

## RÉSOLUTION OENO 7/2005

### **DETERMINATION DU RAPPORT ISOTOPIQUE $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ DU CO<sub>2</sub> DANS LES VINS MOUSSEUX MÉTHODE EMPLOYANT LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE DE RAPPORT ISOTOPIQUE (SMRI)**

L'ASSEMBLÉE GÉNÉRALE,

EU EGARD aux dispositions de l'Article 2, paragraphe 2, alinéa iv de l'Arrangement portant création de l'organisation internationale de la Vigne et du Vin,

SUR PROPOSITION de la Sous-Commission des méthodes d'analyse et d'appréciation du vin,

DECIDE de compléter l'Annexe C du Recueil de méthodes internationales d'analyse de moûts et de vins en y intégrant la méthode de Type II suivante :

#### **Détermination du rapport isotopique $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ du CO<sub>2</sub> dans les vins mousseux**

Méthode employant la spectrométrie de masse de rapport isotopique (SMRI)

#### **Avant-propos**

La méthode standard décrite ci-après a été élaborée avec le consentement de tous les laboratoires participant à l'étude collective de l'OIV : Analyses  $^{13}\text{C}$ -SMRI du CO<sub>2</sub> dans le vin mousseux (2003-2004).

#### **Introduction**

Le vide, dans une bouteille de vin mousseux, contient une phase gazeuse riche en CO<sub>2</sub>, équilibrée avec le CO<sub>2</sub> dissous en phase liquide. Ce gaz évolue durant la seconde fermentation, sous l'effet de l'ajout du sucre provenant de raisin, de betterave, de canne à sucre ou de maïs. Mais la teneur en CO<sub>2</sub> des vins mousseux peut aussi être augmentée artificiellement au moyen de CO<sub>2</sub> industriel.

En 1997, une méthode autonome de détermination du rapport isotopique  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  du CO<sub>2</sub> de vins mousseux par spectrométrie de masse des isotopes (SMRI) a été présentée

à l'OIV. Cette méthode a par la suite générée de nouvelles procédures fondées sur des techniques automatisées en ligne, conçues dans certains laboratoires européens. Une de ces procédures a été présentée à l'OIV en 2001. Ces prochaines années, les progrès techniques pourraient fort bien conduire à de nouvelles procédures permettant de déterminer, de façon fiable et rapide, le rapport isotopique  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  de nombreux échantillons de  $\text{CO}_2$ . Une description exhaustive de toutes les procédures applicables aux différentes techniques risque de faire tomber rapidement la méthode en désuétude. La méthode suivante tient compte de ce fait : elle décrit les principes de base pour une bonne mesure de la teneur en carbone 13 du  $\text{CO}_2$  procédant de vin mousseux et fournit un bref aperçu des procédures utilisées aujourd'hui, accompagné d'une description exhaustive, à base d'exemples, des procédures fondées sur des techniques hors-ligne et en ligne.

## **Vins mousseux - Détermination du rapport isotopique $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ du $\text{CO}_2$ dans les vins mousseux Méthode employant la spectrométrie de masse de rapport isotopique (SMRI)**

### **1. Champ d'application**

Cette méthode détermine, par la spectrométrie de masse des isotopes (SMRI), le rapport isotopique stable du carbone ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) du  $\text{CO}_2$  dans les vins mousseux. Cette méthode couvre une vaste gamme de procédures, dont l'application est fonction des instruments disponibles.

### **2. Références normatives**

- ISO 5725-2:1994 « Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure. Partie 2 : méthode de base pour la détermination de la répétabilité et la reproductibilité d'une méthode de mesure standard ».
- ISO 78-2:1999 « Chimie - Plans de normes. Partie 2 : méthodes d'analyse chimique ».

### 3. Définitions

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

$\Delta^{13}\text{C}$  : Teneur en carbone 13 ( $^{13}\text{C}$ ) exprimée en parties pour mille (‰).

V-PDB : Vienna-Pee-Dee Belemnite. Le standard PDB est un carbonate de calcium fossile de la Caroline du sud, aux États-Unis d'Amérique, présentant le rapport isotopique ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ou  $R_{\text{PDB}}$ ) = 0,0112372. Cette valeur sert de point de référence à l'échelle PDB internationale commune pour les valeurs  $\Delta^{13}\text{C}$  exprimées en parties pour mille (‰).

m/z : Rapport masse sur charge.

$S_r$  : Écart-type de répétabilité. Écart-type observé dans les résultats d'essais conduits sous des conditions de répétabilité (conditions permettant d'obtenir des résultats d'essais conduits indépendamment avec la même méthode à partir d'échantillons identiques, dans le même laboratoire et avec le même opérateur utilisant le même matériel à de brefs intervalles de temps).

r : Limite de répétabilité. Valeur inférieure ou égale à la différence absolue entre deux résultats d'essais obtenus sous des conditions de répétabilité, avec une probabilité de 95 % ;  $r=2,8 \cdot S_r$ .

$S_R$  : Écart-type de reproductibilité. Écart-type observé dans les résultats d'essais conduits sous des conditions de reproductibilité (conditions permettant d'obtenir des résultats d'essais conduits avec la même méthode à partir d'échantillons identiques, dans des laboratoires différents et avec des opérateurs différents utilisant un matériel différent).

