RISOLUZIONE OIV-OENO 662H-2022

METODO PER LA DETERMINAZIONE DEL RAPPORTO ISOTOPICO $^{18}O/^{16}O$ DELL'ACQUA NEL SUCCO D'UVA

Metodi di Tipo IV

L'ASSEMBLEA GENERALE,

VISTO l'articolo 2, paragrafo iv, dell'Accordo del 3 aprile 2001 che istituisce l'Organizzazione internazionale della vigna e del vino,

SU PROPOSTA della Sottocommissione "Metodi di analisi",

CONSIDERATO che per il succo d'uva è possibile eseguire la determinazione sulla base del metodo OIV-MA-AS2-12 della *Raccolta dei metodi internazionali di analisi dei vini e dei mosti*, con una modifica aggiunta ai punti:

DECIDE di aggiungere il metodo seguente:

METODO PER LA DETERMINAZIONE DEL RAPPORTO ISOTOPICO $^{18}O/^{16}O$ DELL'ACQUA NEL SUCCO D'UVA

1. Campo d'applicazione

Il metodo permette la determinazione del rapporto isotopico $^{18}O/^{16}O$ dell'acqua nel succo d'uva dopo il raggiungimento dell'equilibrio con CO_2, utilizzando la spettrometria di massa isotopica.

2. Definizioni

Per identificare l'acqua aggiunta al succo d'uva si utilizza il rapporto isotopico dell'ossigeno $^{18}O/^{16}O$.

3. Principio

Il metodo si basa sull'equilibrio tra il CO_2 e l'acqua nel succo d'uva, secondo la seguente reazione di scambio isotopico:

Esemplare certificato conforme Ensenada, 4 novembre 2022
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale
Pau ROCA

© OIV 2022

$C^{16}O_2 + H_2{}^{18}O \square C^{16}O^{18}O + H_2{}^{16}O$

Dopo il raggiungimento dell'equilibrio, si utilizza il biossido di carbonio della fase gassosa per l'analisi mediante spettrometria di massa isotopica (IRMS) per determinare il rapporto isotopico $^{18}O/^{16}O$ nel CO_2 risultante dall'equilibrio.

4. Reagenti e prodotti

I prodotti e i materiali di consumo dipendono dal metodo usato. I sistemi generalmente impiegati si basano sull'equilibrio dell'acqua nel succo d'uva con CO_2.

Si possono usare i seguenti materiali di riferimento, standard di lavoro e materiali di consumo:

4.1. Materiali di riferimento

Nome	Fornito da	$\square^{18}O$ rispetto a V-SMOW
VSMOW2	NIST/IAEA	0 ‰
GISP	NIST	-24,78 ‰
SLAP	NIST/IAEA	-55,5 ‰

4.2. Standard di lavoro

4.2.1. Biossido di carbonio usato per il raggiungimento dell'equilibrio (nel caso di cilindri con sistemi a flusso continuo contenenti gas, può ugualmente essere usata una miscela di elio-biossido di carbonio).

4.2.2. Standard di lavoro con valori calibrati di $\square^{18}O_{V\text{-}SMOW}$ in rapporto ai materiali di riferimento internazionali.

4.3. Materiali di consumo

Elio per analisi [N. CAS 07440-59-7]

Biossido di carbonio per analisi, usato come gas di riferimento [N. CAS 00124-38-9]

Esemplare certificato conforme Ensenada, 4 novembre 2022
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale
Pau ROCA

© OIV 2022

5. Strumentazione

Strumentazione e interfacce dipendono dal metodo e possono essere utilizzate come indicato di seguito.

5.1. Spettrometro di massa isotopica (IRMS)

Spettrometro di massa isotopica (IRMS) in grado di determinare il contenuto relativo di ^{18}O del gas CO_2 presente naturalmente con una precisione interna dello 0,05‰ o meglio espresso come valore relativo. Lo spettrometro di massa usato per la determinazione del rapporto isotopico è generalmente dotato di un collettore triplo per misurare contemporaneamente le intensità per m/z = 44, 45 e 46.

