



Ministerio de Economía  
Ministerio de Agricultura, Ganadería,  
Pesca y Alimentación  
Instituto Nacional de Vitivinicultura

C.P.

MENDOZA, 9 de junio de 2000.

VISTO el Expediente N° 311-000114/00-2, por el cual se tramita la oficialización del método para la determinación de relaciones isotópicas del carbono en el alcohol de los vinos por espectrometría de masas, y

**CONSIDERANDO:**

Que dicha determinación posibilita el control de la autenticidad de vinos y mostos a través del valor de la relación isotópica de los isótopos estables del carbono,  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ , efectuada sobre el alcohol, mediante un equipo Espectrómetro de Masas de Relaciones Isotópicas de Isótopos Estables (IRMS).

Que el factor responsable de dicha relación es el proceso fotosintético de fijación del anhídrido carbónico en las plantas.

Que desde el descubrimiento en 1966 del fenómeno descrito precedentemente, se está utilizando esta determinación en organismos de control de diferentes países.

Que el valor de esta relación isotópica se ve igualmente reflejada tanto en el azúcar como en el alcohol proveniente de la fermentación del primero.

Que esta determinación es la base de los métodos oficiales vigentes en diferentes países de la Unión Europea y en Estados Unidos para la diferenciación del origen de los azúcares y/o alcoholes en vinos y otros alimentos.

Que esta determinación es recomendada por la Unión Europea para la diferenciación de alcoholes provenientes de diferentes procesos fotosintéticos.



Ministerio de Economía  
de Agricultura, Ganadería,  
Pesca y Alimentación  
Instituto Nacional de Vitivinicultura

Que a su vez esta determinación es aconsejada por el Recueil des Methodes Internationales d'Analyse des Vins et des Mouts de la Office International de la Vigne et du Vin (O.I.V.) para dicho fin.

Que la República Argentina es país miembro de la O.I.V. y su representación es ejercida por el Instituto Nacional de Vitivinicultura.

Que el método FV N° 1117 "METHOD FOR THE DETERMINATION OF THE  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ISOTOPE RATIO OF ETHANOL IN WINES AND BY ISOTOPIC RATIO MASS SPECTROMETRY (IRMS)" para vinos ha sido científicamente aceptado por la Subcomisión de Métodos de Análisis de la O.I.V..

Que el método ha sido redactado por Claude GUILLOU y Fabiano RENIERO, de la European Commission - Joint Research Centre ISPRA, Institute for Health and Consumer Protection Food Products and Consumer Goods Unit, Bureau Européen des Vins Alcools et Boissons Spiritueuses (BEVABS)-Ispra (VA), Italia, Gérard MARTIN, del Centre Européen d'Analyse Isotopique Spécifique, Nantes, Francia, Reiner WITTKOWSKI, del Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV), Berlín, Alemania, Ana Isabel BLANCH, del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Laboratorio Arbitral Agroalimentario, España, Giuseppe VERSINI, del Instituto Agrario San Michele all'Adige (Trento), Italia, Bernard LEFEVRE, del European Commission DG Agriculture, Bruxelles, Bélgica y Gerald GOLDWIN, del Ministry of Agriculture Food and Fisheries, Food Labelling and Standards Division II, Londres, Reino Unido.

Que la validación FV N° 1116 "FIDELITY OF THE DETERMINATION



Ministerio de Economía  
Ministerio de Agricultura, Ganadería,  
Pesca y Alimentación  
Instituto Nacional de Vitivinicultura

OF THE  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ISOTOPIC RATIO OF ETHANOL OF WINE" ha sido presentada en la O.I.V..

Que la validación ha sido realizada por Claude GUILLOU y Fabiano RENIERO, de la European Commission - Joint Research Centre ISPRA, Institute for Health and Consumer Protection, Food Products and Consumer Goods Unit, Bureau Européen des Vins Alcools et Boissons Spiritueuses (BEVABS), ISPRA (VA) Italia, Eric JAMIN, de Eurofins Scientific, Nantes, Francia, Gérard MARTIN, del Centre Européen d'Analyse Isotopique Spécifique, Nantes, Francia, Reiner WITTKOWSKI, del Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, Berlín, Alemania, Roger WOOD, del Ministry of Agriculture Food and Fisheries, JFSSG c/o Institute of Food Research, Norwich Research Park, Colney, Norfolk, Reino Unido.

Que este método es el aplicado actualmente por el Instituto Nacional de Vitivinicultura y como se desprende del considerando anterior, ha sido validado tanto por investigadores como por entidades de primer nivel mundial.

Que esta determinación tiene el respaldo científico suficiente como para adoptarse como norma de control oficial por este Instituto.

Por ello, y en uso de las facultades conferidas por las Leyes Nros. 14.878 y 24.566, el Decreto-Ley N° 2284/91 y los Decretos Nros. 1084/96 y 68/00,

EL DIRECTOR NACIONAL DEL  
INSTITUTO NACIONAL DE VITIVINICULTURA

3



Ministerio de Economía  
Fomento de Agricultura, Ganadería,  
Pesca y Alimentación  
Instituto Nacional de Vitivinicultura

RESUELVE:

- 1°.- Oficializar como norma de control de este Organismo el "METODO PARA LA DETERMINACION DE LA RELACION ISOTOPICA  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  DEL ETANOL EN VINOS POR ESPECTROMETRIA DE MASAS DE RELACIONES ISOTOPICAS (IRMS)" que, junto a su validación, en sus versiones en idioma español, obran como Anexo de la presente Resolución.
- 2°.- Regístrese, comuníquese, publíquese, dése a la Dirección Nacional del Registro Oficial para su publicación, notifíquese y cumplido, archívese.

RESOLUCION N° C. 20



Ing. Agr. LUIS GUSTAVO BORSANI  
DIRECTOR NACIONAL - I.N.V.



