

# ANALYSE QUANTITATIVE DES PRINCIPAUX CONSTITUANTS DU VIN PAR RMN DU CARBONE-13 : OPTIMISATION DE LA MÉTHODE

## QUANTITATIVE ANALYSIS OF THE MAIN COMPONENTS OF THE WINES BY MEANS OF CARBON-13 NMR : OPTIMISATION OF THE METHOD

C. CHON\*, A. POULARD\*\* et C. RABILLER\*

\*Laboratoire de Recherches en Biocatalyse, Faculté des Sciences et des Techniques  
2 rue de la Houssinière, 44072 Nantes Cedex 03 (France).  
E. mail rabiller@ensinfo.univ-nantes.fr

\*\*Institut Technique de la Vigne et du Vin, Château de la Frémoire, 44120 Vertou (France)

**Résumé :** Au cours de ce mémoire, on montre que la RMN du  $^{13}\text{C}$ , en dépit d'une faible sensibilité et d'une faible abondance pour ce noyau, constitue une excellente méthode d'analyse des principaux constituants des vins. Les paramètres d'acquisition des spectres de RMN du  $^{13}\text{C}$  optimisés grâce à la méthode du simplexe conduisent à d'excellentes relations linéaires ( $r^2 > 0,999$ ) entre la surface des raies de résonance et les concentrations des divers composants. Une bonne précision (erreur  $< 5\%$ ) est alors obtenue et cette technique permet en une seule expérience et en un temps voisin d'une heure, de doser le glycérol, les acides tartrique, malique, lactique, succinique, citrique, les butanediols ainsi que le fructose et le glucose. Les domaines de concentration typiquement mesurables dans de bonnes conditions doivent être supérieurs à  $5 \times 10^{-3}$  M.

**Abstract :** Despite both the low sensitivity and abundance of the carbon 13 nuclei,  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy was shown to be an excellent quantitative analytic method for the main components of the wines. The acquisition parameters of the  $^{13}\text{C}$  NMR spectra optimised by means of the simplexe method lead to excellent linear correlations ( $r^2 > 0,999$ ) between the integral of the resonance signals and the concentrations of the corresponding components. Using such optimised parameters, an enhancement of the accuracy was observed. In this way, the technique allows the quantitative analysis of at least 9 components (such as glycerol, tartaric, malic, lactic, succinic, citric acids, butanediols, glucose and fructose) in a sole experiment in approximately one hour with a precision of about 5%. Typically, concentrations of each component up to  $5.10^{-3}$  M can be measured in very good conditions.

**Mots-clés :** constituants du vin, RMN du carbone-13, méthode d'analyse

**Key words :** main components of wine, carbon-13 NMR, analysis method

### INTRODUCTION ET POSITION DU PROBLÈME

En dépit d'une faible sensibilité par rapport à d'autres spectroscopies telles que l'Ultraviolet ou l'Infrarouge, la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) s'est avérée au fil des années comme un outil d'analyse quantitative de premier ordre au service de l'agro-alimentaire. Il en va ainsi des techniques RMN dites de basse résolution qui permettent en particulier de doser de façon routinière la composition en eau et en matières grasses des émulsions (LE BOTLAN *et al.*, 1988) ou le degré alcoolique des boissons (TELLIER *et al.*, 1989). De même, grâce à la RMN du proton en haute résolution, il a été possible de quantifier les concentrations d'un certain nombre de métabolites du vin (ANDERS *et al.*, 1976, GUINON et BELANCHE, 1989, SACCHI *et al.*,

1990). La RMN d'un autre noyau, le deutérium, a également été l'objet d'intenses recherches. Des études quantitatives le concernant ont ainsi conduit à l'avènement d'une nouvelle méthode d'identification de l'origine des composés (SNIF NMR, MARTIN *et al.*, 1982, 1983, 1986). En effet, la RMN présente la rare particularité, parmi les techniques spectroscopiques actuellement connues, de produire des signaux d'absorption proportionnels à la concentration des substances analysées. Cette propriété compense ainsi la faible sensibilité inhérente à la méthode et explique en partie son fort développement. Un autre noyau est également très utilisé, il s'agit du carbone-13 ( $^{13}\text{C}$ ). Comparativement au noyau  $^1\text{H}$ , le  $^{13}\text{C}$  semble *a priori* peu intéressant si on désire l'utiliser à des fins quantitatives. Il est en effet encore moins sensible que le  $^1\text{H}$  et il est surtout beaucoup moins abondant. Le proton a une abondance naturelle supé-

