

RÉSOLUTION OIV/OENO 381/2009

ACTUALISATION DU RECUEIL DES METHODES INTERNATIONALES D'ANALYSE DES BOISSONS SPIRITUEUSES D'ORIGINE VITIVINICOLES – PARTIE 3

L'ASSEMBLEE GENERALE

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

VU les actions du plan stratégique de l'OIV 2005-2008 en particulier celle qui vise à réorganiser les publications relatives aux méthodes d'analyse vitivinicoles

CONSIDERANT les travaux de la sous-commission des méthodes d'analyse

VU l'édition de 1994 du Recueil des méthodes internationales d'analyse des boissons spiritueuses, des alcools et de la fraction aromatique des boissons

VU le recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts

CONSIDERANT que les méthodes décrites ci-dessous sont également décrites dans le recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts avec des paramètres de validation interlaboratoires.

CONSIDERANT que le principe de ces méthodes réside en une mesure des paramètres concernés sur la fraction d'éthanol obtenue ;

DECIDE d'incorporer ces méthodes dans la nouvelle édition du Recueil des méthodes internationales d'analyse des boissons spiritueuses d'origine vitivinicoles.

Détermination par spectrométrie de masse isotopique du rapport d'isotopes $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de l'éthanol des boissons spiritueuses d'origine vitivinicole

Méthode de type II

Année : 2009

1. CHAMP D'APPLICATION

La méthode permet la mesure du rapport isotopique $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de l'éthanol des boissons spiritueuses d'origine vitivinicole.

2. REFERENCES NORMATIVES

- ISO 5725 : 1994 « Fidélité des méthodes d'essai- Détermination de la répétabilité et de la reproductibilité d'une méthode d'essai normalisée par essais interlaboratoires. »
- V-PDB : Vienna-Pee-Dee Belemnite ($R_{\text{PDB}} = 0,0112372$).
- Méthode OIV : «Détection de l'enrichissement des moûts , des moûts concentrés, du sucre de raisin et des vins par application de la résonance magnétique nucléaire du deutérium (RMN-FINS): »

3. TERMES ET DEFINITIONS

$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$: rapport des isotopes du carbone 13 et du carbone 12 pour un échantillon donné

$\delta^{13}\text{C}$: teneur en carbone 13 (^{13}C) exprimée en parties pour mille (‰)

RMN-FINS : Fractionnement Isotopique Naturel Spécifique étudié par Résonance Magnétique Nucléaire

V-PDB : Vienna-Pee-Dee Belemnite. Le PDB, référence primaire pour la mesure des variations naturelles des teneurs isotopiques en carbone 13, était un carbonate de calcium provenant d'un rostre de bélemnite du Crétacé de la formation Peedee de la Caroline du sud (USA). Son rapport isotopique $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ou R_{PDB} est

$R_{\text{PDB}} = 0,0112372$. Le PDB est épuisé depuis longtemps mais est resté la référence primaire pour exprimer les variations naturelles des teneurs isotopiques en carbone 13, contre laquelle sont calibrés les matériaux de référence, disponibles à l'Agence Internationale de l'Energie Atomique (IAEA) à Vienne (Autriche).

Les déterminations isotopiques des abondances naturelles en carbone 13 sont alors exprimées, par convention, par rapport au V-PDB.

m/z : rapport masse sur charge

4. PRINCIPE

Lors de la photosynthèse, l'assimilation du gaz carbonique par les végétaux s'effectue selon deux principaux types de métabolismes qui sont les métabolismes C₃ (cycle de Calvin) et C₄ (Hatch et Slack). Ces deux mécanismes de photosynthèse présentent un fractionnement isotopique différent. Ainsi, les produits issus des plantes C₄, tel que les sucres et l'alcool dérivé par fermentation, présentent des teneurs en carbone 13 plus élevées que celles de leurs homologues provenant des plantes C₃. La plupart des végétaux tels que la vigne et la betterave, appartiennent au groupe C₃. La canne à sucre et le maïs appartiennent au groupe C₄. La mesure de la teneur en carbone 13 permet donc la détection et la quantification du sucre d'origine C₄ (sucre de canne ou l'isoglucose de maïs) ajouté aux produits dérivés du raisin (moûts de raisins, vins...). Les informations combinées de la teneur en carbone 13 avec celles obtenues par RMN-FINS permettent également la quantification de l'addition de mélanges de sucres ou d'alcools d'origine des plantes C₃ et C₄.

La teneur en carbone 13 est déterminée sur le gaz carbonique résultant de la combustion complète de l'échantillon. Les abondances des principaux isotopomères de masses 44 (¹²C¹⁶O₂), 45 (¹³C¹⁶O₂ et ¹²C¹⁷O¹⁶O) et 46 (¹²C¹⁶O¹⁸O), résultant des différentes combinaisons possibles des isotopes ¹⁸O, ¹⁷O, ¹⁶O, ¹³C et ¹²C, sont déterminées à partir des courants ioniques mesurés sur trois collecteurs différents d'un spectromètre de masse isotopique. Les contributions des isotopomères ¹³C¹⁷O¹⁶O et ¹²C¹⁷O₂ peuvent être négligées en raison de leur très faible abondance. Le courant ionique pour m/z = 45 est corrigé de la contribution de ¹²C¹⁷O¹⁶O qui est calculée en fonction de l'intensité du courant mesuré pour m/z = 46 en considérant les abondances relatives de ¹⁸O et ¹⁷O (correction de Craig). La comparaison avec une référence calibrée contre la référence internationale V-PDB permet le calcul de la teneur en carbone 13 sur l'échelle relative $\delta^{13}\text{C}$.

5. REACTIFS

Les matériaux et les consommables dépendent de l'appareillage (6) utilisé par le laboratoire. Les systèmes généralement utilisés sont ceux fondés sur l'analyseur

élémentaire. Celui ci peut être équipé pour l'introduction d'échantillons placés dans des capsules métalliques scellées, ou pour l'injection d'échantillons liquides à travers un septum au moyen d'une seringue.