Ministerio de Economía  
Ministerio de Agricultura, Ganadería,  
Pesca y Alimentación  
Instituto Nacional de Vitivinicultura

## MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA RELACIÓN ISOTÓPICA $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ DEL ETANOL EN VINOS Y POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE RELACIÓN ISOTÓPICA (IRMS)

### Prefacio

El método para la determinación de la relación isotópica  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  en productos alimenticios ya se ha usado durante muchos años en varios laboratorios de alimentos. En particular algunos de los laboratorios de Países Miembros de la Unión Europea, que participan de la base de datos isotópica para vinos, están midiendo este parámetro en el etanol del vino además de la relación  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  del agua y las determinaciones de  $^2\text{H}$ -NMR. Asimismo, la etapa de destilación descrita en el método NMR, también es absolutamente adecuada para la preparación de la muestra para la determinación de la relación isotópica  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  del etanol. La información adicional obtenida a partir de la relación isotópica  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ayuda a la detección de la incorporación de azúcares de maíz o de caña. Los resultados de los diversos estudios inter-laboratorios llevados a cabo en los últimos años, han demostrado la buena precisión y la confiabilidad del método utilizado para la determinación de las relaciones del isótopo  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ . El progreso técnico alcanzado durante la última década ha llevado al desarrollo de varias técnicas on-line automatizadas, alternativas de los clásicos métodos off-line, que permiten la determinación rápida y confiable de la relación de  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  de numerosas muestras de etanol. Una descripción exhaustiva de todas las técnicas aplicables, con demasiados detalles, conduciría al riesgo de que el método quedara perimido muy pronto. Teniendo esto en cuenta, los miembros ya mencionados de la sub-comisión científica para la base de datos isotópicos del Vino en la Unión Europea, acordaron proponer el siguiente método que describe los principios básicos, evitando cualquier fraccionamiento isotópico, para la correcta medición del contenido de carbono 13 en el etanol. Sin embargo, se estimó oportuno describir brevemente, a modo de ejemplo, el procedimiento experimental basado en la técnica de flujo continuo Analizador Elemental – Espectrómetro de Masas de Relación Isotópica, técnica que es la más comúnmente usada en laboratorios de alimentos.

### 1. OBJETIVO

El objetivo del presente método es medir la relación isotópica  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  del etanol extraído del vino o de productos derivados de la uva después de la fermentación. La relación isotópica  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  puede expresarse en desviación. Luego se calcula la desviación isotópica  $\delta^{13}\text{C}$  ‰ del carbono 13, sobre una escala delta por mil, por comparación de los resultados obtenidos con un standard de trabajo previamente calibrado con relación al de referencia internacional Viena Pee Dee Belemnite (V-PDB). Todos los valores  $\delta^{13}\text{C}$  son expresados con relación a esta referencia internacional:

$$\delta^{13}\text{C} = \frac{R_{\text{muestra}} - R_{\text{referencia}}}{R_{\text{referencia}}} \times 1000$$

*M*



Ministerio de Economía  
de Agricultura, Ganadería,  
Pesca y Alimentación  
Instituto Nacional de Vitivinicultura

en donde  $R_{\text{muestra}}$  y  $R_{\text{referencia}}$  son respectivamente las relaciones isotópicas  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  de la muestra y de la referencia analítica ( $R_{\text{ref}} = 0,0112372$ ).

## 2. PRINCIPIO

Existe una diferencia significativa entre el contenido de carbono 13 de los azúcares de plantas que provienen de los diferentes ciclos fotosintéticos  $\text{C}_3$  (ciclo Calvin) y  $\text{C}_4$  (Hatch-Slack). La mayoría de las plantas tales como las vides y la remolacha, pertenecen al grupo  $\text{C}_3$ . Por otro lado, la caña y el maíz pertenecen al grupo  $\text{C}_4$ . Los contenidos de carbono 13 del azúcar y del correspondiente etanol obtenido por fermentación están bien correlacionados. El etanol de fermentación resulta ser una prueba confiable del origen botánico del azúcar original. La medición del contenido de carbono 13 del etanol permite, entonces, la posible detección y la cuantificación de azúcar proveniente de la planta  $\text{C}_4$  (isoglucosa de la caña de azúcar o del maíz) agregada a los productos derivados de la uva (mostos, vinos...). Como ya se ha mencionado en la descripción del método SNIF-NMR, la información del carbono 13 combinada con la que se obtiene por el SNIF-NMR, también puede permitir la cuantificación de la incorporación de mezclas de azúcares de plantas  $\text{C}_3$  y  $\text{C}_4$  al vino. El contenido de carbono-13 se determina sobre el gas de dióxido de carbono resultante de la combustión de la muestra. Las diversas combinaciones posibles de los isótopos  $^{18}\text{O}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{16}\text{O}$  y  $^{13}\text{C}$ ,  $^{12}\text{C}$  conducen a la masa 44 correspondiente al isotópomo  $^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2$ , la masa 45 correspondiente a las especies  $^{13}\text{C}^{16}\text{O}_2$  y  $^{12}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O}$ , y la masa 46 para el isotópomo  $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$  ( $^{13}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O}$  y  $^{12}\text{C}^{17}\text{O}_2$  pueden ser despreciados debido a su muy baja abundancia). Las correspondientes corrientes iónicas se determinan sobre tres colectores diferentes. La corriente iónica  $m/z$  45 se corrige para la contribución de  $^{12}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O}$  el cual es computado a partir de la corriente de intensidad medida para  $m/z$  46 considerando la abundancia relativa de  $^{18}\text{O}$  y  $^{17}\text{O}$  (corrección de Craig). La comparación con una referencia calibrada con respecto de la norma internacional V-PDB permite el cálculo del contenido de carbono-13 sobre la escala relativa  $\delta^{13}\text{C}$  ‰.

## 3. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

El etanol tiene que ser extraído del vino antes de la determinación IRMS.

Esta extracción se realiza por destilación del vino según se describe en §3.1 del método SNIF-NMR.

