



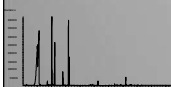
**ISVV**  
INSTITUT DES SCIENCES  
DE LA VIGNE ET DU VIN  
BORDEAUX AQUITAINE



Equipe de chimie analytique, UMR œnologie



UNIVERSITÉ DE  
BORDEAUX



## 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

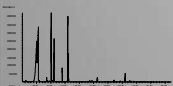
Eau : ~ 85 %

Ethanol : 12 – 15 %

De nombreuses molécules  
organiques, inorganiques

Macromolécules

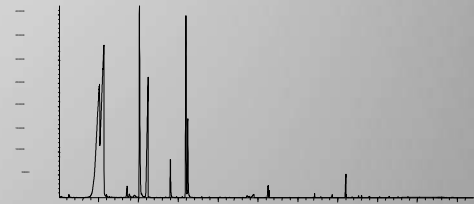
Extrait sec



# L'analyse dans le domaine du vin

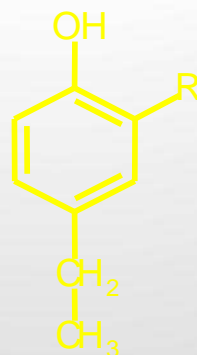
La recherche avance et apporte des réponses, l'œnologie en profite

- 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...

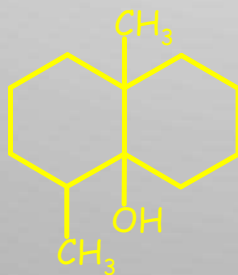


# Défauts des vins :

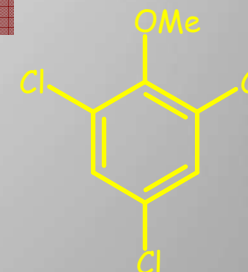
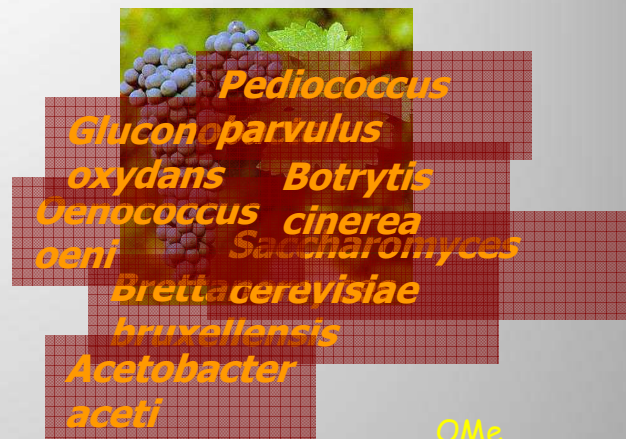
phénolés



végétaux



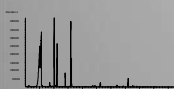
moisiss



bouchonnés...

marqueurs moléculaires / référentiel

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



# Problématique de l'analyse dans le vin

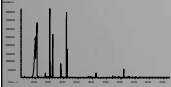
- Étape 1 → **EXTRACTION** obligatoire des composés d'intérêt
  - extraction liquide-liquide  $\Rightarrow$  utilisation de solvants organiques

$\Rightarrow$  impact environnemental et coût

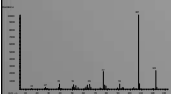


- Étape 2 → **CONCENTRATION** nécessaire

- Étape 3 → **ANALYSE** (souvent spécifique d'une classe chimique de molécules)



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



→ Multiplication des étapes de manipulation des échantillons

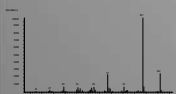
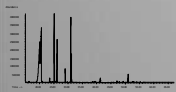
$\rightarrow$  Risques d'erreur et de pertes



# 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  $\mu\text{L}$  de polymère  
➔ + grande quantité de composés extraits  
⇒ meilleure **sensibilité**



# La microextraction:

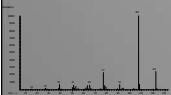
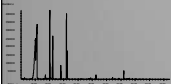
## Nouvelles Techniques : SPME/SBSE

- **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*



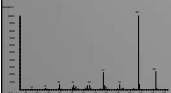
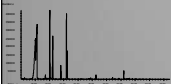
**Exactitude de la méthode :**

**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

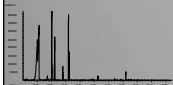
→ sur vin

→ sur bouchons



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

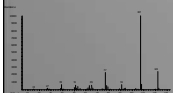
→ sur vin



- 2007 : Pyrazines : IBMP, IPMP

→ sur vin

→ sur moût



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

→ sur vin

→ 32 molécules





# Application : esters du vin

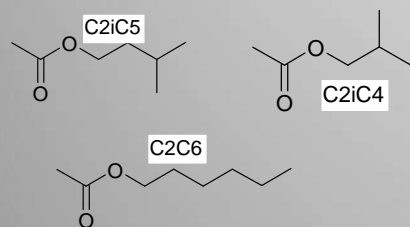


## Esters : rôle central dans l'arôme fruité des vins rouges

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

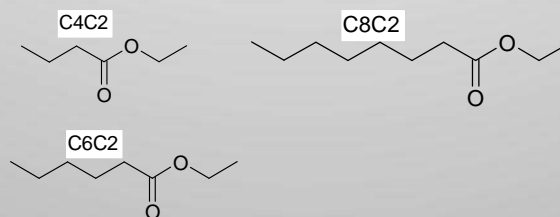


### Acétates d'alcools supérieurs (AAS)



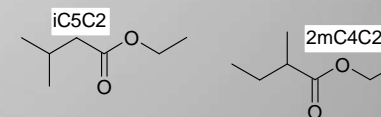
Notes fruités fermentaires

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



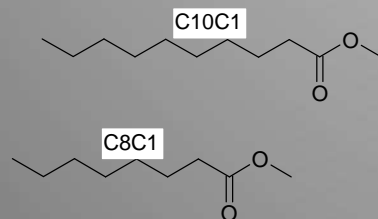
En mélange : note fruits rouges

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

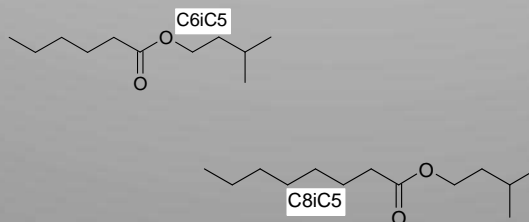


En mélange : note fruits noirs

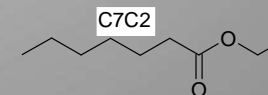
### Esters méthyliques



### 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)



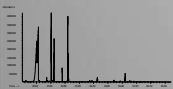
- Facilité d'utilisation pour un suivi FML (FA)
- Optimisation :
  - ✓ Choix de la fibre (PDMS), exclusion des esters polaires (dosés par extraction liq/liq-GC-MS)
  - ✓ EI : 4 esters deutérés  
(C4C2-d5, C6C2-d5, C8C2-d5, CinamateC2-d5)

