RESOLUTION OENO 71/2000

XX. VINAIGRES DE VIN - AUTHENTIFICATION PAR FINS-RMN ® ET D'AUTRES METHODES ISOTOPIQUES

1. Objectif et principe

Le principal objectif de l'application de ces méthodes est la détection et la quantification de la présence d'acide acétique de synthèse dans les vinaigres et la détection d'autres adultérations des vinaigres.

En effet, l'addition d'acide acétique de synthèse et d'autres altérations modifient la concentration de deutérium du -CH3 de cet acide.

La méthode concerne les étapes suivantes :

- évaluation de la concentration en acide acétique du vinaigre ;
- extraction de l'acide acétique du vinaigre par l'éther ;
- détermination du pourcentage de l'eau résiduelle de l'acide acétique purifié ;
- quantification du deutérium de l'acide acétique obtenu, par RMN.

Pour obtenir une information sur la possible addition de vinaigre d'alcool provenant de plantes dont le métabolisme est en C_4, on devra déterminer aussi d'autres paramètres isotopiques, comme le rapport 13C/12C de l'acide acétique ou (D/H) de l'eau, en employant IRMS (*Isotope Ratio Mass Spectrometry).*

Les isotopomères de l'acide acétique et de l'eau qui présentent un intérêt pour l'objectif de cette méthode sont :

I	$CH_2D-COOH$
II	CH_3-COOD
III	HOD

Exemplaire certifié conforme Paris, 23 juin 2000
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Georges DUTRUC-ROSSET

© OIV 2000

2. Réactifs

2.1. Réactifs pour le dosage de l'eau par la méthode de Karl Fischer.

2.2. N,N-tétraméthylurée (TMU) ; utiliser un échantillon de TMU de référence de rapport isotopique donné et contrôlé.

2.3. Anhydride trifluoroacétique, $(CF_3\text{-CO})_2O$.

2.4. Ether éthylique (qualité HPLC).

2.5. Azote gazeux.

3. Matériel

Matériel de laboratoire d'usage courant et aussi :

3.1. Dispositif pour extraction de l'acide acétique, comportant :

- un extracteur liquide liquide, avec un chauffe ballon électrique et un réfrigérant ;
- une colonne Cadiot à bande tournante (mobile en téflon) ;
- fioles coniques à rodage de 125 ml ;
- ballon à double rodage de 250 ml ;

3.2. Appareil de Karl Fischer.

3.3. Equipement RMN

Spectromètre RMN muni d'une sonde spécifique "deutérium" accordée à la fréquence

- v_o caractéristique du champ B0 (par exemple, pour B0=9,4 T, 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.

Changeur automatique d'échantillons (éventuellement).
Logiciel de traitement des données.
Tubes échantillons de 10 mm de diamètre.
La résolution mesurée sur le spectre, transformé sans multiplication exponentielle (LB

Exemplaire certifié conforme Paris, 23 juin 2000
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Georges DUTRUC-ROSSET

© OIV 2000

= 0) et exprimée par la largeur à mi-hauteur du signal méthyle du TMU, doit être inférieure à 0,7 Hz. La sensibilité, mesurée avec un facteur de multiplication exponentielle LB égale à 2, doit être supérieure ou égale à 150 pour le signal méthyle de l'acide acétique de l'extrait, titrant 85% m/m, au minimum, d'acide acétique.

4. Préparation de l'échantillon

4.1. Extraction de l'acide acétique du vinaigre

Introduire 350 ml de l'échantillon du vinaigre dans l'extracteur liquide-liquide. Remplir 2/3 du ballon de 250 ml de l'extracteur avec l'éther éthylique ; ajouter quelques grains de pierre ponce. Chauffer pendant 5 h, à l'ébullition. Recueillir 100 ml de l'eau résiduelle pour l'analyse de $(D/H)_{eau}$ (SMRI).

4.2. Séparation de l'éther de l'acide acétique

Introduire la phase organique dans le ballon à double rodage de 250 ml (avec la pierre ponce), placée sous la colonne Cadiot. Chauffer pour l'ébullition de l'éther. Mettre en place une fiole conique rodée de 125 ml pour recueillir le distillat. Recueillir le liquide bouillant entre 32 °C et 40 °C. Quand la température dépasse 45 °C, arrêter le prélèvement jusqu'à ce que la température revienne à 40 °C. Prélever à nouveau le distillat jusqu'à 45 °C. Répéter cette opération jusqu'à ce que la température après arrêt du prélèvement et fonctionnement en circuit fermé, ne redescende plus.