R : Limite de reproductibilité. Valeur inférieure ou égale à la différence absolue entre deux résultats d'essais obtenus sous des conditions de reproductibilité, avec une probabilité de 95 % ;  $r=2,8 \cdot S_R$ .

### 4. Principe

Les plantes sont classées C3 ou C4 en fonction de l'itinéraire suivi par la synthèse du sucre. Le sucre des plantes C3, telles le raisin et la betterave, présente une teneur en  $^{13}\text{C}$  inférieure à celle du sucre de plantes comme la canne à sucre et le maïs. Cette

différence est préservée dans la teneur en  $^{13}\text{C}$  des produits de fermentation de sucres, tels l'éthanol et le CO<sub>2</sub>. En outre, le CO<sub>2</sub> industriel employé dans l'industrie alimentaire, qui procède de la combustion de combustibles fossiles ou du traitement thermique de carbonate, présente une teneur en  $^{13}\text{C}$  différente de celle des produits issus de plantes C3 et C4. En conséquence, le rapport isotopique  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  du CO<sub>2</sub> des vins mousseux est régi par le type de sucre employé durant la seconde fermentation (C3 ou C4) ou par la composition isotopique du CO<sub>2</sub> industriel ajouté.

Les études conduites à ce jour sur la teneur en  $^{13}\text{C}$  du CO<sub>2</sub> des vins mousseux ont révélé que le CO<sub>2</sub> obtenu par fermentation du sucre de plantes C3 présentait une  $\delta^{13}\text{C}$  de -17 ‰ à -26 ‰, alors que le CO<sub>2</sub> obtenu par fermentation du sucre de plantes C4 avait une  $\delta^{13}\text{C}$  de l'ordre de -7 ‰ à -10 ‰. Les vins gazéifiés ont un rapport isotopique  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  inférieur à -29 ‰ ou supérieur à -10 ‰, en fonction de la source de bioxyde de carbone<sup>1-4</sup>. En conséquence, la mesure du rapport isotopique stable du carbone ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) de CO<sub>2</sub> dans les vins mousseux peut constituer une bonne méthode pour détecter l'origine du gaz.

La teneur en  $^{13}\text{C}$  est déterminée à partir du bioxyde de carbone obtenu d'un vin mousseux. Les différentes combinaisons possibles des isotopes  $^{18}\text{O}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{16}\text{O}$  et  $^{13}\text{C}$ ,  $^{12}\text{C}$  génèrent le nombre de masse 44 correspondant à l'isotopomère  $^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2$ , le nombre de masse 45 correspondant aux espèces  $^{13}\text{C}^{16}\text{O}_2$  et  $^{12}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O}$  et le nombre de masse 46 correspondant à l'isotopomère  $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$  ( $^{13}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O}$  et  $^{12}\text{C}^{17}\text{O}_2$  peuvent être ignorés en raison de leur très faible abondance). Les courants ioniques correspondants sont déterminés sur les trois différents collecteurs. Le courant ionique m/z 45 est corrigé de la contribution de  $^{12}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O}$ , calculée en fonction de l'intensité du courant mesurée pour m/z 46, en considérant les abondances relatives de  $^{18}\text{O}$  et de  $^{17}\text{O}$  (correction de Craig). La comparaison avec une référence calibrée contre la référence internationale V-PDB autorise alors le calcul de la teneur en  $^{13}\text{C}$  sur l'échelle relative  $\delta^{13}\text{C}$  ‰.

## 5. Réactifs

Les matériaux et consommables sont fonction de l'appareillage employé dans le

laboratoire.

Lorsque la séparation et la purification des échantillons de CO<sub>2</sub> sont exécutées par cryopiégeage dans une ligne de vide, les réactifs suivants sont employés :

- Azote liquide
- Éthanol
- CO<sub>2</sub> solide

En général, les consommables suivants sont employés pour l'analyse avec un système à flux continu (EA-SMRI ou GC-C-SMRI). D'autres matériaux de qualité analogue peuvent remplacer l'un ou l'autre des produits recensés :

- Hélium pour analyse (CAS 07440-59-7).
- Oxygène pour analyse (CAS 07782-44-7).
- Bioxyde 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 - ex. : oxyde de cuivre pour micro-analyse (CAS 1317-38-0).
- Desséchant pour l'élimination de l'eau produite par la combustion - ex. : perchlorate de magnésium pour micro-analyse (CAS 10034-81-4). Inutile lorsque le système EA-SMRI ou GC-C-SMRI élimine l'eau par cryopiégeage.
- Colonne capillaire et membrane Naphion pour l'élimination de l'eau produite par la combustion dans les systèmes GC-C-SMRI.

