

II

(Komunikaty)

KOMUNIKATY INSTYTUCJI, ORGANÓW I JEDNOSTEK ORGANIZACYJNYCH
UNII EUROPEJSKIEJ

KOMISJI EUROPEJSKIEJ

Wykaz i opis metod analizy, o których mowa w art. 120g akapit pierwszy rozporządzenia Rady (WE) nr 1234/2007 ⁽¹⁾

(opublikowane zgodnie z art. 15 ust. 2 rozporządzenia Komisji (WE) nr 606/2009 z dnia 10 lipca 2009 r. ⁽²⁾)

(2010/C 43/01)

W poniższej tabeli znajduje się wykaz metod analizy służącej kontroli limitów i wymogów ustanowionych prawem wspólnotowym dla produkcji wina. W odniesieniu do każdego parametru, w kolumnie trzeciej znajduje się odwołanie do odpowiedniej metody analizy opisanej w najnowszym wydaniu (z 2009 r.) *Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins* (kompedium międzynarodowych metod analizy win) Międzynarodowej Organizacji ds. Winorośli i Wina (OIV), dostępnym z dniem jego publikacji. Dla każdego parametru opisano jedynie metody referencyjne („typu I” lub „typu II” w klasyfikacji OIV), z wyjątkiem tych, dla których obecnie nie ma zatwierdzonej metody I lub II. Opis metod znajduje się w załączniku do niniejszego komunikatu.

Uwaga:

Kompedium OIV definiuje w załączniku A sekcja I różne rodzaje metod analizy, w szczególności typ I (metoda referencyjna kryterium), typ II (metoda referencyjna) i typ IV (metoda tymczasowa).

Metody analizy pod kątem ołowiu i kadmu są obecnie opisane w rozporządzeniu Komisji (WE) nr 333/2007 z dnia 28 marca 2007 r. (w załączniku C.3.) ⁽³⁾. Ponadto w załączniku II pkt. 4 do rozporządzenia (WE) nr 401/2006 z dnia 23 lutego 2006 r. ⁽⁴⁾ określono ogólne kryteria dla metod analizy dla ochratoksyny A; nie ma zatem potrzeby opisywania w odniesieniu do tej substancji specjalnej metody analizy dla produktów winiarskich.

WYKAZ METOD ANALIZY

| Nr | Parametr | Metoda w kompedium OIV | Typ |
|----|--|------------------------|-----|
| 1 | Gęstość i ciężar właściwy | AS-2-01-MASVOL | I |
| 2 | Współczynnik refraktometryczny | AS-2-02-SUCREF | I |
| 3 | Całkowity suchy ekstrakt | AS-2-03-EXTSEC | I |
| 4 | Stosunek izotopowy $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ zawartości wody w winie | AS-2-09-MOUO18 | II |

⁽¹⁾ Dz.U. L 299 z 16.11.2007.

⁽²⁾ Dz.U. L 193 z 24.7.2009, s. 1.

⁽³⁾ Dz.U. L 88 z 29.3.2007, s. 29.

⁽⁴⁾ Dz.U. L 70 z 9.3.2006, s. 12.

| Nr | Parametr | Metoda w kompendium OIV | Typ |
|----|--|----------------------------------|-----|
| 5 | Wskaźnik Folina | AS-2-10-INDFOL | IV |
| 6 | Zawartość cukru (= glukoza+fruktoza) | AS-311-02-GLUFRU | II |
| 7 | Zawartość sacharozy (pomiar HPLC) | AS-311-03-SUCRES | II |
| 8 | Magnetyczny rezonans jądrowy deuteru w alkoholu etylowym wina | AS-311-05-ENRRMN (w przeglądzie) | I |
| 9 | Objętościowa zawartość alkoholu (TAV) | AS-312-01-TALVOL | I |
| 10 | Stosunek izotopów $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ alkoholu etylowego w winie | AS-312-06-ETHANO | II |
| 11 | Kwasowość ogólna | AS-313-01-ACITOT | I |
| 12 | Kwasowość lotna | AS-313-02-ACIVOL | I |
| 13 | Kwas cytrynowy | AS-313-09-ACIENZ | II |
| 14 | Kwas sorbowy | AS-313-14-ACISOR | IV |
| 15 | Odczyn pH moszczu | AS-313-15-PH | I |
| 16 | Kwas askorbinowy | AS- 313-22 ACASCO | II |
| 17 | CO ₂ w g/l | AS-314-01-DIOCAR | II |
| 18 | CO ₂ w g/l (manometria) | AS-314-04-CO2MAN | II |
| 19 | Nadciśnienie CO ₂ | AS-314-02-SURPRES | I |
| 20 | Lizozym | AS-315-14-LYSOZY | IV |
| 21 | Siarczan potasu | AS-321-05-SULFAT | II |
| 22 | Żelazo | AS-322-05-FER | IV |
| 23 | Miedź | AS-322-06-CUIVRE | IV |
| 24 | Siarczyny (SO ₂) lub całkowita ilość ditlenku siarki | AS-323-04-DIOSU | II |

Opis niektórych metod analizy podlega w chwili obecnej aktualizacji przez organy OIV. Opisy te zostaną umieszczone w kolejnym komunikacie Komisji, jak tylko zaktualizowany tekst zostanie opublikowany przez OIV w *Recueil des Méthode Internationales d'analyse* z 2010 r.

ZAŁĄCZNIK

SPIS TREŚCI

| | | |
|----|--|----|
| 1 | GĘSTOŚĆ I CIĘŻAR WŁAŚCIWY W TEMPERATURZE 20 °C (OIV - AS2 - 01- MASVOL) – Metoda typu I | 4 |
| 2 | REFRAKTRYCZNE OZNACZANIE ZAWARTOŚCI CUKRÓW W MOSZCZACH GRONOWYCH, ZAGĘSZCZONYCH MOSZCZACH GRONOWYCH I REKTYFIKOWANYCH ZAGĘSZCZONYCH MOSZCZACH GRONOWYCH (OIV - AS2 - 02- SUCREF) – Metoda typu I | 8 |
| 3 | CAŁKOWITY SUCHY EKSTRAKT (OIV-AS-2-03-EXTSEC) Całkowita sucha masa – Metoda typu I | 10 |
| 4 | OZNACZANIE STOSUNKU IZOTOPOWEGO $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ZAWARTOŚCI WODY W WINACH (OIV-AS-2-09-MOUO18) – Metoda typu I | 11 |
| 5 | WSKAŹNIK FOLIN-CIOCALTEU (OIV-AS-2-10-INDFOL) – Metoda typu IV | 12 |
| 6 | GLUKOZA I FRUKTOZA (OIV-AS-311-02-GLUFURU) – Metoda typu II | 14 |
| 7 | OZNACZANIE CUKRÓW METODĄ HPLC (SACHAROZA) (OIV-AS-311-03-SUCRES) – Metoda typu II | 17 |
| 8 | WYKRYWANIE WZBOGACANIA MOSZCZÓW GRONOWYCH, ZAGĘSZCZONYCH MOSZCZÓW GRONOWYCH, REKTYFIKOWANYCH ZAGĘSZCZONYCH MOSZCZÓW GRONOWYCH I WIN METODĄ MAGNETYCZNEGO REZONANSU JĄDROWEGO DEUTERU (OIV-AS-311-05-ENRRMN) – Metoda typu I | 18 |
| 9 | OBJĘTOŚCIOWA ZAWARTOŚĆ ALKOHOLU (OIV-AS-312-01-TALVOL) – Metoda typu I | 19 |
| 10 | OZNACZANIE STOSUNKU IZOTOPÓW $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ METODĄ SPEKTOMETRII MASOWEJ IZOTOPÓW W ALKOHOLU ETYLOWYM WINA LUB ALKOHOLU ETYLOWYM UZYSKANYM W WYNIKU FERMENTACJI MOSZCZU, ZAGĘSZCZONEGO MOSZCZU LUB REKTYFIKOWANEGO MOSZCZU ZAGĘSZCZONEGO (OIV-AS-312-06-ETHANO) – Metoda typu II | 20 |
| 11 | KWASOWOŚĆ OGÓLNA (OIV - AS-313-01-ACITOT) – Metoda typu I | 27 |
| 12 | KWASOWOŚĆ LOTNA (OIV - AS-313-02-ACIVOL) – Metoda typu I | 30 |
| 13 | KWAS CYTRYNOWY (OIV -AS-313-09-ACIENZ) – Metoda typu II | 33 |
| 14 | KWAS SORBOWY (OIV - AS-313-14-ACISOR) – Metoda typu IV | 36 |
| 15 | pH (OIV - AS-313-15-PH) – Metoda typu I | 39 |
| 16 | RÓWNOCZESNE OZNACZANIE ZAWARTOŚCI KWASU L-ASKORBINOWEGO I KWASU D-IZOASKORBINOWEGO (OIV-AS-313-22-ACASCO) – Metoda typu II | 41 |
| 17 | DITLENEK WĘGLA (OIV - AS-314-01-DIOCAR) – Metoda typu II | 45 |
| 18 | OZNACZANIE ZAWARTOŚCI DITLENKU WĘGLA W WINIE METODĄ MANOMETRYCZNĄ (OIV - AS314-04-CO2MAN) – Metoda typu II | 47 |
| 19 | MIERZENIE NADCIŚNIENIA WIN MUSUJĄCYCH I PÓLMUSUJĄCYCH (OIV - AS-314-02-SURPRES) – Metoda typu I | 48 |
| 20 | OZNACZANIE ZAWARTOŚCI LIZOZYMU W WINACH METODĄ HPLC (OIV-AS-315-14) – Metoda typu IV | 51 |
| 21 | SIARCZANY (OIV- AS-321-05-SULFAT) – Metoda typu II | 54 |
| 22 | ŻELAZO (OIV - AS-322-05-FER) – Metoda typu IV | 55 |
| 23 | MIEDŹ (OIV – AS 322-06) – Metoda typu IV | 56 |
| 24 | DITLENEK SIARKI (OIV - AS-323-04-DIOSU) – Metoda typu II | 58 |

1 GĘSTOŚĆ I CIĘŻAR WŁAŚCIWY W TEMPERATURZE 20 °C (OIV - AS2 - 01- MASVOL) – METODA TYPU I

1. DEFINICJE

Gęstość jest to masa przypadająca na jednostkę objętości wina lub moszczu w temperaturze 20 °C. Wyrażana jest w gramach na mililitr i oznaczana symbolem $\rho_{20\text{ °C}}$.

Ciężar właściwy w temperaturze 20 °C (lub gęstość względna 20 °C/20 °C) jest to stosunek, wyrażony liczbą dziesiętną, masy określonej objętości wina lub moszczu w temperaturze 20 °C do masy tej samej objętości wody w tej samej temperaturze. Jest on oznaczany symbolem $d_{20\text{ °C}}^{20\text{ °C}}$.

2 ZASADA METODY

Gęstość i ciężar właściwy w temperaturze 20 °C są oznaczane w badanej próbce metodą:

albo piknometryczną: metoda referencyjna,

albo densymetryczną z wykorzystaniem wagi hydrostatycznej lub densymetrem elektronicznym.

Uwaga:

Dla bardzo dokładnych oznaczeń wynik pomiaru gęstości musi zostać skorygowany poprzez uwzględnienie wpływu ditlenku siarki.

$$\rho_{20\text{ °C}} = \rho'_{20\text{ °C}} - 0,0006 \times S$$

$\rho_{20\text{ °C}}$ = gęstość skorygowana

$\rho'_{20\text{ °C}}$ = gęstość stwierdzona

S = całkowita zawartość ditlenku siarki w g/l

3. PRZYGOTOWANIE PRÓBKII DO BADANIA

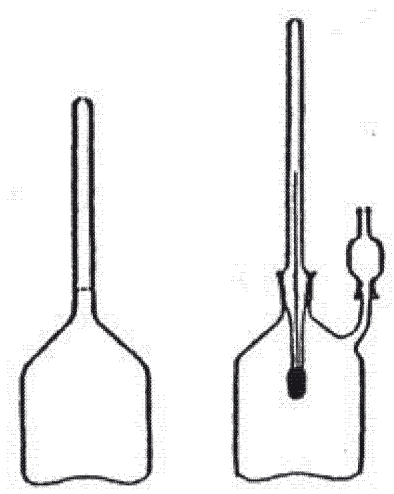
Jeżeli wino lub moszcz zawiera znaczne ilości ditlenku węgla, należy usunąć jego większość poprzez mieszanie 250 ml wina w jednolitrowej kolbie lub poprzez filtrację pod zmniejszonym ciśnieniem przez 2 g waty umieszczonej w rurce odprowadzającej.

4. METODA REFERENCYJNA

4.1. Aparatura

Zwykła aparatura laboratoryjna, w tym w szczególności:

- 4.1.1. Piknometr ⁽¹⁾ pyreksowy o pojemności około 100 ml z wyjmowanym termometrem z doszlifowanym korkiem, ze skalą o działce elementarnej 1/10 stopnia w zakresie 10-30 °C. Termometr musi być standaryzowany (rysunek 1).



Rysunek 1

Piknometr i jego butelka tarująca

Piknometr wyposażony jest w boczną rurkę o długości 25 mm i średnicy 1 mm (maksymalnie), zakończoną stożkowym szlifem. Rurka ta może być zamknięta „korkiem zbiornikowym”, składającym się z rurki ze stożkowym szlifem i wydłużonej części na końcu. Korek ten służy jako komora rozprężeniowa.

⁽¹⁾ Można stosować każdy piknometr o równorzędnej charakterystyce.

Oba połączenia szlifowe aparatu powinny być wykonane bardzo starannie.

- 4.1.2. Butelka tarująca, stanowiąca naczynie o takiej samej objętości zewnętrznej (z dokładnością co najmniej do 1 ml), co piknometr i o masie równej masie piknometru napełnionego cieczą o ciężarze właściwym 1,01 (2,0 % m/v roztwór chlorku sodu).

Izolowany termicznie pojemnik, pasujący dokładnie do kształtu piknometru.

- 4.1.3. Waga dwuszalkowa o nośności co najmniej 300 g i czułości 0,1 mg

lub

waga jednoszalkowa o nośności co najmniej 200 g i czułości 0,1 mg.