Chauffer jusqu'à une température de 85 °C - 90 °C. Introduire l'aiguille dans le ballon de 250 ml, pour faire passer l'azote. Recueillir le liquide bouillant jusqu'à une température de 95 °C, et arrêter le prélèvement. Répéter cette opération jusqu'à ce que la température dépasse rapidement 95 °C.

La distillation complète dure environ 4h. Refroidir alors le ballon qui contient l'acide acétique et l'eau. Transférer la solution dans un flacon de 100 ml.

4.3. Détermination du pourcentage d'eau

Sur une prise d'essai voisine de 0,2 ml de solution d'acide acétique, de masse **p'** exactement connue, la teneur en eau est déterminée par la méthode de Karl Fischer, soit **p** en grammes.

Le titre massique de l'acide acétique est donnée par

- t = 100 (p' - p) / p'.

Exemplaire certifié conforme Paris, 23 juin 2000
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Georges DUTRUC-ROSSET

© OIV 2000

4.4. Préparation de l'échantillon pour les analyses de RMN

Sonde RMN de 10 mm de diamètre :

- Dans un flacon préalablement taré, prélever 1,2 ml du standard interne (TMU) et peser à 0,1 mg près (mst) ; prélever ensuite 3,3 ml d'acide acétique obtenu par l'opération de distillation et le peser à 0,1 mg près (mA). Ajouter 250 µl d'anhydride trifluoro-acétique, comme substance de stabilisation champ-fréquence (*lock*). Homogénéiser le mélange par agitation.

5. Détermination des paramètres isotopiques

5.1. Réglages

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

L'écart-type de répétabilité obtenu sur la moyenne de 10 répétitions de chaque spectre doit être inférieur à 0,8 ppm sur (D/H)CH3.

5.2. Conditions d'acquisition des spectres RMN

Placer l'échantillon d'acide acétique préparé en 4.4, en le filtrant, dans un tube de 10 mm et l'introduire dans la sonde.

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

a. La température de la sonde (par exemple, 302 K) doit être constante ;

b. Temps d'acquisition de 6,8 s au moins pour 1200 Hz de largeur spectrale (mémoire 16 K), c'est-à-dire : environ 20 ppm à 61,4 MHz ou 27 ppm à 46,1 MHz ;

c. Impulsion : 90º ;

d. Régler le délai à l'acquisition ; sa valeur doit être du même ordre de grandeur que le temps d'échantillonnage (*dwell time*) ;

e. Détection en quadrature : fixer l'*offset* O1 entre le signal OD et le signal CH2D de TMU ;

f. Déterminer la valeur de l'*offset* de découplage O2 à partir du spectre protonique mesuré par la bobine de découplage sur le même tube. Utiliser le mode de

Exemplaire certifié conforme Paris, 23 juin 2000
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Georges DUTRUC-ROSSET

© OIV 2000

découplage par large bande.

Effectuer, pour chaque spectre, un nombre d'accumulations NS suffisant pour obtenir le rapport signal-sur-bruit donné dans les spécifications de l'équipement RMN. Répéter NE = 10 fois cette série de NS accumulations. Les valeurs de NS dépendent des types de spectromètre et de sonde utilisés. On choisira, par exemple :

Spectromètre	Sonde 10 mm
7,05 T	NS = 304
9,4 T	NS = 200
11,7 T	NS = 104

6. Expression des résultats

Pour chacun des 10 spectres, déterminer :

- $(D/H)_{CH_3} = 2{,}0661\ .T.\ m_{st}/m_A.(D/H)_{st}/t$

avec :

T = surface du signal CH3 de l'acide acétique / surface du signal CH_3 de TMU

t = pureté de l'acide acétique

$\boldsymbol{m_{st}}$ et $\boldsymbol{m_A}$ = masse du standard interne et de l'acide acétique (voir 4.4)

$\boldsymbol{(D/H)_{st}}$ = rapport isotopique du standard interne (TMU)

Pour $\boldsymbol{(D/H)_{CH_3}}$, calculer la moyenne des 10 déterminations et l'intervalle de confiance.

On conseille l'utilisation du software EUROSPEC avec le module EUROLIS, pour obtenir les meilleurs résultats, sous le point de vue de précision et de répétabilité.

7. Bibliographie

1. EUROFINS, Authentification of vinegars by SNIF-NMR® and other isotopic methods, Laboratoires EUROFINS, Nantes (1994).

Exemplaire certifié conforme Paris, 23 juin 2000
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Georges DUTRUC-ROSSET

© OIV 2000

2. OIV, Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts, OIV, Paris (1990).

Exemplaire certifié conforme Paris, 23 juin 2000
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Georges DUTRUC-ROSSET

© OIV 2000