Le gaz de référence employé dans les mesures peut être un gaz certifié ou un gaz de travail calibré par rapport aux références internationales avec des valeurs delta connues (gaz certifiés ou matériaux de référence). Ci-après figure une liste de quelques-uns des matériaux de référence internationaux pouvant être employés pour le réglage d'étalons gazométriques et le contrôle des étalons gazométriques :

Code Échantillon    Matériel

□<sup>13</sup>C<sub>PDB</sub>

IMEP-8-A	$\text{CO}_2$	-6.40‰ Messer Griesheim
ISO-TOP	$\text{CO}_2$	-25.7‰ “
BCR-656	Ethanol	-20.91‰ from IRMM
BCR-675	Glucose	-10.76‰ “
SAI-692C	$\text{CO}_2$	-10.96‰ Oztech Trading Corporation (USA)
NBS-22	Huile	-29.7‰ IAEA
IAEA-CH-6 (ANU)	Sucrose	-10.4‰ “
NBS-18	Calcite	-5.1‰ “
NBS-19	Calcaire sec	+1.95‰ “
FID-Mix	Mélange de n-alcanes dans l'isoctanol	Varian
	C14	-29.61‰
	C15	-25.51‰
	C16	-33.39‰

## 6. Appareillage

L'appareillage de laboratoire pour la mesure du rapport isotopique du carbone consiste généralement en ce qui suit :

- Spectromètre de masse de rapport isotopique (SMRI), capable de déterminer la teneur en  $^{13}\text{C}$  du  $\text{CO}_2$  en abondance naturelle, à un degré de précision interne d'au

moins 0,05 ‰ (exprimé en valeur relative []). La précision interne se définit ici comme étant la différence entre deux mesures du même échantillon de CO<sub>2</sub>.

Le spectromètre de masse est généralement équipé d'un triple collecteur permettant de mesurer simultanément les intensités de courant de m/z 44, 45 et 46. Le spectromètre de masse doit en outre, soit être équipé d'un système d'introduction double, autorisant la mesure en alternance de l'échantillon inconnu et d'un échantillon de référence, soit appliquer une technique à flux continu (CF-SMRI).

- Systèmes à flux continu (CF-SMRI). Des systèmes à flux continu appliquant un système automatisé d'échantillonnage de gaz peuvent être employés. Ci-dessous figure une liste de quelques techniques CF-SMRI adaptées à la présente méthode et disponibles dans le commerce :

GC-C-SMRI (Chromatographie en phase gazeuse – combustion – SMRI).

EA-SMRI (Analyseur élémentaire équipé pour les injections liquides ou solides).

Ces systèmes séparent et purifient le CO<sub>2</sub>, puis éluent le bioxyde de carbone vers la chambre d'ionisation du spectromètre.

- Ligne de vide en verre ou en acier, avec des cryopièges, reliée à une pompe capable d'atteindre une pression inférieure à 5,10<sup>-3</sup> mbar.
- Dispositifs d'échantillonnage de gaz, disponibles dans le commerce (ex. : seringue pour échantillons gazeux) ou conçus en interne, capables d'extraire une aliquote de CO<sub>2</sub> d'un vin mousseux sans fractionnement isotopique.
- Flacons scellés pour les échantillons gazeux, adaptés au passeur automatique d'échantillons vers les systèmes à flux continu.
- Flacons scellés pour les aliquotes de vin mousseux, adaptés à la ligne de vide et/ou au passeur automatique d'échantillons vers les systèmes à flux continu.

## 7. Procédure

La méthode proposée compte trois étapes : échantillonnage du CO<sub>2</sub>, purification et séparation du CO<sub>2</sub> et mesure du rapport <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C. Ces étapes peuvent être totalement indépendantes (système autonome) ou intégralement ou partiellement

interconnectées (système continu). Toute procédure permettant d'éviter le fractionnement isotopique de l'échantillon de CO<sub>2</sub> durant les trois étapes de la méthode pourra être appliquée. Des informations complémentaires sur les procédures fondées sur des systèmes autonomes et continus sont fournies aux Annexes A, B et C. La description ci-après renvoie aux procédures appliquées par les laboratoires participant à l'essai inter-laboratoires.

## 7.1. Procédures d'échantillonnage de CO<sub>2</sub>

Échantillonnage du CO<sub>2</sub> à température ambiante dans le vide de la bouteille, par insertion d'un dispositif spécial à travers le bouchon.

Échantillonnage du CO<sub>2</sub> dans le vide de la bouteille après extraction du bouchon et étanchéification de la bouteille au moyen d'un mécanisme de fermeture de précision, imperméable au gaz, relié au dispositif d'échantillonnage. La bouteille de vin mousseux doit être refroidie en-deçà de 0° C avant l'installation du mécanisme de fermeture, puis réchauffée à température ambiante. Une aliquote de gaz collectée dans le dispositif d'échantillonnage est prélevée au moyen d'une seringue étanche au gaz et injectée dans un flacon CG scellé.

Échantillonnage du CO<sub>2</sub> dans une aliquote de vin mousseux. La bouteille de vin mousseux doit être refroidie à 4°-5° C avant l'extraction du bouchon. Les aliquotes de vin sont disposées dans une bouteille spéciale, adaptée à la ligne de vide en verre ou au passeur automatique d'échantillons.

## 7.2. Procédures de purification et de séparation du CO<sub>2</sub>

Les gaz non condensés et l'eau présents dans l'échantillon gazeux sont éliminés dans une ligne de vide au moyen de cryopièges.

