



RISOLUZIONE ENO 12/2008

DETERMINAZIONE DELL'ORIGINE DELL'ACIDO L-TARTARICO: VEGETALE O FOSSILE
MEDIANTE MISURAZIONE DELL'ATTIVITÀ DEL ^{14}C

L'ASSEMBLEA GENERALE

Visto l'Articolo 2 paragrafo 2 iv dell'accordo del 3 aprile 2001 che istituisce l'Organizzazione internazionale della vigna e del vino

Su proposta della Sottocommissione dei Metodi di Analisi,

DECIDE di completare l'allegato A della *Raccolta dei metodi internazionali di analisi* con il seguente metodo di tipo IV:

Titolo	Tipo di metodo
Determinazione dell'origine dell'acido L-tartarico: vegetale o fossile mediante misurazione dell'attività del ^{14}C	IV

1 OGGETTO E CAMPO DI APPLICAZIONE

Il metodo permette d'individuare l'origine dell'acido tartarico, vegetale o fossile, e di determinare le rispettive proporzioni delle 2 forme nell'eventualità di una miscela delle due. In quest'ultimo caso, il metodo permette di determinare la presenza di acido L-tartarico (L(+)-tartarico d'origine fossile in quantità inferiori al 10 %.

2 PRINCIPIO

L'acido tartarico di origine vegetale e commercializzato è, nella maggior parte dei casi, un prodotto di origine vinicola. Si tratta dell'idrogenotartrato di potassio presente nella feccia che viene utilizzato e messo in commercio sotto forma di acido L-tartarico. Il tenore di ^{14}C di questo acido è dunque, come l'etanolo dei vini, connesso al tenore di ^{14}C del diossido di carbonio dell'anno di produzione dei vini dai quali è ricavato. Tale attività è relativamente elevata in rapporto alle attività umane.

L'acido tartarico di sintesi, proveniente dai fossili, ha un tenore di ^{14}C molto più basso, se non addirittura trascurabile.

La misurazione dell'attività ^{14}C in dpm/g di carbonio (Disintegrazione per minuto) mediante scintillazione liquida permette quindi di determinare l'origine e un'eventuale miscela delle due forme.

*Esemplare certificato conforme
Verona, il 20 giugno 2008
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale*

Federico CASTELLUCCI



3. REAGENTI E PRODOTTI

3.1 Reagenti

- 3.1.1 liquido scintillante, per es. Instagel Plus
- 3.1.2 soluzione standard toluene ^{14}C la cui attività è certificata da un laboratorio certificato per la taratura, per il calcolo dell'efficienza dell'apparecchiatura e del suo rendimento mediante la definizione della curva di quenching.
- 3.1.3 standard ^{14}C , ^3H e toluene ^{12}C per il rumore di fondo ai fini della calibrazione del contatore a scintillazione
- 3.1.4 nitrometano al 99 %
- 3.1.5 acqua ultrapura ($> 18 \text{ M}\Omega$)
- 3.1.6 soluzione di toluene ^{14}C a 430 dpm/mL circa, ottenuta mediante diluizione nel toluene ^{12}C della soluzione madre standard ^{14}C

3.2 Standard

3.2.1 Definizione della curva di quenching Dopo aver effettuato una calibrazione dello scintillatore con i 3 standard certificati ^{14}C , ^3H e toluene ^{12}C , ottenere la curva di quenching secondo il protocollo seguente.

Preparare una dozzina di flaconi con 10 mL di una soluzione a 500 g/L di acido L-tartarico fossile nell'acqua, aggiungere poi una quantità di standard ^{14}C toluene per ottenere in totale 400-1000 dpm per flacone (se necessario, preparare nel toluene una soluzione intermedia della soluzione standard), aggiungere concentrazioni crescenti di nitrometano, p. es. per 12 provette: 0, 0, 0, 5, 10, 15, 20, 35, 50, 100, 200 e 400 μL poi 10 mL di liquido scintillante. È necessario che vi siano almeno 3 campioni senza nitrometano.

Definire la curva di quenching una volta all'anno analizzando le provette in ordine crescente di tenore di nitrometano.

La curva di quenching permette di determinare l'efficienza o il rendimento medio.

3.2.2 Determinazione del rumore di fondo (bianco di analisi)

A partire dell'acido L-tartarico fossile, ad es. quello utilizzato per il calcolo del rendimento, determinare il rumore di fondo o bianco di analisi. Questa analisi deve essere realizzata immediatamente dopo la curva di quenching e poi all'incirca tutti i mesi.

