

RESOLUTION OIV/OENO 343/2010

MÉTHODE DE DÉTERMINATION ISOTOPIQUE $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ DU RAPPORT DU GLYCÉROL DANS LES VINS PAR CHROMATOGRAPHIE GAZEUSE COUPLÉE A UN FOUR A COMBUSTION OU PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE A HAUTE PERFORMANCE COUPLÉE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE DE RAPPORT ISOTOPIQUE (GC-C-IRMS OU HPLC-IRMS)

L'ASSEMBLÉE GÉNÉRALE,

CONSIDÉRANT l'alinéa iv du paragraphe 2 de l'Article 2 de l'accord daté 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 l'Annexe A du Recueil de Méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts en y insérant la méthode de type IV suivante :

Intitulé	Type de la méthode
Méthode de détermination du rapport isotopique $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ du glycérol dans les vins par chromatographie gazeuse couplée à un four à combustion ou par chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse de rapport isotopique (CG-C-SMRI)	IV

1. CHAMP D'APPLICATION

Les méthodes présentes, fondées sur la chromatographie gazeuse [1] ou la chromatographie liquide [2] couplée à un spectromètre de masse de rapport isotopique (CG-C-SMRI ou CLHP-SMRI), permettent la mesure du rapport $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de glycérol. Si sa quantification est exigée en même temps que le rapport isotopique $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, le CG-C-SMRI peut être utilisé.

L'emploi de pentaméthylèneglycol, en étalon interne, permet également de déterminer la concentration de glycérol au cours de la même analyse du rapport

$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$.

2. Définitions

- $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$: rapport entre l'isotope 13 de carbone (^{13}C) et l'isotope 12 de carbone (^{12}C) pour un échantillon donné.
- $\delta^{13}\text{C}$: teneur en carbone 13 (^{13}C) exprimée en parties par millier (‰).
- CG-C-SMRI : technique couplée de chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse de rapport isotopique et à un four à combustion.
- V-PDB : *Vienna-Pee-Dee-Belemnite*. Le PDB est la matière de référence primaire pour la mesure des variations naturelles de la teneur isotopique du carbone 13, consistant en carbonate de calcium issu d'un rostre de bélemnite du Crétacé de la formation Pee Dee de la Caroline du sud (États-Unis). Son rapport isotopique $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ou R_{PDB} est de 0,0112372. Les réserves de PDB sont épuisées depuis longtemps, mais cette matière continue de faire fonction de référence primaire pour exprimer les variations naturelles de la teneur isotopique du carbone 13 et pour calibrer les matériaux de référence disponibles auprès de l'AIEA (Agence internationale de l'Énergie atomique) de Vienne, en Autriche. Les déterminations isotopiques des abondances naturelles en carbone 13 sont normalement exprimées par rapport au V-PDB.

3. Principe

Il existe une importante différence entre la teneur en carbone 13 des sucres végétaux à l'issue des différents cycles de photosynthèse C_3 (cycle de Calvin) et C_4 (Hatch-Slack). La plupart des plantes, comme la vigne et la betterave, appartiennent au groupe C_3 ; tandis que le maïs et la canne à sucre appartiennent au groupe C_4 . Les teneurs en carbone 13 du sucre et des métabolites correspondants obtenus par fermentation (éthanol, glycérol) sont corrélées.

La mesure de la teneur en carbone 13 du glycérol peut permettre de détecter l'adjonction de glycérol de maïs (plante C_4) ou de synthèse (sources fossiles) à du vin ou autres boissons alcoolisées.

La séparation du glycérol de la matrice du vin est effectuée au moyen d'un chromatographe en phase gazeuse ou liquide.

Dans le GC-C-SMRI après cette séparation chromatographique, l'effluent est soumis à une combustion puis à une réduction, dans les fours d'oxydation et de réduction d'une interface de combustion. Les composants autres que le glycérol, à savoir le solvant, sont dégazés au moyen d'une soupape de rétrobalayage pendant le cycle de manière à éviter toute contamination des fours et toute interférence dans les chromatogrammes. La teneur en carbone 13 est déterminée sur le dioxyde de carbone produit par l'oxydation du glycérol contenu dans l'échantillon. Une fois le glycol oxydé, il y a production de CO_2 et H_2O . L'eau produite durant la combustion est éliminée par un piège évacuateur d'eau, consistant en une membrane de Nafion[®]. Le dioxyde de carbone est élué par un courant d'hélium vers la source SMRI pour l'analyse $^{13}C/^{12}C$.