4.2. Kalibracja piknometru

Kalibracja piknometru polega na oznaczeniu następujących wielkości:

- tara pustego piknometru,
- objętość piknometru w temperaturze 20 °C,
- masa piknometru napełnionego wodą w temperaturze 20 °C.

4.2.1. Metoda z wykorzystaniem wagi dwuszalkowej

Umieścić butelkę tarującą na lewej szalce wagi, a czysty i suchy piknometr, zamknięty „korkiem zbiornikowym” na prawej szalce. Dołożyć odważniki na szalkę z piknometrem i zapisać masę odważników wymaganą do uzyskania równowagi: jest to wartość p gramów.

Ostrożnie napełnić piknometr wodą destylowaną o temperaturze otoczenia i włożyć termometr: ostrożnie wytrzeć piknometr do sucha i umieścić w termicznie izolowanym pojemniku. Wymieszać zawartość piknometru poprzez odwracanie pojemnika aż do osiągnięcia stałej temperatury. Doprowadzić poziom cieczy w piknometrze dokładnie do poziomu górnej krawędzi bocznej rurki. Wytrzeć do sucha ścianki rurki i włożyć „korek zbiornikowy”; dokładnie odczytać wskazanie temperatury t °C, korygując je ewentualnie z uwzględnieniem niedokładności skali temperaturowej. Zważyć napełniony wodą piknometr w stosunku do butli tarującej i zapisać masę p' w gramach, wymaganą do uzyskania równowagi.

Obliczanie:

Tarowanie pustego piknometru:

tara pustego piknometru = $p + m$,

gdzie m = masa powietrza wypełniającego piknometr,

$m = 0,0012 (p - p')$.

Objętość w temperaturze 20 °C:

$V_{20\text{ °C}} = (p + m - p') \times F_t$

gdzie F_t = współczynnik odczytany z tabeli I dla temperatury t °C.

$V_{20\text{ °C}}$ powinna być obliczona z dokładnością do $\pm 0,001$ ml.

Masa wody w temperaturze 20 °C:

$M_{20\text{ °C}} = V_{20\text{ °C}} \times 0,998203$

gdzie 0,998203 = jest gęstością wody w temperaturze 20 °C.

4.2.2. Metoda z wykorzystaniem wagi jednoszalkowej

Ustalić:

- masę czystego i suchego piknometru: P
- masę piknometru napełnionego wodą w temperaturze t °C: P_1 zgodnie ze sposobem postępowania opisanym w 4.2.1
- masę butelki tarującej T_0

Obliczanie:

Tarowanie pustego piknometru:

tara pustego piknometru = $P - m$

gdzie m = masa powietrza wypełniającego piknometr,

$m = 0,0012 (P_1 - P)$

Objętość w temperaturze 20 °C:

$V_{20\text{ °C}} = [P_1 - (P - m)] \times F_t$

gdzie F_t = współczynnik odczytany z tabeli I dla temperatury t °C.

Objętość w temperaturze 20 °C powinna być obliczona z dokładnością do $\pm 0,001$ ml.

Masa wody w temperaturze 20 °C:

$M_{20\text{ °C}} = V_{20\text{ °C}} \times 0,998203$

gdzie 0,998203 = jest gęstością wody w temperaturze 20 °C.

4.3. Metoda pomiaru

4.3.1. Metoda z wykorzystaniem wagi dwuszalkowej

Zważyć piknometr napełniony przygotowaną próbką (pkt 3), zgodnie z procedurą opisaną w pkt 4.2.1.

gdzie p'' oznacza masę w gramach wymaganą do uzyskania równowagi w temperaturze t °C.

Masa cieczy zawartej w piknometrze = $p + m - p''$

Gęstość w temperaturze t °C:

$\rho_t\text{ °C} = (p + m - p'')/V_{20\text{ °C}}$

Obliczyć gęstość w temperaturze 20 °C, wykorzystując jedną z tabel zamieszczonych w dalszej części dokumentu, zgodnie z rodzajem badanej cieczy: wino wytrawne (tabela II), naturalny lub zagęszczony moszcz (tabela III), wino słodkie (tabela IV).

Ciężar właściwy 20 °C/20 °C wina obliczany jest poprzez podzielenie jego gęstości w temperaturze 20 °C przez 0,998203.

4.3.2. Metoda z wykorzystaniem wagi jednoszalkowej

Zważyć butelkę tarującą, jej masę oznaczyć jako T_1 .

Obliczyć $dT = T_1 - T_0$

Masa pustego piknometru w czasie pomiaru = $P - m + dT$

Zważyć piknometr napełniony przygotowaną próbką (pkt 3), zgodnie z procedurą opisaną w pkt 4.2.2. gdzie P_2 oznacza jego masę w temperaturze t °C

Masa cieczy zawartej w piknometrze w temperaturze t °C = $P_2 - (P - m + dT)$

Gęstość w temperaturze t °C:

$\rho_t\text{ °C} = (P_2 - (P - m + dT))/V_{20\text{ °C}}$

Obliczyć gęstość badanej cieczy (wino wytrawne, naturalny lub zagęszczony moszcz lub wino słodkie) w temperaturze 20 °C, tak jak opisano w pkt 4.3.1

Ciężar właściwy 20 °C/20 °C oblicza się, dzieląc gęstość w temperaturze 20 °C przez 0,998203.

4.3.3. Powtarzalność pomiarów gęstości

dla win wytrawnych i półsłodkich: $r = 0,00010$

a dla win słodkich: $r = 0,00018$

4.3.4. Odtwarzalność pomiarów gęstości

dla win wytrawnych i półsłodkich: $R = 0,00037$

a dla win słodkich: $R = 0,00045$

TABELA I

Wartość współczynnika F,

przez który należy pomnożyć masę wody o temperaturze t °C zawartej w piknometrze ze szkła pyreksowego w celu obliczenia objętości piknometru w temperaturze 20 °C

[Należy odnieść się do tabeli I w załączniku II do metody AS2—01 opisanej w *Recueil International des méthodes d'analyse* Międzynarodowej Organizacji ds. Winorośli i Wina]

TABELA II

Korekty temperatury c w stosunku do gęstości win wytrawnych i bezalkoholowych win wytrawnych, mierzonej przy użyciu piknometru ze szkła pyreksowego w temperaturze t °C w celu otrzymania wyników odpowiadających temperaturze 20 °C

[Należy odnieść się do tabeli II w załączniku II do metody AS2—01 opisanej w *Recueil International des méthodes d'analyse* Międzynarodowej Organizacji ds. Winorośli i Wina]

$$\rho_{20} = \rho_t \pm (c/1\ 000) \quad \begin{array}{l} - \text{ jeżeli } t \text{ °C jest niższa niż } 20 \text{ °C} \\ + \text{ jeżeli } t \text{ °C jest wyższa niż } 20 \text{ °C} \end{array}$$

TABELA III

Korekty temperatury c w stosunku do gęstości naturalnych i zagęszczonych moszczów, mierzonej przy użyciu piknometru ze szkła pyreksowego w temperaturze t °C w celu otrzymania wyników odpowiadających temperaturze 20 °C

[Należy odnieść się do tabeli III w załączniku II do metody AS2—01 opisanej w *Recueil International des méthodes d'analyse* Międzynarodowej Organizacji ds. Winorośli i Wina]

$$\rho_{20} = \rho_t \pm (c/1\ 000) \quad \begin{array}{l} - \text{ jeżeli } t \text{ °C jest niższa niż } 20 \text{ °C} \\ + \text{ jeżeli } t \text{ °C jest wyższa niż } 20 \text{ °C} \end{array}$$

TABELA IV

Korekty temperatury c w stosunku do gęstości win o zawartości alkoholu 13 % objętości i więcej, zawierających pozostałości cukrów, mierzonej przy użyciu piknometru ze szkła pyreksowego w temperaturze t °C w celu otrzymania wyników odpowiadających temperaturze 20 °C

[Należy odnieść się do tabeli IV w załączniku II do metody AS2—01 opisanej w *Recueil International des méthodes d'analyse* Międzynarodowej Organizacji ds. Winorośli i Wina]

$$\rho_{20} = \rho_t \pm (c/1\ 000) \quad \begin{array}{l} - \text{ jeżeli } t \text{ °C jest niższa niż } 20 \text{ °C} \\ + \text{ jeżeli } t \text{ °C jest wyższa niż } 20 \text{ °C} \end{array}$$

2 REFRAKTOMETRYCZNE OZNACZANIE ZAWARTOŚCI CUKRÓW W MOSZCZACH GRONOWYCH, ZAGĘSZCZONYCH MOSZCZACH GRONOWYCH I REKTYFIKOWANYCH ZAGĘSZCZONYCH MOSZCZACH GRONOWYCH (OIV - AS2 - 02- SUCREF) – METODA TYPU I

1. ZASADA METODY

Współczynnik załamania światła w temperaturze 20 °C, wyrażony jako wartość bezwzględna lub jako ułamek procentowy masy sacharozy wyrażony w procentach, przedstawiony jest w odpowiednich tabelach w celu obliczenia zawartości cukru w gramach na litr i w gramach na kilogram moszczu gronowego, zagęszczonego moszczu gronowego i rektyfikowanego zagęszczonego moszczu gronowego.

2. APARATURA

2.1. Refraktometr Abbego

Refraktometr powinien być wyposażony w skalę podającą:

- procentowy ułamek masy sacharozy z dokładnością do 0,1 %,
- lub współczynniki załamania światła z dokładnością do czwartego miejsca dziesiętnego.

Refraktometr musi być wyposażony w termometr ze skalą o zakresie co najmniej od + 15 °C do + 25 °C oraz w urządzenie do cyrkulacji wody umożliwiające dokonywanie pomiarów w temperaturze 20 ± 5 °C.

Do urządzenia powinna być na stałe przymocowana instrukcja obsługi, ze szczególnym uwzględnieniem kalibracji i źródła światła.

3. PRZYGOTOWANIE PRÓBKII

3.1. Moszcz i moszcz zagęszczony

Jeżeli jest to konieczne, przesączyć moszcz przez suchą gazę złożoną czterokrotnie, odrzucając pierwsze krople przesącza i do oznaczenia wykorzystać przesączony moszcz.

3.2. Rektyfikowany moszcz zagęszczony

W zależności od stężenia użyć bezpośrednio rektyfikowany moszcz zagęszczony lub roztwór otrzymany przez uzupełnienie 200 g moszczu do 500 g za pomocą wody, dokładnie odważając podane ilości.

4. PROCEDURA

Doprowadzić temperaturę próbki do około 20 °C. Umieścić niewielką ilość próbki na dolnym pryzmacie refraktometru, zwracając uwagę (ponieważ pryzmaty są silnie przyciskane do siebie), aby próbka równomiernie pokrywała szklaną powierzchnię. Wykonać pomiar zgodnie z instrukcją obsługi urządzenia.

Odczytać procentowy ułamek masy sacharozy z dokładnością do 0,1 % lub współczynnik załamania światła z dokładnością do czwartego miejsca dziesiętnego.

Dokonać co najmniej dwóch oznaczeń dla tej samej przygotowanej próbki. Zapisać temperaturę t °C.

5. OBLICZENIA

5.1. Korekta temperatury

5.1.1. Przyrządy wyskalowane w procentowych ułamkach masy sacharozy: wykorzystać tabelę I dla określenia korekty temperatury.

5.1.2. Przyrządy wyskalowane we współczynniku załamania światła: w tabeli II znaleźć zmierzoną wartość współczynnika w t °C w celu określenia (w kolumnie 1) odpowiedniej wartości procentowego ułamka masy sacharozy w temperaturze t °C. Wartość ta jest korygowana w związku z temperaturą i wyrażana jako stężenie w temperaturze 20 °C za pomocą tabeli I.

5.2. Zawartość cukru w moszczu i moszczu zagęszczonym

Odczytać procentowy ułamek masy sacharozy w temperaturze 20 °C w tabeli II i odczytać w tym samym wierszu zawartość sacharozy w gramach na litr i gramach na kilogram. Zawartość cukrów jest wyrażana w przeliczeniu na cukier inwertowany z dokładnością do jednego miejsca dziesiętnego.

5.3. Zawartość cukru w rektyfikowanym moszczu zagęszczonym

Odczytać procentowy ułamek masy sacharozy w temperaturze 20 °C w tabeli III i odczytać w tym samym wierszu zawartość sacharozy w gramach na litr i gramach na kilogram. Zawartość cukrów jest wyrażana w przeliczeniu na cukier inwertowany z dokładnością do jednego miejsca dziesiętnego.

Jeżeli pomiar był wykonany w rozcieńczonym rektyfikowanym moszczu zagęszczonym, wynik należy pomnożyć przez współczynnik rozcieńczenia

5.4. Współczynnik załamania światła moszczu, moszczu zagęszczonego i rektyfikowanego moszczu zagęszczonego

Odczytać procentowy ułamek masy sacharozy w temperaturze 20 °C w tabeli II i odczytać w tym samym wierszu współczynnik załamania światła w temperaturze 20 °C. Współczynnik ten podany jest z dokładnością do czwartego miejsca dziesiętnego.

Uwaga: Potencjalne stężenie alkoholu w moszczu gronowym, zagęszczonym moszczu gronowym i rektyfikowanym zagęszczonym moszczu gronowym można określić wykorzystując tabele równoważności znajdującą się w załączniku I do rozporządzenia Komisji (WE) nr 1623/2000 z dnia 25 lipca 2000 r. (Dz.U. L 194 z 31.7.2000).

TABELA I

Korekta, jaką należy wprowadzić, jeżeli procentowy ułamek masy sacharozy wyrażony w procentach był oznaczony w temperaturze różnej od 20 °C

[Należy odnieść się do tabeli I w załączniku do metody AS2 - 02 opisanej w *Recueil International des méthodes d'analyse* Międzynarodowej Organizacji ds. Winorośli i Wina]

TABELA II

Tabela przedstawiająca zawartość cukru w moszczu i moszczu zagęszczonym w gramach na litr i gramach na kilogram, oznaczoną za pomocą refraktometru wyskalowanego w procentowych ułamkach masy sacharozy w temperaturze 20 °C lub przy wartości współczynnika załamania światła w temperaturze 20 °C. Przedstawiona jest również gęstość w 20 °C.

