RÉSOLUTION OENO 12/2008

DETERMINATION DE L'ORIGINE DE L'ACIDE L-TARTRIQUE : VEGETALE OU FOSSILE PAR LA DETERMINATION DE SON ACTIVITE ^{14}C

L'ASSEMBLEE GENERALE

VU l'article 2 paragraphe 2 iv de l'accord du 3 avril 2001 portant création de l'Organisation internationale de la vigne et du vin

SUR PROPOSITION de la Sous-Commission des Méthodes d'Analyse,

DECIDE de compléter l'annexe A du *Recueil International des méthodes d'analyse* par la méthode de type IV suivante:

Titre	Type de la méthode
Détermination de l'origine de l'acide L-tartrique : végétale ou fossile par la détermination de son activité ^{14}C	IV

1. Objet et domaine d'application

La méthode permet d'identifier l'origine de l'acide tartrique, végétale ou fossile et de déterminer les proportions respectives des 2 formes dans l'éventualité d'un mélange des deux. Dans ce dernier cas, la méthode permet de détecter la présence de quantités d'acide L-tartrique (L(+)-tartrique) d'origine fossile inférieures à 10 %.

2. Principe

L'acide tartrique d'origine végétale commercialisé est, dans la majorité des cas, un produit d'origine vinicole. C'est le hydrogénotartrate de potassium présent dans les lies qui est exploité et commercialisé sous forme d'acide L-tartrique. La teneur de cet acide en ^{14}C est donc, comme l'éthanol des vins, liée à la teneur en ^{14}C du dioxyde de carbone de l'année de production des vins dont il est issu. Cette activité est relativement élevée en liaison avec les activités humaines.

L'acide tartrique de synthèse, issu de produits fossiles, a lui une teneur en ^{14}C

Exemplaire certifié conforme Verone, 20 juin 2008
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2008

beaucoup plus basse voire négligeable.

La mesure de l'activité ^{14}C en DPM/g de carbone (Désintégration Par Minute) par scintillation liquide permet donc de déterminer l'origine et un éventuel mélange des deux formes.

3. Réactifs et produits

3.1. Réactifs

3.1.1. Liquide scintillant, par exemple Instagel Plus

3.1.2. Etalon toluène ^{14}C dont l'activité est certifiée par un laboratoire certifié pour l'étalonnage, pour le calcul de l'efficacité de l'appareil et de son rendement par l'établissement de la courbe de quenching.

3.1.3. Standards ^{14}C, ^{3}H et du toluène ^{12}C pour le bruit de fond pour la calibration du compteur à scintillation

3.1.4. Nitrométhane à 99 %

3.1.5. Eau ultrapure (> 18 MΩ)

3.1.6. Solution de toluène ^{14}C à environ 430 DPM/mL obtenue par dilution dans le toluène ^{12}C de la solution mère étalon ^{14}C

3.2. Etalons

3.2.1. Etablissement de la courbe de quenching

Après avoir réalisé une calibration du scintillateur avec les 3 standards certifiés ^{14}C et ^{3}H et du toluène ^{12}C réaliser la courbe de quenching suivant le protocole suivant.

Préparer une douzaine de flacons avec 10 mL d'une solution à 500 g/L d'acide L-tartrique fossile dans l'eau, rajouter ensuite une quantité telle d'étalon ^{14}C toluène pour avoir environ 400-1000 DPM au total par flacon (au besoin faire une solution intermédiaire de la solution étalon dans du toluène), puis ajouter des concentrations croissantes de nitrométhane, par exemple pour 12 tubes : 0, 0, 0, 5, 10, 15, 20, 35, 50, 100, 200 et 400 µL puis 10 mL de liquide scintillant. Il faut qu'il y ait au moins 3 échantillons sans nitrométhane.

Etablir la courbe de quenching une fois par an en analysant les tubes par ordre de teneur croissante en nitrométhane.

Exemplaire certifié conforme Verone, 20 juin 2008
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2008

La courbe de quenching permet alors de déterminer l'efficacité ou le rendement moyen.

3.2.2. Détermination du bruit de fond (blanc de l'analyse)

A partir de l'acide L-tartrique fossile, par exemple celui utilisé pour le calcul du rendement, déterminer le bruit de fond ou blanc de l'analyse. Cette analyse doit être réalisée immédiatement après la courbe de quenching puis environ tous les mois.