En el caso del mosto de uva, el mosto de uva concentrado y el mosto de uva concentrado rectificado, los azúcares tienen que ser fermentados primero a etanol, según se describe en §3.2 del método SNIF-NMR

## 4. INSTRUMENTACIÓN

- Espectrómetro de masas de relación isotópica (IRMS), con la capacidad de determinar la abundancia natural como contenido de  $^{13}\text{C}$  del gas  $\text{CO}_2$  con una precisión interna de 0,05 ‰ o mayor (expresado en valor  $\delta$  relativo). La precisión interna se define



aquí como la diferencia entre dos mediciones de la misma muestra de  $\text{CO}_2$ . El espectrómetro de masas se equipará generalmente con colectores que midan las intensidades de corriente para  $m/z$  44, 45 y 46. El espectrómetro de masas debe estar equipado con un doble sistema de entrada, para medir alternativamente la muestra desconocida y el standard, o bien debe utilizarse una técnica de flujo continuo (CF-IRMS) que lleve cuantitativamente los gases de combustión de las muestras y eluya el dióxido de carbono resultante hacia la cámara de ionización del espectrómetro.

- Sistema de combustión capaz de convertir cuantitativamente el etanol en dióxido de carbono. Los IRMS modernos generalmente están equipados con dispositivos de flujo continuo que extraen la combustión cuantitativa on-line de las muestras y eluyen el dióxido de carbono resultante hacia la cámara de ionización del espectrómetro (CF-IRMS). Las técnicas CF-IRMS comercialmente disponibles, y que son adecuadas para las necesidades del presente método, son:

- EA-IRMS (analizador elemental equipado para inyección líquida o sólida)
- GC-C-IRMS (cromatografía de gas – combustión – IRMS)

Se puede usar la preparación manual off-line de sistemas que efectúan una conversión de etanol a dióxido de carbono sin ningún fraccionamiento isotópico y que logran una precisión equivalente a la que se indica en §7. En ese caso, las muestras de gas dióxido de carbono resultante de la combustión de las muestras y de la referencia, se colectan en recipientes que luego son instalados en el sistema de entrada doble del IRMS para el análisis isotópico. Existen varios sistemas de combustión off-line disponibles:

- Sistema de combustión cerrada llenado con gas oxígeno circulante
- Analizador elemental con corriente de gas helio/oxígeno
- Ampolla sellada de gas llenada con óxido de cobre como agente oxidante

## 5. MATERIAL

El material y los insumos dependen del sistema de combustión manual off-line, o del sistema de flujo continuo utilizado en el laboratorio. Los sistemas de uso más común son aquellos que están basados en analizadores elementales. El analizador elemental puede estar equipado o bien con un sistema de introducción para sólidos o para líquidos. Los sistemas que utilizan el inyector para sólidos son más universales ya que tanto los líquidos como los sólidos pueden ser analizados en el mismo batch. Esto permite medir las muestras o calibrar con cuidado un standard de trabajo líquido o sólido contra las referencias sólidos internacionales (NBS22, Celulosa,...) disponibles en IAEA. Los materiales de referencia certificados (etanol 96% vol CRM656 y vino sintético CRM660) también están disponibles en IRMM Geel (B) y pueden ser usados en sistemas equipados con inyectores para líquidos. La lista siguiente establecida para los sistemas que usan un analizador elemental equipado con un inyector para sólidos, es sólo indicativa, y cualquier material puede ser sustituido por otro material que tenga una eficiencia equivalente:

5



Ministerio de Economía  
Ministerio de Agricultura, Ganadería,  
Pesca y Alimentación  
Instituto Nacional de Vitivinicultura

- pipeta volumétrica de 20  $\mu$ L de capacidad, con puntas adecuadas
- balanza con precisión de 0,1 mg, o mayor
- pinzas adecuadas para encapsular
- cápsula de estaño, adecuada para líquidos, tamaño 2 x 5 mm (12  $\mu$ L de capacidad)
- cápsula de estaño, adecuada para sólidos, tamaño 4 x 6 mm (70  $\mu$ L de capacidad)
- estándar de trabajo de relación  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  adecuado, calibrado contra estándares internacionales

Cuando se utiliza un analizador elemental equipado con un inyector para líquidos o un GC-C-IRMS, los materiales a usar son los siguientes:

- jeringa de 10  $\mu$ l para líquidos
- ampollas con un sistema de cierre hermético y septums inertes
- estándar de trabajo de relación  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  adecuado, calibrado contra estándares internacionales

En general, se utilizan los siguientes insumos para llevar a cabo el análisis con cualquiera de los sistemas de Flujo Continuo (EA-IRMS o GC-C-IRMS). Cualquier producto de esta lista puede ser sustituido por otros materiales de similar calidad:

- helio para análisis
- oxígeno para análisis
- dióxido de carbono para análisis, usado como gas de referencia secundario para el contenido de carbono-13
- reactivo oxidante para el horno del sistema de combustión (por ej. óxido de cobre para microanálisis)
- disecante para eliminar el agua producida por la combustión (por ej. anhidrona para microanálisis). Esto no es necesario cuando el sistema EA-IRMS o GC-C-IRMS elimina el agua por criotrampa o por el uso de un capilar selectivamente permeable (por ej. el tubo Nafion<sup>TM</sup>).

## 6. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3





Ministerio de Economía  
Ministerio de Agricultura, Ganadería,  
Pesca y Alimentación  
Instituto Nacional de Vitivinicultura

Todos los pasos preparatorios deben llevarse a cabo sin ninguna pérdida significativa de etanol por evaporación, lo que cambiaría la composición isotópica de la muestra. La pérdida de etanol por evaporación produce cambios notables del contenido de isótopo de carbono en el material restante, por ejemplo, hasta 6 ‰ de enriquecimiento cuando se ha evaporado aproximadamente un 40 ‰ de la muestra.

La siguiente descripción se refiere a los procedimientos más comúnmente usados para la combustión de las muestras de etanol previo al análisis del isótopo de carbono estable, en referencia a los sistemas de combustión automatizados de que se dispone comercialmente. Cualquier otro método que asegure que la muestra de etanol es cuantitativamente convertida a dióxido de carbono sin ninguna pérdida de etanol por evaporación va a ser adecuado para la preparación de dióxido de carbono para análisis de isótopo.

