

RÉSOLUTION OIV-OENO 510-2013

MÉTHODE DE DETERMINATION DU RAPPORT ISOTOPIQUE $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ DE L'ACIDE ACÉTIQUE DANS LE VINAIGRE DE VIN PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE ISOTOPIQUE

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 les méthodes d'analyse internationales des vinaigres de vin avec la méthode suivante :

1. Titre

Méthode de détermination du rapport isotopique $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de l'acide acétique du vinaigre de vin par spectrométrie de masse isotopique

Méthode de type : II

2. Objectif/domaine d'application

La méthode permet de déterminer le rapport isotopique $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de l'acide acétique extrait du vinaigre de vin par spectrométrie de masse de rapport isotopique (SMRI).

3. Définitions

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

$\delta^{13}\text{C}$: rapport isotopique du carbone 13 (^{13}C) et du carbone 12 (^{12}C) exprimé en parties pour mille (‰)

V-PDB : Le Vienna-Pee-Dee Belemnite, ou PDB, référence primaire pour la mesure des variations naturelles du rapport isotopique du carbone, 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 $_{\text{is}}R_{\text{PDB}} = 0,0112372$. Le PDB est épuisé depuis longtemps, mais est resté la référence primaire pour exprimer les

variations naturelles du rapport isotopique du carbone, 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 sont alors exprimées, par convention, par rapport au V-PDB.

m/z : rapport masse / charge

4. Principe

Le rapport isotopique $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ est déterminé dans le CO_2 résultant de la combustion complète de l'acide acétique extrait de l'échantillon de vinaigre. En règle générale, on utilise pour la combustion un analyseur élémentaire couplé à un spectromètre, qui déterminera les rapports isotopiques.

5. Réactifs et produits

Les matériaux et les consommables dépendent de l'appareillage (6) utilisé par le laboratoire. Les systèmes utilisés pour la combustion de l'échantillon sont généralement 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 utilisée, les matériaux de référence, réactifs et consommables suivants peuvent être utilisés :

5.1. Matériaux de référence disponibles auprès de l'IAEA

Nom	Matériau	$\delta^{13}\text{C}$ par rapport au V-PDB
IAEA-CH-6	Saccharose	-10,4 ‰
IAEA-CH-7	Polyéthylène	-32,2 ‰
NBS22	Huile	-30,0 ‰
USGS24	Graphite	-16,1 ‰

5.2. Solution de travail

5.2.1. Dioxyde de carbone en tant que gaz de référence secondaire pour la mesure (n° CAS : 00124-38-9).

5.2.2. Solution de travail et de contrôle avec des valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ calibrées avec des matériaux de référence internationaux.

5.3. Consommables

Une liste indicative de consommables établie pour les systèmes à flux continu est reportée ci-après :

- Hélium pour analyse (n° CAS 07440-59-7)
- Oxygène pour analyse (n° CAS 07782-44-7)
- Dioxyde de carbone pour analyse, utilisé comme gaz de référence secondaire pour la teneur en carbone 13 (n° CAS 00124-38-9)
- Réactif d'oxydation pour le four du système de combustion : oxyde de cuivre (Cu_2O) pour analyse élémentaire (n° CAS 1317-38-0)
- Desséchant pour éliminer de l'eau produite par la combustion. Par exemple : anhydride pour analyse élémentaire (perchlorate de magnésium) (n° CAS 10034-81-8).

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

6. Appareillage

6.1. Spectromètre de masse de rapport isotopique

Spectromètre de masse de rapport isotopique détermine la teneur relative de ^{13}C par rapport à celle de ^{12}C du gaz CO_2 avec une précision interne de 0,05 ‰. La précision interne est ici définie comme la différence entre deux mesures du même échantillon de CO_2 .

Le spectromètre de masse, destiné à déterminer la composition isotopique du gaz CO_2 , est généralement équipé d'un collecteur triple capable de mesurer

simultanément les courants ioniques suivants :

- $m/z = 44$ ($^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$)
- $m/z = 45$ ($^{13}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$ et $^{12}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O}$)
- $m/z = 46$ ($^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$, $^{12}\text{C}^{17}\text{O}^{17}\text{O}$ et $^{13}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O}$)

En mesurant l'intensité correspondante, le rapport isotopique $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ est déterminé par le rapport d'intensité $m/z = 45$ et $m/z = 44$ après réalisation d'une série de corrections au niveau de l'espèce isobarique $^{12}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O}$, dont la contribution peut être calculée en fonction de l'intensité du courant mesurée pour $m/z = 46$ et de l'abondance relative de ^{18}O et ^{17}O (correction de Craig).