Selon le type d'instrumentation utilisé, les matériaux de référence, réactifs et consommables suivants peuvent être utilisés :

- Matériaux de référence disponibles auprès de l'IAEA :

Nom	Matériel	$\delta^{13}\text{C}$ versus V-PDB (9)
- IAEA-CH-6	Saccharose	-10,4 ‰
-IAEA-CH-7	polyéthylène	-31,8 ‰
- NBS22	Huile	-29,7 ‰
- USGS24	Graphite	-16,1 ‰

Disponibles auprès de l'IRMM de Geel (B) (Institut des Matériaux et Mesures de Référence) :

Nom	Matériel	$\delta^{13}\text{C}$ versus V-PDB (9)
- CRM 656	Alcool de vin	-26,93 ‰
- CRM 657	Glucose	-10,75 ‰
- CRM 660	Solution hydroalcoolique (TAV 12%)	-26,72 ‰

Echantillon standard de travail ayant un rapport $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ connu calibré contre les matériaux de référence internationaux.

La liste indicative de consommables ci-dessous est établie pour les systèmes à flux continu :

- Hélium pour analyse (CAS 07440-59-7)
- Oxygène pour analyse (CAS 07782-44-7)
- Dioxyde de carbone pour analyse, utilisé comme gaz de référence secondaire pour la teneur en carbone 13 (CAS 00124-38-9)
- Réactif d'oxydation pour le four du système de combustion comme par exemple oxyde de cuivre (□□) pour analyse élémentaire (CAS 1317-38-0)
- Desséchant pour éliminer de l'eau produite par la combustion. Par exemple anhydride pour analyse élémentaire (perchlorate de magnésium) (CAS 10034-81-8).

Non nécessaire pour les appareillages équipés avec un système d'élimination de l'eau par cryopiégeage ou au moyen d'un capillaire sélectivement perméable.

6. APPAREILLAGE ET MATERIEL

6.1. Spectromètre de masse de rapport isotopique (SMRI)

Spectromètre de masse de rapport isotopique (SMRI), permettant de déterminer la teneur relative de ^{13}C du gaz CO_2 en abondance naturelle avec une précision interne de 0,05 ‰ ou mieux exprimée en valeur relative (9). La précision interne est ici définie comme la différence entre deux mesures du même échantillon de CO_2 . Le spectromètre de masse, destiné à la mesure des rapports isotopiques, est généralement équipé d'un collecteur triple pour mesurer simultanément les intensités pour $m/z = 44, 45$ et 46 . Le spectromètre de masse de rapport isotopique doit, soit être équipé d'un système d'introduction double, pour mesurer en alternance l'échantillon inconnu et un échantillon de référence, soit utiliser un système intégré qui effectue la combustion quantitative des échantillons et sépare le dioxyde de carbone des autres produits de combustion préalablement à la mesure dans le spectromètre de masse.

6.2. Appareillage de combustion

Appareillage de combustion capable de convertir quantitativement l'éthanol en dioxyde de carbone et d'éliminer tous les autres produits de combustion y compris l'eau sans aucun fractionnement isotopique. L'appareillage peut être, soit un système à flux continu intégré à l'instrumentation de spectrométrie de masse (6.2.1), soit un

système de combustion autonome (6.2.2). L'appareillage doit permettre d'obtenir une précision au moins équivalente à celle indiquée en (11).

6.2.1. Systèmes à flux continu

Ceux-ci sont constitués soit par un analyseur élémentaire, soit par un chromatographe en phase gazeuse équipé d'un système de combustion en ligne.

Pour les systèmes équipés pour l'introduction des échantillons contenus dans des capsules métalliques, le matériel de laboratoire suivant est utilisé :

- Micropipette volumétrique avec cônes appropriés
- Balance à 1 µg de précision ou mieux
- Pince pour encapsulage
- Capsules d'étain pour échantillons liquides
- Capsules d'étain pour échantillons solides

Lors de l'utilisation d'un analyseur élémentaire équipé d'un injecteur pour liquides ou dans le cas d'un système de préparation par chromatographie-combustion, le matériel de laboratoire suivant est utilisé :

- Seringue pour liquides
- Flacons équipés d'un système de fermeture étanche et de septainertes.

Les matériels de laboratoire indiqués dans les listes ci-dessus constituent des exemples et sont susceptibles d'être remplacés par d'autres matériels de performances équivalentes selon le type d'appareillage de combustion et de spectrométrie de masse utilisé par le laboratoire.

6.2.2. Systèmes autonomes de préparation

Dans ce cas, les échantillons de dioxyde de carbone résultant de la combustion des échantillons à analyser et de la référence sont collectés dans des ampoules qui sont ensuite installées au double système d'entrée du spectromètre pour réaliser l'analyse isotopique. Plusieurs types d'appareillages de combustion décrits dans la littérature sont utilisables:

- Système clos de combustion rempli avec du gaz oxygène circulant

- Analyseur élémentaire avec flux d'hélium et d'oxygène
- Ampoule scellée en verre remplie avec de l'oxyde de cuivre (CuO) comme agent d'oxydation

7. PREPARATION DES ECHANTILLONS POUR ESSAI

L'éthanol doit être extrait à partir de la boisson spiritueuse avant détermination isotopique. Cette extraction est effectuée par la distillation de la boisson comme décrit dans §3.1 de la méthode RMN-FINS pour la détermination par RMN de la distribution de deutérium dans l'éthanol des boissons spiritueuses d'origine vitivinicole.

8. MODE OPERATOIRE

Toutes les étapes préparatoires doivent être effectuées sans aucune perte significative d'éthanol par évaporation qui changerait la composition isotopique de l'échantillon.