3.2.3 Definizione della curva di taratura

È necessario verificare la purezza dell'acido L-tartarico fossile e vegetale tramite HPLC prima dell'analisi mediante scintillazione.

*Esemplare certificato conforme
Verona, il 20 giugno 2008
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale*

Federico CASTELLUCCI



Taratura con una miscela di acido tartarico (di cui si conosce con certezza l'origine vegetale) contenente tra 0 % e 100 % di tale forma in associazione con la forma fossile.

Preparazione delle soluzioni a 500 g/L			
	Bianco o rumore di fondo	Standard	Autocontrollo
Pesatura	rispettivamente in matracci tarati da 50 mL		
	25 g di acido L-tartarico fossile	25 g di miscele note di acido L- - tartarico fossile e vegetale	utilizzare il bianco
Dissoluzione	sigillare		
	omogeneizzare bene la miscela mediante agitatore e/o ribaltatore		
Preparazione delle miscele scintillanti			
	In flaconi di plastica aggiungere rispettivamente		
Campione da analizzare a partire dalle soluzioni a 500 g/L	10 mL mediante pipette graduate		
Aggiunta standard	//////////////////// /////	//////////////////// /////	100 µL
Aggiunta di liquido scintillante	10 mL tramite distributore automatico		
	avvitare il tappo e agitare vigorosamente		
	attendere 15 min. e analizzare per 500 min.		

3.3 Autocontrollo

3.3.1 Natura del prodotto utilizzato per l'autocontrollo

Una soluzione di acido L-tartarico fossile a 500 g/L è addizionata di rivelatore con ^{14}C toluene (DPM<100)

La determinazione del rumore di fondo deve essere eseguita insieme alla stessa soluzione di acido L-tartarico fossile.

3.3.2 Tipo d'autocontrollo

La misurazione dell'aggiunta standard permette di verificare che non ci sia interferenza spettrale nell'ambiente esaminato.

3.3.3 Limite di controllo

Il limite di controllo dipende dal materiale utilizzato, e si ritiene accettabile un valore del 5 %.

3.3.4 Frequenza e sequenza della verifica

Una volta al mese, nell'uso corrente, o ad ogni serie di analisi, effettuare un autocontrollo sullo scintillatore. Questo controllo va effettuato inoltre quando si cambia il lotto del liquido o dopo la definizione di una nuova curva di quenching.

3.3.5 Regole di decisione da prendere in funzione dei risultati dell'autocontrollo

Se i risultati oltrepassano i limiti di controllo, dopo verifica del protocollo, procedere a una taratura dello scintillatore e poi ripetere l'autocontrollo.

*Esemplare certificato conforme
Verona, il 20 giugno 2008
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale*

Federico CASTELLUCCI



Se la taratura è corretta ma non la misura del nuovo autocontrollo, ripetere una curva di quenching e un autocontrollo.

4. ATTREZZATURA

4.1 Spettrometro a scintillazione liquida con computer e stampante preliminarmente calibrato e la cui curva di quenching è stata stabilita, per esempio, con nitrometano

4.2 Flaconi poveri di potassio (40K) muniti di tappo a vite, a debole rumore di fondo e identici

4.3 Pipette da 10 mL a 2 tacche

4.4 Buretta a distribuzione automatica con lo stesso passo di vite del flacone di liquido scintillante

4.5 Vetreria da laboratorio

5. CAMPIONI

La purezza dei campioni può essere eventualmente verificata tramite HPLC prima dell'analisi mediante scintillazione.

Preparare una soluzione a 500 g/L di campione da analizzare in acqua ultra pura.

Preparazione delle soluzioni a 500 g/L				
	Bianco o rumore di fondo	Standard	Autocontrollo	Campione
Pesatura	rispettivamente in matracci tarati da 50 mL			
	25 g di acido L - tartarico fossile	25 g di miscele note di acido L-tartarico fossile e vegetale	utilizzare il bianco	25 g
Dissoluzione	sigillare			
	omogeneizzare bene la miscela mediante agitatore e/o ribaltatore			
Preparazione delle miscele scintillanti				
	In flaconi di plastica aggiungere rispettivamente			
Campione da analizzare a partire dalle soluzioni a 500 g/L	10 mL mediante pipette graduate			
Aggiunta standard	//////////////////// ////	//////////////////// ////	100 µL	//////////////////// ////
Aggiunta di liquido scintillante	10 mL tramite distributore automatico			
	avvitare il tappo e agitare vigorosamente			
	attendere 15 min. e analizzare per 500 min.			
<u>Nota</u>	passare un campione allo 0 % d'acido tartarico vegetale, cioè 10 mL di acido tartarico fossile e 10 mL di liquido scintillante, ogni 5-10 campioni analizzati.			
	determinare il rumore di fondo alla fine di ogni serie di analisi			

