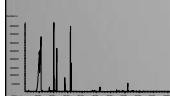




Equipe de chimie analytique, UMR œnologie



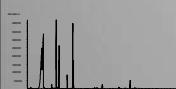
Développement de la SBSE dans le domaine du vin, application au profil multirésidus

Gilles de Revel, Céline Franc

SBSE Technical Meeting / 2011, january 20th

Problématique de l'analyse dans le vin

Matrice hydroalcoolique complexe



Eau : ~ 85 %

Ethanol : 12 – 15 %

De nombreuses molécules organiques, inorganiques

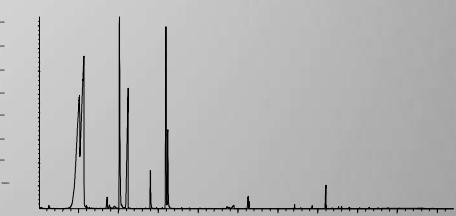
Macromolécules

Extrait sec

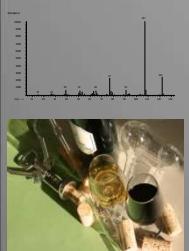
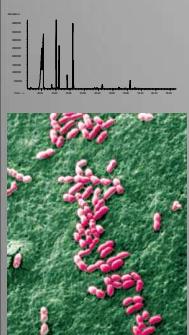
L'analyse dans le domaine du vin

La recherche avance et apporte des réponses, l'œnologie en profite

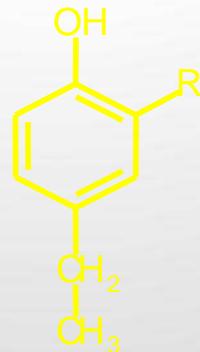
- Développement des systèmes analytiques
- Identification des marqueurs chimiques
- Origine des défauts et paramètres œnologiques
- Analyse et quantification
- Techniques d'évaluation sensorielle
 - produits : impact, caractérisation (seuil, descripteurs/concentration, base de données...)
 - dégustateurs : sensibilité, capacité d'extraction, apprentissage...



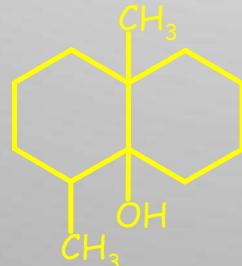
Défauts des vins :



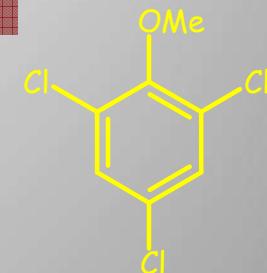
phénolés



végétaux



moisis



bouchonnés...

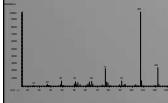
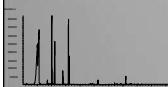
marqueurs moléculaires / référentiel

- molécules connues,
- seuils olfactifs définis,
- quantification possible



Problématique de l'analyse dans le vin

- Étape 1 → **EXTRACTION** obligatoire des composés d'intérêt
 - extraction liquide-liquide ⇒ utilisation de solvants organiques
 - ↳ impact environnemental et coût
 - Étape 2 → **CONCENTRATION** nécessaire
 - Étape 3 → **ANALYSE** (souvent spécifique d'une classe chimique de molécules)



→ Préparations longues \Rightarrow débit faible
 \Rightarrow coût élevé } **automatisation indispensable**

→ Multiplication des étapes de manipulation des échantillons

→ Risques d'erreur et de pertes

microextraction:

SPME/SBSE

SPME (Fibre) :

Solid Phase Micro-Extraction



Fibres : différentes natures
⇒ spécificités différentes



Quantité de polymère $\leq 0,5 \mu\text{L}$



SBSE (Twister) :

Stir Bar Sorptive Extraction



Twisters : une seule phase
4 tailles : 24 à 126 μL de polymère
→ + grande quantité de composés extraits
→ meilleure **sensibilité**

La microextraction:

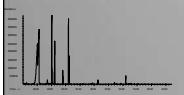
Nouvelles Techniques : SPME/SBSE

- Extraction et Concentration simultanée sur la **fibre** ou le **twister**

→ 2 modes d'utilisation : **espace de tête** ou **immersion**

- Faible volume d'échantillon
- Techniques multi-résidus **sans solvant**
- Introduction **automatisée** de la fibre ou du twister dans l'injecteur de l'appareil

Réduction des étapes de préparation et de manipulation des échantillons



Besoin d'application à l'œnologie

Mise en place possible dans les laboratoires de terrain



Validation des méthodes

Linéarité du dosage

Limites de détection (LD) et de quantification (LQ)

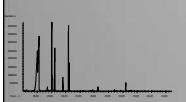
Effet mémoire du twister ou de la fibre



Exactitude de la méthode :

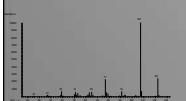
Fidélité :

- Répétabilité
- Reproductibilité (intralaboratoire – interlaboratoire)



Justesse :

- Comparaison avec d'autres méthodes validées
- Calcul du recouvrement
- Dosage d'échantillons de concentrations **connues et certifiées**



Analyses par HS-SPME couplée à la CPG-SM



Méthodes de dosages SPME développées au laboratoire

- 2003 : Anisoles : TCA, TeCA, PCA, TBA

→ sur vin

→ sur bouchons



- 2006 : Phénols volatils : EP, EG, VP, VG

→ sur vin



- 2007 : Pyrazines : IBMP, IPMP

→ sur vin

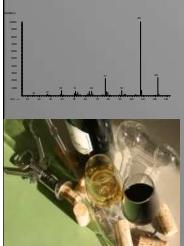
→ sur moût



- 2009 : Esters : EEAG, AAS, EEAB...

→ sur vin

→ 32 molécules





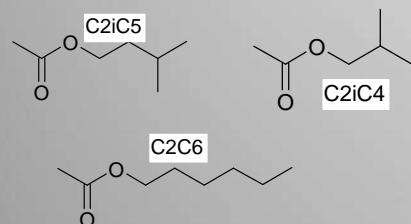
Application : esters du vin



Esters : rôle central dans l'arôme fruité des vins rouges

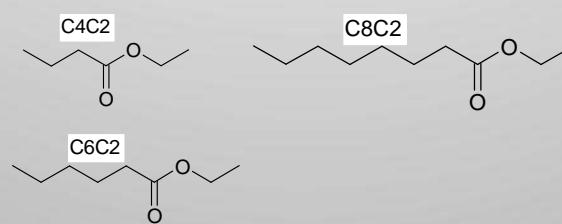
(Bertrand, 1975 ; Escudero *et al.*, 2007 ; Pineau *et al.*, 2009)

**Acétates d'alcools supérieurs
(AAS)**



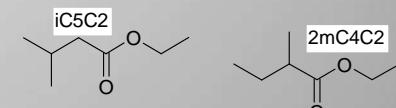
Notes fruités fermentaires

**Esters éthyliques d'acides gras
(EEAG)**



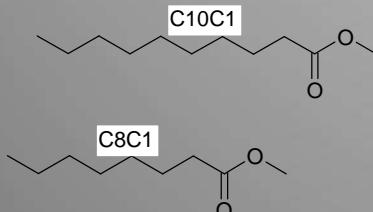
En mélange : note fruits rouges

**Esters éthyliques d'acides branchés
(EEAB)**

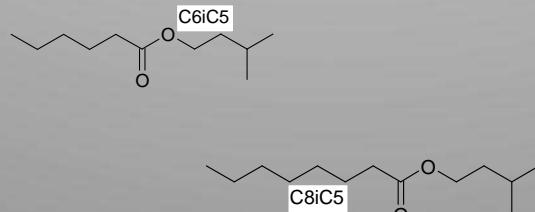


En mélange : note fruits noirs

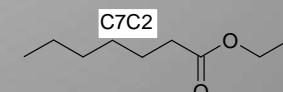
Esters méthyliques



Esters isoamyliques



**Esters éthyliques d'acides gras à
nombre impair de carbones**





Application : esters du vin



Développement d'une méthode de dosage HS-SPME-GC/MS

Plus complète, plus sensible, plus précise, plus spécifique

➤ Dosage de 32 esters apolaires par HS-SPME-GC/MS (Antalick *et al.*, 2010)



- Facilité d'utilisation pour un suivi FML (FA)