[Należy odnieść się do tabeli II w załączniku do metody AS2 - 02 opisanej w *Recueil International des méthodes d'analyse* Międzynarodowej Organizacji ds. Winorośli i Wina]

TABELA III

Tabela przedstawiająca zawartość cukru w rektyfikowanym zagęszczonym moszczu w gramach na litr i gramach na kilogram, oznaczoną za pomocą refraktometru wyskalowanego w procentowych ułamkach masy sacharozy w temperaturze 20 °C lub przy wartości współczynnika załamania światła w temperaturze 20 °C. Przedstawiona jest również gęstość w 20 °C.

[Należy odnieść się do tabeli III w załączniku do metody AS2 - 02 opisanej w *Recueil International des méthodes d'analyse* Międzynarodowej Organizacji ds. Winorośli i Wina]

3 CAŁKOWITY SUCHY EKSTRAKT (OIV-AS-2-03-EXTSEC) CAŁKOWITA SUCHA MASA – METODA TYPU I

1. DEFINICJA

Całkowity suchy ekstrakt lub całkowita sucha masa obejmują wszystkie substancje nietłone w określonych warunkach fizycznych. Warunki fizyczne powinny być takie, aby substancje tworzące ekstrakt ulegały możliwie najmniejszym zmianom w trakcie przeprowadzania badania.

Ekstrakt bezcukrowy jest to różnica między całkowitym suchym ekstraktem a całkowitą zawartością cukru.

Ekstrakt zredukowany jest to różnica między całkowitym suchym ekstraktem a całkowitą zawartością cukru w ilości powyżej 1 g/l, zawartością siarczanu potasu w ilości powyżej 1 g/l, zawartością mannitu i zawartością innych substancji chemicznych, które mogą być dodawane do wina.

Ekstrakt resztkowy jest to ekstrakt bezcukrowy pomniejszony o kwasowość wyrażoną jako kwas winowy.

Zawartość ekstraktu wyrażana jest w gramach na litr i powinna być oznaczana z dokładnością do 0,5 g.

2. ZASADA METODY

[Opis niniejszej metody analizy podlega w chwili obecnej aktualizacji przez organy OIV. Opis ten zostanie umieszczony w kolejnym komunikacie Komisji jak tylko zaktualizowany tekst zostanie opublikowany przez OIV w Recueil des Méthode Internationales d'analyse z 2010 r. W celach informacyjnych, w oczekiwaniu na wymienioną publikację, można odnosić się do rozdziału 4 z załącznika do rozporządzenia Komisji (EWG) nr 2676/90.]

4 OZNACZANIE STOSUNKU IZOTOPOWEGO $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ZAWARTOŚCI WODY W WINACH (OIV-AS-2-09-MOUO18) – METODA TYPU I

(p.m.)

[Opis niniejszej metody analizy podlega w chwili obecnej aktualizacji przez organy OIV. Opis ten zostanie umieszczony w kolejnym komunikacie Komisji jak tylko zaktualizowany tekst zostanie opublikowany przez OIV w Recueil des Méthode Internationales d'analyse z 2010 r. W celach informacyjnych, w oczekiwaniu na wymienioną publikację, można odnosić się do rozdziału 43 z załącznika do rozporządzenia Komisji (EWG) nr 2676/90.]

5 WSKAŹNIK FOLIN-CIOCALTEU (OIV-AS-2-10-INDFOL) – METODA TYPU IV**1. DEFINICJA**

Wskaźnik Folin-Ciocalteu jest to wynik oznaczania uzyskany wg metody opisanej poniżej.

2. ZASADA METODY

Wszystkie związki fenolowe występujące w winie są utleniane przez odczynnik Folin-Ciocalteu. Odczynnik ten stanowi mieszanina kwasu wolframianofosforowego ($H_3PW_{12}O_{40}$) i kwasu molibdenowofosforowego ($H_3PMo_{12}O_{40}$), które po utlenieniu fenoli ulegają redukcji do mieszaniny niebieskich tlenków wolframu (W_8O_{23}) i molibdenu (Mo_8O_{23}).

Powstała barwa niebieska wykazuje maksimum absorpcji w pobliżu 750 nm, a jej natężenie jest proporcjonalne do całkowitej ilości związków fenolowych obecnych w winie.

3. ODCZYNNIKI

Odczynniki musi cechować czystość analityczna. Należy używać wody destylowanej lub wody o podobnej czystości.

3.1. Odczynnik Folin-Ciocalteu

Odczynnik ten jest dostępny na rynku w postaci gotowej do użycia. Można go otrzymać w następujący sposób: rozpuścić 100 g wolframianu(VI) sodu ($Na_2WO_4 \times 2H_2O$) i 25 g molibdenianu (VI) sodu ($Na_2MoO_4 \times 2H_2O$) w 700 ml wody destylowanej. Dodać 50 ml 85 % kwasu fosforowego ($\rho_{20} = 1,71$ g/ml) i 100 ml stężonego kwasu solnego ($\rho_{20} = 1,19$ g/ml). Doprowadzić do wrzenia i gotować przez 10 godzin pod chłodnicą zwrotną. Następnie dodać 150 g siarczanu litowego ($Li_2SO_4 \times H_2O$) i kilka kropli bromu i ponownie gotować przez 15 minut. Odstawić do ostygnięcia i uzupełnić wodą destylowaną do 1 litra.

3.2. Bezwodny węglan sodowy (Na_2CO_3) w 20 % (m/v) roztworze.**4. APARATURA**

Zwykła aparatura laboratoryjna, w tym w szczególności:

4.1. Kolby miarowe o pojemności 100 ml.**4.2. Spektrofotometr umożliwiający pomiar przy 750 nm.****5. PROCEDURA****5.1. Wino czerwone**

Do kolby miarowej na 100 ml (pkt 4.1) odmierzyć ściśle w podanej kolejności:

1 ml wina rozcieńczonego uprzednio w stosunku 1:5,

50 ml wody destylowanej,

5 ml odczynnika Folin-Ciocalteu (pkt 3.1),

20 ml roztworu węglanu sodowego (pkt 3.2).

Uzupełnić wodą destylowaną do 100 ml.

Dokładnie wymieszać. Odczekać 30 minut do ustabilizowania się reakcji. Oznaczyć absorbancję przy 750 nm przy grubości warstwy 1 cm w stosunku do próby ślepej, w której zamiast wina użyto wodę.

Jeżeli absorbancja nie wynosi około 0,3, próbkę należy odpowiednio rozcieńczyć.

5.2. Wino białe

Postępować jak wyżej, używając 1 ml nierozcieńczonego wina.

5.3. Rektyfikowany moszcz zagęszczony**5.3.1. Przygotowanie próbki**

Użyć roztworu próbki o zawartości cukrów 25 % (m/m) (25 ° Brix), przygotowanego jak opisano w rozdziale „pH” pkt 4.1.2.

5.3.2. *Pomiar*

Postępować jak w przypadku wina czerwonego (pkt 5.1), używając 5 ml próbki przygotowanej jak w pkt 5.3.1 i mierząc absorbancję w stosunku do próbki kontrolnej otrzymanej z 5 ml 25 % (m/m) roztworu cukru inwertowanego.

6. PRZEDSTAWIANIE WYNIKÓW

6.1. **Metoda obliczania**

Wynik jest przedstawiany w postaci wskaźnika otrzymywanego przez mnożenie absorbancji przez 100 dla win czerwonych rozcieńczonych w stosunku 1:5 (lub przez odpowiedni współczynnik dla innych rozcieńczeń) i przez 20 dla win białych. Dla rektyfikowanych moszczów zagęszczonych mnożyć przez 16.

6.2. **Powtarzalność**

Różnica między wynikami dwóch prób wykonywanych równocześnie lub bardzo szybko jedna po drugiej przez tego samego analityka nie powinna być większa niż 1.

Dobrą powtarzalność wyników uzyskuje się stosując bardzo czystą aparaturę i sprzęt (kolby miarowe i kuwety spektrofotometryczne).

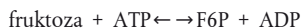
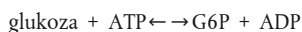
6 GLUKOZA I FRUKTOZA (OIV-AS-311-02-GLUFU) – METODA TYPU II

1. DEFINICJA

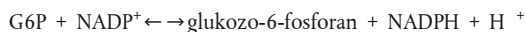
Glukoza i fruktoza mogą być oznaczane indywidualnie metodą enzymatyczną, jedynie w celu obliczenia stosunku glukoza / fruktoza.

2. ZASADA METODY

Glukoza i fruktoza poddawane są fosforylacji za pomocą trójfosforanu adenozy (ATP) w wyniku reakcji enzymatycznej katalizowanej przez heksokinazę (HK), w wyniku czego powstają glukoza-6-fosforan (G6P) i fruktoza-6-fosforan (F6P):



Glukoza-6-fosforan jest najpierw utleniany do 6-fosfoglukonianu za pomocą zredukowanego fosforanu dinukleotydu nikotynamido-adeninowego w obecności enzymu dehydrogenazy glukoza-6-fosforanu (G6PDH). Ilość powstającego zredukowanego fosforanu dinukleotydu nikotynamido-adeninowego (NADPH) odpowiada ilości glukoza-6-fosforanu, a przez to ilości glukozy.



Zredukowany fosforan dinukleotydu nikotynamido-adeninowego oznaczany jest poprzez pomiar absorpcji przy 340 nm.

Na koniec tej reakcji fruktoza-6-fosforan przekształca się w glukoza-6-fosforan glukozy za pomocą izomerazy glukofosforanowej (PGI):



Glukoza-6-fosforan reaguje ponownie z fosforanem dinukleotydu nikotynamido-adeninowego, dając 6-fosfoglukonian i zredukowany fosforan dinukleotydu nikotynamido-adeninowego, ostatni związek jest oznaczany ilościowo.

3. APARATURA

— Spektrofotometr umożliwiający pomiar przy długości fali 340 nm, w której NADPH wykazuje najwyższą absorpcję. Uwzględnia się bezwzględne pomiary (tzn. nie wykorzystuje się krzywej wzorcowej, natomiast przeprowadza się standaryzację z wykorzystaniem współczynnika ekstynkcji NADPH), dlatego należy sprawdzić skalę długości fali oraz wartości absorpcji uzyskiwane w urządzeniu.

Jeżeli nie jest dostępny, można również wykorzystać spektrofotometr ze źródłem światła o widmie nieciągłym, umożliwiający pomiar przy długości fali 334 lub 365 nm.

— Kuwety szklane o drodze optycznej 1 cm lub kuwety jednorazowego użytku.

— Pipety o pojemności 0,02, 0,05, 0,1 i 0,2 ml do odmierzania roztworów do badań enzymatycznych.

4. ODCZYNNIKI

- 4.1. **Roztwór 1:** roztwór buforowy (0,3 M trietanolamina, pH = 7,6, 4×10^{-3} M w Mg^{2+}): rozpuścić 11,2 g chlorowodoru trietanolaminy $[(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{N}, \text{HCl}]$ i 0,2 g siarczanu (VI) magnezu ($\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$) w 150 ml wody podwójnie destylowanej, dodać około 4 ml 5 M roztworu wodorotlenku sodu (NaOH) do uzyskania wartości pH 7,6 i uzupełnić do 200 ml.

Ten roztwór może być przechowywany w temperaturze + 4 °C przez cztery tygodnie.

- 4.2. **Roztwór 2:** roztwór fosforanu dinukleotydu nikotynamido-adeninowego (około $11,5 \times 10^{-3}$ M): 50 mg disodowego fosforanu dinukleotydu nikotynamido-adeninowego rozpuścić w 5 ml wody podwójnie destylowanej.

Ten roztwór może być przechowywany w temperaturze + 4 °C przez cztery tygodnie.

- 4.3. **Roztwór 3:** roztwór 5'trifosforanu adenozy (około 81×10^{-3} M): rozpuścić 250 mg disodowego 5'trifosforanu adenozy i 250 mg wodorowęglanu sodu (NaHCO_3) w 5 ml wody podwójnie destylowanej.

Ten roztwór może być przechowywany w temperaturze + 4 °C przez cztery tygodnie.

- 4.4. **Roztwór 4:** heksokinaza/dehydrogenaza glukoza-6-fosforanowa: zmieszać 0,5 ml roztworu heksokinazy (2 mg białka/ml lub 280 U/ml) z 0,5 ml roztworu dehydrogenazy glukoza-6-fosforanowej (1 mg białka/ml).

Ten roztwór może być przechowywany w temperaturze około + 4 °C przez rok.

- 4.5. **Roztwór 5:** Izomeraza fosfoglukozy (2 mg białka/ml lub 700 U/ml). Tę zawiesinę używa się nierozcieńczoną.

Ten roztwór może być przechowywany w temperaturze około + 4 °C przez rok.

Uwaga:

Wszystkie wyżej wymienione odczynniki są dostępne w handlu.

5. PROCEDURA

5.1. **Przygotowanie próbek**

Zależnie od oczekiwanej ilości glukozy + fruktozy na litr rozcieńczyć próbkę w następujący sposób:

| Pomiar przy 340 lub 334 nm | Pomiar przy 365 nm | Rozcieńczanie wodą | Współczynnik rozcieńczenia F |
|----------------------------|--------------------|--------------------|------------------------------|
| do 0,4 g/l | do 0,8 g/l | — | — |
| do 4,0 g/l | do 8,0 g/l | 1 + 9 | 10 |
| do 10,0 g/l | do 20,0 g/l | 1 + 24 | 25 |
| do 20,0 g/l | do 40,0 g/l | 1 + 49 | 50 |
| do 40,0 g/l | do 80,0 g/l | 1 + 99 | 100 |
| powyżej 40,0 g/l | powyżej 80,0 g/l | 1 + 999 | 1 000 |

5.2. **Oznaczanie**

Przy użyciu spektrofotometru ustawionego na 340 nm przeprowadzić pomiar w stosunku do powietrza (bez kuwety na drodze światła) lub w stosunku do wody jako odnośnika.

Temperatura między 20 i 25 °C.

