	0,12	0,37	0,82	1,78	0,64
FI	0,29	0,48	0,82	1,54	2,16
$\%CV_r$	9,87	9,51	9,49	11,27	10,56

(k=2)					

Tableau VI – Données de fidélité pour le fer à 238,2 nm (mg/L)

Fidélité	**Matériau 1** (solution synthétique)	**Matériau 2** (jus de raisin)	**Matériau 3** (jus de raisin)	**Matériau 4** (jus de raisin)
Valeur cible	0,25	2,50	7,50	10,00
Moyenne	0,23	2,56	7,63	9,81
Sr	0,01	0,08	0,33	0,14
r	0,03	0,23	0,93	0,40
FI	0,05	0,17	0,43	0,74
$\%CV_r$ (k=2)	46,70	13,78	11,51	15,19

Tableau VII – Données de fidélité pour le cuivre à 224,7 nm (mg/L)

Fidélité	**Matériau 1** (solution synthétique)	**Matériau 2** (jus de raisin)	**Matériau 3** (jus de raisin)	**Matériau 4** (jus de raisin)	**Matériau 5** (jus de raisin)
Valeur cible	0,10	1,25	2,50	3,75	5,00
Moyenne	0,10	1,28	2,61	3,83	5,01
Sr	0,01	0,05	0,03	0,04	0,06
r	0,02	0,15	0,07	0,11	0,17
FI	0,01	0,08	0,12	0,13	0,23
$\%CV_r$ (k=2)	23,38	13,75	9,20	6,82	9,55

Tableau VIII – Données de fidélité pour le zinc à 213,8 nm (mg/L)

Fidélité	**Matériau 1** (solution synthétique)	**Matériau 2** (jus de raisin)	**Matériau 3** (jus de raisin)	**Matériau 4** (jus de raisin)	**Matériau 5** (jus de raisin)
Valeur cible	0,08	2,50	5,00	7,50	10,00
Moyenne	0,07	2,44	4,91	7,28	9,55
Sr	0,01	0,04	0,05	0,10	0,11
r	0,01	0,12	0,15	0,28	0,32
FI	0,01	0,05	0,13	0,24	0,24

$\%CV_r$ (k=2)	20,90	4,29	5,62	6,51	4,94

Tableau IX – Données de fidélité pour le strontium à 407,7 nm (mg/L)

Fidélité	**Matériau 1** (solution synthétique)	**Matériau 2** (jus de raisin)	**Matériau 3** (jus de raisin)	**Matériau 4** (jus de raisin)
Valeur cible	0,07	1,50	2,25	3,00
Moyenne	0,07	1,50	2,25	3,02
Sr	0,01	0,06	0,04	0,03
r	0,01	0,19	0,13	0,11
FI	0,01	0,12	0,17	0,25
$\%CV_r$ (k=2)	35,98	16,10	15,35	16,96

Tableau X – Données de fidélité pour l'aluminium à 396,0 nm (mg/L)

Fidélité	**Matériau 1** (solution synthétique)	**Matériau 2** (jus de raisin)	**Matériau 3** (jus de raisin)	**Matériau 4** (jus de raisin)	**Matériau 5** (jus de raisin)
Valeur cible	0,20	1,25	2,50	3,75	5,00
Moyenne	0,26	1,29	2,43	3,58	4,91
Sr	0,01	0,06	0,04	0,10	0,04
r	0,04	0,16	0,11	0,28	0,12
FI	0,02	0,09	0,11	0,10	0,28
$\%CV_r$ (k=2)	16,80	14,68	9,64	6,08	11,62

Tableau XI – Données de fidélité pour le baryum à 455,4 nm (mg/L)

Fidélité	**Matériau 1** (solution synthétique)	**Matériau 2** (jus de raisin)	**Matériau 3** (jus de raisin)	**Matériau 4** (jus de raisin)	**Matériau 5** (jus de raisin)
Valeur cible	0,12	1,25	2,50	3,75	5,00
Moyenne	0,15	1,28	2,52	3,74	4,83
Sr	0,01	0,02	0,055	0,05	0,05
r	0,01	0,04	0,12	0,13	0,13
FI	0,01	0,02	0,05	0,06	0,07
$\%CV_r$ (k=2)	8,87	2,44	4,15	3,00	2,98

10. Bibliographie

1. OIV. Recueil des méthodes internationales d'analyse des moûts et des vins. Méthode OIV-MA-AS322-13:R2013.
2. ISO 3686. Eau pour laboratoire à usage analytique – Spécification et méthodes d'essai

Méthode OIV-MA-G1-10 **Méthode de type IV**

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)

1. Domaine d'application

La présente méthode décrit un protocole analytique pour la 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 dans la plage située entre 12,6 meq/L et 145,7 meq/L

2. Définition

L'acidité totale du jus de raisin, du jus de raisin reconstitué, du jus de raisin concentré et du nectar de raisin correspond à la somme des acidités titrables lorsqu'on amène le pH à 7,0 par addition d'une solution alcaline titrée.