*Esemplare certificato conforme
Verona, il 20 giugno 2008
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale*

Federico CASTELLUCCI



6. CALCOLO

Le misure sono date direttamente in impulsi al minuto, ma vanno convertite in dpm/g di carbonio.

6.1 Risultati:

Calcolo dell'attività specifica ^{14}C del campione in dpm/g di Carbonio:

$$A = \frac{(X - X') \times 100 \times 3,125_{(1)}}{Rm \times m}$$

A: attività in disintegrazioni/minuti e per grammo di carbonio

X: cpm del campione

X': cpm per l'acido L-tartarico fossile utilizzato per il rumore di fondo

m: massa di acido tartarico nel campione da analizzare di 10 mL della soluzione a 500 g/L, cioè 5 g di acido

Rm: rendimento medio espresso in percentuale

(1) ci sono 3,125 grammi di acido tartarico per un grammo di carbonio (rapporto della massa molare dell'acido (150 g/mol) / massa totale del carbonio (cioè $4 \times 12 = 48$ g/mol))

Il risultato è espresso con un decimale.

6.2 Verifica dei risultati con l'autocontrollo:

È necessario effettuare una verifica comparando il valore ottenuto al § 6.1 al risultato ottenuto col metodo dell'aggiunta standard. Se la differenza è significativa ($> 5\%$), ricalcolare il valore in DPM a partire dal seguente valore in CPM:

$$\text{DPM ricalcolati} = \frac{CPM}{Rm}$$

con il rendimento medio ottenuto a partire dalla curva di quenching.

I 2 risultati non devono discostarsi più del 5 % dal valore medio. In caso contrario, effettuare una nuova analisi del campione raddoppiando la quantità di standard interno. Comparare i 2 risultati ottenuti con gli standard, e se non si discostano più del 5% dalla media dei 2, dare il risultato medio.

Nota: in questo caso significa che il quenching del campione è tale che l'analisi diretta non è utilizzabile.

*Esemplare certificato conforme
Verona, il 20 giugno 2008
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale*

Federico CASTELLUCCI



6.3 Incertezza

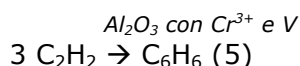
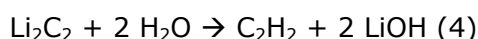
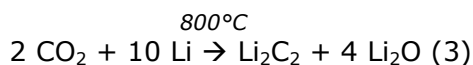
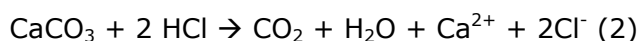
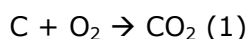
L'incertezza ottenuta in condizioni standard di analisi è di $\pm 0,7$ DPM/g di carbonio.

7. VALIDAZIONE RISPETTO A UN METODO DI RIFERIMENTO

7.1 Principio

L'acido tartarico è trasformato in CO_2 mediante combustione e poi trasformato in benzene;
La misurazione viene quindi compiuta mediante scintillazione liquida.

Dopo aver subito un trattamento preliminare destinato a eliminare le contaminazioni, il CO_2 del campione viene trasformato in benzene secondo la catena di reazioni seguenti:



(1) Campione organico: Il carbonio, con un lavaggio a ossigeno e una fonte di calore (o per combustione in presenza di ossigeno sotto pressione) ottiene il diossido di carbonio dal campione CO_2 .

(2) Campione minerale (carbonati marini o continentali, acque ecc.): Il carbonato viene attaccato con acido cloridrico puro (HCl) per ottenere il diossido di carbonio CO_2 dal campione con acqua e calcio ionizzato.

(3) L'azione del diossido di carbonio CO_2 su del metallo di litio riscaldato da $+600^\circ\text{C}$ a $+800^\circ\text{C}$ ottiene carburo di litio e ossido di litio (Li_2C_2).