# 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

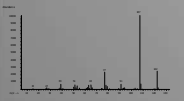
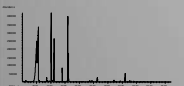
### A partir d'un moût :

- 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



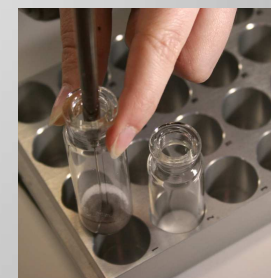
2. Ajout de  
l'étalon interne  
(IBMP-d<sub>3</sub>)



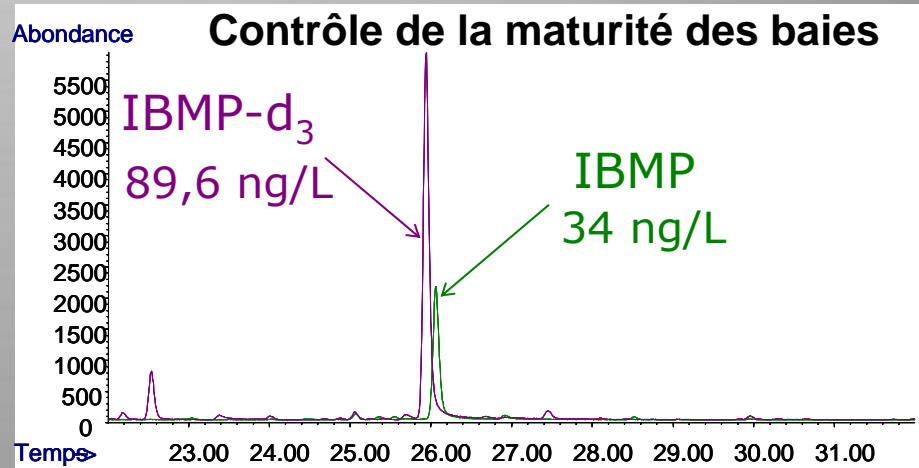
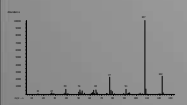
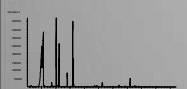
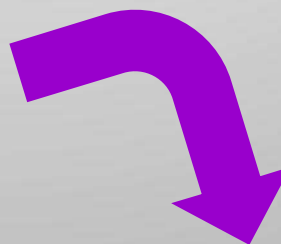
3. Ajustement  
à pH 7



4. Préparation du vial  
avec 3 g de NaCl

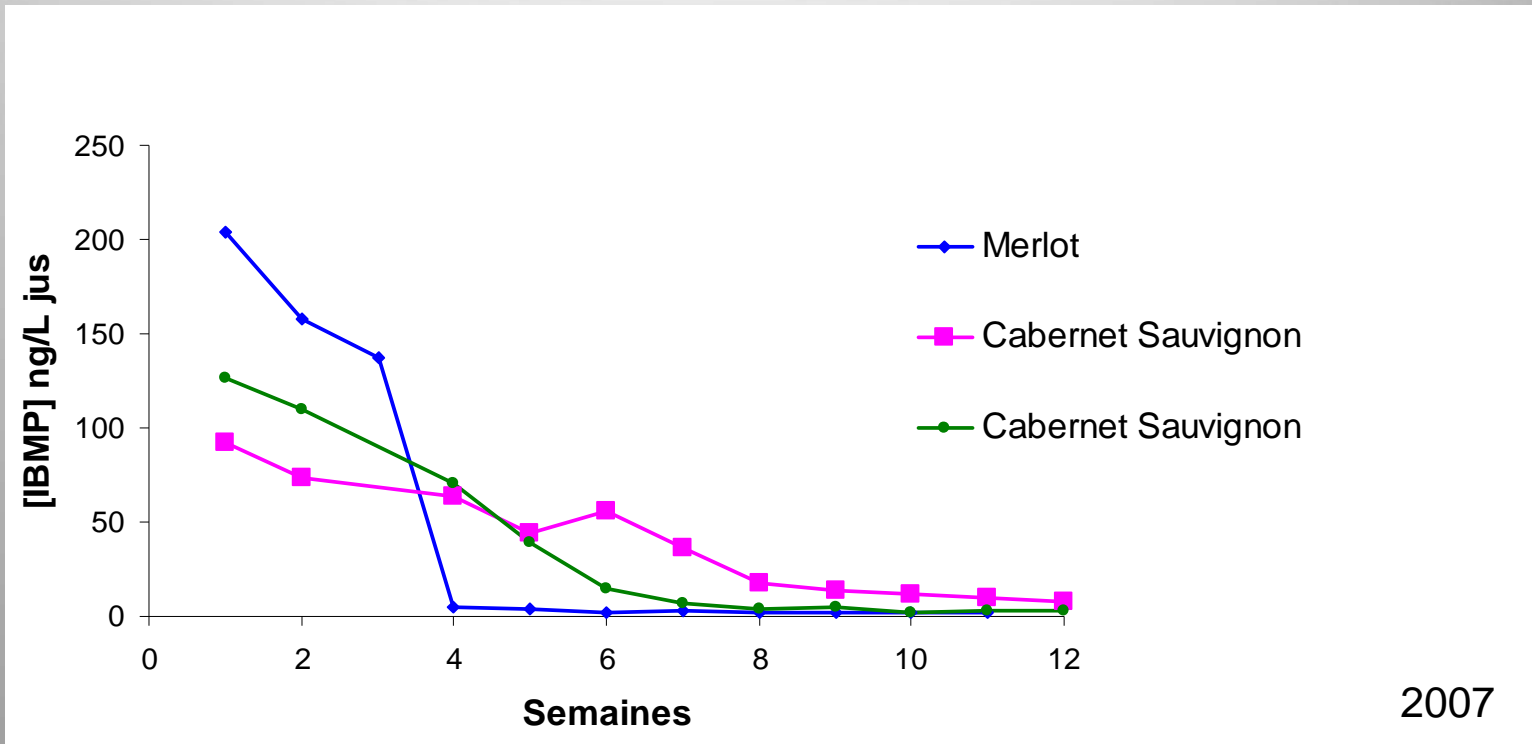
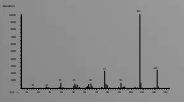
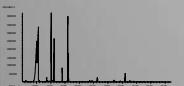


