

## **Note explicative**

### **Pour la mise à jour 2008 du Recueil des méthodes internationales des vins et des moûts**

Lors de la 5<sup>ème</sup> Assemblée générale de l'Organisation Internationale de la Vigne et du Vin (OIV), plusieurs méthodes d'analyses des vins et des moûts ont été adoptées. Ces méthodes figurent dans la mise à jour 2008 ci-incluse. Cette mise à jour concerne 2 types de méthodes :

1/ des nouvelles méthodes qui viennent s'ajouter au Recueil des méthodes internationales des vins et des moûts, il s'agit des méthodes :

- AS313-21-METTAR
- AS315-14-LYSOZY
- AS315-15-GLYCYC
- 

2/ des compléments aux méthodes figurant déjà au Recueil des méthodes internationales des vins et des moûts, il s'agit des méthodes :

- AS315-11-ANCYAN qui complète la méthode AS315-11-ANCYAN

Par ailleurs, la liste des Limites maximales acceptables de divers éléments dans le vin (C1-01-LIMMAX) doit également être remplacée.

Vous trouverez également ci-joint  
Les couvertures de l'édition 2008  
La table des matières de l'édition 2008

Federico CASTELLUCCI  
Directeur Général

***RECUEIL  
DES METHODES  
INTERNATIONALES  
D'ANALYSE DES  
VINS ET DES MOUTS***

*EDITION 2008*

***VOLUME 1***



***INCLUSES:***

***Résolutions adoptées à Budapest (Hongrie)***

***5<sup>ème</sup> A.G. – 15 juin 2007***

***RECUEIL  
DES METHODES  
INTERNATIONALES  
D'ANALYSE DES  
VINS ET DES MOUTS***

*EDITION 2008*

***VOLUME 2***



***INCLUSES:***

***Résolutions adoptées à Budapest (Hongrie)***

***5<sup>ème</sup> A.G. – 15 juin 2007***

## Plan général du Recueil

Table des matières

Avant-propos

### **ANNEXE A – METHODES D'ANALYSE DES VINS ET DES MOUTS**

**SECTION 1 – DEFINITIONS ET PRINCIPES GENERAUX**

**SECTION 2 – ANALYSES PHYSIQUES**

**SECTION 3 – ANALYSES CHIMIQUES**

#### **SECTION 3.1 – COMPOSÉS ORGANIQUES**

*SECTION 3.1.1 – SUCRES*

*SECTION 3.1.2 – ALCOOLS*

*SECTION 3.1.3 – ACIDES*

*SECTION 3.1.4 – GAZ*

*SECTION 3.1.5 – AUTRES COMPOSÉS ORGANIQUES*

#### **SECTION 3.2 – COMPOSÉS NON ORGANIQUES**

*SECTION 3.2.1 – ANIONS*

*SECTION 3.2.2 – CATIONS*

*SECTION 3.2.3 – AUTRES COMPOSÉS NON ORGANIQUES*

**SECTION 4 – ANALYSES MICROBIOLOGIQUES**

**SECTION 5 – AUTRES ANALYSES**

### **ANNEXE B - MODELES DE CERTIFICATS D'ANALYSE**

### **ANNEXE C - LIMITES MAXIMALES ACCEPTABLES DE DIVERS ELEMENTS**

### **ANNEXE D – AVIS**

### **ANNEXE E – ASSURANCE QUALITE DANS LES LABORATOIRES**

**RECUEIL INTERNATIONAL DES METHODES D'ANALYSE – OIV**  
**Table des matières**

---

Table des matières..... MA-F-INT-00-TABMAT

**VOLUME 1**

Avant-propos..... MA-F-INT-01-AVPROP  
Mode rédactionnel d'une méthode d'analyse OIV..... MA-F-INT-04-REDMET

**ANNEXE A – METHODES D'ANALYSE DES VINS ET DES MOÛTS**

**SECTION 1 – DEFINITIONS ET PRINCIPES GENERAUX**

Remarques générales (eco 3/2003) ..... MA-F-AS1-02-REMGEN  
Classification des méthodes d'analyse (oenos 9/2000)..... MA-F-AS1-03-CLASMA  
Effet matrice pour le dosage des métaux (oenos 5/2000) ..... MA-F-AS1-04-EFFMAT

**SECTION 2 – ANALYSES PHYSIQUES**

Masse volumique (A 1) ..... MA-F-AS2-01-MASVOL  
Evaluation de la teneur en sucres des moûts, des moûts  
concentrés et du raisin par réfractométrie ..... MA-F-AS2-02-SUCREF  
Extrait sec total (A 3) ..... MA-F-AS2-03-EXTSEC  
Cendres (A 6)..... MA-F-AS2-04-CENDRE  
Alcalinité des cendres (A 7) ..... MA-F-AS2-05-ALCCEN  
Potentiel d'oxydoréduction (oenos 3/2000) ..... MA-F-AS2-06-POTOXY  
Caractéristiques chromatiques (A0 mod.)..... MA-F-AS2-07-CACHR2  
Turbidité des vins (oenos 4/2000)..... MA-F-AS2-08-TURBID  
Mouillage - rapport isotopique 18O/16O (oenos 2/96) ..... MA-F-AS2-09-MOUO18  
Indice de Folin-Ciocalteu..... MA-F-AS2-10-INDFOL  
Caractéristiques chromatiques (oenos 1/2006) ..... MA-F-AS2-11-CARCHR

**SECTION 3 – ANALYSES CHIMIQUES**

**SECTION 3.1 – COMPOSÉS ORGANIQUES**

**SECTION 3.1.1 – SUCRES**

Sucres réducteurs (A 4) ..... MA-F-AS311-01-SUCRED  
Glucose et fructose (méthode enzymatique) ..... MA-F-AS311-02-GLUFRU  
Dosage des sucres par CLHP (oenos 23/2003)..... MA-F-AS311-03-SUCRES  
Stabilisation des moûts en vue de la recherche  
du saccharose (A 5)..... MA-F-AS311-04-STAMOU  
Détection de l'enrichissement des moûts, des moûts concentrés,  
du sucre de raisin et des vins par <sup>2</sup>H-RMN..... MA-F-AS311-05-ENRRMN  
Polyols dérivant des sucres (Oeno 9/2006)..... MA-F-AS311-06-POLYOL  
Glucose et fructose (pHmétrie) (Oeno 10/2006) ..... MA-F-AS311-07-GLCFR2  
Glucose, fructose et saccharose (pHmétrie) (Oeno 11/2006) MA-F-AS311-08-SACCHA

