



## RÉSOLUTION OIV-OENO 479-2017

DÉTERMINATION DES RAPPORTS ISOTOPIQUES  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  DU GLUCOSE, FRUCTOSE, GLYCEROL ET ÉTHANOL DANS LES PRODUITS D'ORIGINE VITIVINICOLE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE COUPLÉE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE DES RAPPORTS ISOTOPIQUES

L'ASSEMBLÉE GÉNÉRALE,

Au vu de l'article 2, paragraphe 2 iv de l'accord fondateur de l'Organisation Internationale de la Vigne et du Vin,

Sur proposition de la Sous-commission des Méthodes d'analyse

DÉCIDE sur proposition de la Commission II "Oenologie" d'introduire la méthode suivante, de type II pour le glucose, fructose et glycérol et de type III pour l'éthanol, au « *Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts* » :

Titre	Type de méthode
DÉTERMINATION DES RAPPORTS ISOTOPIQUES $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ DU GLUCOSE, FRUCTOSE, GLYCEROL ET ÉTHANOL DANS LES PRODUITS D'ORIGINE VITIVINICOLE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE COUPLÉE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE DES RAPPORTS ISOTOPIQUES	II et III

### 1. Domaine d'application

Cette méthode s'applique aux produits d'origine vitivinicole.

Cette méthode est :

- de type II pour le glucose, fructose et le glycérol
- de type III pour l'éthanol

### 2. Principe

Les échantillons sont injectés après dilution et filtration si nécessaire dans l'appareil de CLHP. Le rapport isotopique  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  des composés est déterminé, après leur oxydation dans une interface liquide, par spectrométrie de masse des rapports isotopiques. Cette interface liquide, symbolisée par

*Exemplaire certifié conforme  
Sofia, le 2 juin 2017  
Le Directeur Général de l'OIV  
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

*Jean-Marie AURAND*

l'acronyme "co", permet une oxydation chimique de la matière organique en CO<sub>2</sub>. Le couplage CLHP-co-SMRI permet donc de déterminer simultanément le rapport isotopique des composés suivants : glucose, fructose, glycérol et éthanol.

### **3. Réactifs**

3.1 Eau pure de résistivité  $\geq 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$  de qualité CLHP

3.2 Persulfate d'ammonium – de pureté analytique – [CAS No : 7727-54-0]

3.3 Acide orthophosphorique (concentration 85 %) –de pureté analytique– [CAS No : 7664-38-2]

3.4 Hélium pour analyse, utilisé comme gaz vecteur (CAS 07440-59-7)

3.5 Gaz de référence : CO<sub>2</sub>, dioxyde de carbone pour analyse, utilisé comme gaz de référence secondaire (CAS 00124-38-9).

3.6 Standards internationaux

### **4. Matériel**

4.1 Matériel courant de laboratoire

4.2 Appareil de chromatographie liquide haute performance

4.4 Interface liquide pour l'oxydation des composés élués

4.5 Spectromètre de masse des rapports isotopiques

### **5. Analyse des échantillons**

#### **5.1 Préparation des échantillons**

Selon les teneurs en sucre, glycérol et éthanol, les échantillons doivent être préalablement dilués avec de l'eau (3.1), afin d'obtenir une concentration observable dans des conditions expérimentales. Selon les concentrations des composés, deux mesures sont nécessaires avec des dilutions différentes.

*Exemplaire certifié conforme  
Sofia, le 2 juin 2017  
Le Directeur Général de l'OIV  
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

*Jean-Marie AURAND*

## 5.2 Exemple de conditions analytiques

Durée totale de l'analyse : 20 minutes

A titre indicatif, la dilution des jus de raisin et des vins est de l'ordre de 1/200 tandis que celle des moûts concentrés est de l'ordre de 1/500.

