

II

(Communications)

COMMUNICATIONS PROVENANT DES INSTITUTIONS, ORGANES ET ORGANISMES DE L'UNION EUROPÉENNE

COMMISSION EUROPÉENNE

Liste et description des méthodes d'analyses visées à l'article 120 octies, premier alinéa, du règlement (CE) n° 1234/2007 du Conseil ⁽¹⁾*[publiées conformément à l'article 15, paragraphe 2, du règlement (CE) n° 606/2009 de la Commission du 10 juillet 2009 ⁽²⁾]*

(2010/C 43/01)

Le tableau ci-après regroupe la liste des méthodes d'analyses qui sont applicables pour le contrôle des limites et des exigences fixées dans la réglementation communautaire pour la production des produits vitivinicoles. Dans la troisième colonne, on trouvera pour chaque paramètre concerné, la référence de la méthode d'analyse correspondante décrite dans le «Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts» de l'OIV, dans la dernière édition (2009) disponible à la date de cette publication. Pour chaque paramètre, seules les méthodes de référence («Type I» ou «Type II» dans la classification OIV) sont décrites, à l'exception des paramètres pour lesquelles il n'y a actuellement pas de méthode de type I ou II validée. La description des méthodes figure à l'Annexe de la communication.

Rappel:

Le Recueil de l'OIV établit dans son annexe A, section I la définition des différents types de méthodes d'analyse, et notamment le type I (Méthode de référence critère), le type II (Méthode de référence) et le type IV (Méthode provisoire).

Les méthodes d'analyse pour le plomb et le cadmium sont maintenant décrites dans le règlement (CE) n° 333/2007 de la Commission du 28 mars 2007 (annexe C-3) ⁽³⁾. Par ailleurs, le règlement (CE) n° 401/2006 du 23 février 2006 ⁽⁴⁾ établit des critères généraux pour les méthodes d'analyse pour l'ochratoxine A dans son annexe II.4, et il n'est donc pas nécessaire de décrire pour cette substance une méthode spécifique aux produits vitivinicoles.

LISTE DES METHODES D'ANALYSE

N°	Paramètre	Méthode du Recueil de l'OIV	Type
1	Masse volumique / densité	AS-2-01-MASVOL	I
2	Indice réfractométrique	AS-2-02-SUCREF	I
3	Extrait sec total	AS-2-03-EXTSEC	I
4	Rapport isotopique ¹⁸ O/ ¹⁶ O de l'eau du vin	AS-2-09-MOUO18	II

⁽¹⁾ JO L 299 du 16.11.2007.⁽²⁾ JO L193 du 24.07.2009, p.1.⁽³⁾ JO L 88 du 29.3.2007, p. 29.⁽⁴⁾ JO L 70 du 9.3.2006, p. 12.

N°	Paramètre	Méthode du Recueil de l'OIV	Type
5	Indice de Folin	AS-2-10-INDFOL	IV
6	Teneur en sucre (= glucose+fructose)	AS-311-02-GLUFRU	II
7	Teneur en saccharose (mesure HPLC)	AS-311-03-SUCRES	II
8	Résonance Magnétique Nucléaire - Deutérium de l'éthanol du vin	AS-311-05-ENRRMN (<i>en révision</i>)	I
9	Titre Alcoométrique Volumique en % (TAV)	AS-312-01-TALVOL	I
10	Rapport isotopique $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de l'éthanol du vin	AS-312-06-ETHANO	II
11	Acidité totale	AS-313-01-ACITOT	I
12	Acidité volatile	AS-313-02-ACIVOL	I
13	Acide citrique	AS-313-09-ACIENZ	II
14	Acide sorbique	AS-313-14-ACISOR	IV
15	pH moûts	AS-313-15-PH	I
16	Acide ascorbique	AS- 313-22 ACASCO	II
17	CO ₂ en g/l	AS-314-01-DIOCAR	II
18	CO ₂ en g/l (manométrie)	AS-314-04-CO2MAN	II
19	Surpression CO ₂	AS-314-02-SURPRES	I
20	Lysozyme	AS-315-14-LYSOZY	IV
21	Sulfate de potassium	AS-321-05-SULFAT	II
22	Fer	AS-322-05-FER	IV
23	Cuivre	AS-322-06-CUIVRE	IV
24	Sulfites (SO ₂) ou Dioxyde de soufre total	AS-323-04-DIOSU	II

La description de quelques méthodes d'analyse fait l'objet d'une mise à jour par les instances de l'OIV. Ces descriptions seront publiées dans une prochaine Communication de la Commission dès qu'un texte mis à jour sera publié par l'OIV dans l'édition 2010 du Recueil des Méthode Internationales d'analyse de l'OIV.

ANNEXE

TABLE DES MATIÈRES

1. MASSE VOLUMIQUE À 20 °C ET DENSITÉ RELATIVE À 20 °C (OIV - AS2 - 01- MASVOL) — Méthode Type I	4
2. ÉVALUATION DE LA TENEUR EN SUCRES DES MOÛTS, DES MOÛTS CONCENTRÉS ET DES MOÛTS CONCENTRÉS RECTIFIÉS PAR RÉFRACTOMÉTRIE (OIV - AS2 - 02- SUCREF) — Méthode Type I	8
3. EXTRAIT SEC TOTAL (OIV-AS-2-03-EXTSEC) Matières sèches totales — Méthode Type I	10
4. DÉTERMINATION DU RAPPORT ISOTOPIQUE $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ DE L'EAU DES VINS (OIV-AS-2-09-MOUO18) — Méthode Type II	11
5. INDICE DE FOLIN-CIOCALTEU (OIV-AS-2-10-INDFOL) — Méthode Type IV	12
6. GLUCOSE ET FRUCTOSE (OIV-AS-311-02-GLUFRU) — Méthode Type II	14
7. DOSAGE DES SUCRES PAR HPLC (SACCHAROSE) (OIV-AS-311-03-SUCRES) — Méthode Type II	17
8. DÉTECTION DE L'ENRICHISSEMENT DES MOÛTS DE RAISINS, DES MOÛTS DE RAISINS CONCENTRÉS, DES MOÛTS DE RAISINS CONCENTRÉS RECTIFIÉS ET DES VINS PAR APPLICATION DE LA RÉSONANCE MAGNÉTIQUE NUCLÉAIRE DU DEUTÉRIUM (OIV-AS-311-05-ENRRMN) — Méthode Type I	18
9. TITRE ALCOOMÉTRIQUE VOLUMIQUE (OIV-AS-312-01-TALVOL) — Méthode Type I	19
10. DÉTERMINATION DU RAPPORT ISOTOPIQUE $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE ISOTOPIQUE DE L'ÉTHANOL DU VIN OU DE L'ÉTHANOL OBTENU PAR FERMENTATION DES MOÛTS, DES MOÛTS CONCENTRÉS OU DES MOÛTS CONCENTRÉS RECTIFIÉS (OIV-AS-312-06-ETHANO) — Méthode Type II	20
11. ACIDITÉ TOTALE (OIV - AS-313-01-ACITOT) — Méthode Type I	27
12. ACIDITÉ VOLATILE (OIV - AS-313-02-ACIVOL) — Méthode Type I	30
13. ACIDE CITRIQUE (OIV -AS-313-09-ACIENZ) — Méthode Type II	33
14. ACIDE SORBIQUE (OIV - AS-313-14-ACISOR) — Méthode Type IV	36
15. pH (OIV - AS-313-15-PH) — Méthode Type I	39
16. DOSAGE SIMULTANE DE L'ACIDE L-ASCORBIQUE ET DE L'ACIDE D-ISO-ASCORBIQUE PAR HPLC ET DÉTECTION UV (OIV-AS-313-22-ACASCO) — Méthode Type II	41
17. DIOXYDE DE CARBONE (OIV - AS-314-01-DIOCAR) — Méthode Type II	45
18. DOSAGE DU DIOXYDE DE CARBONE DANS LE VIN PAR METHODE MANOMETRIQUE (OIV - AS314-04-CO2MAN) — Méthode Type II	47
19. MESURE DE LA SURPRESSION DES VINS MOUSSEUX ET PETILLANTS (OIV - AS-314-02-SURPRES) — Méthode Type I	48
20. Dosage du lysozyme dans le vin par HPLC (OIV-AS-315-14) — Méthode Type IV	51
21. SULFATES (OIV- AS-321-05-SULFAT) — Méthode Type II	54
22. FER (OIV - AS-322-05-FER) — Méthode Type IV	55
23. CUIVRE (OIV - AS 322-06) — Méthode Type IV	56
24. DIOXYDE DE SOUFRE (OIV - AS-323-04-DIOSU) — Méthode Type II	58

1 MASSE VOLUMIQUE À 20 °C ET DENSITÉ RELATIVE À 20 °C (OIV - AS2 - 01- MASVOL) — METHODE TYPE I

1. DÉFINITIONS

La masse volumique est le quotient de la masse d'un certain volume de vin ou de moût à 20 °C par ce volume. Elle s'exprime en grammes par millilitre et son symbole est $\rho_{20\text{ °C}}$.

La densité relative à 20 °C ou densité 20 °C/20 °C est le rapport exprimé en nombre décimal, de la masse d'un certain volume de vin ou de moût à 20 °C à la masse du même volume d'eau à la même température. Son symbole est $d_{20\text{ °C}}^{20\text{ °C}}$.

2. PRINCIPE DES MÉTHODES

La masse volumique et la densité relative à 20 °C sont déterminées sur l'échantillon pour essai:

soit par pycnométrie: méthode de référence,

soit par densimétrie par la balance hydrostatique ou par densimétrie électronique.

Remarque

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

$$\rho_{20\text{ °C}} = \rho'_{20\text{ °C}} - 0,0006 \times S$$

$$\rho_{20\text{ °C}} = \text{masse volumique corrigée}$$

$$\rho'_{20\text{ °C}} = \text{masse volumique observée}$$

$$S = \text{dioxyde de soufre total en g/l}$$

3. TRAITEMENT PRÉALABLE DE L'ÉCHANTILLON

Si le vin ou le moût contient des quantités notables de dioxyde de carbone, en chasser la plus grande quantité par agitation de 250 ml de vin dans un flacon de 1 000 ml, ou par filtration sous pression réduite sur 2 g de coton placé dans une allonge.

4. MÉTHODE DE RÉFÉRENCE

4.1. Appareillage

Matériel courant de laboratoire, et notamment:

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

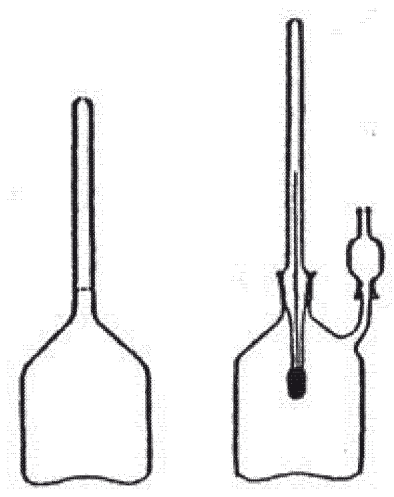


Figure 1

Pycnomètre et son flacon tare

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

⁽¹⁾ Tout pycnomètre de caractéristiques équivalentes peut être employé.

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

- 4.1.2. Flacon tare de même volume extérieur (à moins de 1 ml près) que le pycnomètre et de masse égale à la masse du pycnomètre plein d'un liquide de densité 1,01 [solution à 2 pour 100 (m/v) de chlorure de sodium].

Enceinte calorifugée s'adaptant exactement au corps du pycnomètre.

- 4.1.3. Balance à deux plateaux de portée 300 g au moins, sensible au dixième de milligramme,

ou,

balance monoplateau de portée 200 g au moins, sensible au dixième de milligramme.

4.2. **Étalonnage du pycnomètre**

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

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

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

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

Remplir avec soin le pycnomètre avec de l'eau distillée à la température ambiante, mettre en place le thermomètre; essuyer soigneusement le pycnomètre et le placer dans l'enceinte calorifugée; agiter par retournement jusqu'à ce que la température lue sur le thermomètre soit constante. Affleurer exactement au bord supérieur du tube latéral. Essuyer ce tube latéral, placer le bouchon récepteur; lire la température t °C avec soin et la corriger éventuellement de l'inexactitude de l'échelle du thermomètre. Peser le pycnomètre plein d'eau, soit p' la masse en grammes qui réalise l'équilibre.

Calculs

Tare du pycnomètre vide:

Tare à vide = p + m

m = masse d'air contenue dans le pycnomètre

$m = 0,0012 (p - p')$.

Volume à 20 °C:

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

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

$V_{20\text{ °C}}$ doit être connu à $\pm 0,001$ ml près.

Masse en eau à 20 °C:

$M_{20\text{ °C}} = V_{20\text{ °C}} \times 0,998203$

0,998203 = masse volumique de l'eau à 20 °C.

4.2.2. *Utilisation d'une balance monoplateau*

Déterminer:

- la masse du pycnomètre propre et sec: P
- la masse du pycnomètre plein d'eau à t °C: P₁ en suivant les indications décrites au point 4.2.1
- la masse du flacon tare T₀

Calculs

Tare du pycnomètre vide:

Tare à vide = $P - m$

m = masse d'air contenue dans le pycnomètre

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

Volume à 20 °C:

$V_{20\text{ °C}} = [P_1 - (P - m)] \times F_t$

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

Le volume à 20 °C doit être connu à $\pm 0,001$ ml près.

Masse en eau à 20 °C:

$M_{20\text{ °C}} = V_{20\text{ °C}} \times 0,998203$

0,998203 = masse volumique de l'eau à 20 °C.

4.3. **Technique d'une mesure**

4.3.1. *Utilisation d'une balance à deux plateaux*

Peser le pycnomètre plein de l'échantillon préparé pour essais (point 3) en suivant les indications décrites au point 4.2.1.

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

Masse du liquide contenu dans le pycnomètre = $p + m - p''$

Masse volumique apparente à t °C:

$\rho_t\text{ °C} = (p + m - p'') / (V_{20\text{ °C}})$

Calculer la masse volumique à 20 °C à l'aide d'une des tables de correction ci-après, suivant la nature du liquide étudié: vin sec (table II), moût naturel ou concentré (table III), vin doux (table IV).

On exprime la densité 20 °C/20 °C du vin en divisant la masse volumique à 20 °C par 0,998203.

4.3.2. *Utilisation d'une balance monoplateau*

Peser le flacon tare, soit T_1 sa masse

Calculer $dT = T_1 - T_0$

Masse du pycnomètre vide au moment de la mesure = $P - m + dT$

Peser le pycnomètre plein de l'échantillon préparé pour essais (point 3) en suivant les indications décrites au point 4.2.1. Soit P_2 sa masse à t °C.

Masse du liquide contenu dans le pycnomètre à t °C = $P_2 - (P - m + dT)$

Masse volumique apparente à t °C:

$\rho_t\text{ °C} = (P_2 - (P - m + dT)) / (V_{20\text{ °C}})$

Calculer la masse volumique à 20 °C du liquide étudié: vin sec, moût naturel et concentré, vin doux, comme il est indiqué au point 4.3.1.

La densité 20 °C/20 °C est obtenue en divisant la masse volumique à 20 °C par 0,998203.

