

# Validarea metodei “Autentificarea calității vinului prin determinări de rapoarte izotopice $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ , $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ”

## A. Condițiile tehnice în care s-a realizat validarea

**1.Responsabilul de validare:** Dr. Stela Cuna, cercetator științific II, Laboratorul de Spectrometrie de Masă, Cromatografie și Fizica ionilor, Institutului Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Tehnologii Izotopice și Moleculare din Cluj Napoca

**2.Condițiile de mediu:** Pentru determinarea rapoartelor izotopice  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ,  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  din probe de vin s-a utilizat un spectrometru de masă pentru rapoarte izotopice DELTA V ADVANTAGE, seria nr.8031D, produs de firma Thermo Finnigan. Măsurătorile pentru validarea metodei au fost efectuate între 25.09.2007 și 8.12.2007. Pe timpul efectuării măsurătorilor au fost asigurate condițiile cerute de producătorul echipamentului și anume:

-temperatura să fie constantă, între  $18^{\circ}\text{C}$ - $28^{\circ}\text{C}$ , cu o variație mai mică de  $1^{\circ}\text{C}$  pe ora. În acest sens, temperatura a fost menținută cu ajutorul instalației de aer condiționat la  $21^{\circ}\text{C}$  și a fost monitorizată cu un termo-higrometru.

-umiditatea relativă să fie cuprinsă între 20% și 70%. Umiditatea relativă a fost de 35% în timpul măsurătorilor.

**3. Materiale certificate de referință (MCR)** care au fost utilizate sunt prezentate în tabelul 1.

Tabelul 1. MRC utilizate în validarea metodei

Denumire MRC	Material	$\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}} \text{ ‰}$	$\delta^{18}\text{O}_{\text{PDB}} \text{ ‰}$	$\delta^{18}\text{O}_{\text{VSMOW}} \text{ ‰}$	Incertitudinea standard
VSMOW2	apa	-	-	0	0.025
SLAP2	apa	-	-	-55.5	0.025
NBS 22	ulei	-30.03	-	-	0.050
BCR-659	Soluție apa-etanol 12% vol.	-	-	-7.18	0.020
BCR-660	Soluție apa-etanol 12% volum	-26.72	-	-	0.090
IAEA-CO-1	marmura	+2.48	-	-2.44	

CertIFICATELE DE ANALIZA ALE MRC SUNT PREZENTATE IN COPIE IN ANEXA 1.

**4. Echipamentul** a fost etalonat înainte de validare. Deoarece Institutul National de Metrologie din Bucuresti nu are o procedura specifica pentru etalonarea spectrometrului de masa pentru rapoarte izotopice am efectuat in laborator etalonarea aparatului. In Anexa 2 este prezentata adresa INM prin care ne comunica imposibilitatea de a efectua etalonarea aparatului, iar in Anexa 3 este prezentata Procedura de etalonare efectuata de noi.

## **B. Parametrii validarii**

Au fost determinati urmatoorii parametrii:

- linearitatea
- limitele de masurare
- limita minima de detectie
- precizia (repetabilitate, repetabilitate intermediara)
- acuratete
- incertitudinea de masurare

Metodele folosite pentru determinarea valorilor  $\delta^{13}\text{C}$  si  $\delta^{18}\text{O}$  din probele de vin au fost metodele standardizate si anume:

- pentru  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  din etanolul din vin: EEC/2676/1990
- pentru  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  din apa din vin: EEC/822/1997

Toate masuratorile se efectueaza pe  $\text{CO}_2$  gaz.

### **1. Linearitatea**

In cazul metodei de determinare a rapoartelor izotopice, testul de linearitate se mai numeste si **linearitatea rapoartelor izotopice** pentru un domeniu de intensitati diferite ale curentului de ioni corespunzator masei 44 ( $\text{CO}_2^+$ ). Pentru testul de linearitate s-a inregistrat cum variaza raportul izotopic  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ,  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  pentru diferite valori ale intensitatii curentului principal de la masa 44 (care este proportional cu presiunea probei). S-a masurat intensitatea curentului de ioni la masa 44, pentru diferite valori ale acestuia (diferite presiuni ale probei introduce in spectrometru de masa) si s-a calculat pentru fiecare intensitate valoarea raportului isotopic  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ,  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ . Linearitatea este calculata ca panta a dreptei de regresie obtinute (intensitate vs. raport isotopic) si se exprima in [%/V]. Rapoartele izotopice sunt masurate si

inregistrate pentru semnale ale curentului de ioni de la 2V la 8V in pasi de 1V. Pentru fiecare punct, este facuta corectia de fond. S-au calculate doua valori ale linearitatii, una pentru  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  (45/44) si alta pentru  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  (46/44). Conform cerintelor de functionare ale aparatului, linearitatea trebuie sa fie  $< 0.066$  [%/V]. In urma tesului de linearitate facut, s-au obtinut valorile  $0.065$  [%/V] pentru  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  si  $0.0622$  [%/V] pentru  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ . Datele obtinute si cele doua drepte de regresie sunt prezentate in Anexa 4.

## **2. Limitele de masurare**

### **a) Limita minima de cuantificare**

Limita minima de cuantificare este conditionata de doi factori si anume:

- cantitatea de proba se fie astfel incat sa se realizeze o curgere vascoasa
- precizia interna (1S) sa fie cel putin  $0.02$  ‰ pentru  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  si  $0.04$  ‰ pentru  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$

Cea mai mica cantitate de proba care poate fi analizata este limitata de cerinta de a mentine o curgere vascoasa a probei din rezervorul de proba prin sistemul de introducere si inspre sursa de ioni a aparatului. Daca nu se asigura aceasta conditie, curgerea devine moleculara si se produc fractionari izotopice care schimba valorile rapoartelor izotopice  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ,  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ . Pentru a obtine curgerea vascoasa a gazului, intre rezervorul de proba (burduf reglabil inclus in sistemul de introducere) si sistemul de valve inter-schimbabile in regim automat (prin intermediul softului spectromatrului) se afla un capilar de  $0.1$  mm i.d. si de  $1$  m lungime. In aceste conditii, curgerea este vascoasa daca presiunea gazului  $\text{CO}_2$  in rezervorul de proba nu scade sub  $5-10$  mbar.