rieure à 99 p. cent alors que celle du  $^{13}\text{C}$  est voisine de 1,1 p. cent. L'obtention d'un signal suffisamment intense pour être exploitable, c'est-à-dire présentant un bon rapport signal (S) sur bruit (N), est en conséquence conditionné par l'utilisation de techniques d'accumulations d'un nombre important d'expériences conduisant chacune à des signaux de faible intensité. On imagine déjà à ce niveau que l'acquisition d'un signal  $^{13}\text{C}$  va demander du temps. Il est souvent nécessaire d'effectuer un nombre d'accumulations de l'ordre de 1 000 à 10 000 voire davantage si le produit analysé présente une faible concentration (en RMN du  $^{13}\text{C}$ , on entend par faible concentration une valeur de l'ordre de  $10^{-4}$  M). Cette situation est considérablement aggravée par les phénomènes de relaxation  $T_1$  associés à ces noyaux. Dans l'hypothèse où on cherche à obtenir un signal  $^{13}\text{C}$  proportionnel à la concentration de la substance étudiée, on montre, qu'entre deux accumulations (ou impulsions) successives, il faut attendre un temps égal à  $5T_1$ . Compte tenu de la durée nécessaire à une accumulation (= temps d'acquisition  $0,3-0,5 \text{ s} + 5T_1$ ), l'obtention d'un spectre RMN  $^{13}\text{C}$  exploitable à des fins quantitatives (10 000 accumulations) va demander 505 000 s (c'est-à-dire plus de 140 h) pour un constituant présent à une concentration de 0,1 M et dont la relaxation  $T_1$  des carbones est de 10 s. Malgré cela, ce noyau a été récemment utilisé en analyse quantitative en particulier pour la détermination du titre alcoolique (MARECI et SCOTT, 1977, SCHOOLERY, 1977, COOKSON et SMITH, 1984, SOTAK et al., 1984), des sucres, des acides ou des aminoacides (RAPP et al., 1986, 1987, 1988a, 1988b, 1989a, 1989b, 1991). C'est qu'en effet, la plage des fréquences de résonance pour le  $^{13}\text{C}$  est de l'ordre de 20 000 Hz. Ce domaine est environ 10 fois celui de la résonance des protons. On voit en conséquence qu'en RMN du  $^{13}\text{C}$ , les informations seront mieux séparées qu'en RMN du proton. Ainsi, dans le cas d'un mélange complexe de produits, on trouve moins de recouvrements de raies et en conséquence les résonances correspondant à chacun des produits sont mieux individualisées. Cependant, étant donné la longueur des temps de relaxation et leur grande dispersion en fonction des produits analysés, il est nécessaire d'établir des courbes d'étalonnage pour chacun des composés. RAPP et al., utilisant la RMN  $^{13}\text{C}$  avec le propane-1,3-diol comme référence interne ont pu mesurer sous certaines conditions les concentrations des métabolites du vin et des jus de fruits. Suite à une collaboration avec l'Institut Technique du Vin, nous avons été confrontés à l'analyse quantitative des principaux métabolites présents dans des vins dont la vinification était apparue anormale. La RMN  $^{13}\text{C}$  nous a ainsi semblé être une technique appropriée à cette étude. Cependant, nous nous sommes placés pour ce travail dans une perspective différente de celle de RAPP. En

particulier, seuls les composés, dont la concentration est supérieure à 0,5 g/l, seront pris en considération dans l'analyse. Nous avons également imposé une contrainte de temps à la méthode : compte tenu du nombre d'échantillons à analyser, le temps maximum d'acquisition des données doit être de l'ordre d'une heure. Nous avons ainsi été amenés à établir des courbes d'étalonnage à l'aide de solutions purement synthétiques. Par ailleurs, l'utilisation d'une référence interne, différente de celle employée par RAPP et al., nous a conduit à une préparation différente des échantillons. De plus, en considérant le nombre important de paramètres à faire varier pour améliorer la précision de la mesure (en particulier les paramètres d'acquisition des spectres  $^{13}\text{C}$ ), nous nous sommes aidés de la technique des plans d'expériences pour optimiser ces paramètres. La fiabilité de la méthode pour l'analyse des vins est également testée par comparaison avec les méthodes classiques d'analyses quantitatives des métabolites (méthodes enzymatiques en particulier).

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

### a) Produits utilisés

Le glycérol, les butanediols diastéréomères, le fructose, le glucose, les acides tartrique, malique, lactique, citrique et succinique sont tous d'origine commerciale (Aldrich). Nous les avons utilisés sans purification ultérieure.

La résine Chelex utilisée pour éliminer les métaux a été fournie par BioRad. Les kits enzymatiques utilisés pour les dosages du glycérol et des acides malique et lactique proviennent de chez Sigma.

