

RÉSOLUTION OIV-OENO 426-2011

DÉTERMINATION DE LA RÉPARTITION DU DEUTERIUM 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 (SNIFNMR/RMNFINS)

L'ASSEMBLÉE GÉNÉRALE,

CONSIDÉRANT 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
CONSIDÉRANT les actions du Plan Stratégique 2009-2012 de l'OIV

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

DÉCIDE de remplacer la méthode courante de la 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, publiée dans le Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts par la méthode de type II suivante.

Détermination de la répartition du deutérium dans l'éthanol issu de moûts de raisins fermentés, moûts de raisins concentrés, sucre de raisin (moûts de raisins concentrés rectifiés) et de vins par résonance magnétique nucléaire (SNIF-NMR / RMN-FINS [1])

1. Introduction

Le deutérium contenu dans les sucres et l'eau du moût de raisins est réparti de nouveau après fermentation dans les molécules I, II, III et IV du vin :



I



II



III



IV

2. Champ d'application

La méthode permet de mesurer les rapports isotopiques du deutérium (D/H) dans

l'éthanol du vin et dans l'éthanol obtenu par fermentation de produits de la vigne (moûts, moûts concentrés, moûts concentrés rectifiés).

3. Définitions

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

$(D/H)_II$: Rapport isotopique associé à la molécule II

$(D/H)_w^Q$: Rapport isotopique de l'eau dans le vin (ou dans des produits fermentés)

$$R = 2(D/H)_{II}/(D/H)_I$$

R exprime la répartition relative du deutérium dans les molécules I et II ; R est mesuré directement à partir de l'intensité h (hauteur maximale) des signaux et donc $R = 3h_{II}/h_I$.

4. Principe

Les paramètres définis ci-dessus R , $(D/H)_I$ et $(D/H)_{II}$ sont déterminés par la résonance magnétique nucléaire du deutérium dans l'éthanol extrait à partir du vin ou de produits de fermentation du moût, de moût concentré ou de sucre de raisin (moût concentré rectifié) obtenu dans des conditions données.

5. Réactifs et matériaux

5.1. Réactifs :

5.1.1. Réactifs pour la détermination de l'eau par la méthode de Karl Fischer (lorsque cette méthode est utilisée pour la mesure de la teneur en alcool du distillat).

5.1.2. Hexafluorobenzène (C_6F_6) utilisé comme substance de blocage

5.1.3. Acide trifluoroacétique (TFA, CAS : 76-05-1) ou anhydride trifluoroacétique (TFAA, CAS : 407-25-0)

5.2. Matériaux de référence (disponibles auprès de l'Institut des matériaux et mesures de référence (IRMM) à Geel (B)) :

5.2.1. Tubes RMN scellés de CRM-123, utilisés pour vérifier l'étalonnage de l'instrumentation RMN

5.2.2. N,N-tétraméthylurée standard (TMU) ; TMU standard avec un rapport isotopique étalonné D/H.

5.2.3. Autres matériaux de référence disponibles utilisés

pour contrôler les étapes de distillation et de préparation :

CRM		Paramètre	Valeur certifiée	Incertitude
CRM-656	Éthanol du vin, 96% vol.		94,61	0,05
		t^D (éthanol) en % m/m	-26,91	0,07
		$\delta^{13}C$ (éthanol) en ‰ VPDB	102,84	0,20
		(D/H) _I (éthanol) en ppm	132,07	0,30
		(D/H) _I (éthanol) en ppm	2,570	0,005
		R (éthanol)		
CRM-660	Solution hydroalcoolique, 12% vol.		11,96	0,06
		t^Q (éthanol) en % vol.	-26,72	0,09
		$\delta^{13}C$ (éthanol) en ‰ VPDB	102,90	0,16
		(D/H) _I (éthanol) en ppm	131,95	0,23
		(D/H) _{II} (éthanol) en ppm	2,567	0,005
		R	148,68	0,14

		(D/H) _w (eau) en ppm		
--	--	---------------------------------	--	--

5.3. Appareillage

5.3.1. Spectromètre RMN équipé d'une sonde spécifique 'deutérium' réglé à la fréquence caractéristique ν_0 du champ B_0 (par exemple pour $B_0 = 7,05$ T, $\nu_0 = 46,05$ MHz et pour $B_0 = 9,4$ T, $\nu_0 = 61,4$ MHz), possédant un canal de découplage du proton (B2) et un canal de stabilisation champ-fréquence (lock) à la fréquence du fluor. L'instrument RMN peut éventuellement être équipé d'un passeur automatique d'échantillons et d'un programme supplémentaire de traitement de données pour l'évaluation des spectres et le calcul des résultats. Le fonctionnement du spectromètre RMN peut être contrôlé à l'aide de matériaux de référence certifiés (tubes scellés CRM 123).

5.3.2. Tubes échantillons RMN de 10 mm

5.3.3. Appareil de distillation

Remarque : Tout dispositif d'extraction de l'éthanol peut être utilisé à la condition qu'il permette de récupérer l'alcool du vin sans fractionnement isotopique.

La colonne Cadiot représentée en figure 1 est un exemple de dispositif de distillation manuel qui permet d'extraire 96 à 98,5% de l'éthanol du vin sans fractionnement isotopique, et d'obtenir un distillat contenant 92 à 93 d'éthanol en % m/m (95 % vol.).