*SECTION 3.1.2 – ALCOOLS*

Titre alcoométrique volumique	
- par pycnométrie (A 2).....	MA-F-AS312-01-TALVOL
- par résonateur de flexion (oen 8/2000) .....	MA-F-AS312-01- TALVOL
- par balance hydrostatique (oen 24/2003).....	MA-F-AS312-01- TALVOL
- tables de conversion .....	MA-F-AS312-02- TALVOL
Méthanol (A 41).....	MA-F-AS312-03-METHAN
Glycérol et butane-2,3-diol (A 21) .....	MA-F-AS312-04-GLYBUT
Glycérol (méthode enzymatique).....	MA-F-AS312-05-GLYENZ
Détermination du rapport isotopique de l'éthanol (oen 17/2001).....	MA-F-AS312-06-ETHANO

*SECTION 3.1.3 – ACIDES*

Acidité totale (A 10).....	MA-F-AS313-01-ACITOT
Acidité volatile (A 11).....	MA-F-AS313-02-ACIVOL
Acidité fixe (A 11).....	MA-F-AS313-03-ACIFIX
Acides organiques : méthode générale par HPLC .....	MA-F-AS313-04-ACIORG
Acide tartrique (A 12) .....	MA-F-AS313-05-ACITAR
Acide lactique	
- méthode chimique (A 27).....	MA-F-AS313-06-ALACHI
-méthode enzymatique .....	MA-F-AS313-07-ALAENZ
Acide citrique	
- méthode chimique (A 29).....	MA-F-AS313-08-ACICHI
- méthode enzymatique .....	MA-F-AS313-09-ACIENZ
Acide malique total : méthode usuelle (A 33).....	MA-F-AS313-10-AMALTO
Acide L-malique : méthode enzymatique .....	MA-F-AS313-11-ALMENZ
Acide D-malique : méthode enzymatique (oen 6/98) .....	MA-F-AS313-12-ADMENZ
Acide D-malique - faibles teneurs : méthode enzymatique (oen 16/2002) .....	MA-F-AS313-12-ADMEZ2
Acide L-ascorbique (A 28) .....	MA-F-AS313-13-ALASCO
Acide sorbique (A 30).....	MA-F-AS313-14-ACISOR
pH (A 31).....	MA-F-AS313-15-PH
Acide organique : chromatographie ionique (oen 23/2004) .....	MA-F-AS313-16-ORGION
Acide shikimique (oen 33/2004) .....	MA-F-AS313-17-ACSHIK
Acide sorbique (électrophorèse cap.) (oen 4/2006) .....	MA-F-AS313-18-SORCAP
Acides organiques (électrophorèse cap.) (oen 5/2006) .....	MA-F-AS313-19-ACORG2
Acide sorbique, benzoïque, salicylique (oen 6/2006) .....	MA-F-AS313-20-SOBESA
Acide métatartrique (oen 10/2007) .....	MA-F-AS313-21-METTAR

*SECTION 3.1.4 – GAZ*

Dioxyde de carbone (A 39 modifié par oeno 21/2003 et complété par la résolution Oeno 3/2006).....	MA-F-AS314-01-DIOCAR
Méthode de mesure de la surpression des vins effervescents (oeno 21/2003).....	MA-F-AS314-02-SUPRES
Détermination du rapport isotopique <sup>13</sup> C/ <sup>12</sup> C du CO <sub>2</sub> dans les vins mousseux (Oeno 7/2005) .....	MA-F-AS314-03-CO2MOU
Dioxyde de carbone (méthode manométrique) (oeno 2/2006) .....	MA-F-AS314-04-CO2MAN

**VOLUME 2**

*SECTION 3.1.5 – AUTRES COMPOSÉS ORGANIQUES*

Ethanal (A 37).....	MA-F-AS315-01-ETHANA
Acétate d'éthyle .....	MA-F-AS315-02-ACEETH
Diglycoside de malvidol (A 18).....	MA-F-AS315-03-DIGMAL
Carbamate d'éthyle (oeno 8/98).....	MA-F-AS315-04-CARETH
5-(Hydroxyméthyl)furfural (A 19).....	MA-F-AS315-05-HYDMFF
Dérivés cyanés (oeno 4/94) .....	MA-F-AS315-06-DERCYA
Edulcorants de synthèse (A 36) .....	MA-F-AS315-07-EDUSYN
Colorants de synthèse (A 43).....	MA-F-AS315-08-COLSYN
Diéthylèneglycol .....	MA-F-AS315-09-DIEGLY
Ochratoxine A (oeno 16/2001) .....	MA-F-AS315-10-OCHRAT
Détermination par CLHP de neuf Anthocyanes principales dans le vin rouge et rosé (oeno 22/2003, Oeno 12/2007).....	MA-F-AS315-11-ANCYAN
Matières protéiques d'origine végétale (oeno 24/2004).....	MA-F-AS315-12-PROVEG
Polychlorophénols et polychloroanisoles (oeno 8/2006) .....	MA-F-AS315-13-PCAPCP
Détermination du lysozyme par HPLC (oeno 8/2007).....	MA-F-AS315-14-LYSOZY
Détermination du 3-Methoxypropane-1,2-diols et des glycérols cycliques (oeno 11/2007) .....	MA-F-AS315-15-GLYCYC

**SECTION 3.2 – COMPOSÉS NON ORGANIQUES**

*SECTION 3.2.1 – ANIONS*

Brome total (A 23).....	MA-F-AS321-01-BROTOT
Chlorures (A 15).....	MA-F-SA321-02-CHLORU
Fluorures (oeno 22/2004).....	MA-F-AS321-03-FLUORU
Phosphore total (A 16) .....	MA-F-AS321-04-PHOTOT
Sulfates (A 14).....	MA-F-AS321-05-SULFAT