4.3.3. Répétabilité sur la masse volumique:

pour les vins secs et moelleux: $r = 0,00010$

pour les vins doux: $r = 0,00018$

4.3.4. Reproductibilité sur la masse volumique:

pour les vins secs et moelleux: $R = 0,00037$

pour les vins doux: $R = 0,00045$

TABLE I

Facteurs F

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

[Se référer à la table I de l'annexe II de la méthode AS2 - 01 décrite dans le Recueil International des méthodes d'analyse de l'OIV]

TABLE II

Corrections c de température sur la masse volumique des vins secs et des vins secs débarrassés d'alcool, mesurée dans un pycnomètre en verre pyrex à t °C, pour la ramener à 20 °C

[Se référer à la table II de l'annexe II de la méthode AS2 - 01 décrite dans le Recueil International des méthodes d'analyse de l'OIV]

$$\rho_{20} = \rho_t \pm (c/1\ 000) \quad \begin{array}{l} - \text{ si } t \text{ °C est inférieur à } 20 \text{ °C} \\ + \text{ si } t \text{ °C est supérieur à } 20 \text{ °C} \end{array}$$

TABLE III

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

[Se référer à la table III de l'annexe II de la méthode AS2 - 01 décrite dans le Recueil International des méthodes d'analyse de l'OIV]

$$\rho_{20} = \rho_t \pm (c/1\ 000) \quad \begin{array}{l} - \text{ si } t \text{ °C est inférieur à } 20 \text{ °C} \\ + \text{ si } t \text{ °C est supérieur à } 20 \text{ °C} \end{array}$$

TABLE IV

Corrections c de température sur la masse volumique des vins de 13 % vol. et plus contenant du sucre résiduel mesurée à l'aide d'un pycnomètre en verre pyrex, à t °C pour la ramener à 20 °C

[Se référer à la table IV de l'annexe II de la méthode AS2 - 01 décrite dans le Recueil International des méthodes d'analyse de l'OIV]

$$\rho_{20} = \rho_t \pm (c/1\ 000) \quad \begin{array}{l} - \text{ si } t \text{ °C est inférieur à } 20 \text{ °C} \\ + \text{ si } t \text{ °C est supérieur à } 20 \text{ °C} \end{array}$$

2 ÉVALUATION DE LA TENEUR EN SUCRES DES MOÛTS, DES MOÛTS CONCENTRÉS ET DES MOÛTS CONCENTRÉS RECTIFIÉS PAR RÉFRACTOMÉTRIE (OIV - AS2 - 02- SUCREF) — MÉTHODE TYPE I

1. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

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

2. APPAREILLAGE

2.1. Réfractomètre du type Abbé

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

- soit les pourcentages en masse de saccharose à 0,1 %,
- 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.

3. PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON

3.1. Moûts et moûts concentrés

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

3.2. Moûts concentrés rectifiés

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

4. MODE OPÉRATOIRE

Amener l'échantillon à une température voisine de 20 °C. Déposer une petite prise d'essai sur le prisme inférieur du réfractomètre en veillant à ce que, les prismes étant pressés l'un contre l'autre, la prise d'essai couvre uniformément la surface du verre, et effectuer la mesure conformément aux instructions opératoires de l'appareil utilisé.

Lire le pourcentage en masse de saccharose à 0,1 % près ou relever l'indice de réfraction avec quatre décimales.

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

5. CALCULS

5.1. Correction de température

5.1.1. Appareils gradués en % en masse de saccharose: utiliser la table I pour la correction de température.

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

5.2. Teneur en sucres des moûts et des moûts concentrés

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

5.3. Teneur en sucres du moût concentré rectifié

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

Si la mesure a été effectuée sur le moût concentré rectifié dilué, multiplier le résultat par le facteur de dilution.

5.4. Indice de réfraction des moûts, des moûts concentrés et des moûts concentrés rectifiés

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

Note: Le titre alcoométrique en puissance des moûts, des moûts concentrés et des moûts concentrés rectifiés peut être déterminé en utilisant le tableau de correspondance figurant à l'annexe I du règlement (CE) n° 1623/2000 de la Commission du 25 Juillet 2000 (JOCE L 194 du 31 juillet 2000)

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

[se référer à la table I de l'annexe de la méthode AS2 - 02 décrite dans le Recueil International des méthodes d'analyse de l'OIV]

TABLE II

Table 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 à 20 °C est également donnée.

[se référer à la table II de l'annexe de la méthode AS2 - 02 décrite dans le Recueil International des méthodes d'analyse de l'OIV]

TABLE III

Table donnant la teneur en sucre des moûts concentrés rectifiés 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 à 20 °C est également donnée.

[se référer à la table III de l'annexe de la méthode AS2 - 02 décrite dans le Recueil International des méthodes d'analyse de l'OIV]

3 EXTRAIT SEC TOTAL (OIV-AS-2-03-EXTSEC) MATIÈRES SÈCHES TOTALES — MÉTHODE TYPE I

1. DÉFINITION

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

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

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

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

L'extrait est exprimé en grammes par litre et il doit être déterminé à 0,5 g près.

2. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

[La description de cette méthode d'analyse fait l'objet d'une mise à jour par les instances de l'OIV. Elle sera publiée dans une prochaine Communication de la Commission dès qu'un texte mis à jour sera publié par l'OIV dans l'édition 2010 du Recueil des Méthodes Internationales d'analyse de l'OIV. A titre indicatif, dans l'attente de cette publication, on peut se référer au chapitre 4 de l'annexe du Règlement (CEE) n° 2676/90 de la Commission.]

4 DÉTERMINATION DU RAPPORT ISOTOPIQUE $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ DE L'EAU DES VINS (OIV-AS-2-09-MOUO18) —
MÉTHODE TYPE II

(p.m.)

[La description de cette méthode d'analyse fait l'objet d'une mise à jour par les instances de l'OIV. Elle sera publiée dans une prochaine Communication de la Commission dès qu'un texte mis à jour sera publié par l'OIV dans l'édition 2010 du Recueil des Méthodes Internationales d'analyse de l'OIV. A titre indicatif, dans l'attente de cette publication, on peut se référer au chapitre 43 de l'annexe du Règlement (CEE) n° 2676/90 de la Commission.]

5 INDICE DE FOLIN-CIOCALTEU (OIV-AS-2-10-INDFOL) — MÉTHODE TYPE IV**1. DÉFINITION**

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

2. PRINCIPE

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

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

3. RÉACTIFS

Les réactifs doivent être de qualité analytique. L'eau utilisée doit être de l'eau distillée ou de l'eau de pureté équivalente.

3.1. Réactif de Folin-Ciocalteu

Ce réactif est disponible dans le commerce prêt à l'emploi. Il peut être préparé de la façon suivante: 100 g de tungstate de sodium ($Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$) et 25 g de molybdate de sodium ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$) sont dissous dans 700 ml d'eau distillée; ajouter 50 ml d'acide phosphorique à 85 % ($\rho_{20} = 1,71$ g/ml), 100 ml d'acide chlorhydrique concentré ($\rho_{20} = 1,19$ g/ml). Porter à l'ébullition sous reflux durant 10 heures, ajouter ensuite 150 g de sulfate de lithium ($Li_2SO_4 \cdot H_2O$), quelques gouttes de brome et porter à nouveau à l'ébullition durant 15 minutes. Refroidir et compléter à 1 litre avec de l'eau distillée.

3.2. Carbonate de sodium (Na_2CO_3) anhydre en solution à 20 % (m/v).**4. APPAREILLAGE**

Matériel courant de laboratoire, et notamment:

4.1. Fioles jaugées de 100 ml.**4.2. Spectrophotomètre permettant de travailler à 750 nm.****5. MODE OPÉRATOIRE****5.1. Cas des vins rouges**

Dans une fiole jaugée de 100 ml (point 4.1), introduire en respectant l'ordre suivant:

1 ml de vin dilué au 1/5^e

50 ml d'eau distillée

5 ml de réactif de Folin-Ciocalteu (3.1)

20 ml de solution de carbonate de sodium (3.2)

Porter à 100 ml avec de l'eau distillée.

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

Si l'absorbance lue n'est pas voisine de 0,3, il convient de modifier la dilution du vin.

5.2. Cas des vins blancs

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

5.3. Cas des moûts concentrés rectifiés**5.3.1. Préparation de l'échantillon**

Utiliser la solution dont la teneur en sucres est de 25 pour 100 (m/m) (25° Brix) préparée comme il est indiqué au chapitre «pH», au point 4.1.2.

5.3.2. *Mesure*

Opérer comme il est décrit dans le cas des vins rouges (point 5.1) sur 5 ml d'échantillon préparé selon le point 5.3.1 en mesurant l'absorbance par rapport à un témoin préparé avec 5 ml d'une solution de sucre interverti à 25 pour 100 (m/m).

6. EXPRESSION DES RÉSULTATS

6.1. **Mode de calcul**

Le résultat est exprimé sous forme d'un indice obtenu en multipliant l'absorbance par 100 dans le cas des vins rouges dilués au 1/5^e (ou par le facteur correspondant à la dilution employée) et par 20 dans le cas des vins blancs. Dans le cas des moûts concentrés rectifiés, l'absorbance est multipliée par 16.

6.2. **Répétabilité**

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

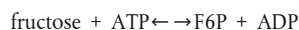
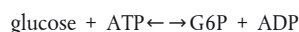
Une bonne répétabilité des résultats est liée à l'utilisation d'un appareillage (fioles jaugées et cuves du spectrophotomètre) rigoureusement propre.

6 GLUCOSE ET FRUCTOSE (OIV-AS-311-02-GLUFRO) — MÉTHODE TYPE II**1. DÉFINITION**

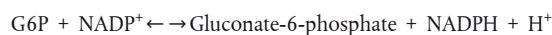
Le glucose et le fructose peuvent être dosés individuellement par une méthode enzymatique, en vue seulement du calcul du rapport glucose/fructose.

2. PRINCIPE

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

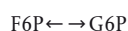


Dans un premier temps le glucose-6-phosphate est oxydé en gluconate-6-phosphate par le nicotinamide-adenine-dinucléotide-phosphate (NADP) en présence de l'enzyme glucose-6-phosphate-déshydrogénase (G6PDH). La quantité de nicotinamide-adenine-dinucléotide-phosphate réduite (NADPH) qui prend naissance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



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

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



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

3. APPAREILLAGE

— Spectrophotomètre permettant d'effectuer la mesure à 340 nm, maximum d'absorption du NADPH. S'agissant de mesures absolues (pas de gamme d'étalonnage, mais référence au coefficient d'extinction du NADPH), les échelles des longueurs d'onde et des absorbances de l'appareil doivent être contrôlées.

À défaut, utiliser un spectrophotomètre à spectre discontinu permettant d'effectuer les mesures à 334 nm ou à 365 nm.

— Cuves de verre de 1 cm de trajet optique ou cuves à usage unique.

— Pipettes pour test enzymatique de 0,02 — 0,05 — 0,1 — 0,2 ml.

4. RÉACTIFS

- 4.1. **Solution 1:** tampon (triéthanolamine 0,3 M; pH = 7,6; 4×10^{-3} M en Mg^{2+}): 11,2 g de chlorhydrate de triéthanolamine ($\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{N}\cdot\text{HCl}$) et 0,2 g de $\text{Mg SO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ sont dissous dans 150 ml d'eau bidistillée, ajouter environ 4 ml de solution 5 M d'hydroxyde de sodium (NaOH) pour obtenir un pH égal à 7,6 et porter à 200 ml.

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

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

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

- 4.3. **Solution 3:** solution d'adénosine-5'-triphosphate (environ 81×10^{-3} M): 250 mg d'adénosine-5'-triphosphate disodique et 250 mg d'hydrogénocarbonate de sodium Na H CO_3 sont dissous dans 5 ml d'eau bidistillée.

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

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

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

- 4.5. **Solution 5:** Phosphoglucose-isomérase (2 mg de protéine par ml soit 700 U/ml). La suspension est utilisée sans dilution.

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

Remarque:

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

5. MODE OPÉRATOIRE

5.1. Préparation de l'échantillon

En fonction de la quantité estimée de glucose + fructose par litre, effectuer les dilutions suivantes:

Mesure à 340 et 334 nm	Mesure à 365 nm	Dilution avec l'eau	Facteur F de dilution
Jusqu'à 0,4 g/l	Jusqu'à 0,8 g/l	—	—
Jusqu'à 4,0 g/l	Jusqu'à 8,0 g/l	1 + 9	10
Jusqu'à 10,0 g/l	Jusqu'à 20,0 g/l	1 + 24	25
Jusqu'à 20,0 g/l	Jusqu'à 40,0 g/l	1 + 49	50
Jusqu'à 40,0 g/l	Jusqu'à 80,0 g/l	1 + 99	100
Au-dessus de 40,0 g/l	Au-dessus de 80,0 g/l	1 + 999	1 000

5.2. Dosage

Le spectrophotomètre étant réglé sur la longueur d'onde 340 nm, effectuer les mesures par rapport à l'air (pas de cuve dans le trajet optique) ou par rapport à l'eau.

Température 20 à 25 °C.

Dans 2 cuves de 1 cm de trajet optique, introduire:

	Témoin	Dosage
Solution 1 (4.1) (ramenée à 20 °C)	2,50 ml	2,50 ml
Solution 2 (4.2)	0,10 ml	0,10 ml
Solution 3 (4.3)	0,10 ml	0,10 ml
Échantillon à doser		0,20 ml
Eau bidistillée	0,20 ml	

Mélanger et après environ 3 minutes lire l'absorbance des solutions (A_1). Déclencher la réaction en ajoutant:

Solution 4 (4.4)	0,02 ml	0,02 ml
------------------	---------	---------

Mélanger; attendre 15 minutes; effectuer la mesure de l'absorbance et vérifier l'arrêt de la réaction après 2 minutes (A_2).

Ajouter immédiatement:

Solution 5 (4.5)	0,02 ml	0,02 ml
------------------	---------	---------

Mélanger; effectuer la lecture au bout de 10 minutes; vérifier l'arrêt de la réaction après 2 minutes (A_3).

Déterminer les différences d'absorbance:

$A_2 - A_1$ correspondant au glucose,

$A_3 - A_2$ correspondant au fructose,

pour le témoin et le dosage.

Déduire la différence d'absorbance du témoin (ΔA_T) de celle du dosage (ΔA_D) et établir:

pour le glucose: $\Delta A_G = \Delta A_D - \Delta A_T$

pour le fructose: $\Delta A_F = \Delta A_D - \Delta A_T$

Remarque:

Le temps nécessaire à l'action des enzymes peut varier d'un lot à l'autre. Il n'est donné ci-dessus qu'à titre indicatif. Il est recommandé de le déterminer pour chaque lot.

5.3. Expression des résultats

5.3.1. Calcul

La formule générale pour le calcul des concentrations est la suivante:

$$C = ((V \times PM)/(\epsilon \times d \times v \times 1\,000)) \times \Delta A \text{ (g/l)}$$

V = volume du test (ml)

v = volume de l'échantillon (ml)

PM = masse moléculaire de la substance à doser

d = trajet optique de la cuve (cm)

ϵ = coefficient d'absorption du NADPH à 340 nm = 6,3 (mmole⁻¹ x l x cm⁻¹)

V = 2,92 ml pour le dosage du glucose

V = 2,94 ml pour le dosage du fructose

v = 0,20 ml

PM = 180

d = 1.

On obtient:

pour le glucose: $C(\text{g/l}) = 0,417 \times \Delta A_G$

pour le fructose: $C(\text{g/l}) = 0,420 \times \Delta A_F$

Si une dilution a été effectuée lors de la préparation de l'échantillon, multiplier le résultat par le facteur F.

Remarque:

Si les mesures ont été faites aux longueurs d'onde 334 ou 365 nm, on obtient:

— mesure à 334 nm: $\epsilon = 6,2$ (mmole⁻¹ x l x cm⁻¹)

pour le glucose: $C(\text{g/l}) = 0,425 \times \Delta A_G$

pour le fructose: $C(\text{g/l}) = 0,428 \times \Delta A_F$

— mesure à 365 nm: $\epsilon = 3,4$ (mmole⁻¹ x l x cm⁻¹)

pour le glucose: $C(\text{g/l}) = 0,773 \times \Delta A_G$

pour le fructose: $C(\text{g/l}) = 0,778 \times \Delta A_F$

5.3.2. Répétabilité (r)

$$r = 0,056 \times x_i$$

5.3.3. Reproductibilité (R)

$$R = 0,12 + 0,076 \times x_i$$

x_i = teneur en glucose ou fructose en grammes par litre.

7 DOSAGE DES SUCRES PAR HPLC (SACCHAROSE) (OIV-AS-311-03-SUCRES) — MÉTHODE TYPE II**(p.m.)**

[La description de cette méthode d'analyse fait l'objet d'une mise à jour par les instances de l'OIV. Elle sera publiée dans une prochaine Communication de la Commission dès qu'un texte mis à jour sera publié par l'OIV dans l'édition 2010 du Recueil des Méthodes Internationales d'analyse de l'OIV. A titre indicatif, dans l'attente de cette publication, on peut se référer au chapitre 6, paragraphe 3 de l'annexe du Règlement (CEE) n° 2676/90 de la Commission.]