Analyse par  
HS-SPME-GC-MS



# IBMP : Application

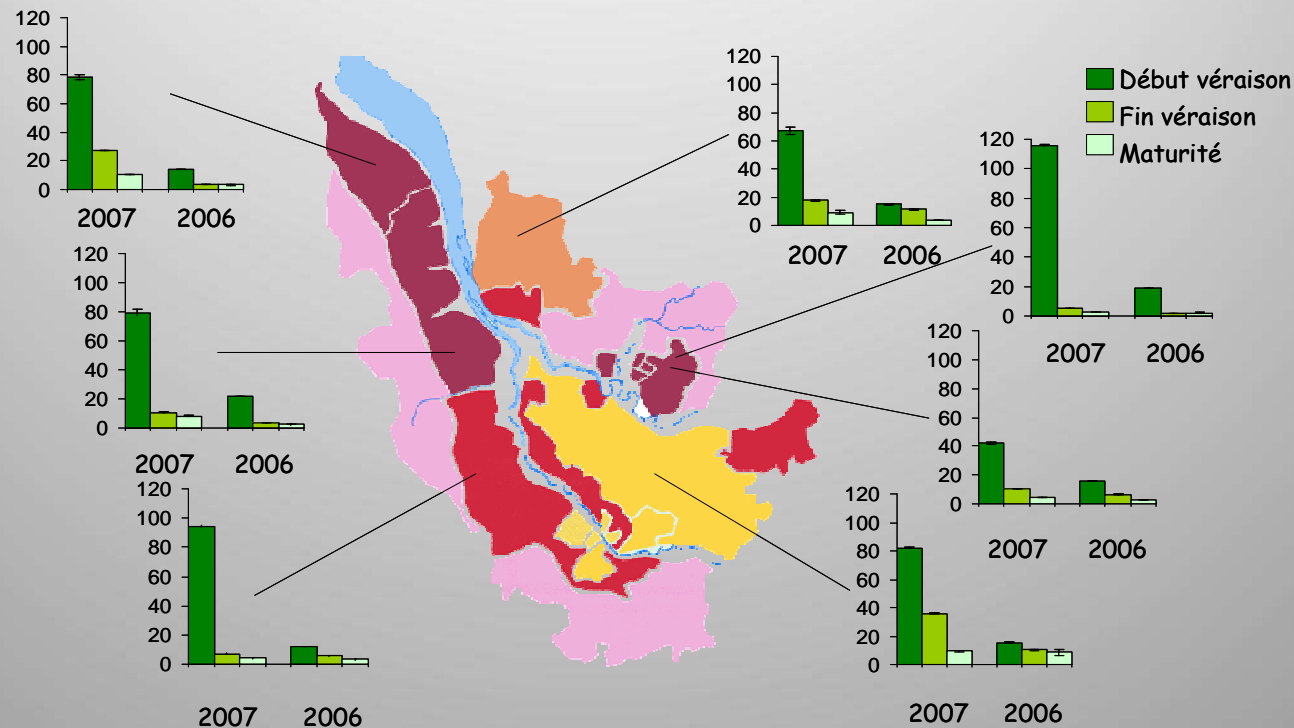
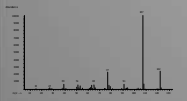
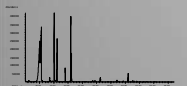
- Suivi de la maturation des baies de raisin



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-norisoprénoïdes et lactones

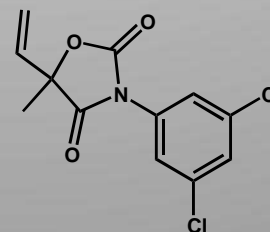
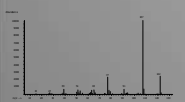


- 2007 : Défauts olfactifs du vin

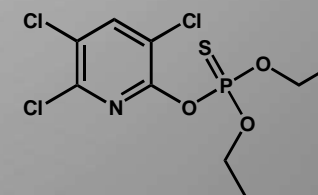
IBMP, EP, EG, TCA, TeCA, PCA, TBA, Géosmine



- 2010 : Résidus de pesticides



Vinclozoline



Chlorpyrifos

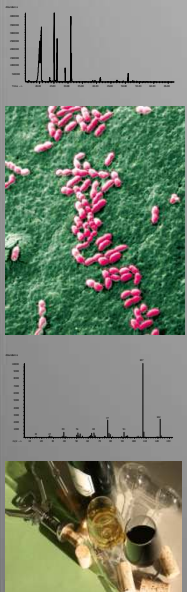


# Analyse multi-résidus dans le vin



## 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

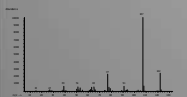
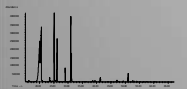




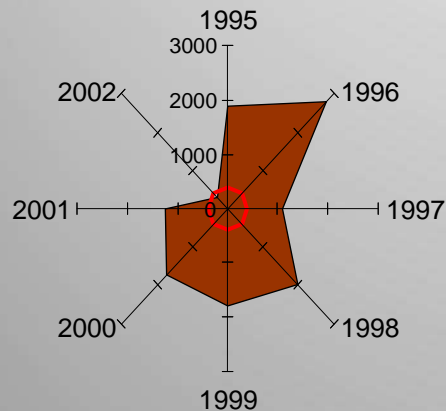
# Application : "multi-défauts"



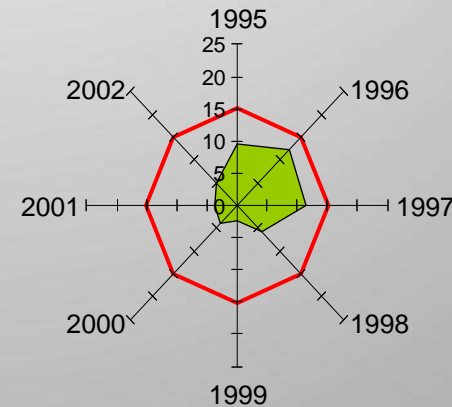
Comparaison en relation avec la valeur du seuil de perception olfactif de la concentration des principales molécules responsables de défauts pour huit millésimes d'un vin de Bordeaux



