

RÉSOLUTION OIV-OENO 527-2015

DÉTERMINATION DE LA RÉPARTITION DU DEUTÉRIUM DANS L'ACIDE ACÉTIQUE ISSU DU VINAIGRE DE VIN PAR RÉSONANCE MAGNÉTIQUE NUCLÉAIRE (RMN)

L'ASSEMBLÉE GÉNÉRALE,

VU l'article 2 paragraphe 2 iv de l'Accord du 3 avril 2001 portant création de l'Organisation internationale de la vigne et du vin,

SUR PROPOSITION de la Sous-commission « Méthodes d'analyse »,

DÉCIDE de compléter le Recueil des [méthodes internationales d'analyse des vinaigres de vin](#) avec la méthode suivante :

Détermination de la répartition du deutérium dans l'acide acétique issu du vinaigre de vin par résonance magnétique nucléaire (RMN)

Méthode de type : IV

1. Objectif / Domaine d'application

Cette méthode permet l'analyse du rapport isotopique de l'hydrogène $(D/H)_{CH_3}$ au niveau du groupement méthylique de l'acide acétique extrait du vinaigre de vin conformément au mode opératoire décrit dans la méthode OIV-OENO 510-2013.

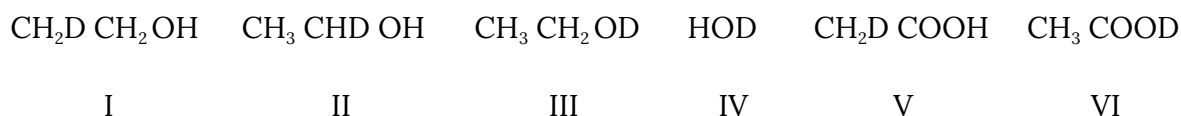
L'analyse est réalisée par RMN- 1H et RMN-FINS- 2H en utilisant une séquence composite de RMN (Fauhl et al., 1996; Hermann, 2001). L'expérimentation RMN- 1H est utilisée pour déterminer le rapport entre le tétraméthylurée (TMU) et l'acide acétique, utilisé par la suite, en conjonction avec les résultats de l'expérimentation RMN-FINS- 2H , pour le calcul du ratio isotopique $(D/H)_{CH_3}$. Si l'acide acétique extrait est pur (> 99%) ou que la teneur exacte en acide acétique de l'extrait est connue, il n'est pas nécessaire de réaliser l'expérimentation RMN- 1H .

2. Définitions

$(D/H)_{CH_3}$: rapport isotopique associé à la molécule $CH_2D COOH$

3. Principe

Le deutérium contenu dans les sucres et l'eau du moût de raisin est réparti de nouveau après fermentation dans les molécules I, II, III et IV de l'éthanol du vin et après fermentation acétique dans les molécules V et VI de l'acide acétique :



Le paramètre D/H_{CH_3} exprime le rapport D/H des sucres dans le moût.

4. Réactifs et produits

- Hexafluorobenzène utilisé comme substance de stabilisation champ-fréquence (blocage), ou, alternativement, acide trifluoroacétique (TFA, CAS n° 76-05-1) ou anhydride trifluoroacétique (TFAA, CAS n° 407-25-0)
- N,N-tétraméthylurée standard (TMU) ; TMU standard avec un rapport isotopique D/H étalonné.
- tubes échantillons RMN (sondes),
- filtre de 0,45 μm .