3.2.3. Etablissement de la courbe d'étalonnage

Il faut vérifier la pureté des acides L-tartriques fossile et végétal par HPLC avant analyse par scintillation.

Etalonnage avec un mélange d'acide tartrique (dont on connaît de manière certaine l'origine végétale) contenant entre 0% et 100 % de cette forme en association avec la forme fossile.

Préparation des solutions à 500 g/L			
	Blanc ou bruit de fond	Etalons	Autocontrôle
Pesée	respectivement dans des fioles jaugées de 50 mL		
	25 g acide L-tartrique fossile	25 g de mélanges connus d'acide L-tartrique fossile et végétal	utiliser le blanc
Dissolution	boucher		
	bien homogénéiser le mélange par secouage et/ou retournement		
Préparation des mélanges scintillant			
	Dans des flacons en plastique ajouter respectivement		
Prise d'essai à partir des solutions à 500 g/L	10 mL à l'aide de pipettes jaugées		
Ajout dosé	//////////////////////////	//////////////////////////	100 µL
Ajout du liquide e scintillant	10 mL à l'aide d'un distributeur automatique		
	visser le bouchon et secouer fortement		
	attendre 15 min et mettre en analyse pendant 500 min		

Exemplaire certifié conforme Verone, 20 juin 2008
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2008

3.3. Autocontrôle

3.3.1. Nature du produit utilisé pour l'autocontrôle

Une solution d'acide L-tartrique fossile à 500 g/L est dopée avec du ^{14}C toluène (DPM<100)
La détermination du bruit de fond doit être réalisée conjointement avec la même solution d'acide L-tartrique fossile.

3.3.2. Type d'autocontrôle

L'ajout dosé mesuré permet de vérifier qu'il n'y a pas interférence spectrale dans le milieu examiné.

3.3.3. Limite de contrôle

La limite de contrôle dépend du matériel utilisé, une valeur de 5 % est acceptable.

3.3.4. Fréquence et séquence de la vérification

Une fois par mois en utilisation courante, ou à chaque série d'analyse, un autocontrôle est effectué sur le scintillateur. Ce contrôle est également effectué à chaque changement de lot de liquide scintillant ou après établissement d'une nouvelle courbe de quenching.

3.3.5. Règles de décision à prendre en fonction des résultats de l'autocontrôle

Si les résultats sortent des limites de contrôle, après vérification du protocole, procéder à une calibration du scintillateur puis refaire l'autocontrôle.
Si la calibration est correcte mais pas la mesure du nouvel autocontrôle, refaire une courbe de quenching et un autocontrôle.

4. Appareillage

4.1. Spectromètre à scintillation liquide avec ordinateur et imprimante préalablement étalonné et dont la courbe de quenching a été établie, par exemple, avec du nitrométhane

4.2. Flacons pauvres en potassium (40K) munis de bouchons à vis, à faible bruit de fond et identiques

4.3. Pipettes de 10 mL à 2 traits

4.4. Burette à distribution automatique s'adaptant au pas de vis du flacon de liquide

Exemplaire certifié conforme Verone, 20 juin 2008
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2008

scintillant

4.5. Verrerie de laboratoire

5. Echantillons

La pureté des échantillons peut éventuellement être vérifiée par HPLC avant analyse par scintillation.

Faire une solution à 500 g/L d'échantillon à analyser dans de l'eau ultra pure.

Préparation des solutions à 500 g/L				
	Blanc analytique ou bruit de fond	Etalons	Autocontrôle	Echantillon
Pesée	respectivement dans des fioles jaugées de 50 mL			
	25 g acide L-tartrique fossile	25 g de mélanges connus d'acide L-tartrique fossile et végétal	utiliser le blanc	25 g
Dissolution	boucher			
	bien homogénéiser le mélange par secouage et/ou retournement			
Préparation des mélanges scintillants				
	Dans des flacons en plastique ajouter respectivement			
Prise d'essai à partir des solutions à 500 g/L	10 mL à l'aide de pipettes jaugées			
Ajout dosé	//////////////////////	//////////////////////	100 µL	//////////////////////
Ajout du liquide e scintillant	10 mL à l'aide d'un distributeur automatique			
	visser le bouchon et secouer fortement			
	attendre 15 minutes et mettre en analyse pendant 500 minutes			
Remarques	passer un échantillon à 0 % d'acide tartrique végétal, soit 10 mL d'acide tartrique fossile et 10 mL de liquide scintillant, tous les 5 à 10 échantillons analysés.			
	effectuer une détermination du bruit de fond à la fin de chaque série d'analyses			

6. Calculs

Les mesures sont données directement en Coups Par Minutes (CPM), mais il faut les convertir en DPM/g de carbone.