Dans le HPLC-SMRI après la séparation chromatographique, l'échantillon est oxydé alors qu'il est encore en phase mobile au niveau de l'interface. Le CO_2 formé est retiré en ligne du flux de solvant via une membrane pour échange de gaz et envoyé dans un écoulement de He. Cet écoulement traverse un piège évacuateur d'eau, consistant en une membrane de Nafion[®], avant d'être admis dans la source d'ions du SMRI par une fente.

Les diverses combinaisons possibles des isotopes ^{18}O , ^{17}O , ^{16}O et ^{13}C , ^{12}C conduisent à la masse 44 correspondant à l'isotopomère $^{12}C^{16}O_2$, à la masse 45 correspondant aux espèces $^{13}C^{16}O_2$ et $^{12}C^{17}O^{16}O$ et à la masse 46 pour l'isotopomère $^{12}C^{16}O^{18}O$ ($^{13}C^{17}O^{16}O$ et $^{12}C^{17}O_2$ peuvent être négligés du fait de leur très faible abondance). Les courants ioniques correspondants sont déterminés sur trois différents collecteurs. Le courant ionique m/z 45 est corrigé de la contribution de $^{12}C^{17}O^{16}O$ qui est calculée en fonction de l'intensité du courant mesuré pour $m/z = 46$ en tenant compte de l'abondance relative de ^{18}O et de ^{17}O (correction de Craig). La comparaison avec une référence calibrée par rapport à l'étalon international de V-PDB permet le calcul de la teneur en carbone 13 sur l'échelle relative $\delta^{13}C$ ‰.

4. RÉACTIFS

Les réactifs et étalons de travail suivants doivent être utilisés :

4.1. Éthanol anhydre (numéro CAS 64-17-5).

- 4.2. Glycérol pur $\geq 99\%$ (CAS 5608105).
- 4.3. Pentaméthylèneglycol (CAS 1112905).
- 4.4. Solution principale de pentaméthylèneglycol (4.3) dans l'éthanol (4.1). Cette solution préparée à une concentration précisément connue, entre 0,5 et 1,0 g L⁻¹, est utilisée pour diluer des échantillons de vin.
- 4.5. Acide orthophosphorique
- 4.6. Peroxodisulfate de sodium utilisé comme réactif d'oxydation
- 4.7. Hélium pour analyse, utilisé comme gaz vecteur (CAS 0744005907).
- 4.8. Oxygène pour analyse, utilisé comme gaz régénérant pour le réacteur de combustion (CAS 07782044-7).
- 4.9. Bouteille de dioxyde de carbone pour analyse, utilisé comme gaz de référence secondaire pour la teneur en carbone 13 (CAS 0012403809).
- 4.10. Échantillons standard de travail de glycérol avec un rapport $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ connu, calibrés par rapport aux matériaux de référence internationaux.
- 4.11. Échantillons standard de travail de pentaméthylèneglycol avec un rapport $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ connu, calibrés par rapport aux matériaux de référence internationaux.

5. APPAREILS ET EQUIPEMENTS

5.1. Spectromètre de masse de rapport isotopique

Spectromètre de masse isotopique (SMRI) capable de déterminer la teneur relative en ^{13}C du CO_2 en abondance naturelle avec une précision interne de 0,05 ‰, ou mieux, exprimée en valeur relative (point 8. Calculs). La précision interne se définit ici comme la différence entre deux mesures du même échantillon de CO_2 . Le spectromètre de masse utilisé pour mesurer les rapports isotopiques est équipé d'un collecteur triple afin de mesurer simultanément les intensités pour $m/z = 44, 45$ et 46 . Le SMRI est équipé d'un logiciel dédié au pilotage de l'analyse, à l'acquisition de données et au traitement des résultats d'analyse pour le calcul des rapports isotopiques.

5.2. Chromatographe en phase gazeuse

Chromatographe en phase gazeuse (GC) couplé à un spectromètre de masse de rapport isotopique par l'intermédiaire d'un four à combustion (5.1).