La description qui suit fait référence aux procédures généralement utilisées pour la combustion des échantillons d'éthanol au moyen des systèmes automatisés de combustion commerciaux. Toute autre méthode, assurant que l'échantillon d'éthanol est quantitativement converti en dioxyde de carbone sans aucune perte par évaporation d'éthanol peut convenir pour la préparation du dioxyde de carbone pour l'analyse isotopique.

Procédure expérimentale fondée sur l'utilisation d'un analyseur élémentaire :

a. Mise en capsule des échantillons :

- Utiliser des capsules, une pince et un plateau de préparation propres
- Prendre une capsule de la dimension appropriée à l'aide de la pince
- Introduire le volume nécessaire de liquide dans la capsule à l'aide de la micropipette

Note: 3,84 mg d'éthanol absolu ou 4,17 mg de distillat ayant un titre alcoolique de 92% m/m sont nécessaires pour obtenir 2 mg de carbone. La quantité appropriée de distillat doit être calculée de la même manière selon la quantité de carbone nécessaire en fonction de la sensibilité de l'instrumentation de spectrométrie de masse.

- Refermer la capsule à l'aide des pinces.
 - Chaque capsule doit être fermée de façon absolument étanche. En cas contraire, elle doit être rejetée et une nouvelle capsule doit être préparée.
 - Pour chaque échantillon, préparer deux capsules.
 - Placer les capsules à l'endroit approprié sur le plateau du passeur automatique d'échantillon de l'analyseur élémentaire. Chaque capsule doit être soigneusement identifiée par un numéro d'ordre.
 - Placer systématiquement des capsules contenant les références de travail au début et à la fin de la série d'échantillons.
 - Insérer régulièrement des échantillons de contrôle dans la série d'échantillons.
- b. Contrôle et ajustement de l'instrumentation d'analyse élémentaire et de spectrométrie de masse
- Ajuster la température des fours de l'analyseur élémentaire et les flux de gaz d'hélium et d'oxygène pour une combustion optimale de l'échantillon.
 - Vérifier l'absence de fuite dans le système d'analyse élémentaire et de spectrométrie de masse (par exemple en contrôlant le courant ionique pour $m/z = 28$ correspondant à N_2).
 - Ajuster le spectromètre de masse pour mesurer les intensités des courants ioniques pour $m/z = 44, 45$ et 46 .
 - Vérifier le système à l'aide d'échantillons de contrôle connus avant de commencer les mesures sur les échantillons.
- c. Déroulement d'une série de mesures

Les échantillons placés sur le passeur automatique d'échantillons de l'analyseur élémentaire (ou du chromatographe) sont introduits successivement. Le dioxyde de carbone de chaque combustion d'échantillon est élué vers le spectromètre de masse qui mesure les courants ioniques. L'ordinateur interfacé à l'instrumentation enregistre les intensités des courants ioniques et calcule les valeurs α pour chaque échantillon (9).

9. CALCUL

L'objectif de la méthode est de mesurer le rapport isotopique $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de l'éthanol extrait à partir de la boisson spiritueuse. Le rapport isotopique $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ peut être exprimé par sa déviation par rapport à une référence de travail. La déviation isotopique carbone 13 ($\delta^{13}\text{C}$) est alors calculée sur une échelle delta pour mille par comparaison des résultats obtenus pour l'échantillon à mesurer contre ceux de la référence de travail précédemment calibrée par rapport à la référence primaire internationale (V-PDB). Les valeurs $\delta^{13}\text{C}$ sont exprimées par rapport à la référence de travail selon :

$$\bullet \delta^{13}\text{C}_{\text{ech/ref}} \text{‰} = 1000 \times (R_{\text{ech}} - R_{\text{ref}}) / R_{\text{ref}}$$

où R_{ech} et R_{ref} sont respectivement les rapports isotopiques $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de l'échantillon et ceux de la référence de travail.

Les valeurs $\delta^{13}\text{C}$ sont alors exprimées par rapport au V-PDB selon :

$$\bullet \delta^{13}\text{C}_{\text{ech/V-PDB}} \text{‰} = \delta^{13}\text{C}_{\text{ech/ref}} + \delta^{13}\text{C}_{\text{ref/V-PDB}} + (\delta^{13}\text{C}_{\text{ech/ref}} \times \delta^{13}\text{C}_{\text{ref/V-PDB}}) / 1000$$

où $\delta^{13}\text{C}_{\text{ref/V-PDB}}$ est la déviation isotopique préalablement déterminée pour la référence de travail contre le V-PDB.

Pendant la mesure en ligne des petites dérives dues à la variation, des conditions instrumentales peuvent être observées. Dans ce cas, les $\delta^{13}\text{C}$ des échantillons doivent être corrigés en fonction de la différence de la valeur $\delta^{13}\text{C}$ de la référence de travail et sa valeur vraie, précédemment calibrée contre le V-PDB par comparaison avec l'un des matériaux de référence international. Entre deux mesures de la référence de travail, la dérive et donc la correction à appliquer aux résultats des échantillons peuvent être assumées linéaires. La référence de travail doit être mesurée en début et en fin de toute série d'échantillons. Une correction peut ensuite être calculée pour chaque échantillon au moyen d'une interpolation linéaire entre les deux valeurs des différences entre la valeur assignée à la référence de travail et les mesures de valeurs obtenues.

10. ASSURANCE QUALITE ET CONTROLE

Contrôler que la valeur ^{13}C pour la référence de travail ne diffère pas de plus de 0,5‰ de la valeur admise. En cas contraire, les réglages de l'instrumentation du spectromètre devront être contrôlés et éventuellement réajustés.

Pour chaque échantillon, vérifier que la différence de résultat entre les deux capsules mesurées successivement est inférieure à 0,3 ‰. Le résultat final pour un échantillon donné est alors la valeur moyenne des deux capsules. Si la déviation est plus élevée que 0,3‰, la mesure doit être répétée.