Le spectromètre de masse pour mesurer le rapport isotopique doit être équipé de :

- Un système d'entrée double (système de double introduction), pour mesurer en alternance l'échantillon et un étalon de référence,
- Ou un système à flux continu intégré qui transfère de manière quantitative dans le spectromètre de masse le CO_2 issu de la combustion des échantillons et de la solution de travail.

6.2. Appareillage de combustion

Appareillage de combustion capable de convertir quantitativement l'acide acétique 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 (6.2.1) intégré à l'instrumentation de spectrométrie de masse, 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 d'un chromatographe de gaz, le matériel de laboratoire suivant est utilisé :

- Seringue pour liquides,
- Flacons équipés d'un système de fermeture étanche et de septa inertes.

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 manuels 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. Préparation des échantillons

L'acide acétique doit être extrait du vinaigre et purifié afin d'être analysé par SMRI. Au moins 6 mL d'acide acétique pur doivent être récupérés à la fin de l'extraction.

L'extraction et la purification de l'acide acétique pourront être obtenues par tout type de méthode pourvu qu'elle n'implique pas un fractionnement isotopique. À titre d'exemple, la méthode suivante est exposée (y compris les réactifs utilisés), de même que la colonne Cadiot de la Figure 1.

7.1. Principe

L'acide acétique du vinaigre est tout d'abord extrait avec de l'éther diéthylique. Il est ensuite purifié par distillation.

7.2. Réactifs

- Éther diéthylique (pureté > 99,8).

7.3. Matériel de laboratoire

- Extracteur liquide-liquide,
- Colonne d'extraction de type Cadiot,
- Ballon,
- Condensateur,
- Chauffe ballon.

7.4. Déterminations expérimentales

7.4.1. Extraction liquide-liquide

Placer environ 125 mL d'éther diéthylique dans un ballon à fond rond de 250 mL. Utiliser un extracteur liquide-liquide d'une capacité de 400 mL à 800 mL, en fonction de la teneur en acide acétique du vinaigre (au moins 6 mL d'acide acétique pur doivent être récupérés à la fin de l'extraction).

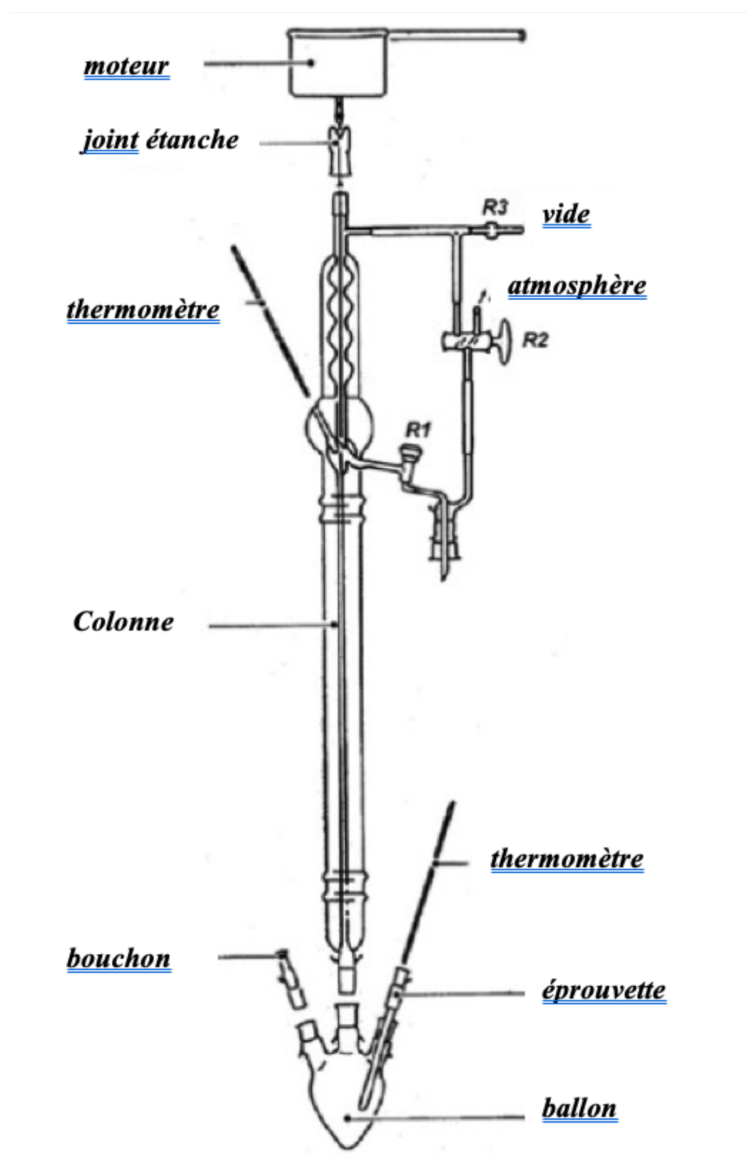
Verser le vinaigre dans l'extracteur et compléter le remplissage avec de l'éther diéthylique. Placer le ballon à fond rond dans le chauffe ballons, connecter l'extracteur et ouvrir l'alimentation en eau du condensateur, située sur la partie supérieure de l'extracteur. L'extraction doit se poursuivre pendant au moins 5 heures. Après ce délai, séparer les solutions aqueuse et organique. Ajouter la solution