Ce type de système comprend :

- Chauffe-ballon électrique avec régulateur de tension,
- Ballon à fond rond de 1 litre avec col en verre dépoli,
- Colonne Cadiot à bande tournante (partie mobile en Téflon),
- Fioles coniques avec col en verre dépoli, pour la collecte du distillat

Des systèmes automatiques de distillation sont également disponibles.

Les performances du système de distillation peuvent être contrôlées périodiquement, à la fois pour vérifier le taux d'extraction et l'exactitude de la détermination isotopique. Ce contrôle peut être effectué par distillation et mesure de CRM -660.

5.3.4. Les équipements et consommables de laboratoire courants listés ci-dessous sont nécessaires :

- Micropipette avec embouts appropriés,
- Balance d'une précision de 0,1 mg ou supérieure,
- Balance d'une précision de 0,1 g ou supérieure
- Seringue à usage unique pour le transfert des liquides,
- Fioles jaugées de précision (50ml, 100 ml, 250ml, ...)
- Flacons équipés d'un système de fermeture étanche et de septa inertes (pour le stockage de parties aliquotes de vins, de distillats et de résidus jusqu'à la mesure)
- Équipement et consommables spécifiés dans les autres méthodes citées ici.

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.

6. Echantillonnage (Préparation de l'échantillon)

6.1. S'il n'est pas indiqué, déterminer le titre alcoométrique du vin ou du produit fermenté (tv) au moins à 0,05 % vol. le plus proche. (par exemple en utilisant la méthode de l'OIV MA-F-AS312-01-TALVOL).

6.2. Extraction de l'éthanol

Avec la fiole jaugée appropriée, introduire un échantillon homogène d'un volume approprié V ml de vin ou de produit fermenté dans le ballon à fond rond de l'appareil de distillation. Placer une fiole conique en verre dépoli pour recueillir le distillat. Chauffer le produit à distiller pour obtenir un taux de reflux constant au niveau du condensateur. Commencer le recueil du distillat quand on atteint une température stable des vapeurs caractéristique de l'azéotrope eau-éthanol (78°C) et arrêter le recueil quand la température augmente. Le recueil du distillat doit se poursuivre jusqu'à la récupération totale de l'azéotrope eau-éthanol.

En cas d'utilisation manuelle d'une colonne Cadiot (Figure 1), il est possible d'appliquer le mode opératoire suivant :

Recueillir le liquide d'ébullition correspondant à l'azéotrope eau-éthanol ; quand la température augmente, interrompre le recueil pendant cinq minutes. Quand la température redescend à 78°C, recommencer le recueil du distillat jusqu'à ce que la température des vapeurs augmente à nouveau. Répéter cette opération jusqu'à ce que

la température, après interruption du recueil, ne redescende plus à 78 °C.

Des systèmes de distillation disponibles dans le commerce peuvent également être utilisés.

Le poids m^D de distillat collecté est pesé avec une précision d'au moins 0,1g.

Afin d'éviter tout fractionnement isotopique, le distillat doit être conservé dans une fiole étanche empêchant toute évaporation jusqu'à ce qu'il soit de nouveau utilisé pour la détermination du titre alcoométrique (6.3) et la préparation du tube RMN (7.1).

Une partie aliquote de quelques ml de résidu est conservée. Son rapport isotopique $(D/H)^Q_w$ peut être déterminé si nécessaire.

6.3. Détermination du titre alcoométrique du distillat

Le titre alcoométrique (%m/m) du distillat doit être déterminé avec une précision supérieure à 0,1%.

La teneur en eau du distillat ($\square$ g) peut être déterminée par la méthode Karl Fischer à l'aide d'un échantillon d'environ 0,5 ml d'alcool d'une masse connue exacte de $\square$ g. Le titre alcoométrique par masse du distillat est alors donné par la formule suivante :

$$\bullet \quad t_m^D \% \text{ m/m} = 100 (1 - \square') / \square$$

Alternativement, le titre alcoométrique peut être déterminé par densimétrie, par exemple à l'aide d'un densimètre électronique.

6.4. Taux de distillation

Le taux de distillation est estimé à l'aide de la formule suivante :

$$\text{Taux de dist. \%} = 100 \quad t_m^D \quad m^D / (V.tv)$$

Etant donné l'incertitude pesant sur chaque terme et en particulier sur le t_v , le taux de distillation est estimé à $\pm 0,5\%$ (dans le cas d'un vin à 10% v/v).

En cas d'utilisation de la colonne Cadiot, aucun effet significatif de fractionnement isotopique n'est prévu pour un taux d'extraction supérieur à 96%. En tout état de cause, l'opérateur peut employer pour la distillation un volume V_{ml} approprié de vin ou de produit fermenté afin d'assurer un taux d'extraction suffisant. En général des parties aliquotes de 750, 500, 400 et de 300 ml d'échantillon de vin devraient être suffisantes pour obtenir un taux de 96% en suivant la procédure de distillation énoncée ci-dessus avec la colonne de Cadiot sur des vins ou produits fermentés dont

le tv est respectivement de 4, 6, 8 et 10% vol.

6.5. Fermentation de moûts, moûts concentrés et moûts concentrés rectifiés

Avant utilisation, la levure peut être réactivée dans un faible volume de moût. La cuve de fermentation est équipée d'un système d'étanchéité pour éviter les pertes d'éthanol.

6.5.1. Moûts

Verser environ un litre de moût, dont la concentration en sucres fermentescibles a été précédemment déterminée, dans la cuve de fermentation. Ajouter environ 1 g de levure sèche qui aura éventuellement été préalablement réactivée. Insérer le dispositif d'étanchéité. Laisser la fermentation s'effectuer jusqu'à épuisement du sucre. Le produit fermenté peut ensuite être distillé suivant le procédé décrit précédemment pour le vin aux paragraphes 6.1 à 6.4.