Un contrôle du fonctionnement correct de la mesure peut être fondé sur l'intensité du courant ionique pour $m/z = 44$ qui est proportionnel à la quantité de carbone injectée dans l'analyseur élémentaire. Dans les conditions type, l'intensité de ce courant ionique devrait être pratiquement constante pour les échantillons en analyse. Une déviation significative doit conduire à soupçonner une évaporation d'éthanol (par exemple une capsule imparfaitement scellée) ou bien une instabilité de l'analyseur élémentaire ou du spectromètre de masse.

11. CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE DE LA METHODE (Précision)

Une première analyse collaborative (11.1) a été réalisée sur des distillats comportant des alcools d'origine vinique, et des alcools de canne et de betterave ainsi que différents mélanges de ces trois origines. Cette étude n'ayant pas pris en compte l'étape de distillation, des informations complémentaires provenant d'autres essais interlaboratoires réalisés sur des vins (11.2) et notamment des circuits de tests d'aptitudes (11.3) pour les mesures isotopiques ont également été considérées. Les résultats démontrent que les différents systèmes de distillation utilisés dans des conditions satisfaisantes, et en particulier ceux applicables pour les mesures RMN-FINS, n'apportent pas de variabilité significative pour les déterminations $\delta^{13}\text{C}$ de l'éthanol du vin, et il est raisonnable de supposer qu'il en sera de même pour l'éthanol des boissons spiritueuses. Les paramètres de fidélité observés pour les vins sont quasiment identiques à ceux obtenus lors de l'étude collaborative (11.1) sur les distillats.

11.1. Étude collaborative sur les distillats

Année de l'essai interlaboratoires : 1996

Nombre de laboratoires : 20

Nombre d'échantillons : 6 échantillons en double aveugle

Analyte : $\delta^{13}\text{C}$ de l'éthanol

Code des échantillons	Alcool d'origine vinique	Alcool de betterave	Alcool de canne
A & G	80%	10%	10%
B & C	90%	10%	0%
D & F	0%	100%	0%
E & I	90%	0%	10%
H & K	100%	0%	0%
J & L	0%	0%	100%

Échantillons	A / G	B / C	D / F	E / I	H / K	J / L
Nombre de laboratoires retenus après élimination des résultats aberrants	19	18	17	19	19	19
Nombre de résultats acceptés	38	36	34	38	38	38
Valeur moyenne ($\delta^{13}\text{C}$) ‰	-25,32	-26,75	-27,79	-25,26	-26,63	-12,54
Sr^2	0,0064	0,0077	0,0031	0,0127	0,0069	0,0041
Écart-type de répétabilité (Sr) ‰	0,08	0,09	0,06	0,11	0,08	0,06
Limite de répétabilité $r(2,8 \times \text{Sr})$ ‰	0,22	0,25	0,16	0,32	0,23	0,18

S_R^2	0,0389	0,0309	0,0382	0,0459	0,0316	0,0584
Écart-type de reproductibilité (S_R) ‰	0,20	0,18	0,20	0,21	0,18	0,24
Limite de reproductibilité R ($2,8 \times S_R$) ‰	0,55	0,49	0,55	0,60	0,50	0,68

11.2. Etude interlaboratoires sur deux vins et un alcool

Année de l'essai interlaboratoires : 1996

Nombre de laboratoires : 14 pour la distillation des vins dont 7 pour également la mesure $\delta^{13}C$ de l'éthanol des vins

8 pour la mesure $\delta^{13}C$ de l'échantillon d'alcool

Nombre d'échantillons 3 (Vin blanc TAV 9,3% vol., Vin blanc de TAV 9,6% vol. et Alcool de titre alcoométrique 93% m/m)

Analyte : $\delta^{13}C$ de l'éthanol

Échantillons	Vin rouge	Vin blanc	Alcool
Nombre de laboratoires	7	7	8
Nombre de résultats acceptés	7	7	8
Valeur moyenne ($\delta^{13}C$) ‰	-26,20	-26,20	-25,08
Variance de reproductibilité S_R^2	0,0525	0,0740	0,0962
Écart-type de reproductibilité (S_R) ‰	0,23	0,27	0,31
Limite de reproductibilité R ($2,8 \times S_R$) ‰	0,64	0,76	0,87

Différents systèmes de distillation ont été utilisés par les laboratoires participants. Les

déterminations isotopiques $\delta^{13}\text{C}$ réalisées dans un seul laboratoire sur l'ensemble des distillats retournés par les participants ne montrent ni valeur aberrante ni valeur significativement distincte des valeurs moyennes. La variance des résultats ($S^2 = 0,0059$) est comparable aux variances de répétabilité S_r^2 de l'étude collaborative sur les distillats (11.1).

11.3. Résultats des exercices des circuits d'aptitude aux essais isotopiques

Depuis décembre 1994 des exercices d'aptitude internationaux pour les déterminations isotopiques sur les vins et alcools (distillats de TAV 96% vol.) sont organisés régulièrement. Les résultats permettent aux laboratoires participants de contrôler la qualité de leurs analyses. L'exploitation statistique des résultats permet d'apprécier la variabilité des déterminations dans des conditions de reproductibilité et donc d'estimer les paramètres de variance et de limite de reproductibilité. Les résultats obtenus pour les déterminations $\delta^{13}\text{C}$ de l'éthanol des vins et distillats sont résumés dans le tableau suivant :

	Vins				Distillats			
Date	N	S_r	S^2_r	R	N	S_r	S^2_r	R
Déc. 1994	6	0,210	0,044	0,59	6	0,151	0,023	0,42
Juin 1995	8	0,133	0,018	0,37	8	0,147	0,021	0,41
Déc. 1995	7	0,075	0,006	0,21	8	0,115	0,013	0,32
Mars 1996	9	0,249	0,062	0,70	11	0,278	0,077	0,78
Juin 1996	8	0,127	0,016	0,36	8	0,189	0,036	0,53
Sep. 1996	10	0,147	0,022	0,41	11	0,224	0,050	0,63
Déc. 1996	10	0,330	0,109	0,92	9	0,057	0,003	0,16
Mars 1997	10	0,069	0,005	0,19	8	0,059	0,003	0,16
Juin 1997	11	0,280	0,079	0,78	11	0,175	0,031	0,49