**6.1. Procedimiento experimental basado en la utilización de un analizador elemental equipado con inyector de sólidos y acoplado al espectrómetro de masas**

**a) Encapsulado**

- Se recomienda insertar regularmente un estándar de trabajo en las series de muestras.
- En cualquier caso, coloque sistemáticamente una cápsula con el estándar de trabajo al comienzo y al final de la serie de muestras
- Utilice cápsulas, pinzas, y bandejas limpias
- Tome una cápsula del tamaño adecuado con el extremo curvo de la pinza
- Introduzca el volumen necesario de líquido en la cápsula utilizando una micropipeta
- Prese para sellar la cápsula con una pinza/prensa especial
- Ponga la cápsula en la balanza y controle que el peso sea estable
- Cada cápsula debe estar cerrada en forma totalmente hermética. Si no es así debe descartarse y debe prepararse una nueva cápsula. El sellado de las cápsulas que contienen etanol debe efectuarse con gran cuidado
- Prepare dos cápsulas para cada muestra
- Coloque la cápsula sobre la bandeja del cambiador automático de muestras del microanalizador, en el lugar correcto. Cada cápsula debe ser cuidadosamente referenciada por medio de un orden numérico

**Nota:** Se necesita 3,84 mg de etanol absoluto o 4,17 mg de destilado con un grado alcohólico de 92% w/w para obtener 2 mg de carbono. La cantidad adecuada del destilado debe ser calculada del mismo modo de acuerdo con la cantidad de carbono necesario, dependiendo de la sensibilidad del instrumental del espectrómetro de masas.

**b) Control y seteo del EA-IRMS**

- Fije la temperatura de los hornos del analizador elemental y de los flujos de gas de helio y oxígeno para una combustión óptima de la muestra



Ministerio de Economía  
Fomento de Agricultura, Ganadería,  
Pesca y Alimentación  
Instituto Nacional de Vitivinicultura

- Controle que no existan fugas en el sistema EA-IRMS (por ejemplo, monitoreando la corriente iónica  $m/z = 28$  correspondiente a  $N_2$ )
  - Ajuste el IRMS para medir las intensidades de las corrientes iónicas  $m/z = 44, 45$  y  $46$
  - Permita que se equilibre el sistema
  - Controle el sistema por medio de muestras de control antes de comenzar las mediciones de las muestras
- c) Ejecutar una serie de mediciones
- Coloque las muestras encapsuladas sobre el autosampler (muestreador automático) del analizador
  - Inicie las mediciones. La computadora en interfaz con el EA-IRMS graba las corrientes iónicas y calcula los valores  $\delta$  para cada muestra

**Notas:** El uso de un analizador elemental automatizado y de un sistema de caja de atrampamiento automatizado debe tener en cuenta un procedimiento de trabajo relativamente similar al descrito precedentemente. Cuando se utiliza un inyector para líquidos las consideraciones respecto del procedimiento de encapsulado obviamente no son necesarias.

d) Procesamiento de los resultados

Controle que el valor  $\delta^{13}C$  para el estándar de trabajo no difiera en más de  $0,5 \text{ ‰}$  del valor admitido para el estándar; de otro modo, debe controlarse el espectrómetro.

Para cada muestra, controle que los dos valores replicados vayan en sucesión. Si la diferencia de resultados entre las dos cápsulas es menor que  $0,3 \text{ ‰}$ , la medición se acepta; el resultado final para una muestra dada es la media de dos cápsulas. Si la desviación es mayor que  $0,3 \text{ ‰}$ , la medición debe repetirse.

Un control del desarrollo correcto del experimento puede estar basado en la intensidad de corriente iónica  $m/z 44$  que sea proporcional a la cantidad de carbono inyectado en el analizador elemental. En condiciones normales, la intensidad de la corriente iónica  $m/z 44$  debe ser casi constante para las muestras que se están analizando. Una desviación significativa debe hacernos sospechar una evaporación de etanol (por ejemplo una cápsula sellada incorrectamente) o una inestabilidad del sistema EA-IRMS.

Durante la medición on-line, se pueden observar pequeñas dispersiones debido a la variación en las condiciones del instrumental. En ese caso los valores  $\delta^{13}C$  de las muestras tienen que ser corregidos de acuerdo con la diferencia entre el valor  $\delta^{13}C$  medido del estándar de trabajo y su valor real, determinado previamente con respecto al de la referencia internacional. La dispersión y por lo tanto la corrección a aplicar se pueden suponer como que son lineales entre dos mediciones



Ministerio de Economía  
Ministerio de Agricultura, Ganadería,  
Pesca y Alimentación  
Instituto Nacional de Vitivinicultura

de  $\delta^{13}\text{C}$  del estándar de trabajo. Esta debe ser medida al principio y al final de todas las series de muestras. Luego se puede calcular una corrección para cada muestra por medio de una interpolación lineal entre los dos valores de las diferencias que hay entre el valor asignado del estándar de trabajo y los valores reales obtenidos de las mediciones.

Esta corrección permite una diferencia de 0,5 ‰ entre el  $\delta^{13}\text{C}$  del estándar de trabajo con respecto de su valor aceptado tolerable. Si la desviación es mayor que 0,5 ‰, no se puede validar ningún resultado y el espectrómetro debe ser recalibrado.

#### **6.2. Método basado en la combustión off-line del etanol y en la medición de entrada doble**

Cuando se usa el sistema de entrada doble, las corrientes iónicas del dióxido de carbono resultante de la combustión de las muestras se comparan, bajo las mismas condiciones de presión, con las de un dióxido de carbono de referencia calibrado contra un estándar internacional.

El mismo procesamiento de resultados que se ha mencionado es aplicable para la técnica de flujo continuo. Sin embargo, no se necesita ninguna corrección por dispersión dado que todas las muestras son comparadas con el mismo dióxido de carbono de referencia.