Do dwóch kuwet o drodze optycznej 1 cm nalać:

| | Odniesienie | Oznaczenie |
|---|-------------|------------|
| Roztwór 1 (pkt 4.1) (sprawdzony do temperatury 20 °C) | 2,50 ml | 2,50 ml |
| Roztwór 2 (pkt 4.2) | 0,10 ml | 0,10 ml |
| Roztwór 3 (pkt 4.3) | 0,10 ml | 0,10 ml |
| Badana próbka | | 0,20 ml |
| Woda podwójnie destylowana | 0,20 ml | |

Wymieszać i po około 3 minutach odczytać absorbancję roztworów (A_1). Zapoczątkować reakcję przez dodanie:

| | | |
|---------------------|---------|---------|
| Roztwór 4 (pkt 4.4) | 0,02 ml | 0,02 ml |
|---------------------|---------|---------|

Wymieszać, odczekać 15 minut, odczytać absorbancję i po następnych 2 minutach sprawdzić, czy reakcja ustała (A_2).

Dodać niezwłocznie:

| | | |
|---------------------|---------|---------|
| Roztwór 5 (pkt 4.5) | 0,02 ml | 0,02 ml |
|---------------------|---------|---------|

Wymieszać, po 10 minutach odczytać absorbancję, po następnych dwóch minutach sprawdzić czy reakcja ustała (A_3).

Obliczyć różnice absorbancji:

$A_2 - A_1$ dotyczącą glukozy,

$A_3 - A_2$ dotyczącą fruktozy,

dla kuwety odniesienia i kuwety z próbką.

Obliczyć różnice absorpcji dla kuwety odniesienia (ΔA_T) i kuwety z próbką (ΔA_D) otrzymując wartości:

$$\text{dla glukozy: } \Delta A_G = \Delta A_D - \Delta A_T$$

$$\text{dla fruktozy: } \Delta A_F = \Delta A_D - \Delta A_T$$

Uwaga:

Czas niezbędny do całkowitego przebiegu reakcji enzymatycznej może być różny dla kolejnych serii oznaczeń. Powyższa wartość jest podana tylko jako wskazówka i zaleca się, aby była oznaczana dla każdej serii.

5.3. Przedstawianie wyników

5.3.1. Obliczanie

Ogólny wzór na obliczanie stężenia:

$$C = [(V \times M) / (\epsilon \times d \times v \times 1\,000)] \times \Delta A \text{ (g/l) gdzie}$$

V = objętość roztworu używanego do badań (ml)

v = objętość próbki (ml)

M = masa cząsteczkowa oznaczanej substancji

d = droga optyczna kuwety (cm)

ϵ = współczynnik absorpcji NADPH przy 340 nm = 6,3 (mmole⁻¹ × l × cm⁻¹)

V = 2,92 dla określenia glukozy

V = 2,94 dla określenia fruktozy

v = 0,20 ml

M = 180

d = 1

a więc

$$\text{dla glukozy: } C \text{ (g/l)} = 0,417 \times \Delta A_G$$

$$\text{dla fruktozy: } C \text{ (g/l)} = 0,420 \times \Delta A_F$$

Jeżeli próbka została rozcieńczona podczas przygotowywania, wynik należy pomnożyć przez współczynnik rozcieńczenia F .

Uwaga:

Jeżeli pomiary były wykonywane przy 334 lub 365 nm, uzyskuje się następujące wyrażenia:

— pomiar przy 334 nm: $\epsilon = 6,2$ (mmole⁻¹ × l × cm⁻¹)

$$\text{dla glukozy: } C \text{ (g/l)} = 0,425 \times \Delta A_G$$

$$\text{dla fruktozy: } C \text{ (g/l)} = 0,428 \times \Delta A_F$$

— pomiar przy 365 nm: $\epsilon = 3,4$ (mmole⁻¹ × l × cm⁻¹)

$$\text{dla glukozy: } C \text{ (g/l)} = 0,773 \times \Delta A_G$$

$$\text{dla fruktozy: } C \text{ (g/l)} = 0,778 \times \Delta A_F$$

5.3.2. Powtarzalność (r)

$$r = 0,056 x_i$$

5.3.3. Odtwarzalność (R)

$$R = 0,12 + 0,076 x_i$$

x_i = zawartość glukozy lub fruktozy w g/l.

7 OZNACZANIE CUKRÓW METODĄ HPLC (SACHAROZA) (OIV-AS-311-03-SUCRES) – METODA TYPU II**(p.m.)**

[Opis niniejszej metody analizy podlega w chwili obecnej aktualizacji przez organy OIV. Opis ten zostanie umieszczony w kolejnym komunikacie Komisji, jak tylko zaktualizowany tekst zostanie opublikowany przez OIV w Recueil des Méthode Internationales d'analyse z 2010 r. W celach informacyjnych, w oczekiwaniu na wymienioną publikację, można odnosić się do rozdziału 6 ust. 3 załącznika do rozporządzenia Komisji (EWG) nr 2676/90.]

8 WYKRYWANIE WZBOGACANIA MOSZCZÓW GRONOWYCH, ZAGĘSZCZONYCH MOSZCZÓW GRONOWYCH, REKTYFIKOWANYCH ZAGĘSZCZONYCH MOSZCZÓW GRONOWYCH I WIN METODĄ MAGNETYCZNEGO REZONANSU JĄDROWEGO DEUTERU (OIV-AS-311-05-ENRRMN) – METODA TYPU I

(p.m.)

[Opis niniejszej metody analizy podlega w chwili obecnej przeglądowi przez organy OIV. Zostanie on opublikowany w komunikacie Komisji, jak tylko ostateczna wersja tekstu zostanie przyjęta przez walne zgromadzenie OIV. W celach informacyjnych, w oczekiwaniu na decyzję OIV, można odnosić się do rozdziału 8 załącznika do rozporządzenia Komisji (EWG) nr 2676/90.]

9 OBJĘTOŚCIOWA ZAWARTOŚĆ ALKOHOLU (OIV-AS-312-01-TALVOL) – METODA TYPU I**(p.m.)**

[Opis niniejszej metody analizy podlega w chwili obecnej aktualizacji przez organy OIV. Opis ten zostanie umieszczony w kolejnym komunikacie Komisji, jak tylko zaktualizowany tekst zostanie opublikowany przez OIV w Recueil des Méthode Internationales d'analyse z 2010 r. W celach informacyjnych, w oczekiwaniu na publikację OIV, można odnosić się do rozdziału 3 załącznika do rozporządzenia Komisji (EWG) nr 2676/90.]

10 OZNACZANIE STOSUNKU IZOTOPÓW $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ METODĄ SPEKTOMETRII MASOWEJ IZOTOPÓW W ALKOHOLU ETYLOWYM WINA LUB ALKOHOLU ETYLOWYM UZYSKANYM W WYNIKU FERMENTACJI MOSZCZU, ZAGĘSZCZONEGO MOSZCZU LUB REKTYFIKOWANEGO MOSZCZU ZAGĘSZCZONEGO (OIV-AS-312-06-ETHANO) – METODA TYPU II

1. ZAKRES ZASTOSOWANIA

Ta metoda umożliwia pomiar stosunku izotopów $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ w winnym alkoholu etylowym i alkoholu etylowym uzyskanym z fermentacji produktów z winorośli (moszczu, moszczu zagęszczonego, rektyfikowanego moszczu zagęszczonego).

2. NORMY REFERENCYJNE

ISO: 5725:1994 „Dokładność (prawdziwość i precyzja) metod pomiarowych oraz wyników: Podstawowa metoda oznaczania powtarzalności i odtwarzalności standardowej metody pomiarowej”.

V-PDB: Vienna-Pee-Dee Belemnite ($R_{\text{PDB}} = 0,0112372$).

Metoda OIV AS-311-O5-ENRRMN „Wykrywanie wzbogacania moszczu gronowych, zagęszczonych moszczów gronowych, rektyfikowanych zagęszczonych moszczów gronowych i win metodą magnetycznego rezonansu jądrowego deuteru (SNIF-NMR)”.

3. TERMINY I DEFINICJE

$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$: stosunek izotopów węgla 13 (^{13}C) do węgla 12 (^{12}C) dla danej próbki.

$\delta^{13}\text{C}$: zawartość węgla 13 (^{13}C) wyrażona w częściach na 1 000 (%).

SNIF-NMR: naturalne frakcjonowanie izotopowe przy wykorzystaniu magnetycznego rezonansu jądrowego.

V-PDB: Vienna-Pee-Dee Belemnite. PDB jest pierwotnym materiałem odniesienia dla pomiaru naturalnej zmienności zawartości izotopu węgla 13, składającą się z węglanu wapnia formacji belemnitowej z okresu kredowego z Południowej Karoliny (USA). Jego stosunek izotopów $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ lub R_{PDB} wynosi 0,0112372. Zasoby PDB są od dawna wyczerpane, lecz pozostają pierwotnym odniesieniem dla wyrażania naturalnej zmienności zawartości izotopu węgla 13, według którego kalibrowany jest materiał odniesienia dostępny w Międzynarodowej Agencji Energii Atomowej (MAEA) w Wiedniu (Austria). Wskazania izotopowe naturalnie występującego węgla 13 są zwyczajowo wyrażane w stosunku do V-PDB.

m/z: stosunek masy do ładunku.

4. ZASADA METODY

Podczas fotosyntezy asymilacja ditlenku węgla przez rośliny odbywa się na zasadzie dwóch głównych rodzajów metabolizmu: metabolizmu C_3 (cykl Calvina) i metabolizmu C_4 (Hatch i Slack). Te dwa mechanizmy fotosyntezy powodują różny typ frakcjonowania izotopów. Produkty roślin C_4 , takie jak cukry i alkohol powstające w wyniku fermentacji, mają wyższe poziomy węgla 13 niż podobne produkty roślin C_3 . Większość roślin, włączając winorośl i buraki cukrowe, należą do grupy roślin C_3 . Trzcina cukrowa i kukurydza należą do grupy C_4 . Pomiar zawartości węgla 13 umożliwia wykrywanie i ocenę cukrów pochodzących z grupy C_4 (trzcina cukrowa lub izoglukoza z kukurydzy) dodanych do produktów winogronowych (moszczu gronowego, win itp.). Informacje na temat zawartości węgla 13 powiązane z informacjami otrzymanymi w wyniku SNIF-NMR umożliwiają ustalenie dodanych ilości mieszanin cukrów lub alkoholi pochodzących z roślin typu C_3 i C_4 .

Zawartość węgla 13 ustalana jest na ditlenku węgla wyprodukowanym podczas całkowitego spalania próbki. Rozpowszechnienie głównych izotopomerów o masach 44 ($^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2$), 45 ($^{13}\text{C}^{16}\text{O}_2$ i $^{12}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O}$) oraz 46 ($^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$), wynikających z różnych możliwych kombinacji izotopów ^{18}O , ^{17}O , ^{16}O , ^{13}C i ^{12}C , ustala się na podstawie prądów jonowych mierzonych przez trzy różne kolektory spektrometru mas izotopów. Udział izotopomerów $^{13}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O}$ i $^{12}\text{C}^{17}\text{O}_2$ może być pominięty pod warunkiem ich niskich poziomów. Prąd jonowy m/z = 45 koryguje się dla składu $^{12}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O}$, który jest obliczany zgodnie z natężeniem prądu dla

$m/z = 46$, przy uwzględnieniu względnego rozpuszczenia ^{18}O i ^{17}O (poprawka Craiga). Porównanie z odniesieniem kalibrowanym względem międzynarodowego odniesienia V-PDB pozwala na obliczenie zawartości węgla 13 na skali względnej $\delta^{13}\text{C}$.

5. ODCZYNNIKI

Materiał oraz paliwo zależą od aparatury (pkt 6) używanej w laboratorium. Układy zwykle stosowane opierają się na analizatorach elementarnych. Te układy mogą być wyposażone tak, aby umożliwić wprowadzenie próbki umieszczonej w zapieczętowanych metalowych kapsułach lub nastrożenie strzykawką przez korek próbek płynnych.

W zależności od rodzaju stosowanych przyrządów następujące materiały odniesienia, odczynniki oraz paliwa mogą być użyte:

- materiały odniesienia
- dostępne z MAEA:

| Nazwa | Materiał | $\delta^{13}\text{C}$ w stosunku do V-PDB (9) |
|-------------|------------|---|
| — IAEA-CH-6 | sacharoza | – 10,4 ‰ |
| — IAEA-CH-7 | polietylen | – 31,8 ‰ |
| — NBS22 | olej | – 29,7 ‰ |
| — USGS24 | grafit | – 16,1 ‰ |

- dostępne z Instytutu Materiałów Odniesienia i Pomiarów (IRMM) w Geel (Belgia):

| Nazwa | Materiał | $\delta^{13}\text{C}$ w stosunku do V-PDB (9) |
|---------------|-------------------------------------|---|
| — CRM/BCR 656 | alkohol winny | – 26,93 ‰ |
| — CRM/BCR 657 | glukoza | – 10,75 ‰ |
| — CRM/BCR 660 | roztwór wodno-alkoholowy (ASV 12 ‰) | – 26,72 ‰ |

- standardowa próbka robocza o znanym stosunku $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ kalibrowana względem międzynarodowych materiałów odniesienia,
- poniżej znajduje się orientacyjny wykaz paliw do układów o przepływie ciągłym:
 - hel do analizy (CAS 07440–59–7),
 - tlen do analizy (CAS 07782–44–7),
 - ditlenek węgla do analizy, używany jako wtórny gaz odniesienia, zawartości węgla 13 (CAS 00124–38–9),
 - odczynnik utleniający do pieców należących do układów spalania, np. tlenek miedzi(II) do analizy elementarnej (CAS 1317–38–0),
 - eksykator w celu eliminowania wody wytworzonej podczas spalania, np. anhydryn do analizy elementarnej (nadchloran magnezu) (CAS 10034–81–8). (Nie jest on niezbędny w przypadku aparatury wyposażonej w układ usuwania wody wykorzystujący łapacze kriogeniczne lub częściowo przepuszczalne rurki kapilarne).