- Optimisation :
 - ✓ Choix de la fibre (PDMS), exclusion des esters polaires (dosés par extraction liq/liq-GC-MS)
 - ✓ EI : 4 esters deutérés
(C4C2-d5, C6C2-d5, C8C2-d5, CinamateC2-d5)

IBMP : marqueur végétal du vin

Préparation des échantillons

Méthode antérieure



- Lavage de la verrerie à l'acide chromique (24h, 20°C)
- Prélèvement de **250 mL** d'échantillon
- Distillation par entraînement à la vapeur
- Percolation de l'extrait sur une microcolonne de résine échangeuse de cations
- Élution à la soude 10%, rinçage à l'eau puis au DCM
- Extraction de la phase aqueuse au DCM
- Séchage des phases organiques rassemblées sur sulfate de sodium
- Concentration sous courant d'azote
- INJECTION (2 µL)

IBMP : marqueur végétal du vin



Méthode actuelle

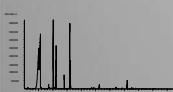
A partir d'un vin :

- Dilution ½ par l'eau distillée



A partir d'un moût :

- Analyse directe (10 ml)



A partir de baies :

- Eraflage, broyage des baies (200)
- Centrifugation du broyat
- Filtration du surnageant
- Analyse du filtrat (10 mL)



} Préparation classique
pour l'indice de maturité

IBMP : Préparation des échantillons

1. Prélèvement
d'un volume précis



2. Ajout de
l'étalon interne
(IBMP-d₃)



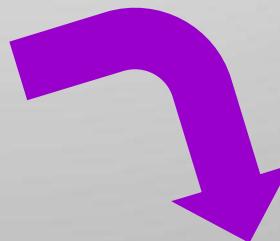
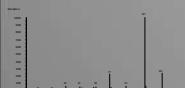
3. Ajustement
à pH 7



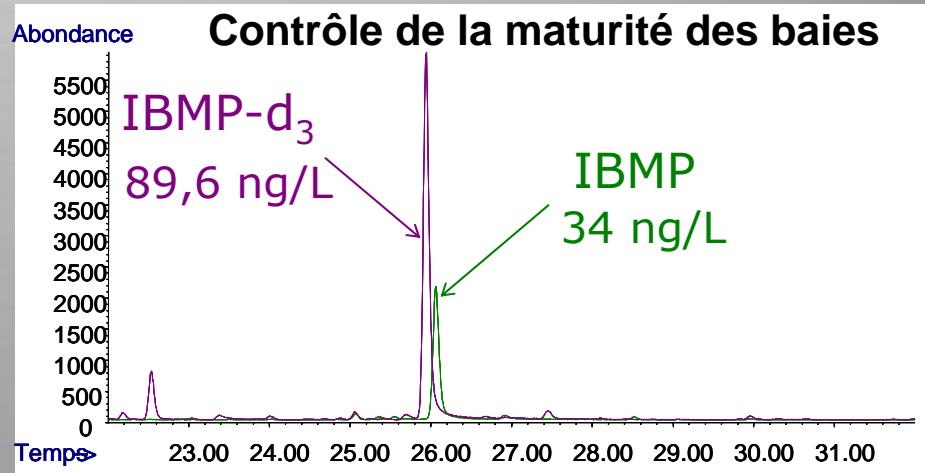
4. Préparation du vial
avec 3 g de NaCl



Analyse par
HS-SPME-GC-MS

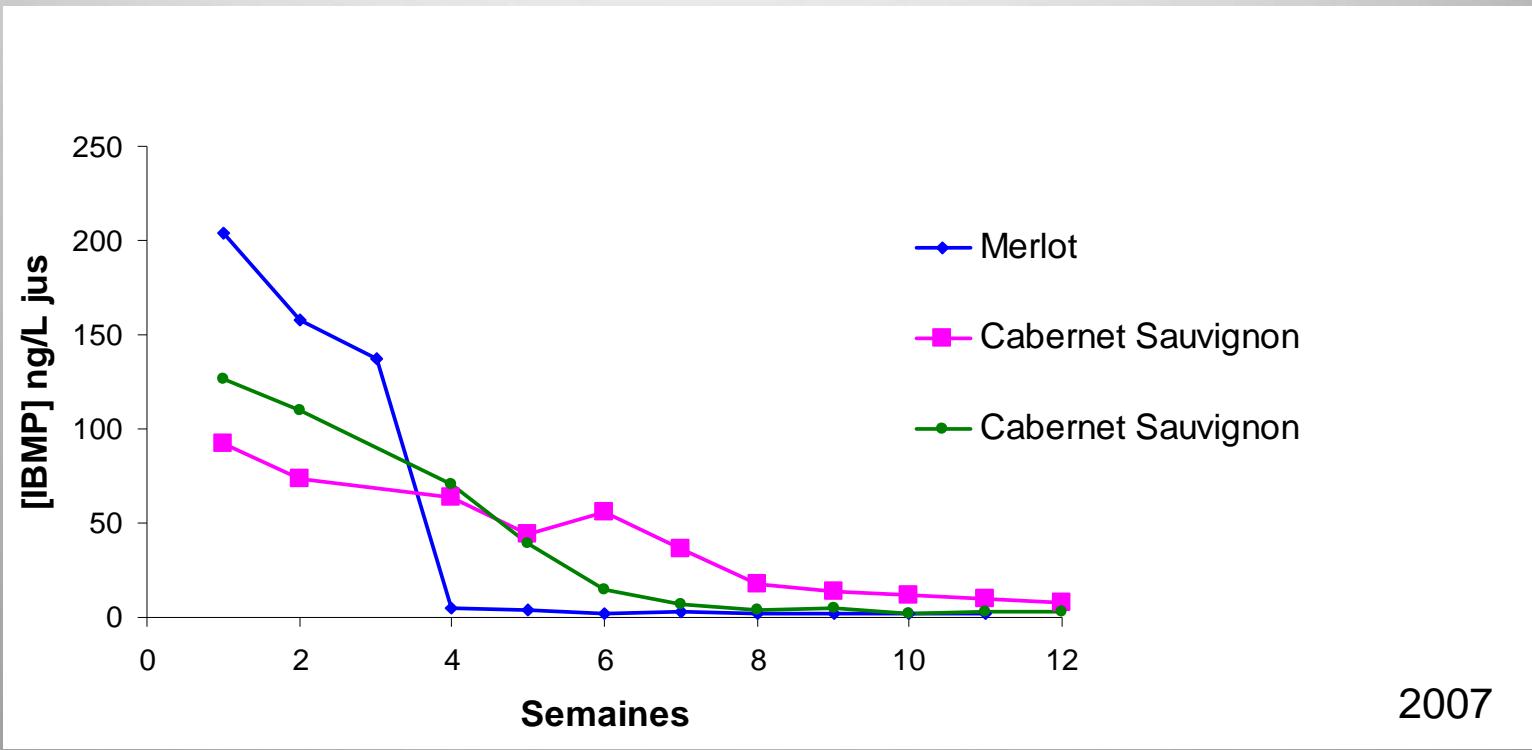
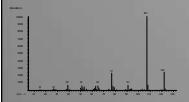
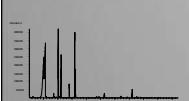