### b) Préparation des échantillons

- Échantillons de vins : le degré alcoolique des vins est déterminé au préalable par ébullioscopie. L'échantillon est ensuite élué sur une colonne de verre contenant la résine échangeuse d'ions (Chelex). Cette opération vise à éliminer les métaux (Cu, Fe...) susceptibles de former des complexes avec les aminoacides. Après s'être assuré que la totalité des produits organiques constituant le vin a effectivement traversé la colonne, on ajoute à l'éluat une masse précise de glycine, substance utilisée comme référence pour l'analyse quantitative par RMN  $^{13}\text{C}$ . L'alcool ainsi qu'une partie de l'eau sont ensuite éliminés sous pression réduite de façon à concentrer le milieu par un facteur 5. Le pH de la solution est alors compris entre 9,5 et 10. Il est amené à une valeur de 3,5 (valeur moyenne pour les vins) à l'aide d'une solution 1M d'acide chlorhydrique. Dans ces conditions, on évite toute précipitation de tar-

trate. Des tentatives de concentration plus élevées se sont soldées par l'apparition de précipitations. L'échantillon ainsi préparé est soumis à la RMN sans adjonction d'eau lourde ou d'une quelconque source de deutérium pour verrouiller le champ magnétique.

- Échantillons synthétiques : afin d'évaluer la précision des résultats obtenus lors de l'analyse quantitative par RMN du  $^{13}\text{C}$ , nous avons préparé des solutions contenant les constituants précédents avec des concentrations connues et d'un ordre de grandeur semblable à celui habituellement rencontré dans les échantillons de vins (après concentration d'un facteur 5).

#### c) Analyse quantitative par RMN du $^{13}\text{C}$

Cette étude a été menée sur un spectromètre RMN WM250 Bruker. La fréquence de résonance du proton est de 250 MHz et celle du  $^{13}\text{C}$  de 62,89 MHz. Les paramètres d'acquisition utilisés ont été optimisés grâce à la technique statistique des plans d'expériences (méthode du simplexe). Le verrouillage du champ est assuré à l'aide d'un tube RMN contenant de l'eau lourde. Les réglages de résolution effectués sur ce tube servent ensuite à l'acquisition du signal de l'échantillon de vin. La très grande stabilité du champ du spectromètre WM250 permet de travailler dans ces conditions. À l'échelle de temps de nos expériences (soit environ 1 h 10 mn), aucune dérive appréciable du champ n'est détectée.

L'identification sur les spectres de RMN  $^{13}\text{C}$  des divers composants du vin ne pose pas de problème particulier. Ces produits ayant fait l'objet de nombreuses études RMN sont aisément identifiables sur les spectres. A titre indicatif, on donne les spectres  $^{13}\text{C}$  d'un échantillon de vin (Cabernet) avant et après fermentation malolactique que l'on peut comparer à celui d'un échantillon synthétique (voir figure 1).

La mesure de la surface des raies permet le dosage des composés contenus dans les vins. L'intégration des raies de résonance est effectuée grâce à un logiciel Mac NMR intégré au système de l'ordinateur de commande du spectromètre RMN. Ce logiciel utilise une fonction d'intégration qui assimile les raies de résonance à des courbes lorentziennes.

d) Étude de la précision des mesures et optimisation des paramètres d'acquisition RMN par la méthode du simplexe séquentiel.

La surface des raies obtenue en RMN du  $^{13}\text{C}$  dépend d'un nombre important de paramètres. Si on veut tester l'influence de chacun d'entre eux sur la précision de la mesure, il est nécessaire de les faire varier systématiquement et donc d'effectuer un nombre impressionnant de mesures. La méthode des plans d'ex-

périences (méthode du simplexe séquentiel) aide considérablement dans cette recherche puisqu'elle permet sur la base d'un traitement statistique de limiter considérablement le nombre des expériences à réaliser (SPENDLEY *et al.*, 1962 ; PHAN TAN LU *et al.*, 1979 ; PORTE *et al.*, 1984). Dans cette étude, nous avons choisi de faire varier trois des paramètres d'acquisition : l'angle d'impulsion PW, le délai DE entre chaque impulsion et le nombre d'impulsions N. Les contraintes pour chacun d'eux sont les suivantes : PW est compris entre 0 et 90°, DE est choisi entre 0,05 s et 3 s et N entre 0 et 5 000 impulsions. Une contrainte supplémentaire est imposée au système : le temps d'analyse ne doit pas excéder 4 000 s (1 heure 10 mn environ).