Remarque : Les moûts conservés par ajout d'anhydride sulfureux doivent être désulfités par barbotage d'azote dans le moût dans un bain-marie à 70 à 80 °C sous reflux, afin d'empêcher le fractionnement isotopique par l'évaporation de l'eau. Une alternative pour retirer l'anhydride sulfureux consiste à ajouter en petite quantité une solution de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

6.5.2 Moûts concentrés

Placer V ml de moût concentré contenant une quantité connue de sucre (approximativement 170 g) dans la cuve de fermentation. Compléter jusqu'à 1 litre avec (1000 - V) ml d'eau. Ajouter les levures sèches (1 g) et 3 g de base azotée de bacto-levure DIFCO sans acides aminés. Homogénéiser et procéder comme décrit au paragraphe 6.5.1.

6.5.3 Sucre de raisin (Moûts concentrés rectifiés)

Procéder comme indiqué en 6.5.2, en complétant jusqu'à 1 litre avec (1000 - V) ml d'eau contenant également 3 g d'acide tartrique dissous.

Remarque : Les moûts concentrés et les moûts rectifiés sont dilués dans de l'eau ayant un rapport isotopique (D/H) différent de celui du moût d'origine. Par convention, les mesures des paramètres (D/H)_I et (D/H)_{II} sur l'éthanol doivent être normalisées comme si le moût avait fermenté dans de l'eau ayant une concentration en deutérium ajustée à celle de V-SMOW (155,76). On normalise cette donnée à l'aide des équations suivantes (Martin et al., 1996, J. AOAC, 79, 62-72) :

$$\left(\frac{D}{H}\right)_I^{Norm.V-SMOW} = \left(\frac{D}{H}\right)_I - 0.19 \times \left[\left(\frac{D}{H}\right)_W^S - 155.76\right]$$

$$\left(\frac{D}{H}\right)_{II}^{Norm.V-SMOW} = \left(\frac{D}{H}\right)_{II} - 0.78 \times \left[\left(\frac{D}{H}\right)_W^S - 155.76\right]$$

où $\left(\frac{D}{H}\right)_W^S$ est le rapport isotopique du moût dilué. Cette valeur peut être calculée à l'aide de l'équation de la Droite mondiale des eaux météoriques (Craig, 1961) :

$$\left(\frac{D}{H}\right)_W^S = 155.76 \times \left[\frac{(8 \times \delta^{18}O + 10)}{1000} + 1\right]$$

où on mesure $\delta^{18}O$ sur le moût dilué par la méthode de détermination du rapport isotopique $^{18}O/^{16}O$ de l'eau dans les vins et les moûts [OIV-MA-AS2-12].

Conserver 50 ml d'échantillon de moût ou de moût traité à l'anhydride sulfureux ou de moût concentré ou de moût concentré rectifié, en vue de l'extraction éventuelle de l'eau et de la détermination de son rapport isotopique $(D/H)_w^Q$.

7. Procédure

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

Sonde RMN de 10 mm de diamètre : dans une fiole précédemment pesée, recueillir 3,2 ml de distillat comme indiqué en section 6.2 et peser à 0,1 mg près (m_A) ; puis prendre un échantillon de 1,3 ml d'étalon interne TMU (5.2.2) et peser à 0,1 mg près (m_{ST}).

En fonction du type de spectromètre et de sonde utilisé, ajouter une quantité suffisante d'hexafluorobenzène (5.1.2) comme substance de stabilisation champ-fréquence (lock):

Spectromètres	Sonde de 10 mm
7.05 T	150 µl
9.4 T	35 µl

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 du tube et jusqu'à la mesure RMN, l'opérateur doit veiller à éviter toute évaporation d'éthanol et de TMU car ceci occasionnerait un fractionnement isotopique, des erreurs de poids (m_A et m_{ST}) des composants et des résultats RMN incorrects.

L'exactitude du mode opératoire de mesure y compris cette étape de préparation peut être vérifiée en utilisant le CRM 656.

Remarque : l'hexafluorobenzène peut être additionné de 10% (v/v) d'acide trifluoroacétique (5.1.3) afin de catalyser l'échange rapide d'hydrogène sur la liaison hydroxyle avec pour résultat un seul pic RMN pour les signaux hydroxyle et eau résiduelle.

7.2. Enregistrement des spectres RMN 2H de l'alcool

L'homogénéité du champ magnétique B_0 de l'échantillon est optimisée par compensation (shimming), maximisant le signal RMN du lock ^{19}F observé avec l'hexafluorobenzène. Les spectromètres RMN modernes peuvent effectuer automatiquement et de manière très efficace cette procédure de compensation (shimming) à condition que les réglages initiaux soient suffisamment proches de l'homogénéité optimale du champ magnétique pour un échantillon donné, ce qui est généralement le cas pour une série d'échantillons d'éthanol préparés comme indiqué en 7.1. L'efficacité de cette procédure peut être contrôlée au moyen de la résolution mesurée sur le spectre obtenu sans multiplication exponentielle (c.-à-d. $LB = 0$) (Figure 2b) et exprimée par la largeur à mi-hauteur des signaux méthyle et méthylène de l'éthanol et du signal méthyle du TMU, et doit être inférieure à 0,5 Hz dans les conditions optimales. La sensibilité mesurée avec un facteur de multiplication exponentielle LB égal à 2 (Figure 2a) doit être supérieure ou égale à 150 pour le signal méthyle de l'éthanol titrant 95 % vol. (93,5 % mas.).

