

Utilisation de l'analyse infrarouge à transformée de Fourier pour l'analyse œnologique de routine

Marc DUBERNET, Matthieu DUBERNET.

Laboratoire Dubernet, 9A, quai d'Alsace - 11100 Narbonne.

Le vin est une solution d'origine biologique contenant un très grand nombre de composés organiques dont les concentrations varient de doses infiniment petites à des valeurs de plusieurs grammes par litre. Le dosage de ces composés revêt une importance majeure pour orienter les gestes technologiques qui entourent la production et la vie des vins, mais aussi pour accompagner les nécessaires contrôles de la qualité indispensables pour un produit destiné à la consommation humaine. Les techniques analytiques actuellement utilisées et exploitables en routine n'apportent qu'une quantité limitée d'informations et sont souvent d'une mise en œuvre difficile voire, dans certains cas, coûteuse.

Les techniques utilisant l'infrarouge sont connues depuis longtemps et ont été utilisées pour la mesure du titre alcoométrique volumique ou celle des sucres réducteurs. Leur développement ne pouvait être envisagé qu'avec une amélioration sensible des performances du matériel, ce qui a été acquis récemment grâce, en particulier, à l'arrivée de micro-ordinateurs à grande performance.

1 Bases de l'analyse infrarouge à transformée de Fourier

Les composés organiques ont la particularité de posséder des liaisons inter-atomiques qui entrent en vibration sous l'action d'un rayonnement infrarouge à des longueurs d'onde caractéristiques. Ce phénomène s'accompagne d'une consommation de l'énergie lumineuse à la longueur d'onde considérée.

Cette longueur d'onde va dépendre de la liaison elle-même (C-H, C-O, C-C etc...) mais aussi de l'environnement moléculaire dans lequel elle se trouve. Ainsi, une molécule donnée va présenter plusieurs longueurs d'onde d'absorption caractéristiques dans le spectre infrarouge. L'intensité de l'absorption est directement proportionnelle à la concentration de la molécule considérée.

Le spectre infrarouge d'une solution organique comme le vin ou le moût, présente donc des absorptions, à certaines longueurs d'onde, caractéristiques des différentes molécules présentes. Un tel spectre contient ainsi un très grand nombre d'informations. L'analyse par infrarouge à transformée de Fourier consiste à récupérer cette information afin d'en extraire les valeurs des concentrations des composés recherchés.

La méthode comprend deux étapes successives : la première est l'acquisition du spectre lui-même, la seconde est l'extraction de l'information contenue dans ce spectre.

1.1- Acquisition du spectre infrarouge

La première étape consiste à faire l'acquisition du spectre infrarouge du vin ou du moût analysé. Nous sommes là très loin de ce qui est réalisé par les appareils infrarouges traditionnels, utilisés en œnologie, et fonctionnant avec des filtres qui ne permettent pas de mesurer l'absorption pour plus de vingt longueurs d'onde différentes. L'acquisition pourrait se faire point par point par un spectrophotomètre infrarouge classique automatisé pour ce type de travail. Dans ce cas, les mesures seraient très longues et inexploitable en routine. La solution retenue est l'utilisation d'un spectrophotomètre infrarouge à

transformée de Fourier dont le cœur est un interféromètre de Michelson.

Nous avons utilisé un appareil Winescan FT 120 de la société FOSS electric. Celui-ci, conçu au départ pour l'analyse du lait et de ses dérivés, a été transformé et adapté aux conditions particulières de l'analyse des vins et des moûts.

L'interférométrie se base sur la division, par une lame séparatrice, d'une lumière infrarouge polychromatique (issu dans ce cas d'un filament incandescent). Chaque moitié du signal infrarouge parcourt un trajet optique différent, la différence de trajet optique se traduit au moment de leur réunion par un déphasage p . Ce déphasage est variable en fonction de la position du miroir mobile.

La réunion des deux signaux au niveau du détecteur infrarouge engendre un signal d'interférence. La mesure précise du déphasage p est primordiale ; elle est réalisée par un laser qui n'apparaît pas sur la figure 1.