Chromatographe en phase gazeuse doit être équipé d'une colonne capillaire polaire permettant de séparer par chromatographie le glycérol des autres composants du vin

(p. ex. colonne capillaire en silice fondue Chrompack WCOT remplie de polyéthylène glycol collé CP-Wax-57 CB, 25 m, di 0,25 mm, film épaisseur 0,20 µm).

Interface de combustion généralement composée d'un réacteur d'oxydation (tube de céramique contenant des fils de nickel, de platine et de cuivre) et d'un réacteur de réduction (tube de céramique contenant des fils de cuivre).

5.3. Chromatographe en phase liquide

Chromatographe en phase liquide (LC) couplé à un spectromètre de masse de rapport isotopique (5.1) par l'intermédiaire d'une interface Isolink LC.

Le chromatographe en phase liquide doit être équipé d'une colonne permettant de séparer par chromatographie le glycérol des autres composants du vin sans recourir à des solvants ou additifs organiques (p. ex. colonnes Carbohydate HyperREZ H⁺, 30 cm, 8 mm).

Interface Isolink constituée d'un réacteur d'oxydation à capillaire et d'un échangeur à membranes (trois membranes).

5.4. Matériels

Matériels de laboratoire habituels, notamment :

- Seringues d'injection pour échantillons ou autosampler
- Fioles calibrées, filtres de 0,2 µm, flacons chromatographiques et seringue à liquide 10 µ L.

Les équipements de laboratoire figurant dans la liste ci-dessus sont des exemples et peuvent être remplacés par d'autres équipements dont les performances sont équivalentes.

6. Préparation d'échantillon avant essais

6.1. Détermination $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de glycérol par GC-C-SMRI

Chaque échantillon de vin est filtré au moyen d'un filtre de 0,2 µm, puis une partie aliquote est diluée (rapport 1/4) avec de l'éthanol. Chaque échantillon est ensuite versé dans un flacon chromatographique spécial, lequel est alors scellé et stocké à T ≤ 4 °C jusqu'à l'analyse.

6.2. Rapport de glycérol $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ et sa quantification par GC-C-SMRI

Chaque échantillon de vin est filtré au moyen d'un filtre de 0,2 µm, puis une partie aliquote est diluée (rapport 1/4) avec la solution en vrac de pentaméthylèneglycol (4.4). Chaque échantillon est ensuite versé dans un flacon chromatographique spécial, lequel est alors scellé et stocké à $T \leq 4\text{ °C}$ jusqu'à l'analyse.

6.3. Détermination de glycérol $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ par CLHP-SMRI

Chaque échantillon de vin est filtré au moyen d'un filtre de 0,2 µm, puis une partie aliquote est diluée dans de l'eau. Chaque échantillon est ensuite versé dans un flacon chromatographique spécial, lequel est alors scellé et stocké à $T \leq 4\text{ °C}$ jusqu'à l'analyse.

7. Procédure

7.1. GC-C-SMRI

La description suivante renvoie aux procédures généralement appliqués pour déterminer le rapport isotopique $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de glycérol, à l'aide de systèmes GC-C-SMRI automatisés du commerce.

Les procédures peuvent être adaptées en fonction des changements introduits par les fabricants. Remarque : les volumes, la température, les écoulements et la durée sont donnés à titre indicatif. Les valeurs correctes doivent être optimisées suivant les indications du fabricant.

7.1.1. Conditions opératoires

Avec la colonne et l'interface de combustion décrites plus haut à titre d'exemple au point (5.2), les paramètres suivants peuvent être appliqués :

A. La température de l'injecteur est réglée sur 270 °C.

B. Le programme thermique est défini comme suit : la température initiale de la colonne est fixée à 120 °C, avec une durée de maintien de 2 minutes, puis la température est programmée à raison de 10 °C.min^{nl} jusqu'à atteindre la valeur finale de 220 °C, avec un isotherme final de 2 minutes. Chaque cycle dure 14 minutes, sans tenir compte du temps de refroidissement.

C. Il est utilisé comme gaz porteur.

D. Les températures des réacteurs de combustion et de réduction de l'interface de combustion GC sont réglées à 960 et 640 °C respectivement.

E. À chaque injection, 0,3 µL de solution d'échantillon est introduite dans la colonne avec un mode de division élevé à l'injection (débit de fuite de l'injecteur : 120 mL.

min⁰¹).