Sep 1997	12	0,237	0,056	0,66	11	0,203	0,041	0,57
Déc. 1997	11	0,127	0,016	0,36	12	0,156	0,024	0,44
Mars 1998	12	0,285	0,081	0,80	13	0,245	0,060	0,69
Juin 1998	12	0,182	0,033	0,51	12	0,263	0,069	0,74
Sep 1998	11	0,264	0,070	0,74	12	0,327	0,107	0,91
Moyenne pondérée		0,215	0,046	0,60		0,209	0,044	0,59

N : nombre de laboratoires participants

12. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Détermination par RMN de la distribution de deutérium dans l'éthanol des boissons spiritueuses d'origine vitivinicole
2. OIV Recueil des méthodes internationales d'analyse des boissons spiritueuses d'origine vitivinicole.
3. Détermination par spectrométrie de masse isotopique du rapport d'isotopes $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de l'éthanol du vin ou de celui obtenu par fermentation des moûts, des moûts concentrés ou du sucre de raisin
4. OIV Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts.
5. Détection de l'enrichissement des moûts, des moûts concentrés, du sucre de raisin et des vins par l'application de la résonance magnétique nucléaire du deutérium (RMN-FINS/SNIF-NMR)
6. OIV Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts.
7. E.C. Regulation. Community analytical methods which can be applied in the wine sector, N°.2676/90. Detecting enrichment of grape musts, concentrated grape musts, rectified concentrated grape musts and wines by application of nuclear magnetic resonance of deuterium (SNIF-NMR)
8. *Official Journal of the European Communities*, NoL 272, Vol 33, 64-73, 3 October

1990.

9. Interlaboratory study about the determination of $\delta^{13}\text{C}$ in wine ethanols OIV FV No 1051
10. Fidélité de la détermination du rapport isotopique $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de l'éthanol du vin OIV FV No 1116.
11. Stable carbon isotope content in ethanol of EC data bank wines from Italy, France and Germany. A Rossmann ; H.-L. Schmidt ; F. Reniero ; G. Versini ; I. Moussa ; M.-H. Merle. *z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 1996, 203, p 293-301.

Détermination de la distribution de deutérium dans l'éthanol des boissons spiritueuses d'origine vitivinicole par application de la résonance magnétique nucléaire du deutérium (RMN $\delta^2\text{H}$ /SNIF $\delta^2\text{H}$ NMR[1])

Méthode de type I

Année : 2009

1. Définition

Les atomes de deutérium contenus dans les sucres et dans l'eau d'un moût de raisin vont être redistribués après fermentation dans les molécules I, II, III et IV du vin:



I



II



III



IV

L'addition de sucres exogènes (chaptalisation) avant la fermentation du moût se répercutera sur la redistribution du deutérium.

Par comparaison avec les valeurs des paramètres relatifs à un vin témoin naturel de la même région, l'enrichissement avec un sucre exogène se traduira par les variations

suivantes:

Paramètres	$(D/H)_I$	$(D/H)_{II}$	$(D/H)_{\overline{w}}^Q$	R
Vin naturel	☐	☐	☐	☐
Vin enrichi Sucre de betterave	☐	☐	☐	☐
Sucre de canne Sucre de maïs	☐	☐	☐	☐

$(D/H)_I$: rapport isotopique associé à la molécule I.

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

$(D/H)_{\overline{w}}^Q$: rapport isotopique de l'eau du vin.

$R = 2 (D/H)_{II} / (D/H)_I$, exprime la distribution relative du deutérium dans les molécules I et II; R est directement mesuré à partir des intensités h des signaux et alors $R = 3h_{II} / h_I$.

$(D/H)_I$ caractérise principalement l'espèce végétale qui a synthétisé le sucre et dans une mesure moindre la géographie du lieu de récolte (nature de l'eau utilisée au cours de la photosynthèse).

$(D/H)_{II}$ représente la climatologie du lieu de production des raisins (nature de l'eau de pluie et conditions météorologiques) et dans une mesure moindre, la concentration en sucre du moût initial.

$(D/H)_{\overline{w}}^Q$ représente la climatologie du lieu de production et la richesse en sucre du moût initial. Par la suite ce paramètre ne sera plus considéré, car il n'est plus caractéristique de l'eau d'une boisson spiritueuse.

2. Principe

La détermination des paramètres définis ci-dessus R, $(D/H)_I$ et $(D/H)_{II}$, est effectuée par RMN du deutérium sur l'éthanol extrait de la boisson spiritueuse; elle est éventuellement complétée par la détermination du rapport isotopique $^{13}C/^{12}C$ de

l'éthanol.

3. Préparation de l'échantillon pour l'analyse

Remarque: Tout dispositif d'extraction de l'éthanol peut être utilisé à la condition qu'il permette de récupérer entre 98 et 98,5 % de l'alcool du vin en un distillat qui titre entre 92 et 93 % mas. (95 % vol.)

3.1. Extraction de l'éthanol

3.1.1. Appareillage et réactifs

Dispositif pour extraction de l'éthanol (fig. 1) comportant :

- Chauffe-ballon électrique avec régulateur de tension;
- Ballon à rodage de 1 litre,
- Colonne Cadiot à bande tournante (mobile en téflon),
- Fioles coniques à rodage de 125 ml,
- Flacons à bouchon plastique de 125 et 60 ml.

Réactifs pour le dosage de l'eau selon la technique de Karl Fischer.