6. APARATURA I SPRZĘT

6.1. Spektrometr masowy do określania stosunku izotopowego (IRMS)

Spektrometr masowy do określania stosunku izotopowego (IRMS), posiadający możliwość określania względnej zawartości ^{13}C w naturalnie występującym gazie CO_2 z wewnętrzną dokładnością do 0,05 ‰ lub lepiej wyrażoną jako wartość względną (pkt 9). Wewnętrzną dokładność określa się tutaj jako różnicę między dwoma pomiarami tej samej próbki CO_2 . Spektrometr mas wykorzystywany do pomiaru stosunków izotopowych jest na ogół wyposażony w potrójny kolektor do równoczesnych pomiarów nateżeń dla $m/z = 44, 45$ oraz 46. Spektrometr masowy do określania stosunku izotopowego musi być wyposażony w podwójny wlot, aby przemiennie mierzyć nieznaną próbkę i próbkę odniesienia, lub wykorzystywać zintegrowany układ, który przeprowadza ilościowe spalanie próbek i oddziela ditlenek węgla od pozostałych produktów spalania przed pomiarem w spektrometrze mas.

6.2. Aparatura do spalania

Aparatura do spalania jest w stanie ilościowo przekonwertować alkohol etylowy w ditlenek węgla i usunąć pozostałe produkty spalania, w tym wodę, bez frakcjonowania izotopowego. Aparatura może być ciągłym układem przepływowym zintegrowanym z aparaturą spektrometrii masowej (pkt 6.2.1) lub oddzielnym układem spalania (pkt 6.2.2). Aparatura musi zapewniać przynajmniej dokładność wskazaną w pkt 11.

6.2.1. Układy o przepływie ciągłym

Na takie składają się analizator elementarny lub chromatograf z bezpośrednim układem spalania.

Następujący sprzęt laboratoryjny jest niezbędny dla układów tak wyposażonych, aby wprowadzać w nie próbki zawarte w metalowych kapsułach:

- kalibrowana mikrostrzykawka lub mikropipeta z odpowiednimi końcówkami,
- waga o dokładności do 1 µg lub dokładniejsza,
- szczypczyki do otoczkowania,
- blaszane kapsuły na próbki płynne,
- blaszane kapsuły na próbki stałe.

Uwaga:

aby ograniczyć ryzyko wyparowania próbek alkoholu etylowego, substancja absorbująca (np. *Chromosorb W 45-60 mesh*) może zostać umieszczona w kapsułach, po uprzednim sprawdzeniu poprzez próbę ślepą, czy nie zawiera znaczących ilości węgla, który mógłby wpłynąć na wyniki.

Następujący sprzęt laboratoryjny jest niezbędny w przypadku korzystania z analizatora elementarnego wyposażonego we wtryskiwacz płynów lub w przypadku spalania chromatograficzny układ przygotowawczy:

- strzykawka do płynów,
- kolby wyposażone w szczelne zamknięcie oraz obojętne chemicznie i nieprzepuszczalne dla gazów korki.

Sprzęt laboratoryjny wskazany w powyższym wykazie jest przykładowy i może być zastąpiony przez urządzenia o podobnym działaniu, w zależności od rodzaju aparatury do spalania i spektrometrii masowej używanej w danym laboratorium.

6.2.2. Oddzielny układ przygotowawczy

Próbki ditlenku węgla powstałe w wyniku spalania próbek do analizy i próbki odniesienia zbierane są w kolbach, które umieszcza się następnie w podwójnym wlocie spektrometru do analizy izotopowej. Można stosować kilka rodzajów aparatury do spalania opisanych w literaturze:

- zamknięty układ spalania wypełniony cyrkulującym tlenem,
- analizator elementarny z przepływem helu i tlenu,
- zapieczętowane kolby szklane wypełnione tlenkiem miedzi(II) jako utleniaczem.

7. PRZYGOTOWANIE PRÓBEK DO BADANIA

Alkohol etylowy musi być ekstrahowany z wina przed badaniem izotopowym. Należy przeprowadzić to poprzez destylację wina jak opisano w pkt 3.1 metody SNIF-NMR (OIV - MA-E-AS311-05-ENRRMN).

W przypadku moszczu gronowego, zagęszczonego moszczu gronowego i rektyfikowanego zagęszczonego moszczu gronowego cukry muszą być najpierw przefermentowane w alkoholu etylowym, jak opisano w pkt 3.2 metody SNIF-NMR (OIV - MA-E-AS311-05-ENRRMN).

8. PROCEDURA

Wszystkie etapy przygotowawcze należy przeprowadzić bez znacznej utraty alkoholu etylowego wskutek parowania, co zmieniłoby skład izotopowy próbek.

Następujący opis dotyczy procedur zwykle stosowanych przy spalaniu próbki alkoholu etylowego, wykorzystujących zautomatyzowane przemysłowe układy spalania. Wszystkie pozostałe metody, które zapewniają, by całość próbki alkoholu etylowego została przetworzona na ditlenek węgla bez żadnej utraty alkoholu etylowego w wyniku parowania, mogą być stosowane w przygotowaniu ditlenku węgla do analizy izotopowej.

Metoda doświadczalna oparta na wykorzystaniu analizatora elementarnego:

a) umieszczanie próbek w kapsułach:

- użyć kapsuły, szczypczyków i tacy przygotowawczej, które muszą być czyste,
- pobrać szczypczykami kapsułę właściwych rozmiarów,
- wprowadzić mikropipetą właściwą ilość płynu do mikrostrzykawki,
- Uwaga:
do otrzymania 2 mg węgla niezbędne jest 3,84 mg czystego alkoholu etylowego lub 4,17 mg destylatu o zawartości alkoholu 92 % m/m. Właściwa ilość destylatu musi zostać obliczona w ten sam sposób, zgodnie z ilością potrzebnego węgla w zależności od czułości aparatury do spektrometrii masowej,
- zamknąć kapsułę szczypczykami,
- każda kapsuła musi być całkowicie zapieczętowana. W przeciwnym razie musi być wyrzucona i należy przygotować nową kapsułę,
- należy przygotować dwie kapsuły dla każdej próbki,
- umieścić kapsuły we właściwym miejscu na tacy automatycznego próbnika analizatora elementarnego. Każdej kapsule należy nadać numer seryjny,
- systematycznie umieszczać kapsuły zawierające robocze substancje odniesienia na początku i końcu serii próbek,
- regularnie wprowadzać próbki kontrolne do serii próbek;

b) sprawdzanie i przygotowanie aparatury do analizy elementarnej i spektrometrii masowej:

- dostosować temperaturę pieców analizatora elementarnego oraz przepływów helu i tlenu do optymalnego spalania próbki,
- sprawdzić układy analizy elementarnej i spektrometrii masowej pod względem przecieków (np. poprzez sprawdzenie prądu jonowego, gdzie $m/z = 28$ dla N_2),
- dostosować spektrometr masowy, w celu pomiarów prądów jonowych dla $m/z = 44, 45$ i 46 ,
- sprawdzić układ wykorzystując znane próbki kontrolne przed rozpoczęciem pomiaru próbek;

c) przeprowadzanie serii pomiarów

Próbki umieszczone na automatycznym próbniku analizatora elementarnego (lub chromatografu) wprowadza się po kolei. Ditlenek węgla ze spalania każdej próbki jest eluowany do spektrometru masowego, który mierzy prądy jonowe. Podłączony komputer rejestruje prądy jonowe i oblicza wartość δ dla każdej próbki (pkt 9).

9. OBLICZANIE

Celem metody jest pomiar stosunku izotopów $^{13}C/^{12}C$ w alkoholu etylowym ekstrahowanym z wina lub produktów pochodzących z winogron w wyniku fermentacji. Stosunek izotopów $^{13}C/^{12}C$ można wyrazić poprzez jego odchylenie od wzorca roboczego. Odchylenie izotopowe węgla 13 ($\delta^{13}C$) jest następnie obliczane na skali delta na tysiąc ($\delta/1000$), poprzez porównanie wyników uzyskanych dla mierzonej próbki z wynikami dla wzorca roboczego wcześniej skalibrowanego na podstawie pierwotnego międzynarodowego materiału odniesienia (V-PDB). Wartości $\delta^{13}C$ wyraża się w odniesieniu do wzorca roboczego jak podano:

$$\delta^{13}C_{\text{próbki/odniesienia}} \text{‰} = 1000 \times (R_{\text{próbki}} - R_{\text{odniesienia}}) / R_{\text{odniesienia}}$$

gdzie $R_{\text{próbki}}$ i $R_{\text{odniesienia}}$ są odpowiednio $^{13}C/^{12}C$ stosunkami izotopowymi próbki i ditlenku węgla użytego jako gaz odniesienia.

Wartości $\delta^{13}\text{C}$ wyrażane są względem V-PDB:

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{próbki/V-PDB}} \text{‰} = \delta^{13}\text{C}_{\text{próbki/odniesienia}} + \delta^{13}\text{C}_{\text{odniesienia/V-PDB}} + (\delta^{13}\text{C}_{\text{próbki/odniesienia}} \times \delta^{13}\text{C}_{\text{odniesienia/V-PDB}}) / 1000$$

gdzie $\delta^{13}\text{C}_{\text{odniesienia/V-PDB}}$ jest wcześniej określonym izotopowym odchyleniem wzorca roboczego od V-PDB.

Małe różnice mogą pojawić się podczas pomiaru bezpośredniego, z uwagi na zmianę stanu przyrządów. W tym przypadku wartości $\delta^{13}\text{C}$ próbek należy skorygować zgodnie z różnicą między mierzoną wartością $\delta^{13}\text{C}$ dla roboczej próbki odniesienia i rzeczywistością, uprzednio skalibrowaną względem V-PDB, poprzez porównanie z jedną z międzynarodowych substancji odniesienia. Między dwoma pomiarami roboczej próbki odniesienia można założyć, że zmienność, a zatem korekta, jaką należy zastosować do wyników uzyskanych z próbek, ma charakter liniowy. Roboczą próbkę odniesienia należy mierzyć na początku i na końcu wszystkich serii próbek. Następnie dla każdej próbki można obliczyć korektę wykorzystując interpolację liniową.

10. ZAPEWNIENIE JAKOŚCI I JEJ KONTROLA

Sprawdzić, czy wartość ^{13}C dla wzorca roboczego nie różni się o więcej niż 0,5 ‰ od dopuszczalnej wartości. W przeciwnym razie ustawienia aparatury spektrometrycznej należy sprawdzić i, jeśli to konieczne, dostosować.

Dla każdej próbki, sprawdzić, czy różnica w wynikach dla dwóch kapsułek mierzonych kolejno jest mniejsza niż 0,3 ‰. Ostateczny wynik dla danej próbki jest średnią wartością dla dwóch kapsułek. Jeśli odchylenie jest większe niż 0,3 ‰, pomiar należy powtórzyć.

Badania prawidłowości pomiarów mogą być oparte na natężeniu prądu jonowego, gdzie $m/z = 44$, który jest proporcjonalny do ilości węgla wprowadzonego do analizatora elementarnego. W normalnych warunkach prąd jonowy powinien być prawie stały dla analizowanych próbek. Istotne odchylenie może wskazywać na parowanie alkoholu etylowego (np. wadliwe zapieczętowanie kapsułek) lub niestabilność analizatora elementarnego lub spektrometru masowego.

11. CHARAKTERYSTYKA SKUTECZNOŚCI METODY (DOKŁADNOŚĆ)

Przeprowadzono wspólne badanie wstępne (pkt 11.1) na destylatach zawierających alkohol pochodzący z winorośli, trzciny cukrowej i buraka, jak również z różnych mieszanin alkoholi tego pochodzenia. Ponieważ to badanie nie uwzględniło procedury destylacyjnej, dalsze informacje z pozostałych badań międzylaboratoryjnych wina (pkt 11.2) i, w szczególności, serii kontroli biegłości (pkt 11.3) dla pomiarów izotopowych zostały również uwzględnione. Wyniki pokazują, że w odpowiednich warunkach, w szczególności tych dotyczących pomiaru wykorzystującego SNIF-NMR, różne układy destylacyjne nie wytwarzają znaczących zmienności w określaniu wartości $\delta^{13}\text{C}$ winnego alkoholu etylowego. Parametry dokładności obserwowane dla wina są niemal identyczne z parametrami uzyskanymi we wspólnym badaniu destylatów (pkt 11.1).

11.1. Wspólne badanie destylatów

Rok testów międzylaboratoryjnych: 1996

Liczba laboratoriów: 20

Liczba próbek: sześć próbek w podwójnym ślepych porównaniu

Analit: $\delta^{13}\text{C}$ alkoholu etylowego

| Kod próbki | Alkohol pochodzenia winnego | Alkohol z buraka | Alkohol z trzciny cukrowej |
|------------|-----------------------------|------------------|----------------------------|
| A & G | 80 % | 10 % | 10 % |
| B & C | 90 % | 10 % | 0 % |
| D & F | 0 % | 100 % | 0 % |
| E & I | 90 % | 0 % | 10 % |
| H & K | 100 % | 0 % | 0 % |
| J & L | 0 % | 0 % | 100 % |

| Próbki | A/G | B/C | D/F | E/I | H/K | J/L |
|--|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Liczba laboratoriów pozostałych po eliminacji wartości skrajnych | 19 | 18 | 17 | 19 | 19 | 19 |
| Liczba akceptowanych wyników | 38 | 36 | 34 | 38 | 38 | 38 |
| Wartość średnia ($\delta^{13}\text{C}$) ‰ | - 25,32 | - 26,75 | - 27,79 | - 25,26 | - 26,63 | - 12,54 |
| S_r^2 | 0,0064 | 0,0077 | 0,0031 | 0,0127 | 0,0069 | 0,0041 |
| Odchylenie standardowe powtarzalności (S_r) ‰ | 0,08 | 0,09 | 0,06 | 0,11 | 0,08 | 0,06 |
| Limit powtarzalności r ($2,8 \times S_r$) ‰ | 0,22 | 0,25 | 0,16 | 0,32 | 0,23 | 0,18 |
| S_R^2 | 0,0389 | 0,0309 | 0,0382 | 0,0459 | 0,0316 | 0,0584 |
| Odchylenie standardowe odtwarzalności (S_R) ‰ | 0,20 | 0,18 | 0,20 | 0,21 | 0,18 | 0,24 |
| Limit odtwarzalności R ($2,8 \times S_R$) ‰ | 0,55 | 0,49 | 0,55 | 0,60 | 0,50 | 0,68 |

11.2. Międzylaboratoryjne badanie na dwóch winach i jednym alkoholu

Rok badań międzylaboratoryjnych: 1996

Liczba laboratoriów: 14 do destylacji wina, z których siedem również mierzyło $\delta^{13}\text{C}$ winnego alkoholu etylowego, osiem do pomiaru $\delta^{13}\text{C}$ próbek alkoholu

Liczba próbek: trzy (białe wino o 9,3 % ASV, białe wino o 9,6 % ASV i zawartości alkoholu 93 % m/m)

Analit: $\delta^{13}\text{C}$ alkoholu etylowego

| Próbki | Czerwone wino | Białe wino | Alkohol |
|---|---------------|------------|---------|
| Liczba laboratoriów | 7 | 7 | 8 |
| Liczba akceptowanych wyników | 7 | 7 | 8 |
| Wartość średnia ($\delta^{13}\text{C}$) ‰ | - 26,20 | - 26,20 | - 25,08 |
| Różnica odtwarzalności S_R^2 | 0,0525 | 0,0740 | 0,0962 |
| Odchylenie standardowe odtwarzalności (S_R) ‰ | 0,23 | 0,27 | 0,31 |
| Limit odtwarzalności R ($2,8 \times S_R$) ‰ | 0,64 | 0,76 | 0,87 |

Uczestniczące laboratoria wykorzystywały różne układy destylacyjne. Oznaczenia izotopowe ($\delta^{13}\text{C}$) przeprowadzone w jednym laboratorium na wszystkich destylatach zwróconych przez uczestników nie wykazują żadnych odchyleń lub wartości, które znacznie różnią się od przeciętnych wartości. Zróżnicowanie w wynikach ($S^2 = 0,0059$) jest porównywalne do średnich różnic powtarzalności S_r^2 w połączonym badaniu destylatów (pkt 11.1).