organique à l'extract dans le ballon à fond rond.

7.4.2. Purification de l'extract

L'acide acétique en solution dans l'éther diéthylique contenu dans le ballon à fond rond est distillé sur une colonne, ce qui permet d'éviter le fractionnement isotopique de l'acide acétique, tel qu'indiqué dans la Fig. 1.

Fig. 1. Schéma du dispositif de distillation (source : Thomas et Jamin, 2009)



Un flacon adapté de 250 mL est utilisé pour recueillir le distillat.

Ouvrir l'alimentation en eau du condensateur et mettre le dispositif de chauffage en marche. Attention, le chauffage doit être modéré au cours de la distillation de l'éther diéthylique (point d'ébullition : 34°C).

Lorsque la plus grande partie de l'éther diéthylique a été distillée (plus de vapeurs au niveau de la tête de la colonne), augmenter le chauffage.

La distillation est achevée lorsque la température interne au niveau de la tête de la colonne est stabilisée à 90°C (l'acide acétique se distille à 116-117°C).

Les traces d'éther diéthylique dans l'acide acétique sont éliminées en appliquant un flux de N₂ sur le résidu à température ambiante, pendant 10 min.

8. Mode opératoire

Toutes les étapes préparatoires doivent être effectuées sans aucune perte significative d'acide acétique 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'acide acétique au moyen des systèmes automatisés de combustion commerciaux. Il est possible d'utiliser toute autre méthode permettant de garantir que l'échantillon est quantitativement converti en dioxyde de carbone sans aucune perte par évaporation.

8.1. 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 : la quantité appropriée d'échantillon doit être calculée selon la quantité de carbone nécessaire et 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 préparée,

- Pour chaque échantillon, préparer deux capsules,
- Placer les capsules à l'endroit approprié sur le plateau du tambour d'échantillons de l'analyseur élémentaire. Chaque capsule doit être soigneusement identifiée par un numéro d'ordre,
- Placer systématiquement des capsules contenant la solution de travail au début et à la fin de la série d'échantillons,
- Insérer régulièrement des échantillons de contrôle dans la série d'échantillons.

8.2. 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 référence avant de commencer les mesures sur les échantillons.

8.3. Déroulement d'une série de mesures

Les échantillons sont introduits successivement dans l'analyseur élémentaire. Le dioxyde de carbone issu de la combustion de chaque échantillon est transféré vers le spectromètre de masse qui mesure les courants ioniques. L'ordinateur, connecté à cet appareillage, enregistre les intensités des courants ioniques et calcule les valeurs δ pour chaque échantillon (9).

9. Calculs

L'objectif de la méthode est de mesurer le rapport isotopique $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de l'acide acétique extrait à partir du vinaigre. Le rapport isotopique $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ s'exprime comme la

déviations par rapport à une solution de travail. La déviation isotopique carbone ($\delta^{13}\text{C}$) est calculée sur une échelle delta pour mille par comparaison des résultats obtenus pour l'échantillon contre ceux de la solution de travail précédemment calibrée selon la référence primaire internationale (V-PDB). Les valeurs $\delta^{13}\text{C}$ sont exprimées par rapport à la solution de travail :

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

où $R_{\text{éch}}$ et $R_{\text{réf}}$ sont respectivement les rapports isotopiques $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de l'échantillon et ceux de l'étalon interne.

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

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

où $\delta^{13}\text{C}_{\text{réf/V-PDB}}$ est la valeur isotopique préalablement déterminée pour la solution 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 solution de travail et sa valeur réelle, précédemment calibrée contre le V-PDB par comparaison avec l'un des matériaux de référence internationaux. La correction à appliquer aux échantillons varie de manière linéaire par rapport au biais de la valeur des deux solutions de travail qui précèdent et suivent l'échantillon. 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 solution de travail et les mesures de valeurs obtenues.