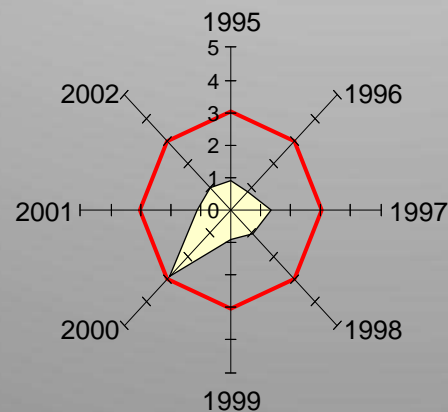
## Phénols volatils



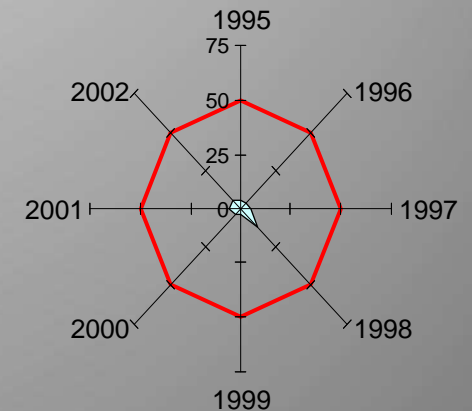
## IBMP



## TCA



## Géosmine



# Application : "multi-défauts"

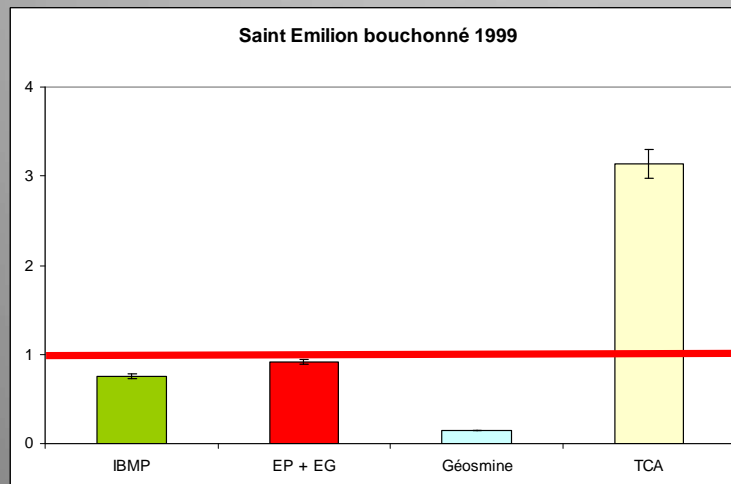
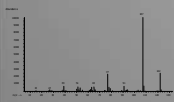
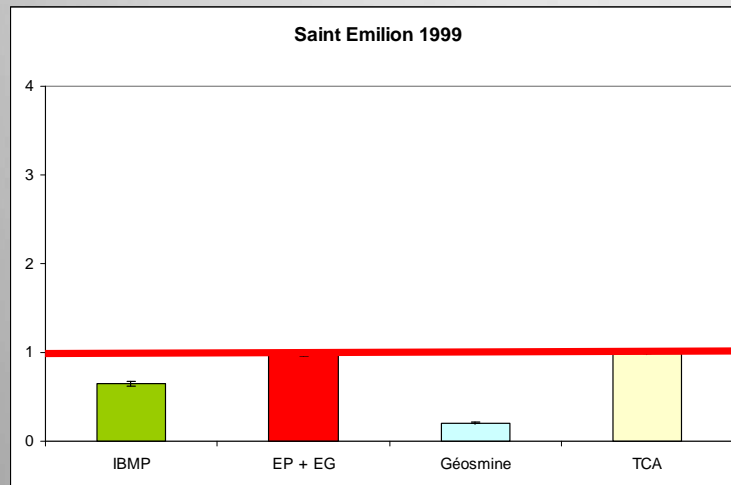
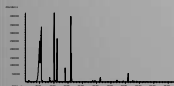


Relation entre l'analyse et les commentaires de dégustation :

Comparaison de deux bouteilles d'un même vin de 1999

Dégustation à la Faculté d'œnologie:  
6 dégustateurs experts

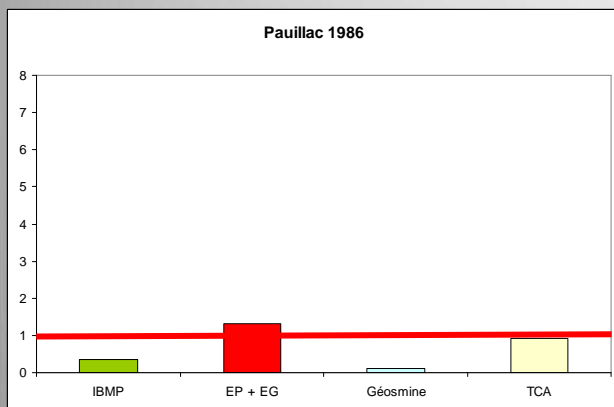
Peu expressif au nez,  
fruits mûrs, retour café,  
épices, boisé



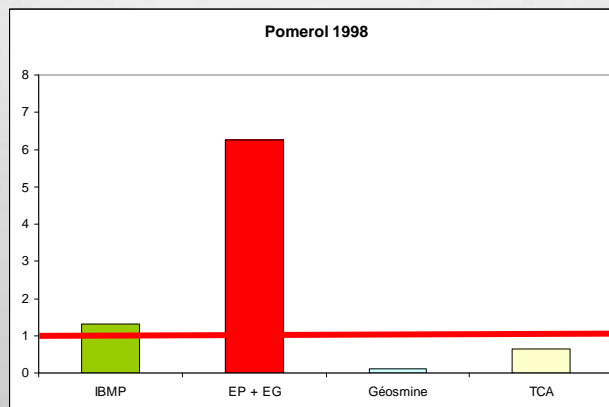
Bouchonné !

# Application : "multi-défauts"

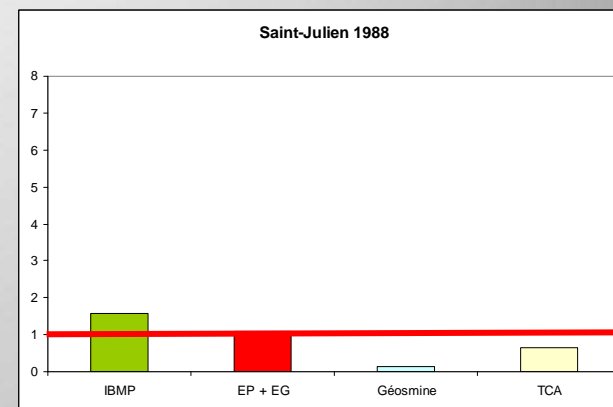
Quantification et caractères organoleptiques :  
« indicateurs de la qualité »