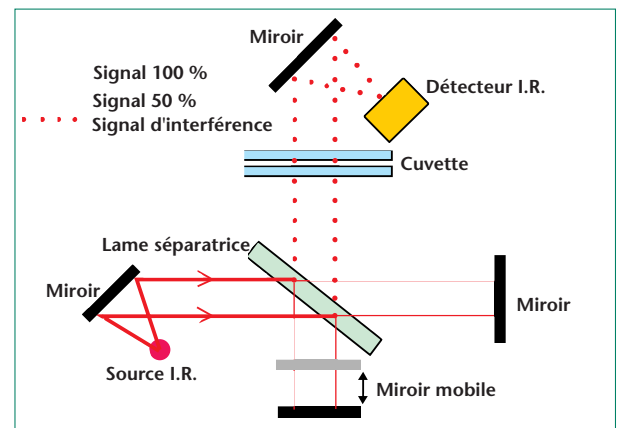


Figure 1- Schéma d'un interféromètre de Michelson.

La cuvette de mesure est donc traversée par le faisceau infrarouge dont certaines longueurs d'onde sont absorbées par le vin ou le moût analysé. Le détecteur reçoit l'intensité I du signal d'interférence en fonction du temps ; c'est la fonction $I(t)$. Connaissant avec précision la valeur (p) du déphasage à chaque instant $p(t)$, il est possible d'obtenir l'intensité I du signal d'interférence en fonction du déphasage (p). La fonction $I(p)$ constituée ainsi s'appelle un interférogramme (figure 2).

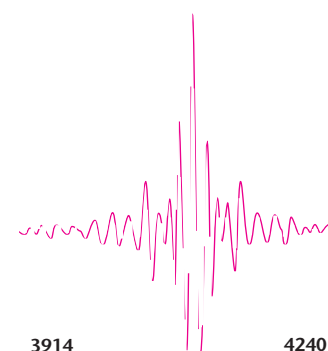


Figure 2- Interférogramme.

À partir de cet interférogramme, il est possible de reconstituer le spectre infrarouge par calcul en utilisant un outil mathématique classique appelé "transformée de Fourier". Seule l'informatique moderne et sa puissance peuvent permettre de venir rapidement à bout d'un tel calcul.

De façon simple, un spectrogramme est la représentation graphique de la fonction $I(v)$, v étant la longueur d'onde. Comme nous connaissons $I(p)$, il est possible d'obtenir I_v , l'intensité pour une longueur d'onde donnée, en intégrant le produit $I(p) \times I_v(p)$. La transformée de Fourier se résume alors au calcul de l'intégrale

$$I_v = \int I(p) \cos(2\pi vp) dp$$

En refaisant ce calcul pour les 1 000 longueurs d'onde qui composent le spectre qui nous intéresse, on obtient l'intégralité du spectre infrarouge. L'ensemble de la mesure optique et du calcul d'intégration demande moins de 30 secondes (figure 3).

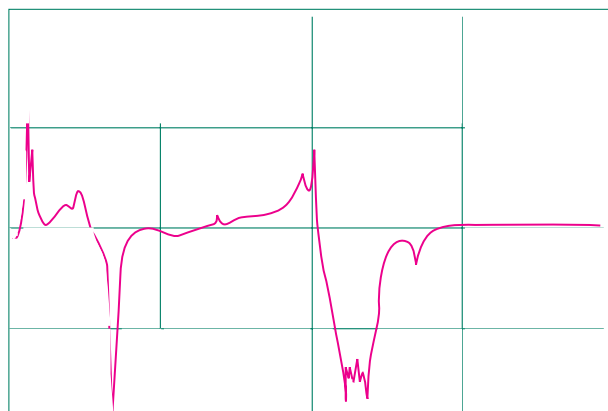


Figure 3- Spectre infrarouge d'un vin.

Le spectre obtenu par l'appareil utilisé se situe entre 1 000 et 5 000 cm^{-1} , soit de 10 000 à 2 000 nm. Ces longueurs d'onde sont à cheval sur le proche et le moyen infrarouge.

En l'état, l'interprétation du spectre est impossible à formuler. Seule une approche statistique puissante pourra permettre d'en extraire l'information recherchée.