10. Contrôle de la qualité de l'analyse

Contrôler que la valeur $\delta^{13}\text{C}$ de la référence de contrôle répond aux critères d'acceptabilité définis par la carte de contrôle du document OIV-MA-AS1-11. 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'acide acétique (par exemple une capsule imparfaitement scellée) ou bien une instabilité de l'analyseur élémentaire ou du spectromètre de masse.

11. Fidélité

Une étude collaborative internationale a été réalisée (Thomas et Jamin, 2009) pour la validation de la méthode.

La limite de répétabilité (r) est de 0,51 ‰ en moyenne.

La limite de reproductibilité (R) est de 0,93 ‰ en moyenne.

Les données et résultats de cette étude collaborative internationale sont fournis dans l'annexe A.

12. Bibliographie

1. OIV-MA-AS1-08 : Fidélité des méthodes (Résolution 5/99).
2. OIV-MA-AS1-09 : Protocole pour la planification, la conduite et l'interprétation des études de performance des méthodes d'analyse (Résolution 6/2000).
3. OIV-MA-AS1-11 : Contrôle interne de qualité dans les laboratoires d'analyse.
4. OIV-MA-AS312-06: R2009 : 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 mouts, des mouts concentrés ou du sucre de raisin.
5. Protocole IUPAC de W. Horwitz, Pure Appl. Chem. 67 (2) (1995) 331.
6. Thomas, F., Jamin, E. (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.

ANNEXE A

RÉSULTATS DE L'ÉTUDE COLLABORATIVE INTERNATIONALE

Ce document rassemble les résultats de l'étude de validation de la méthode d'analyse du rapport isotopique $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ dans l'acide acétique extrait du vinaigre de vin (Thomas et Jamin, 2009).

L'étude a été réalisée conformément aux documents OIV-MA-AS1-08 et OIV-MA-AS1-09.

1. Laboratoires participants

14 laboratoires ont participé à l'étude :

Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin	Allemagne
Central Science Laboratory, York	Royaume-Uni
Custom Technical Laboratory, Prague	Rép. tchèque
Chemical Institute of the Hungarian Customs and Finance Guard, Budapest	Hongrie
Eurofins, Nantes	France
FEM-IASMA, San Michele all'Adige, Trente	Italie
Joint Reasearch Center, Ispra	Italie
Arbitral Agroalimentario Del MAPA, Madrid	Espagne
Landesuntersuchungsamt, Speyer	Allemagne
Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Würzburg	Allemagne

Service Commun des Laboratoires, Bordeaux	France
Service Commun des Laboratoires, Montpellier	France
Service Commun des Laboratoires, Paris	France
Unione Italiana Vini, Vérone	Italie

2. Échantillons

L'étude a été réalisée sur 5 échantillons en double aveugle : trois échantillons de vinaigre de vin (B, C, D), un échantillon de vinaigre d'alcool (A) et un échantillon de vinaigre de vin contenant 20 % de A (Thomas et Jamin, 2009).

L'acide acétique a été extrait et le $\delta^{13}\text{C}$ analysé pour chaque échantillon. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-après.

3. Évaluation statistique

Les calculs statistiques ont été réalisés conformément au protocole OIV-MA-AS1-09, lui-même basé sur le protocole IUAPC de Horwitz. Les valeurs aberrantes ont été éliminées de la manière suivante : une boucle de tests Cochran pour l'élimination des laboratoires présentant les variances les plus élevées, tests de Grubbs simple et double pour les valeurs aberrantes individuelles ou couplées, puis retour au test de Cochran, etc. en conservant une proportion de valeurs aberrantes $< 2/9$. Les écarts types de répétabilité (s_r) et de reproductibilité (s_R) pour chaque matériau ont ensuite été calculés à partir des couples de résultats valides obtenus en double aveugle.

Pour l'obtention de davantage de données, se référer à la publication de Thomas et Jamin, 2009.

Description de l'échantillon	n° de résultats valides	n° de répétitions	$\delta^{13}\text{C}$ moyen (‰)	s_r (‰)	Limite de répétabilité r ($2,8 \times s_r$) ‰	s_R (‰)	Limite de reproductibilité R ($2,8 \times s_R$) ‰
A	10	2	-29,52	-0,14	0,39	0,34	0,95
B	11	2	-26,66	0,11	0,31	0,25	0,70

C	10	2	-27,51	0,20	0,56	0,33	0,92
B+20%A	11	2	-27,15	0,14	0,39	0,29	0,81
D	7	2	-27,19	0,33	0,92	0,46	1,29

La limite de répétabilité moyenne (r) était de 0,51 ‰ et la limite de reproductibilité moyenne (R) de 0,93 ‰, comparables aux valeurs observées pour l'alcool de vin (OIV-MA-AS312-06).