6.1. Résultats

Calcul de l'activité spécifique ^{14}C de l'échantillon en DPM/g de Carbone:

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

Exemplaire certifié conforme Verone, 20 juin 2008
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2008

A : activité en désintégrations/minutes et par gramme de carbone

X : CPM de l'échantillon

X' : CPM pour l'acide L-tartrique fossile utilisé pour le bruit de fond

m : masse d'acide tartrique dans la prise d'essai de 10 mL de la solution à 500 g/L soit 5 g d'acide

Rm : c'est le rendement moyen exprimé en pourcentage

(1) il y a 3,125 grammes d'acide tartrique pour un gramme de carbone (rapport de la masse molaire de l'acide (150 g/mol) sur la masse totale du carbone (soit 4 x 12 = 48 g/mol)

Le résultat est donné avec une décimale.

6.2. Vérification des résultats avec l'autocontrôle

Il faut vérifier en comparant la valeur obtenue au § 6.1 avec le résultat donné par la méthode de l'ajout dosé. Si la différence est importante (> 5 %), dans ce cas recalculer la valeur en DPM à partir de la valeur en CPM suivant :

$$DPM\ recalculées = \frac{CPM}{Rm}$$

avec le rendement moyen obtenu à partir de la courbe de quenching.

Les 2 résultats ne doivent pas différer de plus de 5 % de la valeur moyenne. Sinon, refaire une analyse de l'échantillon en doublant la quantité d'étalon interne. Comparer les 2 résultats obtenus avec les étalons, s'ils ne diffèrent pas de plus de 5 % autour de la moyenne des 2, donner le résultat moyen.

Remarque : dans ce cas cela signifie que le quenching de l'échantillon est tel que l'analyse directe n'est pas exploitable.

6.3. Incertitude

L'incertitude obtenue dans des conditions standards d'analyse est de ± 0,7 DPM/g de carbone.

7. Validation par rapport à une méthode de référence

7.1. Principe

L'acide tartrique est transformé en CO_2 par combustion puis transformé en benzène ;

Exemplaire certifié conforme Verone, 20 juin 2008
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2008

La mesure est alors effectué en scintillation liquide.

Après avoir subi un prétraitement destiné à éliminer les contaminations, le CO_2 de l'échantillon est transformé en benzène selon la chaîne de réactions suivantes:

$C + O_2 \rightarrow CO_2$ (1)

$CaCO_3 + 2\ HCl \rightarrow CO_2 + H_2O + Ca^{2+} + 2Cl^-$ (2)

800°C

$2\ CO_2 + 10\ Li \rightarrow Li_2C_2 + 4\ Li_2O$ (3)

$Li_2C_2 + 2\ H_2O \rightarrow C_2H_2 + 2\ LiOH$ (4)

Al_2O_3 avec Cr^{3+} et V

$3\ C_2H_2 \rightarrow C_6H_6$ (5)

(1) Echantillon organique: Le carbone, avec un balayage d'oxygène et une source de chaleur (ou par combustion en présence d'oxygène sous pression) donne le dioxyde de carbone de l'échantillon CO_2.

(2) Echantillon minéral (carbonates marins ou continentaux, eaux, etc) : Le carbonate est attaqué par de l'acide chlorydrique pur (HCl) pour donner le dioxyde de carbone CO_2 de l'échantillon avec de l'eau et du calcium ionisé.

(3) L'action du dioxyde de carbone CO_2 sur du lithium métal chauffé entre +600°C et +800°C donne du carbure de lithium et de l'oxyde de lithium (Li_2O).