### CLHP :

Colonne : colonne de type carbohydrate (Ex : Carbohydrate column 700 CH, HyperRez XP Carbohydrate H<sup>+</sup>)

Volume injecté : 25 µL

Phase mobile : eau (3.1)

Débit : 0.4 mL/min

T° Colonne : 80 °C

### Interface Liquide :

Solution de persulfate d'ammonium (3.2) (15% en masse) et d'acide orthophosphorique (2,5% en volume)

Débit de la pompe péristaltique : 0,6 mL/min

Température de chauffage : 93 °C

Flux de l'hélium vecteur : 15 mL/min

Flux de l'hélium de séchage : 50 mL/min

### SMRI :

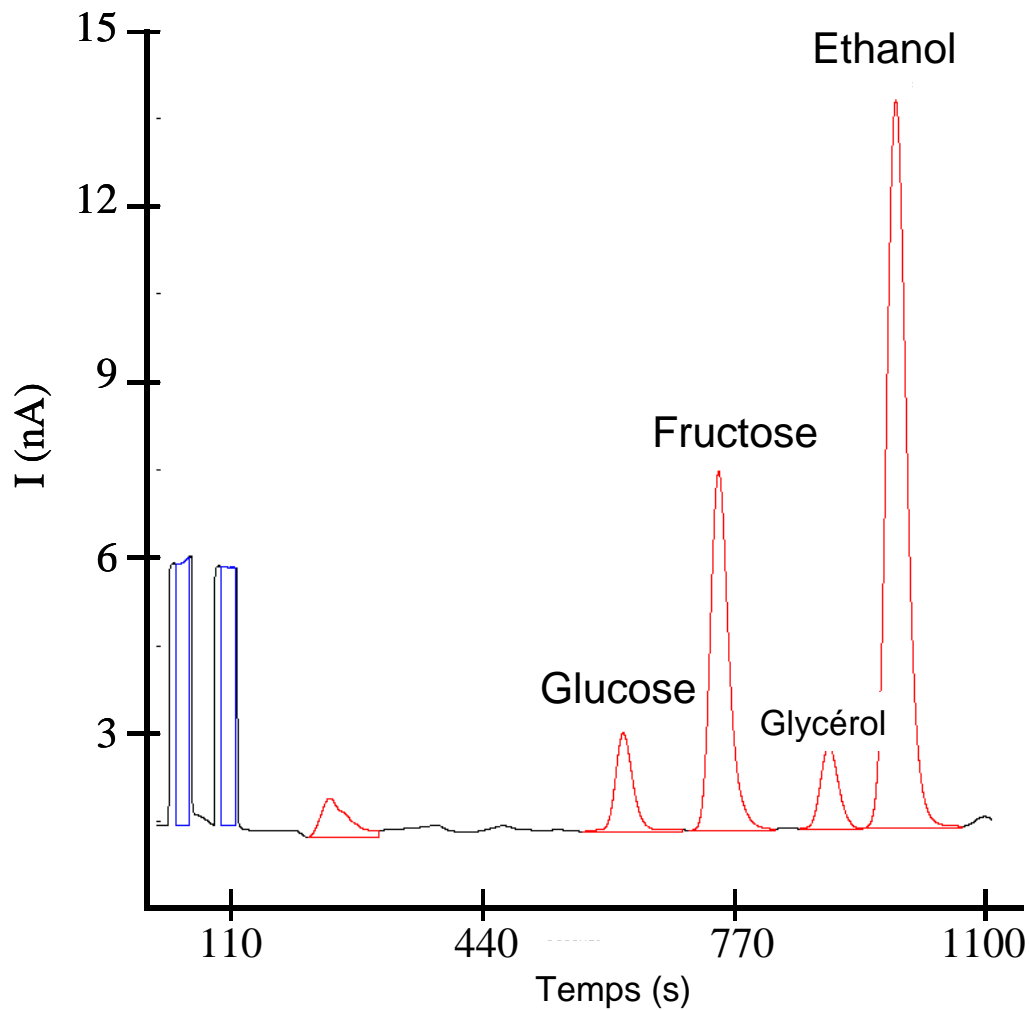
Courant de trappe : 300 µA

*Exemplaire certifié conforme  
Sofia, le 2 juin 2017  
Le Directeur Général de l'OIV  
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