#### **7. FIDELIDAD:**

- El límite de repetibilidad (r) es igual a 0,2 ‰
- El límite de reproducibilidad (R) es igual a 0,6 ‰



## FIDELIDAD DE LA DETERMINACIÓN DE LA RELACIÓN ISOTÓPICA $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ DEL ETANOL DEL VINO

### INTRODUCCIÓN

Los métodos isotópicos fueron introducidos hace casi veinte años para el análisis de vinos cuando el gobierno francés decidió desarrollar un nuevo método para detectar y medir el enriquecimiento de los vinos por la sacarosa. El método SNIF-NMR (Fraccionamiento isotópico natural de sitio específico - Resonancia magnética nuclear) fue aprobado por el gobierno francés en diciembre de 1981 y presentado ante la OIV dos años más tarde (FV 760). La Comunidad Europea adoptó el método SNIF-NMR en 1990 en su reglamentación EC n° 2676 la que también se refería a la necesidad de una determinación adicional por espectrometría de masas de la relación  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  del etanol del vino. La Comunidad Europea además decidió establecer un banco de datos de valores de referencia para vinos de las regiones productoras europeas con el fin de asistir y promover el uso práctico del método<sup>(1,2,3)</sup>. La Comisión Europea creó el laboratorio BEVABS\* en el centro conjunto de investigación para el manejo del banco de datos y para arbitrar en caso de disputas entre estados miembros con relación a la interpretación de resultados analíticos. A esta altura, ya se preveía incluir además otras relaciones isotópicas en el banco de datos apenas fueran adoptadas por la OIV y la Unión Europea. La relación isotópica  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  del etanol y la relación del isótopo  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  del agua fueron particularmente visualizadas ya que fueron medidas en forma rutinaria en varios laboratorios y ya que son particularmente útiles en la detección de adulteración que involucre el agregado de azúcar de caña y agua. Con esta finalidad, el gobierno italiano adoptó en 1993 el método para la determinación de la relación isotópica  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  como complemento del método NMR para la detección del enriquecimiento de vino con azúcares de caña o maíz<sup>(4)</sup>. El reconocimiento oficial de los métodos analíticos por parte de la OIV y de la Unión Europea depende de su validación en estudios cooperativos estableciendo sus parámetros de repetibilidad y reproducibilidad. Esto se logró para el  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  por medio de un estudio colaborativo organizado por el BGVV y el método ha sido adoptado después de la publicación de los resultados en la Hoja Verde de la OIV N° 1035<sup>(5)</sup>. El método  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  luego fue adoptado por la Comisión Europea que también incluyó este parámetro en el Banco de Datos para el Vino de la UE<sup>(6,7)</sup>. La determinación de la relación isotópica  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  para el etanol también ha sido ensayada en un estudio cooperativo organizado para la OIV y los resultados fueron presentados en la Hoja Verde 1051<sup>(8)</sup>. Dado que este estudio se llevó a cabo utilizando destilados del vino, consideramos necesario controlar si el paso de destilación contribuye a la varianza de resultados. Sin embargo, dado que fue difícil organizar otro estudio colaborativo sobre vinos, hemos retenido las cifras de repetibilidad y reproducibilidad medidas en destilados para su comparación con los numerosos resultados disponibles a partir de pruebas de eficiencia de laboratorio.

\* Oficina Europea para el Vino y Bebidas Espirituosas



Ministerio de Economía  
Ministerio de Agricultura, Ganadería,  
Pesca y Alimentación  
Instituto Nacional de Vitivinicultura

El propósito del presente trabajo es considerar la información que se ha compilado a lo largo de los años de estudios inter-laboratorios para proponer cifras para los límites de repetibilidad y reproducibilidad que tienen en cuenta el paso de destilación.

## MEDICIÓN DE LA RELACIÓN ISOTÓPICA $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$

El contenido de carbono-13 se determina sobre el gas dióxido de carbono resultante de la combustión de la muestra. Las intensidades de las corrientes iónicas ( $m/z = 44, 45$  y  $46$ ) correspondientes a los isotopómeros del dióxido de carbono se miden por espectrometría de masas. La relación isotópica  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  puede ser expresada en desviación. Luego se calcula la desviación isotópica de carbono 13,  $\delta^{13}\text{C}$  ‰, sobre una escala delta por mil, por comparación de los resultados obtenidos con un estándar de trabajo previamente calibrado con respecto de la referencia internacional Viena Pee Dee Belemnite (V-PDB). Todos los valores  $\delta^{13}\text{C}$  se expresan con relación a esta referencia internacional:

$$\delta^{13}\text{C} = \frac{R_{\text{muestra}} - R_{\text{referencia}}}{R_{\text{referencia}}} \times 1000$$

en donde  $R_{\text{muestra}}$  y  $R_{\text{referencia}}$  son respectivamente las relaciones  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  de la muestra y de la referencia analítica ( $R_{\text{ref}} = 0,0112372$ ).

## PRESENTACIÓN DE LOS DIVERSOS ESTUDIOS INTER-LABORATORIOS

### Estudio colaborativo sobre la determinación de $\delta^{13}\text{C}$ en etanoles de vino <sup>(8)</sup>

Veinte laboratorios de nueve países participaron en este estudio inter-laboratorios. El propósito de esta práctica fue determinar la repetibilidad y la reproducibilidad de la medición del contenido de  $^{13}\text{C}$  en los alcoholes de vinos por Espectrometría de Masas de Relación Isotópica. El estudio utilizó doce etanoles dispuestos en seis conjuntos de duplicados ciegos que fueron constituidos por alcohol de uva, alcohol de remolacha, alcohol de caña y varias mezclas de alcohol binarias y ternarias a partir de estos tres orígenes botánicos. Después de la evaluación estadística de los resultados y de la eliminación de los anómalos, la repetibilidad media  $r$  y la reproducibilidad media  $R$  fueron:

media  $r$ : 0,2 ‰

media  $R$ : 0,56 ‰

### Estudio inter-laboratorios organizado por BEVABS

Con el fin de monitorear la calidad de los datos y del desempeño del laboratorio, BEVABS organizó un estudio inter-laboratorios en 1996 utilizando dos muestras de vinos y un alcohol que fueron distribuidas a todos los laboratorios participantes de la medición de datos para el Banco de Datos del Vino de la UE. A los laboratorios que tenían equipo IRMS se les pidió que enviaran los resultados, donde fuera posible, de la relación isotópica  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  del etanol y la relación isotópica  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ , además de los resultados de NMR. Tres diferentes sistemas de destilación fueron usados por los