7.2.1. Vérification des réglages des instruments

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

Utiliser les tubes scellés CRM123 (H : Haut, M : Moyen, B : Bas).

En suivant la procédure décrite au paragraphe 7.3 ci-dessous, déterminer les valeurs isotopiques de ces alcools, en les notant $mesH$, $mesM$, $mesB$.

Les comparer aux valeurs standard correspondantes signalées par stH , stM , stB en exposant.

En général, à titre d'indication, l'écart-type obtenu pour 10 répétitions de chaque spectre devrait être de l'ordre de 0,01 pour le rapport R, 0,5 ppm pour $(D/H)_I$ et 1 ppm pour $(D/H)_{II}$.

Les valeurs moyennes obtenues pour les divers paramètres isotopiques (R , $(D/H)_I$, $(D/H)_{II}$) doivent se situer dans l'écart-type de répétabilité correspondant indiqué pour ces paramètres pour le CRM123. Dans le cas contraire, répéter les contrôles.

Une fois les réglages optimisés, d'autres matériaux CRM peuvent être utilisés pour contrôler la qualité des mesures dans des analyses de routine.

7.3. Conditions d'acquisition des spectres RMN

Placer un échantillon d'alcool préparé en 7.1 dans un tube de 10 mm et l'introduire dans la sonde.

On suggère les conditions d'acquisition des spectres RMN suivantes :

- Température constante de la sonde, réglée idéalement avec une variation n'excédant pas $\pm 0,5^\circ\text{K}$ dans la plage de 302K à 306K en fonction de la puissance calorifique générée par le découplage ;
- Temps d'acquisition d'au moins 6,8 s pour une largeur spectrale de 1200 hertz (mémoire de 16K) (c.-à-d. environ 20 ppm à 61,4 MHz ou 27 ppm à 46,1 MHz) ;
- Impulsion : 90° ;
- 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 CH3 et CH2. Utiliser le mode de découplage large bande ou des trains d'impulsions composites (ex : WALTZ16) pour assurer un découplage homogène sur l'ensemble du spectre.

Effectuer pour chaque spectre un nombre NS d'accumulations suffisant pour obtenir le rapport signal-bruit indiqué sous le terme de sensibilité au paragraphe 7.2 et répéter NE fois cette série de NS accumulations. Les valeurs de NS dépendent des types de spectromètre et de sonde utilisés. Exemples de choix possibles :

Spectromètre	Sonde de 10 mm
7.05 T	NS = 304
9.4 T	NS = 200

Le nombre NE de répétitions doit être statistiquement significatif et suffisant pour obtenir les performances et la précision de la méthode comme indiqué en section (9) ci-dessous.

Dans le cas où deux tubes d'échantillons RMN ont été préparés selon la procédure décrite en 7.1, on peut enregistrer cinq répétitions de spectres RMN (NE=5) sur chaque tube. Le résultat final pour chacun des paramètres isotopiques correspond à la valeur moyenne des mesures obtenues sur les deux tubes d'échantillons RMN. Dans ce cas, les critères d'acceptation pour la validation des résultats obtenus avec ces deux tubes sont les suivants :

- $|\text{Mes1(D/H)}_I - \text{Mes2(D/H)}_I| < 0,5\text{ppm}$, $|\text{Mes1(D/H)}_{II} - \text{Mes2(D/H)}_{II}| < 0,8\text{ppm}$

8. Expression des résultats

Pour chacun des NE spectres (voir spectre RMN de l'éthanol, Figure 2a), déterminer :

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

$$(D/H)_I = 1.5866 \cdot T_I \cdot \frac{m_{ST}}{m_A} \cdot \frac{(D/H)_{ST}}{t_m^D}$$

$$(D/H)_{II} = 2.3799 \cdot T_{II} \cdot \frac{m_{ST}}{m_A} \cdot \frac{(D/H)_{ST}}{t_m^D}$$

Avec

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

$$T_{II} = \frac{\text{hauteur du signal II (CH}_3\text{ CHD OH)}}{\text{hauteur du signal II (TMU)}}$$

- m_{ST} et m_A , voir 7.1
- t_m^D , voir 6.3
- $(D/H)_{ST}$ = rapport isotopique de l'étalon interne (TMU) indiqué sur le certificat fourni par IRMM.

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

Pour chacun des paramètres isotopiques, calculer la moyenne et l'intervalle de confiance pour le nombre de spectres répétés acquis sur un échantillon donné.

Des logiciels optionnels permettent d'effectuer ces calculs en ligne.

9. Précision

La répétabilité et la reproductibilité de la méthode SNIF-NMR / RMN-FINS ont été l'objet d'études menées en collaboration sur les jus de fruit, ainsi qu'il est indiqué dans la bibliographie ci-dessous. Néanmoins ces études ne prenaient en considération que le paramètre $(D/H)_I$. Dans le cas du vin, des données provenant d'études internes menées dans différents laboratoires peuvent être prises en considération pour établir l'écart-type de répétabilité et la limite de répétabilité, comme présenté dans l'Annexe I. Les résultats des essais d'aptitude rapportés dans l'Annexe II fournissent des données qui peuvent être utilisées pour calculer l'écart-type de reproductibilité et la limite de reproductibilité pour les vins.