*Jean-Marie AURAND*

### 5.3 Exemple de chromatogramme

Chromatogramme d'un vin sucré analysé par CLHP-co-SMRI



### 6. Détermination des rapports isotopiques

Le gaz de référence, le CO<sub>2</sub>, est étalonné à partir des standards internationaux commerciaux. Les rapports isotopiques sont exprimés en δ ‰ par rapport au Pee Dee Belemnite (PDB) et sont définis comme :

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{Ech}} (\text{‰}) = [(R_{\text{Ech}} / R_{\text{St}}) - 1] * 10^3$$

*Exemplaire certifié conforme  
Sofia, le 2 juin 2017  
Le Directeur Général de l'OIV  
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

*Jean-Marie AURAND*

avec : Ech : échantillon ; St : standard ; R : rapport isotopique  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$

## 7. Caractéristiques de la méthode

Les caractéristiques de la méthode de mesure des rapports isotopiques du  $\delta^{13}\text{C}$  du glucose, fructose, glycérol et éthanol par CLHP-co-SMRI ont été déterminées à partir des résultats d'une chaîne d'analyse inter-laboratoires sur quatre échantillons (vin sec, vin sucré, jus de raisin et moût concentré rectifié). Les résultats obtenus pour chaque composé analysé et chaque type de matrice sont présentés en annexe.

## 8. Bibliographie

1. Cabanero, Al.; Recio, JL.; Rupérez, M. (2008) Isotope ratio mass spectrometry coupled to liquid and gas chromatography for wine ethanol characterization. Rapid Commun. Mass Spectrom. 22 : 3111-3118.
2. Cabanero, Al. ; Recio, JL. ; Rupérez, M. (2010) Simultaneous stable carbon isotopic analysis of wine glycerol and ethanol by liquid chromatography coupled to isotope ratio mass spectrometry. J. Agric. Food Chem. 58: 722-728.
3. Guyon, F. ; Gaillard, L. ; Salagoïty, MH. ; Médina, B. Intrinsic Ratios of Glucose, Fructose, Glycerol and Ethanol  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  Isotopic Ratio Determined by HPLC-co-IRMS : Toward Determining Constants for Wine Authentication. Anal. Bioanal. Chem. (2011) 401 : 1551-1558.

*Exemplaire certifié conforme  
Sofia, le 2 juin 2017  
Le Directeur Général de l'OIV  
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

*Jean-Marie AURAND*

## Annexe

### Traitement statistique de la chaîne d'analyse CLHP-co-SMRI Pour la détermination de la fidélité de la méthode (répétabilité et reproductibilité)

#### Liste des laboratoires classés par ordre alphabétique des pays d'origine.

Pays	Laboratoire
Allemagne	INTERTEK
Allemagne	UNI DUE
Allemagne	ELEMENTAR
Allemagne	QSI
Allemagne	LVI
Belgique	IRMM
Chine	CNRIFI
Espagne	MAGRAMA
France	SCL-33
Italie	FLORAMO
Japon	AKITA Univ.
Rép. Tchèque	SZPI

#### Réponses :

12 laboratoires / 14 réponses

#### Traitement des résultats de la chaîne inter-laboratoires selon ISO 5725-2

#### Echantillons:

- 1 vin sec (Vin A)
- 1 vin sucré (Vin B)
- 1 moût concentré rectifié (MCR)
- 1 Jus de raisin

#### Conditions d'analyse :

Chaque échantillon analysé en double (répétabilité) et double aveugle (reproductibilité)  
Expression des résultats en ‰ vs PDB

*Exemplaire certifié conforme  
Sofia, le 2 juin 2017  
Le Directeur Général de l'OIV  
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