8 DÉTECTION DE L'ENRICHISSEMENT DES MOÛTS DE RAISINS, DES MOÛTS DE RAISINS CONCENTRÉS, DES MOÛTS DE RAISINS CONCENTRÉS RECTIFIÉS ET DES VINS PAR APPLICATION DE LA RÉSONANCE MAGNÉTIQUE NUCLÉAIRE DU DEUTÉRIUM (OIV-AS-311-05-ENRRMN) — MÉTHODE TYPE I

(p.m.)

[La description de cette méthode d'analyse fait l'objet d'un réexamen par les instances scientifiques de l'OIV. Elle sera publiée dans une Communication de la Commission dès qu'un texte définitif sera adopté par l'Assemblée Générale de l'OIV. A titre indicatif, dans l'attente de cette décision de l'OIV, on peut se référer au chapitre 8 de l'annexe du Règlement (CEE) n° 2676/90 de la Commission.]

9 TITRE ALCOOMÉTRIQUE VOLUMIQUE (OIV-AS-312-01-TALVOL) — MÉTHODES TYPE I**(p.m.)**

[La description de ces méthodes d'analyse font l'objet d'une mise à jour par les instances de l'OIV. Elles seront publiées dans une prochaine Communication de la Commission dès qu'un texte mis à jour sera publié par l'OIV dans l'édition 2010 du Recueil des Méthode Internationales d'analyse de l'OIV. A titre indicatif, dans l'attente de cette publication de l'OIV, on peut se référer au chapitre 3 de l'annexe du Règlement (CEE) n° 2676/90 de la Commission.]

10 DÉTERMINATION DU RAPPORT ISOTOPIQUE $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE ISOTOPIQUE DE L'ÉTHANOL DU VIN OU DE L'ÉTHANOL OBTENU PAR FERMENTATION DES MOÛTS, DES MOÛTS CONCENTRÉS OU DES MOÛTS CONCENTRÉS RECTIFIÉS (OIV-AS-312-06-ETHANO) — MÉTHODE TYPE II

1. CHAMP D'APPLICATION

La méthode permet la mesure du rapport isotopique $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de l'éthanol du vin et de celui de l'éthanol obtenu après fermentation des produits dérivés de la vigne (moût, moût concentré, moût concentré rectifié).

2. RÉFÉRENCES NORMATIVES

ISO: 5725:1994 «Fidélité des méthodes d'essai — Détermination de la répétabilité et de la reproductibilité d'une méthode d'essai normalisée par essais interlaboratoires».

V-PDB: Vienna-Pee-Dee Belemnite ($R_{\text{PDB}} = 0,0112372$).

Méthode OIV AS-311-O5-ENRRMN «Détection de l'enrichissement des moûts, des moûts concentrés, des moûts concentrés rectifiés et des vins par application de la résonance magnétique nucléaire du deutérium (RMN-FINS)».

3. TERMES ET DÉFINITIONS

$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$: Rapport des isotopes du carbone 13 (^{13}C) et du carbone 12 (^{12}C) pour un échantillon donné.

$\delta^{13}\text{C}$: teneur en carbone 13 (^{13}C) exprimée en parties pour mille (‰).

RMN-FINS: Fractionnement isotopique naturel spécifique étudié par résonance magnétique nucléaire.

V-PDB: Vienna-Pee-Dee Belemnite. Le PDB, référence primaire pour la mesure des variations naturelles des teneurs isotopiques en carbone 13, était un carbonate de calcium provenant d'un rostre de bélemnite du Crétacé de la formation Pee-Dee de la Caroline du sud (Etats-Unis d'Amérique). Son rapport isotopique $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ou R_{PDB} est $R_{\text{PDB}} = 0,0112372$. Le PDB est épuisé depuis longtemps, mais est resté la référence primaire pour exprimer les variations naturelles des teneurs isotopiques en carbone 13, contre laquelle sont calibrés les matériaux de référence, disponibles à l'Agence internationale de l'énergie atomique (IAEA) à Vienne (Autriche). Les déterminations isotopiques des abondances naturelles en carbone 13 sont alors exprimées, par convention, par rapport au V-PDB.

m/z: Rapport masse sur charge.

4. PRINCIPE

Lors de la photosynthèse, l'assimilation du gaz carbonique par les végétaux s'effectue selon deux principaux types de métabolismes qui sont les métabolismes C_3 (cycle de Calvin) et C_4 (Hatch et Slack). Ces deux mécanismes de photosynthèse présentent un fractionnement isotopique différent. Ainsi, les produits issus des plantes C_4 , tel que les sucres et l'alcool dérivé par fermentation, présentent des teneurs en carbone 13 plus élevées que celles de leurs homologues provenant des plantes C_3 . La plupart des végétaux tels que la vigne et la betterave appartiennent au groupe C_3 . La canne à sucre et le maïs appartiennent au groupe C_4 . La mesure de la teneur en carbone 13 permet donc la détection et l'évaluation du sucre d'origine C_4 (sucre de canne ou isoglucose de maïs) ajouté aux produits dérivés du raisin (moûts de raisins, vins, etc.). Les informations combinées de la teneur en carbone 13 avec celles obtenues par RMN-FINS permettent également la quantification de l'addition de mélanges de sucres ou d'alcools d'origine des plantes C_3 et C_4 .

La teneur en carbone 13 est déterminée sur le gaz carbonique résultant de la combustion complète de l'échantillon. Les abondances des principaux isotopomères de masses 44 ($^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2$), 45 ($^{13}\text{C}^{16}\text{O}_2$ et $^{12}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O}$) et 46 ($^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$), résultant des différentes combinaisons possibles des isotopes ^{18}O , ^{17}O , ^{16}O , ^{13}C et ^{12}C , sont déterminées à partir des courants ioniques mesurés sur trois collecteurs différents d'un spectromètre de masse isotopique. Les contributions des isotopomères $^{13}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O}$ et $^{12}\text{C}^{17}\text{O}_2$ peuvent être

négligées en raison de leur très faible abondance. Le courant ionique pour $m/z = 45$ est corrigé de la contribution de $^{12}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O}$ qui est calculée en fonction de l'intensité du courant mesuré pour $m/z = 46$ en considérant les abondances relatives de ^{18}O et ^{17}O (correction de Craig). La comparaison avec une référence calibrée contre la référence internationale V-PDB permet le calcul de la teneur en carbone 13 sur l'échelle relative $\delta^{13}\text{C}$.

5. RÉACTIFS

Les matériaux et les consommables dépendent de l'appareillage (6) utilisé par le laboratoire. Les systèmes généralement utilisés sont ceux fondés sur l'analyseur élémentaire. Celui-ci peut être équipé pour l'introduction d'échantillons placés dans des capsules métalliques scellées, ou pour l'injection d'échantillons liquides à travers un septum au moyen d'une seringue.

Selon le type d'instrumentation utilisé, les matériaux de référence, réactifs et consommables suivants peuvent être utilisés:

- matériaux de référence
- disponibles auprès de l'IAEA:

Nom	Matériel	$\delta^{13}\text{C}$ versus V-PDB (9)
— IAEA-CH-6	saccharose	- 10,4 ‰
— IAEA-CH-7	polyéthylène	- 31,8 ‰
— NBS22	huile	- 29,7 ‰
— USGS24	graphite	- 16,1 ‰

- disponibles auprès de l'Institut des matériaux et mesures de référence (IRMM) de Geel (BE):

Nom	Matériel	$\delta^{13}\text{C}$ versus V-PDB (9)
— CRM/BCR 656	alcool de vin	- 26,93 ‰
— CRM/BCR 657	glucose	- 10,75 ‰
— CRM/BCR 660	solution hydroalcoolique (TAV 12 %)	- 26,72 ‰

- Échantillon standard de travail ayant un rapport $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ connu calibré contre les matériaux de référence internationaux.
- La liste indicative de consommables ci-dessous est établie pour les systèmes à flux continu:
 - hélium pour analyse (CAS 07440-59-7),
 - oxygène pour analyse (CAS 07782-44-7),
 - dioxyde de carbone pour analyse, utilisé comme gaz de référence secondaire pour la teneur en carbone 13 (CAS 00124-38-9),
 - réactif d'oxydation pour le four du système de combustion, par exemple oxyde de cuivre (II) pour analyse élémentaire (CAS 1317-38-0),
 - desséchant pour éliminer de l'eau produite par la combustion, par exemple anhydride pour analyse élémentaire (perchlorate de magnésium) (CAS 10034-81-8) (non nécessaire pour les appareillages équipés avec un système d'élimination de l'eau par cryopiégeage ou au moyen d'un capillaire sélectivement perméable).

6. APPAREILLAGE ET MATÉRIEL

6.1. Spectromètre de masse de rapport isotopique (SMRI)

Spectromètre de masse de rapport isotopique (SMRI), permettant de déterminer la teneur relative de ^{13}C du gaz CO_2 en abondance naturelle avec une précision interne de 0,05 ‰ ou mieux exprimée en valeur relative (point 9). La précision interne est ici définie comme la différence entre deux mesures du même échantillon de CO_2 . Le spectromètre de masse, destiné à la mesure des rapports isotopiques, est généralement équipé d'un collecteur triple pour mesurer simultanément les intensités pour $m/z = 44, 45$ et 46 . Le spectromètre de masse de rapport isotopique doit soit être équipé d'un système d'introduction double, pour mesurer en alternance l'échantillon inconnu et un échantillon de référence, soit utiliser un système intégré qui effectue la combustion quantitative des échantillons et sépare le dioxyde de carbone des autres produits de combustion préalablement à la mesure dans le spectromètre de masse.

6.2. Appareillage de combustion

Appareillage de combustion capable de convertir quantitativement l'éthanol en dioxyde de carbone et d'éliminer tous les autres produits de combustion y compris l'eau sans aucun fractionnement isotopique. L'appareillage peut être soit un système à flux continu intégré à l'instrumentation de spectrométrie de masse (point 6.2.1), soit un système de combustion autonome (point 6.2.2). L'appareillage doit permettre d'obtenir une précision au moins équivalente à celle indiquée au point 11.

6.2.1. Systèmes à flux continu

Ceux-ci sont constitués soit par un analyseur élémentaire, soit par un chromatographe en phase gazeuse équipé d'un système de combustion en ligne.

Pour les systèmes équipés pour l'introduction des échantillons contenus dans des capsules métalliques, le matériel de laboratoire suivant est utilisé:

- microseringue ou micropipette volumétrique avec cônes appropriés,
- balance à échelon de lecture à 1 µg ou mieux,
- pince pour encapsulage,
- capsules d'étain pour échantillons liquides,
- capsules d'étain pour échantillons solides.

Note:

pour limiter les risques d'évaporation des échantillons d'éthanol, il est possible de placer dans les capsules un matériau absorbant (par exemple *chromosorb W 45-60 mesh*) dont on aura vérifié préalablement par une mesure à blanc qu'il ne comporte pas de quantité significative de carbone susceptible d'altérer les mesures.

Lors de l'utilisation d'un analyseur élémentaire équipé d'un injecteur pour liquides ou dans le cas d'un système de préparation par chromatographie-combustion, le matériel de laboratoire suivant est utilisé:

- seringue pour liquides,
- flacons équipés d'un système de fermeture étanche et de septa inertes.

Les matériels de laboratoire indiqués dans les listes ci-dessus constituent des exemples et sont susceptibles d'être remplacés par d'autres matériels de performances équivalentes selon le type d'appareillage de combustion et de spectrométrie de masse utilisé par le laboratoire.

6.2.2. Systèmes autonomes de préparation

Dans ce cas, les échantillons de dioxyde de carbone résultant de la combustion des échantillons à analyser et de la référence sont collectés dans des ampoules qui sont ensuite installées au double système d'entrée du spectromètre pour réaliser l'analyse isotopique. Plusieurs types d'appareillages de combustion décrits dans la littérature sont utilisables:

- système clos de combustion rempli avec du gaz oxygène circulant,
- analyseur élémentaire avec flux d'hélium et d'oxygène,
- ampoule scellée en verre remplie avec de l'oxyde de cuivre (II) comme agent d'oxydation.

7. PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS POUR ESSAI

L'éthanol doit être extrait à partir du vin avant détermination isotopique. Cette extraction est effectuée par la distillation du vin comme décrit au point 3.1 de la méthode RMN-FINS (OIV - MA-E-AS311-05-ENRRMN).

Dans le cas du moût de raisins, du moût de raisins concentré et du moût de raisins concentré rectifié, les sucres doivent être fermentés en éthanol d'abord comme décrit au point 3.2 de la méthode RMN-FINS (OIV - MA-E-AS311-05-ENRRMN).

8. MODE OPÉRATOIRE

Toutes les étapes préparatoires doivent être effectuées sans aucune perte significative d'éthanol par évaporation qui changerait la composition isotopique de l'échantillon.

La description qui suit fait référence aux procédures généralement utilisées pour la combustion des échantillons d'éthanol au moyen des systèmes automatisés de combustion commerciaux. Toute autre méthode, assurant que l'échantillon d'éthanol est quantitativement converti en dioxyde de carbone sans aucune perte par évaporation d'éthanol peut convenir pour la préparation du dioxyde de carbone pour l'analyse isotopique.

Procédure expérimentale fondée sur l'utilisation d'un analyseur élémentaire:

a) mise en capsule des échantillons:

- utiliser des capsules, une pince et un plateau de préparation propres,
- prendre une capsule de la dimension appropriée à l'aide de la pince,
- introduire le volume nécessaire de liquide dans la capsule à l'aide de la micropipette,
- *Note:*
3,84 mg d'éthanol absolu ou 4,17 mg de distillat ayant un titre alcoolique de 92 % m/m sont nécessaires pour obtenir 2 mg de carbone. La quantité appropriée de distillat doit être calculée de la même manière selon la quantité de carbone nécessaire en fonction de la sensibilité de l'instrumentation de spectrométrie de masse.
- refermer la capsule à l'aide des pinces,
- chaque capsule doit être fermée de façon absolument étanche. Dans le cas contraire, elle doit être rejetée et une nouvelle capsule doit être préparée,
- pour chaque échantillon, préparer deux capsules,
- placer les capsules à l'endroit approprié sur le plateau du passeur automatique d'échantillon de l'analyseur élémentaire. Chaque capsule doit être soigneusement identifiée par un numéro d'ordre,
- placer systématiquement des capsules contenant les références de travail au début et à la fin de la série d'échantillons,
- insérer régulièrement des échantillons de contrôle dans la série d'échantillons;

b) contrôle et ajustement de l'instrumentation d'analyse élémentaire et de spectrométrie de masse

- ajuster la température des fours de l'analyseur élémentaire et les flux de gaz d'hélium et d'oxygène pour une combustion optimale de l'échantillon,
- vérifier l'absence de fuite dans le système d'analyse élémentaire et de spectrométrie de masse (par exemple en contrôlant le courant ionique pour $m/z = 28$ correspondant à N_2),
- ajuster le spectromètre de masse pour mesurer les intensités des courants ioniques pour $m/z = 44$, 45 et 46,
- vérifier le système à l'aide d'échantillons de contrôle connus avant de commencer les mesures sur les échantillons;

c) déroulement d'une série de mesures

Les échantillons placés sur le passeur automatique d'échantillons de l'analyseur élémentaire (ou du chromatographe) sont introduits successivement. Le dioxyde de carbone de chaque combustion d'échantillon est élué vers le spectromètre de masse qui mesure les courants ioniques. L'ordinateur interfacé à l'instrumentation enregistre les intensités des courants ioniques et calcule les valeurs δ pour chaque échantillon (point 9).

9. CALCUL

L'objectif de la méthode est de mesurer le rapport isotopique $^{13}C/^{12}C$ de l'éthanol extrait à partir du vin ou à partir des produits dérivés du raisin après fermentation. Le rapport isotopique $^{13}C/^{12}C$ peut être exprimé par sa déviation par rapport à une référence de travail. La déviation isotopique carbone 13 ($\delta^{13}C$) est alors calculée sur une échelle delta pour mille ($\delta/1\ 000$) par comparaison des résultats obtenus pour l'échantillon à mesurer contre ceux de la référence de travail précédemment calibrée par rapport à la référence primaire internationale (V-PDB). Les valeurs $\delta^{13}C$ sont exprimées par rapport à la référence de travail selon:

$$\delta^{13}C_{ech/ref} \text{‰} = 1\ 000 \times (R_{ech} - R_{ref})/R_{ref}$$

où R_{ech} et R_{ref} sont respectivement les rapports isotopiques $^{13}C/^{12}C$ de l'échantillon et ceux du dioxyde de carbone utilisé comme gaz de référence.