Le dioxyde de carbone n'est pas compris dans l'acidité totale.

3. Principe

Titrage potentiométrique ou titrage en présence de bleu de bromothymol comme indicateur de fin de réaction par comparaison à un étalon de coloration.

Remarque : Il convient de privilégier le titrage potentiométrique, étant donné qu'il s'agit d'une approche plus durable.

4. Réactifs et matériaux

4.1. Réactifs

4.1.1. Phosphate monopotassique (KH_2PO_4), n° CAS : 7778-77-0

4.1.2. Hydroxyde de sodium (NaOH) 1 M, n° CAS : 1310-73-2

4.1.3. Phtalate acide de potassium ($C_8H_5KO_4$), n° CAS : 877-24-7

4.1.4. Bleu de bromothymol ($C_{27}H_{28}Br_2O_5S$), n° CAS : 76-59-5

4.1.5. Éthanol neutre 96 % v/v (C_2H_5OH), n° CAS : 64-17-5

4.1.6 .Eau purifiée de laboratoire ou qualité équivalente conforme à la norme EN ISO 3696

4.2. Préparation des solutions

4.1.7.Solution tampon pH 7,0 (1 L)

Phosphate monopotassique (4.1.1) : 107,3 g

Solution d'hydroxyde de sodium à 1 M (4.1.2) : 500 mL

Eau (4.1.6) q.s.p. :1000 mL

4.1.8.Solution tampon pH 4,0 (1 L)

Phtalate acide de potassium (4.1.3) : 10,211 g

Remarque : D'autres solutions tampon d'étalonnage peuvent être utilisées, en fonction des pH des matrices à analyser. Des solutions tampon d'étalonnage du commerce, traçables au SI, peuvent également être utilisées.

4.1.9.Solution d'hydroxyde de sodium à 0,1 M (1 L)

Solution d'hydroxyde de sodium à 1 M (4.1.2) : 100 mL

Eau (4.1.6) q.s.p. : 1000 mL

4.1.10. Solution indicatrice de bleu de bromothymol à 4 g/L (1 L)

Bleu de bromothymol (4.1.4) : 4 g

Alcool neutre 96 % v/v (4.1.5) : 200 mL

Après solubilisation ajouter :

Eau (4.1.6) : 200 mL

Solution d'hydroxyde de sodium (4.1.2) à 1 M q.s.p. obtenir une coloration bleu-vert (pH 7,0), environ : 7,5 mL

Eau (4.1.6) q.s.p. : 1000 mL

Remarque : Des solutions commerciales peuvent être utilisées pour l'ensemble des solutions décrites.

5. Appareillage

5.1. Potentiomètre à échelle étalonnée en unités pH et électrodes
5.2. Trompe à vide
5.3. Fiole à vide de 500 mL
5.4. Béchers de 250 mL et 600 mL ou autres récipients appropriés
5.5. Pipettes volumétriques de 10 mL
5.6. Pipettes volumétriques de 50 mL
5.7. Burettes
5.8. Agitateur
5.9. Balance d'une précision de 0,1 mg

6. Mode opératoire

6.1. Préparation de l'échantillon

6.1.1. Pour le jus de raisin concentré

Préparer une solution de jus concentré à 40 % m/m. Par exemple, introduire 200 g de jus concentré exactement pesé dans un bécher de 600 mL. Compléter à 500 g avec de l'eau (4.1.6). Homogénéiser (facteur de dilution : F = 2,5).

6.1.2. Pour le jus de raisin, le jus de raisin reconstitué et le nectar de raisin gazéifiés

Placer environ 50 mL d'échantillon dans une fiole à vide. Faire le vide au moyen de la trompe à vide en agitant continuellement pendant 1 à 2 minutes. D'autres systèmes d'élimination de CO_2 peuvent être utilisés si l'élimination est garantie.

6.2. Titrage potentiométrique

6.2.1. Étalonnage du pH mètre

Étalonner le pH mètre de manière à ce qu'il soit adapté à l'objectif de la méthode.

6.2.2. Méthode de mesure

Dans un bécher (5.4), placer 10 mL d'échantillon préparé comme indiqué en 6.1.2 ou 50 mL d'échantillon préparé comme indiqué en 6.1.1. Ajouter environ 10 mL environ d'eau distillée (4.1.6) sans CO_2 et procéder au titrage avec la solution d'hydroxyde de sodium à 0,1 M (4.2.3) en l'introduisant avec une burette jusqu'à ce que le pH soit égal à 7,0 à 20 °C. L'addition de la solution d'hydroxyde de sodium doit être faite lentement et la solution constamment agitée. Soit *n* le volume d'hydroxyde de sodium à 0,1 M additionné en mL.