(4) L'azione dell'acqua (idrolisi) sul carburo di litio produce acetilene (C_2H_2), idrossido di litio. Bisogna utilizzare acqua non tritiata e senza radon

(5) La trimerizzazione dell'acetilene su catalizzatore a base di alluminio ricoperto da cromo-vanadio a 185°C circa produce il benzene (C_6H_6).

*Esemplare certificato conforme
Verona, il 20 giugno 2008
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale*

Federico CASTELLUCCI



7.2 Procedura:

Il diossido di carbonio (CO_2) ottenuto in seguito a bruciatura, combustione o attacco con acido di un campione, viene conservato in una colonna di stoccaggio. Porre una quantità di litio (litio = catalizzatore che permette una trasformazione chimica) necessaria in una calotta di nickel e mettere il tutto in un reattore / riscaldatore. Si produce il vuoto nel reattore e si riscalda la parte inferiore raffreddando la parte superiore a livello delle pareti, grazie a una tasca di circolazione d'aria.

7.2.1 Carburazione

Dopo circa un'ora di riscaldamento, la temperatura raggiunge 650°C . Si può quindi mettere il CO_2 in presenza del litio fuso. La quantità di litio è sempre in eccesso rispetto alla quantità di carbonio del campione. L'eccesso di litio da utilizzare rispetto alle condizioni **stechiometriche** varia secondo gli autori dal 20% al 100%.

La reazione chimica (carburazione o "cattura") è quasi istantanea, e i primi minuti della cattura sono determinanti nel processo di carburazione.

Questa reazione è **esotermica** (guadagno di 200°C). La carburazione è abbastanza rapida ed è considerata allo stato carburato sin dai primi 20 minuti, ma il riscaldamento rimane permanente per 4-50 minuti in modo da eliminare le tracce di **radon** ("figlio" dell'uranio) che possono eventualmente trovarsi mescolate al diossido di carbonio.

7.2.2 Raffreddamento

Una volta passato il tempo di trattamento (riscaldamento), si lasciano raffreddare i reattori fino ad arrivare a temperatura ambiente ($25-30^\circ\text{C}$).

7.2.3 Idrolisi del carburo di litio

Si introduce acqua nel reattore, in quantità largamente superiore ai bisogni della reazione (1,5 L). La reazione chimica è istantanea e la produzione di **acetilene** avviene contemporaneamente. Anche questa reazione è esotermica (guadagno di temperatura da $+80^\circ\text{C}$ a $+100^\circ\text{C}$).

L'acetilene prodotto viene successivamente riportato allo stato gassoso (sublimazione) per essere captato sul catalizzatore allumina al cromo-vanadio Cr^{3+} . Quest'ultimo viene disidratato per almeno tre ore all'aria e poi due ore sotto vuoto primario mediante riscaldamento a 380°C . La disidratazione è fondamentale per evacuare tutta l'acqua presente sulle biglie del catalizzatore.

7.2.4 Trimerizzazione – Polimerizzazione dell'acetilene in benzene mediante catalisi

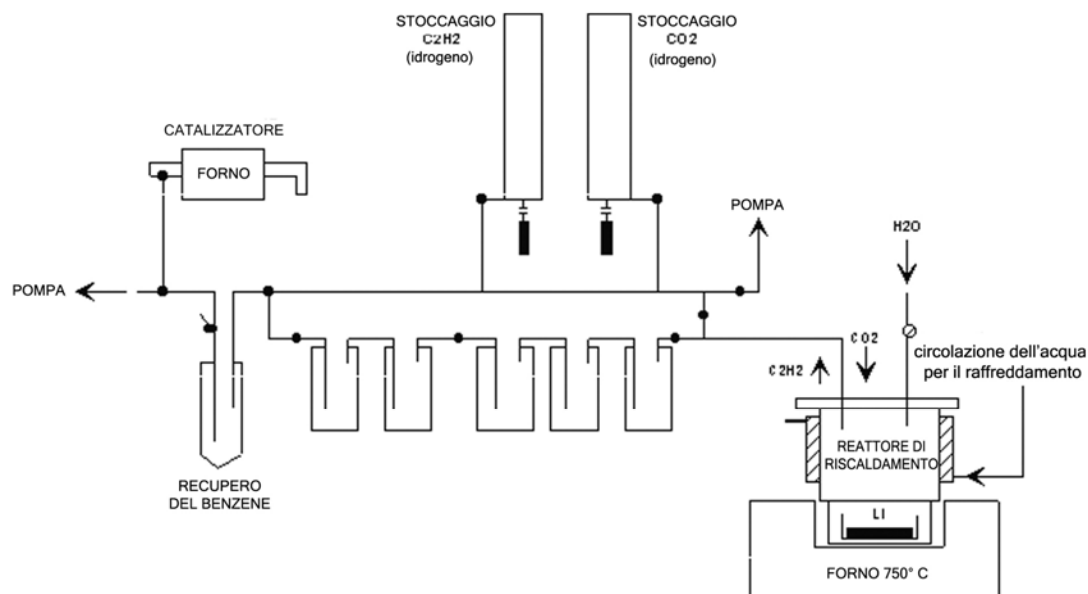
Prima della trimerizzazione, la temperatura del catalizzatore deve essere ricaduta tra $+60$ e $+70^\circ\text{C}$, e dato che anche questa reazione è esotermica, vi sarà auto-mantenimento di tale temperatura. Successivamente il catalizzatore viene nuovamente riscaldato a 180°C per 1h30 e il **benzene** vaporizzato è desorbito per essere intrappolato in un'asta bagnata nell'azoto liquido. Questo dessorbimento avviene sotto vuoto dinamico. Al termine della manipolazione, si lascia riscaldare il benzene cristallizzato fino a temperatura ambiente perché trovi la sua forma liquida prima di essere utilizzato per il conteggio.