Les échantillons gazeux sont purifiés et le CO<sub>2</sub> est séparé par différents systèmes continus reliés au SMRI au moyen d'un système à flux continu ou d'un cryopiège. Les systèmes continus pouvant être utilisés sont, entre autres, les suivants :

- Cryopiège à eau autonome, relié à un système à flux continu,
- Piège à eau (perchlorate de magnésium), suivi d'un chromatographe en phase gazeuse,
- Chromatographe en phase gazeuse, relié directement ou indirectement au SMRI ou via une interface de combustion.

### 7.3. Mesure du ratio $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$

Le rapport isotopique du carbone du CO<sub>2</sub> obtenu dans du vin se mesure au moyen d'un spectromètre de masse des rapports isotopiques.

## 8. Calcul

Rapport isotopique  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  du CO<sub>2</sub> dans du vin mousseux exprimé par déviation à partir d'un étalon de travail  $\delta^{13}\text{C}$ ) préalablement étalonné par rapport à la référence internationale PDB (Pee Dee Belemnite). Ce paramètre est défini comme étant la différence relative pour mille entre les rapports  $^{13}\text{C}$  et  $^{12}\text{C}$  d'un échantillon par rapport à la référence PDB. La référence PDB consiste en un carbonate de calcium fossile de la Caroline du sud, aux États-Unis, présentant un rapport isotopique ( $R_{\text{PDB}}$ ) = 0,0112372. Cette valeur sert de point de référence à l'échelle PDB internationale commune pour les valeurs  $\delta^{13}\text{C}$  exprimées en parties pour mille (‰).

Les valeurs  $\delta^{13}\text{C}$  exprimées par rapport à l'étalon de travail sont calculées au moyen de l'équation suivante :

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

où

$R_{\text{éch}}$  est le rapport isotopique  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  de la prise d'essai ;

$R_{\text{réf}}$  est le rapport isotopique  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  de l'étalon de travail.

Les valeurs  $\delta^{13}\text{C}$  exprimées par rapport à la référence PDB sont calculées au moyen de l'équation suivante :

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

où

$\delta^{13}\text{C}_{\text{ref/V-PDB}}$  est la déviation isotopique de l'étalon de travail préalablement déterminé contre le PDB, exprimée en parties pour mille (‰).

Les résultats sont exprimés avec deux décimales.

## 9. Précision

L'essai inter-laboratoires sur la précision de la méthode est spécifié à l'Annexe D.

### 9.1. Répétabilité

La différence absolue entre deux résultats individuels obtenus sur un même échantillon d'essai par un opérateur utilisant le même appareil dans le plus bref intervalle de temps possible excédera la limite de répétabilité  $r$  dans 5 % des cas au maximum.

Les valeurs moyennes admises pour l'écart type de la limite de répétabilité ( $S_r$ ) et de répétabilité ( $r$ ) sont égales à :

$$S_r = 0,21 \% \quad r = 0,58 \%$$

### 9.2. Reproductibilité

La différence absolue entre deux résultats individuels obtenus sur un même échantillon d'essai par deux laboratoires excédera la limite de reproductibilité  $R$  dans 5 % des cas au maximum.

Les valeurs moyennes admises pour l'écart type de la limite de reproductibilité ( $S_R$ ) et de reproductibilité ( $R$ ) sont égales à :

$$S_R = 0,47 \% \quad R = 1,33 \%$$

## 10. Procès-verbal d'essai

Le procès-verbal d'essai doit spécifier les données suivantes :

- Toutes les informations nécessaires à l'identification de l'échantillon testé
- Mention de la Méthode standard internationale
- La méthode employée, avec mention de la procédure d'échantillonnage et de mesurage et recensement des instruments employés
- Les résultats de l'essai et les unités, avec les résultats des déterminations individuelles et leur moyenne, calculés comme indiqué à la Section 8 (« Calcul »)
- Toute variance par rapport à la procédure spécifiée
- Toute caractéristique inhabituelle observée durant l'essai

- La date de l'essai
- Si la répétabilité a été vérifiée
- Une description de la procédure de calibrage du gaz de référence appliquée pour la mesure des prises d'essai.

## Annexes (A,B,C,D)

### 1. Bibliographie

1. « Mesure du rapport isotopique  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  du gaz carbonique des vins mousseux et des vins gazéifiés », J. Merin et S. Mínguez. Office International de la Vigne et du Vin. Paris. F.V. 1039, 2426/200297 (1997).
2. « *Examination of the  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  isotopes in sparkling and semi-sparkling wine with the aid of simple on-line sampling* », M. Boner et H. Förstel. *Office International de la Vigne et du Vin. Paris. F.V. 1152.* (2001).
3. « *Use of  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ratios for studying the origin of CO<sub>2</sub> in sparkling wine* », J.Dunbar. *Fresenius Z. Anal. Chem.*, 311, 578-580 (1982).
4. « *Contribution to the study of the origin of CO<sub>2</sub> in sparkling wines by determination of the  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  isotope ratio* », I. González-Martin, C. González-Pérez et E. Marqués-Macías. *J. Agric. Food Chem.* 45, 1149-1151 (1997).
5. « *Protocol for Design, Conduct and Interpretation of Method-Performance studies* ». *Pure Appl. Chem.*, 1995, 67, 331-343.