Les valeurs $\delta^{13}\text{C}$ sont alors exprimées par rapport au V-PDB selon:

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{ech}/\text{V-PDB}} \text{ ‰} = \delta^{13}\text{C}_{\text{ech}/\text{ref}} + \delta^{13}\text{C}_{\text{ref}/\text{V-PDB}} + (\delta^{13}\text{C}_{\text{ech}/\text{ref}} \times \delta^{13}\text{C}_{\text{ref}/\text{V-PDB}})/1\ 000$$

où $\delta^{13}\text{C}_{\text{ref}/\text{V-PDB}}$ est la déviation isotopique préalablement déterminée pour la référence de travail contre le V-PDB.

Pendant la mesure en ligne, des petites dérives dues à la variation des conditions instrumentales peuvent être observées. Dans ce cas, les $\delta^{13}\text{C}$ des échantillons doivent être corrigés en fonction de la différence entre la valeur $\delta^{13}\text{C}$ mesurée pour la référence de travail et sa valeur vraie, précédemment calibrée contre le V-PDB par comparaison avec l'un des matériaux de référence international. Entre deux mesures de la référence de travail, la dérive, et donc la correction à appliquer aux résultats des échantillons, peuvent être assumées linéaires. La référence de travail doit être mesurée en début et en fin de toute série d'échantillons. Une correction peut ensuite être calculée pour chaque échantillon au moyen d'une interpolation linéaire.

10. ASSURANCE QUALITÉ ET CONTRÔLE

Contrôler que la valeur ^{13}C pour la référence de travail ne diffère pas de plus de 0,5 ‰ de la valeur admise. En cas contraire, les réglages de l'instrumentation du spectromètre devront être contrôlés et éventuellement réajustés.

Pour chaque échantillon, vérifier que la différence de résultat entre les deux capsules mesurées successivement est inférieure à 0,3 ‰. Le résultat final pour un échantillon donné est alors la valeur moyenne des deux capsules. Si la déviation est plus élevée que 0,3 ‰, la mesure doit être répétée.

Un contrôle du fonctionnement correct de la mesure peut être fondé sur l'intensité du courant ionique pour $m/z = 44$ qui est proportionnel à la quantité de carbone injectée dans l'analyseur élémentaire. Dans les conditions type, l'intensité de ce courant ionique devrait être pratiquement constante pour les échantillons en analyse. Une déviation significative doit conduire à soupçonner une évaporation d'éthanol (par exemple une capsule imparfaitement scellée) ou bien une instabilité de l'analyseur élémentaire ou du spectromètre de masse.

11. CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE DE LA MÉTHODE (PRÉCISION)

Une première étude collaborative (point 11.1) a été réalisée sur des distillats comportant des alcools d'origine vinique, et des alcools de canne et de betterave ainsi que différents mélanges de ces trois origines. Cette étude n'ayant pas pris en compte l'étape de distillation, des informations complémentaires provenant d'autres essais interlaboratoires réalisés sur des vins (point 11.2), et notamment des circuits de tests d'aptitudes (point 11.3), pour les mesures isotopiques, ont également été considérées. Les résultats démontrent que les différents systèmes de distillation utilisés dans des conditions satisfaisantes, et en particulier ceux applicables pour les mesures RMN-FINS, n'apportent pas de variabilité significative pour les déterminations $\delta^{13}\text{C}$ de l'éthanol du vin. Les paramètres de fidélité observés pour les vins sont quasiment identiques à ceux obtenus lors de l'étude collaborative (point 11.1) sur les distillats.

11.1. Étude collaborative sur les distillats

Année de l'essai interlaboratoires: 1996

Nombre de laboratoires: 20

Nombre d'échantillons: 6 échantillons en double aveugle

Analyte: $\delta^{13}\text{C}$ de l'éthanol

Code des échantillons	Alcool d'origine vinique	Alcool de betterave	Alcool de canne
A & G	80 %	10 %	10 %
B & C	90 %	10 %	0 %
D & F	0 %	100 %	0 %
E & I	90 %	0 %	10 %
H & K	100 %	0 %	0 %
J & L	0 %	0 %	100 %

Echantillons	A/G	B/C	D/F	E/I	H/K	J/L
Nombre de laboratoires retenus après élimination des résultats aberrants	19	18	17	19	19	19
Nombre de résultats acceptés	38	36	34	38	38	38
Valeur moyenne ($\delta^{13}\text{C}$) ‰	- 25,32	- 26,75	- 27,79	- 25,26	- 26,63	- 12,54
S_r^2	0,0064	0,0077	0,0031	0,0127	0,0069	0,0041
Écart-type de répétabilité (S_r) ‰	0,08	0,09	0,06	0,11	0,08	0,06
Limite de répétabilité r ($2,8 \times S_r$) ‰	0,22	0,25	0,16	0,32	0,23	0,18
S_{R2}	0,0389	0,0309	0,0382	0,0459	0,0316	0,0584
Écart-type de reproductibilité (S_R) ‰	0,20	0,18	0,20	0,21	0,18	0,24
Limite de reproductibilité R ($2,8 \times S_R$) ‰	0,55	0,49	0,55	0,60	0,50	0,68

11.2. Étude interlaboratoires sur deux vins et un alcool

Année de l'essai interlaboratoires: 1996

Nombre de laboratoires: 14 pour la distillation des vins dont 7 pour également la mesure $\delta^{13}\text{C}$ de l'éthanol des vins, 8 pour la mesure $\delta^{13}\text{C}$ de l'échantillon d'alcool

Nombre d'échantillons: 3 (vin blanc TAV 9,3 % vol., vin blanc de TAV 9,6 % vol. et alcool de titre alcoométrique 93 % m/m)

Analyte: $\delta^{13}\text{C}$ de l'éthanol

Echantillons	Vin rouge	Vin blanc	Alcool
Nombre de laboratoires	7	7	8
Nombre de résultats acceptés	7	7	8
Valeur moyenne ($\delta^{13}\text{C}$) ‰	- 26,20	- 26,20	- 25,08
Variance de reproductibilité S_R^2	0,0525	0,0740	0,0962
Écart-type de reproductibilité (S_R) ‰	0,23	0,27	0,31
Limite de reproductibilité R ($2,8 \times S_R$) ‰	0,64	0,76	0,87

Différents systèmes de distillation ont été utilisés par les laboratoires participants. Les déterminations isotopiques $\delta^{13}\text{C}$ réalisées dans un seul laboratoire sur l'ensemble des distillats retournés par les participants ne montrent ni valeur aberrante ni valeur significativement distincte des valeurs moyennes. La variance des résultats ($S^2 = 0,0059$) est comparable aux variances de répétabilité S_r^2 de l'étude collaborative sur les distillats (point 11.1).

11.3. Résultats des exercices des circuits d'aptitude aux essais isotopiques

Depuis décembre 1994, des exercices d'aptitude internationaux pour les déterminations isotopiques sur les vins et alcools (distillats de TAV 96 % vol) sont organisés régulièrement. Les résultats permettent aux laboratoires participants de contrôler la qualité de leurs analyses. L'exploitation statistique des résultats permet d'apprécier la variabilité des déterminations dans des conditions de reproductibilité et donc d'estimer les paramètres de variance et de limite de reproductibilité. Les résultats obtenus pour les déterminations $\delta^{13}\text{C}$ de l'éthanol des vins et distillats sont résumés dans le tableau suivant:

Date	Vins				Distillats			
	N	S_R	S_R^2	R	N	S_R	S_R^2	R
Décembre 1994	6	0,210	0,044	0,59	6	0,151	0,023	0,42
Juin 1995	8	0,133	0,018	0,37	8	0,147	0,021	0,41
Décembre 1995	7	0,075	0,006	0,21	8	0,115	0,013	0,32
Mars 1996	9	0,249	0,062	0,70	11	0,278	0,077	0,78
Juin 1996	8	0,127	0,016	0,36	8	0,189	0,036	0,53
Septembre 1996	10	0,147	0,022	0,41	11	0,224	0,050	0,63
Décembre 1996	10	0,330	0,109	0,92	9	0,057	0,003	0,16
Mars 1997	10	0,069	0,005	0,19	8	0,059	0,003	0,16
Juin 1997	11	0,280	0,079	0,78	11	0,175	0,031	0,49
Septembre 1997	12	0,237	0,056	0,66	11	0,203	0,041	0,57
Décembre 1997	11	0,127	0,016	0,36	12	0,156	0,024	0,44
Mars 1998	12	0,285	0,081	0,80	13	0,245	0,060	0,69
Juin 1998	12	0,182	0,033	0,51	12	0,263	0,069	0,74
Septembre 1998	11	0,264	0,070	0,74	12	0,327	0,107	0,91
Moyenne pondérée		0,215	0,046	0,60		0,209	0,044	0,59

N: nombre de laboratoires participants.

11.4. Limites de répétabilité et de reproductibilité

Les données des différents exercices interlaboratoires présentées dans les tableaux précédents permettent donc d'établir pour la présente méthode, en incluant également l'étape de distillation, les limites de répétabilité et de reproductibilité suivantes:

Limite de répétabilité r: 0,24

Limite de reproductibilité R: 0,6.

11 ACIDITÉ TOTALE (OIV - AS-313-01-ACITOT) — MÉTHODE TYPE I

1. DÉFINITION

L'acidité totale est la somme des acidités titrables lorsqu'on amène le pH à 7 par addition d'une solution alcaline titrée.

Le dioxyde de carbone n'est pas compris dans l'acidité totale.

2. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Titration potentiométrique ou titration en présence de bleu de bromothymol comme indicateur de fin de réaction par comparaison à un étalon de coloration.

3. RÉACTIFS

3.1. Solution tampon pH 7,0:

Phosphate monopotassique KH_2PO_4 : 107,3 g

Solution M d'hydroxyde de sodium (NaOH): 500 ml

Eau q.s.p.: 1 000 ml.

Les solutions tampons de référence du commerce peuvent également être utilisées.

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 ($\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{Br}_2\text{O}_5\text{S}$) 4 g

Alcool neutre 96 % vol. 200 ml

Après solubilisation ajouter:

Eau sans CO_2 200 ml

Solution M d'hydroxyde de sodium

q.s.p. coloration bleu-vert (pH 7) 7,5 ml

Eau q.s.p. 1 000 ml

4. APPAREILLAGE

4.1. Trompe à vide à eau.

4.2. Fiole à vide de 500 ml.

4.3. Potentiomètre à échelle étalonnée en unités pH et électrodes. L'électrode de verre doit être conservée dans l'eau distillée. L'électrode au calomel-chlorure de potassium saturé doit être conservée dans une solution saturée de chlorure de potassium. Une électrode combinée est le plus souvent employée, la conserver dans l'eau distillée.

4.4. Vases cylindriques de 50 ml de capacité (cas des vins) et de 100 ml de capacité (cas des moûts concentrés rectifiés).

5. MODE OPÉRATOIRE

5.1. Préparation de l'échantillon

5.1.1. Cas des vins

Élimination du dioxyde de carbone. Placer environ 50 ml de vin dans une fiole à vide, agiter et en même temps faire le vide au moyen de la trompe à vide à eau. L'agitation doit durer 1 à 2 minutes.

5.1.2. Cas des moûts concentrés rectifiés

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. Étalonnage du pH mètre**

L'étalonnage du pH mètre s'effectue à 20 °C en suivant les indications données pour l'appareil utilisé avec la solution tampon de pH 7,00 à 20 °C.

5.2.2. Technique d'une mesure

Dans un vase cylindrique (point 4.4) placer un volume d'échantillon, préparé comme indiqué au point 5.1, égal à 10 ml dans le cas du vin et à 50 ml dans le cas du moût concentré rectifié. Ajouter 10 ml environ d'eau distillée et verser à la burette la solution 0,1 M d'hydroxyde de sodium (point 3.2) jusqu'à ce que le pH soit égal à 7 à 20 °C. L'addition de liqueur alcaline doit être faite lentement et la solution constamment agitée. Soit n le nombre de millilitres de NaOH 0,1 M versés.

5.3. Titrage avec indicateur (bleu de bromothymol)**5.3.1. Essai préalable: établissement de l'étalon de coloration**

Dans un vase cylindrique (point 4.4), placer 25 ml d'eau distillée bouillie, 1 ml de solution de bleu de bromothymol (point 3.3) et un volume préparé comme indiqué au point 5.1 égal à 10 ml dans le cas du vin et à 50 ml dans le cas du moût concentré rectifié. Ajouter la solution 0,1 M d'hydroxyde de sodium (point 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 (point 4.4), placer 30 ml d'eau distillée bouillie, 1 ml de solution de bleu de bromothymol (point 3.3), un volume d'échantillon préparé comme indiqué au point 5.1 égal à 10 ml dans le cas du vin et à 50 ml dans le cas du moût concentré rectifié. Ajouter la solution 0,1 M d'hydroxyde de sodium (point 3.2) jusqu'à obtention d'une coloration identique à celle obtenue à l'essai préalable (point 5.3.1). Soit n le nombre de millilitres de solution d'hydroxyde de sodium 0,1 M versés.

6. EXPRESSION DES RÉSULTATS**6.1. Mode de calcul****6.1.1. Cas des vins**

L'acidité totale exprimée en milliéquivalents par litre sera:

$$A = 10 n$$

Elle est donnée avec 1 décimale.

L'acidité totale exprimée en grammes d'acide tartrique par litre sera:

$$A' = 0,075 \times A$$

Elle est donnée avec 1 décimale.

6.1.2. Cas des moûts concentrés rectifiés

— 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.

6.2. Répétabilité (r) pour le titrage avec indicateur(5.3)

$$r = 0,9 \text{ me/l}$$

$$r = 0,07 \text{ g d'acide tartrique/l}$$

pour les vins blancs, rosés et rouges.

6.3. Reproductibilité (R) pour le titrage avec indicateur (5.3)

Pour les vins blancs et rosés:

R = 3,6 me/l

R = 0,3 g d'acide tartrique/l.

Pour les vins rouges:

R = 5,1 me/l

R = 0,4 g d'acide tartrique/l.

12 ACIDITÉ VOLATILE (OIV - AS-313-02-ACIVOL) — MÉTHODE TYPE I

1. DÉFINITION

L'acidité volatile est constituée par les acides appartenant à la série acétique qui se trouvent dans le vin à l'état libre et à l'état salifié.

2. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Titration des acides volatiles séparés du vin par entraînement à la vapeur d'eau et rectification des vapeurs.

Le vin est au préalable débarrassé du dioxyde de carbone.

L'acidité du dioxyde de soufre libre et du dioxyde de soufre combiné distillés dans ces conditions doit être retranchée de l'acidité du distillat.

L'acidité de l'acide sorbique éventuellement ajouté au vin doit également être retranchée.

Remarque:

L'acide salicylique utilisé dans certains pays pour stabiliser les vins préalablement à l'analyse se retrouve en partie dans le distillat. Il est nécessaire de le doser et de le défalquer de l'acidité. La méthode de dosage est donnée au paragraphe 7 de ce chapitre.

3. RÉACTIFS

3.1. Acide tartrique cristallisé ($C_4H_6O_6$)

3.2. Solution 0,1 M d'hydroxyde de sodium (NaOH)

3.3. Solution de phénolphthaléine à 1 pour 100 dans l'alcool à 96 % vol. neutre

3.4. Acide chlorhydrique ($\rho_{20} = 1,18$ à $1,19$ g/ml) dilué 1/4 (v/v)

3.5. Solution 0,005 M d'iode (I_2)

3.6. Iodure de potassium cristallisé (KI)

3.7. Empois d'amidon à 5 g/l:

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

3.8. Solution saturée de borate de sodium ($Na_2B_4O_7 \cdot 10 H_2O$), soit environ 55 g/l à 20 °C.

4. APPAREILLAGE

4.1. Appareil à entraînement à la vapeur d'eau composé:

- 1) d'un générateur de vapeur d'eau; la vapeur d'eau produite doit être exempte de dioxyde de carbone;
- 2) d'un barboteur;
- 3) d'une colonne rectificatrice;
- 4) d'un réfrigérant.