laboratorios para la extracción de etanol del vino, previo a las determinaciones isotópicas. Además de la columna de Cadiot descrita en los métodos oficiales de la OIV y la UE, otros dos sistemas de destilación, las columnas de Normag y de Bullio, también fueron usados en los laboratorios que participaron en estos estudios. Este estudio inter-laboratorios apuntó a completar los resultados relacionados con la influencia del paso de la destilación publicados por Rossmann et al. después de los estudios efectuados en el marco del proyecto AIR 3-SMT-92-005 de la Comunidad Europea<sup>9</sup>. Los resultados obtenidos por los laboratorios para las determinaciones de  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  se muestran en la Tabla 1 y Tabla 2. Con el fin de detectar posibles cambios sistemáticos debidos al uso de distintos sistemas de destilación, a los participantes se les pidió que enviaran a BEVABS los destilados obtenidos a partir de las dos muestras de vino. Esto permitió que los resultados obtenidos por los laboratorios fueran controlados, y también que se midieran las relaciones  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  para los laboratorios que no tenían equipo IRMS. Las mediciones obtenidas por BEVABS sobre estos destilados se presentan en la segunda parte de la Tabla 1, y demuestran ser muy cercanos a los valores determinados por los participantes. Siete laboratorios enviaron determinaciones  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ , y una estimación del límite de reproducibilidad R, que puede ser computado a partir de estos resultados, como  $R = 2,8 \times S_R$ , en donde  $S_R$  puede considerarse igual a las desviaciones standard obtenidas de cada muestra. Los valores de reproducibilidad obtenidos de este modo fueron:

Vino blanco A	R= 0,59 ‰
Vino tinto B	R= 0,71 ‰
Alcohol	R= 0,87 ‰

Es interesante que la varianza de las mediciones efectuadas por BEVABS sobre los destilados enviados por los laboratorios se encontraba en el mismo rango que aquellas ( $s^2(r)$ ) obtenidas bajo la condición de repetibilidad en el estudio anterior de la OIV sobre los destilados, al cual se hizo referencia anteriormente<sup>(8)</sup>. Como puede suponerse, estas mediciones fueron obtenidas bajo las mismas condiciones de repetibilidad (un laboratorio, mismo operario, mismo instrumento, y breve periodo de tiempo) pero para los destilados preparados por diferentes laboratorios con diferentes sistemas de destilación, se puede deducir que los diversos métodos de destilación no introdujeron gran variabilidad adicional. Puede concluirse que la repetibilidad de la determinación de  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  para vinos es probablemente equivalente a la establecida para alcoholes en el anterior estudio colaborativo sobre destilados de la OIV. Esta conclusión se corrobora como cierta con la condición de que cualquier otro sistema para destilación que se utilice, sea validado contra aquellos usados en los métodos oficiales de la OIV y UE para la determinación de deuterio en etanol<sup>(1,3)</sup>. Sin embargo, como se ha establecido que la extracción incompleta del etanol conduce a un fraccionamiento isotópico, se recomienda insistentemente que los laboratorios controlen que su condición de operación y sus métodos de destilación no introduzcan un fraccionamiento isotópico significativo para el alcohol recuperado en el destilado<sup>(10)</sup>. Esto se puede establecer por el uso de materiales de referencia certificados y por medio de la participación en pruebas y ensayos de eficiencia.

3



Ministerio de Economía  
Ministerio de Agricultura, Ganadería,  
Pesca y Alimentación  
Instituto Nacional de Vitivinicultura

## FIT – Programa de Prueba de Eficiencia

Un programa de prueba de eficiencia se ha organizado desde 1994, el cual involucra a varios laboratorios interesados en la medición isotópica de productos alimenticios. Este programa de prueba de eficiencia fue integrado oficialmente a la red FIT (proyecto financiado por la UE "Análisis de alimentos utilizando Técnicas Isotópicas") en 1996, como una herramienta para mejorar y monitorear la calidad de las determinaciones isotópicas. Se habían organizado cuatro ejecuciones de inter-comparación por cada año durante el periodo correspondiente al proyecto FIT (diciembre 1995 a diciembre 1998). Una ejecución fue organizada en diciembre de 1994 y otra en junio de 1995. Además del análisis isotópico de varios otros productos alimenticios (jugos de frutas, miel, vinagres), todas las instancias incluyeron el análisis de una muestra de vino y una muestra de alcohol, tanto para determinaciones  $^2\text{H-NMR}$  como  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ . Los resultados de las determinaciones  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  se presentan en la Tabla 3 y Tabla 4 para alcoholes y vinos respectivamente. Los laboratorios participantes pertenecían a varios países, y para la determinación de  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  la cantidad de resultados enviados fue de entre 6 a 13. Utilizando estos datos es posible computar una estimación de la reproducibilidad para la determinación de la relación isotópica  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  tanto en alcoholes como en vinos. Esto se ha llevado a cabo después de la eliminación de los anómalos, de acuerdo con el test de Grubbs. Los resultados son presentados en la Tabla 5. Estos resultados muestran que el límite de reproducibilidad obtenido para alcohol y para vinos son muy similares, y esto se confirma más aún por el análisis de varianza presentado en la Tabla 6.

Estos valores son consecuentes con los valores obtenidos para vinos en el estudio inter-laboratorios BEVABS, y son comparables con aquellos obtenidos en el estudio colaborativo previo de la OIV sobre destilados de vino.

## CONCLUSIÓN

Todos los resultados de los estudios inter-laboratorios presentados en este trabajo sobre la determinación del  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  del etanol del vino son muy comparables. La fuente de la varianza es debida principalmente a la determinación IRMS, dado que se obtienen valores muy comparables tanto en muestras de vino como en destilados. Los diversos sistemas que generalmente son usados por los laboratorios para la extracción del etanol del vino previo a la determinación de  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  no tienen una incidencia importante sobre la varianza de la determinación. Sin embargo, siempre es aconsejable que los operarios controlen el desempeño de su aparato de destilación y validen sus métodos para esta medición utilizando una muestra con un contenido de  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  conocido.