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

La précision des mesures obtenues par RMN  $^{13}\text{C}$  dépend de façon importante du choix des paramètres d'acquisition. En considérant la séquence mono-impulsionnelle choisie pour ce travail, on peut en distinguer six majeurs : la température d'analyse, l'angle d'impulsion PW, le délai DE entre chacune des impulsions, le nombre N d'impulsions, l'étendue de la gamme de fréquence SW sur laquelle on travaille et le nombre de points mémoire. Tous ces paramètres conditionnent le temps total d'acquisition. Nous avons choisi et fixé la température, SW et la taille de la mémoire. Les trois autres paramètres ont été retenus pour étude par la méthode des plans d'expériences. Par ailleurs, une contrainte supplémentaire a été imposée au système : le temps d'analyse est fixé à 4 000s. L'objectif de ce plan d'expérience à trois dimensions est de trouver le compromis conduisant à la meilleure précision des mesures dans le cadre défini. Sans entrer dans les détails de l'établissement du simplexe séquentiel utilisé pour optimiser les paramètres d'acquisition du signal RMN  $^{13}\text{C}$ , on voit à l'examen du tableau I qu'il se produit une nette amélioration du pourcentage d'erreur utilisé comme critère d'appréciation entre le début (point initial S1 du simplexe) et la fin du traitement (point final S22 du simplexe). Un gain d'environ 2 p. cent peut ainsi être obtenu sur le pourcentage d'erreur. De plus, l'utilisation du simplexe permet de réaliser un compromis entre le nombre d'accumulations et le délai. On minimise ainsi le pourcentage d'erreur moyen de façon assez sensible. Dans le cas des paramètres finaux, il est de l'ordre de 2,5 p. cent, voir tableau I), alors qu'en choisissant le même angle d'impulsion et le même délai que dans le simplexe d'origine, mais en augmentant le nombre d'accumulations afin de conserver le même temps d'analyse, il est de 3,7 p. cent.

Contrairement à la RMN du proton, l'existence pour

TABLEAU III

Tests de justesse sur la méthode d'analyse quantitative des composants majoritaires des vins en utilisant les paramètres d'acquisition au point S22 (nombre d'acquisitions = 1624, angle d'impulsion = 7,1  $\mu$ s, délai 1,4 s).

Constituants	Essai										% Erreur Moyen par rapport à la valeur théorique ( $\pm$ )
	a	b	c	d	e	f	g	h	Concentrations calculées		
	Concentrations théoriques										
Glycérol	6,52	7,08	6,65	6,98	6,62	6,78	6,92	6,85			3,2
Acide tartrique	2,76	2,86	2,72	2,91	2,76	2,69	2,86	2,75			2,4
Acide malique	1,09	1,11	1,17	1,19	1,10	1,08	1,11	1,09			2,6
Acide lactique	2,15	2,21	2,15	2,17	2,16	2,10	2,06	2,09			3,0
Acide citrique	1,60	1,67	1,71	1,59	1,65	1,64	1,55	1,58			2,8
Acide succinique	0,59	0,58	0,54	0,59	0,64	0,57	0,57	0,57			5,0
Butanediol	1,19	1,33	1,32	1,32	1,24	1,19	1,22	1,20			4,6
Fructose	0,76	0,62	0,62	0,55	0,59	0,64	0,46	0,52			20,8
Fructose	1,71	1,67	1,73	1,83	1,53	1,76	1,85	1,59			8,0
Glucose	0,53	0,59	0,48	0,63	0,73	0,68	0,57	0,55			20,0