*SECTION 3.2.2 – CATIONS*

Ammonium (A 20).....	MA-F-AS322-01-AMMONI
Potassium (A 8).....	MA-F-AS322-02-POTASS
Sodium (A 25) .....	MA-F-AS322-03-SODIUM
Calcium (A 26).....	MA-F-AS322-04-CALCIU
Fer (A 9) .....	MA-F-AS322-05-FER
Cuivre .....	MA-F-AS322-06-CUIVRE
Magnésium (A 26).....	MA-F-AS322-07-MAGNES
Zinc (A 45) .....	MA-F-AS322-08-ZINC
Argent.....	MA-F-AS322-09-ARGENT
Cadmium.....	MA-F-AS322-10-CADMIU
Plomb (critères pour méthodes) (oen 7/2006).....	MA-F-AS322-12-CRIPLO

*SECTION 3.2.3 – AUTRES COMPOSÉS NON ORGANIQUES*

Arsenic (A 34) .....	MA-F-AS323-01-ARSENI
Arsenic - Absorption atomique (oen 14/2002) .....	MA-F-AS323-01-ASSAA
Azote total (A 40).....	MA-F-AS323-02-AZOTOT
Azote total - Méthode Dumas (oen 13/2002).....	MA-F-AS323-02-AZOTDU
Bore (A 44).....	MA-F-AS323-03-BORE
Dioxyde de soufre	
- vin (A 17) .....	MA-F-AS323-04-DIOSOU
- jus de raisin .....	MA-F-AS323-05-SO2JUS
Mercure - Fluorescence atomique (oen 15/2002).....	MA-F-AS323-06-MERCUR

**SECTION 4 – ANALYSES MICROBIOLOGIQUES**

Analyse microbiologique (oen 8/95) .....	MA-F-AS4-01-ANMICR
Recherche des antiseptiques et des inhibiteurs de fermentation (A 35 modifiée par Oeno 6/2006).....	MA-F-AS4-02-RECANT

**SECTION 5 – AUTRES ANALYSES**

Différentiation des mistelles et des vins de liqueur doux.....	MA-F-AS5-01-DIFMIS
--	--------------------

**ANNEXE B**

Règles d'application des méthodes d'analyse.....	MA-F-B1-01-REGAPL
Modèles de certificats d'analyse.....	MA-F-B1-02-MODCER

**ANNEXE C**

Limites maximales acceptables de divers éléments contenus dans le vin (oeno 9/2007).....	MA-F-C1-01-LIMMAX
---	-------------------

**ANNEXE D – AVIS**

Acide gluconique (oeno 4/91).....	MA-F-D1-01-ACIGLU
Caractérisation des vins issus du surpressurage (oeno 5/91) ..	MA-F-D1-02-SURPRE
Teneur en ions chlorures et en ions sodium des vins (oeno 6/91).....	MA-F-D1-03-TENION

**ANNEXE E – ASSURANCE QUALITE DANS LES LABORATOIRES**

Principe de validation (oeno 7/98) .....	MA-F-AS1-05-PPEVAL
Etude collaborative .....	MA-F-AS1-07-ETCOL
Fidélité des méthodes (oeno 5/99) .....	MA-F-AS1-08-FIDMET
Protocole pour la planification, la conduite et l'interprétation des études de performance des méthodes d'analyse (oeno 6/2000).....	MA-F-AS1-09-PROPER
Estimation limite de détection et limite de quantification (oeno 7/2000).....	MA-F-AS1-10-LIMDET
Contrôle interne de qualité dans les laboratoires d'analyse (oeno 19/2002) .....	MA-F-AS1-11-COQUAL
Guide de validation (oeno 10/05) .....	MA-F-AS1-12-GUIVAL
Recommandations pour la validation par un seul laboratoire (Oeno 8/05) .....	MA-F-AS1-13-SINVAL
Recommandations sur l'incertitude de mesure (Oeno 9/05) ..	MA-F-AS1-14-INCERT

<i>Titre</i>	<b>DETERMINATION DE LA PRESENCE D'ACIDE METATARTRIQUE</b>	
<i>Type de méthode</i>	<b>IV</b>	
<i>Résolution</i>	Oeno 10/2007	

### **1. Introduction**

L'acide métatartrique ajouté au vin pour éviter les précipitations tartriques est traditionnellement dosé par différence entre l'acide tartrique total après hydrolyse à chaud de l'acide métatartrique et l'acide tartrique naturel avant hydrolyse. Toutefois, compte tenu de la précision du dosage de l'acide tartrique, des traces d'acide métatartrique ne sont pas décelables par cette méthode, il faut donc caractériser cet additif non accepté dans certains pays par une méthode plus spécifique.

### **2. Domaine d'application**

Vins susceptibles de contenir de l'acide métatartrique à l'état de trace.

### **3. Principe**

L'acide métatartrique forme avec l'acétate de cadmium en milieu moyennement acide, un précipité insoluble ; il est le seul de tous les éléments présents dans le moût et le vin à donner un tel précipité.

Remarque : L'acide tartrique est aussi précipité avec l'acétate de cadmium, mais seulement en présence d'une teneur en alcool supérieure à 25 % vol. Le précipité se re-dissout dans l'eau, contrairement au précipité obtenu avec l'acide métatartrique.

Le précipité cadmique d'acide métatartrique est décomposé par chauffage avec de l'hydroxyde de sodium et libère l'acide tartrique. Ce dernier forme avec le métavanadate d'ammonium une coloration orangée spécifique.