5. Appareillage

- Spectromètre RMN équipé d'une sonde spécifique « deutérium » réglé à la fréquence caractéristique ν_0 du champ B_0 (par exemple pour $B_0 = 7,05 \text{ T}$, $\nu_0 = 46,05 \text{ MHz}$ et pour $B_0 = 9,4 \text{ T}$, $\nu_0 = 61,4 \text{ MHz}$), possédant un canal de découplage du proton (B_2) et un canal de stabilisation champ-fréquence (lock) à la fréquence du fluor. Le second canal, B_2 , est également utilisé pour l'expérimentation RMN- ^1H . La résolution mesurée sur le spectre, transformée sans multiplication exponentielle (c.-à-d. $\text{LB} = 0$) et exprimée par la largeur à mi-hauteur du signal méthyle de l'acide acétique et du signal méthyle du TMU, doit

être inférieure à 0,5 Hz. La sensibilité (rapport signal-bruit), mesurée avec un facteur de multiplication exponentielle LB égal à 2, doit être supérieure ou égale à 150 pour le signal du méthyle de l'acide acétique contenant moins de 25 % d'eau. Par exemple, en utilisant un spectromètre RMN de champ $B_0 = 7,05 \text{ T}$, 200 explorations sont requises pour atteindre cette valeur,

- balance d'une précision de 0,1 mg ou supérieure,
- balance d'une précision de 0,1 g ou supérieure.

L'appareillage et les consommables de laboratoire indiqués aux points 5 et 6 sont des exemples et peuvent être remplacés par d'autres équipements présentant des performances équivalentes.

6. Préparation des échantillons

L'acide acétique doit être extrait du vinaigre et purifié afin d'être analysé par RMN-FINS. Au moins 6 mL d'acide acétique pur doit être recueilli à la fin de l'extraction.

La procédure d'extraction et de purification est décrite dans la méthode OIV 510-2013.

7. Mode opératoire

Remarque préliminaire : la quantité et le type de réactifs ainsi que les conditions instrumentales dépendent du type d'appareillage utilisé. La procédure décrite dans la présente n'est fournie qu'à titre d'exemple.

Toutes les étapes préparatoires doivent être réalisées sans évaporation significative de l'acide acétique, car ceci modifierait la composition isotopique de l'échantillon.

7.1. Préparation de l'échantillon d'acide acétique pour la mesure RMN

Tubes RMN de 10 mm de diamètre : dans une fiole précédemment pesée, recueillir 3,25 g de la solution contenant l'acide acétique obtenue comme indiqué au point 6 et peser à 0,1 mg près (m_A) ; puis ajouter 1,1 g d'étalon interne TMU et peser à nouveau à 0,1 mg près (m_B).

En fonction du type de spectromètre et de sonde utilisés, ajouter une quantité suffisante d'hexafluorobenzène comme substance de stabilisation champ-fréquence (lock) :

Spectromètre sonde de	10 mm
7,05 T	150 μ L
9,4 T	35 μ L

Ces chiffres sont indicatifs et le volume réel à utiliser doit être ajusté en fonction de la sensibilité de l'instrument RMN. Pendant la préparation de la sonde jusqu'à la mesure RMN, l'opérateur doit veiller à éviter toute évaporation d'acide acétique et de TMU, car ceci occasionnerait un fractionnement isotopique

L'échantillon est ensuite introduit dans la sonde RMN, et, si nécessaire, filtré au moyen d'une seringue équipée d'un filtre de 0,45 microns.

N.B. : La sonde RMN doit être préparée sous hotte en portant des gants et des lunettes de protection.

7.2. Acquisition du spectre RMN

Les conditions suivantes sont recommandées pour l'acquisition du spectre RMN-FINS- ^2H :

- La température de la sonde doit être constante (par ex. 303 K),
- L'échantillon doit subir une rotation (par ex. 15-20 Hz),
- Le temps d'acquisition doit être d'au moins 5,5 s pour une largeur spectrale de 1 200 Hz (mémoire de 16 K) (c.-à-d. environ 20 ppm à 61,4 MHz ou 27 ppm à 46,1 MHz),
- Angle d'impulsion de 90 °,
- Ajustement du temps d'acquisition : sa valeur doit être du même ordre que le temps d'échantillonnage,
- Détection en quadrature : fixer l'offset 01 entre les signaux de référence OD et CH_2D pour l'acide acétique,
- Déterminer la valeur de l'offset de découplage 02 à partir du spectre protonique mesuré par la bobine de découplage sur le même tube. Un bon découplage est obtenu quand 02 est situé au milieu de l'intervalle de fréquence existant entre les groupes CH_3 - et TMU. Utiliser le mode de découplage large bande ou des trains

d'impulsion composites (per ex. WALTZ16) pour assurer un découplage plus homogène sur l'ensemble du spectre.