*Jean-Marie AURAND*

## Fidélité sur la mesure du Glucose

### Répétabilité et Reproductibilité

	Vin B	MCR	Jus de Raisin
Nombre de Laboratoires	12	12	12
Nombre de réponses	14	13	14
Nombre de réponses retenues (élimination des aberrants)	13	13	12
Valeur Minimale	-26.33	-25.04	-25.78
Valeur Maximale	-23.72	-23.74	-24.62
Valeur Moyenne	-25.10	-24.24	-25.19
Variance de répétition	0.02	0.01	0.01
Ecart type de répétabilité ( $S_r$ )	0.14	0.10	0.09
Limite de répétabilité (r ‰)	0.40	0.29	0.24
Variance de reproductibilité	0.39	0.14	0.11
Ecart type de reproductibilité ( $S_R$ )	0.62	0.38	0.33
Limite de reproductibilité (R ‰)	1.77	1.06	0.94

*Exemplaire certifié conforme  
Sofia, le 2 juin 2017  
Le Directeur Général de l'OIV  
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

*Jean-Marie AURAND*

## Fidélité sur la mesure du Fructose

### Répétabilité et Reproductibilité

	Vin B	MCR	Jus de Raisin
Nombre de Laboratoires	12	11	12
Nombre de réponses	14	13	14
Nombre de réponses retenues (élimination des aberrants)	13	13	13
Valeur Minimale	-25.56	-24.19	-25.33
Valeur Maximale	-24.12	-23.19	-23.98
Valeur Moyenne	-24.87	-23.65	-24.56
Variance de répétition	0.02	0.03	0.02
Ecart type de répétabilité ( $S_r$ )	0.14	0.16	0.14
Limite de répétabilité (r ‰)	0.40	0.46	0.39
Variance de reproductibilité	0.15	0.10	0.18
Ecart type de reproductibilité ( $S_R$ )	0.39	0.32	0.42
Limite de reproductibilité (R ‰)	1.10	0.90	1.19

*Exemplaire certifié conforme  
Sofia, le 2 juin 2017  
Le Directeur Général de l'OIV  
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

*Jean-Marie AURAND*



## Fidélité sur la mesure du Glycérol

### Répétabilité et Reproductibilité

	Vin A	Vin B
Nombre de Laboratoires	12	12
Nombre de réponses	12	12
Nombre de réponses retenues (élimination des aberrants)	11	11
Valeur Minimale	-32.91	-30.74
Valeur Maximale	-30.17	-28.27
Valeur Moyenne	-31.75	-29.54
Variance de répétition	0.13	0.04
Ecart type de répétabilité ( $S_r$ )	0.36	0.19
Limite de répétabilité (r ‰)	1.03	0.55
Variance de reproductibilité	0.57	0.37
Ecart type de reproductibilité ( $S_R$ )	0.76	0.61
Limite de reproductibilité (R ‰)	2.14	1.72

*Exemplaire certifié conforme  
Sofia, le 2 juin 2017  
Le Directeur Général de l'OIV  
Secrétaire de l'Assemblée Générale*

*Jean-Marie AURAND*

## Fidélité sur la mesure de l’Ethanol

### Répétabilité et Reproductibilité

	Vin A	Vin B
Nombre de Laboratoires	12	12
Nombre de réponses	11	12
Nombre de réponses retenues (élimination des aberrants)	10	12
Valeur Minimale	-27.85	-27.60
Valeur Maximale	-26.50	-26.06
Valeur Moyenne	-27.21	-26.82
Variance de répétition	0.03	0.03
Ecart type de répétabilité ( $S_r$ )	0.16	0.17
Limite de répétabilité (r ‰)	0.47	0.47
Variance de reproductibilité	0.16	0.23
Ecart type de reproductibilité ( $S_R$ )	0.40	0.47
Limite de reproductibilité (R ‰)	1.14	1.34

*Exemplaire certifié conforme  
Sofia, le 2 juin 2017  
Le Directeur Général de l’OIV  
Secrétaire de l’Assemblée Générale*

*Jean-Marie AURAND*