(4) L'action de l'eau (hydrolyse) sur le carbure de lithium donne de l'acétylène (C_2H_2), de l'hydroxyde de lithium, . Il faut utiliser de l'eau non tritiée et sans radon.

(5) La trimérisation de l'acétylène sur catalyseur à base d'alumine recouvert de chrome-vanadium à 185°C environ donne le benzène (C_6H_6).

7.2. Mode Opératoire

Le dioxyde de carbone (CO_2) obtenu soit après brûlage, combustion ou attaque acide d'un échantillon, est conservé dans une colonne de stockage. On place une quantité de lithium (lithium = catalyseur permettant une transformation chimique) nécessaire dans une coupelle en nickel et on place le tout au fond d'un réacteur de chauffe. On fait le vide dans ce réacteur et on chauffe sa partie inférieure tout en refroidissant sa partie supérieure au niveau des parois grâce à une poche de circulation d'eau.

7.2.1. Carburation.

Après une heure de chauffe environ, la température atteint 650 °C. On peut alors

Exemplaire certifié conforme Verone, 20 juin 2008
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2008

mettre le CO_2 en présence du lithium fondu. La quantité de lithium est toujours en excès par rapport à la quantité de carbone de l'échantillon. L'excès de lithium à utiliser par rapport aux conditions **stoechiométriques** varie selon les auteurs de 20% à 100%.

La réaction chimique (carburation ou "capture") est quasi instantanée et ce sont les premières minutes de la capture qui sont déterminantes dans le processus de carburation.

Cette réaction est **exothermique** (un gain de 200 °C). La carburation est assez rapide et elle est considérée à l'état carburé dès les premières 20 minutes, mais le chauffage reste permanent durant 45 à 50 minutes de façon à éliminer les traces de **radon** (fils de l'uranium) qui peuvent éventuellement se trouver mêlées au dioxyde de carbone.

7.2.2. Refroidissement.

Une fois le temps de traitement (chauffage) terminé, on laisse les réacteurs refroidir jusqu'à obtenir une température ambiante (25-30 °C).

7.2.3. Hydrolyse du Carbure de Lithium.

On introduit de l'eau dans le réacteur, en quantité largement supérieure aux besoins de la réaction (1,5 L). La réaction chimique est instantanée et le dégagement de **l'acétylène** se produit dans le même temps. Cette réaction est également exothermique (gain en température de +80°C à +100°C).

L'acétylène produit est ensuite ramené à l'état gazeux (sublimation) pour être capté sur le catalyseur alumine au vanadium-chrome Cr^{3+}. Celui-ci est préalablement déshydraté pendant trois heures minimum à l'air puis ensuite deux heures sous vide primaire avec un chauffage à +380 °C. La déshydratation est capitale pour évacuer toute l'eau résidente sur les billes du catalyseur.

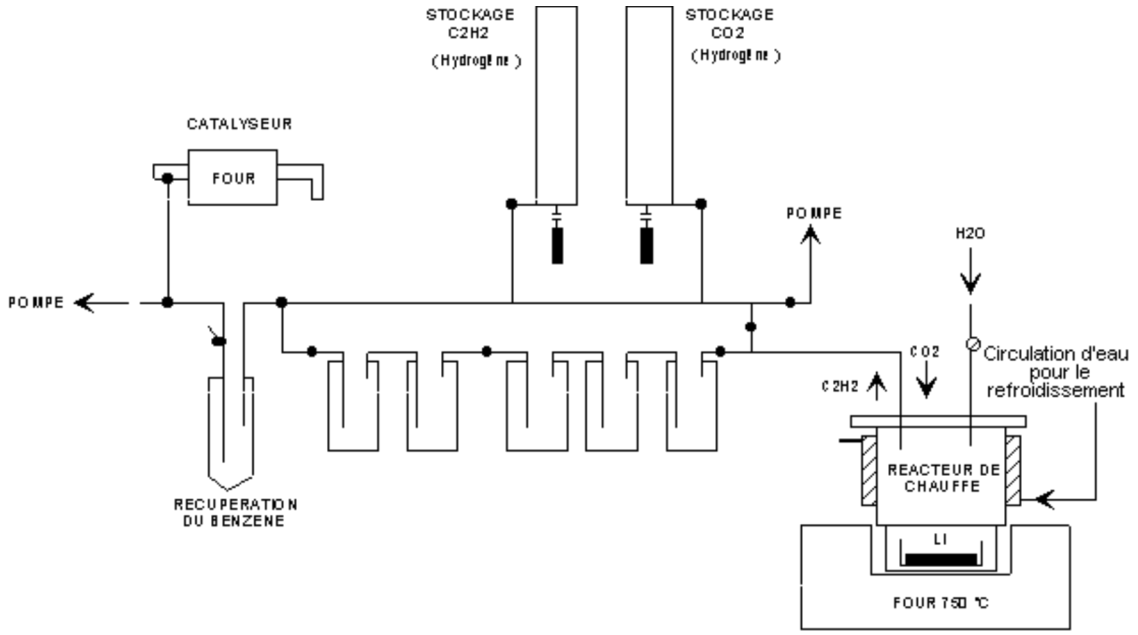
7.2.4. Trimérisation - Polymérisation de l'acétylène en benzène par catalyse.