1.2- Traitement de l'information du spectre

L'étape suivante consiste à extraire les informations contenues par le spectre obtenu. Cette procédure est une procédure purement statistique. Elle fait appel à une base de données de calibration.

La base de données de calibration est constituée d'une banque de spectres de vins, pour chacun desquels on a attribué une valeur de référence pour le paramètre cherché, obtenue par une analyse classique.

Une calibration sera donc valable pour un paramètre. Il convient de développer autant de calibrations que de paramètres que l'on souhaite analyser.

Dans un premier temps, l'ordinateur va rechercher une éventuelle corrélation entre chaque longueur d'onde et les valeurs de référence. Pour chaque paramètre, une quinzaine de longueurs d'onde (ou fine bande passante) environ seront retenues, qui présentent les meilleures corrélations entre l'absorption observée et la concentration du composé recherché. Généralement, avec 15 longueurs d'onde, on peut obtenir plus de 97 % de l'information sur un composé donné, analysable avec cette méthode.

À partir de ces valeurs d'intensité à certaines longueurs d'onde des spectres de référence et des concentrations de référence, est créé un modèle polynomial de calibration par voie statistique. La méthode statistique la plus couramment employée est la P.L.S. (Partial Least Square).

Ce modèle mis en place à partir d'une base de données de spectres et de valeurs de référence correspond donc à une calibration permanente pour l'analyse du paramètre choisi. Il reste cependant possible de faire des corrections de pente et de biais en cas de légère dérive. Il est à noter qu'une calibration développée sur un appareil est tout à fait transférable sur un autre appareil, à condition de faire les corrections de pente et de biais nécessaires.

2 Déroutement de l'analyse

- 1- Une aiguille de prélèvement associée à une pompe péristaltique prélève 7 à 8 ml d'échantillon, une partie chasse l'échantillon précédent de la cellule; il n'y a pas de rinçage entre deux échantillons. La lecture est effectuée après arrêt de la pompe, en phase statique.
- 2- L'acquisition du spectre de l'échantillon démarre alors. La lecture optique est assez rapide (2 secondes environ). La partie calcul est un peu plus longue.
- 3- L'ordinateur procède ensuite au traitement du spectre selon les paramètres établis de calibration; cette étape est quasiment instantanée. Si plusieurs paramètres sont recherchés, le spectre peut être lu pour autant de paramètres voulus sans que la durée de l'analyse en soit significativement modifiée. Pratiquement, plus de vingt paramètres peuvent ainsi être déterminés en un seul passage.
- 4- Les résultats sont affichés à l'écran.

Entre le moment du prélèvement, et l'affichage des résultats à l'écran, il s'écoule 30 secondes. En version automatisée, le Winescan traite donc 120 échantillons à l'heure. Si l'on considère que pour chaque échantillon il peut être fait jusqu'à une vingtaine de paramètres, ce sont 2 400 déterminations à l'heure qui sont ainsi réalisées. On mesure là l'extraordinaire puissance de la méthode. Aucun réactif chimique n'est mis en œuvre.

Les échantillons doivent être suffisamment propres, mais une filtration ne s'avère nécessaire que dans le cas de moûts frais ou en début de fermentation. Les vins finis peuvent donc être directement présentés à l'appareil sans préparation préalable. La seule précaution qu'il faut avoir est de surveiller la teneur en CO_2 du produit analysé. Une teneur supérieure à 1 500 mg/l peut perturber l'analyse. Dans ce cas, il suffit de dégazer partiellement l'échantillon en utilisant, par exemple, un bain à ultrasons. Le dosage du CO_2 faisant partie des paramètres disponibles, il est facile de surveiller les teneurs excessives et d'intervenir en cas de besoin.

3 Résultats

Nous avons utilisé l'I.R.T.F. depuis deux années maintenant et testé cette méthode sur environ 200 000 échantillons. Des calibrations ont été réalisées sur des vins, des moûts, des moûts en fermentation et des Vins Doux Naturels. Les paramètres suivants sont actuellement exploités en routine (tableau 1) :

T.A.V.	Acide acétique
Glucose/fructose	Acide tartrique
Acidité totale	CO_2
PH	Glycérol
Acide malique	Acide gluconique
Acide lactique	Saccharose
Indice de polyphénols totaux (vins rouges)	

Tableau 1- Liste des paramètres actuellement exploités en routine.