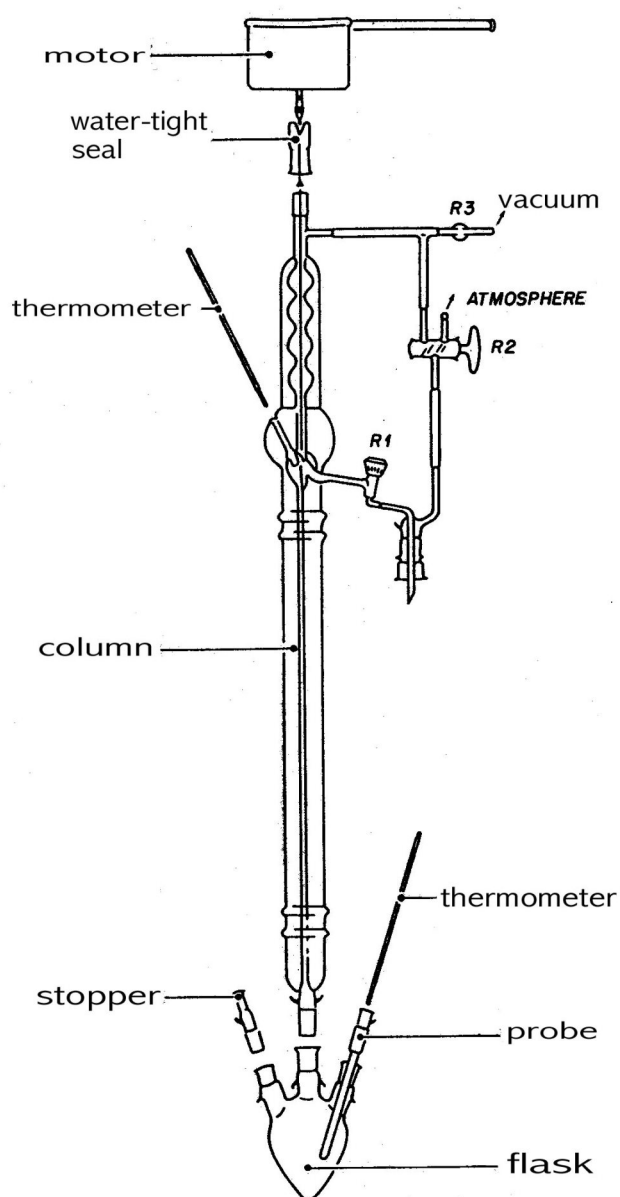


Figure 1 – Dispositif pour extraction d'éthanol

3.1.2. Mode opératoire

3.1.2.1. Extraction de l'éthanol

Introduire une prise d'essai homogène de 50 à 300 ml (selon son titre alcoométrique) de boisson spiritueuse dans le ballon de l'appareil à distiller avec un taux de reflux constant voisin de 0,9. Mettre en place une fiole conique rodée de 125 ml préalablement tarée, pour recevoir le distillat. Recueillir le liquide bouillant entre 78,0 et 78,2° C, soit environ 40 à 60 ml. Quand la température dépasse 78,5° C, arrêter le prélèvement pendant 5 minutes.

Quand la température est revenue à 78° C, prélever à nouveau le distillat jusqu'à 78,5° C et répéter cette opération jusqu'à ce que la température après arrêt du prélèvement et fonctionnement en circuit fermé ne redescende plus.

La distillation complète dure environ 5 heures. Cette façon de procéder permet de récupérer entre 98 et 98,5 % de l'alcool total la boisson spiritueuse en un distillat qui titre entre 92 et 93 % mas. (95 % vol.), titre pour lequel les conditions RMN décrites au paragraphe 4 ont été établies.

L'éthanol récupéré est pesé.

3.1.2.2. Détermination du titre alcoométrique de l'alcool extrait

Sur une prise d'essai voisine de 0,5 ml d'alcool, de masse p exactement connue, la teneur en eau est déterminée par la méthode de Karl Fischer, soit α g.

Le titre massique de l'éthanol est donné par :

$$t \frac{D}{m} = \frac{p - p'}{p} \times 100$$

3.2. Préparation de l'échantillon d'alcool pour la mesure RMN

3.2.1. Réactifs

N,N-tétraméthylurée (TMU); utiliser un échantillon de TMU de référence de rapport isotopique D/H donné et contrôlé. Cet échantillon est fourni par le Bureau communautaire de Référence, à Bruxelles.

3.2.2. Mode opératoire

- Sonde RMN de 15 mm de diamètre:

Dans un flacon préalablement taré, prélever 7 ml d'alcool obtenu en 3.1.2 et le peser à 0,1 mg près, soit m_A ; prélever ensuite 3 ml du standard interne (TMU) et peser à 0,1 mg près, soit m_{st} . Homogénéiser le mélange par agitation.

- Sonde RMN de 10 mm de diamètre:

3,2 ml d'alcool et 1,3 ml de TMU suffisent.

Selon les types de spectromètre et de sonde utilisés (cf. paragraphe 4), ajouter une quantité suffisante d'hexafluorobenzène comme substance de stabilisation champ-fréquence (lock).

Spectromètre	Sonde 10 mm 15 mm
7.05T 9.4T	150 μ L 200 μ L 35 μ L 50 μ L

4. Enregistrement des spectres RMN ^2H de l'alcool.

Détermination des paramètres isotopiques.

4.1. Matériel

Spectromètre RMN muni d'une sonde spécifique «deutérium» accordée à la fréquence ν_0 caractéristique, 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.

La résolution, mesurée sur le spectre, transformé sans multiplication exponentielle (c'est-à-dire $LB = 0$, fig. 2b) et exprimée par la largeur à mi-hauteur des signaux méthyle et méthylène de l'éthanol et du signal méthyle du TMU, doit être inférieure à 0,5 Hz.