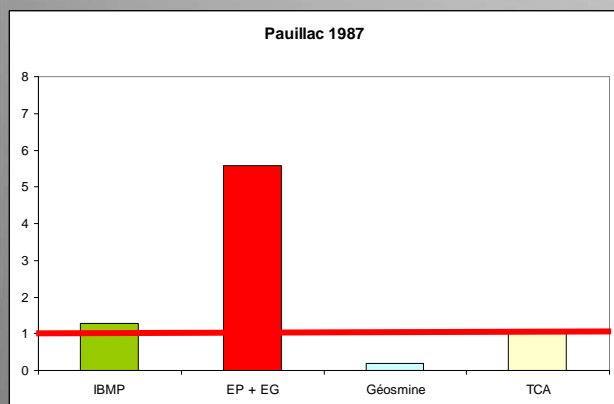
Poivron (1/6), Phénolé (1/6),  
Liégeux



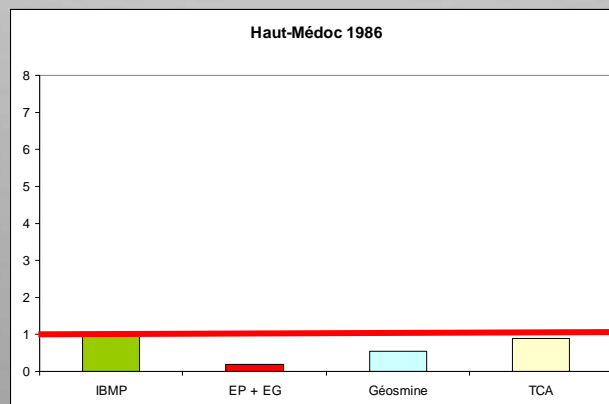
Végétal, pyrazine, phénolé



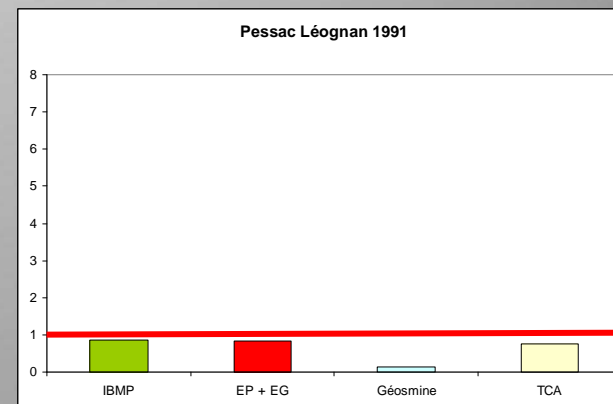
Floral, fruits rouges, épicé  
Végétal en bouche



Poussiéreux, pas net



Végétal, pas net, poussiéreux



Bouchonné 1/6  
Torréfaction, empyreumatique

# Application : "multi-défauts"

## Analyse multi-résidus de vins de différents pays

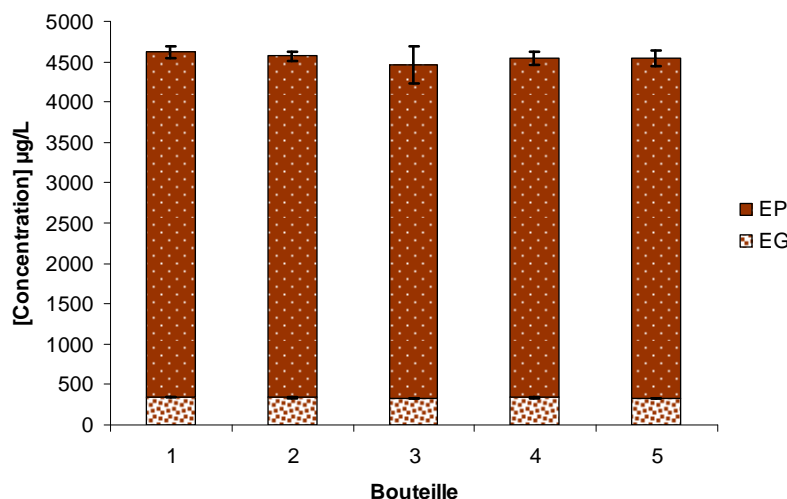
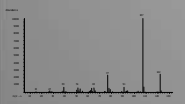
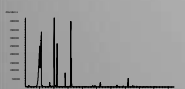


Vin	Pays	Couleur	Millésime	EP (µg/L)	EG (µg/L)	TCA (ng/L)	TeCA (ng/L)	TBA (ng/L)	PCA (ng/L)	Géo (ng/L)	IBMP (ng/L)
1	Australie	rouge	1992	859 ± 1	52 ± 0	4.7 ± 0.2	4.3 ± 1.1	1.9 ± 0.1	5.6 ± 1.2	< LOQ	< LOQ
2	Australie	rouge	1997	294 ± 3	44 ± 0	6.2 ± 0.6	1.0 ± 0.0	< LOQ	0.7 ± 0.0	< LOQ	< LOQ
3	Brésil	rouge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

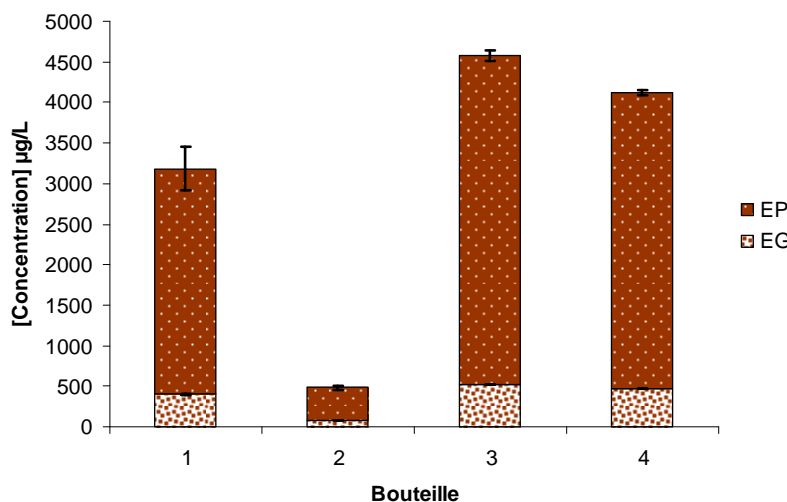
# Application : Phénols volatils

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

---

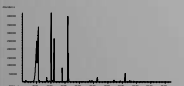


- Environ 100 matières actives utilisées recensées en Gironde



- Environ 80 matières actives ont été testées

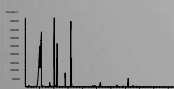
- sensibilité
- résolution
- linéarité



- **37 matières actives validées**



# Application : multi-résidus de pesticides



Matière active	Type
Benalaxyl	Fongicide
Boscalid	Fongicide
Chlorpyrifos	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

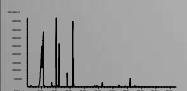
Matière active	Type
Chlorpyrifos-Me	Insecticide
Diethofencarbe	Fongicide
Difenoconazole	Fongicide
Fenarimol	Fongicide
Fenazaquin	Insecticide
Fluazinam	Fongicide
Fludioxonil	Fongicide
Flufenoxuron	Insecticide
Fluopicolide	Fongicide
Hexaconazole	Fongicide
Kresoxim-méthyl	Fongicide
Myclobutanil	Fongicide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