#### **4. Réactifs**

- 4.1 Solution d'acétate de cadmium à 5 p.100
  - 4.1.1 Acétate de cadmium dihydraté à 98 %
  - 4.1.2 Acide acétique pur
  - 4.1.3 Eau distillée ou déminéralisée
  - 4.1.4 Solution d'acétate de cadmium : dissoudre 5 g d'acétate de cadmium (4.1.1) dans 99 mL d'eau (4.1.3) ajouter 1 mL d'acide acétique pur (4.1.2)
- 4.2 Hydroxyde de sodium 1M
- 4.3 Acide sulfurique 1M
- 4.4 Solution de métavanadate d'ammonium à 2 p. 100 en poids
  - 4.4.1 Métavanadate d'ammonium
  - 4.4.2 Acétate de sodium trihydraté à 99 %
  - 4.4.3 Solution d'acétate de sodium à 27 p. 100 : dissoudre 478 g d'acétate de sodium (4.4.2) dans 1 litre d'eau (4.1.3)
  - 4.4.4 Solution de métavanadate d'ammonium : dissoudre 10 g de métavanadate d'ammonium (4.4.1) dans 150 mL d'hydroxyde de sodium 1 M (4.2) ajouter 200 mL de la solution d'acétate de sodium à 27 p. 100 (4.4.3) et compléter à 500 mL avec de l'eau (4.1.3)
- 4.5 Ethanol à 96 % vol.

#### **5. Appareillage**

- 5.1 Centrifugeuse avec un rotor pouvant recevoir des flacons de 50 mL de capacité
- 5.2 Spectromètre pouvant fonctionner dans le visible et recevoir des cuves de 1 cm de trajet optique.

#### **6. Mode opératoire**

- 6.1 Centrifuger 50 mL de vin pendant 10 minutes à 11000 rpm
- 6.2 Prélever 40 mL de vin limpide à l'éprouvette et les placer de nouveau dans un flacon pour centrifugeuse
- 6.3 Ajouter 5 mL d'éthanol à 96 % vol (4.5)
- 6.4 Ajouter 5 mL de la solution d'acétate de cadmium (4.1.4)
- 6.5 Mélanger et laisser reposer 10 minutes
- 6.6 Centrifuger pendant 10 minutes à 11000 rpm
- 6.7 Décanner par retournement total du flacon (une fois) et jeter le surnageant.

En présence d'acide métatartrique, il se forme un précipité lamellaire au fond du tube.

En l'absence de précipité, l'échantillon sera considéré comme exempt d'acide métatartrique. Dans le cas contraire ou si l'on veut établir avec certitude la présence d'un léger précipité, procéder comme suit :

6.8 Laver une fois le précipité avec 10 mL d'eau (4.1.3) sous la forme d'un jet énergétique vers le fond du tube ce qui à pour but de détacher le précipité du fond

6.9 Ajouter 2 mL de solution d'acétate de cadmium (4.1.4)

6.10 Centrifuger à 11000 rpm pendant 10 minutes puis jeter le surnageant par retournement complet du tube (une fois)

6.11 Après addition d'un mL d'hydroxyde de sodium 1 M (4.2), plonger le tube à centrifuger pendant 5 minutes dans un bain d'eau à 100° C

6.12 Après refroidissement, ajouter 1 mL d'acide sulfurique 1M (4.3) et 1 mL de solution de métavanadate d'ammonium (4.4.4)

6.13 Attendre 15 minutes

6.14 Centrifuger durant 10 minutes à 11000 rpm

6.15 Verser le surnageant dans une cuve de spectrophotomètre et mesurer l'absorbance à 530 nm, après avoir fait le zéro avec de l'eau (4.1.3)

Soit  $Abs_E$

Témoin. On réalise en parallèle un témoin constitué du même vin que celui analysé mais chauffé préalablement 2 minutes 30 à l'aide d'un générateur de micro-ondes réglé sur la puissance maximum ou encore au bain d'eau à 100° C durant 5 minutes

Soit  $Abs_T$

## **7. Résultat**

La présence d'acide métatartrique dans le vin est établie lorsque, à 530 nm :

$$Abs_E - Abs_T > 0,050$$

<b>Titre</b>	<b>DETERMINATION PAR CLHP DE NEUF ANTHOCYANES PRINCIPALES DANS LE VIN ROUGE ET ROSE</b>	
<b>Type de méthode</b>	<b>II</b>	
<b>Résolution</b>	Oeno 8/2007 modifiée par Oeno 12/2007	

## **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/acétonitrile 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 anthocyanes sont séparés :

		Pic-N°
Groupe 1: "anthocyanes-3-glucosides non acylées":	Delphinidol-3-glucoside	1
	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 ( $w_{1/2}$ ) 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  $h_{max}$ , 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 :

$$h_{max} = 0,208 \text{ [mAU]}; \quad LD = 3 \times 0,208 \text{ [mAU]} = 0,62 \text{ [mAU]}. \\ LQ = 10 \times 0,208 \text{ [mAU]} = 2,08 \text{ [mAU]}.$$