La sensibilité mesurée avec un facteur de multiplication exponentielle LB égal à 2 (fig. 2a) doit être supérieure ou égale à 150 pour le signal méthyle de l'éthanol titrant 95%

vol. (93,5% mas.)

Dans ces conditions, l'intervalle de confiance sur la mesure de la hauteur du signal, calculé pour une probabilité de 97,5% (test à 1 aile) et 10 répétitions du spectre, est de 0,35 %.

- Changeur automatique d'échantillons (éventuellement).
- Logiciel de traitement des données.
- Tubes échantillons de 15 mm ou de 10 mm selon les performances du spectromètre.

4.2. Réglages du spectromètre et vérifications

4.2.1. Réglages

Procéder aux réglages habituels d'homogénéité et de sensibilité selon les indications du constructeur.

4.2.2. Vérification de la validité des réglages

Utiliser des éthanols de référence, désignés par les lettres C (éthanol de canne à sucre), V (éthanol de vin) et B (éthanol de betterave), présentant une teneur isotopique différente mais étalonnés avec précision. Ces échantillons sont fournis par le Bureau Communautaire de Référence à Bruxelles.

En suivant le mode opératoire décrit en 4.3, déterminer les valeurs isotopiques de ces alcools désignés en notant en indice supérieur C_{mes} , V_{mes} , B_{mes} (voir 5.3).

Les comparer aux valeurs de référence correspondantes, désignées en notant en indice supérieur C_{st} , B_{st} , V_{st} (voir 5.3).

L'écart-type de répétabilité obtenu sur la moyenne de 10 répétitions de chaque spectre doit être inférieur à 0,01 sur le rapport R et inférieur à 0,3 ppm sur $(D/H)_I$ et sur $(D/H)_{II}$.

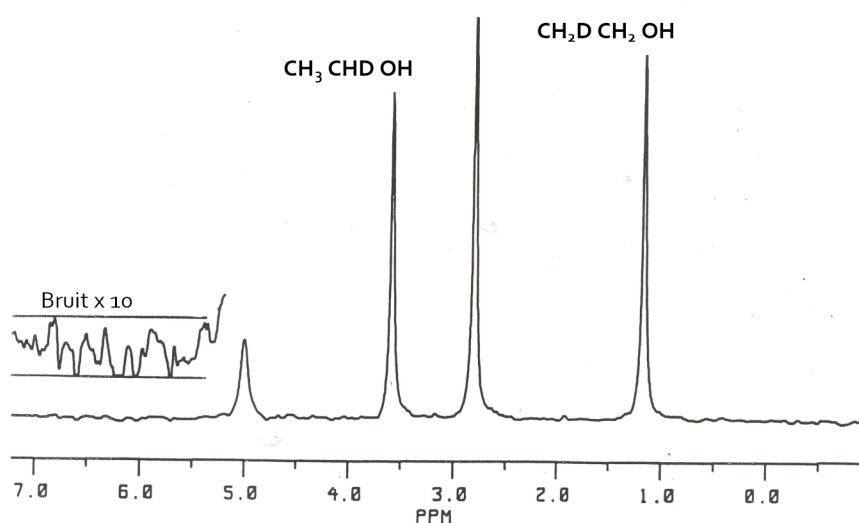


Figure 2a : Spectre RMN 2H d'un éthanol de vin avec une référence interne

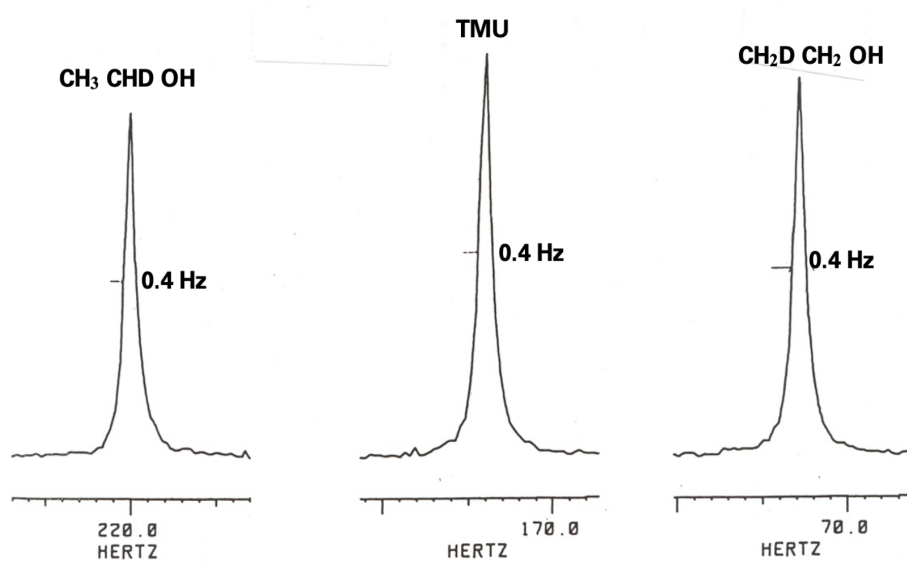


Figure 2b

^2H spectrum of ethanol taken under the same conditions as those of Figure 2a, but without exponential multiplication ($\text{LB} = 0$)

Figure 2b Spectre 2H de l'éthanol réalisé dans les mêmes conditions que celles de la figure 2a, mais sans multiplication exponentielle (LB=0)

Les valeurs moyennes obtenues pour les différents paramètres isotopiques $[R, (D/H)_I, (D/H)_{II}]$ doivent se situer dans l'écart-type de répétabilité correspondant, donné, pour ces paramètres et pour les trois alcools de référence, par le Bureau Communautaire de Référence. Sinon reprendre les réglages.

4.3. Conditions d'acquisition des spectres RMN

Placer l'échantillon d'alcool préparé en 3.2 dans un tube de 15 ou de 10 mm et l'introduire dans la sonde.