11.3. Wyniki serii kontroli biegłości wykonywania badań izotopowych

Od grudnia 1994 r. organizowano regularne międzynarodowe badania biegłości dotyczące określania pomiarów izotopowych dla wina i alkoholu (destylaty 96 % ASV). Wyniki umożliwiają uczestniczającym laboratoriom sprawdzenie jakości swoich analiz. Wyniki statystyczne pozwalają na ocenę zróżnicowania pomiarów w warunkach odtwarzalności, a także oszacowanie parametrów odchylenia i limitu odtwarzalności. Wyniki uzyskane dla oznaczania $\delta^{13}\text{C}$ dla wina i destylatu alkoholu etylowego są zestawione w poniższej tabeli:

| Data | Wina | | | | Destylaty | | | |
|----------------|------|-------|---------|------|-----------|-------|---------|------|
| | N | S_R | S_R^2 | R | N | S_R | S_R^2 | R |
| grudzień 1994 | 6 | 0,210 | 0,044 | 0,59 | 6 | 0,151 | 0,023 | 0,42 |
| czerwiec 1995 | 8 | 0,133 | 0,018 | 0,37 | 8 | 0,147 | 0,021 | 0,41 |
| grudzień 1995 | 7 | 0,075 | 0,006 | 0,21 | 8 | 0,115 | 0,013 | 0,32 |
| marzec 1996 | 9 | 0,249 | 0,062 | 0,70 | 11 | 0,278 | 0,077 | 0,78 |
| czerwiec 1996 | 8 | 0,127 | 0,016 | 0,36 | 8 | 0,189 | 0,036 | 0,53 |
| wrzesień 1996 | 10 | 0,147 | 0,022 | 0,41 | 11 | 0,224 | 0,050 | 0,63 |
| grudzień 1996 | 10 | 0,330 | 0,109 | 0,92 | 9 | 0,057 | 0,003 | 0,16 |
| marzec 1997 | 10 | 0,069 | 0,005 | 0,19 | 8 | 0,059 | 0,003 | 0,16 |
| czerwiec 1997 | 11 | 0,280 | 0,079 | 0,78 | 11 | 0,175 | 0,031 | 0,49 |
| wrzesień 1997 | 12 | 0,237 | 0,056 | 0,66 | 11 | 0,203 | 0,041 | 0,57 |
| grudzień 1997 | 11 | 0,127 | 0,016 | 0,36 | 12 | 0,156 | 0,024 | 0,44 |
| marzec 1998 | 12 | 0,285 | 0,081 | 0,80 | 13 | 0,245 | 0,060 | 0,69 |
| czerwiec 1998 | 12 | 0,182 | 0,033 | 0,51 | 12 | 0,263 | 0,069 | 0,74 |
| wrzesień 1998 | 11 | 0,264 | 0,070 | 0,74 | 12 | 0,327 | 0,107 | 0,91 |
| Średnia ważona | | 0,215 | 0,046 | 0,60 | | 0,209 | 0,044 | 0,59 |

N: liczba uczestniczących laboratoriów.

11.4. Limity powtarzalności i odtwarzalności

Na podstawie danych z różnych testów międzylaboratoryjnych podanych w powyższych tabelach, następujące limity powtarzalności i odtwarzalności można ustanowić dla tej metody, włączając etap destylacji:

Limit powtarzalności r : 0,24

Limit odtwarzalności R : 0,6.

11 KWASOWOŚĆ OGÓLNA (OIV - AS-313-01-ACITOT) – METODA TYPU I

1. DEFINICJA

Kwasowość ogólna wina jest sumą jego kwasowości miareczkowych, oznaczanych do pH 7 w odniesieniu do wzorcowego roztworu alkalicznego.

Ditlenek węgla nie wchodzi w skład kwasowości ogólnej.

2. ZASADA METODY

Miareczkowanie potencjometryczne lub miareczkowanie błękitem bromotymolowym jako wskaźnikiem i porównanie z wzorcem o barwie odpowiadającej punktowi końcowemu miareczkowania.

3. ODCZYNNIKI

3.1. Roztwór buforowy o pH 7,0

(orto) fosforan potasu (KH_2PO_4): 107,3 g

M roztwór wodorotlenku sodu (NaOH): 500 ml

woda do: 1 000 ml.

Można użyć buforowych roztworów wzorcowych dostępnych w handlu.

3.2. 0,1 M roztwór wodorotlenku sodu (NaOH).

3.3. Roztwór wskaźnika błękitu bromotymolowego o stężeniu 4 g/l:

błękit bromotymolowy ($\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{Br}_2\text{O}_5\text{S}$) 4 g

obojętny alkohol etylowy, 96 % obj. 200 ml

Rozpuścić i dodać:

wodę pozbawioną CO_2 200 ml

1 M roztwór wodorotlenku sodu

w ilości potrzebnej do uzyskania barwy niebieskozielonej (pH 7) 7,5 ml

woda do 1 000 ml

4. APARATURA

4.1. Pompka wodna.

4.2. Kolba próżniowa o pojemności 500 ml.

4.3. Potencjometr skalowany w wartościach pH i elektrody. Elektroda szklana musi być przechowywana w wodzie destylowanej. Elektroda kalomelowa nasycona chlorkiem potasu musi być przechowywana w nasyconym roztworze chlorku potasu. Najczęściej używana jest elektroda kombinowana: powinna być przechowywana w wodzie destylowanej.

4.4. Cylindry miarowe na 50 ml (wino) i 100 ml (rektyfikowany moszcz zagęszczony).

5. PROCEDURA

5.1. Przygotowanie próbki

5.1.1. Wina

Usunięcie ditlenku węgla. W kolbie próżniowej umieścić około 50 ml wina; podłączyć kolbę do pompki wodnej na jedną do dwóch minut, stale wstrząsając.

5.1.2. Rektyfikowane moszcze zagęszczone

Odważyć dokładnie 200 g rektyfikowanego moszczu zagęszczonego. Uzupelnąć do kreski wodą w ilości 500 ml. Dokładnie wymieszać.

5.2. Miareczkowanie potencjometryczne**5.2.1. Kalibracja pehametru**

Pehametr jest kalibrowany do użycia w temperaturze 20 °C, zgodnie z instrukcją producenta, za pomocą buforu o pH 7,00 w temperaturze 20 °C.

5.2.2. Metoda pomiaru

Do cylindra miarowego (pkt 4.4) wprowadzić próbkę, przygotowaną w sposób opisany w pkt 5.1, o objętości 10 ml w przypadku wina i 50 ml w przypadku rektyfikowanego moszczu zagęszczonego. Dodać około 10 ml wody destylowanej, a następnie za pomocą biurety dodawać 0,1 M roztwór wodorotlenku sodu (pkt 3.2) do uzyskania pH 7 w temperaturze 20 °C. Wodorotlenek sodu należy dodawać powoli, stale mieszając. n ml oznacza objętość zużytego 0,1 M roztworu NaOH.

5.3. Miareczkowanie ze wskaźnikiem (błękit bromotymolowy)**5.3.1. Próba wstępna: oznaczanie barwy roztworu w końcowym punkcie miareczkowania.**

W cylindrze miarowym (pkt 4.4) umieścić 25 ml przegotowanej wody destylowanej, 1 ml roztworu błękitu bromotymolowego (pkt 3.3) oraz próbkę przygotowaną w sposób opisany w pkt 5.1 o objętości 10 ml w przypadku wina i 50 ml w przypadku rektyfikowanego moszczu zagęszczonego. Dodawać 0,1 M roztwór wodorotlenku sodu (pkt 3.2) do zmiany barwy na niebieskozieloną. Następnie dodać 5 ml roztworu buforowego o pH 7 (pkt 3.1).

5.3.2. Oznaczenie

W cylindrze miarowym (pkt 4.4) umieścić 30 ml przegotowanej wody destylowanej, 1 ml roztworu błękitu bromotymolowego (pkt 3.3) oraz próbkę przygotowaną w sposób opisany w pkt 5.1 o objętości 10 ml w przypadku wina i 50 ml w przypadku rektyfikowanego moszczu zagęszczonego. Dodawać 0,1 M roztwór wodorotlenku sodu (pkt 3.2) do uzyskania barwy identycznej z barwą uzyskaną w badaniu wstępnym opisanym powyżej (pkt 5.3.1). n ml oznacza objętość zużytego 0,1 M roztworu NaOH.

6. PRZEDSTAWIANIE WYNIKÓW**6.1. Metoda obliczania****6.1.1. Wina**

Kwasowość ogólna w miliekwiwentach na litr wynosi:

$$A = 10 n$$

Wartość ta jest podawana z dokładnością do jednego miejsca dziesiętnego.

Kwasowość ogólna kwasu winowego w gramach na litr wynosi:

$$A' = 0,075 \times A$$

Wartość ta jest podawana z dokładnością do jednego miejsca dziesiętnego.

6.1.2. Rektyfikowane moszcze zagęszczone

— Kwasowość ogólna w miliekwiwentach na kilogram rektyfikowanego moszczu zagęszczonego wynosi: $a = 5 \times n$

— Kwasowość ogólna w miliekwiwentach na kilogram cukrów ogółem wynosi:

$$A = (500 \times n)/P$$

P = zawartość cukrów ogółem w % (m/m).

Wartość tę podaje się z dokładnością do jednego miejsca dziesiętnego.

6.2. Powtarzalność (r) dla miareczkowania ze wskaźnikiem (pkt 5.3):

$$r = 0,9 \text{ meq/litr}$$

$$r = 0,07 \text{ g kwasu winowego / litr}$$

dla win białych, różowych i czerwonych.

6.3. **Odtwarzalność (R) dla miareczkowania ze wskaźnikiem (pkt 5.3):**

Dla win białych i różowych:

$$R = 3,6 \text{ meq/litr}$$

$$R = 0,3 \text{ g kwasu winowego / litr}$$

Dla win czerwonych:

$$R = 5,1 \text{ meq/litr}$$

$$R = 0,4 \text{ g kwasu winowego / litr}$$

12 KWASOWOŚĆ LOTNA (OIV - AS-313-02-ACIVOL) – METODA TYPU I**1. DEFINICJA**

Kwasowość lotna tworzona jest z kwasów z szeregu kwasu octowego, występujących w winie w formie wolnej i połączonych w sole.

2. ZASADA METODY

Miareczkowanie kwasów lotnych wydzielonych z wina metodą destylacji z parą wodną i miareczkowanie destylatu.

Z wina należy uprzednio usunąć ditlenek węgla.

Kwasowość tworzoną przez wolny i związany ditlenek siarki, oddestylowany w tych warunkach, należy odjąć od kwasowości destylatu.

Należy również odjąć kwasowość tworzoną przez kwas sorbowy, który mógł zostać dodany do wina.

Uwaga:

W destylacie jest obecna część kwasu salicylowego, który w niektórych państwach jest używany do utrwalania wina. Zawartość kwasu salicylowego należy ustalić i odjąć od kwasowości. Metoda oznaczania podana jest w pkt 7 niniejszego rozdziału.

3. ODCZYNNIKI

3.1. Krystaliczny kwas winowy ($C_4H_6O_6$).

3.2. 0,1 M roztwór wodorotlenku sodu (NaOH).

3.3. 1 % roztwór fenoloftaleiny w 96 % obojętnym alkoholu.

3.4. Kwas solny (ρ_{20} = od 1,18 do 1,19 g/ml) rozcieńczony w stosunku 1:4 (v/v).

3.5. 0,005 M roztwór jodu (I_2).

3.6. Krystaliczny jodek potasu (KI).

3.7. Roztwór skrobi o stężeniu 5 g/l.

Zmieszać 5 g skrobi z około 500 ml wody. Doprowadzić do wrzenia, ciągle mieszając, i gotować przez 10 minut. Dodać 200 g chlorku sodu. Ochłodzić i uzupełnić do 1 litra.

3.8. Nasycony roztwór boranu sodu ($Na_2B_4O_7 \times 10 H_2O$), tzn. o stężeniu 55 g/l w temperaturze 20 °C.

4. APARATURA

4.1. Aparatura do destylacji parowej, składająca się z:

1) wytwornicy pary wodnej: para nie może zawierać ditlenku węgla;

2) kolby z przewodem pary;

3) kolumny destylacyjnej;

4) chłodnicy.