5.2. Attrezzatura e materiali

L'attrezzatura e i materiali utilizzati devono soddisfare le esigenze del metodo/dallo strumento usato (secondo quanto indicato dal fabbricante). Tutte le attrezzature e i materiali possono tuttavia essere sostituiti con prodotti dalle prestazioni identiche.

5.2.1. Vial con setti adatti al sistema utilizzato

5.2.2. Pipette volumetriche con puntali appropriati

5.2.3. Sistema a controllo termico per eseguire la messa in equilibrio a temperatura costante, tipicamente entro ±1 °C

5.2.4. Pompa a vuoto (se richiesta dal sistema usato)

5.2.5. Campionatore automatico (se richiesto dal sistema usato)

5.2.6. Siringhe per campionatura (se richieste dal sistema usato)

5.2.7. Colonna GC per separare il CO_2 dagli altri gas elementari (se richiesta dal sistema usato)

5.2.8. Dispositivo di estrazione dell'acqua (ad es. membrana permeabile selettiva)

6. Preparazione dei campioni

I campioni di succo, come anche i materiali di riferimento, vengono usati per l'analisi senza che siano sottoposti ad alcun pre-trattamento. Per evitare che fermentino,

Esemplare certificato conforme Ensenada, 4 novembre 2022
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale
Pau ROCA

© OIV 2022

aggiungere acido benzoico (o un altro inibitore della fermentazione) o filtrare attraverso una membrana con pori del diametro di 0,22 µm.

7. Procedimento

Le descrizioni che seguono si riferiscono a procedure generalmente usate per la determinazione dei rapporti isotopici $^{18}O/^{16}O$ tramite messa in equilibrio dell'acqua con uno standard di lavoro di CO_2 e la successiva misurazione con IRMS. Tali procedure possono essere modificate in funzione dei cambiamenti delle attrezzature e degli strumenti forniti dai fabbricanti, dal momento che sono disponibili diversi tipi di sistemi di messa in equilibrio, che implicano varie condizioni di operazione. Due principali procedure tecniche possono essere usate per l'introduzione di CO_2 nell'IRMS, con un sistema a doppia immissione o usando un sistema a flussi continui. I sistemi tecnici e le condizioni operative corrispondenti vengono forniti a titolo esemplificativo.

Nota: Tutti i valori forniti per volume, temperature, pressioni e periodi di tempo sono esclusivamente indicativi. I valori appropriati devono essere ottenuti dalle specifiche fornite dal fabbricante e/o determinati sperimentalmente.

7.1. Messa in equilibrio manuale

Si trasferisce con una pipetta un volume definito del campione/standard in un matraccio. Il matraccio viene quindi saldamente attaccato al collettore.

Ogni collettore è raffreddato a una temperatura inferiore a -80 °C per congelare i campioni (i collettori provvisti di tubi capillari non richiedono questa fase di congelamento). Successivamente si fa il vuoto nell'intero sistema. Dopo il raggiungimento di un vuoto stabile, si lascia che il CO_2 gassoso che funge da standard di lavoro si distribuisca nei vari matracci. Per il processo di messa in equilibrio, ciascun collettore è posto a bagnomaria a temperatura controllata, tipicamente a 25 °C (± 1 °C) per 12 ore (per una notte). È di fondamentale importanza che la temperatura del bagnomaria sia mantenuta costante e omogenea. Una volta ultimato il processo di messa in equilibrio, il CO_2 risultante è trasferito dai matracci al lato campione del sistema a doppio ingresso. Le misurazioni sono eseguite confrontando più volte i rapporti del CO_2 contenuto nel lato campione e nel lato standard (gas standard di riferimento: CO_2) del sistema a doppio ingresso. Tale processo viene ripetuto fino alla misurazione dell'ultimo campione della sequenza.