### ANNEXE A

# Procédure expérimentale fondée sur des systèmes autonomes pour l'échantillonnage et le mesurage (dispositif d'échantillonnage conçu en interne, ligne de vide autonome et SMRI à double système d'entrée)

## 1. Matériel

- Dispositif d'échantillonnage. Le dispositif employé pour extraire les aliquotes gazeuses de la bouteille consiste en une pince (aiguille d'acier) dotée de trois orifices latéraux, par lesquels pénètre le gaz. Il est relié à un système de clapets composé de deux clapets reliés en séquence, d'une capacité d'environ 1 mL. Un clapet est fixé à la pince (Clapet 1) et l'autre à un tube d'acier (Clapet 2), qui relie le dispositif à une ligne de vide. Si la ligne de vide est en verre, un adaptateur à tube d'acier flexible doit être installé. Le Schéma ci-après représente le dispositif de captation des gaz.
- Ligne de vide autonome avec deux cryopièges ( $P < 0,05$  mbar). Deux types de ligne de vide peuvent être employés : verre ou acier.
- Spectromètre de masse des rapports isotopiques – double système d'entrée, capable de déterminer la teneur en  $^{13}\text{C}$  du  $\text{CO}_2$  en abondance naturelle, à un degré de précision interne d'au moins 0,05 ‰ (exprimé en valeur relative □). La précision interne se définit ici comme étant la différence entre deux mesures du même échantillon de  $\text{CO}_2$ .

## 2. Procédure (voir le Schéma)

### 2.1. Échantillonnage du $\text{CO}_2$

1. Relier le dispositif d'échantillonnage à la ligne de vide et tester sa capacité d'étanchéité.
2. Insérer le dispositif d'échantillonnage avec les clapets fermés dans le bouchon en effectuant un mouvement circulaire tout en maintenant le dispositif à la verticale.

3. Relier l'ensemble dispositif d'échantillonnage-bouteille de vin à la ligne de vide et vidanger la ligne et le réservoir délimités par les deux clapets (Clapet 2 ouvert, Clapet 1 fermé).
4. Une fois que le vide est créé dans le réservoir, fermer le clapet 2, ouvrir le clapet 1 et maintenir cette configuration pendant 1 minute. Après le temps d'équilibre, fermer le clapet 1. Le gaz enfermé dans le réservoir est alors purifié.

## **2.2. Purification et séparation du CO<sub>2</sub>,**

1. Transférer le CO<sub>2</sub> collecté dans le réservoir vers le premier cryopège avec de l'azote liquide pendant au moins 1 minute, puis pomper le gaz non condensé jusqu'à obtention d'une pression inférieure à 0,05 mbar.
2. Transférer l'échantillon de CO<sub>2</sub> vers le dispositif de mesurage en employant de l'azote liquide dans le second cryopège et en échangeant l'azote liquide dans le premier cryopège contre un piège à eau de -80 ± 5 °C. Maintenir cette configuration pendant au moins 1 minute.
3. Pomper le gaz non condensé (jusqu'à obtention d'une pression inférieure à 0,05 mbar) avant de fermer le dispositif de mesurage.

## **2.3. Mesure du rapport <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C**

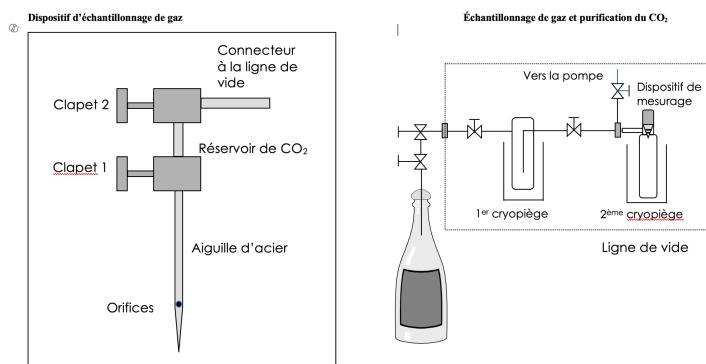
Le rapport isotopique du carbone du CO<sub>2</sub> obtenu se mesure au moyen d'un SMRI à double système d'entrée.

## **3. Référence**

1. « Mesure du rapport isotopique <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C du gaz carbonique des vins mousseux et des vins gazéifiés », J. Merín et S. Minguez. Office International de la Vigne et du Vin, F.V. 1039, 2426/200297.

## ANNEXE A

### Diagrammes du système autonome



## ANNEXE B

### Procédure expérimentale fondée sur des systèmes continus pour l'échantillonnage et le mesurage (CF-SMRI)

#### 1. Échantillonnage technique

En premier lieu, le système d'échantillonnage est vidangé, le dioxyde de carbone est extrait de la bouteille au moyen d'un « dispositif d'échantillonnage » et une quantité spécifique est transférée vers la cuve de stockage. Après application d'une surpression, une petite quantité de gaz est introduite dans le flux continu d'hélium au moyen d'un restricteur. Le système d'échantillonnage est représenté au Schéma 2.