To urządzenie musi zostać poddane trzem następującym badaniom:

a) Umieścić w barboterze 20 ml przegotowanej wody. Zebrać 250 ml destylatu i dodać do niego 0,1 M roztworu wodorotlenku sodu (pkt 3.2) i dwie krople roztworu fenoloftaleiny (pkt 3.3). Barwa różowa musi utrzymywać się przez co najmniej 10 sekund (tzn. że para wodna nie zawiera ditlenku węgla).

b) Umieścić w barboterze 20 ml 0,1 M roztworu kwasu octowego. Zebrać 250 ml destylatu. Miareczkować 0,1 M roztworem wodorotlenku sodu (pkt 3.2): objętość roztworu zużytego do miareczkowania musi wynosić co najmniej 19,9 ml (tzn. że co najmniej 99,5 % kwasu octowego zostało oddestylowane z parą wodną).

- c) Umieścić w barbaterze 20 ml 1 M roztworu kwasu mlekowego. Zabrać 250 ml destylatu i miareczkować kwas 0,1 M roztworem wodorotlenku sodu (pkt 3.2).

Objętość roztworu wodorotlenku sodu zużytego do miareczkowania musi być mniejsza lub równa 1,0 ml (tzn. że nie więcej niż 0,5 % kwasu mlekowego zostało oddestylowane).

Każdy zestaw lub metoda, które spełniają wymagania powyższego testu, są zgodne z oficjalnymi międzynarodowymi wymogami dotyczącymi aparatury i metod.

- 4.2. Pompka wodna.

- 4.3. Kolba próżniowa.

5. PROCEDURA

- 5.1. **Przygotowanie próbki: usunięcie ditlenku węgla.**

Umieścić około 50 ml wina w kolbie próżniowej; utworzyć w kolbie stan próżni, podłączając pompkę wodną na jedną do dwóch minut, stale wstrząsając kolbą.

- 5.2. **Destylacja parowa.**

Umieścić 20 ml wina pozbawionego ditlenku węgla w barbaterze w sposób opisany w pkt 5.1. Dodać około 0,5 g kwasu winowego (pkt 3.1). Zebrać co najmniej 250 ml destylatu.

- 5.3. **Miareczkowanie**

Miareczkować 0,1 M roztworem wodorotlenku sodu (pkt 3.2), używając dwóch kropli fenoloftaleiny (pkt 3.3) jako wskaźnika. n ml oznacza zużytą objętość.

Dodać cztery krople kwasu solnego rozcieńczonego w stosunku 1:4 (pkt 3.4), 2 ml roztworu skrobi (pkt 3.3) i kilka kryształów jodku potasu (pkt 3.6). Miareczkować wolny ditlenek siarki za pomocą 0,005 M roztworu jodu (pkt 3.5). n' ml oznacza zużytą objętość.

Dodawac nasycony roztwór boranu sodu (pkt 3.8) do pojawienia się barwy różowej. Miareczkować związany ditlenek siarki za pomocą 0,005 M roztworu jodu (pkt 3.5). n'' ml oznacza zużytą objętość.

6. PRZEDSTAWIANIE WYNIKÓW

- 6.1. **Metoda obliczania**

Kwasowość lotna, wyrażana w miliekwivalentach na litr z dokładnością do jednego miejsca dziesiątego, wynosi:

$$A = 5 (n - 0,1 n' - 0,05 n'')$$

Kwasowość lotna, wyrażana w gramach kwasu octowego na litr z dokładnością do dwóch miejsc dziesiątych, wynosi:

$$0,300 (n - 0,1 n' - 0,05 n'')$$

- 6.2. **Powtarzalność (r)**

$$r = 0,7 \text{ meq/l}$$

$$r = 0,04 \text{ g/litr kwasu octowego.}$$

- 6.3. **Odtwarzalność (R)**

$$R = 1,3 \text{ meq/l}$$

$$R = 0,08 \text{ g/litr kwasu octowego.}$$

- 6.4. **Wino zawierające kwas sorbowy**

Ponieważ przy objętości destylatu wynoszącej 250 ml przechodzi do niego 96 % kwasu sorbowego, kwasowość pochodzącą z kwasu sorbowego należy odjąć od oznaczonej kwasowości lotnej, wiedząc, że 100 mg kwasu sorbowego odpowiada kwasowości 0,89 miliekwivalentów lub 0,053 g kwasu octowego i znając zawartość kwasu sorbowego w mg/ml, ustaloną innymi metodami.

7. OZNACZANIE KWASU SALICYLOWEGO UMIESZCZONEGO W DESTYLACIE POCHODZĄCYM Z KWASOWOŚCI LOTNEJ

- 7.1. **Zasada**

Po określeniu kwasowości lotnej i wprowadzeniu korekty na ditlenek siarki należy stwierdzić obecność kwasu salicylowego, po zakwaszeniu, poprzez fioletowe zabarwienie pojawiające się po dodaniu soli żelaza(III).

Określenie kwasu salicylowego przechodzącego do destylatu z kwasami lotnymi wykonuje się w drugim destylacie, o tej samej objętości, co destylat wykorzystany do oznaczania kwasowości lotnej. W destylacie tym oznacza się kwas salicylowy kolorymetryczną metodą porównawczą. Zawartość kwasu salicylowego odejmuje się od kwasowości lotnej destylatu oznaczonej w destylacie uzyskanym w pierwszej destylacji.

7.2. **Odczynniki**

- 7.2.1. Kwas solny (HCl) (ρ_{20} = od 1,18 do 1,19 g/l).
- 7.2.2. 0,1 M roztwór tiosiarczanu sodu ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$).
- 7.2.3. 10 % (m/v) roztwór siarczanu amonu żelaza(III) [$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \times (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \times 24 \text{H}_2\text{O}$].
- 7.2.4. 0,01 M roztwór salicylanu sodu. Roztwór salicylanu sodu ($\text{NaC}_7\text{H}_5\text{O}_3$) o stężeniu 1,60 g/l.

7.3. **Procedura**

7.3.1. *Identyfikacja kwasu salicylowego w destylacie kwasowości lotnej*

Natychmiast po oznaczeniu kwasowości lotnej i wprowadzeniu korekty na zawartość wolnego i związanego ditlenku siarki do kolby stożkowej odmierzyć 0,5 ml kwasu solnego (pkt 7.2.1), 3 ml 0,1 M roztworu tiosiarczanu sodu (pkt 7.2.2) i 1 ml roztworu siarczanu amonu żelaza(III) (pkt 7.2.3).

Barwa fioletowa świadczy o obecności kwasu salicylowego.

7.3.2. *Oznaczanie kwasu salicylowego*

Na kolbie stożkowej opisanej powyżej zaznaczyć kreską objętość destylatu. Kolbę opróżnić i przepłukać.

Przeprowadzić destylację parową następnej badanej próbki wina o objętości 20 ml i zebrać destylat do kolby stożkowej do kreski. Dodać 0,3 ml czystego kwasu solnego (pkt 7.2.1) i 1 ml roztworu siarczanu amonu żelaza(III) (pkt 7.2.3). Zawartość kolby stożkowej zabarwi się na fioletowo.

Do kolby stożkowej, identycznej jak kolba z zaznaczoną kreską, nalać wodę destylowaną w ilości równej ilości destylatu. Dodać 0,3 ml czystego kwasu solnego (pkt 7.2.1) i 1 ml roztworu siarczanu amonu żelaza(III) (pkt 7.2.3). Za pomocą biurety wprowadzać 0,01 M roztwór salicylanu sodu (pkt 7.2.4) do uzyskania barwy fioletowej o natężeniu odpowiadającym barwie roztworu w kolbie zawierającej destylat wina.

n'' ml oznacza objętość zużytego roztworu.

7.4. **Korekta kwasowości lotnej**

Od objętości n ml 0,1 M roztworu wodorotlenku sodu, zużytego do miareczkowania kwasów w destylacie podczas oznaczania kwasowości lotnej, odjąć objętość $0,1 \times n''$ ml.

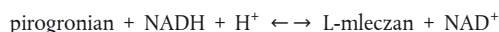
13 KWAS CYTRYNOWY (OIV -AS-313-09-ACIENZ) – METODA TYPU II

1. ZASADA METODY

Kwas cytrynowy przekształca się w oksaloocetan i octan w reakcji katalizowanej przez liazę cytrynianową (CL):



W obecności dehydrogenazy jabłczanowej (MDH) i dehydrogenazy mleczanowej (LDH) oksaloocetan i jego dekarboksylowana pochodna, pirogronian, są redukowane do L-jabłczanu i L-mleczanu przez zredukowany dinukleotyd nikotynamido-adeninowy (NADH):



Ilość utlenionego dinukleotydu nikotynamido-adeninowego NAD⁺ do NADH w powyższej reakcji jest proporcjonalna do ilości obecnego cytrynianu. Utlenienie NADH ustala się poprzez pomiar spadku absorbancji przy długości fali 340 nm.

2. ODCZYNNIKI

2.1. Roztwór buforowy o pH 7,8

(0,51 M glicyloglicyna; pH = 7,8; Zn²⁺: 0,6 × 10⁻³M):

Rozpuścić 7,13 g glicyloglicyny w około 70 ml wody podwójnie destylowanej.

Doprowadzić pH do 7,8 za pomocą około 13 ml 5 M roztworu wodorotlenku sodu, dodać 10 ml roztworu chlorku cynkowego (ZnCl₂ 80 mg w 100 ml H₂O) i uzupełnić do 100 ml wodą podwójnie destylowaną.

Roztwór ten jest trwały przez co najmniej 4 tygodnie w temperaturze 4 °C.

2.2. Roztwór zredukowanego dinukleotydu nikotynamido-adeninowego (NADH) (około 6 × 10⁻³ M): rozpuścić 30 mg NADH i 60 mg NaHCO₃ w 6 ml wody podwójnie destylowanej.

2.3. Roztwór dehydrogenazy jabłczanowej i dehydrogenazy mleczanowej (MDH/LDH, 0,5 mg/ml MDH, 2,5 mg/ml LDH):

zmieszać 0,1 ml roztworu MDH (5 mg/ml MDH), 0,4 ml roztworu siarczanu amonowego (3,2 M) i 0,5 ml LDH (5 mg/ml). Zawiesina ta jest trwała przez co najmniej rok w 4 °C.

2.4. Liaza cytrynianowa (CL, 5 mg/ml białka): rozpuścić 168 mg liofilizatu w 1 ml lodowato zimnej wody. Roztwór ten jest trwały przez co najmniej tydzień w 4 °C i przez co najmniej cztery tygodnie w stanie zamrożenia.

Zaleca się sprawdzenie aktywności enzymów przed wykonaniem oznaczania.

2.5. Poliwinylpolipirolidon (PVPP)

Uwaga: wszystkie wyżej wymienione odczynniki są dostępne w handlu.

3. APARATURA

3.1. Spektrofotometr umożliwiający pomiar przy długości fali 340 nm, przy której NADH ma maksimum absorpcji.

Jeżeli spektrofotometr taki nie jest dostępny, można użyć spektrofotometru o źródle widma nieciągłego, umożliwiający pomiar przy 334 nm lub 365 nm. Ponieważ w oznaczeniu mierzy się bezwzględną absorbancję (tzn. nie wykorzystuje się krzywych wzorcowych, natomiast przeprowadza się standaryzację, uwzględniając współczynnik ekstynkcji NADH), należy sprawdzić zakres długości fali i absorbancję widmową aparatu.

3.2. Kuwety szklane o drodze optycznej 1 cm lub kuwety jednorazowego użytku.

3.3. Mikropipety do pipetowania wielkości w zakresie 0,02—2 ml.

4. PRZYGOTOWANIE PRÓBK

Oznaczanie cytrynianu przeprowadza się zwykle bezpośrednio w winie, bez uprzedniego usuwania związków barwnych (zabarwienia) i bez rozcieńczania, o ile zawartość kwasu cytrynowego wynosi poniżej 400 mg/l. W przeciwnym przypadku wino należy rozcieńczyć do uzyskania zawartości cytrynianu od 20 do 400 mg/l (tzn. zawartość cytrynianu w badanej próbce wynosi 5-80 µg).

Jeżeli wina czerwone zawierają duże ilości składników fenolowych, zaleca się poddanie ich obróbce za pomocą PVPP:

wykonać zawiesinę około 0,2 g PVPP w wodzie i odstawić na 15 minut. Przefiltrować przez sączek karbowany.

Umieścić 10 ml wina w kolbie stożkowej o pojemności 50 ml, dodać wilgotną PVPP usuniętą łopatką z sączka. Potrząsać przez dwie do trzech minut. Przefiltrować.

5. PROCEDURA

Za pomocą spektrofotometru z długością fali ustawionej na 340 nm oznaczyć absorbancję przy użyciu jednocentymetrowych kuwet i w stosunku do powietrza jako wzorca o zerowej absorbancji (bez kuwety na drodze światła). W jednocentymetrowych kuwetach umieścić:

| | Odniesienie | Oznaczenie |
|----------------------------|-------------|------------|
| Roztwór 2.1 | 1,00 ml | 1,00 ml |
| Roztwór 2.2 | 0,10 ml | 0,10 ml |
| Próbka | — | 0,20 ml |
| Woda podwójnie destylowana | 2,00 ml | 1,80 ml |
| Roztwór 2.3 | 0,02 ml | 0,02 ml |

Wymieszać i po około 5 minutach odczytać absorbancję roztworów w kuwecie odniesienia i w kuwecie z próbką (A_1).

Dodać:

| | | |
|-------------|---------|---------|
| Roztwór 2.4 | 0,02 ml | 0,02 ml |
|-------------|---------|---------|

Wymieszać, pozostawić do zakończenia reakcji (około pięć minut) i odczytać absorbancję roztworów w kuwecie odniesienia i w kuwecie z próbką (A_2).

Obliczyć różnice absorbancji (A_1-A_2) dla kuwety odniesienia i kuwety z próbką.

Na koniec obliczyć różnicę między tymi różnicami:

$$\Delta A = \Delta A_D - \Delta A_T$$

Uwaga: Czas niezbędny do całkowitego przebiegu reakcji enzymatycznej może być różny dla kolejnych serii oznaczeń. Powyższa wartość jest podana tylko jako wskazówka i zaleca się, aby była oznaczana dla każdej serii.