Esemplare certificato conforme Ensenada, 4 novembre 2022
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale
Pau ROCA

© OIV 2022

7.2. Uso di un apparato di messa in equilibrio automatico

Si trasferisce con una pipetta un volume definito del campione/standard in un vial. I vial di campione vengono attaccati al sistema di messa in equilibrio e raffreddati fino a una temperatura inferiore a -80 °C per congelare i campioni (i sistemi provvisti di tubi capillari non richiedono questa fase di congelamento). Successivamente viene fatto il vuoto nell'intero sistema.

Una volta raggiunto un vuoto stabile, il CO_2 gassoso che funge da standard di si distribuisce nei vial. L'equilibrio è generalmente raggiunto a una temperatura di 22 ± 1 °C dopo un periodo minimo di 5 ore e con moderata agitazione (se disponibile). Poiché la durata della messa in equilibrio dipende da vari parametri (per es.: la geometria del vial, la temperatura, l'agitazione applicata...), il tempo minimo di equilibrio deve essere determinato sperimentalmente.

Una volta ultimato il processo di messa in equilibrio, il CO_2 risultante è trasferito dai vial al lato campione del sistema a doppio ingresso. Le misurazioni sono eseguite confrontando più volte i rapporti del CO_2 contenuto nel lato campione e nel lato standard (gas standard di riferimento: CO_2) del sistema a doppio ingresso. Tale processo viene ripetuto fino alla misurazione dell'ultimo campione della sequenza.

7.3. Preparazione manuale e messa in equilibrio automatica e manuale, analisi mediante un sistema IRMS a doppio ingresso

Si trasferisce con una pipetta un volume definito del campione/standard (ad esempio 200 µL) in un vial. I vial aperti sono quindi posti in una camera chiusa riempita di CO_2 usato per la messa in equilibrio (4.2.1). Dopo diverse depurazioni per eliminare ogni traccia d'aria, i vial sono chiusi e messi sulla piastra termostatata dell'autocampionatore. L'equilibrio è raggiunto dopo almeno 8 ore a 40 °C. Una volta completato il processo di messa in equilibrio, il CO_2 ottenuto è asciugato e trasferito nel lato campione del sistema a doppio ingresso. Le misurazioni sono effettuate confrontando più volte i rapporti del CO_2 contenuto nel lato campione e nel lato standard (gas standard di riferimento: CO_2) del sistema a doppio ingresso. Tale processo viene ripetuto fino alla misurazione dell'ultimo campione della sequenza.

7.4. Uso di un apparato automatico di messa in equilibrio accoppiato a un sistema a flusso continuo

Si trasferisce con una pipetta un volume definito del campione/standard in un vial. I vial contenenti il campione sono posti in un vassoio termostatato.

Esemplare certificato conforme Ensenada, 4 novembre 2022
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale
Pau ROCA

© OIV 2022

I vial vengono lavati con una miscela di He e CO_2 usando una siringa a gas. Il CO_2 rimane nello spazio di testa dei vial per la messa in equilibrio.

La temperatura e il tempo per il raggiungimento dell'equilibrio devono essere ottenuti dalle specifiche fornite dal fabbricante e/o determinati sperimentalmente. L'equilibrio generalmente è raggiunto a una temperatura di 25 ± 1 °C, dopo un periodo minimo di 18 ore.

Una volta ultimato il processo di messa in equilibrio, il CO_2 risultante è trasferito tramite il sistema di flusso continuo nella sorgente ionica dello spettrometro di massa. Anche il gas di riferimento CO_2 è introdotto nell'IRMS per mezzo del sistema a flusso continuo. La misurazione è eseguita sulla base di un protocollo specifico per ciascun tipo di attrezzatura.