Un flux continu de dioxyde de carbone est maintenant présent dans le flux d'hélium (flux d'échantillonnage). Le flux résiduel d'hélium est exempt de dioxyde de carbone et fait fonction de débit nul. Des « pics de commutation » artificiels sont générés par commutation provisoire entre le débit nul et le flux d'échantillonnage (temps de commutation : 2 secondes), dont les rapports isotopiques sont mesurés par le spectromètre de masse.

## 2. Procédure (voir Schéma)

### 2.1. Vidange du système d'échantillonnage

Le système d'échantillonnage est intégralement vidangé jusqu'à obtention d'une pression négative de 1 mbar (V3 fermé).

### 2.2. Échantillonnage

Le bouchon est transpercé par un « dispositif d'échantillonnage » et l'atmosphère de la bouteille est transférée vers la cuve de stockage de gaz (GV) par pression négative (housse de pression après 50 mbars environ). Le clapet de réglage fin (VF) autorise l'écoulement maîtrisé et lent du gaz. Le gaz est purifié dans le cryopège à l'issue du transfert.

### 2.3. Alimentation

Après l'échantillonnage (V3 et V2 fermés, V4 ouvert), une surpression de 1,5 bar est constituée à l'aide d'hélium. Le gaz à mesurer est conduit au CF-SMRI par l'ouverture de V3. Le mesurage peut être effectué après une première mise en condition de 150 secondes. Un capillaire est intégré comme restricteur, n'autorisant le passage que d'une très faible quantité de gaz porteur (10 mL/mn).

### 2.4. Mesurage

Un flux continu de dioxyde de carbone est maintenant présent dans le flux d'échantillonnage d'hélium (PRO). La commutation entre le flux d'échantillonnage (PRO) le flux d'hélium pur (NUL) permet de générer des pics de commutation artificiels.

Commutation sur le flux d'échantillonnage : 2 secondes (débit nul : 10-30 secondes).

## 3. Référence

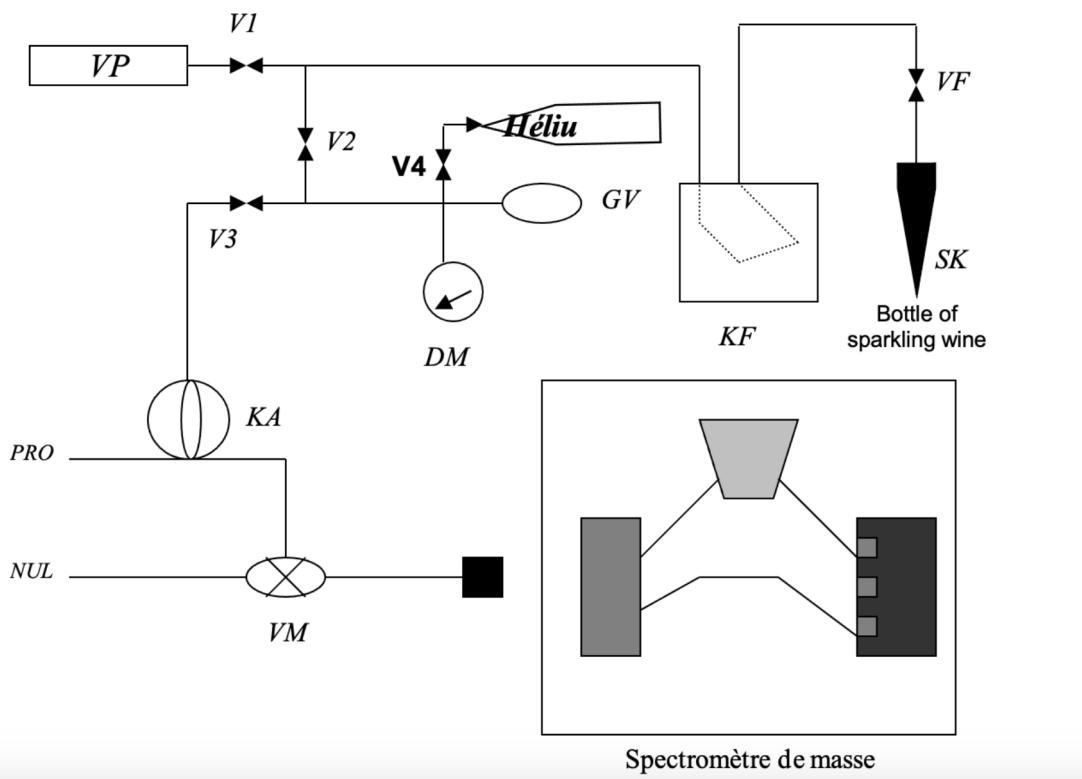
1. « Examination of the  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  isotopes in sparkling and semi-sparkling wine with the aid of simple on-line sampling », M. Boner et H. Förstel. Office International de la Vigne et du Vin, FV 1152.