Effectuer pour chaque spectre un nombre NS d'accumulations suffisant pour obtenir le rapport signal-bruit indiqué au point 6, et répéter 5 fois cette série de NS accumulations. Les valeurs de NS dépendent des types de spectromètre et de sonde utilisés.

Les conditions suivantes sont recommandées pour l'acquisition du spectre RMN-¹H :

- La température de la sonde doit être constante (par ex. 303 K),
- L'échantillon doit subir une rotation (par ex. 15-20 Hz),
- Le temps d'acquisition doit être d'au moins 4,1 s pour une largeur spectrale de 8 000 Hz (mémoire de 16 K),
- Angle d'impulsion de 30 ° ou inférieur,
- D1 = 7 s au moins,
- Détection en quadrature : fixer l'offset 01 entre les signaux de référence OH et CH₃ pour l'acide acétique,
- Absence de découplage.

Pour RMN-¹H, 16 explorations sont suffisantes + 4 essais afin d'obtenir un rapport signal-bruit approprié. Cinq répétitions sont également requises.

8. Calculs des résultats

Un logiciel adapté se basant sur un algorithme d'ajustement de signal complexe basé sur la méthode des plus petits carrés doit être adopté pour déterminer l'aire du signal (la phase et la ligne de base sont des paramètres sensibles qui doivent être réglés correctement). S'il n'existe pas d'erreurs de phase ou de ligne de base significatives (par ex. en appliquant les corrections appropriées), un autre logiciel peut alors être adopté.

Pour chacun des spectres RMN-¹H, calculer le rapport RH de la manière suivante :

$$RH = S_{\text{TMU}} / S_{\text{acide acétique}}$$

où S est l'aire du signal RMN-¹H, fournie par le logiciel de traitement de données,

conformément à la décroissance d'induction libre soumise à la transformée de Fourier, avec une largeur de bande égale à 0,5 Hz.

Calculer le nombre moyen de répétitions et l'écart type.

Calculer pour chacun des spectres RMN-FINS ^2H :

1. Le rapport RD de la manière suivante :

$$\text{RD} = \text{S}'_{\text{acide acétique}} / \text{S}'_{\text{TMU}}$$

où c'est l'aire du signal RMN-FINS- ^2H , fournie par le logiciel de traitement de données, conformément à la décroissance d'induction libre soumise à la transformation de Fourier, avec une largeur de bande égale à 2 Hz.

2. Le rapport $\text{D}/\text{H}_{\text{CH}_3}$ (ppm) de la manière suivante :

$$(\text{D}/\text{H})_{\text{CH}_3} = \text{RH} * \text{RD} * \text{D}/\text{H}_{\text{TMU}}$$

où $(\text{D}/\text{H})_{\text{TMU}}$ est le rapport isotopique de l'étalon interne (TMU) indiqué sur le certificat fourni par l'IRMM.

Calculer le nombre moyen de répétitions et l'écart type.

Un logiciel optionnel permet de réaliser ces calculs en ligne.

9. Maîtrise de la qualité des analyses

Le spectromètre doit être contrôlé en termes de sensibilité et de résolution conformément aux spécifications de l'instrument (5).

10. Caractéristiques de la méthode

Une étude préliminaire a été menée afin de caractériser la méthode.

L'écart type de répétabilité moyen (S_r) est de 0,4 ppm et la limite de répétabilité moyenne (r) est de 1,0 ppm.

L'écart type de reproductibilité moyen (S_R) est de 0,5 ppm et la limite de reproductibilité moyenne (R) est de 1,4 ppm.

Les détails et résultats de cette étude sont présentés en annexe A.