Cet appareil doit répondre aux trois essais suivants:

- a) placer dans le barboteur 20 ml d'eau bouillie; recueillir 250 ml de distillat et les additionner de 0,1 ml de solution 0,1 M d'hydroxyde de sodium (point 3.2) et II gouttes de la solution de phénolphthaléine (point 3.3); la coloration rose doit être stable pendant au moins 10 secondes (vapeur d'eau exempte de dioxyde de carbone).
- b) Placer dans le barboteur 20 ml d'une solution 0,1 M d'acide acétique. Recueillir 250 ml de distillat. Titrer avec la solution 0,1 M d'hydroxyde de sodium (point 3.2). Le volume versé doit être au moins égal à 19,9 ml. (Acide acétique entraîné $\geq 99,5$ %).

- c) Placer dans le barboteur 20 ml d'une solution M d'acide lactique. Recueillir 250 ml de distillat et titrer l'acidité avec la solution 0,1 M d'hydroxyde de sodium (point 3.2).

Le volume versé doit être inférieur ou égal à 1,0 ml (Acide lactique distillé \leq 0,5 %).

Tout appareil ou toute technique qui satisfait à ces essais constitue un appareil ou une technique officielle internationale.

- 4.2. Trompe à vide d'eau.

- 4.3. Fiole à vide.

5. MODE OPÉRATOIRE

- 5.1. **Préparation de l'échantillon: élimination du dioxyde de carbone.**

Placer environ 50 ml de vin dans une fiole à vide; agiter et en même temps faire le vide au moyen de la trompe à vide d'eau. L'agitation doit durer 1 à 2 minutes.

- 5.2. **Entraînement à la vapeur d'eau.**

Placer 20 ml de vin décarboniqué comme indiqué au point 5.1 dans le barboteur. Ajouter 0,5 g environ d'acide tartrique (point 3.1). Recueillir au moins 250 ml de distillat.

- 5.3. **Titrage**

Titrer par la solution 0,1 M d'hydroxyde (point 3.2) de sodium en présence de II gouttes de solution de phénolphaléine (point 3.3), soit n ml le volume versé.

Ajouter IV gouttes d'acide chlorhydrique dilué 1/4 (3.4), 2 ml d'empois d'amidon (point 3.7) et quelques cristaux d'iodure de potassium (point 3.6). Titrer le dioxyde de soufre libre par la solution 0,005 M d'iode (point 3.5). Soit n' ml le volume versé.

Ajouter la solution saturée de borate de sodium (point 3.8) jusqu'à réapparition de la coloration rose. Titrer le dioxyde de soufre combiné par la solution 0,005 M d'iode (point 3.5). Soit «n» ml le volume versé.

6. EXPRESSION DES RÉSULTATS

- 6.1. **Mode de calcul**

L'acidité volatile exprimée en milliéquivalents par litre avec 1 décimale sera:

$$A = 5 (n - 0,1 n' - 0,05 n'')$$

L'acidité volatile exprimée en grammes d'acide acétique par litre avec 2 décimales sera:

$$0,300 (n - 0,1 n' - 0,05 n'')$$

- 6.2. **Répétabilité (r)**

$$r = 0,7 \text{ me/l}$$

$$r = 0,04 \text{ g d'acide acétique/l.}$$

- 6.3. **Reproductibilité (R)**

$$R = 1,3 \text{ me/l}$$

$$R = 0,08 \text{ g d'acide acétique/l.}$$

- 6.4. **Cas d'un vin additionné d'acide sorbique**

L'acide sorbique étant entraînable à la vapeur d'eau à 96 % pour un volume de distillat de 250 ml, son acidité doit être retranchée de l'acidité volatile, sachant que 100 mg d'acide sorbique correspondent à une acidité de 0,89 milliéquivalent, ou de 0,053 g d'acide acétique et connaissant la teneur en acide sorbique (mg/l) déterminée par ailleurs.

7. DOSAGE DE L'ACIDE SALICYLIQUE ENTRAÎNÉ DANS LE DISTILLAT DE L'ACIDITÉ VOLATILE

- 7.1. **Principe**

Après le dosage de l'acidité volatile et la correction du dioxyde de soufre, la présence d'acide salicylique est caractérisée, après acidification, par la coloration violette qui apparaît après addition d'un sel de fer III.

Le dosage de l'acide salicylique entraîné dans le distillat avec l'acidité volatile est effectué sur un deuxième distillat de volume égal à celui sur lequel a été effectué le dosage de l'acidité volatile. Dans ce distillat, l'acide salicylique est dosé par une méthode colorimétrique de comparaison. Il est défalqué de l'acidité du distillat de l'acidité volatile.

7.2. **Réactifs**

- 7.2.1. Acide chlorhydrique (HCl) ($\rho_{20} = 1,18$ à $1,19$ g/ml).
- 7.2.2. Thiosulfate de sodium ($\text{Na}_2 \text{S}_2 \text{O}_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$) 0,1 M.
- 7.2.3. Solution de sulfate de fer III et d'ammonium [$\text{Fe}_2 (\text{SO}_4)_3 \times (\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4 \times 24 \text{H}_2\text{O}$] à 10 p. 100 (m/v).
- 7.2.4. Solution de salicylate de sodium 0,01 M. Solution contenant 1,60 g/l de salicylate de sodium ($\text{Na C}_7 \text{H}_5 \text{O}_3$).

7.3. **Mode opératoire**

- 7.3.1. *Caractérisation de l'acide salicylique dans le distillat de l'acidité volatile.*

Immédiatement après le dosage de l'acidité volatile et la correction du dioxyde de soufre libre et combiné ajouter dans la fiole conique 0,5 ml d'acide chlorhydrique (point 7.2.1), 3 ml de la solution 0,1 M de thiosulfate de sodium (point 7.2.2) et 1 ml de la solution de sulfate de fer III et d'ammonium (point 7.2.3).

En présence d'acide salicylique, une coloration violette apparaît.

- 7.3.2. *Dosage de l'acide salicylique*

Sur la fiole conique précédente, indiquer par un trait repère le volume du distillat. Vider et rincer la fiole.

Soumettre à l'entraînement à la vapeur d'eau une nouvelle prise d'essai de 20 ml de vin et recueillir le distillat dans la fiole conique jusqu'au trait repère. Ajouter 0,3 ml d'acide chlorhydrique pur (point 7.2.1) et 1 ml de la solution de sulfate de fer III et d'ammonium (point 7.2.3). Le contenu de la fiole conique se colore en violet.

Dans une fiole conique identique à celle portant le trait repère, placer de l'eau distillée jusqu'au même niveau que celui du distillat. Ajouter 0,3 ml d'acide chlorhydrique pur (point 7.2.1), 1 ml de solution de sulfate de fer III et d'ammonium (point 7.2.3). Verser à la burette la solution de salicylate de sodium 0,01 M (point 7.2.4) jusqu'à obtention d'une coloration violette de même intensité que celle de la fiole conique contenant le distillat de vin.

soit n''' , le nombre de millilitres versés.

7.4. **Correction de l'acidité volatile**

Retrancher le volume $0,1 \cdot n'''$ du volume n ml de solution d'hydroxyde de sodium 0,1 M utilisé pour titrer l'acidité du distillat lors du dosage de l'acidité volatile.

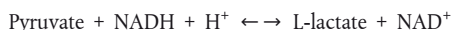
13 ACIDE CITRIQUE (OIV -AS-313-09-ACIENZ) — MÉTHODE TYPE II

1. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

L'acide citrique est transformé en oxaloacétate et acétate dans une réaction catalysée par la citrate-lyase (CL):



En présence de la malate-deshydrogénase (MDH) et de la lactate-deshydrogénase (LDH), l'oxaloacétate et son dérivé de décarboxylation, le pyruvate, sont réduits en L-malate et en L-lactate par le nicotinamide-adénine-dinucléotide réduit (NADH):



La quantité de NADH oxydé en NAD^+ dans ces réactions est proportionnelle au citrate présent. L'oxydation du NADH est mesurée par la diminution de son absorbance à la longueur d'onde 340 nm.

2. RÉACTIFS

2.1. Tampon pH 7,8 (glycylglycine 0,51 M; pH = 7,8; Zn^{2+} : $0,6 \times 10^{-3}$ M)

Dissoudre 7,13 g de glycylglycine dans environ 70 ml d'eau bidistillée.

Ajuster le pH à 7,8 avec environ 13 ml de solution d'hydroxyde de sodium 5 M; ajouter 10 ml de solution de chlorure de zinc ZnCl_2 , à 80 mg dans 100 ml et porter à 100 ml avec de l'eau bidistillée.

La solution reste stable pendant au moins 4 semaines à + 4 °C.

2.2. Solution de nicotinamide-adénine-dinucléotide réduit (NADH), environ $6 \cdot 10^{-3}$ M: Dissoudre 30 mg de NADH et 60 mg de NaHCO_3 avec 6 ml d'eau bidistillée.

2.3. Solution de malate deshydrogénase/lactate deshydrogénase, (MDH/LDH) (0,5 mg MDH/ml; 2,5 mg LDH/ml):

On fait un mélange de 0,1 ml MDH (5 mg MDH/ml), 0,4 ml de solution de sulfate d'ammonium (3,2 M) et 0,5 ml LDH (5 mg/ml). Cette suspension est stable pendant au moins un an à + 4 °C.

2.4. Citrate-lyase CL (5 mg de protéine/ml):

Dissoudre 168 mg de lyophilisat dans 1 ml d'eau glacée. La solution est stable pendant au moins une semaine à + 4 °C et pendant au moins 4 semaines sous forme congelée.

Il est recommandé de procéder, préalablement au dosage, à la vérification de l'activité de l'enzyme.

2.5. Polyvinylpyrrolidone (PVPP)

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

3. APPAREILLAGE

3.1. Spectrophotomètre permettant d'effectuer les mesures à 340 nm, maximum d'absorption du NADH.

À défaut, photomètre à spectre discontinu permettant d'effectuer les mesures à 334 nm ou à 365 nm. S'agissant de mesures absolues d'absorbance (pas de gamme d'étalonnage, mais référence au coefficient d'extinction du NADH), les échelles des longueurs d'onde et des absorbances de l'appareil doivent être contrôlées.

3.2. Cuves de verre de 1 cm de trajet optique ou cuves à usage unique.

3.3. Micropipettes permettant de prélever des volumes allant de 0,02 à 2 ml.

4. PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON

Le dosage du citrate s'effectue généralement directement sur le vin sans décoloration préalable et sans dilution, à condition que la teneur en acide citrique soit inférieure à 400 mg/l. Sinon, procéder à la dilution du vin de manière que la concentration en citrate se situe entre 20 et 400 mg/l (quantité de citrate dans la prise d'essai comprise entre 5 µg et 80 µg).

Dans le case de vin rouge riche en composés phénoliques, il est recommandé de le traiter au préalable par la PVPP:

mettre en suspension dans l'eau 0,2 g environ de PVPP, laisser reposer 15 minutes. Filtrer sur filtre plissé.

À 10 ml de vin placé dans une fiole conique de 50 ml, ajouter la PVPP humide prélevée à la spatule sur le filtre. Agiter pendant 2 à 3 minutes. Filtrer.

5. MODE OPÉRATOIRE

Le spectrophotomètre étant réglé sur la longueur d'onde 340 nm, les mesures d'absorbance se font dans les cuves de 1 cm, l'absorbance zéro étant réglée par rapport à l'air (pas de cuve sur le trajet optique). Dans les cuves de 1 cm d'épaisseur, introduire:

	Témoin	Dosage
Solution 2.1	1,00 ml	1,00 ml
Solution 2.2	0,10 ml	0,10 ml
Échantillon	—	0,20 ml
Eau bidistillée	2,00 ml	1,80 ml
Solution 2.3	0,02 ml	0,02 ml

Mélanger; après environ 5 minutes, lire les absorbances des solutions témoin et dosage (A_1).

Ajouter:

Solution 2.4	0,02 ml	0,02 ml
--------------	---------	---------

Mélanger; attendre la fin de la réaction (environ 5 minutes) et lire les absorbances des solutions témoin et dosage (A_2).

Déterminer les différences d'absorbances ($A_1 - A_2$) du témoin et du dosage.

Déduire la différence d'absorbances du témoin de la différence d'absorbances du dosage:

$$\Delta A = \Delta A_D - \Delta A_T$$

Remarque: Le temps nécessaire à l'action des enzymes peut varier d'un lot à l'autre. Il n'est donné ci-dessus qu'à titre indicatif. Il est recommandé de le déterminer pour chaque lot.

6. EXPRESSION DES RÉSULTATS

La teneur en acide citrique est donnée, en milligrammes par litre (mg/l) sans décimale.

6.1. Mode de calcul

La concentration en milligrammes par litre est donnée par la formule générale:

$$C = ((V \times PM) / (\epsilon \times d \times v)) \times \Delta A$$

V = volume du test en millilitres (ici 3,14 ml)

v = volume de l'échantillon en millilitres (ici 0,2 ml)

P.M = masse moléculaire de la substance à doser (ici, acide citrique anhydre = 192,1)

d = trajet optique de la cuve en centimètres (ici 1 cm)

ϵ = coefficient d'absorption du NADH; à 340 nm,

$$\epsilon = 6,3 \text{ mmole}^{-1} \times 1 \times \text{cm}^{-1}.$$

On obtient:

$$C = 479 \times \Delta A$$

Si une dilution a été effectuée lors de la préparation de l'échantillon, multiplier le résultat par le facteur de dilution.

Remarque: à 334 nm: $C = 488 \times \Delta A$ ($\epsilon = 6,2 \text{ mmole}^{-1} \times 1 \times \text{cm}^{-1}$)

à 365 nm: $C = 887 \times \Delta A$ ($\epsilon = 3,4 \text{ mmole}^{-1} \times 1 \times \text{cm}^{-1}$)

6.2. Répétabilité (r)

Teneur en acide citrique inférieure à 400 mg/l: $r = 14$ mg/l.

Teneur en acide citrique supérieure à 400 mg/l: $r = 28$ mg/l.

6.3. Reproductibilité (R)

Teneur en acide citrique inférieure à 400 mg/l: $R = 39$ mg/l.

Teneur en acide citrique supérieure à 400 mg/l: $R = 65$ mg/l.

14 ACIDE SORBIQUE (OIV - AS-313-14-ACISOR) — MÉTHODE TYPE IV

1. PRINCIPE DES MÉTHODES

1.1. Méthode de dosage par spectrophotométrie d'absorption dans l'ultra-violet

L'acide sorbique (acide hexadiène — 2,4 oïque trans, trans) extrait par entraînement à la vapeur d'eau est dosé dans le distillat du vin par spectrophotométrie d'absorption dans l'ultra-violet. Les substances interférant sur la mesure d'absorption dans l'ultraviolet sont éliminées par évaporation à sec de la prise d'essai du distillat légèrement alcalinisée par une solution d'hydroxyde de calcium. Les teneurs inférieures à 20 mg/l doivent être confirmées par la caractérisation par chromatographie en couche mince (sensibilité: 1 mg/l).

1.2. Méthode de dosage par chromatographie gazeuse

L'acide sorbique extrait dans l'éther éthylique est dosé par chromatographie en phase gazeuse en présence d'un étalon interne.

1.3. Méthode de recherche de traces par chromatographie sur couche mince

L'acide sorbique extrait dans l'éther éthylique est séparé par chromatographie sur couche mince et sa concentration est évaluée semi-quantitativement.

2. MÉTHODE DE DOSAGE PAR SPECTROPHOTOMÉTRIE D'ABSORPTION DANS L'ULTRA-VIOLET

2.1. Réactifs

2.1.1. Acide tartrique, (C₄H₆O₆) cristallisé.

2.1.2. Solution d'hydroxyde de calcium, Ca (OH)₂ environ 0,02 M.

2.1.3. Solution de référence d'acide sorbique à 20 mg par litre.

Dissoudre 20 mg d'acide sorbique, C₆H₈O₂ dans 2 ml environ de solution 0,1 M d'hydroxyde de sodium. Verser dans une fiole jaugée de 1 000 ml, ajuster au trait repère avec de l'eau. On peut également dissoudre 26,8 mg de sorbate de potassium, C₆H₇KO₂ dans l'eau et compléter à 1 000 ml avec de l'eau.