Tableau 2- Calibration des paramètres en I.R.T.F. par rapport aux méthodes d'analyse de référence.

	T.A.V.			Glucose Fructose			Indice de polyphénols			Acidité totale			pH			Acide Malique			Acide Lactique			
	8,7-14,3 %Vol			0-150 g/l			20-80 (indice de Folin)			2,4-5,3 gH ₂ SO ₄ /l			2,48-3,71			0-3 g/l			0-1,7 g/l			
<i>Arrondi au 1/100^e</i>	IRTF	Ref. (J.O.)	Ref. (Lab.)	IRTF	Ref. (J.O.)	Ref. (Lab.)	IRTF	Ref. (J.O.)	Ref. (Lab.)	IRTF	Ref. (J.O.)	Ref. (Lab.)	IRTF	Ref. (J.O.)	Ref. (Lab.)	IRTF	Ref. (J.O.)	Ref. (Lab.)	IRTF	Ref. (J.O.)	Ref. (Lab.)	
Répétabilité	r	0,05	0,10	0,13	1,12	0 à 8,40	3,93	2,62	1	6,49	0,08	0,04	0,18	0,07		0,15	0,28	0,03 à 0,13	0,22	0,11	0,02 à 0,13	0,08
Ecart type Répétabilité	Sr	0,02	0,03	0,05	0,40	0 à 3	1,40	0,94	0,35	2,32	0,03	0,01	0,06	0,02		0,05	0,10	0,01 à 0,04	0,08	0,04	0,07 à 0,04	0,03
Ecart moyen/référence	D	-0,02			0,63			0,12			-0,06			-0,02		0,04				0,05		
Ecart type Ecart moyen	Sd	0,08			2,41			4,35			0,07			0,06		0,12				0,30		

Une partie d'entre eux ont été validés par comparaison à la méthode de référence O.I.V., selon le protocole O.I.V. de validation d'analyse usuelle par rapport à la méthode de référence O.I.V. Les caractéristiques obtenues sont données dans le tableau 2.

Pour les autres paramètres, des validations internes ont été effectuées selon le même protocole par comparaison avec les méthodes usuelles utilisées au laboratoire (tableau 3).

Avec des calibrations de qualité, l'analyse I.R.T.F. se caractérise par sa capacité à donner de très bonnes répétabilités et reproductibilités. Dans de nombreux cas, ces dernières sont meilleures que celles des méthodes usuelles classiques, et souvent même des méthodes de référence.

La justesse de la méthode est directement dépendante de la qualité des calibrations utilisées.

4 Contraintes de la méthode

Pour spectaculaire que soit la technique décrite, elle présente des limites qu'il est impératif de bien connaître pour pouvoir en avoir une parfaite maîtrise.

4.1- Les calibrations

4.1.1- Effets matrice

La méthode de calibration statistique se fonde sur une population d'échantillons ayant certains points communs (région, teneur en sucres, niveau d'acidité etc...). Ceci implique qu'une calibration donnée ne sera pas valable pour tous les types de vins ou de moûts. La matrice joue un rôle important et un produit

dont la matrice sera très différente de celles de la population de calibration, pourra présenter des résultats aberrants.

Il reste cependant possible de développer une calibration robuste à partir d'une base de données où de nombreuses matrices différentes sont représentées. Les aberrations sont ainsi éliminées. Cependant, plus on gagne en robustesse, plus la précision de l'analyse est dégradée. Un compromis doit donc être trouvé entre robustesse et précision de l'analyse, afin de pouvoir traiter le maximum de types de vins avec la même calibration, tout en gardant une précision suffisante pour les exigences de l'analyse œnologique.

Pour notre part, afin de conserver suffisamment de précision dans l'analyse, nous utilisons plusieurs calibrations correspondant à des matrices bien définies :

- Vins finis "secs" (0 à 50 g/l de glucose/fructose) blancs, rosés et rouges.
- Vins moelleux (plus de 50 g/l de sucres) et Vins Doux Naturels.
- Moûts.
- Moûts en fermentation.
- Vins nouveaux en fin de fermentation.