La limite de répétabilité moyenne (r) et la limite de reproductibilité moyenne (R) sont comparables à celles observées pour l'alcool et le vin (OIV 426-2011).

11. Bibliographie

1. A. Hermann (2001). Determination of D/H isotope ratio in acetic acid from vinegars and pickled products by H-2-NMR spectroscopy Eur Food Res Techn 212 683-686
2. C. Faulh, R. Wittkowski (1996). On-line ^1H -NMR to facilitate tube preparation in SNIF-NMR analysis, Z Lebensm Unters Forsch (1996) 541-545
3. Murat, M. L., Dumeau, F. (2009). (^2H) NMR and (^{13}C) -IRMS analyses of acetic acid from vinegar, (^{18}O) -IRMS analysis of water in vinegar: International collaborative study report. *Analytica Chimica Acta*, 649, 98-105.
4. Méthode OIV-OENO 510-2013 : Méthode de détermination du rapport isotopique $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de l'acide acétique dans le vinaigre de vin par spectrométrie de masse isotopique.
5. Méthode OIV-OENO 426-2011 : Détermination de la répartition du deutérium dans l'éthanol issu de moûts de raisins fermentés, moûts de raisins concentrés, moûts de raisins concentrés rectifiés et de vins par résonance magnétique nucléaire.

ANNEXE A :

RÉSULTATS DE L'ÉTUDE DE CARACTÉRISATION

Ce document présente les résultats de l'étude de caractérisation de la méthode d'analyse pour la détermination du rapport $(\text{D}/\text{H})_{\text{CH}_3}$ dans l'acide acétique issu du vinaigre de vin.

Une étude de répétabilité interne a été réalisée sur 2 échantillons de vinaigre. Les résultats sont présentés dans le tableau suivant :

La répétabilité interne a été calculée sur la base des 2 échantillons extraits et analysés 10 fois.

Répétition	Échantillon	
	Échantillon 1	2
	$(\text{D}/\text{H})_{\text{CH}_3}$	$(\text{D}/\text{H})_{\text{CH}_3}$

1	100,8	104,9
2	101,7	104,9
3	100,9	104,7
4	101,3	104,4
5	101,0	104,9
6	102,1	104,8
7	101,8	104,5
8	101,2	104,6
9	101,6	104,3
10	101,0	104,8
Sr	0,4	0,2
Limite de répétabilité r ($2,8 \times S_r$)	1,2	0,6

Une étude collaborative internationale impliquant 3 laboratoires a été menée en 2012.

1. Laboratoires participants

Trois laboratoires ont participé à l'étude :

Eurofins, Nantes

France

FEM-IASMA, San Michele all'Adige, Trente

Italie

Landesuntersuchungsamt, Speyer

Allemagne

2. Échantillons

L'étude a inclus 4 échantillons de vinaigre de vin (n° 1 à 4) et 6 échantillons (n° 5 à 10) produits à partir de vins enrichis avec des pourcentages croissants (10, 14, 20, 33, 40 et 42 %) d'alcool de canne à sucre puis soumis à une fermentation acétique. L'acide acétique a été extrait de chaque échantillon et le rapport $(D/H)_{CH_3}$ analysé. Les résultats sont présentés dans le tableau suivant :

Échantillon	$(D/H)_{CH_3}$			SR	Limite de reproductibilité R ($2,8 \times S_R$)
	lab1	lab2	lab3		
1	104,8	105,4	104,8	0,4	1,1
2	105,0	105,0	104,5	0,3	0,8
3	106,0	106,0	104,8	0,7	2,0
4	106,2	106,5	106,9	0,3	0,8
5	106,9	106,6	106,6	0,2	0,6
6	107,7	108,2	107,6	0,3	0,8
7	107,3	107,9	107,3	0,3	0,8
8	108,5	107,5	108,6	0,6	1,7
9	109,2	109,2	107,9	0,8	2,2
10	108,9	109,5	107,5	1,0	2,8
SR moyen				0,5	1,4