2.2. Appareillage

2.2.1. Appareil d'entraînement par la vapeur d'eau (voir «Acidité volatile»).

2.2.2. Bain d'eau à 100 °C.

2.2.3. Spectrophotomètre permettant des mesures à la longueur d'onde de 256 nm avec cuves en quartz de 1 cm de trajet optique.

2.3. Mode opératoire

2.3.1. Distillation

Placer dans le barboteur de l'appareil d'entraînement par la vapeur d'eau 10 ml de vin, ajouter 1 à 2 g d'acide tartrique (2.1.1). Recueillir 250 ml de distillat.

2.3.2. Courbe d'étalonnage

Préparer par dilutions avec l'eau à partir de la solution de référence (point 2.1.3) quatre solutions de référence diluées titrant respectivement 0,5 - 1 - 2,5 et 5 mg d'acide sorbique par litre; mesurer à l'aide du spectrophotomètre leurs absorbances respectives à 256 nm par rapport à l'eau distillée. Tracer la courbe des variations de l'absorbance en fonction des concentrations des solutions. La variation est linéaire.

2.3.3. Dosage

Dans une capsule de 55 mm de diamètre placer 5 ml de distillat, ajouter 1 ml de solution d'hydroxyde de calcium (point 2.1.2). Évaporer à sec sur bain d'eau bouillante.

Prendre le résidu par quelques millilitres d'eau distillée, entraîner quantitativement dans une fiole jaugée de 20 ml et ajuster au trait repère avec les eaux de rinçage. Mesurer l'absorbance à 256 nm à l'aide du spectrophotomètre comparativement à une solution témoin obtenue par dilution à 20 ml avec de l'eau de 1 ml de solution d'hydroxyde de calcium (point 2.1.2).

Porter la valeur de l'absorbance mesurée sur la droite d'étalonnage, en déduire la concentration C de la solution en acide sorbique.

Remarque: Dans la pratique courante, cette évaporation à sec peut être négligée. Opérer directement la mesure d'absorbance sur le distillat dilué au 1/4 par rapport à l'eau distillée.

2.4. Expression des résultats

2.4.1. Mode de calcul

La concentration en acide sorbique du vin exprimée en milligrammes par litre est égale à:

$$100 \times C$$

C = concentration en acide sorbique de la solution analysée par spectrophotométrie, exprimée en milligrammes par litre.

3. MÉTHODE DE DOSAGE PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

3.1. Réactifs

3.1.1. Éther éthylique, (C₂H₅)₂O distillé au moment de l'utilisation.

3.1.2. Solution de l'étalon interne: solution d'acide undécanoïque, C₁₁H₂₂O₂ dans l'éthanol à 95 pour 100 (vol.) titrant 1 g par litre.

3.1.3. Solution aqueuse d'acide sulfurique, H₂SO₄ (ρ₂₀ = 1,84 g/ml) dilué 1/3 (v/v).

3.2. Appareillage

3.2.1. Chromatographe en phase gazeuse équipé d'un détecteur à ionisation de flamme et d'une colonne en acier inoxydable (4 m × 1/8 de pouce) préalablement traitée par le diméthylchlorosilane et garnie de phase stationnaire, constituée par un mélange de diéthylèneglycol succinate (5 %) et d'acide phosphorique (1 %) (DEGS- H₃ PO₄) ou par un mélange de diéthylèneglycol adipate (7 %) et d'acide phosphorique (1 %) (DEGA — H₃ PO₄) fixé sur Gaschrom Q 80 — 100 mesh.

Pour le traitement au diméthylchlorosilane (DMDCS), faire passer dans la colonne une solution titrant 2 à 3 g de DMDCS dans le toluène. Laver immédiatement la colonne avec du méthanol; faire passer un courant d'azote, puis de l'hexane et à nouveau un courant d'azote. La remplir ensuite.

Conditions opératoires:

Température du four: 175 °C.

Température de l'injecteur et du détecteur: 230 °C.

Gaz vecteur: azote (débit 20 ml/min.).

3.2.2. Microseringue de 10 microlitres de capacité graduée par 0,1 microlitre.

Remarque: D'autres types de colonnes peuvent également permettre une bonne séparation, notamment la colonne capillaire (par exemple, FFAP).

Le mode opératoire décrit ci-dessous est donné à titre d'exemple.

3.3. Mode opératoire

3.3.1. Préparation de l'échantillon à analyser

Dans un tube de verre de 40 ml environ de capacité et muni d'un bouchon rodé introduire 20 ml de vin, ajouter 2 ml de solution de l'étalon interne (point 3.1.2) et 1 ml de solution diluée d'acide sulfurique (point 3.1.3).

Après agitation par retournements successifs, ajouter au contenu du tube 10 ml d'éther éthylique (point 3.1.1). Extraire l'acide sorbique dans la phase organique par agitation du tube durant 5 minutes. Laisser décanter.

3.3.2. Préparation de la solution de référence

Sélectionner un vin dont le chromatogramme de l'extrait à l'éther ne présente aucun pic au niveau de l'élution de l'acide sorbique; surcharger ce vin en acide sorbique à la concentration de 100 mg par litre. Traiter 20 ml de l'échantillon ainsi préparé selon le mode opératoire décrit au point 3.3.1.

3.3.3. Chromatographie

Injecter successivement dans le chromatographe à l'aide d'une microseringue 2 µl de la phase étherée obtenue comme indiqué au point 3.3.2 et 2 µl de la phase étherée obtenue comme indiqué au point 3.3.1.

Enregistrer les chromatogrammes respectifs; vérifier l'identité des temps de rétention respectifs de l'acide sorbique et de l'étalon interne. Mesurer la hauteur (ou la surface) de chacun des pics enregistrés.

3.4. Expression des résultats

3.4.1. Mode de calcul

La concentration en acide sorbique du vin analysé, exprimée en milligrammes par litre, est égale à:

$$100 \times (h/H) \times (l/i)$$

H = hauteur du pic de l'acide sorbique dans la solution de référence

h = hauteur du pic de l'acide sorbique dans l'échantillon à analyser

l = hauteur du pic de l'étalon interne dans la solution de référence

i = hauteur du pic de l'étalon interne dans l'échantillon à analyser

Note: La concentration en acide sorbique peut être déterminée de la même manière à partir des mesures de la surface des pics respectifs.

15 PH (OIV - AS-313-15-PH) — MÉTHODE TYPE I

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. APPAREILS

2.1. pH mètre étalonné en unités pH permettant des mesures à 0,05 unité près au moins.

2.2. Électrodes:

2.2.1. Électrode de verre, à conserver dans l'eau distillée.

2.2.2. Électrode de référence au calomel-chlorure de potassium saturé, à conserver dans une solution saturée de chlorure de potassium.

2.2.3. Ou électrode combinée à conserver dans l'eau distillée.

3. RÉACTIFS

3.1. Solutions tampons:

3.1.1. 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 200 ml.

$$\text{pH} \begin{cases} 3,57 \text{ à } 20 \text{ °C} \\ 3,56 \text{ à } 25 \text{ °C} \\ 3,55 \text{ à } 30 \text{ °C} \end{cases}$$

3.1.2. 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).

$$\text{pH} \begin{cases} 3,999 \text{ à } 15 \text{ °C} \\ 4,003 \text{ à } 20 \text{ °C} \\ 4,008 \text{ à } 25 \text{ °C} \\ 4,015 \text{ à } 30 \text{ °C} \end{cases}$$

3.1.3. Solution contenant:

Phosphate monopotassique, $KH_2 PO_4$	3,402 g
Phosphate dipotassique, $K_2 H PO_4$	4,354 g
Eau q.s.p.	1 l

(Durée maximale de conservation: 2 mois)

$$\text{pH} \begin{cases} 6,90 \text{ à } 15 \text{ °C} \\ 6,88 \text{ à } 20 \text{ °C} \\ 6,86 \text{ à } 25 \text{ °C} \\ 6,85 \text{ à } 30 \text{ °C} \end{cases}$$

Remarque: Les solutions tampons de référence du commerce peuvent également être utilisées.

4. MODE OPÉRATOIRE

4.1. **Préparation de l'échantillon à analyser**

4.1.1. *Cas du moût et du vin*

Opérer directement sur le moût ou le vin.

4.1.2. *Cas du moût concentré rectifié*

Diluer le moût concentré rectifié avec de l'eau pour obtenir une concentration de $25 \pm 0,5$ 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**

L'étalonnage s'effectue à 20 °C en suivant les indications données pour l'appareil utilisé avec les solutions tampons de pH 6,88 et 3,57 à 20 °C.

Utiliser la solution tampon de pH 4,00 à 20 °C pour contrôler le calibrage de l'échelle.

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 déterminations.

5. EXPRESSION DES RÉSULTATS

Le pH du moût, du vin ou de la solution à 25 pour 100 (m/m) (25 ° Brix) du moût concentré rectifié est exprimé avec 2 décimales.

16 DOSAGE SIMULTANÉ DE L'ACIDE L-ASCORBIQUE ET DE L'ACIDE D-ISO-ASCORBIQUE PAR HPLC ET DÉTECTION UV (OIV-AS-313-22-ACASCO) — MÉTHODE TYPE II

1. INTRODUCTION

L'acide ascorbique est un antioxydant présent naturellement dans toute une série de denrées alimentaires. La quantité normale d'acide ascorbique dans le raisin diminue lors de l'élaboration des moûts et au cours de la vinification. Il peut être ajouté aux moûts et aux vins dans certaines limites.

La méthode décrite a été validée dans le cadre d'essais interlaboratoires, par des analyses d'échantillons de vin avec des quantités ajoutées d'acide L-ascorbique et d'acide D-isoascorbique respectivement de 30 mg/l à 150 mg/l et de 10 mg/l à 100 mg/l.

2. DOMAINE D'APPLICATION

Cette méthode convient au dosage simultané de l'acide L-ascorbique et de l'acide D-isoascorbique (acide érythorbique) dans le vin par chromatographie liquide haute performance et détection UV dans une plage de 3 à 150 mg/l.

Pour des teneurs supérieures à 150 mg/l, une dilution de l'échantillon est nécessaire.

3. PRINCIPE

Les échantillons sont directement injectés dans le système HPLC après filtration sur membrane. Les analytes sont séparés sur une colonne à phase inversée et sont soumis à une détection UV à 266 nm. La quantification de l'acide L-ascorbique et de l'acide D-isoascorbique est effectuée par rapport à un étalon externe.

Remarque: Les colonnes et les conditions de fonctionnement sont données à titre d'exemple. D'autres types de colonnes peuvent également assurer une bonne séparation.

4. REACTIFS ET PRODUITS

4.1 Réactifs

4.1.1 n-octylamine, pureté $\geq 99,0$ %

4.1.2 Acétate de sodium $\times 3 \text{ H}_2\text{O}$, pureté $\geq 99,0$ %

4.1.3 Acide acétique pur, 100 %

4.1.4 Acide phosphorique, approx. à 25 %

4.1.5 Acide oxalique, pureté $\geq 99,0$ %

4.1.6 Ascorbate oxydase

4.1.7 Acide L-ascorbique, ultra $\geq 99,5$ %

4.1.8 Acide D-isoascorbique, pureté $\geq 99,0$ %

4.1.9 Eau bidistillée

4.1.10 Méthanol, p.A. 99,8 %

4.2 Préparation de la phase mobile

4.2.1 Solutions pour la phase mobile

Préparer les solutions suivantes pour la phase mobile:

4.2.1.1 12,93 g de n-octylamine dans 100 ml de méthanol

4.2.1.2 68,05 g d'acétate de sodium $\times 3 \text{ H}_2\text{O}$ dans 500 ml d'eau bidistillée

4.2.1.3 12,01 g d'acide acétique pur dans 200 ml d'eau bidistillée

4.2.1.4 Solution tampon (pH 5,4): 430 ml de solution d'acétate de sodium (4.2.1.2) et 70 ml de solution d'acide acétique (4.2.1.3)

4.2.2 Préparation de la phase mobile

Ajouter 5 ml de solution de n-octylamine (4.2.1.1) à environ 400 ml d'eau bidistillée dans un bécher. Ajuster cette solution à un pH de 5,4 à 5,6, en ajoutant goutte à goutte de l'acide phosphorique à 25 % (4.1.4). Ajouter 50 ml de la solution tampon (4.2.1.4) et transférer le composé dans une fiole jaugée de 1 000 ml, puis compléter avec de l'eau bidistillée. Avant utilisation, la phase mobile doit être filtrée à l'aide d'une membrane (cellulose régénérée de 0,2 µm) et si possible dégazée avec de l'hélium (pendant environ 10 minutes) selon les besoins du système HPLC utilisé.

4.3 Préparation de la solution étalon

Remarque:

Toutes les solutions étalons (solution mère 4.3.1. et solutions de travail 4.3.2) doivent être préparées chaque jour et de préférence stockées dans un réfrigérateur avant injection.

4.3.1 Préparation de la solution mère (1 mg/ml)

Préparer une solution aqueuse d'acide oxalique à 2 % et éliminer l'oxygène dissout par barbotage à l'azote.

Peser exactement 100 mg d'acide L-ascorbique et 100 mg d'acide D-isoascorbique dans une fiole jaugée de 100 ml, et la remplir de solution aqueuse d'acide oxalique à 2 %.

4.3.2 Préparation des solutions de travail

Pour les solutions de travail, diluer la solution mère (4.3.1) aux concentrations désirées avec la solution d'acide oxalique à 2 %. Des concentrations entre 10 mg/l et 120 mg/l sont recommandées. Par exemple 100 µl, 200 µl, 400 µl, 800 µl 1 200 µl à 10 ml, correspondant à 10, 20, 40, 80 et 120 mg/l.

5. APPAREILLAGE

Matériel courant de laboratoire, en particulier les équipements suivants:

5.1 Pompe HPLC

5.2 Injecteur à boucle de 20 µl

5.3 Détecteur UV

6. ECHANTILLONNAGE

Des échantillons de vin sont filtrés sur une membrane d'un diamètre de pore de 0,2 µm avant injection.

Pour des teneurs supérieures à 150 mg/l, une dilution de l'échantillon est nécessaire.

7. MODE OPERATOIRE

7.1 Conditions d'utilisation du système HPLC

Injecter dans l'appareil chromatographique 20 µl de l'échantillon filtré sur membrane.

Précolonne: par exemple Nucléosil 120 C18 (4 cm × 4 mm × 7 µm)

Colonne: par exemple Nucléosil 120 C18 (25 cm × 4 mm × 7 µm)

Volume d'injection: 20 µl

Phase mobile: voir 4.2.2, isocratique

Débit: 1 ml/min

Détection UV: 266 nm

Cycle de rinçage: au moins 30 ml d'eau bidistillée suivis de 30 ml de méthanol et de 30 ml d'acétonitrile

7.2 Identification/Confirmation

L'identification des pics s'effectue par comparaison des temps de rétention des étalons et des échantillons. Avec le système chromatographique décrit en exemple, les temps de rétention sont respectivement de 7,7 min pour l'acide L-ascorbique et 8,3 min pour l'acide D-isoascorbique (voir figure 1, chromatogramme A).

Pour confirmer des résultats positifs, ces échantillons doivent être traités avec une spatule d'ascorbate oxydase et mesurés de nouveau (voir figure 1, chromatogramme B).

En raison de la dégradation de l'acide L-ascorbique et de l'acide D-isoascorbique provoquée par l'ascorbate oxydase, aucun signal ne devrait être trouvé au temps de rétention de l'acide L-ascorbique et de l'acide D-isoascorbique. En cas de détection de pics parasites, leur surface doit être prise en compte dans le calcul de la concentration des analytes.