*Esemplare certificato conforme
Verona, il 20 giugno 2008*

*Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale*

Federico CASTELLUCCI

7.3 Banco chimico per la sintesi del Benzene



7.4 Soluzione chimica di riferimento per il conteggio

Come riferimento per i conteggi in scintillazione liquida, viene utilizzato un volume predefinito di **4 mL di soluzione**.

Questa soluzione comprende una base ideale di 3,52g di benzene del campione (solvente) + il liquido scintillante (soluto) composto dai 2 scintillanti, uno primario e uno secondario.

Sapendo che la massa specifica del benzene è di 0,88 g/litro, **$0,88 \times 4\text{mL} = 3.52 \text{ g}$** .

*Esemplare certificato conforme
Verona, il 20 giugno 2008
Il Direttore Generale dell'OIV
Secretario dell'Assemblea Generale*

Federico CASTELLUCCI

Liquido Scintillante Primario	Butil-PBD
Composizione chimica	(2-(4-Bifenile)-5-(4-tert-Butil-Fenile)-1,3,4-Ossadiazolo)
Fluorescenza massima in lunghezza d'onda	367 nanometri
Liquido Scintillante Secondario	bis-MSB
Composizione chimica	1,4-Di-(2-Metilstilil)-Benzene
Fluorescenza massima in lunghezza d'onda	415 nanometri
Proprietà ottiche di assorbimento e di emissione dell'accoppiamento dei due scintillanti:	
Lunghezza d'onda dell'assorbimento maxi	409 nanometri
Lunghezza d'onda dell'emissione maxi	412 nanometri

7.5 Correzione delta 13C per il frazionamento Isotopico

La misurazione implica una correzione per il frazionamento isotopico attraverso la procedura di normalizzazione con uno standard ^{13}C PDB **dal valore di - 25 ‰**.

8 . CARATTERISTICHE DEL METODO

8.1 Realizzazione

Per preparare delle soluzioni test di acido tartarico a 500 g/L sono stati utilizzati un campione di acido tartarico di origine vinicola e un campione di acido tartarico di sintesi.

Il tenore di acido tartarico di origine vinicola delle soluzioni test è variato tra l'0% e il 100 %.

L'origine e la purezza dei due campioni di partenza sono state verificate preliminarmente usando il metodo di riferimento.