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

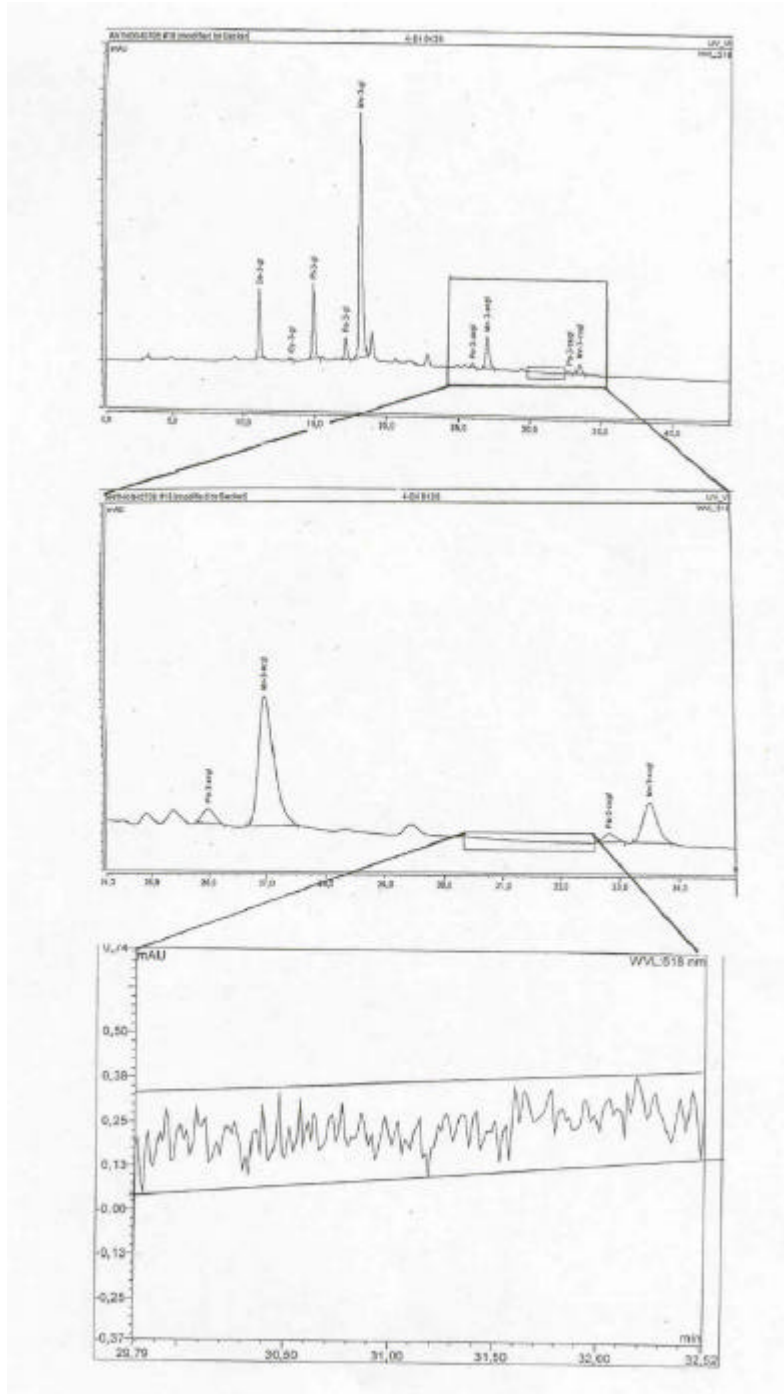
## **8. PARAMETRES DE LA FIDELITE**

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



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 Rotweanthocyanen 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 Anthocyanenspektrum. *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 :

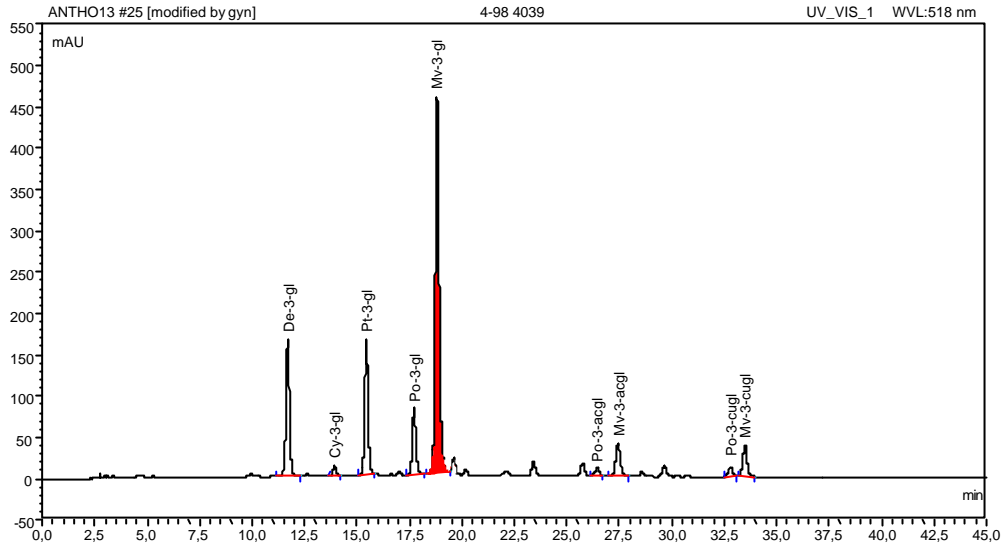
**Tableau 1 : Résumé des résultats des performances de la méthode**

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<sub>r</sub> et RSD<sub>R</sub>. 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<sub>r</sub> et RSD<sub>R</sub> peuvent augmenter d'une façon assez significative. Pour les anthocyanes dont les surfaces relatives dépassent 1 %, les valeurs RSD<sub>r</sub> et RSD<sub>R</sub> sont raisonnables.

Figure 1

Séparation de 9 anthocyanes dans un vin rouge



**RECUEIL INTERNATIONAL DES METHODES D'ANALYSES – OIV**  
**Anthocyanes**

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

Anthocyanes	échantillon 1	échantillon 2	échantillon 3	échantillon 4	échantillon 5
<i>Delphinidol-3-glucoside</i>					
N	14	14	16	15	16
moyenne	6,75	14,14	3,45	16,68	3,54
S <sub>r</sub>	0,163	0,145	0,142	0,142	0,108
RSD <sub>r</sub> (%)	2,4	1,0	4,1	0,8	3,1
r	0,46	0,41	0,40	0,40	0,30
S <sub>R</sub>	0,544	0,462	0,526	0,704	0,490
RSD <sub>R</sub> (%)	8,1	3,3	15,2	4,2	13,8
R	1,52	1,29	1,47	1,97	1,37
<i>Cyanidol-3-glucoside</i>					
n	16	17	16	15	14
moyenne	2,18	1,23	0,61	1,46	0,34
S <sub>r</sub>	0,086	0,053	0,043	0,110	0,031
RSD <sub>r</sub> (%)	4,0	4,3	7,1	7,5	9,2
r	0,24	0,15	0,12	0,31	0,09
S <sub>R</sub>	0,460	0,211	0,213	0,180	0,158
RSD <sub>R</sub> (%)	21,2	17,2	34,9	12,3	46,7
R	1,29	0,59	0,60	0,50	0,44
<i>Petunidol-3-glucoside</i>					
n	15	17	16	14	15
moyenne	10,24	14,29	5,75	12,21	6,19
S <sub>r</sub>	0,233	0,596	0,157	0,097	0,196
RSD <sub>r</sub> (%)	2,3	4,2	2,7	0,8	3,2
r	0,65	1,67	0,44	0,27	0,55
S <sub>R</sub>	0,431	0,996	0,495	0,469	0,404
RSD <sub>R</sub> (%)	4,2	7,0	8,6	3,8	6,5
R	1,21	2,79	1,39	1,31	1,13
<i>Peonidol-3-glucoside</i>					
n	16	15	17	17	16
moyenne	11,88	6,23	13,75	7,44	4,12
S <sub>r</sub>	0,241	0,166	0,144	0,232	0,174
RSD <sub>r</sub> (%)	2,0	2,7	1,0	3,1	4,2
r	0,68	0,47	0,40	0,65	0,49
S <sub>R</sub>	0,981	0,560	1,227	0,602	0,532
RSD <sub>R</sub> (%)	8,3	9,0	8,9	8,1	12,9
R	2,75	1,57	3,44	1,69	1,49
<i>Malvidol-3-glucoside</i>					
n	16	15	17	16	16
moyenne	55,90	55,04	76,11	52,60	61,04
S <sub>r</sub>	0,545	0,272	0,251	0,298	0,377
RSD <sub>r</sub> (%)	1,0	0,5	0,3	0,6	0,6
r	1,53	0,76	0,70	0,83	1,06
S <sub>R</sub>	2,026	2,649	2,291	1,606	1,986
RSD <sub>R</sub> (%)	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 <sub>r</sub>	= écart-type de répétabilité				
RSD <sub>r</sub> (%)	= écart-type de répétabilité relatif				
r	= répétabilité				
S <sub>R</sub>	= écart-type de reproductibilité				
RSD <sub>R</sub> (%)	= écart-type de reproductibilité relatif				
R	= reproductibilité				