Ces chiffres peuvent être résumés comme suit :

	$(D/H)_I$	$(D/H)_{II}$	R
S_r	0,26	0,30	0,005
r	0,72	0,84	0,015

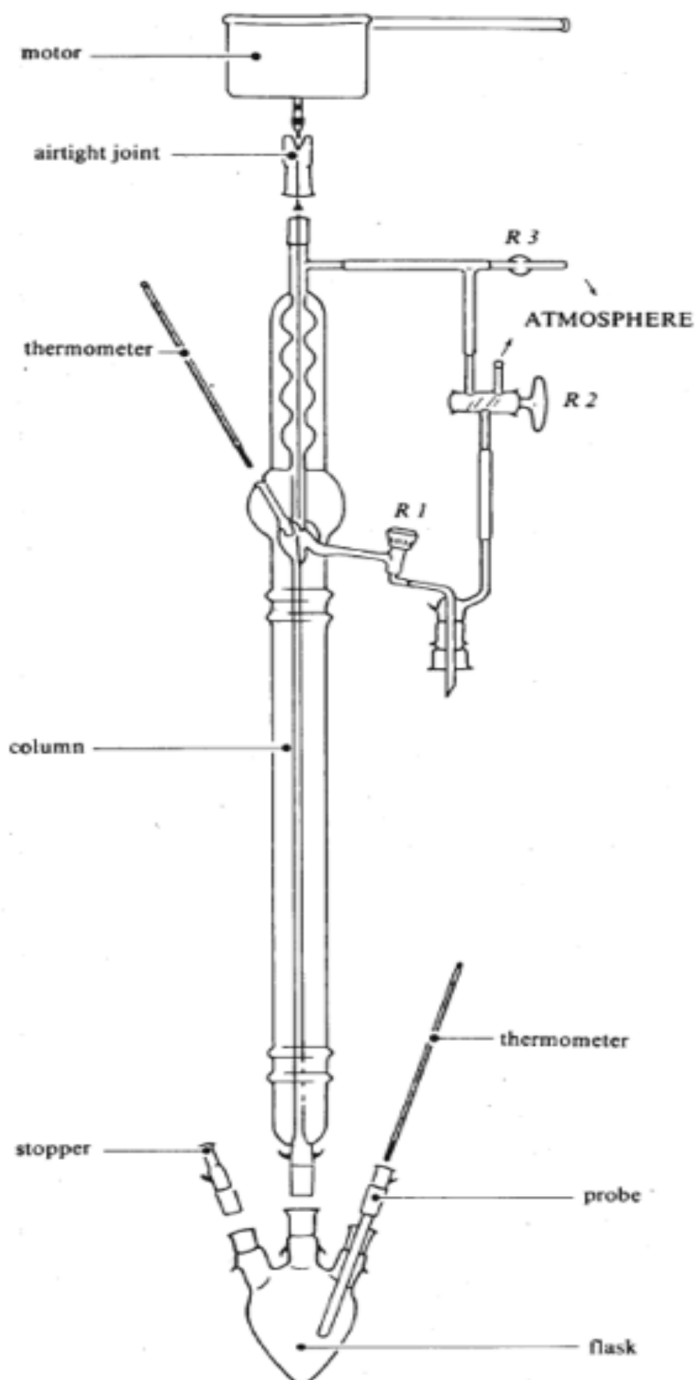
S_R	0,35	0,62	0,006
R	0,99	1,75	0,017

Avec

- S : écart type de répétabilité
- r : limite de répétabilité
- S_R : écart type de reproductibilité
- R : limite de reproductibilité

REFERENCES

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.
7. MARTIN G. G., WOOD R., MARTIN, G. J., *J. AOAC Int.*, 1996, 79 (4), 917-928.
8. MARTIN G.G., HANOTE V., LEES M., MARTIN Y-L., *J. Assoc Off Anal Chem*, 1996, 79, 62-72
9. CRAIG H., *Science*, 1961, 133, 1702 - 1703



Colonne Sonde Bouchon Thermomètre Ballon
d'éthanol

Figure 1 – Dispositif d'extraction

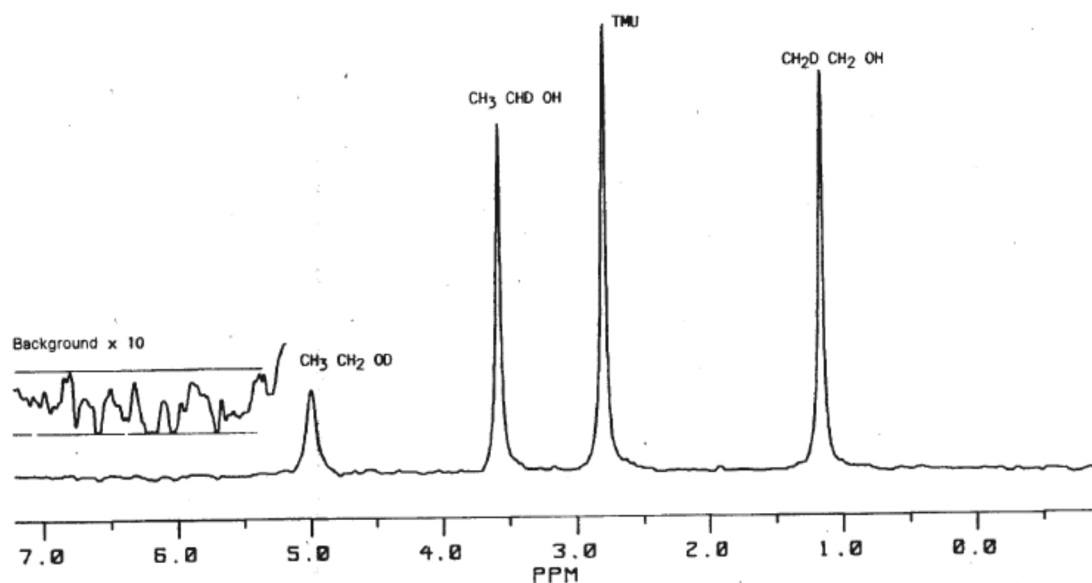


Figure 2a- Spectre RMN^2H d'un éthanol de vin avec un étalon interne (TMU : N,N-tétraméthylurée)