# Application : multi-résidus de pesticides



## Limites analytiques

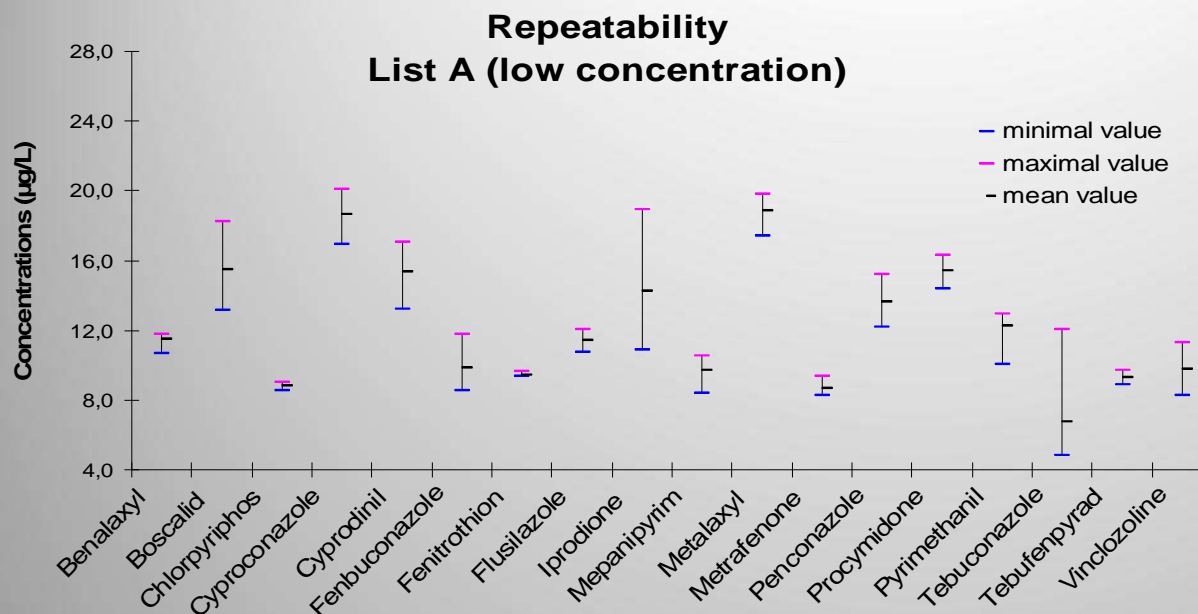
Pour l'ensemble des composés, la limite de détection est inférieure à 10 µg/L



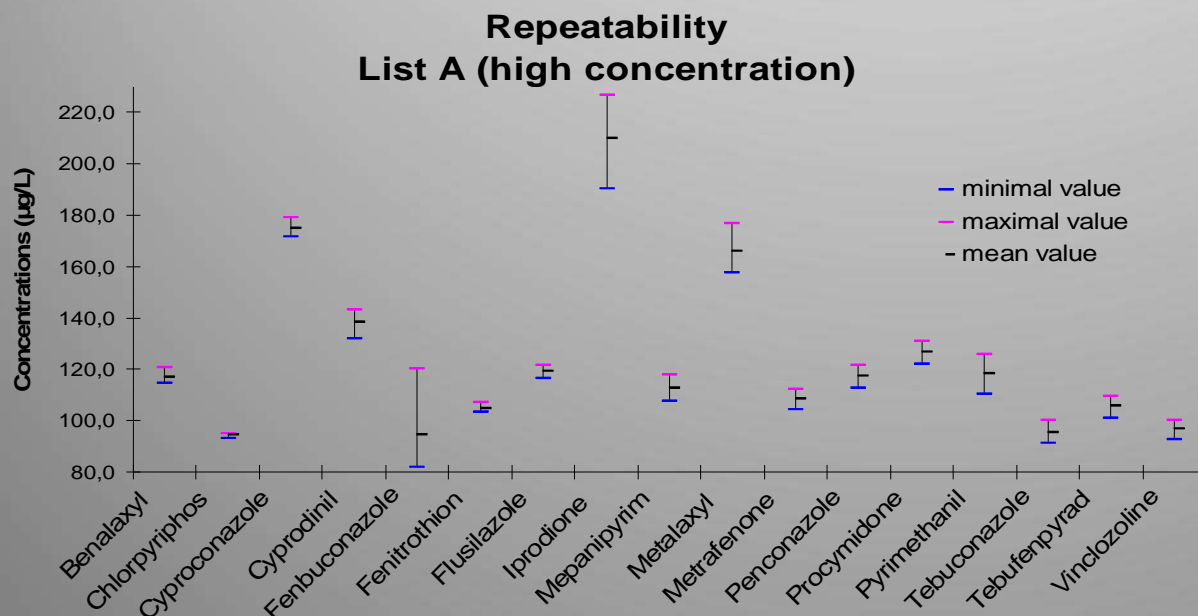
Active compounds (List A)	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)
Benalaxyl	0,8	2,5
Boscalid	1,2	4,0
Chlorpyrifos	0,2	0,5
Cyproconazole	2,0	6,0
Cyprodinil	0,2	0,5
Fenbuconazole	3	10
Fenitrothion	0,2	0,5
Flusilazole	0,3	1,0
Iprodione	5,0	18
Mepanipyrim	2,5	8,3
Metalaxyl	1,5	5,0
Metrafenone	1,5	5,0
Penconazole	0,2	0,6
Procymidone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



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



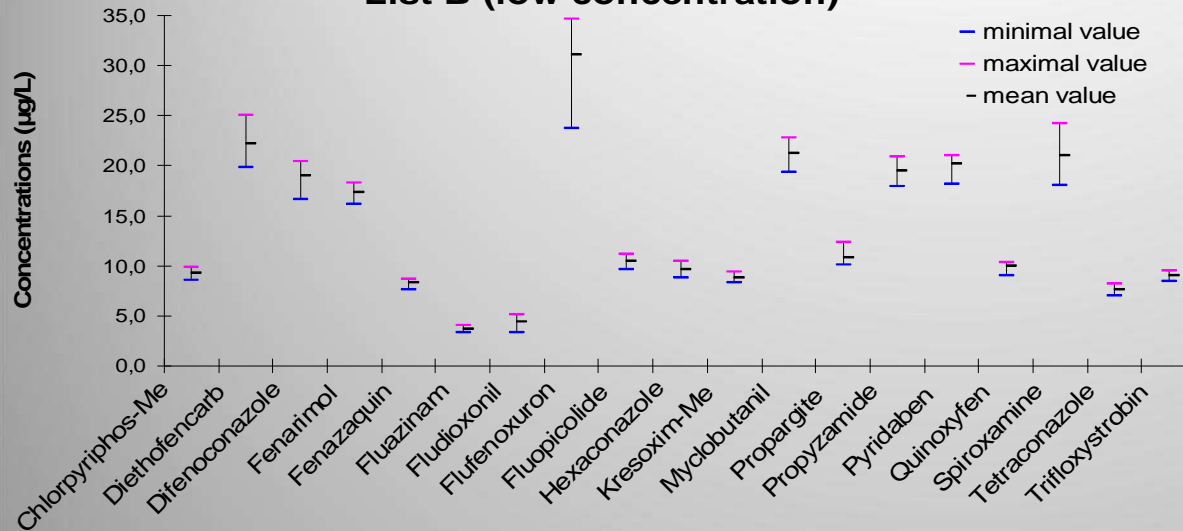
Les résultats sont plus fidèles quand les étalons internes deutérés correspondants sont utilisés (chlorpyrifos, fenitrothion).