Es posible una compilación de todos estos datos para proponer valores prácticos para el límite de repetibilidad y reproducibilidad para la determinación del  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  de los etanoles de vino según se indica a continuación:

$$r = 0,2 \text{ ‰} \quad R = 0,6 \text{ ‰}$$

3



Tabla 1: Resultados del estudio inter-laboratorios organizado por BEVABS en 1996 – muestras de vino

Vino Blanco A							
	Destilación	Mediciones de los participantes				Controles JRC de los destilados devueltos	
lab N°		TAV %	Tm %	Rendim. %	$\delta^{13}C$ ‰	Tm %	$\delta^{13}C$ ‰
1	Cadiot	9,35	93,02	96,80	-25,72	92,88	-26,3
2	Normag	8,62	94,09	92,60		93,44	-26,3
3	Cadiot	9,40	93,50	96,00	-26,13	93,25	-26,1
4	Bullio	9,44	89,86	98,00		89,79	-26,2
5 (JRC)	Cadiot	9,31	93,20	98,15	-26,22		-26,22
6	Cadiot	9,39	92,47	97,40	-26,31	92,48	-26,2
8	Bullio	9,61	93,36	89,60		93,25	-26,2
9	Normag	9,66	92,40	85,30		92,51	-26,2
10	Cadiot	9,17	90,82	98,90	-26,40	90,53	-26,2
11	Cadiot	9,33	92,72	98,40		92,52	-26,1
13	Normag	9,52	93,17	91,30		92,89	-26,1
14	Bullio		90,95			90,95	-26,2
15	Cadiot	9,44	92,94	96,80	-26,35	92,65	-26,1
16	Bullio	9,14	89,34		-26,27	89,20	-26,4
media		9,34	92,27	94,94	-26,20	92,03	-26,20
desviación standard		0,25	1,39	4,10	0,21	1,36	0,08
min		8,62	89,34	85,30	-26,40	89,20	-26,40
max		9,66	94,09	98,90	-25,72	93,44	-26,10
conteo		13	14	12	7	13	14
Vino tinto B							
		Mediciones de los participantes				Controles JRC de los destilados devueltos	
lab N°		TAV%	Tm %	Rendim %	$\delta^{13}C$ ‰	Tm %	$\delta^{13}C$ ‰
1	Cadiot	9,56	93,01	98,10	-25,75	92,83	-26,3
2	Normag	9,68	94,08	88,50		93,90	-26,3
3	Cadiot	9,56	93,32	97,00	-26,15	93,12	-26,2
4	Bullio	9,68	90,00	98,10		89,99	-26,2
5 (JRC)	Cadiot	9,57	92,99	98,43	-26,14		-26,14
6	Cadiot	9,54	92,41	98,50	-26,05	92,28	-26,3
8	Bullio	9,81	93,25	89,30		93,19	-26,3
9	Normag	10,06	92,37	83,60		92,45	-26,2
10	Cadiot	9,58	89,80	97,30	-26,60	89,56	-26,2
11	Cadiot	9,59	92,57	98,20		92,37	-26,3
13	Normag	9,86	93,88	94,10		93,62	-26,4
14	Bullio		89,06			89,08	-26,4
15	Cadiot	9,67	92,39	97,10	-26,39	92,40	-26,3
16	Bullio	9,48	89,58		-26,33	89,45	-26,3
media		9,66	92,05	94,85	-26,20	91,86	-26,27
desviación standard		0,15	1,63	4,76	0,25	1,64	0,07
min		9,48	89,06	83,60	-26,60	89,08	-26,40
max		10,06	94,08	98,50	-25,75	93,90	-26,14
conteo		13	14	12	7	13	14

TAV %: Grado alcohólico del vino en porcentaje de volumen

Tm%: Grado alcohólico del destilado (en porcentaje de masa)

Rendimiento %: Rendimiento de la extracción de etanol por destilación





Ministerio de Economía  
de Agricultura, Ganadería,  
Pesca y Alimentación  
Instituto Nacional de Vitivinicultura

**Tabla 2: Resultados del estudio inter-laboratorios organizado por BEVABS en 1996 – muestras de alcohol**

lab N°	Alcohol	
	Tm%	$\delta^{13}C\text{‰}$
1	92,94	-24,97
2	93,21	
3	93,12	-25,10
4	93,00	
5	92,96	-25,10
6	92,91	-24,45
7		-25,35
8	92,91	
9	92,82	
10	92,80	-25,00
11	93,00	
12		
13	92,88	
14	92,88	
15	92,90	-25,50
16	92,89	-25,17
media	92,94	-25,08
desviación st.	0,11	0,31
min	92,80	-25,50
max	93,21	-24,45
n	14	8

3



Ministerio de Economía  
de Agricultura, Ganadería,  
Pesca y Alimentación  
Nacional de Vitivinicultura

Tabla 3: FIT-Prueba de eficiencia resultados de la determinación de  $\delta^{13}C$  en alcoholes

TIPO Prueba	ALCOHOL 9412C	ALCOHOL 9508C	ALCOHOL 9512C	ALCOHOL 9608C	ALCOHOL 9609C	ALCOHOL 9612C	ALCOHOL 9708C	ALCOHOL 9709C	ALCOHOL 9712C	ALCOHOL 9708C	ALCOHOL 9709C	ALCOHOL 9712C	ALCOHOL 9808C	ALCOHOL 9809C	ALCOHOL 9812C
	-27,2	-26,4	-27,30	-24,50	-26,72	-28,10	-24,9	-23,7	-25,37	-17,70	-25,54	-25,67			
		-26,0	-27,29	-24,50	-26,65	-28,04	-23,09		-25,37						
	-27,5	-26,1	-26,66	-23,96	-26,99	-28,05	-24,9	-23,8	-25,25	-17,95					
			-27,25	-24,40	-26,53		-25,35		-25,00						
	-27,2	-23,2	-27,10	-24,34	-26,50		-25,37	-23,45	-24,96	-17,55					
	-27,5	-26,1	-27,25	-24,49	-26,68	-28,01		-23,6	-23,75	-17,90					
		-26,2	-27,46	-24,26	-26,64		-25,31		-25,31	-18,04					
		-26,1	-27,30	-24,17	-26,50	-27,91		-23,34	-25,3	-18,09					
		-25,9	-27,90	-24,50	-26,40		-25,1	-23,60		-25,20					
	-27,3	-26,2		-24,64	-26,73		-25,2		-25,01	-18,23					
	-27,5		-27,11	-28,14	-25,40	-27,97	-25,3	-23,59	-25,12	-17,81					
				-28,29	-26,61	-28,02	-25,26	-23,64	-25,28	-17,29					
					-26,59	-27,49	-23,36	-23,36	-25,2	-17,95					
						-28,06	-25,31			-17,87					
						-28,44	-25,4	-23,36	-25,4	-18,03					
							-25,72			-17,90					
Media	-27,37	-26,12	-27,26	-24,44	-26,72	-28,02	-25,21	-23,50	-25,21	-17,87					
Tamaño	6	8	8	11	11	8	11	11	12	13					
Anómalos		1	1	1	1	2			1						
Resultados aceptados	6	7	7	11	10	6	11	11	11	13					
S <sub>R</sub>	0,15	0,15	0,11	0,28	0,22	0,06	0,18	0,20	0,16	0,24					
R	0,42	0,41	0,32	0,78	0,63	0,16	0,49	0,57	0,44	0,69					