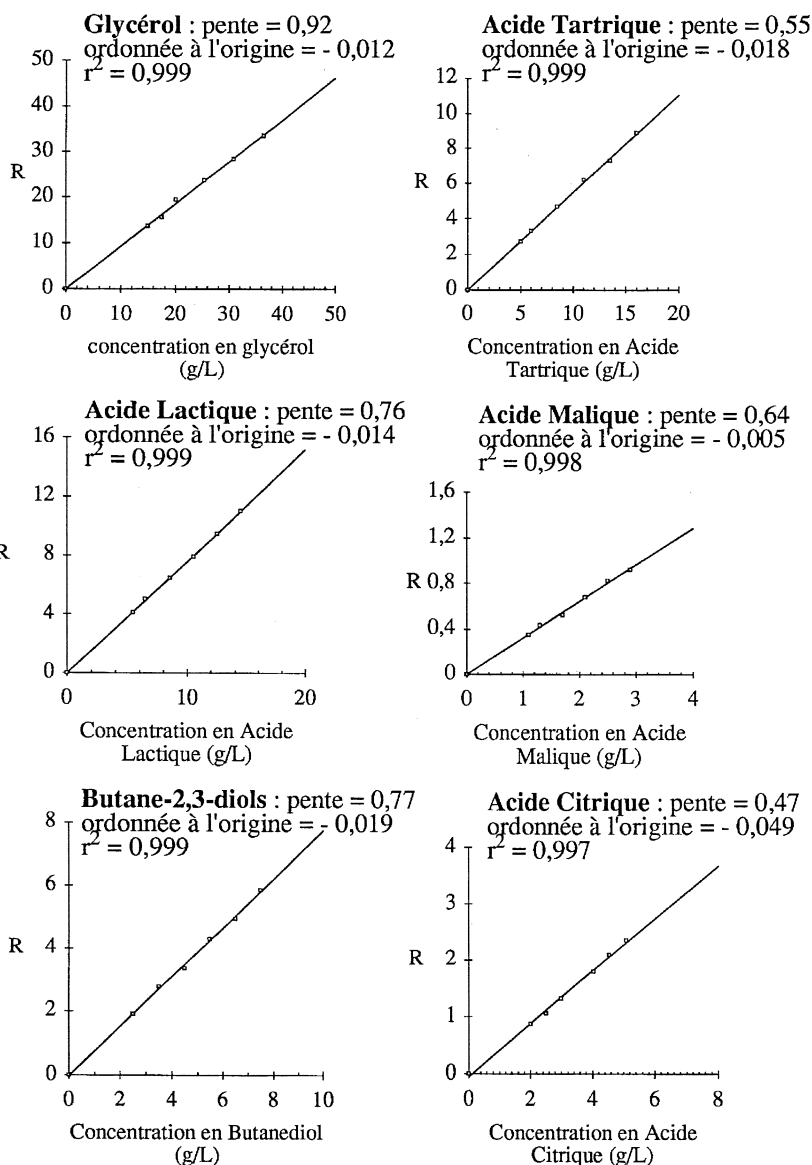


Figure 2 — Droite d'étalonnage du glycérol, des acides tartrique, lactique, malique, citrique et des butane-2,3-diols en RMN du <sup>13</sup>C.

$[M_i]$  = Concentration en g/l du métabolite -  $M_i$ ;  $[M_{ref}]$  = Concentration en g/l du métabolite de référence -  $n_i$  = Nombre de pic considéré pour chaque métabolite  $M_i$  -  $\sum S_i$  = Somme des surfaces des pics considérés pour le métabolite  $M_i$  -  $S_{ref}$  = Surface du pic de la référence.

optimisés à l'aide de la méthode du simplexe (voir figure 2 et 3). Les coefficients de régression linéaire  $r^2$  calculés pour ces droites sont en général supérieurs à 0,999.

En guise de vérification de la méthode, nous avons testé un milieu constitué, en concentrations connues, des principaux composés rencontrés dans le vin sans alcool (glycérol, acides tartrique, malique, lactique, citrique, succinique, butanediols, glucose et fructose). Les résultats obtenus en utilisant les courbes d'étalonnage sont rassemblés dans le tableau II. Dans les conditions d'analyses de ce travail, on voit que la concentration  $5.10^{-3}$  M constitue une valeur limite pour la justesse des mesures. Il en va ainsi pour le glucose

et le fructose pour lesquels une hausse très importante de l'erreur est constatée lorsqu'on passe d'une concentration  $5,6.10^{-3}$  M (1g/l, pourcentage moyen d'erreur < 10) à une concentration  $2,8.10^{-3}$  M (0,5 g/l, pourcentage moyen d'erreur = 27 p. cent pour le fructose). Par ailleurs, en vue de montrer la fiabilité des résultats obtenus à l'aide de la RMN du <sup>13</sup>C, il nous a semblé intéressant d'effectuer une comparaison avec ceux fournis par d'autres méthodes de référence. Ainsi, le glycérol, les acides malique et lactique dans les vins peuvent être dosés par voie enzymatique (Recueil des Méthodes Internationales d'Analyses des Vins et des Moûts, OIV, 1990). Nous avons analysé la concentration de ces métabolites dans différents échantillons