Les conditions d'acquisition des spectres RMN sont les suivantes:

- La température de la sonde (par exemple 302 K) doit être constante ;
- Temps d'acquisition de 6,8 s au moins pour 1200 Hz de largeur spectrale (Mémoire 16 K), c'est-à-dire environ 20 ppm à 61,4 MHz ou 27 ppm à 46,1 MHz.
- Impulsion: 90 °.
- Régler le délai à l'acquisition; sa valeur doit être du même ordre de grandeur que le temps d'échantillonnage (Dwell time).
- Détection en quadrature: fixer l'«offset» 01 entre les signaux - OD et - CHD pour l'éthanol et entre les signaux HOD et TMU pour l'eau.
- 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 CH_2 .

Utiliser le mode de découplage par large bande.

Effectuer pour chaque spectre, un nombre d'accumulations NS suffisant pour obtenir le rapport signal-sur-bruit donné en paragraphe 4.1 et répéter NE = 10 fois cette série de NS accumulations. Les valeurs de NS dépendent des types de spectromètre et de sonde utilisés (cf. 4) et on choisira par exemple:

Spectromètre	Sonde 10 mm 15 mm
--------------	----------------------

7.05T	NS = 304 NS = 200
9.4T	NS = 200 NS = 128

5. Expression des résultats

5.1. Pour chacun des 10 spectres (voir spectre RMN de l'éthanol, figure 2a), déterminer:

$$R = 3 \frac{h_{II}}{h_I} = 3 \frac{\text{hauteur du signal II (CH}_3\text{CHDOH)}}{\text{hauteur du signal I (CH}_2\text{D CH}_2\text{OH)}}$$

$$(D/H)_I = 1,5866 \cdot T_I \cdot \frac{m_{st}}{m_A} \cdot \frac{(D/H)_{st}}{t_m^D}$$

$$(D/H)_{II} = 2,3799 \cdot T_{II} \cdot \frac{m_{st}}{m_A} \cdot \frac{(D/H)_{st}}{t_m^D}$$

Avec

$$T_I = \frac{\text{hauteur du signal I (CH}_2\text{D CH}_2\text{OH)}}{\text{hauteur du signal du standard interne (TMU)}}$$

$$T_{II} = \frac{\text{hauteur du signal II (CH}_3\text{CHDOH)}}{\text{hauteur du signal du standard interne (TMU)}}$$

- m_{st} et m_A , voir 3.3.2.

□ t_m^D , voir 3.1.2.2.

□ $(D/H)_{st}$ = rapport isotopique du standard interne (TMU) indiqué sur le flacon fourni par le Bureau Communautaire de Référence

L'utilisation des hauteurs de signaux au lieu des surfaces, mesurables avec moins de précision, suppose des largeurs de raies à mi-hauteurs égales, ce qui est une approximation raisonnable (fig. 2b).

5.2. Pour chacun des paramètres isotopiques, calculer la moyenne des 10 déterminations et l'intervalle de confiance.

Un logiciel optionnel (par exemple SNIF-NMR) adaptable sur le calculateur du spectromètre permet d'effectuer ces calculs en ligne.

Remarque: Si, après le réglage du spectromètre, il y a un écart systématique entre les valeurs moyennes obtenues pour les caractéristiques isotopiques des alcools de référence (4.2.2) et les valeurs indiquées par le Bureau Communautaire de Référence, à l'écart-type près, on pourra appliquer la correction suivante pour retrouver la vraie valeur d'un échantillon X quelconque.

L'interpolation sera effectuée en prenant les valeurs des échantillons de référence qui encadrent celle de l'échantillon X.

Soit $(D/H)_I^{Xmes}$ la valeur mesurée et $(D/H)_I^{Xcorr}$ la valeur corrigée, on a:

$$(D/H)_I^{Xcorr} = (D/H)_I^{Bst} + \alpha[(D/H)_I^{Xmes} - (D/H)_I^{Bmes} (D/H)_I^{Vmes}]$$

Avec :

$$\alpha = \frac{(D/H)_I^{Vst} - (D/H)_I^{Bst}}{(D/H)_I^{Vmes} - (D/H)_I^{Bmes}}$$

Exemple:

Échantillons de référence fournis et étalonnés par le Bureau Communautaire de Référence:

$$(D/H)_I^{Vst} = 102.0 \text{ ppm} \quad (D/H)_I^{Bst} = 91.95 \text{ ppm}$$

Échantillons de référence mesurés par le laboratoire:

$$(D/H)_I^{Vmes} = 102.8 \text{ ppm} \quad (D/H)_I^{Bmes} = 93.0 \text{ ppm}$$

Échantillon examiné non corrigé:

$$(D/H)_I^{Xmes} = 100.2 \text{ ppm}$$

On calcule : $\alpha = 1.0255$ et $(D/H)_I^{Xcorr} = 99.3 \text{ ppm}$

6. BIBLIOGRAPHIE

1. Martin G.J., Martin M.L., MABON F., Anal. Chem., 1982, 54, 2380-2382.
2. Martin G.J., Martin M.L., J. Chim. Phys., 1983, 80, 294-297.
3. Martin G.J., Guillou C., NAULET N., BRUN S., Tep Y., Cabanis J.C.,

4. Cabanis M.T., Sudraud P., Sci. Alim., 1986, 6, 385-405.
5. Martin G.J., Zhang B.L., NAULET N. and MARTIN M.L., J. Amer. Chem. Soc., 1986, 108, 5116-5122.
6. Martin G.J., Guillou C., Martin M.L., Cabanis M.T., Tep Y. et Aerny J., J. Agric. Food Chem., 1988, 36, 316.

[1] Fractionnement Isotopique Naturel Spécifique étudié par Résonance Magnétique Nucléaire (Site-Specific Natural Isotope Fractionation studied by Nuclear Magnetic Resonance). □ Brevet: France, 81□22710; Europe, 82□402□209□9; Etats-Unis, 85□4□550□082; Japon 57□123□249.