Contrôle de la maturité des baies



IBMP : Application

- Suivi de la maturation des baies de raisin

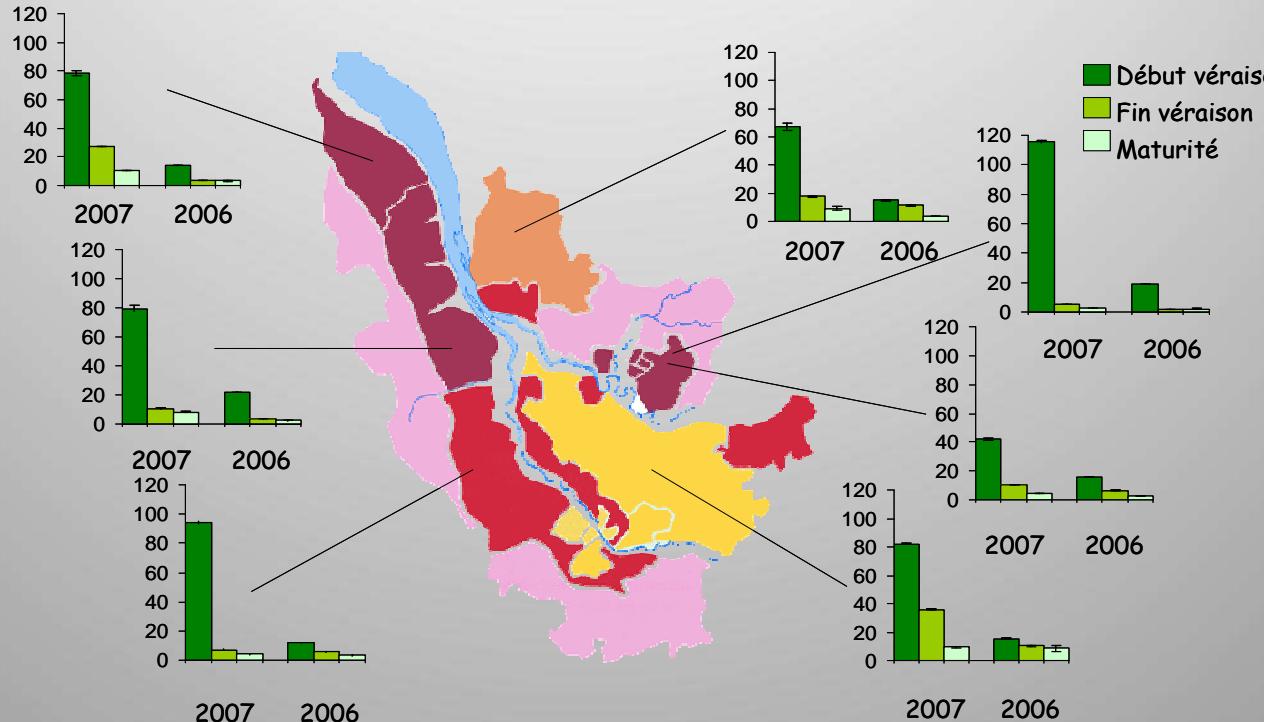
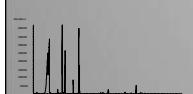


Les teneurs en IBMP diminuent régulièrement au cours de la maturation de la baie. Dès la fin véraison, la teneur dans les moûts est inférieure au seuil de perception olfactif dans les vins.

IBMP : Application



- Suivi des parcelles du réseau maturité en Gironde



Teneurs en IBMP à différentes dates de prélèvement pour 7 parcelles de Cabernet Sauvignon (millésimes 2006 et 2007).

Analyses par Twister-CPG-SM



Méthodes multi-résidus

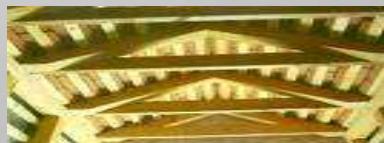
- 2010 : Marqueurs aromatiques fruités du vin

C13-norisoprénoides et lactones

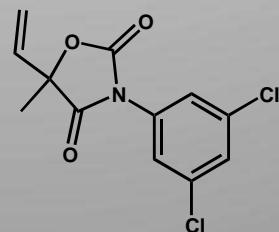


- 2007 : Défauts olfactifs du vin

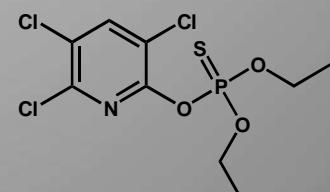
IBMP, EP, EG, TCA, TeCA, PCA, TBA, Géosmine



- 2010 : Résidus de pesticides



Vinclozoline



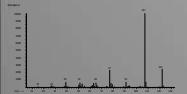
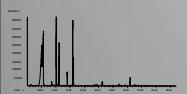
Chlorpyrifos

Analyse multi-résidus dans le vin



Préparation de l'échantillon :

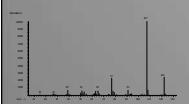
- Volume de vin 10 mL
- Agitation 1 heure
- 15 échantillons simultanément
- Récupération du twister, rinçage à l'eau
- Introduction du twister chargé des composés dans le liner



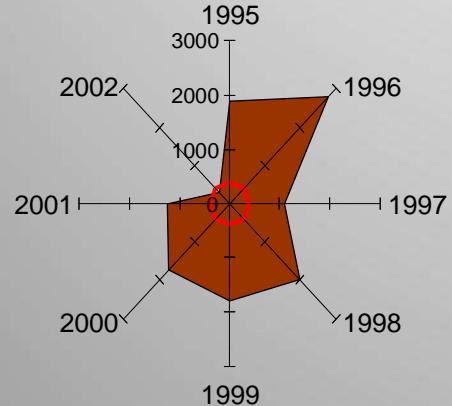
Application : "multi-défaux"



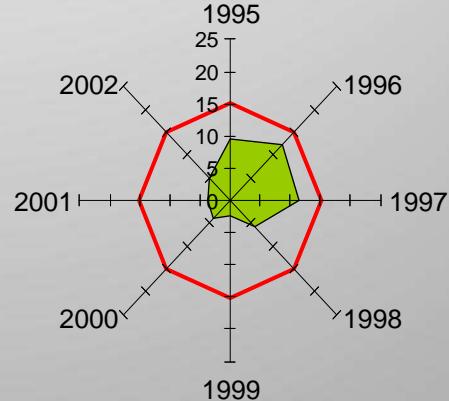
Comparaison en relation avec la valeur du seuil de perception olfactif de la concentration des principales molécules responsables de défauts pour huit millésimes d'un vin de Bordeaux



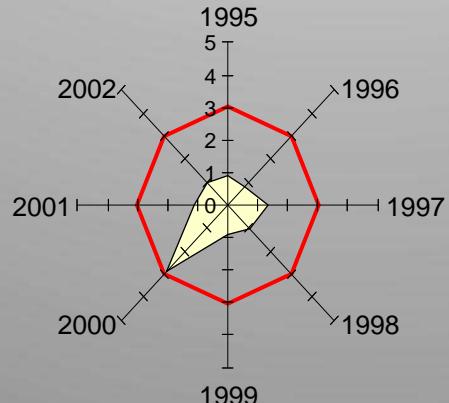
Phénols volatils



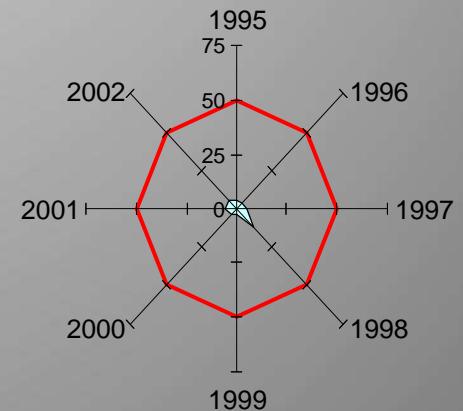
IBMP



TCA



Géosmine

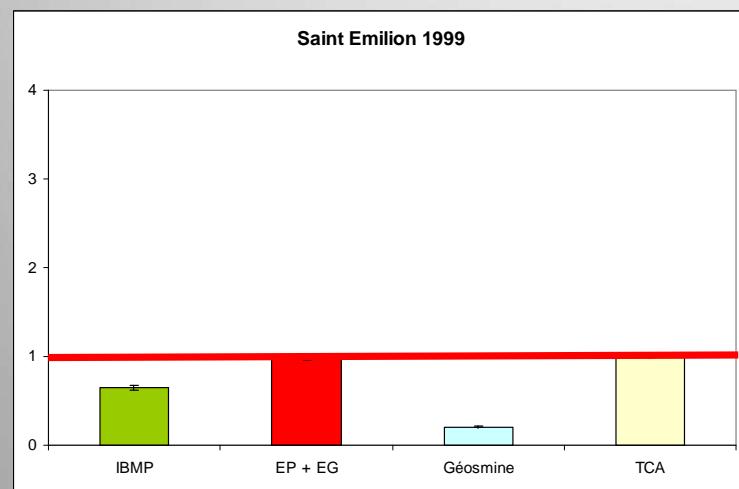
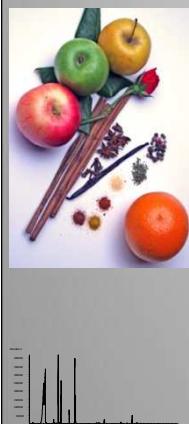


Application : "multi-défaux"