A intervalles réguliers (p. ex. une fois par semaine) une réoxydation du réacteur d'oxydation au O₂ est indispensable (les intervalles sont fonction des quantités totales de substances qui sont passées dans le réacteur).

7.1.2. Rapport de glycérol ¹³C/¹²C

Pour chaque analyse ¹³C/¹²C, au minimum deux injections de gaz de référence de la bouteille de CO₂ (4.9) sont effectuées. Ce CO₂ a été précédemment calibré par rapport à d'autres étalons internationaux de V-PDB, eux-mêmes calibrés par rapport aux étalons internationaux de l'AIEA. Le CO₂ de référence peut également être calibré avec des étalons internes.

Chaque échantillon de vin (6.1) est injecté trois fois. Des références de contrôle appropriées doivent être incluses dans chaque lot.

Un lot-type se présente comme suit :

- Échantillon témoin
- Échantillon témoin
- Échantillon 1
- Échantillon 1
- Échantillon 1
- Échantillon 2

Chaque échantillon est mesuré 3 fois

- Echantillon 6
- Échantillon 6
- Échantillon 6
- Échantillon témoin
- Échantillon témoin

L'échantillon témoin est une solution de glycérol dans l'éthanol d'une valeur $\alpha^{13}\text{C}$

connue et précisément mesurée (par un analyseur élémentaire SMRI, par exemple) et permet également de vérifier la dérive dans la séquence de mesures et la donc la correction des résultats.

7.1.3. Rapport $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de glycérol et sa quantification

Si la quantification du glycérol est exigée en même temps que la mesure du rapport isotopique $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, la procédure précédente (7.1.2) est appliquée aux échantillons préparés suivant la description au point 6.2.

Le pentaméthylèneglycol (5.3) permet de déterminer la concentration de glycérol. En outre, les valeurs $\delta^{13}\text{C}$ de la référence interne peuvent être utilisées pour évaluer la justesse des injections et le contrôle qualité des déterminations isotopiques et de la phase de réaction de la combustion.

La concentration de glycérol dans des échantillons de vin est déterminée au moyen de la méthode de l'Étalon interne. Une courbe de calibrage doit être établie à cette fin, en prenant une concentration constante connue pour l'étalon interne, le pentaméthylèneglycol, et cinq solutions de glycérol à différentes concentrations connues, de 0,50 à 10 g L⁻¹. Ces solutions sont préparées en pesant et en dissolvant du glycérol (4.2) et du pentaméthylèneglycol dans de l'éthanol (4.1) dans des flacons calibrés. Il faut s'assurer que la réponse est linéaire en analysant successivement, à trois reprises, chacune des solutions normales de linéarité contenant un étalon interne.

7.2. CLHP-SMRI

La description suivante renvoie aux procédures généralement appliquées pour déterminer le rapport isotopique $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ du glycérol à l'aide de systèmes CLHP-SMRI automatisés du commerce.

Les procédures peuvent être adaptées en fonction des changements introduits par les fabricants. Remarque : les volumes, la température, les écoulements et la durée sont donnés à titre indicatif. Les valeurs correctes doivent être optimisées suivant les indications du fabricant.

7.2.1. Conditions opératoires

Avec la colonne et l'interface décrites à titre exemple au point (5.3), les paramètres suivants peuvent être appliqués :

A. Le débit de l'éluent est réglé à 400 $\mu\text{L min}^{-1}$.

B. Le débit des réactifs acides et oxydants dans l'interface LC interface est réglé à 40 et 30 $\mu\text{L min}^{-1}$, respectivement

C. Les températures du réacteur de l'interface et de la colonne sont réglées à 99,9 et 65 °C, respectivement.

D. Le débit d'hélium de l'unité de séparation est réglé à 1 $\mu\text{L min}^{-1}$.

Les bouteilles de réactif subissent un dégazage à l'hélium durant la totalité de la campagne chromatographique.

7.2.2. Rapport $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de glycérol

Pour chaque analyse $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, au minimum deux injections de gaz de référence de la bouteille de CO_2 (4.9) sont effectuées (voir exemple du chromatogramme en 11.2). Ce CO_2 a été précédemment calibré par rapport à d'autres étalons internationaux de V-PDB, eux-mêmes calibrés par rapport aux étalons internationaux de l'AIEA. Le CO_2 de référence peut également être calibré par rapport à des étalons internes.