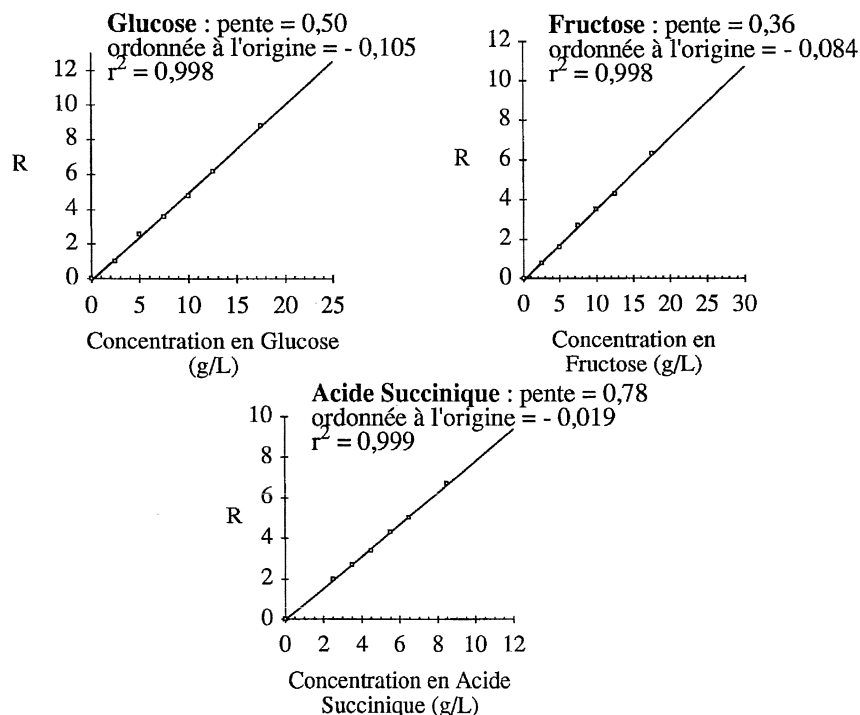


Figure 3 — Droites d'étalonnages des dosages de l'acide succinique, du glucose et du fructose en RMN du <sup>13</sup>C.

$R = \sum S_i \cdot [M_{ref}] / (n_i \cdot S_{ref})$  avec :  $[M_i]$  = concentration en g/l du métabolite  $M_i$  -  $[M_{ref}]$  = concentration en g/l du métabolite de référence  
 $n_i$  = nombre de pic considéré pour chaque métabolite  $M_i$  -  $\sum S_i$  = somme des surfaces des pics considérés pour le métabolite  $M_i$   
 $S_{ref}$  = surface du pic de la référence.

**TABLEAU II**

**Valeurs des constantes (au point final du simplex) des courbes d'étalonnage reliant la surface des raies et la concentration des métabolites majoritaires dans les vins**

Paramètres RMN au point S22	Angle d'impulsion (PW) en µs*	Délai (s)	Nombre d'accumulations
	7,1	1,4	1624
Métabolites	a	b	r <sup>2</sup>
Glycérol	- 0,012	0,92	0,999
Butanediol	- 0,019	0,77	0,999
Acide tartrique	- 0,018	0,55	0,999
Acide malique	- 0,005	0,64	0,998
Acide lactique	- 0,014	0,76	0,999
Acide citrique	- 0,049	0,47	0,997
Acide succinique	- 0,019	0,78	0,999
Fructose	- 0,084	0,36	0,998
Glucose	- 0,105	0,50	0,998

Les droites sont de la forme :  $\sum S_i \cdot [M_{ref}] / (n_i \cdot S_{ref}) = b \cdot [M_i] + a$  ;  $[M_i] = ((\sum S_i \cdot [M_{ref}] / (n_i \cdot S_{ref}) - a) / b)$   
 $[M_i]$  = Concentration en g/l du métabolite  $M_i$  ;  $[M_{ref}]$  = Concentration en g/l du métabolite de référence ;  $n_i$  = nombre de pic considéré pour chaque métabolite  $M_i$  ;  
 $\sum S_i$  = Somme des surfaces des pics considérés pour le métabolite  $M_i$  ;  $S_{ref}$  = surface du pic de la référence ;  $r^2$  = coefficient de régression linéaire  
 \*µs : microsecondes (un angle de 90° correspond à 11,5 ms sur l'appareil utilisé).

**TABLEAU IV**

**Comparaison de l'analyse quantitative du glycérol dans les vins par RMN du  $^{13}\text{C}$  et par voie enzymatique**  
(Les concentrations sont exprimées en g/l)

Échantillon	Méthode enzymatique				Méthode RMN $^{13}\text{C}$	Écart (%) entre méthodes
	Moyenne	n	Ecart-type	% Erreur		
A	6,6	4	0,3	3,8	6,7	1,5
B	4,6	4	0,1	2,2	4,4	4,4
C	4,1	4	0,0	0,0	4,2	2,4
D	4,5	4	0,1	1,1	4,5	0,0
E	5,3	4	0,4	7,1	5,2	1,9
Moyenne des écarts entre les deux méthodes (%) :						2,1

A est un échantillon de Gamay Rouge (Cépage Beaujolais) - B, C, D, E sont des échantillons de Gros-Plant (Cépage Folle Blanche)

**TABLEAU V**

**Comparaison de l'analyse quantitative de l'acide malique dans les vins par RMN du  $^{13}\text{C}$  et par voie enzymatique.**