Pour chacune de ces matrices, il a donc été nécessaire de développer des calibrations spécifiques, à partir d'échantillons appartenant à la matrice donnée.

Si l'on souhaite s'affranchir au maximum de l'effet matrice, une calibration doit se faire avec un nombre d'échantillons suffisamment élevé présentant un maximum de diversités et une échelle de valeurs la plus ouverte possible pour le paramètre choisi. L'expérience montre qu'il faut au moins 100 à 150 échantillons pour obtenir une calibration correcte.

Tableau 3- Calibration d'autres paramètres en I.R.T.F. par rapport aux méthodes usuelles de laboratoire.

	AV			CO ₂			Glycérol			Acide gluconique			Acide tartrique			Saccharose		
	0,1-0,8 g/l (H ₂ SO ₄)			300-1500 mg/l			4-17 g/l			0-4 g/l			2-8 g/l			0-100 g/l		
<i>Arrondi au 1/100^e</i>	IRTF	Ref. (J.O.)	Ref. (Lab.)	IRTF	Ref. (J.O.)	Ref. (Lab.)	IRTF	Ref. (J.O.)	Ref. (Lab.)	IRTF	Ref. (J.O.)	Ref. (Lab.)	IRTF	Ref. (J.O.)	Ref. (Lab.)	IRTF	Ref. (J.O.)	Ref. (Lab.)
Répétabilité	r	0,025	0,019	0,011	12		39	0,45		2,556	0,24		0,16	0,28		1,49		
Ecart type Répétabilité	Sr	0,009	0,006	0,004	4		14	0,161		0,91	0,08		0,05	0,1		0,53		
Ecart moyen/référence	D	-0,007			16			-0,84			-0,08		0,06			0,11		
Ecart type Ecart moyen	Sd	0,022			84			1,315			0,35		0,11			0,95		

Il convient de noter cependant que l'effet matrice est beaucoup moins sensible en I.R.T.F. que sur les appareils infrarouges à filtres en raison du plus grand nombre de longueurs d'onde spécifiques prises en compte pour chaque composé donné.

4.1.2- Spécificité

Des tests ont été réalisés en ajoutant à différents vins plusieurs adjuvants classiques du vin, à la dose légale maximale, et à 2 fois cette dose. Pour tous les paramètres exploités, la comparaison des résultats a été faite. Les résultats dans le cas de l'analyse du glucose et du fructose sont donnés dans la figure 4 suivante :

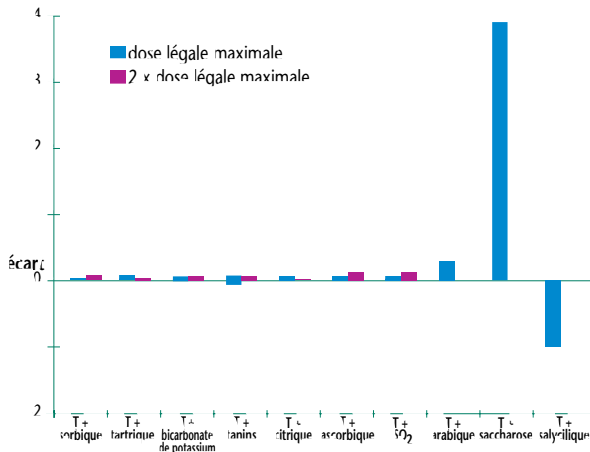


Figure 4- Incidence de plusieurs adjuvants classiques des vins sur l'analyse du glucose et du fructose.

Il apparaît clairement que les adjuvants classiques n'ont pas d'effet sur l'analyse. Comme ils étaient naturellement présents dans de nombreux vins ayant servi à la calibration, ils ont été pris en compte par la machine et leur effet a été naturellement éliminé. Par contre, dans l'exemple choisi, le saccharose, qui n'était pas présent dans les vins ayant servi à la calibration, apporte une déviation importante. Un laboratoire qui teste régulièrement des vins contenant du saccharose devra développer une calibration à partir de vins de ce type. De même, l'acide salicylique, qui est un adjuvant non autorisé dans le vin mais utilisé pour stabiliser des échantillons destinés à certaines analyses officielles crée des déviations importantes de l'analyse.