## ANNEXE B

### Diagramme du système continu

#### ANNEXE B

##### Diagramme du système continu



V1-V4 clapet de non retour

VP pompe à vide

VF clapet de réglage fin

SK dispositif d'échantillonnage

PRO flux d'échantillonnage d'hélium (50 ml/min)

NUL flux d'hélium (débit nul) (60 ml/min)

KF propan-1-ol du piège à eau à - 90°C

GV cuve de stockage de gaz 250 ml

DM manomètre

KA capillaire restricteur (10 cm, 150 µm)

VM clapet 2/4 voies

## ANNEXE C

### Procédure expérimentale fondée sur la technique GC-C-SMRI

#### 1. Caractéristiques des instruments

- Chromatographe en phase gazeuse : GC Varian 3400.
- Colonne capillaire : HP-INNOWax (glycol polyéthylénique réticulé), 30 m x 0,25 mm ID, épaisseur du film : 0,5 µm.
- Interface de combustion ThermoFinnigan-MAT, avec four à oxydation réglé à 940° C ou à l'arrêt ; four de réduction à 640° C ou à l'arrêt.
- Spectromètre de masse : DeltaPlus ThermoFinnigan-MAT.

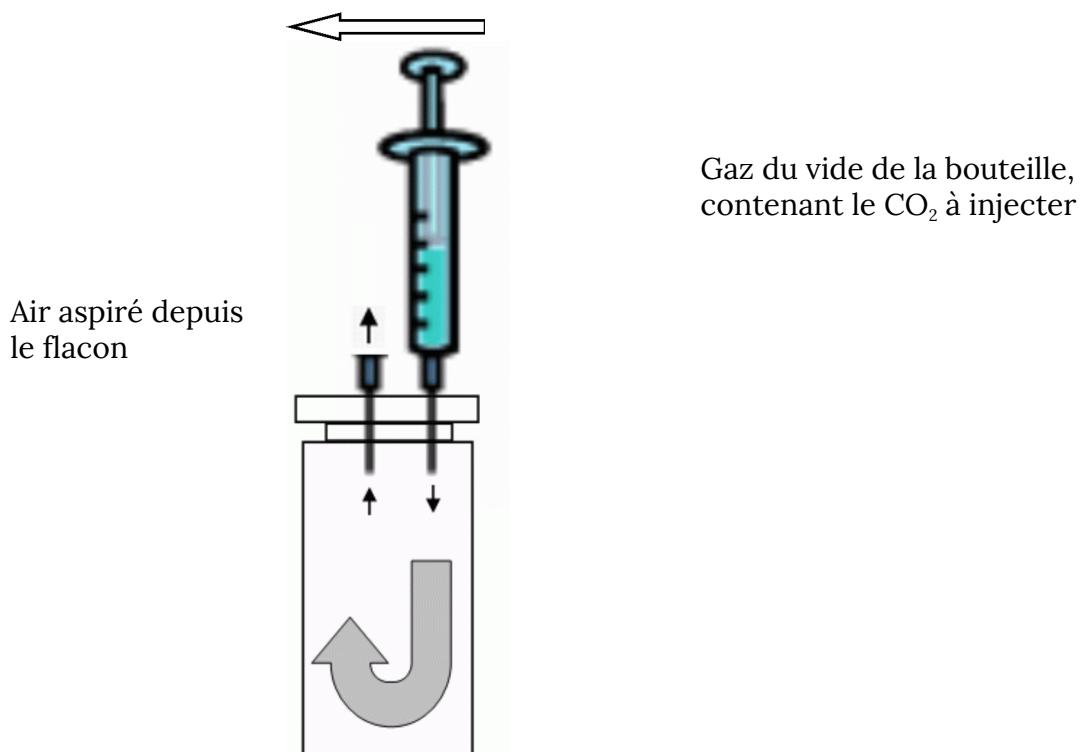
#### 2. Procédure

##### 2.1. Échantillonnage du CO<sub>2</sub>

1. Des aliquotes de gaz ont été collectées au moyen d'une seringue de 25 cm<sup>3</sup>, avec insertion d'une longue aiguille d'acier au travers du bouchon. La pression du CO<sub>2</sub> a spontanément rempli la seringue avec le gaz du vide de la bouteille.
2. Le gaz est transféré dans des flacons pré-obturés aux fins de l'analyse. Les flacons employés pour stocker le gaz sont préalablement obturés au moyen de capsules à septum de Téflon-silicone. Pour évacuer l'air situé à l'intérieur - et ainsi le CO<sub>2</sub> atmosphérique -, une seconde aiguille est plantée dans le septum, de manière à garantir que le gaz du vide de la bouteille pousse bien l'air dans le flacon. Voir le

schéma ci-dessous.

REMARQUE : une seringue de plus grande capacité est employée, en fonction du volume du flacon, pour garantir une parfaite propreté du flacon. Dans le cas présent, une seringue de 25 cm<sup>3</sup> (ou de capacité plus grande) est employée avec un flacon de 2 ml.