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

Anthocyanes	échantillon 1	échantillon 2	échantillon 3	échantillon 4	échantillon 5
<i>Peonidol-3-acetylglucoside</i>					
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 <sub>r</sub> (%)	5,5	4,3		10,1	5,8
r	0,18	0,17		0,17	0,60
$s_R$	0,511	0,392		0,272	0,374
RSD <sub>R</sub> (%)	43,9	27,2		46,4	10,0
R	1,43	1,10		0,76	1,05
<i>Malvidol-3-acetylglucoside</i>					
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 <sub>r</sub> (%)	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 <sub>R</sub> (%)	7,2	7,6		16,0	4,1
R	1,11	1,02		1,39	1,73
<i>Peonidol-3-coumarylglucoside</i>					
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 <sub>r</sub> (%)	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 <sub>R</sub> (%)	24,5	12,2		23,0	11,8
R	0,86	0,31		0,57	0,44
<i>Malvidol-3-coumarylglucoside</i>					
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 <sub>r</sub> (%)	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 <sub>R</sub> (%)	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 <sub>r</sub> (%) = écart-type de répétabilité relatif r = répétabilité $s_R$ = écart-type de reproductibilité RSD <sub>R</sub> (%) = 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)

<b>Titre</b>	<b>DOSAGE DU LYSOZYME DANS LE VIN PAR HPLC</b>	
<b>Type de méthode</b>	<b>IV</b>	
<b>Résolution</b>	Oeno 8/2007	

### 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<sub>3</sub>CN) 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<sub>3</sub>CN 1%, TFA 0,2 %, H<sub>2</sub>O= 98,8%

B : CH<sub>3</sub>CN 70%, TFA 0,2 %, H<sub>2</sub>O= 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 :  $\lambda$  ex = 276 nm ;  $\lambda$  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.

**RECUEIL DES METHODES INTERNATIONALES D'ANALYSES – OIV**  
**Lysozyme**

---

	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 <sup>1</sup>	V.R. <sup>2</sup>	V.B. <sup>3</sup>	Std <sup>1</sup>
UV	5-250	3 786	0,9993	1,86	6,20	4,67	5,54	0,62	1,93
FLD	1-250	52 037	0,9990	0,18	0,59	2,61	2,37	0,68	2,30

Tableau 1: Données relatives aux caractéristiques de la méthode : <sup>1</sup> solution standard ; <sup>2</sup> vin rouge ; <sup>3</sup> 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

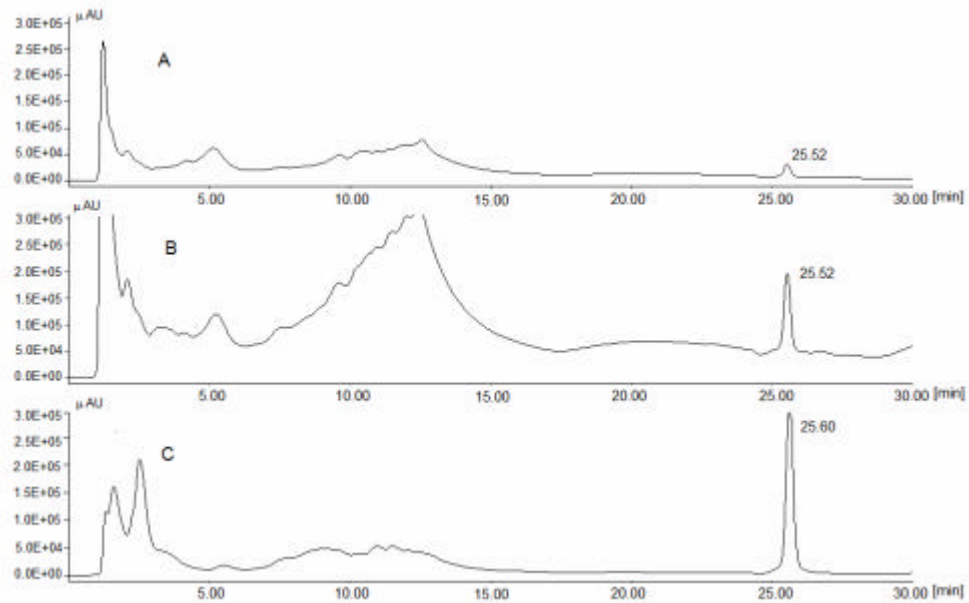


Fig.1 Chromatogramme de vin rouge contenant du Lysozyme pur (une solution standard contenant 1 000 mg/L de Lysozyme a été ajouté au vin pour obtenir une concentration finale de 125 mg/L de Lysozyme). A: détecteur UV à 280 nm; B: détecteur UV à 225 nm; C: détecteur FLD (? ex 276 nm; ? em 345 nm).