(Les concentrations sont exprimées en g/l)

Échantillon	Méthode enzymatique				Méthode RMN $^{13}\text{C}$	Écart (%) entre méthodes
	Moyenne	n	Ecart-type	% Erreur		
J	2,97	4	0,01	0,3	2,86	3,8
K	2,94	4	0,05	1,7	2,95	0,3
L	4,83	4	0,13	2,7	4,76	1,5
M	2,77	4	0,02	0,7	2,89	4,2
Moyenne des écarts entre les deux méthodes (%) :						2,5

L est un échantillon de Gamay rouge (cépage Beaujolais) - J, K et M sont des échantillons de Gros Plant (cépage Folle Blanche)

**TABLEAU VI**

Échantillon	Méthode enzymatique				Méthode RMN $^{13}\text{C}$	Écart (%) entre méthodes
	Moyenne	n	Ecart-type	% Erreur		
F	1,41	4	0,03	2,1	1,44	2,1
G	2,82	4	0,16	5,7	2,84	0,7
H	5,12	4	0,25	4,9	5,05	1,4
I	0,46	4	0,04	8,7	0,53	14,1
Moyenne des écarts entre les deux méthodes (%) :						4,6

F, G et I sont des échantillons de Gamay rosé (cépage Beaujolais) - H est un échantillon de Gamay rouge (cépage Chaudenay)

de vin par les deux méthodes. Les résultats rassemblés dans les tableaux IV, V et VI indiquent une excellente concordance entre les deux méthodes. Dans cette série de vérifications, les limites de la technique RMN  $^{13}\text{C}$  sont clairement montrées lorsque les concentrations sont inférieures à  $5 \cdot 10^{-3}$  M. L'erreur devient alors nettement plus importante. Le cas de l'acide lactique dans l'échantillon I (écart de 14 p. cent entre les deux méthodes, voir tableau VI) est particulièrement révélateur à cet égard.

## CONCLUSION

Nous avons montré que le noyau  $^{13}\text{C}$ , bien que peu abondant et muni de propriétés en principe peu favorables à l'analyse quantitative par RMN (problèmes dus aux temps de relaxation) permettait d'effectuer dans de bonnes conditions le dosage des constituants les plus abondants des vins. La précision des mesures est fonction de la concentration : une erreur de l'ordre de 3 à 5 p. cent est observée pour des concentrations de la solution de mesure comprises entre  $10^{-1}$  et  $10^{-2}$  M (soit pour des concentrations des composants du vin comprises entre  $5 \cdot 10^{-3}$  et  $5 \cdot 10^{-2}$  M). Il est évident que des concentrations plus faibles peuvent être atteintes avec une bonne précision à la condition d'en payer le prix, c'est-à-dire d'augmenter de façon très importante le temps d'acquisition des spectres de résonance du  $^{13}\text{C}$ . Dans les limites de temps que nous nous étions imposés (1 heure environ), on voit qu'il est néanmoins possible de doser une dizaine de constituants des vins en une seule expérience, ce qui constitue un gain de temps appréciable par rapport aux autres méthodes chimiques et enzymatiques en particulier.