Il convient de rappeler ici que le manque de spécificité n'est pas exclusif à ce type d'analyse. La pycnométrie, par exemple, est tout à fait incapable de détecter la présence de méthanol dans le vin et donne, dans ce cas, un résultat de titre alcoométrique volumique erroné.

4.1.3- Précision de l'analyse

Une importance particulière doit être accordée à la qualité des valeurs de référence des échantillons de la base de données de calibration. En effet plus les valeurs de référence seront justes, plus le traitement statistique sera fin et aboutira à une calibration de qualité.

On considère que la qualité de l'analyse est détériorée d'un facteur 1,2 à 1,7 par rapport à l'analyse utilisée pour les valeurs de référence.

On observe également que chaque échantillon de référence a un poids important pour la qualité de la calibration. En effet, il suffit de 2 à 3 % de valeurs de référence erronées pour faire chu-

ter la qualité de la calibration. Les modèles statistiques sont extrêmement sensibles.

4.2- Les paramètres analysables

L'I.R.T.F. permet de tester de nombreux composés organiques. Il reste cependant que cette méthode n'est pas absolue.

En premier lieu, la sensibilité d'une molécule à l'autre est assez variable selon que celle-ci présente des absorptions plus ou moins intenses dans l'infrarouge ou même que les principales longueurs d'onde absorbées soient très proches de celles des composés majeurs du vin (l'eau, l'éthanol, le glycérol etc...), ce qui provoque des phénomènes de masquage.

En second lieu, il s'agit d'une technique de macro-dosage. Cela veut dire que la précision tombe rapidement pour les faibles concentrations. Ainsi, de nombreux composés organiques, présents en quantités faibles, ne peuvent être dosés. Les valeurs les plus basses qui peuvent être détectées se situent, dans les meilleurs des cas, autour de 100 mg/l.

Il convient de signaler le cas particulier du dioxyde de soufre. La calibration du SO₂ total s'est avérée d'une précision intéressante. Elle est cependant extrêmement sensible à l'effet matrice. Dans des régions où les vins sont issus de cépages similaires et sont eux-mêmes proches les uns des autres, une telle calibration pourrait être fonctionnelle. Le SO₂ libre reste, quant à lui, très mal résolu.

Le dosage de l'acide sorbique est réalisable mais il manque de précision pour les valeurs faibles (inférieures à 75 mg/l). Des approches très encourageantes sont actuellement en cours sur la mesure de l'intensité colorante ou celle de la masse volumique. Le potentiel de développement à d'autres composés organiques semble largement ouvert.

CONCLUSION

Bien que l'analyse par I.R.T.F. existe depuis déjà quelques années dans plusieurs secteurs agroalimentaires et industriels, l'œnologie n'a accédé à cette technique que très récemment.

Cette méthode physique multiparamétrique s'avère très efficace pour les moûts et les vins et devrait permettre aux laboratoires d'augmenter sensiblement l'information analytique qu'ils peuvent donner. Différentes contraintes sont cependant à prendre en compte :

- *Le développement des calibrations doit être fait avec beaucoup de rigueur dans le choix des échantillons, dans la qualité des analyses de référence, et doit compter un nombre suffisant d'échantillons.*
- *En l'état actuel des choses, il n'est pas concevable de pouvoir analyser tous les types de vins avec une même calibration. Selon les contextes, des ségrégations de matrices doivent être opérées.*
- *Malgré ses étonnantes capacités, il ne s'agit pas d'un analyseur universel, même s'il est appelé à devenir un outil incontournable dans les laboratoires d'œnologie.*
- *Enfin, la qualité de l'appareil d'analyse choisi est primordiale. Des choix techniques faits par les constructeurs de l'appareil, notamment en ce qui concerne la cellule et le système hydraulique de pompage du vin, la partie optique et les logiciels de traitement, découlent la qualité de l'analyse, sa répétabilité, sa reproductibilité, et la possibilité de travailler avec des cadences élevées, avec une bonne fiabilité.*