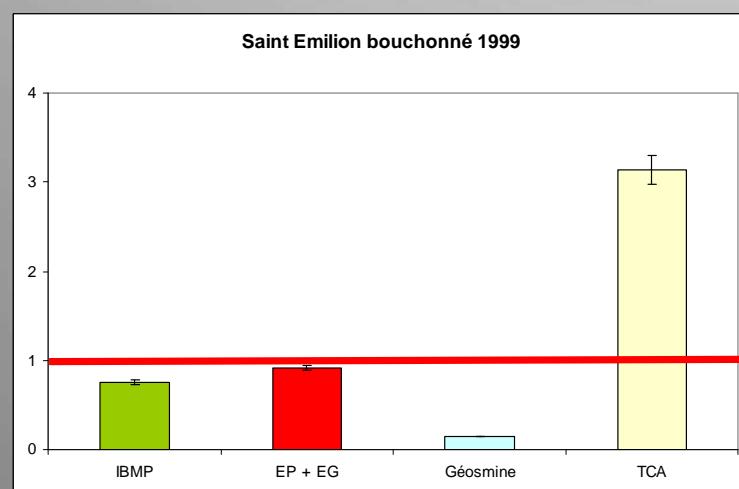
Relation entre l'analyse et les commentaires de dégustation :

Comparaison de deux bouteilles d'un même vin de 1999



Dégustation à la Faculté d'œnologie:
6 dégustateurs experts

Peu expressif au nez,
fruits mûrs, retour café,
épices, boisé

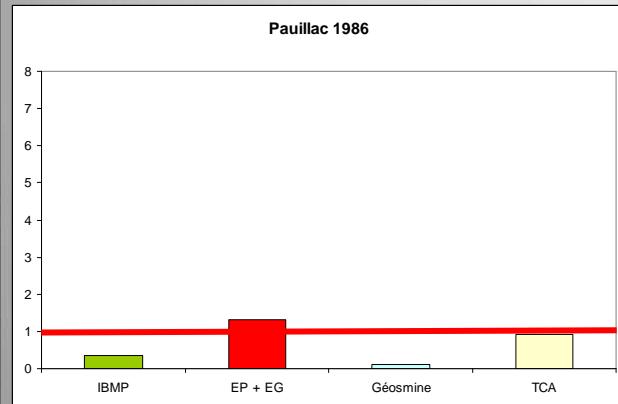


Bouchonné !

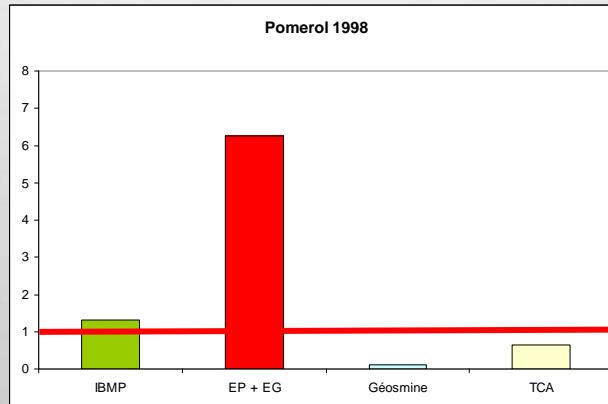


Application : "multi-défaux"

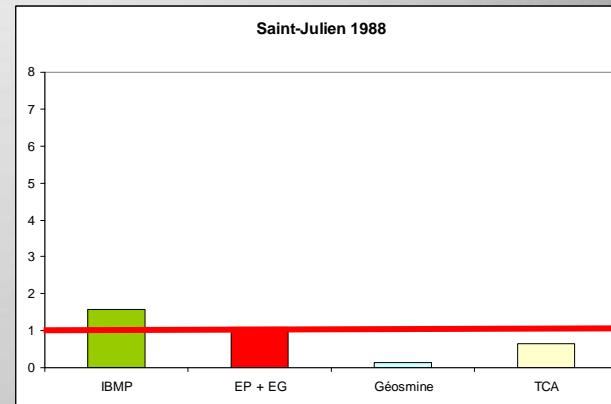
Quantification et caractères organoleptiques :
« indicateurs de la qualité »



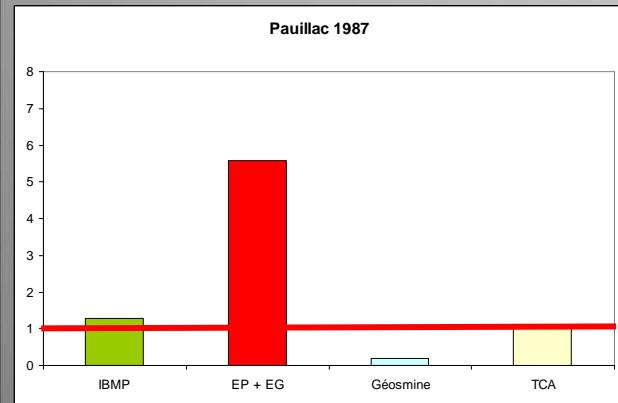
Poivron (1/6), Phénolé (1/6),
Liégeux



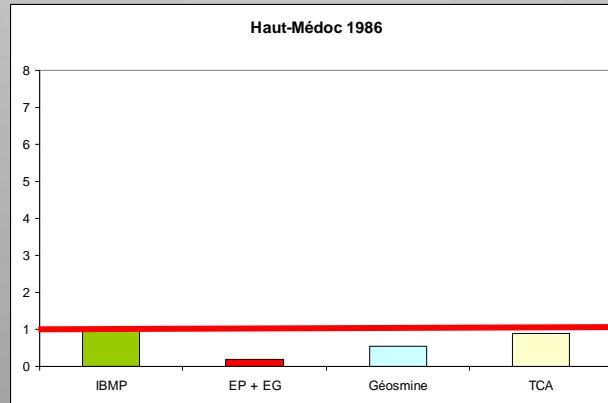
Végétal, pyrazine, phénolé



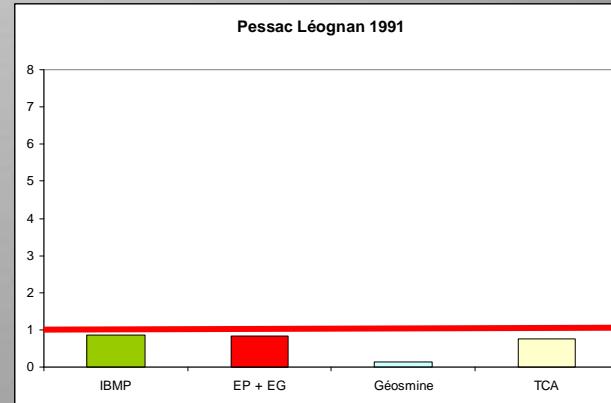
Floral, fruits rouges, épice
Végétal en bouche



Poussiéreux, pas net



Végétal, pas net, poussiéreux



Bouchonné 1/6
Torréfaction, empyreumatique

Application : "multi-défaits"

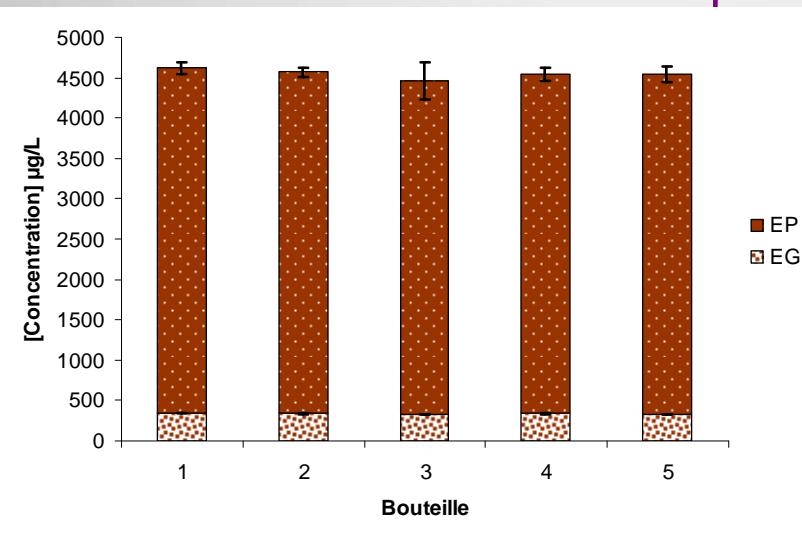
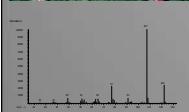
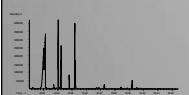