Avant la trimérisation, la température du catalyseur doit être retombée entre +60 et +70 °C, cette réaction étant exothermique également, il y aura auto-entretien de cette température. Puis le catalyseur est à nouveau chauffé à +180 °C pendant 1h30 et **le benzène** vaporisé est désorbé pour être piégé dans un doigt entouré d'azote liquide. Cette désorbtion se déroule sous vide dynamique. A la fin de la manipulation, on laisse le benzène cristallisé se réchauffer jusqu'à température ambiante pour qu'il trouve sa forme liquide avant d'être utilisé pour le comptage.

7.3. Banc de chimie pour la synthèse du Benzène

Exemplaire certifié conforme Verone, 20 juin 2008
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2008



7.4. Solution chimique de référence pour le comptage.

On utilise comme référence pour les comptages en scintillation liquide, un volume établi à **4 mL de solution**.

Cette solution comprend une base idéale de 3,52g de benzène de l'échantillon (solvant) + le liquide scintillant (soluté) composé de 2 scintillants, un primaire et un secondaire.

Sachant que la masse volumique du benzène est 0.88 g/litre, donc **0,88 x 4mL = 3,52 g**.

Liquide Scintillant Primaire	**Butyl-PBD**
Composition chimique	(2-(4-Biphénylyl)-5-(4-tertbutyl-phényl)-1,3,4-oxadiazole)
Fluorescence maximale en longueur d'onde	367 nanomètres

Exemplaire certifié conforme Verone, 20 juin 2008
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2008

Liquide Scintillant Secondaire	**bis-MSB**
Composition chimique	1,4-Di-(2-Méthylstyryl)-Benzène
Fluorescence maximale en longueur d'onde	415 nanomètres
Propriétés optiques d'absorption et d'émission du couplage des deux scintillants :	
Longueur d'onde de l'absorption maxi	409 nanomètres
Longueur d'onde de l'émission maxi	412 nanomètres

7.5. Correction delta 13C pour le fractionnement Isotopique.

La mesure implique une correction pour le fractionnement isotopique au travers de la procédure de normalisation avec un standard ^{13}C PDB **d'une valeur de - 25 o/oo**.

8. CARACTERISTIQUES DE LA METHODE

8.1. Mise en oeuvre

Un échantillon d'acide tartrique d'origine vinicole et un échantillon d'acide tartrique de synthèse ont été utilisés pour préparer des solutions tests d'acide tartrique à 500 g/L.

Les teneurs en acide tartrique d'origine vinicole des solutions tests variaient entre 0% et 100%.

L'origine et la pureté des deux échantillons de départ ont été préalablement vérifiées à l'aide de la méthode de référence.

8.2. Résultats:

Les résultats sont donnés dans le tableau et la figure suivant :