Pentru a asigura performanta masuratorii (precizia interna specificata mai sus) este necesara o cantitate de proba  $> 50$  bar  $\mu\text{L}$  pentru  $\text{CO}_2$  gazos.

### **b) Limita maxima de masurare**

Precizia buna se obtine cu presiunea probei in rezervoarele de proba intre  $15$  si  $20$  mbar. Volumul unui rezervor de proba este de  $40$  ml si se poate varia prin intermediul softului aparatului pana la  $3.5$  ml. Conditii ideale de lucru sunt atunci cand pentru  $10$  mbar presiune se obtine un semnal la masa  $44$  de  $1$  V. Aceasta s-a facut introducand  $\text{CO}_2$  in ambele rezervoare (sistemul de introducere este dublu, deci este nevoie de doua rezervoare) la presiunea de  $50$  mbar si ajustand diametrul capilarelor ce leaga cele doua burdufe de valva compusa inter-schimbabila astfel incat

intensitatea curentului de ioni la masa 44 ( $\text{CO}_2^+$ ) sa fie de 5 V. In Anexa 5 este prezentata calibrarea semnalului curentului ionic principal in functie de volumul rezervorului. Inainte de calibrarea semnalului cele doua rezervoare se umplu cu  $\text{CO}_2$  la o presiune de 10-20 mbar fiecare, presiune care asigura un semnal sufficient pentru calibrare. Calibrare este facuta notand intensitatea curentului la masa 44 pentru doua volume ale rezervoarelor: 25% si 75%. Din dreapta de regresie obtinuta se determina panta dreptei, m, care se foloseste pentru determinarea procentului de crestere asteptat pentru semnal.

### **3.Limita minima de detectie**

Limita de detectie pentru  $\text{CO}_2$  de 5 mbar

### **4.Precizia**

Precizia am estimat-o determinand parametrii statistici de performanta ai repetabilitatii si ai repetabilitatii intermediara.

#### **a) Repetabilitatea**

Continutul isotopic al  $^{13}\text{C}$  si  $^{18}\text{O}$  in  $\text{CO}_2$  a fost determinat masurand valorile  $\delta^{13}\text{C}$  si  $\delta^{18}\text{O}$  pentru 50 de probe preparate dupa cum urmeaza:

-pentru estimarea statistica a repetabilitatii pentru  $^{13}\text{C}$  din etanolul din vin s-au preparat 25 probe din MRC BCR-660 care este o solutie de etanol 12% certificate pentru valoarea  $\delta^{13}\text{C}$  (Tabelul 1 si Anexa 1) si s-au analizat 5 zile la rand, in fiecare zi determinand-se valorile  $\delta^{13}\text{C}$  pentru cate 5 probe.

- pentru estimarea statistica a repetabilitatii pentru  $^{18}\text{O}$  din apa din vin s-au preparat 25 probe din vinul primit pentru Testul de intercomparare international organizat de Eurofins, Nantes, Franta (Anexa 6a, 6b) care este un vin dulce alb cu codul 07/2/A si s-au determinat valorile  $\delta^{18}\text{O}$  pentru fiecare proba 5 zile la rand, in fiecare zi efectuandu-se 5 probe.

Rezultatele masuratorilor sunt prezentate in Tabelele 2 si 3, unde parametrii statistici de performanta sunt cei de mai jos:

$S_r$  = deviatia standard a repetabilitatii

$S_{r,x}$  = deviatia standard a mediei sau eroarea standard

r = limita de repetabilitate

$\text{RSD}_r$  = deviatia standard relative a repetabilitatii

CV % = coeficient de variatie

Tabel 2.  $\delta^{13}\text{C}$  din etanolul din proba de vin (BCR-660)

Nr. Crt.	Data masurarii	$\delta^{13}\text{C}_{\text{vs PDB}} (\text{‰})$					$\bar{X}$	$S_r \text{ ‰}$	$r \text{ ‰}$	$\text{RSD}_r$	$\text{CV}_r \text{ ‰}$	$S_{r\bar{x}} \text{ ‰}$
		1	2	3	4	5						
1	04.12.2007	-26.67	-26.87	-26.93	-26.94	-	-26.85	0.1269	0.35	0.0047	0.47	0.063
2	05.12.2007	-	-26.79	-26.81	-	-26.94	-26.85	0.0805	0.22	0.0029	0.29	0.046
3	06.12.2007	-26.76	-	-26.69	-26.81	-26.81	-26.77	0.0554	0.15	0.0020	0.20	0.027
4	07.12.2007	-26.67	-26.67	-26.97	-26.60	-	-26.59	0.1675	0.47	0.0062	0.62	0.083
5	08.12.2007	-26.87	-26.71	-26.72	-26.77	-	-26.77	0.0759	0.21	0.0028	0.28	0.037

Repetabilitate intermediara (media pentru zile diferite):

$$\bar{X}_{\text{intermediar}} = -26.76 \text{ ‰}, S_{r\text{-intermediar}} = 0.0453 \text{ ‰}, r_{\text{intermediar}} = 0.12 \text{ ‰}, \text{RSD}_{r\text{-intermediar}} = 0.0016, \text{CV}_{r\text{-intermediar}} = 0.16 \text{ ‰}, S_{r\bar{x}\text{-intermediar}} = 0.0202$$