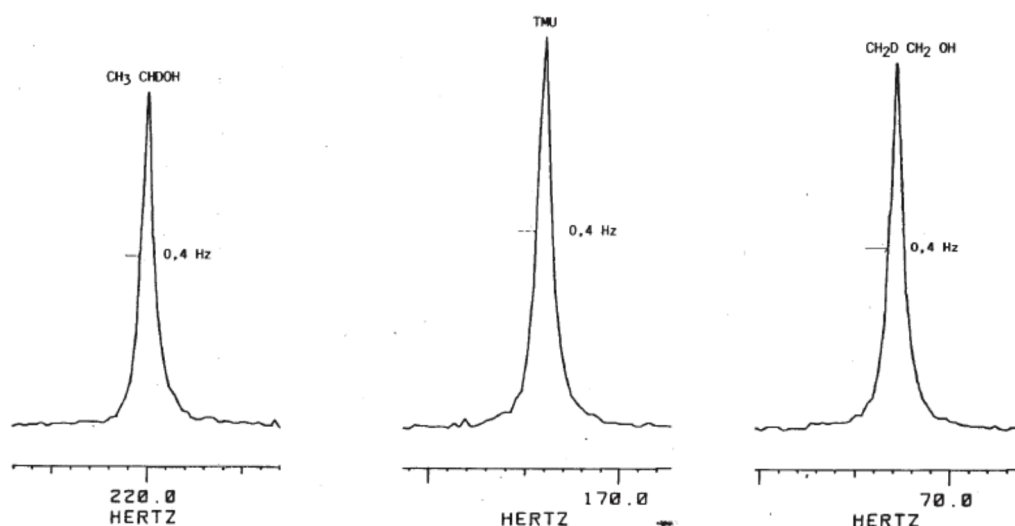


Figure 2b Spectre ^2H de l'éthanol pris dans les mêmes conditions que celles de la Figure 2a, mais sans multiplication exponentielle ($\text{LB} = 0$)

Annexe I : Estimation de la répétabilité à partir d'études internes de répétabilité

Les études internes de répétabilité réalisées dans 4 laboratoires fournissent des données qui permettent l'estimation de la répétabilité de la méthode SNIF-NMR / RMN-FINS.

Ces études internes de répétabilité ont été réalisées par les distillations et les mesures en double de 10, 9 et 5 échantillons de vin différents, par les laboratoires 1, 2 et 3.

De son côté, le laboratoire 4 a réalisé 16 distillations et mesures sur le même vin dans des conditions de répétabilité sur une courte période de temps.

Tableau I-1 :

labo 1 : 10 vins analysés en double

	(D/H) _i			(D/H) _{ii}		R			
	abs(σ (D/H) _i)			Carrés	abs(σ (D/H) _{ii})	Carrés	abs(σ (R))	Carrés	
Échantillon	(D/H) _i	(D/H) _{ii}	R						
1	103,97	130,11	2,503	0,55	0,302	0,68	0,462	0,000	0,00000
	104,52	130,79	2,503						
2	103,53	130,89	2,529	0,41	0,168	0,32	0,102	0,016	0,00026
	103,94	130,57	2,513						
3	102,72	130,00	2,531	0,32	0,102	0,20	0,040	0,004	0,00002
	103,04	130,20	2,527						
4	105,38	132,39	2,513	0,14	0,020	0,20	0,040	0,000	0,00000
	105,52	132,59	2,513						
5	101,59	127,94	2,519	0,48	0,230	0,20	0,040	0,016	0,00026
	101,11	128,14	2,535						
6	103,23	132,14	2,560	0,30	0,090	0,36	0,130	0,001	0,00000
	102,93	131,78	2,561						
7	103,68	130,95	2,526	0,15	0,023	0,75	0,563	0,011	0,00012
	103,53	130,20	2,515						

8	101,76	128,86	2,533	0,24	0,058	0,42	0,176	0,003	0,00001
	101,52	128,44	2,530						
9	103,05	129,59	2,515	0,04	0,002	0,44	0,194	0,007	0,00005
	103,01	129,15	2,508						
10	101,47	132,63	2,614	0,50	0,250	0,18	0,032	0,010	0,00010
	100,97	132,45	2,624						
				Somme des carrés :	1,245		1,779		0,00081
				Sr	0,25		0,30		0,006
				r	0,71		0,84		0,018

Tableau I-2 :

labo 2 : 9 vins analysés en double

Échantillon	(D/H) _i	(D/H) _{ii}	R	(D/H) _I	(D/H) _{II}		R		
				abs($\pi(D/H)_{ii}$)	Carrés	abs($\pi(D/H)_{ii}$)	Carrés	abs($\pi(R)$)	
1	105,02	133,78	2,548	0,26	0,068	0,10	0,010	0,008	0,00007
	104,76	133,88	2,556						
2	102,38	130,00	2,540	0,73	0,533	0,40	0,160	0,010	0,00011
	101,65	129,60	2,550						
3	100,26	126,08	2,515	0,84	0,706	0,64	0,410	0,008	0,00007
	99,42	125,44	2,523						
4	101,17	128,83	2,547	0,51	0,260	0,45	0,203	0,004	0,00002
	100,66	128,38	2,551						
5	101,47	128,78	2,538	0,00	0,000	0,26	0,068	0,005	0,00003
	101,47	128,52	2,533						