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

# Application : multi-résidus de pesticides

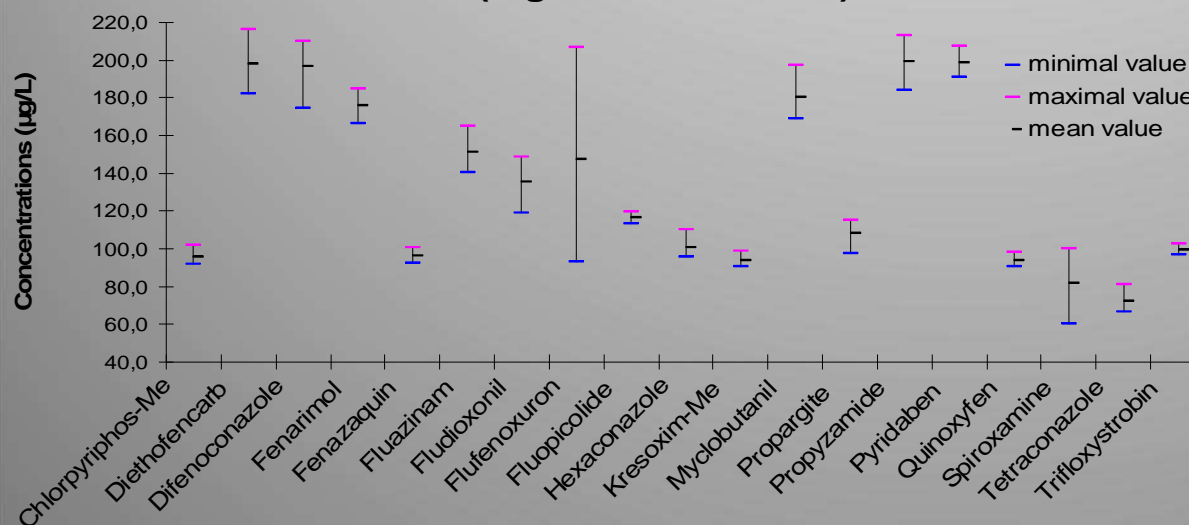


**Repeatability  
List B (low concentration)**



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

**Repeatability  
List B (high concentration)**



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



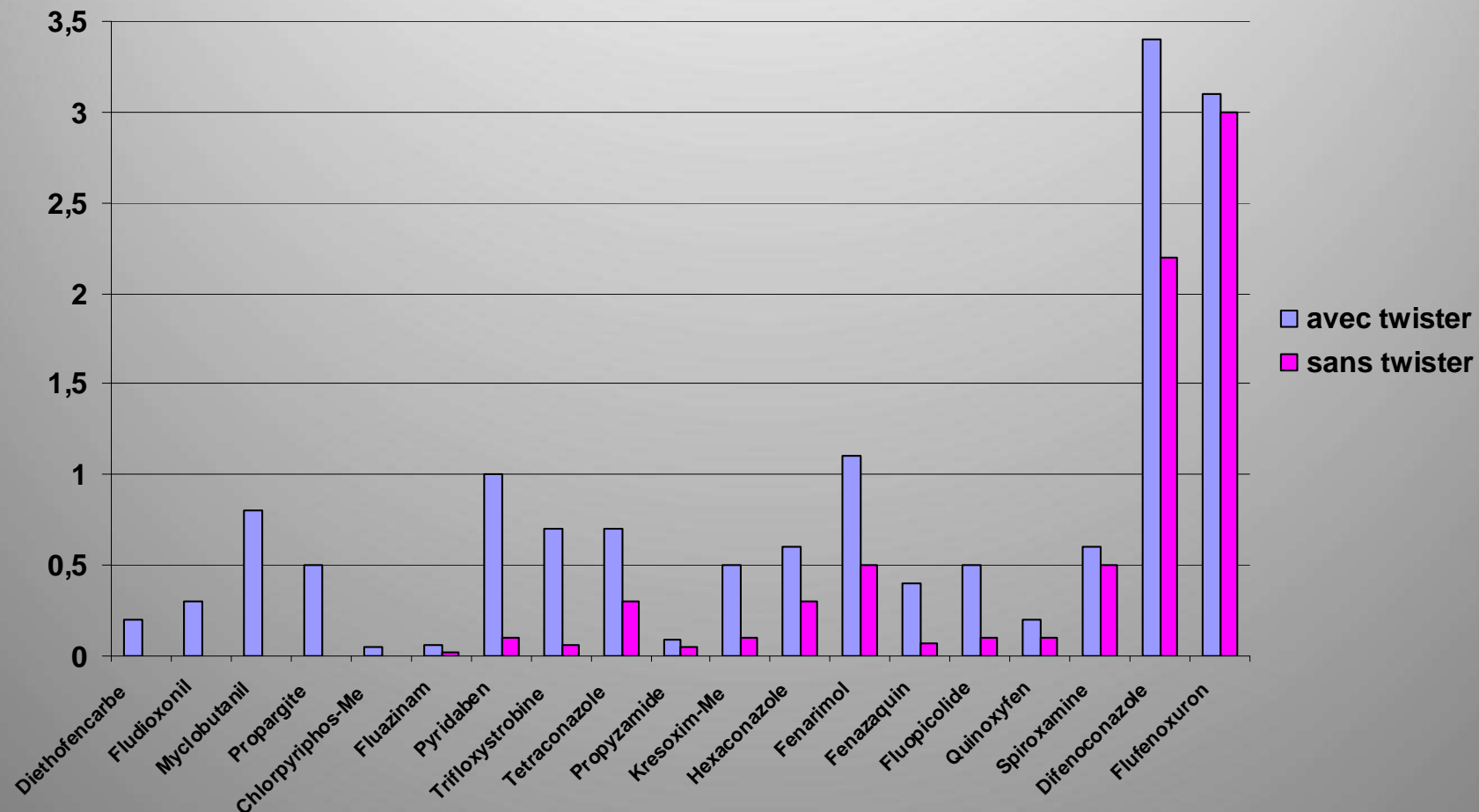
# Application : multi-résidus de pesticides