Analyse multi-résidus de vins de différents pays

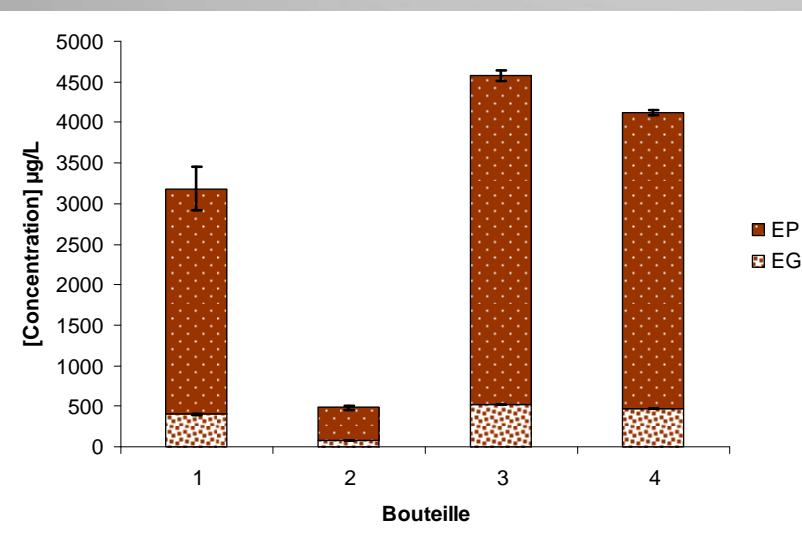
Vin	Pays	Couleur	Millésime	EP ($\mu\text{g/L}$)	EG ($\mu\text{g/L}$)	TCA (ng/L)	TeCA (ng/L)	TBA (ng/L)	PCA (ng/L)	Géo (ng/L)	IBMP (ng/L)
1	Australie	rouge	1992	859 \pm 1	52 \pm 0	4.7 \pm 0.2	4.3 \pm 1.1	1.9 \pm 0.1	5.6 \pm 1.2	< LOQ	< LOQ
2	Australie	rouge	1997	294 \pm 3	44 \pm 0	6.2 \pm 0.6	1.0 \pm 0.0	< LOQ	0.7 \pm 0.0	< LOQ	< LOQ
3	Brésil	rouge	2005	383 \pm 10	42 \pm 1	3.5 \pm 0.5	1.6 \pm 0.3	< LOQ	1.4 \pm 0.2	< LOQ	4.0 \pm 0.8
5	Chili	rouge	2003	18 \pm 6	1.2 \pm 0.3	3.7 \pm 0.2	4.7 \pm 0.7	< LOQ	2.7 \pm 0.3	< LOQ	16 \pm 1
6	France (Bordeaux)	rouge	1982	55 \pm 1	7.2 \pm 0.2	8.9 \pm 0.6	3.5 \pm 0.3	< LOQ	9.8 \pm 0.8	< LOQ	18 \pm 2
7	France (Bordeaux)	blanc	2001	< LOQ	< LOQ	3.5 \pm 0.1	1.3 \pm 0.1	< LOQ	2.6 \pm 0.2	17 \pm 1	< LOQ
9	France (Bourgogne)	rouge	1992	1028 \pm 38	237 \pm 3	1.2 \pm 0.1	1.0 \pm 0.1	< LOQ	4.2 \pm 0.3	13 \pm 1	9 \pm 0
11	France (Bourgogne)	rouge	2005	129 \pm 2	98 \pm 2	1.1 \pm 0.0	0.5 \pm 0.0	< LOQ	2.1 \pm 0.1	< LOQ	11 \pm 1
13	France (Madiran)	rouge	2000	21 \pm 1	2.8 \pm 0.1	0.9 \pm 0.1	3.7 \pm 0.2	< LOQ	9.9 \pm 0.3	< LOQ	< LOQ
14	France (Loire)	blanc	2003	< LOQ	< LOQ	0.8 \pm 0.1	< LOQ	< LOQ	0.9 \pm 0.1	< LOQ	5.9 \pm 1.0
16	France (Côtes du Rhône)	rouge	2001	499 \pm 16	127 \pm 1	1.2 \pm 0.2	0.8 \pm 0.0	< LOQ	1.6 \pm 0.0	< LOQ	< LOQ
17	France (Côtes du Rhône)	blanc	2001	7.5 \pm 1.6	12 \pm 0	0.8 \pm 0.1	0.5 \pm 0.0	< LOQ	1.4 \pm 0.1	< LOQ	6.9 \pm 0.6
18	Georgie	rouge	2004	2.1 \pm 0.6	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0.7 \pm 0.1	< LOQ	< LOQ
19	Grèce	rouge	2004	112 \pm 1	27 \pm 1	1.8 \pm 0.1	< LOQ	< LOQ	1.1 \pm 0.5	< LOQ	6.8 \pm 1.1
22	Italie	rouge	2006	872 \pm 8	160 \pm 3	1.0 \pm 0.2	0.9 \pm 0.2	< LOQ	1.7 \pm 0.2	< LOD	4.4 \pm 0.8
23	Italie	blanc	2007	1.7 \pm 0.3	< LOQ	0.7 \pm 0.2	0.6 \pm 0.1	< LOQ	1.4 \pm 0.1	< LOD	< LOQ
25	Japon	rouge	2006	1.9 \pm 1.1	< LOQ	2.4 \pm 0.7	0.6 \pm 0.2	< LOQ	1.3 \pm 0.1	< LOQ	< LOQ
26	Afrique du Sud	rouge	2003	814 \pm 36	171 \pm 3	0.7 \pm 0.0	0.4 \pm 0.0	< LOQ	1.3 \pm 0.1	< LOQ	4.7 \pm 0.3
27	Afrique du Sud	rouge	2005	4.3 \pm 0.2	0.9 \pm 0.1	1.1 \pm 0.0	0.5 \pm 0.0	< LOQ	1.1 \pm 0.1	< LOQ	8.3 \pm 0.6
29	Espagne	rouge	2001	4.2 \pm 0.5	2.3 \pm 0.0	13.3 \pm 0.2	0.8 \pm 0.1	< LOQ	2.0 \pm 0.2	< LOQ	< LOQ
30	Espagne	rouge	2002	45 \pm 4	6.6 \pm 0.1	3.0 \pm 0.1	< LOQ	< LOQ	0.9 \pm 0.1	< LOQ	14 \pm 2
31	USA (Californie)	rouge	1985	57 \pm 1	6.1 \pm 0.0	2.1 \pm 0.7	20 \pm 1	2.3 \pm 0.2	7.6 \pm 0.3	< LOQ	10.7 \pm 0.4
32	USA (Californie)	rouge	1987	306 \pm 4	56 \pm 0	3.7 \pm 0.0	4.0 \pm 0.2	1.1 \pm 0.1	3.2 \pm 0.2	< LOQ	3.9 \pm 0.3

Application : Phénols volatils

Analyse des phénols volatils dans plusieurs bouteilles
d'un même vin contaminé par *Brettanomyces bruxellensis*



Contamination en cuve



Contamination en bouteille

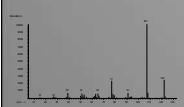
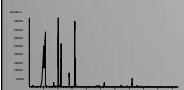
Application : multi-résidus de pesticides



- Environ 100 matières actives utilisées recensées en Gironde
- Environ 80 matières actives ont été testées
 - sensibilité
 - résolution
 - linéarité
- **37 matières actives validées**



Application : multi-résidus de pesticides



Matière active	Type
Benalaxyl	Fongicide
Boscalid	Fongicide
Chlorpyriphos	Insecticide
Cyproconazole	Fongicide
Cyprodinil	Fongicide
Fenbuconazole	Fongicide
Fenitrothion	Insecticide
Flusilazole	Fongicide
Iprodione	Fongicide
Mepanipyrim	Fongicide
Metalaxyl	Fongicide
Metrafenone	Fongicide
Penconazole	Fongicide
Procymidone	Fongicide
Pyrimethanil	Fongicide
Tebuconazole	Fongicide
Tebufenpyrad	Acaricide
Vinclozoline	Fongicide