Remarque : Des ajustements du volume peuvent être réalisés pour permettre l'utilisation de titreurs automatiques.

6.3. Titrage avec indicateur (bleu de bromothymol)

6.3.1. Essai préalable : établissement de l'étalon de coloration

Dans un bécher (5.4), placer 25 mL d'eau (4.1.6), 1 mL de solution de bleu de bromothymol (4.2.4) et 10 mL d'échantillon préparé comme indiqué en 6.1.2 ou 50 mL d'échantillon préparé comme indiqué en 6.1.1. Ajouter la solution d'hydroxyde de sodium à 0,1 M (4.2.3) jusqu'à obtention d'une coloration bleu-vert. Ajouter 5 mL de la solution tampon pH 7 (4.2.1).

6.3.2. Dosage

Dans un bécher (5.4), placer 30 mL d'eau (4.1.6), 1 mL de solution de bleu de bromothymol (4.2.4) et 10 mL d'échantillon préparé comme indiqué en 6.1.2. ou 50 mL d'échantillon préparé comme indiqué en 6.1.1. Ajouter la solution d'hydroxyde de sodium à 0,1 M (4.2.3) jusqu'à obtention d'une coloration

identique à celle obtenue de l'essai préalable (6.3.1.). Soit *n* le volume de solution d'hydroxyde de sodium à 0,1 M ajouté en mL.

7. Calculs et expression des résultats

7.1. Mode de calcul pour le jus de raisin concentré

- Acidité totale exprimée en milliéquivalents par kilogramme (meq/kg) de jus concentré :

$A = (1000 \times n \times M/v) \times F$

$A = 5 \times n$

n = volume (mL) de la solution d'hydroxyde de sodium à 0,1 M utilisé

M = molarité de l'hydroxyde de sodium (0,1 M)

v = volume de l'échantillon (50 mL)

F = facteur de dilution (2,5)

- Acidité totale exprimée en milliéquivalents par kilogramme (meq/kg) de sucres totaux :

$A = (500 \times n)/P$

P = teneur pour 100 (m/m) en sucres totaux

n = volume (mL) de la solution d'hydroxyde de sodium à 0,1 M utilisé

Les résultats sont donnés avec une décimale.

7.2. Mode de calcul pour le jus de raisin, le jus de raisin reconstitué et le nectar de raisin

- Acidité totale exprimée en milliéquivalents par litre (meq/L) :

$A = 10 \times n$

n = volume (mL) de la solution d'hydroxyde de sodium à 0,1 M utilisé

Les résultats sont donnés avec une décimale.

- Acidité totale exprimée en grammes d'acide tartrique par litre :

$A' = 0{,}075 \times A$

A = acidité totale exprimée en milliéquivalents par litre (meq/L)

Les résultats sont donnés avec deux décimales.

- Acidité totale exprimée en grammes d'acide sulfurique par litre :

$A' = 0{,}049 \times A$

A = acidité totale exprimée en milliéquivalents par litre (meq/L)

Les résultats sont donnés avec deux décimales.

8. Caractéristiques de la méthode

L'approche de titrage potentiométrique a fait l'objet d'une étude de validation afin d'évaluer la fidélité de cette méthode.

8.1. Fidélité de la méthode

Les paramètres pris en considération sont la répétabilité (r) et la fidélité intermédiaire (FI). La répétabilité a été exprimée comme l'écart-type de répétabilité (S_r) de 21 mesures dans un jus de raisin rouge. La fidélité intermédiaire (FI) a été exprimée comme l'écart-type (S_{FI}) de 15 mesures dans le même échantillon de jus de raisin rouge à des dates différentes. Le tableau 1 indique les valeurs de ces paramètres.

Tableau 1. Caractéristiques de la méthode

Plage de linéarité (meq/L)	Coefficient de corrélation (r^2)	Écart-type de répétabilité (S_r) (meq/L)	Écart-type de fidélité intermédiaire (S_{FI}) (meq/L)
12,6-145,7	0,9994	0,8	2,1

9. Bibliographie

1. OIV, Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts. Méthode OIV-MA-F1-05 (pour le jus de raisin concentré).
2. OIV, Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts. Méthode OIV-MA-AS313-01 (pour le jus de raisin, le jus de raisin reconstitué et le nectar de raisin).
3. BS EN ISO 3696, Eau pour laboratoire à usage analytique - Spécification et méthodes d'essai, 1995.

(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: 978-2-85038-138-6

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