## 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.

<b>TITRE</b>	<b>DETERMINATION DU 3-METHOXYPROPANE-1,2-DIOL ET DES DIGLYCEROLS CYCLIQUES (DERIVES DE GLYCEROL TECHNIQUE) DANS LE VIN PAR CG-SM – DESCRIPTION DE LA METHODE ET DE L'ETUDE COLLABORATIVE –</b>	
<b>Type de méthode</b>	<b>II</b>	
<b>Résolution</b>	Oeno 11/2007	

### 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 importante de 3-MPD. La synthèse de glycérol à partir de produits pétrochimiques génère des impuretés de DC. L'une des méthodes publiées [1, 2, 3i] 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 <sub>2</sub>	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<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 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<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 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<sup>1</sup>, 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-(<sup>2</sup>H)<sub>8</sub> 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

---

<sup>1</sup> 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](http://www.bfr.bund.de). [poststelle@bfr.bund.de](mailto:poststelle@bfr.bund.de)

**RECUEIL DES METHODES INTERNATIONALES D'ANALYSES – OIV**  
**3-Methoxypropane-1,2-diols et des glycérols cycliques**

---

chaque substance). Ajouter exactement 10 mL d'éthanol et mélanger vigoureusement. La concentration de cette solution est de 1 000 ng/μL.

**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)

<b>Solution</b>	<b>Concentration</b>	
<b>S0</b>	1 000	ng/μL
<b>S1</b>	100	ng/μL

3-méthoxypropane-1,2-diol (3-MPD)

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

butane-1,4-diol-(<sup>2</sup>H)<sub>8</sub> (étalon interne EI)

<b>Solution</b>	<b>Concentration</b>	
<b>S0</b>	1 000	ng/μL
<b>S1</b>	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.

**RECUEIL DES METHODES INTERNATIONALES D'ANALYSES – OIV**  
**3-Methoxypropane-1,2-diols et des glycérols cycliques**

---

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 $\mu$ l		Volume de vin		C vin	C vin
				ml	$\mu$ g/L	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  $\pm 0,0001$  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-(<sup>2</sup>H)<sub>8</sub>). Ajouter précautionneusement 10 g de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> et mélanger. Il convient d'observer une grande prudence durant cet ajout, car le dégagement du CO<sub>2</sub> 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.

**RECUEIL DES METHODES INTERNATIONALES D'ANALYSES – OIV**  
**3-Methoxypropane-1,2-diols et des glycérols cycliques**

---

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<sub>2</sub>.

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. Quoiqu'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  $\pm 0,5$  %. 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  $\pm 20$  % 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 ( $w_{1/2}$ ). 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

$$S_r = 0,060 x$$

$$S_R = 0,257 x$$

$x$  = concentration de 3-MPD [mg/L]

$$r = 0,169 x$$

$$R = 0,720 x$$

**DC**

$$S_r = 0,082 x$$

$$S_R = 0,092 x + 0,070$$

x = concentration de DC [mg/L]

$$r = 0,230 x$$

$$R = 0,257 x + 0,197$$

## **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, Coblenz, 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.

**RECUEIL DES METHODES INTERNATIONALES D'ANALYSES – OIV  
3-Methoxypropane-1,2-diols et des glycérols cycliques**

**Tableau 2. Résultats pour 3-MPD**

	ÉCHAN TILLON A Vin blanc	ÉCHAN TILLON B Vin rouge <sup>a</sup>	ÉCHAN TILLON C Vin blanc	ÉCHAN TILLON F Vin rouge doux	ÉCHAN TILLON G Vin blanc
<b>Moyenne mg/L</b>	<b>0,30</b>	<b>0,145</b>	<b>0,25</b>	<b>0,48</b>	<b>0,73</b>
<b>mg/L enrichi</b>	0,30	0,12	-	-	0,80
Récupération %	100	121	-	-	91
n	10	10 <sup>a</sup>	10	10	10
nc	1	1 <sup>a</sup>	1	1	1
Résultats aberrants	2	0	0	1	1
n1	7	9 <sup>a</sup>	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
<b>Hor</b>	<b>0,30</b>	-	<b>0,60</b>	<b>0,50</b>	<b>0,59</b>
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
<b>HoR</b>	<b>0,80</b>	<b>1,53</b>	<b>1,10</b>	<b>1,30</b>	<b>1,72</b>

<sup>a</sup> 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<sub>r</sub> écart-type de la répétabilité

RSD<sub>r</sub> écart-type relatif de la répétabilité (S<sub>r</sub> x 100/moyenne)

r répétabilité (2,8 x S<sub>r</sub>)

Ho<sub>r</sub> la valeur Horrat de répétabilité est la valeur RSD<sub>r</sub> observée, divisée par la valeur RSD<sub>r</sub> estimée par l'équation Horwitz sur l'hypothèse r = 0,66R

R reproductibilité (entre l'écart laboratoire) (2,8 x S<sub>R</sub>)

S<sub>R</sub> écart-type de la reproductibilité

RSD<sub>R</sub> écart-type relatif de la reproductibilité (S<sub>R</sub> x 100/moyenne)

Ho<sub>R</sub> la valeur Horrat de reproductibilité est la valeur RSD<sub>R</sub> observée, divisée par la valeur RSD<sub>R</sub> calculée par l'équation Horwitz