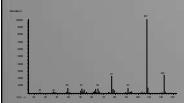
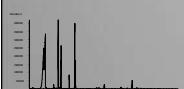
Matière active	Type
Chlorpyriphos-Me	Insecticide
Diethofencarbe	Fongicide
Difenoconazole	Fongicide
Fenarimol	Fongicide
Fenazaquin	Insecticide
Fluazinam	Fongicide
Fludioxonil	Fongicide
Flufenoxuron	Insecticide
Fluopicolide	Fongicide
Hexaconazole	Fongicide
Kresoxim-méthyl	Fongicide
Myclobutanil	Fongicide
Propargite	Acaricide
Propyzamide	Herbicide
Pyridabene	Insecticide
Quinoxifen	Fongicide
Spiroxamine	Fongicide
Tetraconazole	Fongicide
Trifloxystrobine	Fongicide

Application : multi-résidus de pesticides



Limites analytiques

Pour l'ensemble des composés, la limite de détection est inférieure à 10 µg/L



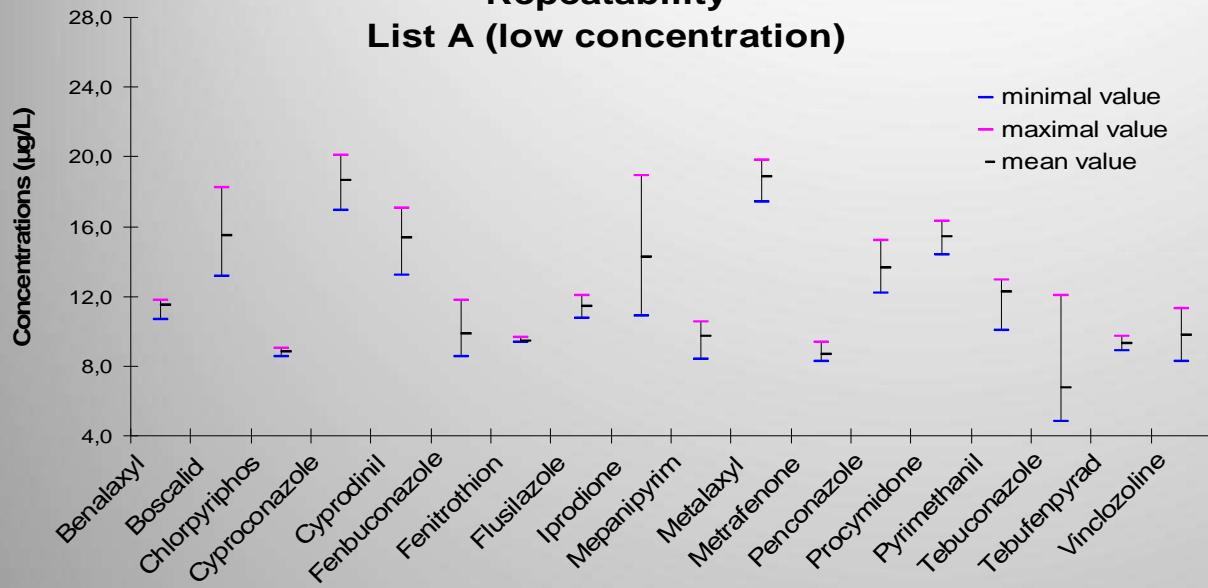
Active compounds (List A)	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)
Benalaxyl	0,8	2,5
Boscalid	1,2	4,0
Chlorpyriphos	0,2	0,5
Cyproconazole	2,0	6,0
Cyprodinil	0,2	0,5
Fenbuconazole	3	10
Fenitrothion	0,2	0,5
Flusilazole	0,3	1,0
Iprodione	5,0	18
Mepanipyrim	2,5	8,3
Metalaxyl	1,5	5,0
Metrafenone	1,5	5,0
Penconazole	0,2	0,6
Procymidone	0,2	0,6
Pyrimethanil	0,2	0,5
Tebuconazole	3	10
Tebufenpyrad	0,6	2,0
Vinclozoline	0,2	0,5

Active compounds (List B)	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)
Chlorpyriphos-Me	0,2	0,5
Diethofencarb	0,75	2,5
Difenoconazole	1,0	3,5
Fenarimol	0,6	2,0
Fenazaquin	0,2	0,5
Fluazinam	0,75	2,5
Fludioxonil	4,5	15,0
Flufenoxuron	0,9	3,0
Fluopicolide	0,6	2,0
Hexaconazole	0,6	2,0
Kresoxim-Me	0,2	0,5
Myclobutanil	1,8	6,0
Propargite	0,2	0,7
Propyzamide	0,3	1,0
Pyridaben	0,3	1,0
Quinoxifen	0,2	0,5
Spiroxamine	0,2	0,6
Tetraconazole	0,1	0,4
Trifloxystrobin	0,2	0,7

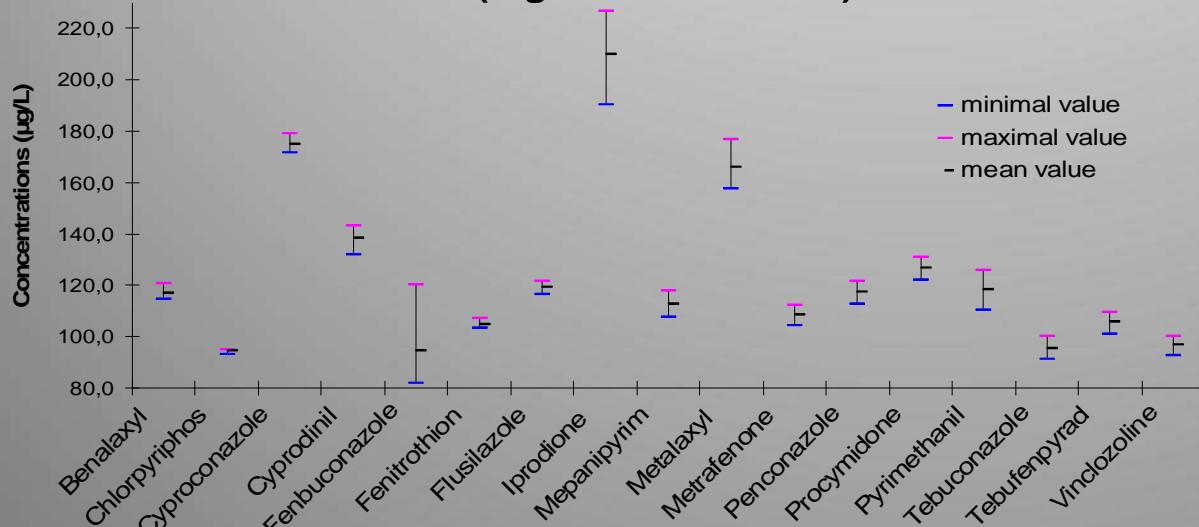
Application : multi-résidus de pesticides



Repeatability
List A (low concentration)



Repeatability
List A (high concentration)