## Effet mémoire du système analytique

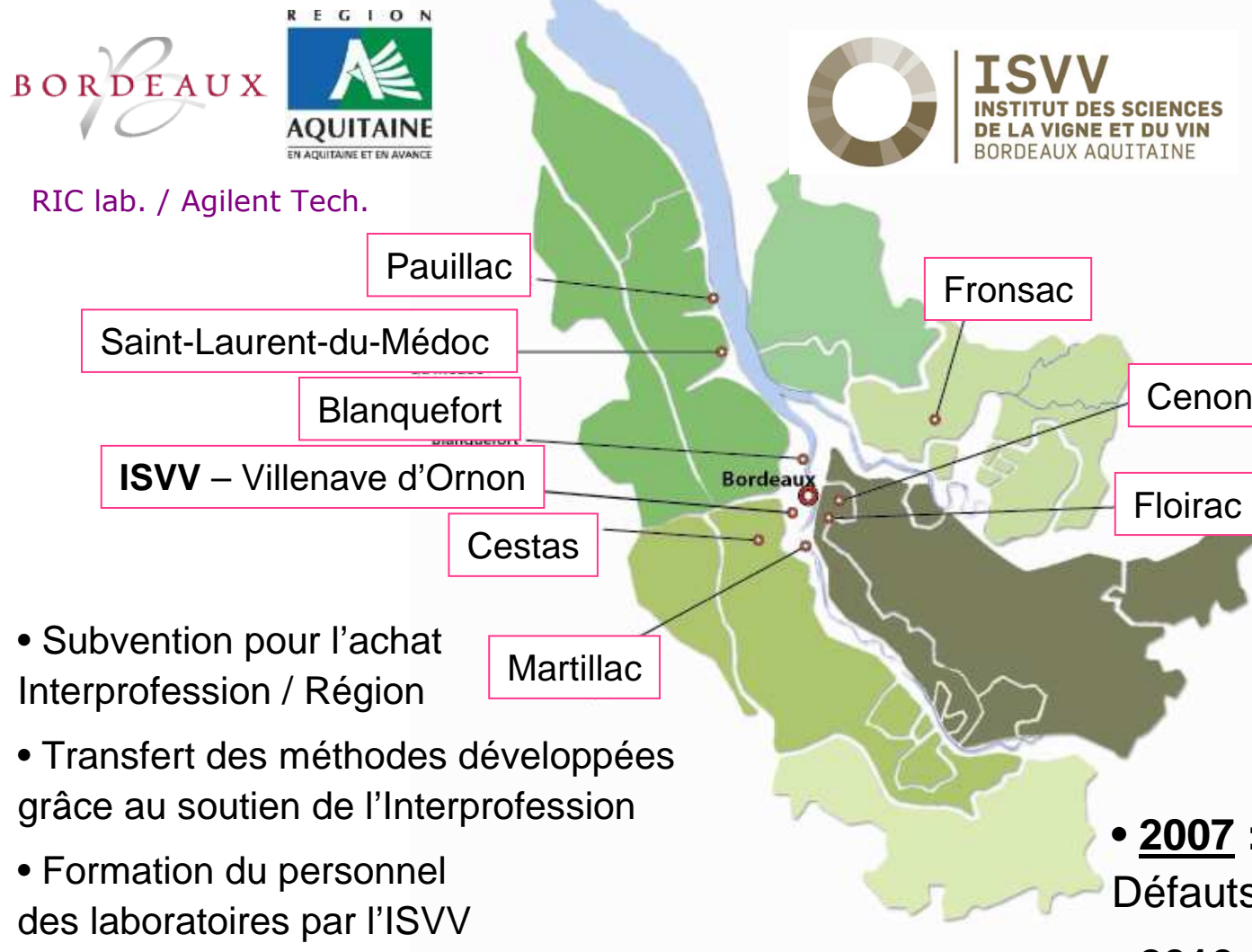


Pollution éventuelle lors de l'injection d'un échantillon fortement chargé (100-200 µg/L)

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



- Subvention pour l'achat Interprofession / Région
- Transfert des méthodes développées grâce au soutien de l'Interprofession
- Formation du personnel des laboratoires par l'ISVV
- Validation par des essais interlaboratoires

- **2007** :  
Défauts olfactifs du vin
- **2010** :  
Résidus de pesticides

# Application : Essai interlaboratoire Twister-CPG-SM "multi-défauts"



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

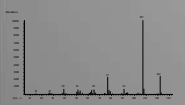
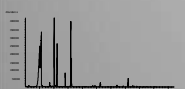
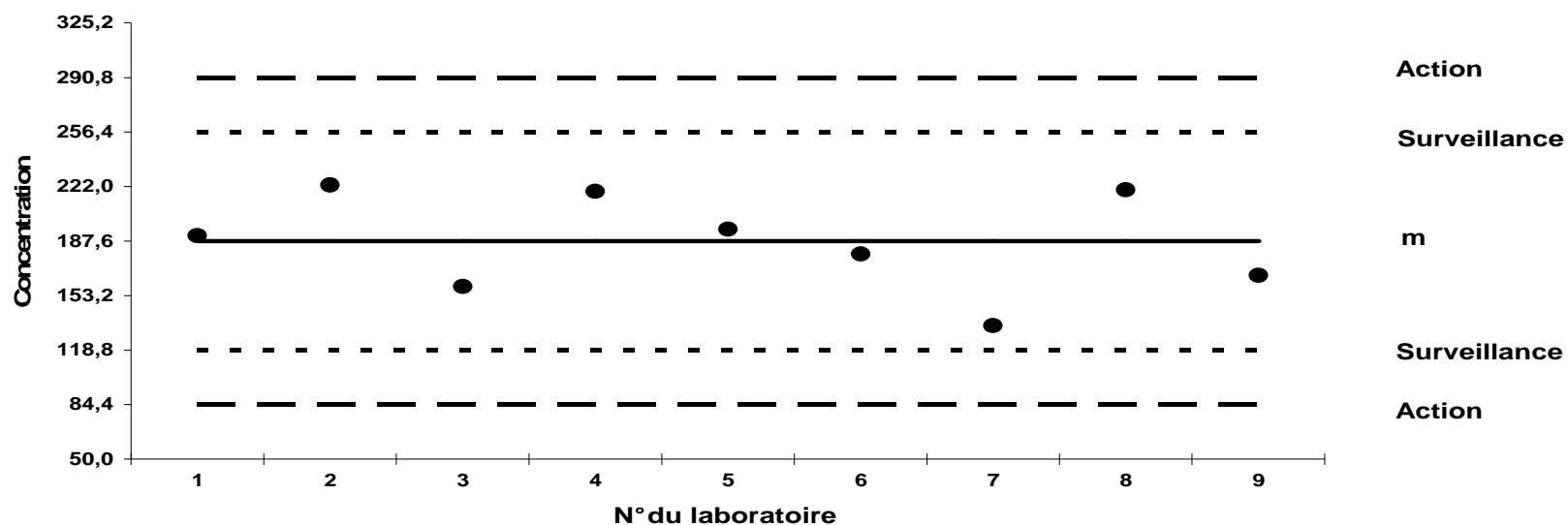
➡ Assurer la confiance dans le résultat de l'analyse



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

Répartition des résultats des laboratoires

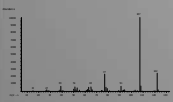
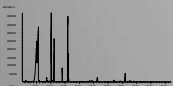


# Intérêt professionnel du développement de l'analyse par Twister-GC-MS



## 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

---

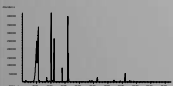


## ⇒ Recherche

Nouveaux marqueurs aromatiques.

Etude du métabolome.

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



## ⇒ Développement

Analyse de l'ambiance des chais