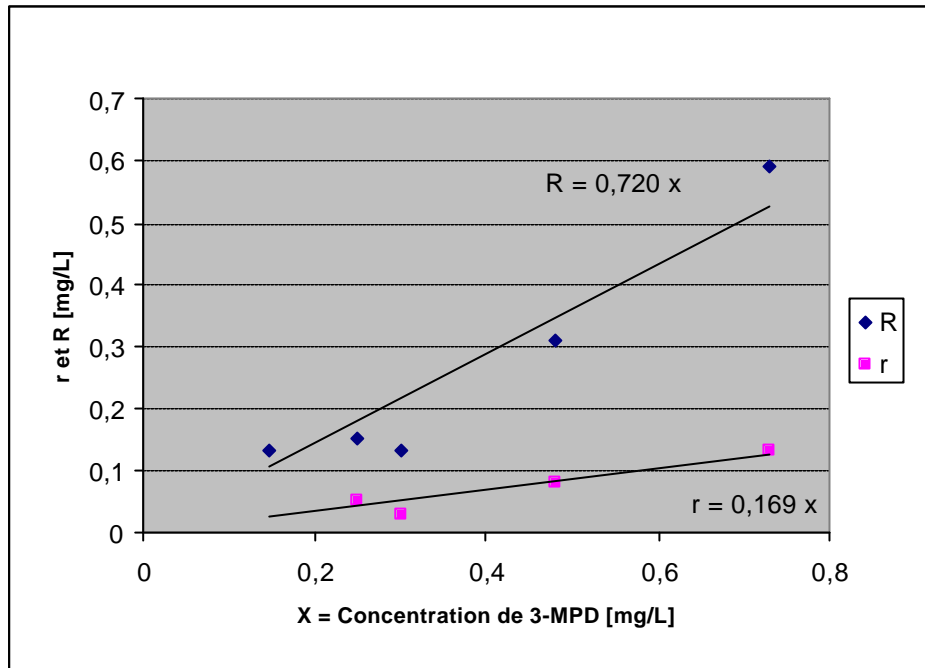


Schéma 1. Corrélation entre la concentration de 3-MPD et r et R.

**Tableau 3. Résultats pour les diglycérols cycliques**

	<b>ÉCHANTILLON A</b> Vin blanc	<b>ÉCHANTILLON B</b> Vin rouge <sup>a</sup>	<b>ÉCHANTILLON D</b> Vin rouge	<b>ÉCHANTILLON F</b> Vin rouge doux	<b>ÉCHANTILLON G</b> Vin blanc doux
<b>Moyenne mg/L</b>	<b>1,55</b>	<b>0,593</b>	<b>0,80</b>	<b>0,96</b>	<b>0,56</b>
<b>mg/L enrichi</b>	1,50	0,53			0,50
Récupération %	103	113			112
n	11	11 <sup>a</sup>	11	11	11
nc	0	0	0	0	0
Résultats aberrants	2	0	1	2	1
n1	9	11 <sup>a</sup>	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
<b>Hor</b>	<b>0,90</b>	-	<b>0,80</b>	<b>0,60</b>	<b>0,80</b>
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
<b>HoR</b>	<b>0,90</b>	<b>1,319</b>	<b>1,00</b>	<b>0,90</b>	<b>1,20</b>

<sup>a</sup> Échantillon d'essai simple ; n et nc sont des résultats simples.

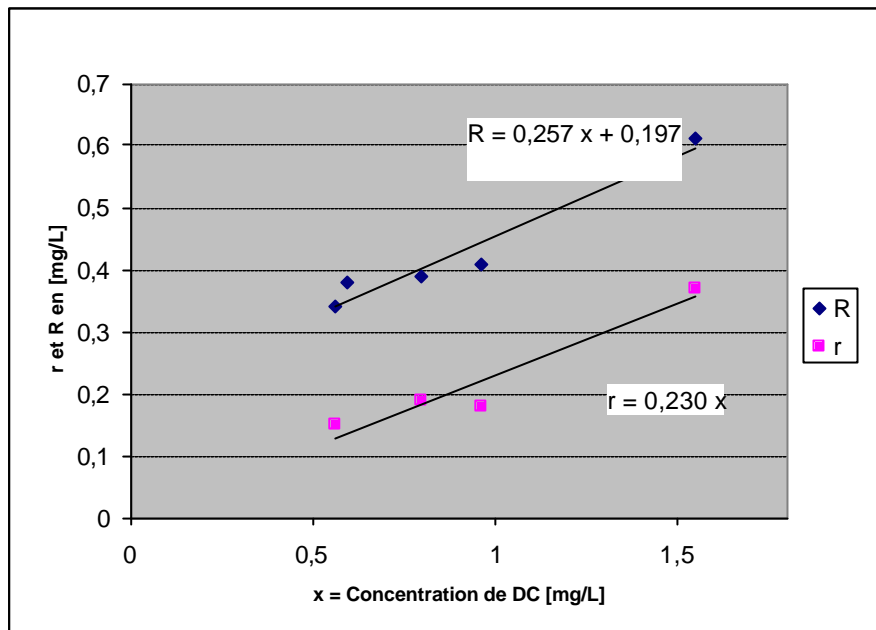


Schéma 2. Corrélation entre la concentration de DC et r et R.

- 
- (1) Lampe, U., Kreisel, A., Burkhard, A., Bebiolka, H., Brzezina, T., Dunkel, K. (1997)  
Zum Nachweis eines Glycerinzusatzes zu Wein  
Deutsche Lebensmittelrundschaу 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

**Limites maximales acceptables de divers éléments dans le  
vin**  
(édition 2008)

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.
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
Diéthylène glycol :	≤ 10 mg/l, à la limite de quantification
Diglycoside de malvidol :	15 mg/l (déterminé par la méthode quantitative décrite dans le <i>Recueil</i> ).

**RECUEIL INTERNATIONAL DES METHODES D'ANALYSES – OIV**  
**Limites maximales acceptables de divers éléments dans le vin**

---

Dioxyde de soufre total au moment de la vente au consommateur: (oen 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 (oen 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 (oen 13/06):	0,15 mg/l pour les vins produits à partir de la campagne 2007,
--------------------	--

Propane-1,2- diol / Propylène glycol (oen 20/2003)	Vins tranquilles: = 150 mg/l. Vins mousseux: = 300 mg/l.
--	---

Sodium excédentaire (Oeno 12/2007)	: 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
--------	--------

Conformément à la jurisprudence, l'O.I.V. 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'O.I.V. 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'O.I.V., est illicite et constitue une contrefaçon.

© O.I.V. - 2008

---

**ORGANISATION INTERNATIONALE DE LA VIGNE ET DU VIN**

**18, rue d'Aguesseau**

**75008 PARIS**

**Tél. (33) 01.44.94.80.80 - Tlc. (33) 01.42.66.90.63**

**E-mail: [oiv@oiv.int](mailto:oiv@oiv.int) - [www.oiv.int](http://www.oiv.int)**