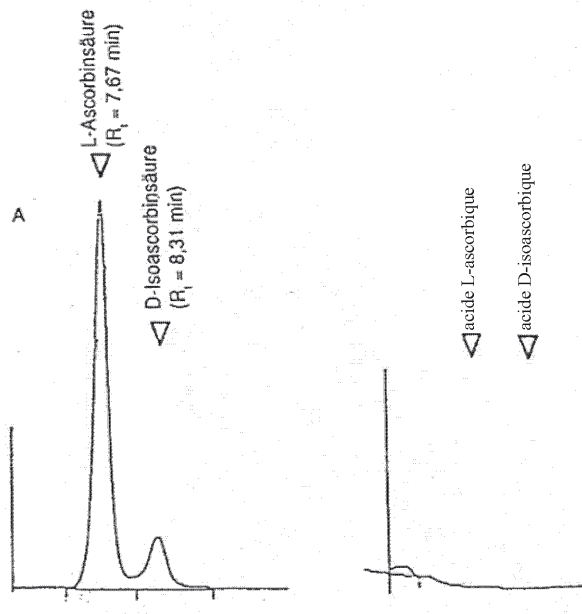


Figure 1

Exemple de chromatogramme d'un vin blanc: A avant le traitement à l'ascorbate oxydase; B après traitement

Remarque: Il est recommandé d'analyser les échantillons traités à l'ascorbate oxydase à la fin d'une séquence suivie du cycle de rinçage pour éliminer les restes d'ascorbate oxydase de la colonne, faute de quoi l'acide L-ascorbique et l'acide D-isoascorbique pourraient être convertis par les restes d'ascorbate oxydase lors de la mesure HPLC et le résultat pourrait s'en trouver affecté.

8. CALCULS

Préparer une courbe d'étalonnage à partir des solutions de travail (4.3.2). Selon la méthode de l'étalon externe, la quantification de l'acide L-ascorbique et de l'acide D-isoascorbique est réalisée en mesurant les surfaces des pics et en les comparant à la concentration correspondante sur la courbe d'étalonnage.

Expression des résultats

Les résultats sont exprimés à une décimale en mg/L d'acide L-ascorbique et d'acide D-isoascorbique respectivement (par exemple 51,3 mg/l).

Pour des teneurs supérieures à 150 mg/l, prendre en compte la dilution.

9. FIDÉLITÉ

La méthode a été testée dans le cadre d'un essai interlaboratoire organisé en 1994 par l'ancien Office fédéral d'hygiène publique (Bundesgesundheitsamt, Allemagne), auquel ont participé 27 laboratoires. Le programme de l'essai interlaboratoire a suivi le § 35 de la loi allemande relative aux denrées alimentaires, qui a été accepté par l'O.I.V jusqu'à l'introduction du nouveau protocole (OENO 6/2000).

L'étude a porté sur quatre échantillons différents de vin - deux vins blancs et deux vins rouges - avec cinq répétitions de chaque échantillon demandées. Étant donné qu'il n'était pas possible de préparer des échantillons avec une stabilité suffisante des analytes (vitesses de dégradation différentes), il a été décidé d'envoyer aux participants des quantités définies de substances étalons pures ainsi que les échantillons de vin. Les laboratoires ont reçu pour consigne de transférer les étalons quantitativement dans les échantillons de vin et de les analyser immédiatement. Des volumes de 30 à 150 mg/l pour l'acide L-ascorbique et de 10 à 100 mg/l pour l'acide D-isoascorbique ont été analysés. Les résultats détaillés de l'étude sont présentés dans l'ANNEXE publiée par l'OIV. L'évaluation a été réalisée selon DIN/ISO 5725 (version 1988).

Les écarts-types de répétabilité (s_r) et de reproductibilité (s_R) étaient en adéquation avec les concentrations d'acide L-ascorbiques et d'acide D-isoascorbique. Le paramètre de précision réelle peut être calculé à l'aide des équations suivantes:

Acide L-ascorbique

$$s_r = 0,011 x + 0,31$$

$$s_R = 0,064 x + 1,39$$

x: concentration d'acide L-ascorbique (mg/L)

Acide D-isoascorbique

$$s_r = 0,014 x + 0,31$$

$$s_R = 0,079 x + 1,29$$

x: concentration d'acide D-isoascorbique (mg/L)

Exemple:

50 mg/l d'acide D-isoascorbique $s_r = 1,0$ mg/l

$$s_R = 5,2 \text{ mg/L}$$

10. AUTRES CARACTÉRISTIQUES DE L'ANALYSE

10.1 Limite de détection

La limite de détection de cette méthode a été estimée à 3 mg/l pour l'acide L-ascorbique et l'acide D-isoascorbique.

10.2 Justesse

La récupération moyenne calculée à partir de l'essai interlaboratoire mené sur quatre échantillons (voir l'ANNEXE publiée dans le Recueil de l'OIV) a été de:

— 100,6 % pour l'acide L-ascorbique

— 103,3 % pour l'acide D-isoascorbique

17 DIOXYDE DE CARBONE (OIV - AS-314-01-DIOCAR) — MÉTHODE TYPE II

1. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

1.1. Cas des vins tranquilles (surpression de $\text{CO}_2 \leq 0,5 \times 10^5 \text{ Pa}$) ⁽¹⁾

Le volume de vin prélevé sur l'échantillon amené au voisinage de 0 °C est versé dans un excès suffisant de solution titrée d'hydroxyde de sodium pour avoir un pH de 10-11. On titre avec une solution acide en présence d'anhydrase carbonique. La teneur en dioxyde de carbone est déduite du volume versé pour passer de pH 8,6 (forme carbonate acide) à 4,0 (acide carbonique). Un titrage témoin effectué dans les mêmes conditions sur le vin décarboniqué permet de tenir compte du volume de solution d'hydroxyde de sodium consommé par les acides du vin.

1.2. Cas des vins pétillants et des vins mousseux

L'échantillon de vin à analyser est amené au voisinage de son point de congélation. Après soutirage d'un certain volume destiné à servir de témoin après décarbonation, on alcalinise le reste de la bouteille pour fixer tout le CO_2 sous forme de Na_2CO_3 . On titre avec une solution acide en présence d'anhydrase carbonique. La teneur en dioxyde de carbone est déduite du volume de solution acide versée pour passer de pH 8,6 (forme carbonate acide) à pH 4,0 (acide carbonique). Un titrage témoin effectué dans les mêmes conditions sur le vin décarboniqué permet de tenir compte du volume de solution d'hydroxyde de sodium consommé par les acides du vin.

2. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

2.1. Cas des vins tranquilles (surpression de dioxyde de carbone $\leq 0,5 \times 10^5 \text{ Pa}$).

2.1.1. Appareillage

2.1.1.1. Agitateur magnétique.

2.1.1.2. pH mètre.

2.1.2. Réactifs

2.1.2.1. Solution d'hydroxyde de sodium (NaOH), 0,1 M.

2.1.2.2. Solution d'acide sulfurique (H_2SO_4), 0,05 M.

2.1.2.3. Solution d'anhydrase carbonique à 1 gramme par litre.

2.1.3. Mode opératoire

Refroidir l'échantillon de vin aux environs de 0 °C ainsi que la pipette de 10 ml servant à son prélèvement.

Prélever dans un vase cylindrique de 100 ml, 25 ml de solution d'hydroxyde de sodium (point 2.1.2.1); ajouter 2 gouttes de solution aqueuse d'anhydrase carbonique (point 2.1.2.3). Y introduire 10 ml de vin au moyen de la pipette refroidie à 0 °C.

Placer le vase cylindrique sur l'agitateur magnétique, mettre en place l'électrode et le barreau magnétique et procéder à une agitation modérée.

Lorsque le liquide est revenu à la température ambiante, verser par affusion lente la solution d'acide sulfurique (point 2.1.2.2) jusqu'à pH 8,6.

Continuer les affusions d'acide sulfurique (point 2.1.2.2) jusqu'à pH 4,0. Soit n ml le volume utilisé entre pH 8,6 et 4,0.

Procéder par ailleurs à l'élimination du CO_2 sur 50 ml environ de l'échantillon de vin par agitation sous vide pendant 3 minutes, en réchauffant la fiole dans un bain d'eau à 25 °C environ.

Appliquer sur 10 ml de vin décarboniqué le mode opératoire ci-dessus: soit n' ml le volume utilisé.

2.1.4. Expression des résultats

1 ml de solution titrée d'acide sulfurique 0,05 M correspond à 4,4 mg de CO_2 .

La quantité de CO_2 en grammes par litre de vin est donnée par

$$0,44 (n - n')$$

Elle est exprimée avec 2 décimales.

Remarque: Dans le cas des vins peu chargés en CO_2 ($\text{CO}_2 < 1 \text{ g/l}$), l'addition d'anhydrase carbonique pour catalyser l'hydratation du CO_2 n'est pas nécessaire.

⁽¹⁾ 10^5 pascal (Pa) = 1 bar.

2.2. Cas des vins pétillants et des vins mousseux

2.2.1. Appareillage

2.2.1.1. Agitateur magnétique.

2.2.1.2. pH mètre.

2.2.2. Réactifs

2.2.2.1. Solution d'hydroxyde de sodium (NaOH), à 50 pour 100 (m/m).

2.2.2.2. Solution d'acide sulfurique (H₂SO₄), 0,05 M.

2.2.2.3. Solution d'anhydrase carbonique à 1 gramme par litre.

2.2.3. Mode opératoire

Sur la bouteille de vin à analyser, tracer un repère au niveau du remplissage et la refroidir jusqu'à début de congélation.

Laisser la bouteille se réchauffer légèrement, tout en l'agitant, jusqu'à disparition des cristaux de glace.

Déboucher rapidement et mettre de côté, dans une éprouvette graduée, 45 à 50 ml de vin qui serviront au dosage témoin. Le volume exact de ce prélèvement, v ml, sera déterminé par lecture sur l'éprouvette après son retour à la température ambiante.

Ajouter, sitôt le prélèvement effectué, 20 ml de solution d'hydroxyde de sodium (point 2.2.2.1) dans la bouteille pour une contenance de 750 ml.

Attendre que le vin soit revenu à la température ambiante.

Placer dans un vase cylindrique de 100 ml, 30 ml d'eau distillée bouillie et 2 gouttes de la solution d'anhydrase carbonique (point 2.2.2.3). Y ajouter 10 ml de vin alcalinisé.

Placer le vase sur l'agitation magnétique, mettre en place l'électrode et le barreau magnétique et procéder à une agitation modérée.

Verser par affusion lente la solution d'acide sulfurique (point 2.2.2.2) jusqu'à pH 8,6.

Continuer les affusions d'acide sulfurique (point 2.2.2.2) jusqu'à pH 4,0. Soit n ml le volume utilisé entre pH 8,6 et 4,0.

Procéder par ailleurs à l'élimination du CO₂ sur les v ml de vin, mis à côté pour le dosage témoin, par agitation sous vide pendant 3 minutes, en réchauffant la fiole dans un bain d'eau à 25 °C environ. Prélever 10 ml de vin décarboniqué dans 30 ml d'eau distillée bouillie, ajouter 2 à 3 gouttes de solution d'hydroxyde de sodium (point 2.2.2.1) pour amener le pH à 10-11. Appliquer ensuite le mode opératoire ci-dessus. Soit n' ml, le volume d'acide sulfurique 0,05 M versé.

2.2.4. Expression des résultats

1 ml de solution d'acide sulfurique 0,05 M correspond à 4,4 mg de CO₂.

Vider la bouteille de son vin alcalinisé et déterminer à 1 ml près le volume initial du vin en la remplissant avec de l'eau jusqu'au trait de repère, soit V ml.

La quantité de CO₂ en grammes par litre de vin est donnée par:

$$0,44(n - n') \times ((V - v + 20)/(V - v))$$

Elle est exprimée avec 2 décimales.

2.3. Calcul de la surpression théorique

La surpression à 20 °C, P_{aph}₂₀, exprimée en pascals, est donnée par la formule:

$$P_{aph20} = ((Q)/(1,951 \times 10^{-5}(0,86 - 0,01 A)(1 - 0,00144 S))) - Patm$$

avec:

Q: teneur en grammes de CO₂ par litre de vin

A: titre alcoométrique du vin à 20 °C

S: teneur en sucres du vin en grammes par litre

Patm: pression atmosphérique, exprimée en pascals

18 DOSAGE DU DIOXYDE DE CARBONE DANS LE VIN PAR METHODE MANOMETRIQUE (OIV – AS314-04-CO2MAN) — MÉTHODE TYPE II

(p.m.)

[La description de cette méthode d'analyse fait l'objet d'une mise à jour par les instances de l'OIV. Elle sera publiée dans une prochaine Communication de la Commission dès qu'un texte mis à jour sera publié par l'OIV dans l'édition 2010 du Recueil des Méthodes Internationales d'analyse de l'OIV]

19 MESURE DE LA SURPRESSION DES VINS MOUSSEUX ET PETILLANTS (OIV - AS-314-02-SURPRES) —
MÉTHODE TYPE I

1. PRINCIPE

Après stabilisation thermique et agitation de la bouteille, la surpression est mesurée à l'aide d'un aphromètre (jauge de pression). Elle est exprimée en Pascals (Pa) (méthode de type I). La méthode est également applicable aux vins mousseux gazéifiés et aux vins pétillants gazéifiés.

2. APPAREILLAGE

L'appareil permettant la mesure de la surpression dans les bouteilles de vins mousseux et pétillants s'appelle un aphromètre. Il se présente différemment suivant le bouchage de la bouteille (capsule métallique, capsule couronne, bouchon liège ou plastique).

2.1. Pour les bouteilles munies d'une capsule

Il est constitué de trois parties (figure 1):

- la partie supérieure (ou vis porte-aiguille) est composée du manomètre, d'une bague de serrage manuel, d'une vis sans fin qui coulisse dans la partie moyenne, et d'une aiguille qui traverse la capsule. L'aiguille possède un trou latéral qui communique la pression au manomètre. Un joint assure l'étanchéité de l'ensemble sur la capsule de la bouteille
- la partie moyenne (ou écrou) sert à centrer la partie supérieure. Elle se visse dans la partie inférieure de manière à maintenir fortement l'ensemble sur la bouteille
- la partie inférieure (ou étrier) est munie d'un ergot qui se glisse sous la bague de la bouteille, de manière à retenir l'ensemble. Il existe des bagues adaptées à chaque type de bouteille.

2.2. Pour les bouteilles munies d'un bouchon

Il est constitué de deux parties (figure 2):

- La partie supérieure est identique à l'appareil précédent; toutefois, l'aiguille est plus longue. Cette dernière est formée d'un long tube creux au bout duquel est placée une pointe qui aidera à traverser le bouchon. Cette pointe est amovible, elle tombe dans le vin une fois le bouchon traversé
- la partie inférieure est formée par l'écrou et d'une base venant reposer sur le bouchon. Celle-ci est munie de quatre vis de serrage servant à maintenir l'ensemble sur le bouchon.

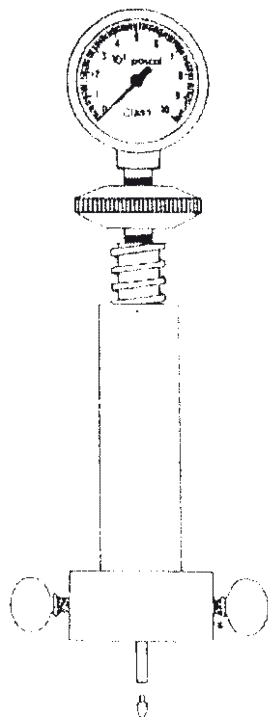


Figure 2: Aphromètre pour bouchons

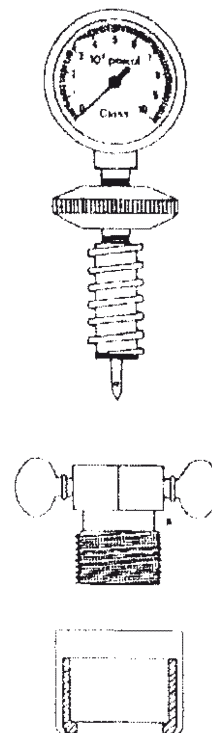


figure 1: Aphromètre pour capsules

Remarques concernant les manomètres équipant ces deux types d'appareil:

- ils peuvent être soit mécaniques à tube de Bourdon, soit numériques à capteur piézoélectrique. Dans le premier cas, le tube de Bourdon sera obligatoirement en acier inoxydable
- ils sont gradués en pascals (abréviation Pa). Pour les vins mousseux, il est plus pratique d'utiliser le 10^5 pascals (10^5 Pa) ou le kilopascal (kPa) comme unité
- ils peuvent être de différentes classes. La classe d'un manomètre est la précision de la lecture par rapport à la pleine échelle exprimée en pourcentage (ex.: manomètre 1 000 kPa classe 1 signifie pression d'utilisation maximale 1 000 kPa, lecture à ± 10 kPa). La classe 1 est recommandée pour des mesures précises.