6	106,14	134,37	2,532	0,12	0,014	0,04	0,002	0,002	0,00000
	106,26	134,41	2,530						
7	103,62	130,55	2,520	0,05	0,003	0,11	0,012	0,003	0,00001
	103,57	130,66	2,523						
8	103,66	129,88	2,506	0,28	0,078	0,55	0,302	0,004	0,00001
	103,38	129,33	2,502						
9	103,50	129,66	2,506	0,43	0,185	0,22	0,048	0,015	0,00021
	103,93	129,44	2,491						
				Somme des carrés :	1,846		1,214		0,00053
				Sr	0,32		0,26		0,005
				r	0,91		0,74		0,015

Tableau I-3 :

labo 3 : 15 vins analysés en double

Échantillon	(D/H)I			(D/H)II		R			
	(D/H) _I	(D/H) _{II}	R	abs(σ (D/H) _I)	Carrés	abs(σ (D/H) _{II})	Carrés	abs(σ (R))	Carrés
1	101,63	125,87	2,477	0,06	0,004	0,46	0,212	0,007	0,00005
	101,57	125,41	2,470						
2	99,24	124,41	2,507	0,05	0,002	0,04	0,002	0,001	0,00000
	99,19	124,37	2,508						
3	101,23	125,07	2,471	0,06	0,004	0,16	0,026	0,005	0,00002
	101,17	125,23	2,476						

4	100,71	125,29	2,488	0,07	0,005	1,16	1,346	0,024	0,00058
	100,78	124,13	2,464						
5	99,89	124,02	2,483	0,18	0,032	0,56	0,314	0,007	0,00005
	99,71	123,46	2,476						
6	100,60	124,14	2,468	0,19	0,036	0,66	0,436	0,018	0,00032
	100,41	124,80	2,486						
7	101,47	125,60	2,476	0,23	0,053	0,14	0,020	0,003	0,00001
	101,70	125,74	2,473						
8	102,02	124,00	2,431	0,13	0,017	0,07	0,005	0,005	0,00002
	102,15	123,93	2,426						
9	99,69	124,60	2,500	0,40	0,160	0,53	0,281	0,000	0,00000
	100,09	125,13	2,500						
10	99,17	123,71	2,495	0,30	0,090	0,19	0,036	0,004	0,00002
	99,47	123,90	2,491						
11	100,60	123,89	2,463	0,40	0,160	0,54	0,292	0,001	0,00000
	101,00	124,43	2,464						
12	99,38	124,88	2,513	0,33	0,109	0,55	0,302	0,002	0,00000
	99,05	124,33	2,511						
13	99,51	125,24	2,517	0,44	0,194	0,01	0,000	0,011	0,00012
	99,95	125,25	2,506						
15	101,34	124,68	2,460	0,43	0,185	0,41	0,168	0,002	0,00000
	101,77	125,09	2,458						
				Somme des carrés :	1,050		3,437		0,00120
				Sr	0,19		0,34		0,006
				r	0,53		0,96		0,018

Tableau
I-4 :

labo 4 : un vin analysé 16 fois

Répétition	$(D/H)_I$	$(D/H)_{II}$	R		$(D/H)_I$	$(D/H)_{II}$	R
1	101,38	126,87	2,503	Écart :	0,0703	0,0840	0,00001 3
2	101,30	126,22	2,492				
3	100,98	125,86	2,493	Sr	0,27	0,29	0,004
4	100,94	126,00	2,497				
5	100,71	125,79	2,498	r	0,75	0,82	0,010
6	100,95	126,05	2,497				
7	101,17	126,30	2,497				
8	101,22	126,22	2,494				
9	100,99	125,91	2,494				
10	101,29	126,24	2,493				
11	100,78	126,07	2,502				
12	100,65	125,65	2,497				
13	101,01	126,17	2,498				
14	100,89	126,05	2,499				
15	101,66	126,52	2,489				
16	100,98	126,11	2,498				

Les données groupées pour l'écart-type de répétabilité et pour la limite de répétabilité peuvent donc être estimées comme suit :

	$(D/H)_I$	$(D/H)_{II}$	R
Sr	0.26	0.30	0.005
Limit de répétabilité r	0.72	0.84	0.015

Les données des études internes de répétabilité ont été fournies par (par ordre alphabétique) :

- Bundesinstitut für Risikobewertung, Thielallee 88-92 PF 330013 D-14195
BERLIN - ALLEMAGNE
- Fondazione E. Mach-Istituto Agrario di San Michele all'Adige, Via E. Mach, 1 -
38010 San Michele all'Adige (TN), ITALIE
- Joint Research Centre - Institute for Health and Consumer Protection, I-21020
ISPRA (VA) - ITALIE
- Laboratorio Arbitral Agroalimentario, Carretera de la Coruña, km 10,7 E-28023
MADRID - Espagne

Annexe II : Évaluation de la Reproductibilité à partir de données d'essais d'aptitude

Depuis décembre 1994, des campagnes internationales d'essais d'aptitude sur la détermination de paramètres isotopiques sur le vin et sur plusieurs autres matrices alimentaires ont été régulièrement organisées. Ces campagnes d'essais d'aptitude permettent aux laboratoires participants d'évaluer leurs résultats et la qualité de leurs analyses. L'exploitation statistique de ces résultats obtenus sur un grand nombre d'échantillons sur une longue période de temps permet d'apprécier la variabilité des mesures dans des conditions de reproductibilité. Ceci permet une bonne estimation des paramètres d'écart et de la limite de reproductibilité de la méthode. Les résultats de 40 séries d'essais d'aptitude entre 1994 et 2010 pour différents types de vin (rouge, blanc, rosé, sec, doux et mousseux) sont synthétisés dans le tableau II-1 ci-dessous.