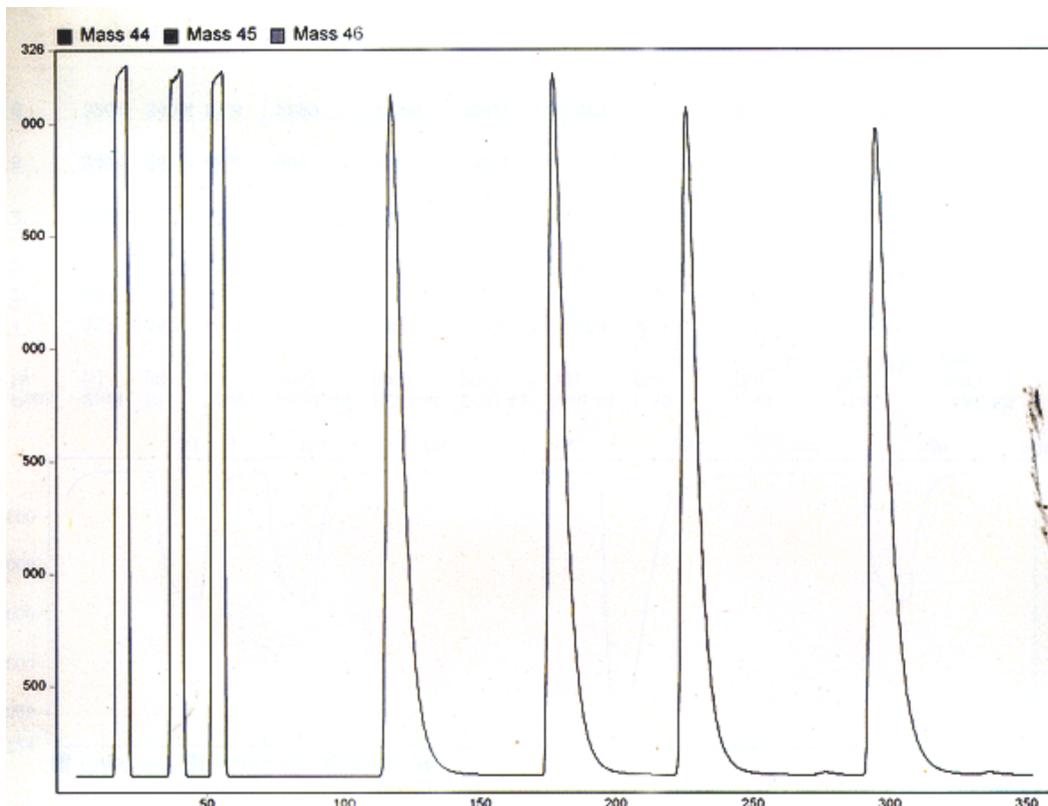


\* Attention : le format du flacon n'est pas à échelle avec celui de la seringue .

## 2.2. Analyses GC-SMRI : injection du CO<sub>2</sub> et mesure du rapport <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C

Une très faible quantité  $\mu\text{l}$  de gaz a été directement injectée dans la colonne au moyen d'une seringue Hamilton de 10  $\mu\text{l}$  à aiguille en acier cémenté. Des conditions de dédoublement de haut débit étaient définies. L'hélium porteur était à 20 PSI.

Quatre injections ont été effectuées lors de chaque mise en condition de chacun des échantillons. Le temps total d'exécution pour l'analyse a été de 6 minutes. Voir le chromatogramme ci-dessous.



### 2.3. Traitement des résultats

Le logiciel employé pour l'enregistrement et la confection des signaux du spectromètre de masse est la version 1.50 d'Isodat NT, de ThermoFinnigan-Bremen, sous le système d'exploitation MS-Windows NT.

Pour chaque échantillon, la valeur  $\delta^{13}\text{C}$  moyenne est calculée comme étant la valeur moyenne des 3 dernières injections. La valeur  $\delta^{13}\text{C}$  de la première injection est systématiquement rejetée.

## ANNEXE D

### (à titre d'information)

Résultats statistiques de l'essai inter-laboratoires essais de champagne commercial à supprimer 2 ;2

Conformément à ISO 5725:1994, les paramètres suivants ont été définis dans le cadre d'un essai inter-laboratoires conduit par 11 laboratoires européens et 1 laboratoire mexicain.

Année de l'essai inter-laboratoires : 2003-2004

Nombre de laboratoires :12

Nombre d'échantillons : 5, en double aveugle

Paramètre :  $\delta^{13}\text{C}$  de CO<sub>2</sub>

Identification de l'échantillon	A	B	C	D	E
Nombre de laboratoires participants	12	12	12	12	12
Nombre de laboratoires retenus après élimination des résultats aberrants	12	11	12	12	12
Nombre d'expériences menées en parallèle par laboratoire	2	2	2	2	2
Nombre de résultats acceptés	24	22	24	24	24
Moyenne ( $\delta^{13}\text{C}$ ) ‰	-9,92	-20,84	-23,66	-34,80	-36,43
$s_r^2$	0,057	0,031	0,119	0,006	0,044
Écart-type de répétabilité ( $S_r$ ) ‰	0,24	0,18	0,35	0,08	0,21
Valeur de répétabilité, r ( $2,8 \times S_r$ ) ‰	0,67	0,49	0,97	0,21	0,58
$S_R^2$	0,284	0,301	0,256	0,140	0,172

Écart-type de reproductibilité ( $S_R$ ) %o	0,53	0,55	0,51	0,37	0,41
Valeur de reproductibilité, R ( $2,8 \times S_R$ ) %o	1,49	1,54	1,42	1,05	1,16

Types d'échantillons :

A : Vin mousseux – Sucre C<sub>4</sub>

B : Vin mousseux – Sucre C<sub>3</sub>

C : Vin mousseux – Sucre C<sub>3</sub>

D : Vin gazéifié

E : Vin gazéifié