Chaque échantillon de vin (6.3) est injecté trois fois. Des références de contrôle appropriées doivent être incluses dans chaque lot.

Un lot-type se présente comme suit :

- Echantillon témoin
- Echantillon témoin
- Echantillon 1
- Echantillon 1
- Echantillon 1
- Echantillon 2
- Chaque échantillon est mesuré 3 fois
-
- Echantillon 6
- Echantillon 6
- Echantillon 6
- Echantillon témoin

- Echantillon témoin

L'échantillon témoin est une solution de glycérol d'une valeur $\delta^{13}\text{C}$ connue et mesurée avec précision (par un analyseur élémentaire SMRI, par exemple) et permet également de vérifier la dérive dans la séquence de mesures et donc la correction des résultats.

8. CALCULS

8.1. Rapport $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$

Le rapport isotopique $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ peut être exprimé par son écart avec une référence de travail.

L'écart isotopique du carbone 13 ($\delta^{13}\text{C}$) est alors calculé sur une échelle delta pour mille ($\delta/1\,000$ ou $\delta\text{‰}$) en comparant les résultats obtenus pour l'échantillon à mesurer avec ceux d'une référence de travail préalablement calibrée par rapport à la référence internationale primaire (V-PDB). Pendant les analyses $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, du CO_2 de référence est introduit, calibré par rapport à d'autres étalons internationaux de PDB.

Les valeurs $\delta^{13}\text{C}$ sont exprimées par rapport à la référence de travail, comme suit :

$$\bullet \delta^{13}\text{C}_{\text{Échantillon/Réf.}} \text{‰} = (R_{\text{Échantillon}}/R_{\text{réf.}} - 1) \times 1\,000$$

où $R_{\text{Échantillon}}$ et $R_{\text{Réf.}}$ sont respectivement les rapports isotopiques $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de l'échantillon et du dioxyde de carbone utilisé comme gaz de référence (4.9).

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

$$\bullet \delta^{13}\text{C}_{\text{Échantillon/V-PDB}} \text{‰} = \delta^{13}\text{C}_{\text{Échantillon/Réf.}} + \delta^{13}\text{C}_{\text{Réf./V-PDB}} + (\delta^{13}\text{C}_{\text{Échantillon/réf}} \times \delta^{13}\text{C}_{\text{Réf./V-PDB}}) / 1\,000$$

où $\delta^{13}\text{C}_{\text{Réf./V-PDB}}$ est l'écart isotopique précédemment déterminé entre la référence de travail et le V-PDB.

De faibles variations peuvent survenir lors de la mesure en ligne en raison de changements des conditions instrumentales. Dans ce cas, les valeurs $\delta^{13}\text{C}$ des

échantillons doivent être corrigées en fonction de la différence entre la valeur mesurée $\delta^{13}\text{C}$ de l'échantillon de travail standard et sa vraie valeur précédemment étalonné par rapport à V-PDB par comparaison à l'un des matériaux de référence internationaux. Entre deux mesures de l'échantillon de travail standard, la variation, et par conséquent la correction à appliquer aux résultats obtenus avec les échantillons, peuvent être supposées linéaires. L'échantillon de travail standard doit être mesuré au début et à la fin de toutes les séries d'échantillons. Une correction peut être ensuite calculée pour chaque échantillon par interpolation linéaire.

8.2. Concentration de glycérol par GC SMRI

Lors de la génération de la courbe d'étalonnage, pour chaque injection, le paramètre mesuré qui est pris en compte est la surface S (dans V*s) donnée par le spectromètre. Calculer le rapport R et tracer un graphique représentant R en fonction du rapport de concentration du glycérol et de l'étalon interne (EI), C. Un tracé linéaire doit être obtenu, avec un coefficient de corrélation d'au moins 0,99.

$$\text{Équation 1 } R = \frac{\text{Surface du pic glycérol}}{\text{Surface du pi EI}}$$

Avec les mêmes conditions d'analyse (7.1.1), le pentaméthylèneglycol, qui est moins polaire que le glycérol, a un temps de rétention d'environ 310 secondes, alors que celui du glycérol est de 460 secondes (voir un exemple de chromatogramme au point 11.1).