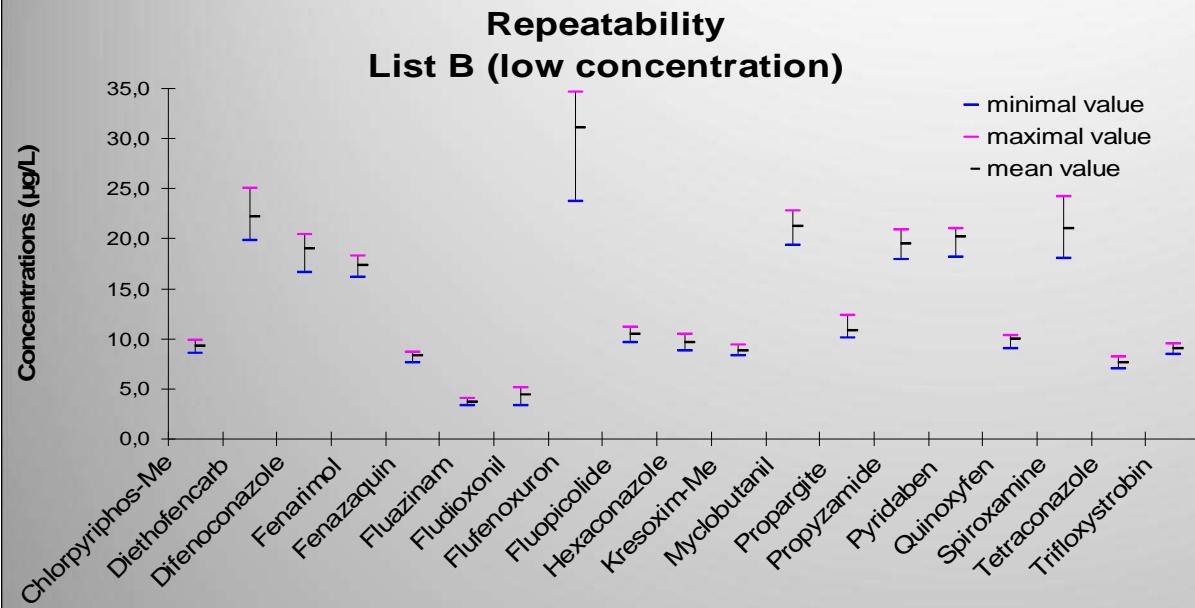


Vin rouge,
2 concentrations,
10 échantillons,
10 twisters différents

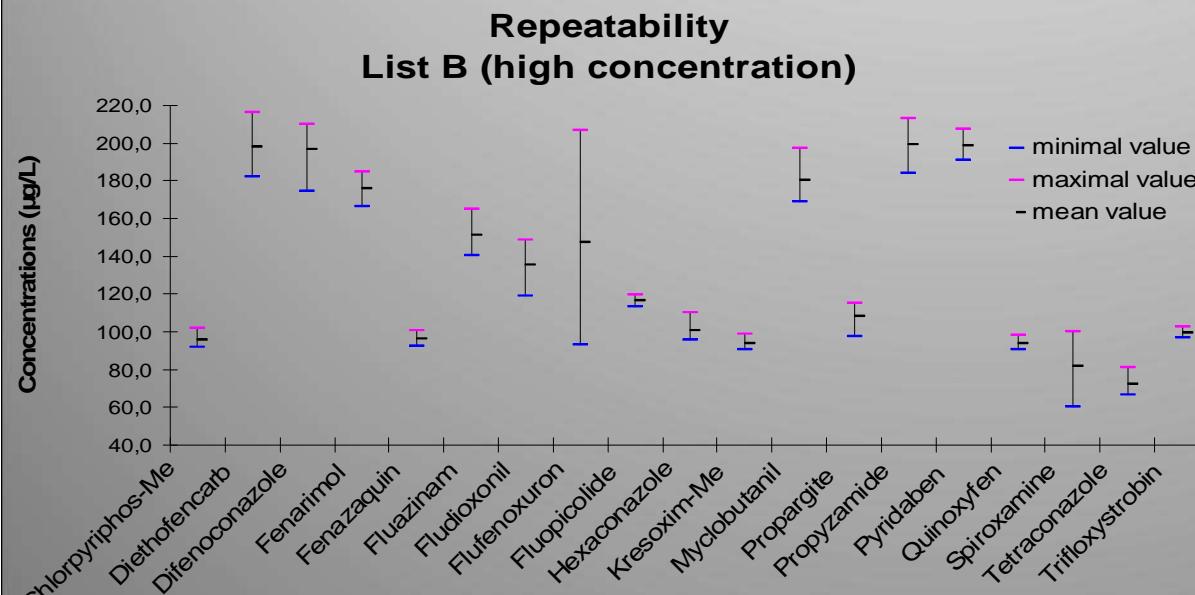
Les résultats sont plus fidèles quand les étalons internes deutérés correspondants sont utilisés (chlorpyriphos, fenitrothion).

Certains composés montrent des performances plus faibles : fenbuconazole et iprodione.

Application : multi-résidus de pesticides



Vin rouge,
2 concentrations,
10 échantillons,
10 twisters différents



Certains composés montrent des performances plus faibles : flufenoxuron et spiroxamine.

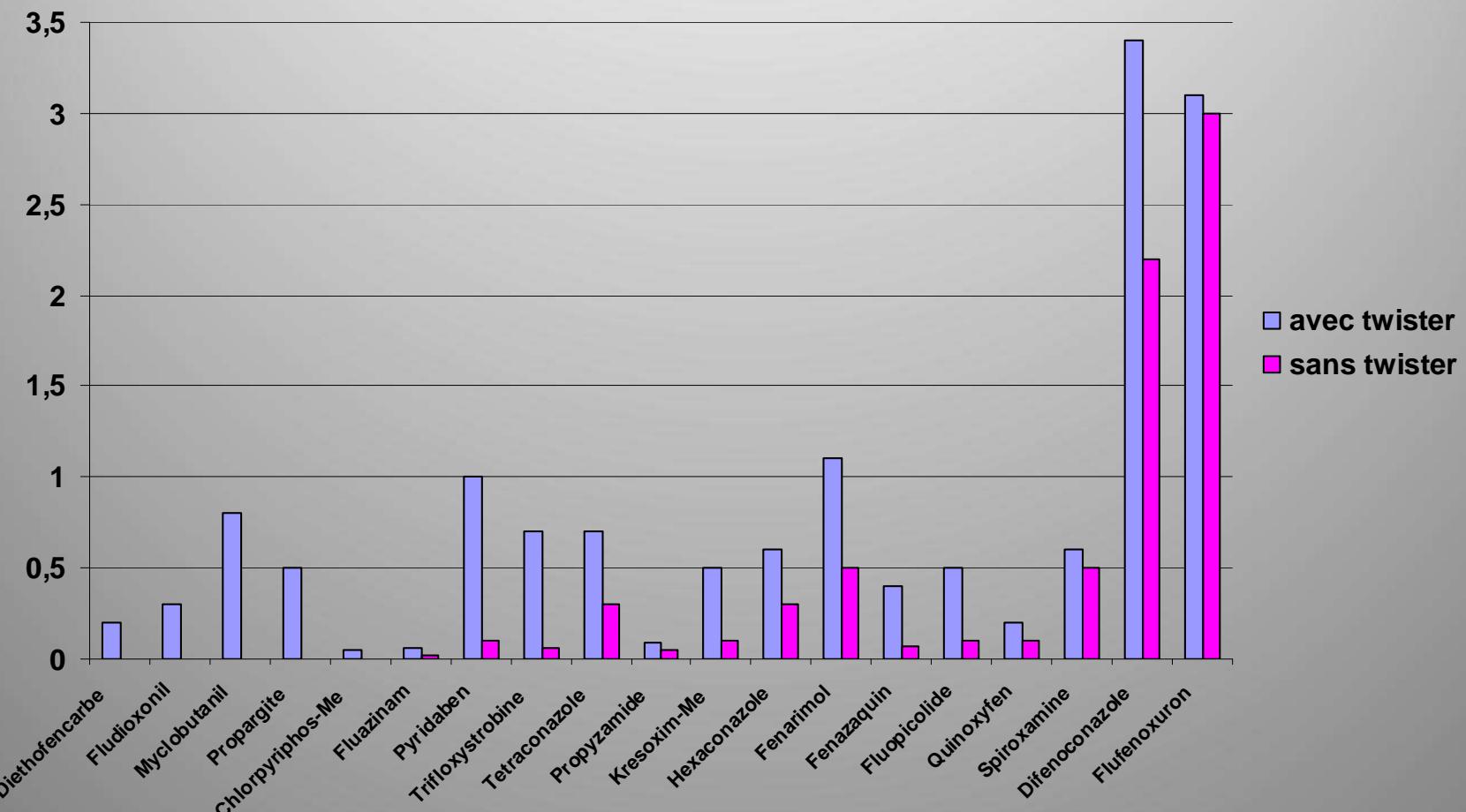
Application : multi-résidus de pesticides