4





Ministerio de Economía  
de Agricultura, Ganadería,  
Pesca y Alimentación  
Instituto Nacional de Vitivinicultura

Tabla 5: FIT-Prueba de eficiencia – límite calculado de reproducibilidad para la determinación de  $\delta^{13}\text{C}$  en vinos y alcoholes

Vinos				Alcoholes			
N	S <sub>R</sub>	S <sup>2</sup> <sub>R</sub>	R	N	SR	S <sup>2</sup> <sub>R</sub>	R
6	0,210	0,044	0,59	6	0,151	0,023	0,42
8	0,133	0,018	0,37	8	0,147	0,021	0,41
7	0,075	0,006	0,21	8	0,115	0,013	0,32
9	0,249	0,062	0,70	11	0,278	0,077	0,78
8	0,127	0,016	0,36	8	0,189	0,036	0,53
10	0,147	0,022	0,41	11	0,224	0,050	0,63
10	0,330	0,109	0,92	9	0,057	0,003	0,16
10	0,069	0,005	0,19	8	0,059	0,003	0,16
11	0,280	0,079	0,78	11	0,175	0,031	0,49
12	0,237	0,056	0,66	11	0,203	0,041	0,57
11	0,127	0,016	0,36	12	0,156	0,024	0,44
12	0,285	0,081	0,80	13	0,245	0,060	0,69
12	0,182	0,033	0,51	12	0,263	0,069	0,74
11	0,264	0,070	0,74	12	0,327	0,107	0,91
<b>Prom. ponderado</b>	<b>0,215</b>	<b>0,046</b>	<b>0,60</b>		<b>0,209</b>	<b>0,044</b>	<b>0,59</b>

Tabla 6: FIT Prueba de eficiencia - ANOVA

ANOVA						
Origen de la variación	SS	df	MS	F	P-valor	F <sub>crit</sub>
Entre Grupos	0,0046	1	0,0046	<b>0,0903</b>	0,7662	<b>4,2252</b>
Dentro de Grupos	1,3340	26	0,0513			
<b>Total</b>	<b>1,3387</b>	<b>27</b>				



## REFERENCIAS

<sup>1</sup> Détection de l'enrichissement des moûts, des moûts concentrés, du sucre de raisin et des vins par l'application de la résonance magnétique nucléaire du deutérium (RMN-FINS/SNIF-NMR)  
OIV Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts d'analyse des vins – p 107-118

<sup>1</sup>E.C. Regulation. Community analytical methods which can be applied in the wine sector, N° 2676/90. Detecting enrichment of grape musts, concentrated grape musts, rectified concentrated grape musts and wines by application of nuclear magnetic resonance of deuterium (SNIF-NMR)  
Official Journal of the European Communities, N° L 272, Vol 33, 64-73, 3 October 1990.

<sup>1</sup> -E.C. Regulation N° 2048/89, art 16, dated 19 June 1989  
Official Journal of the European Communities N° L 202/32, 14/07/89

-E.C. Regulation N° 2347/91 dated 29 July 1991  
Official Journal of the European Communities N° L 214/32, 2/08/91

-E.C. Regulation N° 2348/91 dated 29 July 1991  
Official Journal of the European Communities N° L 214/32, 2/08/91

<sup>1</sup> Decreto del Ministero dell' agricoltura e delle foreste , 16 febbraio 1993  
Determinazione del rapporto  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  relativo all'alcol da fermentazione di mosti, MC , MCR e da vini tramite spettrometro di massa per la determinazione di rapporti di isotopi stabili (SIRA-IRMS).  
Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana, Serie Generale No 95 p18-19, 24/4/1993

<sup>1</sup> Förstel H, Martin G.J. Olschimke D, Wittkowski R.  
Détermination du rapport isotopique  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  de l'eau des vins – Description de la méthode et étude inter-laboratoire  
OIV FV N° 1035, 2366/190396

<sup>1</sup> E.C. Regulation N° 822/97 dated 6 May 1997  
Official Journal of the European Communities N° L117/10 of 7/5/97

<sup>1</sup> E.C. Regulation N° 1754/97 dated 10 September 1997  
Official Journal of the European Communities N° L248/3 of 11/09/97

<sup>1</sup>: Interlaboratory study about the determination of  $d^{13}\text{C}$  in wine ethanols  
OIV FV N° 1051, 2452/180397

<sup>1</sup> Rossmann A., Schmidt H.L., Reniero F. , Versini G., Moussa I., Merle M.H., 1996  
Stable carbon isotope content in ethanol of EC data bank wines from Italy, France and Germany  
Z Lebensm Unters Forsch 203:293-301

<sup>1</sup> Moussa I., Naulet N., Martin M.L., Martin G.J., 1990  
A Site-Specific and Multielement Approach to the Determination of Liquid-Vapor Isotope Fractionation Parameters. The Case of Alcohols  
J. Phys. Chem. 94:8303-8309

3