Pour $(D/H)_I$ et $(D/H)_{II}$ le S_r groupé peut donc être calculé en utilisant l'équation suivante :

$$\sqrt{\frac{\sum_i^N (N_i - 1) S_{R,i}^2}{\sum_i^N (N_i - 1)}}$$

Avec N_i , et $S_{R,i}$ étant le nombre des valeurs et l'écart-type de reproductibilité de la $i^{\text{ème}}$ série, et K le nombre de séries.

Considérant la définition du rapport intramoléculaire R , et en appliquant les règles type de propagation d'erreur supposant que $(D/H)_I$ et $(D/H)_{II}$ sont indépendantes (les termes de covariance valent donc zéro), on peut aussi estimer l'écart-type de reproductibilité pour ce paramètre.

On peut donc calculer les chiffres suivants :

	$(D/H)_I$	$(D/H)_{II}$	R
S_R	0.35	0.62	0.006
Limit de reproductibilité R	0.72	1.75	0.017

Tableau II-1 : Essai d'aptitude FIT – Synthèse des valeurs statistiques observées sur des échantillons de vin :

			$(D/H)_I$			$(D/H)_{II}$		
Échantillon	Année	Série	N	Moyenne	S_R	N	Moyenne	S_R
Vin rouge	1994	R1	10	102,50	0,362	10	130,72	0,33
Vin rosé	1995	R1	10	102,27	0,333	10	128,61	0,35
Vin rouge	1995	R2	11	101,45	0,389	11	127,00	0,55
Vin rouge	1996	R1	11	101,57	0,289	11	132,23	0,34
Vin rosé	1996	R2	12	102,81	0,322	12	128,20	0,60

Vin blanc	1996	R3	15	103,42	0,362	15	127,97	0,51
Vin rouge	1996	R4	15	102,02	0,377	13	131,28	0,30
Vin rosé	1997	R1	16	103,36	0,247	16	126,33	0,44
Vin blanc	1997	R2	16	103,42	0,444	15	127,96	0,53
Vin blanc doux	1997	R2	14	99,16	0,419	15	130,02	0,88
Vin	1997	R3	13	101,87	0,258	15	132,03	0,61
Vin doux	1997	R3	12	102,66	0,214	12	128,48	0,48
Vin rosé	1997	R4	16	102,29	0,324	16	129,29	0,63
Vin doux	1997	R4	15	102,04	0,269	13	131,27	0,30
Vin blanc	1998	R1	16	105,15	0,302	16	127,59	0,59
Vin doux	1998	R3	16	102,17	0,326	16	129,60	0,56
Vin rouge	1998	R4	17	102,44	0,306	17	131,60	0,47
Vin blanc	1999	R1	14	102,93	0,404	13	129,64	0,46
Vin doux	2000	R2	15	103,19	0,315	14	129,43	0,60
Vin	2001	R1	12	105,28	0,264	16	131,32	0,68
Vin doux	2001	R2	14	101,96	0,249	15	128,99	1,05
Vin	2002	R1	17	101,01	0,365	16	129,02	0,74
Vin	2002	R2	17	101,30	0,531	17	129,28	0,93
Vin	2003	R1	18	100,08	0,335	18	128,98	0,77
Vin doux	2003	R2	17	100,51	0,399	18	128,31	0,80

Vin	2004	R1	18	102,88	0,485	19	128,06	0,81
Vin doux	2004	R3	16	101,47	0,423	16	130,10	0,71
Vin	2005	R1	19	101,33	0,447	19	129,88	0,76
Vin doux	2005	R2	15	102,53	0,395	15	131,36	0,38
Vin sec	2006	R1	18	101,55	0,348	18	131,30	0,51
Vin doux	2006	R2	18	100,31	0,299	18	127,79	0,55
Vin	2007	R1	18	103,36	0,403	18	130,90	0,90
Vin doux	2007	R2	19	102,78	0,437	19	130,72	0,55
Vin	2008	R1	24	103,20	0,261	23	131,29	0,59
Vin doux	2008	R2	20	101,79	0,265	19	129,73	0,34
Vin sec	2009	R1	24	102,96	0,280	23	130,25	0,49
Vin doux	2009	R2	21	101,31	0,310	21	127,07	0,50
Vin sec	2010	R1	21	101,80	0,350	20	129,65	0,40
Vin moussoux	2010	R1	11	101,51	0,310	11	129,09	0,68
Vin sec	2010	R2	20	104,05	0,290	19	133,31	0,58

[1] Fractionnement Isotopique Naturel Spécifique étudié par Résonance Magnétique Nucléaire (SiteSpecific Natural Isotope Fractionation studied by Nuclear Magnetic Resonance). Brevet : France, 8122710 ; Europe, 824022099 ; Etats-Unis, 854550082 ; Japon 57123249.