La concentration de glycérol dans chaque injection est calculée par l'équation suivante :

Équation 2 :

$$C_{\text{glyc}\text{échantillon}} = K \cdot C_{1,5PD\text{échantillon}} \cdot \frac{S_{\text{glyc}\text{échantillon}}}{S_{1,5PD\text{échantillon}}} \times \text{facteur de dilution}$$

avec :

$C_{X\text{échantillon}}$ est la concentration en g L⁻¹ de l'espèce dans l'échantillon ;

$S_{X\text{échantillon}}$ est la surface des pics produits ;

K (le facteur de réponse) est calculé comme suit :

Equation 3 (voir 8.2.)

$$K = \frac{C_{glyc_{St}}}{C_{1,5PD_{St}}} \cdot \frac{S_{1,5PD_{St}}}{S_{glyc_{St}}}$$

Le suffixe St indique les concentrations et les surfaces de pentaméthylèneglycol et de glycérol dans les cinq solutions normales préparées pour le calibrage (7.1.3) ;

Facteur de dilution : compte tenu des conditions de calibrage susvisées (7), le facteur de dilution est 4.

La valeur de concentration en g L⁻¹ de chaque échantillon est la moyenne des trois injections.

9. ASSURANCE ET CONTROLE QUALITE

9.1. GC-C-SMRI

Pour chaque échantillon, vérifier que l'écart type (ET) dans trois fioles mesurées successivement est inférieur à 0,6 ‰. Le résultat final pour un échantillon donné est la valeur moyenne pour les trois mesures. Si l'écart est supérieur à 0,6 ‰, la mesure doit être répétée.

Les contrôles de mesure correcte peuvent être basés sur le courant ionique pour lequel m/z = 44, lequel est proportionnel à la quantité de carbone injectée dans le système. Dans des conditions standard, le courant ionique doit être quasiment constant pour les échantillons analysés. Un écart important peut signaler une séparation imparfaite et une oxydation du glycérol ou une instabilité du spectromètre de masse.

9.2. CLHP-SMRI

Vérifier que la valeur ¹³C de la référence de travail ne s'écarte pas de plus de 0,5 ‰ de la valeur admissible. Dans le cas contraire, les réglages de l'appareil de spectrométrie doivent être vérifiés et, si besoin, ajustés.

Pour chaque échantillon, vérifier que l'écart type (ET) dans trois fioles mesurées successivement est inférieur à 0,6 ‰. Le résultat final pour un échantillon donné est la valeur moyenne pour les trois mesures. Si l'écart est supérieur à 0,6 ‰, la mesure doit être répétée.

Les contrôles de mesure correcte peuvent être basés sur le courant ionique pour lequel m/z = 44, lequel est proportionnel à la quantité de carbone injectée dans le

système. Dans des conditions standard, le courant ionique doit être quasiment constant pour les échantillons analysés. Un écart important peut signaler une séparation imparfaite et une oxydation du glycérol ou une instabilité du spectromètre de masse.

10. CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCES DE LA METHODE

10.1. GC-C-SMRI

10.1.1. Précision

Des études préliminaires ont été conduites sur 4 solutions de vin synthétiques (eau-éthanolglycérol), préparées avec des échantillons de glycérol de différentes origines et d'une valeur $\delta^{13}\text{C}$ préalablement déterminée par EA-SMRI. Pour les 3 répétitions, $n = 3$, par la technique GC-C-SMRI, un écart-type $ET \leq 0,6 \text{ ‰}$ a été jugé admissible.

La précision peut être affectée par un chevauchement entre le pentaméthylèneglycol et d'autres composants ou sous-produits du vin dans la détermination des vins liquoreux.

10.1.2. Détermination de la concentration de glycérol

Pour la validation de cette méthode, deux solutions de glycérol ont été employées. Si l'on suppose que la concentration-type de glycérol est de $4\text{-}10 \text{ g L}^{-1}$ dans le vin sec, ces deux solutions représentent cette étendue. La première solution est de $4,0 \text{ g L}^{-1}$ et a donné une concentration expérimentale de $3,6 \text{ g L}^{-1}$ ($ET = 0,2$, $n = 8$). La seconde solution, de $8,0 \text{ g L}^{-1}$, a donné une valeur de $7,9 \text{ g L}^{-1}$ ($ET = 0,3$, $n = 8$).