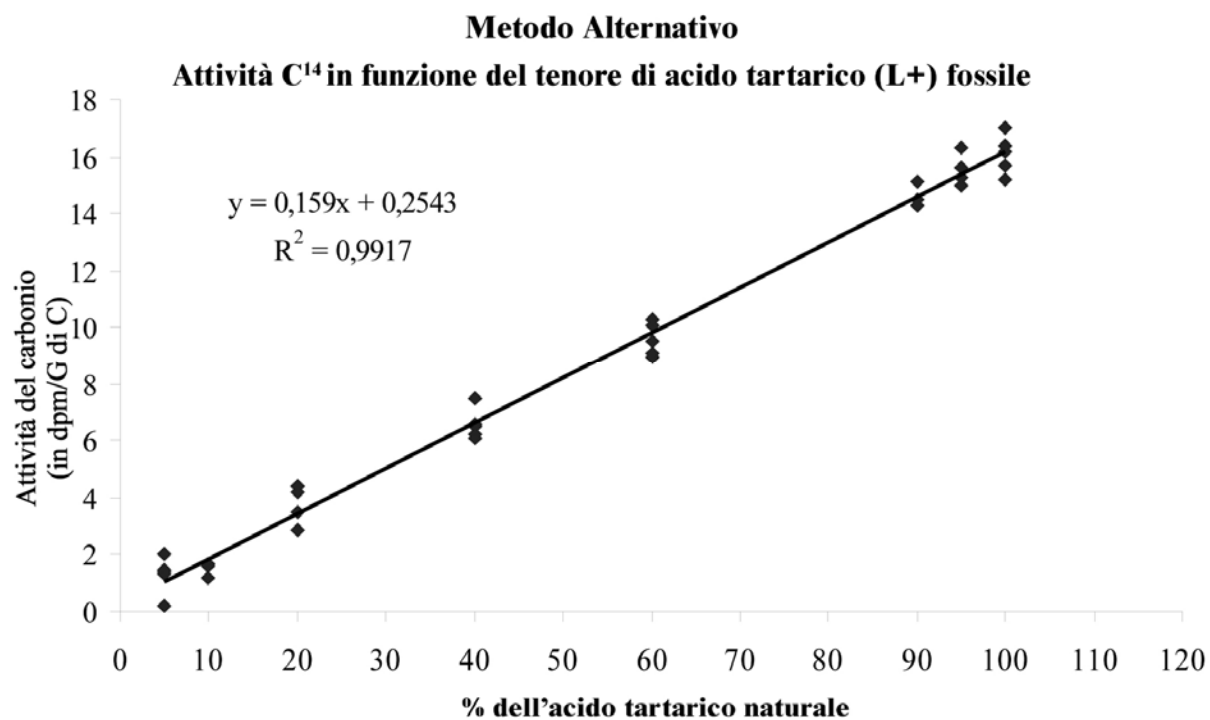
*Esemplare certificato conforme
Verona, il 20 giugno 2008
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale*

Federico CASTELLUCCI

8.2 Risultati:

I risultati sono riportati nella tabella e nella figura seguente:

% DI ACIDO TARTARICO DI ORIGINE VINICOLA		
TENORI REALI	RISULTATI DEL METODO ALTERNATIVO	RISULTATI DEL METODO DI RIFERIMENTO
0	0 e 0	0
10	3,5 e 6,0	12
20	11,4 e 12	22
30	24,6 e 25,4	31
40	34,7 e 38	40
50	41,4 e 50,6	50
60	57,8 e 58,8	63
70	60 e 63,3	70
80	81	81
85	84	86
90	88	91
95	94	96
100	100	100



*Esemplare certificato conforme
Verona, il 20 giugno 2008
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale*

Federico CASTELLUCCI



8.3 Accuratezza, Fedeltà:

L'accuratezza e' del 6,9%

La deviazione standard di ripetibilità del metodo alternativo è di: 2,86 % di acido tartarico vegetale.

9. BIBLIOGRAFIA

Raccolta dei metodi internazionali d'analisi delle bevande alcoliche, degli alcool e della frazione aromatica delle bevande, Ufficio Internazionale della Vigna e del Vino, Edizione ufficiale, giugno 1994, pagg. 201, 204, 210 e 307.

Metodi comunitari di analisi dell'alcol neutro nel settore del vino, Gazzetta ufficiale delle Comunità Europee del 15 maggio 1992, n°L130, p. 13. (Gazzetta ufficiale del 8 aprile 2003, L90, p. 4)

J. GUERAIN e S. TOURLIERE, Radioattività carbonio e tritio negli alcool, «Industries Alimentaires et Agricoles», anno 92, luglio-agosto 1975, N° 7-8.

S. COHEN, B. CRESTO, S. NACHAMPASSAK, T. PAYOT, B. MEDINA, S. CHAUVET, Determinazione dell'origine dell'acido tartarico L(+): naturale o fossile mediante determinazione della sua attività C^{14} - Documento OIV FV 1238, 2006

*Esemplare certificato conforme
Verona, il 20 giugno 2008
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale*

Federico CASTELLUCCI