8. Calcoli

Le intensità per m/z = 44, 45, 46 sono registrate per ciascun campione e materiale di riferimento analizzati. I rapporti isotopici $^{18}O/^{16}O$ sono quindi calcolati dal computer e dal software dello strumento IRMS. In pratica i rapporti isotopici $^{18}O/^{16}O$ sono misurati rispetto a uno standard di lavoro precedentemente calibrato rispetto al V-SMOW. Durante le misurazioni in linea si possono verificare piccole variazioni dovute a cambiamenti delle condizioni strumentali. In tal caso, il $\delta^{18}O$ dei campioni deve essere corretto in base alla differenza tra il valore $\delta^{18}O$ dello standard di lavoro e il suo valore assegnato, precedentemente calibrato rispetto al V-SMOW. Tra due misurazioni dello standard di lavoro, la variazione è la correzione apportata ai risultati dei campioni che si considerano lineari. Lo standard di lavoro deve essere infatti misurato all'inizio e alla fine di tutte le serie di campioni. Si può pertanto calcolare una correzione per ciascun campione utilizzando un'interpolazione lineare tra due valori (la differenza tra il valore assegnato dello standard di lavoro e le misurazioni dei valori ottenuti).

$$\delta^{18}O_{V-SMOW} = \left[\frac{\left(\frac{^{18}O}{^{16}O}\right)_{sample} - \left(\frac{^{18}O}{^{16}O}\right)_{V-SMOW}}{\left(\frac{^{18}O}{^{16}O}\right)_{V-SMOW}}\right] \times 1000[\%]$$

Il valore $\delta^{18}O$ normalizzato rispetto alla scala V-SMOW/SLAP è calcolato usando la seguente equazione:

Esemplare certificato conforme Ensenada, 4 novembre 2022
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale
Pau ROCA

© OIV 2022

$$\delta^{18}O_{V-SMOW/SLAP} = \left[\frac{\delta^{18}O_{échantillon} - \delta^{18}O_{V-SMOW}}{\delta^{18}O_{V-SMOW} - \delta^{18}O_{SLAP}}\right] \times 55{,}5[\%]$$

9. Caratteristiche del metod

È stato condotto uno studio di validazione allo scopo di valutare l'idoneità del metodo per le matrici in questione, prendendo in considerazione la linearità, i limiti di rivelabilità e quantificazione e l'accuratezza del metodo. L'ultimo parametro è stato determinato definendo i livelli di precisione ed esattezza del metodo.

9.1. Precisione del metodo

I parametri presi in considerazione sono stati la ripetibilità e la riproducibilità intralaboratorio, i cui valori sono riportati nella tabella 1. La ripetibilità è stata espressa come ‰ delle misure ripetute nelle stesse condizioni e lo stesso giorno per tutto il succo d'uva. La riproducibilità è stata espressa come la media del ‰ delle misurazioni dello stesso campione di succo d'uva, svolte da due operatori.

9.2. Esattezza del metodo

La percentuale del recupero è stata determinata utilizzando un campione di succo d'uva arricchito con 6 concentrazioni di acqua del rubinetto, in un intervallo compreso tra il 20% e il 99,5%. Ogni concentrazione è stata analizzata 5 volte. L'esattezza del metodo è stata anche espressa in termini di scostamento mediante il materiale di riferimento e mediante il calcolo dell'errore relativo.

Tabella 1. Caratteristiche del metodo

	Coefficiente di correlazione (r^2)	Ripetibilità (n=16) ‰	Riproducibilità (n=7) ‰	Recupero (%) ± SD	Esattezza (MR) (‰)
	0,998	0,20	0,29	101 ± 2,16	0,17

10. Bibliografia

Esemplare certificato conforme Ensenada, 4 novembre 2022
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale
Pau ROCA

© OIV 2022

1. Metodo per la determinazione del rapporto isotopico $^{18}O/^{16}O$ dell'acqua nel vino e nel mosto dell'OIV. Metodo OIV-MA-AS2-12.

Esemplare certificato conforme Ensenada, 4 novembre 2022
Il Direttore Generale dell'OIV
Segretario dell'Assemblea Generale
Pau ROCA

© OIV 2022