En outre, cinq échantillons de vin (A-E) avec une concentration de glycérol prédosée, par application d'autres méthodes* par le test de compétence BIPEA, ont été injectés afin de tester la méthode.

Tableau 1 : Comparaison de concentrations avec 5 vins dosés

Echantillon	A	B	C	D	E
Type	Blanc	Rosé	Blanc	Rouge	Blanc
Fourchette donnée	6,2-8,4	4,8-6,6	5,7-7,7	6,3-8,5	4,6-6,2

Valeur moyenne	7,3	5,4	6,7	7,4	5,4
par GC-C-IRMS	6,4	5,4	6,7	7,8	5,4

Les déterminations BIPEA ont été réalisées par HPLC et/ou analyses enzymatiques
Les concentrations sont données en g/L n>3 et SD<0,6

Tableau 1 : Comparaison avec la concentration de 5 vins dosés

Echantillon Type de vin Gamme de mesure Valeur moyenne par CG-C-SMRI Blanc
Rosé Blanc Rouge Blanc

* Les déterminations BIPEA ont été effectuées par CLHP et/ou analyse enzymatique.

Les concentrations sont indiquées en g L⁻¹. n > 3 et ET < 0,6.

Les concentrations de glycérol trouvées par GC-C-SMRI sont conformes aux valeurs obtenues utilisant d'autres techniques analytiques comme la détermination enzymatique ou par CLHP.

10.2. CLHP-SMRI

Validation interne de la méthode CLHP-SMRI

Pour la validation de la méthode CLHP_SMRI, les échantillons suivants ont été utilisés : un échantillon de glycérol standard, trois vins synthétiques (les concentrations de glycérol varient au sein de la gamme typique des vins) et un vin.

La précision de la mesure du glycérol fût déterminée en répétant l'analyse dix fois pour chaque échantillon pendant trois jours, sous des conditions reproductibles (Tableau 2)

Tableau 2. Accuracy and precision of $\delta^{13}\text{C}$ values of glycerol obtained by HPLC-IRMS^a

		HPLC-IRMS							
		Jour 1		Jour 2		Jour 3		Précision	
Echantillon	Répétitions par échantillon	Moyenne $\delta^{13}\text{C}$ (‰)	Ecart type (‰)	Moyenne $\delta^{13}\text{C}$ (‰)	Ecart type (‰)	Moyenne $\delta^{13}\text{C}$ (‰)	Ecart type (‰)	r (‰)	R (‰)
Glycérol (standard) ^b	10	-27.99	0.05	-27.94	0.04	-27.95	0.08	0.17	0.18

Vin synthétique (6 g/l)	10	-28.06	0.13	-28.14	0.12	-28.14	0.11	0.34	0.35
Vin synthétique (8 g/l)	10	-28.11	0.12	-28.18	0.07	-28.21	0.07	0.25	0.28
Vin synthétique (10 g/l)	10	-28.06	0.06	-28.06	0.09	-28.05	0.09	0.23	0.24
Vin	10	-28.88	0.10	-28.85	0.27	-28.72	0.23	0.60	0.62