**Remerciements** : Nous exprimons nos plus vifs remerciements au Ministère de l'Agriculture et de la Pêche pour l'aide financière apportée à l'ITV pour la réalisation de ce travail. En effet, l'étude présentée dans ce mémoire s'intègre dans le cadre d'un contrat d'association avec l'ITV dont l'objet concerne le problème des pertes de titre alcoolique des vins. Ces remerciements s'adressent aussi au Conseil Général de Loire Atlantique pour l'attribution d'une bourse de thèse (Atlantèse) à C. CHON. Nous remercions également D. MITRE pour ses précieux conseils en matière de plans d'expériences.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ANDERS U., TITTEMEIER F. und HAILER G., 1976.  $^1\text{H}$ -NMR Bestimmung von Äthanol in Wein, Weinähnlichen Getränken und Spirituosen. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **162**, 21-24.
- COOKSON D.J. and SMITH B.E., 1984. Optimal Conditions for Obtaining Quantitative  $^{13}\text{C}$  NMR Data. *J. Magn. Res.*, **57**, 355-368.
- GUINON J.L. et BELANCHE M., 1989. Application de la résonance magnétique nucléaire du proton au dosage de l'éthanol dans les boissons alcoolisées. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, **23**, n°4, 215-221.
- LE BOTLAN D., GUILLOU-CHARPIN M., TELLIER C. et MÉCHIN B., 1988. Une Méthode d'Analyse Rapide des Aliments : La Résonance Magnétique Nucléaire Basse Résolution. 2<sup>e</sup> Partie : Applications dans les Industries Agro-alimentaires (IAA), juin, 463-470.
- MARECI T.H. and SCOTT C.N., 1977. Quantitative Analysis of Mixtures by Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry. *Analytical Chemistry*, **49**, 2130-2136.
- MARTIN G.J., MARTIN M.L., MABON F. and MICHON M.-J., 1982. Identification of the Origin of Natural Alcohols by Natural Abundance Hydrogen-2 Nuclear Magnetic Resonance. *Analytical Chemistry*, **54**, 2380-2382.
- MARTIN G.J. et MARTIN M.L., 1983. Détermination par résonance magnétique nucléaire du deutérium du fractionnement isotopique spécifique naturel. Application à la détection de la chaptalisation des vins. *J. Chimie Physique*, **80**, n°3, 293-297.
- MARTIN G.J., GUILLOU C., NAULET N., BRUN S., TEP Y., CABANIS J.-C., CABANIS M.-T. et SUDRAUD P., 1986. Contrôle de l'origine et de l'enrichissement des vins par analyse isotopique spécifique. Etude de différentes techniques d'enrichissement des vins. *Sci. Alim.*, **6**, 385-405.
- OFFICE INTERNATIONAL DE LA VIGNE ET DU VIN, 1990, Recueil des Méthodes Internationales d'Analyse des Vins et des Moûts. *OIV*, Paris.
- PHAN TAN LU R., BAZARD D., FLAYEUX R., LEHNEDE J.M., PARISOT M., VINH T. et MOLL M., 1979. Application de de la méthodologie de la recherche expérimentale. Plans d'expérience factoriels et simplex séquentiels. Exemples. *Industries Alim. Agric.*, 441-451.
- PORTE C., DEBREUILLE W. et DELACROIX A., 1984. La méthode simplex et ses dérivés. Applications à l'optimisation dans le laboratoire de développement en chimie. *Actualité Chimique*, 45-54.
- RAPP A., SPRAUL M. und HUMPFER E., 1986.  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopische Bestimmung von



- Diethylenglycol im Wein. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **182**, 419-421.
- RAPP A., MARKOWETZ A., SPRAUL M. und HUMPFER, E., 1987. Anwendung der  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie in der Weinanalytik. *Deutsche Lebensmittel Rundschau*, **83**, 375-8.
- RAPP A., MARKOWETZ A., SPRAUL M. und HUMPFER E., 1988a. Anwendung der  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie in der Weinanalytik. *Fresenius Z. Anal. Chem.*, **330**, 462-3.
- RAPP A., MARKOWETZ A., SPRAUL M. und HUMPFER E., 1988b. Anwendung der  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie in der Weinanalytik. *GIT Fachz. Lab.*, **9**, 941-6.
- RAPP A. und MARKOWETZ A., 1989a. Anwendung der  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie in der Weinanalytik. *Lebensmittelchem. Gerichtl. Chem.*, **43**, 73-75.
- RAPP A., MARKOWETZ, A., SPRAUL, M. und HUMPFER, E., 1989b. Nachweis und quantitative Bestimmung von Zuckern, Zuckeralkoholen und Zuckersäuren im Wein mit  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **188**, 138-143.
- RAPP A., MARKOWETZ, A. und NIEBERGALL, H., 1991. Anwendung der  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie in der Aminosäureanalytik in Wein und Fruchtsäften. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **192**, 1-6.
- SACCHI R., MAIONE V., GIUDICIANNI I., NOTA G., PAOLILLO L. and ADDEO A., 1990. The determination of methanol in wines by proton NMR spectroscopy. *Ital. J. Food Sci.*, **2**, 113-122.
- SCHOOLERY J.N., 1977. Some Quantitative Applications of  $^{13}\text{C}$ NMR Spectroscopy. *Progress in NMR Spectroscopy*, **11**, 79-93.
- SOTAK C.H., DUMOULIN C.L., LEVY G.C., 1984. High-Accuracy quantitative analysis by  $^{13}\text{C}$  Fourier transform NMR Spectroscopy. *Topics in NMR Spectroscopy*, **4**, 91-121.
- SPENDLEY W., HEXT G.R. and HINSWORTH F.R., 1962. *Technometrics*, **4**, 441.
- TELLIER C., GUILLOU-CHARPIN M., GRENIER P. and LE BOTLAN D., 1989. Monitoring Alcoholic Fermentation by Low Resolution Pulsed Nuclear Magnetic Resonance. *J. Agr. Food. Chem.* **37**, 988-991.

Manuscrit reçu le 19 février 1996  
accepté pour publication le 14 juin 1996