3. MODE OPERATOIRE

La mesure doit s'effectuer sur des bouteilles dont la température est stabilisée depuis au moins 24 heures. Après avoir percé la couronne, le bouchon de liège ou de plastique, la bouteille doit alors être fortement agitée jusqu'à pression constante, pour effectuer la lecture.

3.1. Cas des bouteilles capsulées

Glisser l'ergot de l'étrier sous la bague de la bouteille. Visser l'écrou jusqu'à ce que l'ensemble soit serré sur la bouteille. La partie supérieure est alors vissée dans l'écrou. Pour éviter des pertes de gaz le percement de la capsule doit s'effectuer le plus rapidement possible, pour amener le joint au contact de la capsule. La bouteille doit être ensuite fortement agitée jusqu'à pression constante pour effectuer la lecture.

3.2. Cas des bouteilles bouchées

Mettre une pointe en place au bout de l'aiguille. Positionner l'ensemble du montage sur le bouchon. Serrer les quatre vis sur le bouchon. Visser la partie supérieure (l'aiguille traverse alors le bouchon). La pointe doit tomber dans la bouteille pour que la pression puisse se transmettre au manomètre. Effectuer la lecture après agitation de la bouteille jusqu'à pression constante. Récupérer la pointe après lecture.

4. EXPRESSION DES RESULTATS

La surpression à 20 °C ($P_{aph_{20}}$) est exprimée en pascals (Pa) ou en kilopascals (kPa). Elle doit être en concordance avec la précision du manomètre (par exemple: $6,3 \times 10^5$ Pa ou 630 kPa et non $6,33 \times 10^5$ Pa ou 633 kPa pour un manomètre 1 000 kPa pleine échelle, de classe 1).

Quand la température de mesure est différente de 20 °C, il convient d'apporter une correction en multipliant la pression mesurée par le coefficient approprié (voir tableau 1).

Tableau 1

Rapport de la surpression $P_{aph_{20}}$ d'un vin pétillant ou mousseux à 20 °C à la surpression P_{aph_t} à une température t

°C		°C	
0	1,85	13	1,24
1	1,80	14	1,20
2	1,74	15	1,16
3	1,68	16	1,13
4	1,64	17	1,09
5	1,59	18	1,06
6	1,54	19	1,03
7	1,50	20	1,00
8	1,45	21	0,97
9	1,40	22	0,95
10	1,36	23	0,93
11	1,32	24	0,91
12	1,28	25	0,88

5. CONTRÔLE DES RESULTATS

Méthode de détermination directe de paramètres physiques (méthode critère de type I)

Vérification des aphromètres

Les aphromètres doivent être vérifiés régulièrement (au moins une fois par an).

La vérification se fait à l'aide d'un banc d'étalonnage. Il permet de comparer le manomètre à tester à un manomètre de référence, de classe supérieure, raccordé aux étalons nationaux, monté en parallèle. Le contrôle est utilisé pour confronter les valeurs indiquées par les deux appareils pour des pressions croissantes puis décroissantes. S'il y a une différence entre les deux, une vis de réglage permet d'effectuer les corrections nécessaires.

Les laboratoires et les organismes autorisés sont tous équipés de tels bancs d'étalonnage; ils sont également disponibles auprès des constructeurs de manomètres.

20 DOSAGE DU LYSOZYME DANS LE VIN PAR HPLC (OIV-AS-315-14) — MÉTHODE TYPE IV**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 (CH₃CN) pour analyse CLHP

Acide trifluoroacétique (TFA) pur

Eau désionisée pour analyse CLHP

Solution standard: acide tartrique 1 g/l, Alcool éthylique 10 % v/v ajusté à pH 3,2 avec du tartrate de potassium neutre

5.2. Éluants

A: CH₃CN 1 %, TFA 0,2 %, H₂O= 98,8 %

B: CH₃CN 70 %, TFA 0,2 %, H₂O= 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 × 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: 1 ml/min

8.2. Température de la colonne: 30 °C

- 8.3. Détection spectrophotométrique: 280 nm
- 8.4. Détection spectrofluorimétrique: $\lambda_{ex} = 276 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 345 \text{ nm}$; Gain = 10
- 8.5. Programme du gradient d'éluion

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	52,037	0,9990	0,18	0,59	2,61	2,37	0,68	2,30

Tableau 1: Données relatives aux caractéristiques de la méthode: Std¹ solution standard ; V.R.² vin rouge ; V.B.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

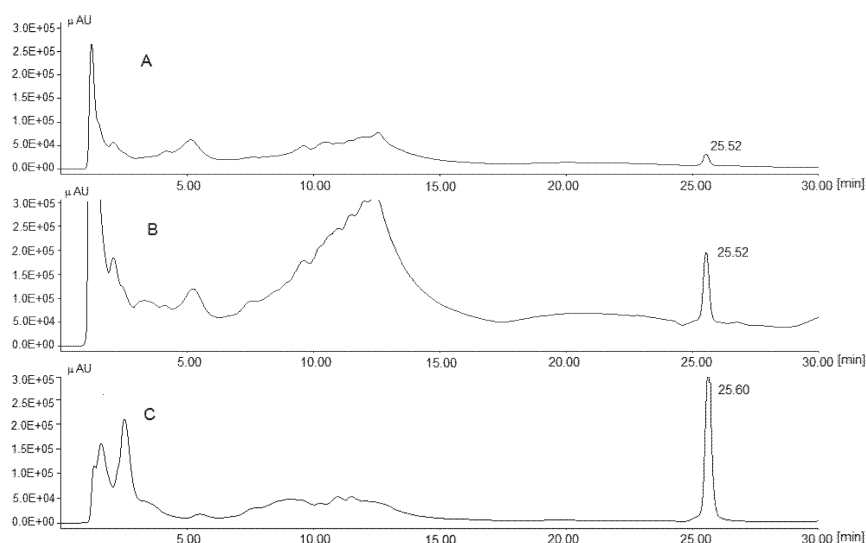


Fig.1 Chromatogramme de vin rouge contenant du Lysozyme pur (une solution standard contenant 1 000 mg/l de Lysozyme a été ajouté au vin pour obtenir une concentration finale de 125 mg/l de Lysozyme). A: détecteur UV à 280 nm; B: détecteur UV à 225 nm; C: détecteur FLD (λ ex 276 nm; λ em 345 nm).

21 SULFATES (OIV- AS-321-05-SULFAT) — MÉTHODE TYPE II

1. PRINCIPE DES MÉTHODES

1.1. **Méthode de référence**

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.

1.2. **Méthode rapide d'essai**

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'ion baryum.

2. MÉTHODE DE RÉFÉRENCE

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 $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

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 minutes. Centrifuger pendant 5 minutes, 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 ($\rho_{20} = 1,15 - 1,18$ 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 au point 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 1 000 mg/l: $r = 27$ mg/l

environ 1 500 mg/l: $r = 41$ mg/l

2.3.3. *Reproductibilité*

jusqu'à 1 000 mg/l: $R = 51$ mg/l

environ 1 500 mg/l: $R = 81$ mg/l

22 FER (OIV - AS-322-05-FER) — MÉTHODE TYPE IV

1. PRINCIPE DES MÉTHODES

MÉTHODE DE RÉFÉRENCE

Après dilution convenable du vin et élimination de l'alcool, le fer est dosé directement par spectrophotométrie d'absorption atomique.

MÉTHODE USUELLE

Après minéralisation du vin par le perhydrol, le fer qui se trouve à l'état de fer III est réduit à l'état de fer II et est dosé grâce à la coloration rouge qu'il donne avec l'orthophénanthroline.

2. MÉTHODE DE RÉFÉRENCE

2.1. **Réactifs**

2.1.1. 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 ($\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) dans de l'eau distillée légèrement acidifiée par de l'acide chlorhydrique M et en ajustant le volume à 1 litre.

2.1.2. Solution étalon diluée de fer titrant 100 milligrammes par litre.

2.2. **Appareillage**

2.2.1. Évaporateur rotatif avec bain d'eau thermostaté.

2.2.2. Spectrophotomètre d'absorption atomique équipé d'un brûleur alimenté par de l'air et de l'acétylène.

2.2.3. Lampe à cathode creuse en fer.

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 cinq fioles jaugées de 100 ml, placer 1 - 2 - 3 - 4 - 5 ml de la solution de fer à 100 milligrammes par litre (point 2.1.2) 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 comme indiqué au point 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 en fer C.

La concentration en fer exprimée en milligrammes par litre de vin avec 1 décimale sera:

$$C \times F$$

F = facteur de dilution.

23 CUIVRE (OIV – AS 322-06) — MÉTHODE TYPE IV

1. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Emploi de la spectrophotométrie d'absorption atomique.

2. APPAREILS

2.1. Capsule de platine.

2.2. Spectrophotomètre d'absorption atomique.

2.3. Lampe à cathode creuse au cuivre.

2.4. Gaz d'alimentation: air/acétylène ou protoxyde d'azote/acétylène.

3. RÉACTIFS

3.1. Cuivre métal.

3.2. Acide nitrique concentré 65 % (HNO₃, ρ₂₀ = 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, à 1 g/l. Cette solution peut être préparée en pesant 1 000 g de cuivre métal et en transférant quantitativement dans une fiole jaugée de 1 000 ml. Ajouter de l'acide nitrique dilué 1/2 (3.3), en quantité strictement suffisante pour dissoudre le métal, ajouter 10 ml d'acide nitrique concentré (3.2), 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.

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. Si nécessaire préparer une dilution appropriée avec de l'eau bidistillée.

4.2. **Établissement de la courbe d'étalonnage**

Prélever 0,5 - 1 - 2 ml de solution (point 3.5) (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 l'échantillon du vin dilué 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 x C.

Elle est donnée avec 2 décimales.

Remarques:

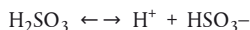
- a) Les solutions pour l'établissement de la courbe d'étalonnage et les dilutions de l'échantillon doivent toutes être choisies en fonction de la sensibilité de l'appareil utilisé et de la concentration en cuivre présente dans l'échantillon.

- b) 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 (point 3.2) 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 (point 3.2) 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 minutes; 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 (point 3.2) 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.

24 DIOXYDE DE SOUFRE (OIV - AS-323-04-DIOSU) — MÉTHODE TYPE II

1. DÉFINITIONS

On appelle dioxyde de soufre, le dioxyde de soufre présent dans le moût ou le vin sous les formes suivantes: H_2SO_3 , H SO_3 , dont l'équilibre est fonction du pH et de la température:



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

2.1.1. Méthode de référence

2.1.1.1. Cas des vins et des moûts

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 libre est extrait du vin par entraînement à froid (10 °C).

Le dioxyde de soufre total est extrait du vin par entraînement à chaud (100 °C environ).

2.1.1.2. Cas des moûts concentrés rectifiés

Le dioxyde de soufre total est extrait par entraînement à chaud (100 °C environ) du moût concentré rectifié préalablement dilué.

2.1.2. Méthode rapide d'essai (cas des vins et des moûts)

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 de référence

2.2.1. Appareillage

2.2.1.1. L'appareil utilisé doit être conforme au schéma ci-dessous, principalement en ce qui concerne le réfrigérant.

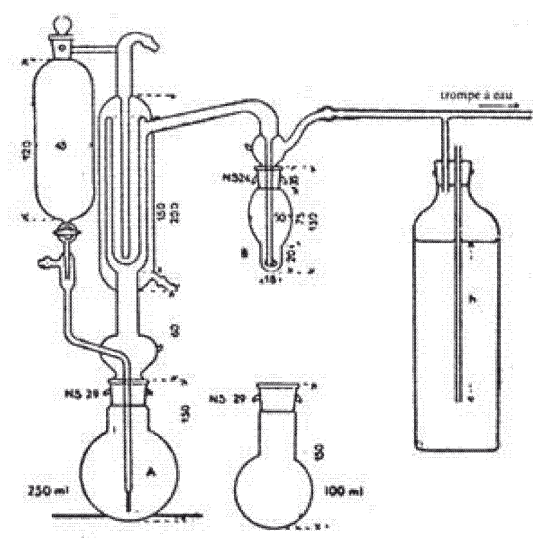


Figure 1

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.

2.2.1.2. Microburette.

2.2.2. Réactifs

2.2.2.1. Acide phosphorique à 85 pour 100 (H_3PO_4) ($\rho_{20} = 1,71$ g/ml).

2.2.2.2. Solution de peroxyde d'hydrogène à 9,1 g d' H_2O_2 /l (3 volumes).

2.2.2.3. Réactif indicateur:

rouge de méthyle..... 100 mg

bleu de méthylène..... 50 mg

alcool à 50 % vol..... 100 ml

2.2.2.4. Solution d'hydroxyde de sodium (NaOH), 0,01 M.

2.2.3. Dosage du dioxyde de soufre libre

2.2.3.1. Mode opératoire

Le vin doit être maintenu à 20 °C en flacon plein et bouché pendant 2 jours avant le dosage.

— Dans le barboteur B, placer 2 à 3 ml de solution de peroxyde d'hydrogène (point 2.2.2.2) 2 gouttes de réactif indicateur et neutraliser la solution de peroxyde d'hydrogène par la solution 0,01 M d'hydroxyde de sodium (point 2.2.2.4). Adapter ce barboteur à l'appareil.

— Dans le ballon A de 250 ml de l'appareil à entraînement, introduire 50 ml d'échantillon et 15 ml d'acide phosphorique (point 2.2.2.1). Mettre en place le ballon.

— Faire ensuite barboter l'air (ou l'azote) pendant 15 minutes. Le dioxyde de soufre libre entraîné est oxydé en acide sulfurique. Retirer le barboteur de l'appareil et titrer l'acide formé par la solution d'hydroxyde de sodium 0,01 M (point 2.2.2.4). Soit n le nombre de millilitres versés.

2.2.3.2. Expression des résultats

Le dioxyde de soufre libre est exprimé en milligrammes par litre (mg/l) sans décimale.

2.2.3.2.1. Calcul

Dioxyde de soufre libre en milligrammes par litre: 6,4 n.

2.2.4. Dosage du dioxyde de soufre total

2.2.4.1. Mode opératoire

2.2.4.1.1. 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» au point 5.1.2. Dans le ballon A de 250 ml de l'appareil à entraînement, introduire 50 ml de cette solution et 5 ml d'acide phosphorique (point 2.2.2.1). Mettre en place le ballon.

2.2.4.1.2. Cas des vins et des moûts

Teneur présumée de l'échantillon ≤ 50 mg/l SO_2 total. Dans le ballon A de 250 ml de l'appareil à entraînement, introduire 50 ml d'échantillon et 15 ml d'acide phosphorique (point 2.2.2.1). Mettre en place le ballon.

Teneur présumée de l'échantillon ≥ 50 mg/l de SO_2 total. Dans le ballon A de 100 ml de l'appareil à entraînement, introduire 20 ml d'échantillon et 5 ml d'acide phosphorique (point 2.2.2.1). Mettre en place le ballon.

Placer dans le barboteur B 2 à 3 ml de solution de peroxyde d'hydrogène (point 2.2.2.2), la neutraliser comme précédemment, porter le vin 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 pyrogénéation des matières extractives du vin 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 (point 2.2.2.4).

Soit n le nombre de millilitres versés.

2.2.4.2. Expression des résultats

Le dioxyde de soufre total est exprimé en milligrammes par litre (mg/l) respectivement en milligrammes par kilogramme (mg/kg) de sucres totaux sans décimale.

2.2.4.2.1. Calcul

— Cas des vins et des moûts

Dioxyde de soufre total en milligrammes par litre.

— Échantillons pauvres en dioxyde de soufre (prise d'essai 50 ml):

$$6,4 \times n$$

— Autres échantillons (prise d'essai 20 ml):

$$16 \times n$$

— Cas des moûts concentrés rectifiés

Dioxyde de soufre en milligrammes par kilo de sucres totaux (prise d'essai 50 ml d'échantillon préparé) (point 2.2.4.1.1):

$$(1,600 \times n)/(P)$$

P = teneur pour 100 (m/m) en sucres totaux

2.2.3.4.2. 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

2.2.3.4.3. 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