^aValeurs de $\delta^{13}\text{C}$ sont exprimées en ‰ du rapport V-PDB

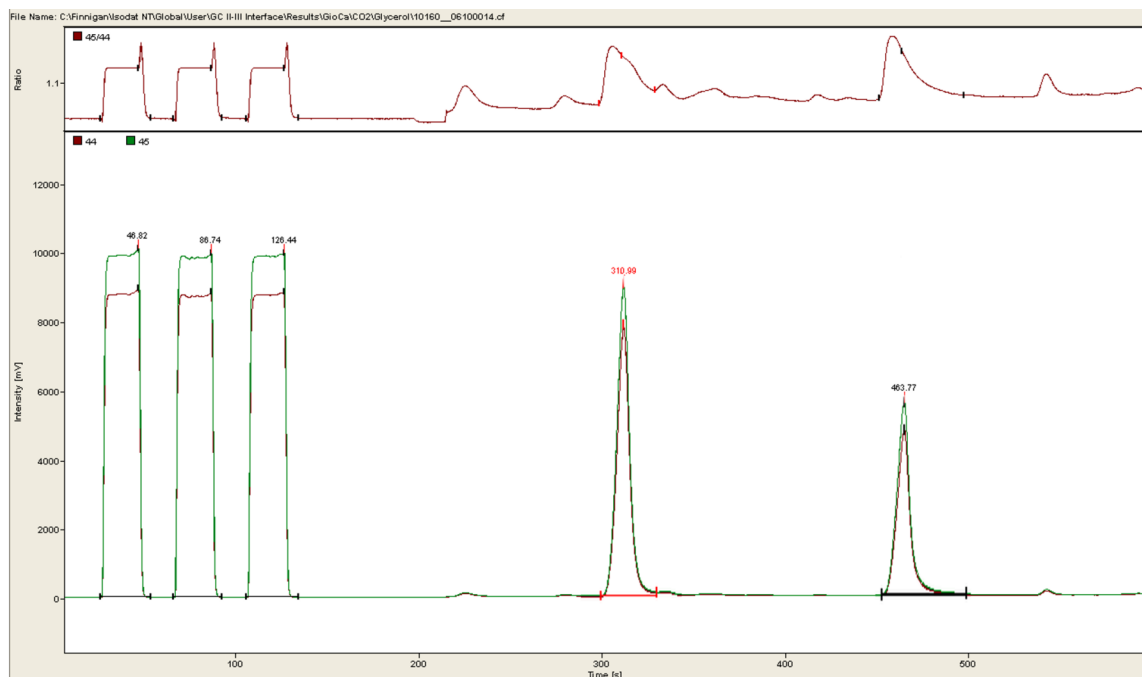
^bEA-IRMS glycérol (standard) résultat : -28.02 ± 0.09 ‰

Les paramètres de performance suivants pour la détermination du $\delta^{13}\text{C}$ du glycérol furent obtenus à partir d'un échantillon de vin :

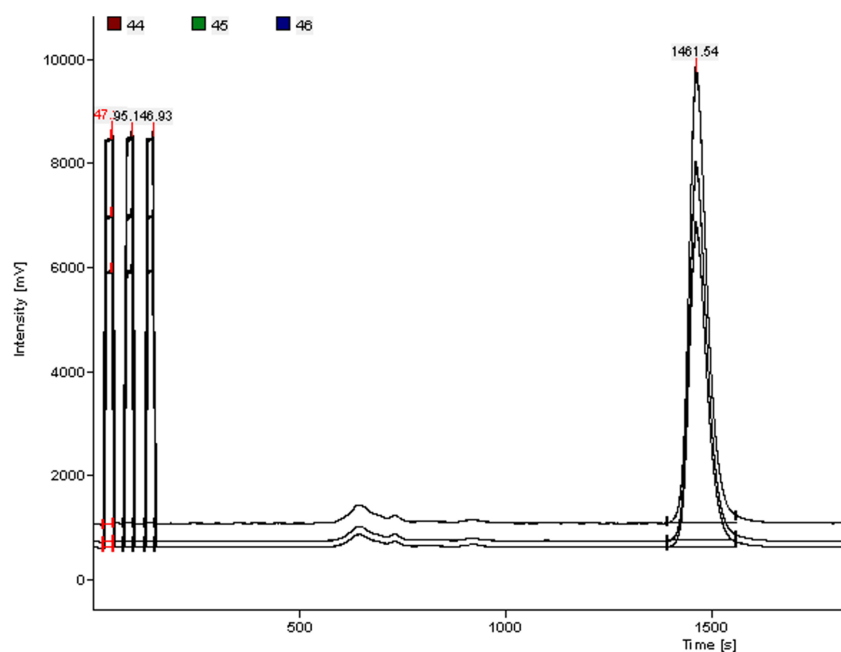
- Répétabilité **r**: **0,60** ‰
- Reproductibilité **R**: **0,62** ‰

11. ANNEXE

11.1. Chromatographe type d'une analyse GC-S-SMRI de glycérol dans du vin



11.2. Chromatogramme typique d'une analyse CLHP-SMRI du glycérol



12. Bibliographie

1. Calderone G., Naulet N., Guillou C., Reniero F., "Characterization of European wine glycerol: stable carbon isotope approach". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52, 5902-5906
2. Cabanero AI, Recio JL, Ruperez M. Simultaneous stable carbon isotopic analysis of wine glycerol and ethanol by liquid chromatography coupled to isotope ratio mass spectrometry