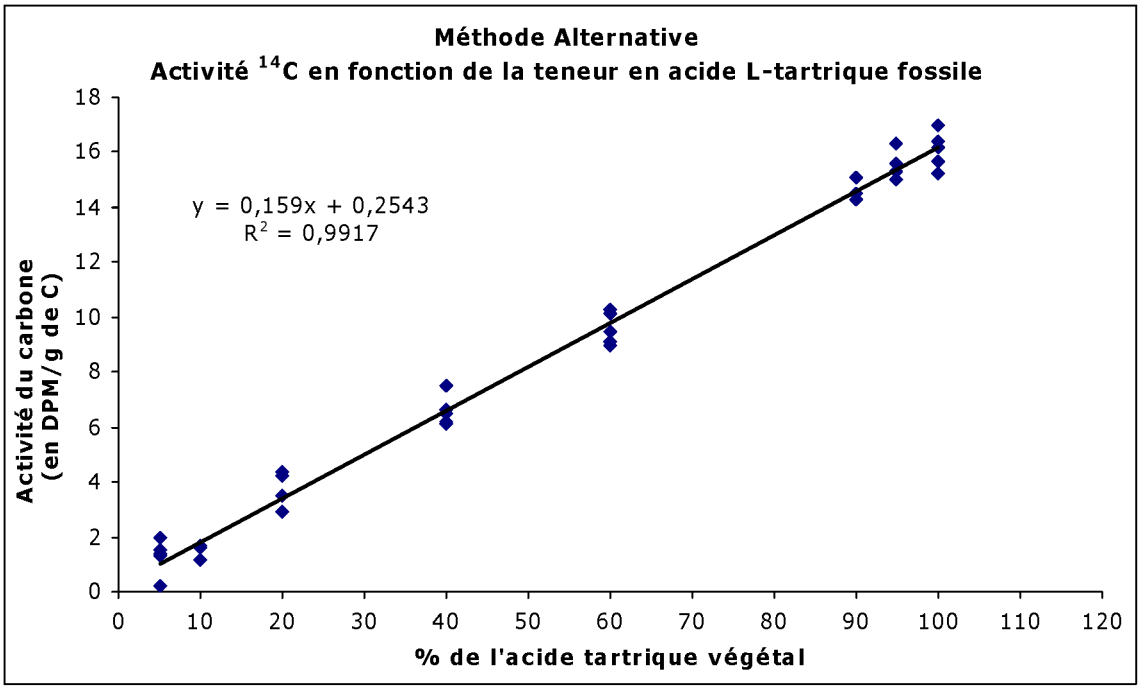
Exemplaire certifié conforme Verone, 20 juin 2008
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2008

% D'ACIDE TARTRIQUE D'ORIGINE VINICOLE		
TENEURS REELLES	RESULTATS DE LA METHODE ALTERNATIVE	RESULTATS DE LA METHODE DE REFERENCE
0	0 et 0	0
10	3,5 et 6,0	12
20	11,4 et 12	22
30	24,6 et 25,4	31
40	34,7 et 38	40
50	41,4 et 50,6	50
60	57,8 et 58,8	63
70	60 et 63,3	70
80	81	81
85	84	86
90	88	91
95	94	96
100	100	100

Exemplaire certifié conforme Verone, 20 juin 2008
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2008



8.3. Justesse, Fidélité

La justesse est de 6,9%

L'écart type de répétabilité de la méthode alternative est de : 2,86 % d'acide tartrique végétal.

9. Bibliographie

1. Recueil des méthodes internationales d'analyse des boissons spiritueuses, des alcools et de la fraction aromatiques des boissons, Office Internationale de la Vigne et du Vin, Edition officielle, juin 1994, page 201, 204, 210 et 307.
2. Méthodes d'analyses communautaires de l'alcool neutre applicables dans le secteur du vin, règlement C.E.E n°625/2003, 2 avril 2003, Journal Officiel des communautés européennes du 15 mai 1992, n°L130, p18. (Journal officiel du 8 avril 2003, N° L90, p4.)
3. J. GUERAIN et S. TOURLIERE , Radioactivité carbone et tritium dans les alcools, Industries Alimentaires et Agricoles – 92e année juillet - août 1975, N° 7-8

Exemplaire certifié conforme Verone, 20 juin 2008
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2008

4. S. COHEN, B. CRESTO, S. NACHAMPASSAK, T. PAYOT, B. MEDINA, S. CHAUVET, Détermination de l'origine de l'acide tartrique L(+): naturelle ou fossile par la détermination de son activité C^{14} - Document OIV FV 1238, 2006

Exemplaire certifié conforme Verone, 20 juin 2008
Le Directeur Général de l'OIV
Secrétaire de l'Assemblée Générale
Frederico CASTELLUCCI

© OIV 2008