Effet mémoire du système analytique

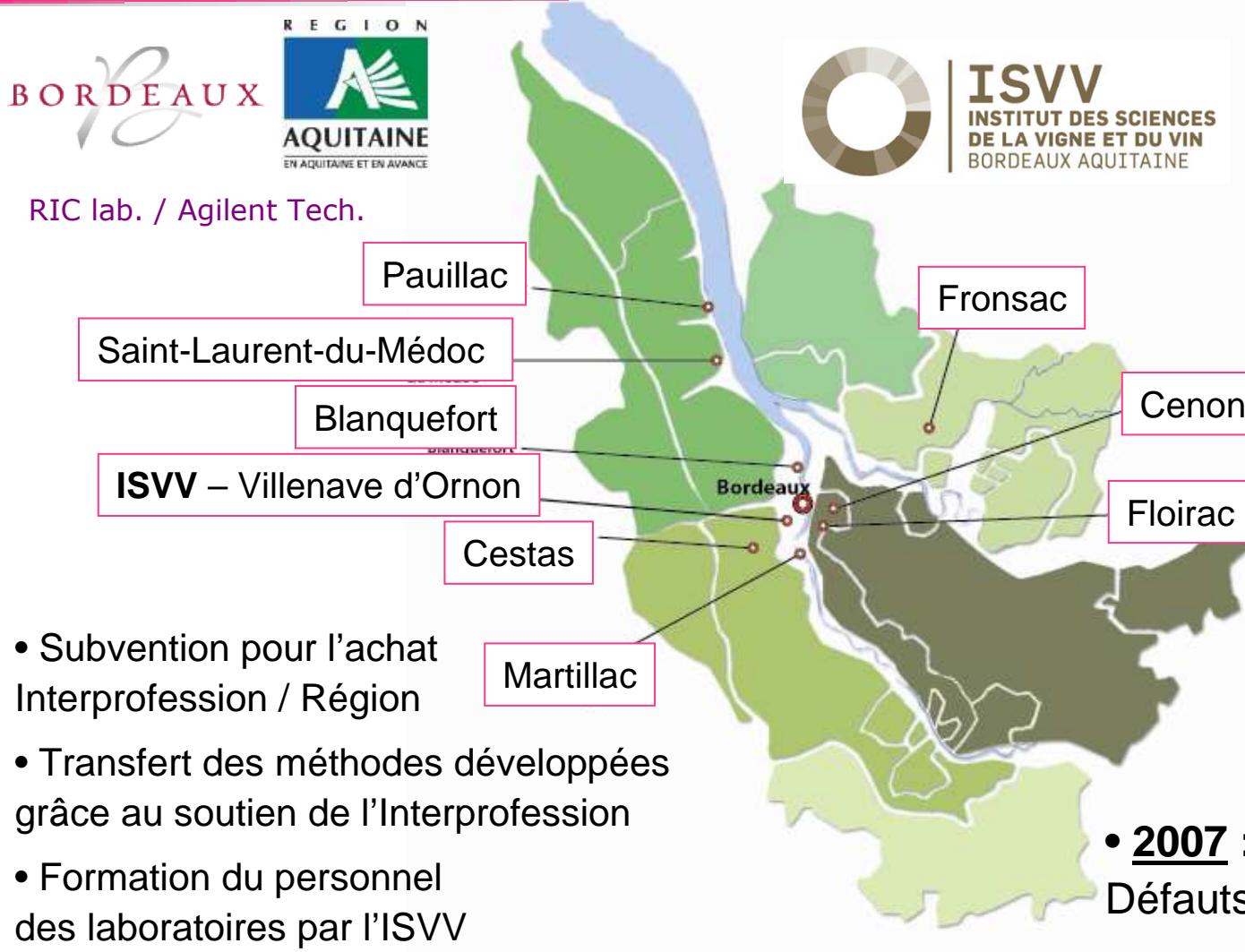


Pollution éventuelle lors de l'injection d'un échantillon fortement chargé (100-200 µg/L)

Quantité résiduelle (%) de matière active lors d'une seconde injection avec ou sans le même twister



Transfert des méthodes Twister-CPG-SM à 8 laboratoires girondins



Application : Essai interlaboratoire Twister-CPG-SM "multi-défaits"



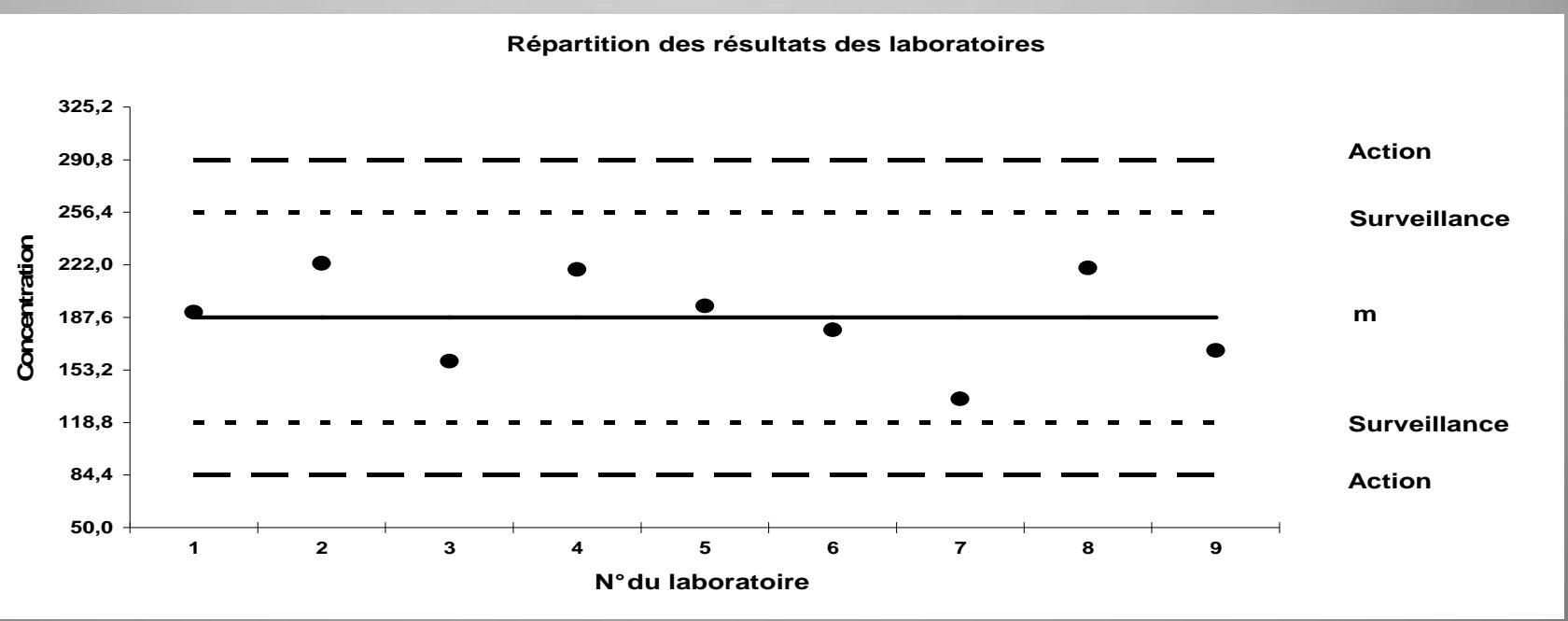
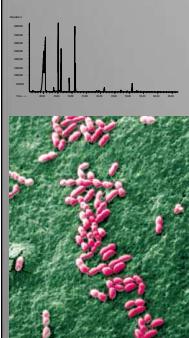
2009 : Essai inter-laboratoires girondins, 8 composés – 9 laboratoires

↳ Assurer la confiance dans le résultat de l'analyse



Phénols volatils :

nombre de laboratoires retenus :	9
valeur assignée m :	187,6
écart-type s^* :	34,4
limites de surveillance :	118,8 ; 256,4
limites d'action :	84,4 , 290,8



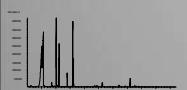
Intérêt professionnel du développement de l'analyse par Twister-GC-MS



Transférer les connaissances de la recherche aux laboratoires de terrain (méthodes – formations)



- ↳ Diminuer les délais
- ↳ Diminuer le coût des analyses
- ↳ Multiplier les analyses



Améliorer le suivi tout au long de l'élaboration du vin



- ↳ Diagnostiquer le(s) défaut(s) dans les vins, améliorer la qualité sensorielle et hygiénique des vins
- ↳ Estimer le risque de « rejet du consommateur »



Perspectives en œnologie de l'analyse par Twister-GC-MS



↳ Recherche



Nouveaux marqueurs aromatiques.

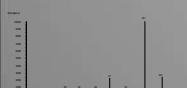


Etude du métabolome.

- implication des microorganismes
- étude des souches, des paramètres œnologiques



↳ Développement



Analyse de l'ambiance des chais