6. PRZEDSTAWIANIE WYNIKÓW

Zawartość kwasu cytrynowego podaje się w miligramach na litr w zaokrągleniu do liczby całkowitej.

6.1. Metoda obliczania

Ogólny wzór obliczania zawartości kwasu cytrynowego w mg/l jest następujący:

$$C = [(V \times M) / (\epsilon \times d \times v)] \times \Delta A$$

gdzie

V = objętość badanego roztworu w ml (tu 3,14 ml)

v = objętość próbki w ml (w niniejszym przykładzie 0,2 ml)

M = masa cząsteczkowa oznaczanej substancji (w niniejszym przykładzie dla bezwodnego kwasu cytrynowego $M = 192,1$)

d = droga optyczna kuwety w cm (w niniejszym przykładzie 1 cm)

ϵ = współczynnik absorbancji NADH, przy 340 nm

$\epsilon = 6,3 \text{ mmole}^{-1} \times 1 \times \text{cm}^{-1}$.

a więc

$$C = 479 \times \Delta A$$

Jeżeli próbka została rozcieńczona podczas jej przygotowywania, pomnożyć wynik przez współczynnik rozcieńczania.

Uwaga: przy 334 nm: $C = 488 \times \Delta A$ ($\epsilon = 6,2 \text{ mmole}^{-1} \times 1 \times \text{cm}^{-1}$)

przy 365 nm: $C = 887 \times \Delta A$ ($\epsilon = 3,4 \text{ mmole}^{-1} \times 1 \times \text{cm}^{-1}$)

6.2. Powtarzalność (r)

Stężenie kwasu cytrynowego poniżej 400 mg/l: $r = 14$ mg/l.

Stężenie kwasu cytrynowego powyżej 400 mg/l: $r = 28$ mg/l.

6.3. Odtwarzalność (R)

Stężenie kwasu cytrynowego poniżej 400 mg/l: $R = 39$ mg/l.

Stężenie kwasu cytrynowego powyżej 400 mg/l: $R = 65$ mg/l.

14 KWAS SORBOWY (OIV - AS-313-14-ACISOR) – METODA TYPU IV

1. ZASADA METODY

1.1. **Oznaczanie metodą spektrofotometrii absorpcji w ultrafiolecie**

Kwas sorbowy (kwas trans, trans, 2,4-heksadienowy), wyekstrahowany metodą destylacji parowej jest oznaczany w destylacie wina metodą spektrofotometrii w ultrafiolecie. Substancje, które zakłócają pomiar w ultrafiolecie, usuwa się poprzez odparowanie do sucha z zastosowaniem lekko alkalicznego wodorotlenku wapnia. Do potwierdzenia wyniku przy zawartości kwasu sorbowego w ilości poniżej 20 mg/l, stosuje się chromatografię cienkowarstwową (1 mg/l).

1.2. **Oznaczanie metodą chromatografii gazowej**

Kwas sorbowy, wyekstrahowany eterem etylowym, oznaczany jest metodą chromatografii gazowej z wzorcem wewnętrznym.

1.3. **Wykrywanie ilości śladowych metodą chromatografii cienkowarstwowej**

Kwas sorbowy, wyekstrahowany eterem etylowym, jest separowany metodą chromatografii cienkowarstwowej, a jego zawartość jest oznaczana półilościowo.

2. OZNACZANIE METODĄ SPEKTROFOTOMETRII ABSORPCJI W ULTRAFIOLECIE

2.1. **Odczynniki**

2.1.1. Krystaliczny kwas winowy ($C_4H_6O_6$).

2.1.2. roztwór około 0,02 M wodorotlenku wapnia $Ca(OH)_2$

2.1.3. Wzorcowy roztwór kwasu sorbowego 20 mg/l

Rozpuścić 20 mg kwasu sorbowego $C_6H_8O_2$ w około 2 ml 0,1 M roztworu wodorotlenku sodu. Przenieść do kolby miarowej na 1 000 ml i uzupełnić wodą do kreski. Można również rozpuścić 26,8 mg sorbinianu potasu $C_6H_7KO_2$ w wodzie i uzupełnić wodą do 1 000 ml.

2.2. **Aparatura**

2.2.1. Aparatura do destylacji parowej (patrz rozdział „Kwasowość lotna”).

2.2.2. Łaźnia wodna o temperaturze 100 °C.

2.2.3. Spektrofotometr umożliwiający pomiar chłonności przy 256 nm, wyposażony w kuwety kwarcowe o drodze optycznej 1 cm.

2.3. **Procedura**2.3.1. *Destylacja*

W kolbie aparatu do destylacji z parą wodną umieścić 10 ml wina i dodać 1—2 g kwasu winowego (pkt 2.1.1). Zebrać 250 ml destylatu.

2.3.2. *Przygotowanie krzywej wzorcowej*

Rozcieńczając roztwór wzorcowy (pkt 2.1.3) przygotować cztery rozcieńczone roztwory wzorcowe, zawierające odpowiednio 0,5, 1, 2,5 i 5 mg kwasu sorbowego w litrze. Zmierzyć absorbancję roztworów za pomocą spektrofotometru przy 256 nm z wodą destylowaną jako próbą ślepą. Wykreślić krzywą obrazującą zróżnicowanie absorbancji jako funkcję stężenia. Zróżnicowanie ma charakter liniowy.

2.3.3. *Oznaczanie*

W parownicy o średnicy 55 mm umieścić 5 ml destylatu, dodać 1 ml roztworu wodorotlenku wapnia (pkt 2.1.2). Odparować do sucha na łaźni wodnej.

Pozostałość rozpuścić w kilku mililitrach wody destylowanej, przenieść w całości do kolby miarowej o pojemności 20 ml i uzupełnić do kreski wodą. Zmierzyć absorbancję przy 256 nm, używając spektrofotometru w stosunku do próby ślepej składającej się z roztworu otrzymanego przez rozcieńczenie wodą 1 ml roztworu wodorotlenku wapnia (pkt 2.1.2) do objętości 20 ml.

Znaleźć zmierzoną wartość absorbancji na krzywej wzorcowej i odczytać zawartość C kwasu sorbowego w roztworze.

Uwaga: W tej metodzie można pominąć straty następujące w wyniku odparowania i dokonać pomiaru absorbancji w poddanym obróbce destylacie, rozcieńczonym o 1/4 wodą destylowaną.

2.4. Przedstawianie wyników**2.4.1. Metoda obliczania**

Zawartość kwasu sorbowego w winie, wyrażana w mg na litr, wynosi

$$100 \times C$$

gdzie C = zawartość kwasu sorbowego w roztworze, którego użyto do pomiaru spektrofotometrycznego, wyrażona w mg na litr.

3. OZNACZANIE METODĄ CHROMATOGRAFII GAZOWEJ**3.1. Odczynniki**

3.1.1. Eter etylowy (C₂H₅)₂O destylowany przed użyciem.

3.1.2. Roztwór wzorca wewnętrzznego: roztwór kwasu undekanowego C₁₁H₂₂O₂ w 95 % obj. alkoholu etylowego o stężeniu 1 g/l.

3.1.3. Roztwór wodny kwasu siarkowego H₂SO₄ (ρ₂₀ = 1,84 g/ml), rozcieńczony w stosunku 1:3 (v/v).

3.2. Aparatura

3.2.1. Chromatograf gazowy wyposażony w detektor płomieniowo-jonizacyjny i kolumnę ze stali kwasoodpornej (4 m × 1/8 cala), poddaną uprzednio obróbce dimetylodichlorosilanem i z fazą stacjonarną składającą się z mieszaniny bursztynianu glikolu dietylenowego (5 %) i kwasu fosforowego (1 %) (DEGS — H₃PO₄) lub mieszaniny adypinianu glikolu dietylenowego (7 %) i kwasu fosforowego (1 %) (DEGA — H₃PO₄) osadzoną na nośniku Gaschrom Q 80—100 mesh.

Obróbka kolumny za pomocą dimetylodichlorosilanu (DMDCS) — przepuścić przez kolumnę roztwór zawierający 2—3 g DMDCS w toluenie. Natychmiast przemyć metanolem i przepłukać azotem, następnie przemyć heksanem i ponownie przepłukać większą ilością azotu. Kolumna jest teraz gotowa do wypełniania.

Warunki działania:

Temperatura pieca: 175 °C.

Temperatura komory nastrzyku i detektora: 230 °C.

Gaz nośny: azot (szybkość przepływu = 20 ml/min).

3.2.2. Mikrostrzykawka, pojemność 10 µl, skalowana co 0,1 µl.

Uwaga: Można wykorzystać inne rodzaje kolumn, dające dobrą separację, szczególnie kolumny kapilarne (np. FFAP).

Metoda oznaczania podana jest jako przykład.

3.3. Procedura**3.3.1. Przygotowanie badanej próbki**

Do szklanej probówki o objętości około 40 ml i zamykanej korkiem szklanym ze szlifem odmierzyć 20 ml wina, dodać 2 ml roztworu wzorca wewnętrznego (pkt 3.1.2) i 1 ml rozcieńczonego kwasu siarkowego (pkt 3.1.3).

Po zmieszaniu roztworów poprzez kilkakrotne odwracanie probówki dnem do góry dodać 10 ml eteru etylowego (pkt 3.1.1). Wyekstrahować kwas sorbowy do fazy organicznej, wstrząsając probówką przez 5 minut. Pozostawić do dekantacji.

3.3.2. Przygotowanie roztworu wzorcowego

Wybrać wino, którego chromatogram ekstraktu eterowego nie wykazuje piku odpowiadającego kwasowi sorbowemu. Do tego wina dodać kwas sorbowy w ilości 100 mg na litr. 20 ml tak przygotowanej próbki poddać obróbce zgodnie z procedurą określoną w pkt 3.3.1.

3.3.3. Chromatografia

Za pomocą mikrostrzykawki wprowadzić do chromatografu kolejno 2 µl fazy ekstraktu eterowego otrzymanej w pkt 3.3.2 i 2 µl fazy ekstraktu eterowego otrzymanej w pkt 3.3.1.

Zapisać odpowiednie chromatogramy: sprawdzić zgodność czasów retencji kwasu sorbowego i wzorca wewnętrznego. Zmierzyć wysokość (lub powierzchnię) każdego zarejestrowanego piku.

3.4. Przedstawianie wyników**3.4.1. Metoda obliczania**

Zawartość kwasu sorbowego w analizowanym winie, wyrażana w mg na litr, wynosi:

$$100 \times (h/H) \times (l/i)$$

gdzie

H = wysokość piku kwasu sorbowego w roztworze wzorcowym

h = wysokość piku kwasu sorbowego w analizowanej próbce

l = wysokość piku wzorca wewnętrznego w roztworze wzorcowym

i = wysokość piku wzorca wewnętrznego w analizowanej próbce

Uwaga: Zawartość kwasu sorbowego można obliczyć w podobny sposób, wykorzystując powierzchnie odpowiednich pików.

15 PH (OIV - AS-313-15-PH) – METODA TYPU I

1. ZASADA

Mierzona jest różnica potencjału między dwoma elektrodami zanurzonymi w badanej cieczy. Jedna z tych elektrod wykazuje potencjał, który jest funkcją wartości pH cieczy, natomiast druga wykazuje stały i znany potencjał i stanowi elektrodę odniesienia.

2. APARATURA

2.1. **Pehametr, wyskalowany w jednostkach pH i umożliwiający pomiar z dokładnością co najmniej $\pm 0,05$ jednostki pH.**2.2. **Elektrody:**

2.2.1. elektroda szklana, przechowywana w wodzie destylowanej,

2.2.2. kalomelowa nasycona chlorkiem potasu elektroda odniesienia, przechowywana w nasyconym roztworze chlorku potasu,

2.2.3. lub elektroda kombinowana, przechowywana w wodzie destylowanej.

3. ODCZYNNIKI

3.1. **Roztwory buforowe:**

3.1.1. Nasycony roztwór wodorowinianu potasu zawierający co najmniej 5,7 g wodorowinianu potasu w litrze ($C_4H_5K_2O_6$) w temperaturze 20 °C. Roztwór ten można przechowywać do 2 miesięcy, dodając 0,1 g tymolu na 200 ml.

$$\text{pH} \left\{ \begin{array}{l} 3,57 \text{ w } 20 \text{ }^\circ\text{C} \\ 3,56 \text{ w } 25 \text{ }^\circ\text{C} \\ 3,55 \text{ w } 30 \text{ }^\circ\text{C} \end{array} \right.$$

3.1.2. 0,05 M roztwór wodoroftalanu potasu zawierający 10,211 g wodoroftalanu potasu ($C_8H_5KO_4$) w litrze w temperaturze 20 °C. (Maksymalny okres przechowywania: dwa miesiące.)

$$\text{pH} \left\{ \begin{array}{l} 3,999 \text{ w } 15 \text{ }^\circ\text{C} \\ 4,003 \text{ w } 20 \text{ }^\circ\text{C} \\ 4,008 \text{ w } 25 \text{ }^\circ\text{C} \\ 4,015 \text{ w } 30 \text{ }^\circ\text{C} \end{array} \right.$$

3.1.3. Roztwór zawierający:

| | |
|--|---------|
| fosforan monopotasowy KH_2PO_4 | 3,402 g |
| fosforan dipotasowy K_2HPO_4 | 4,354 g |
| woda do | 1 l |

(Maksymalny okres przechowywania: 2 miesiące.)

$$\text{pH} \left\{ \begin{array}{l} 6,90 \text{ w } 15 \text{ }^\circ\text{C} \\ 6,88 \text{ w } 20 \text{ }^\circ\text{C} \\ 6,86 \text{ w } 25 \text{ }^\circ\text{C} \\ 6,85 \text{ w } 30 \text{ }^\circ\text{C} \end{array} \right.$$

Uwaga: Można użyć buforowych roztworów wzorcowych dostępnych w handlu.

4. PROCEDURA
- 4.1. **Przygotowanie badanej próbki**
- 4.1.1. *Moszcze i wina:*
bezpośrednio użyć moszczu lub wina.
- 4.1.2. *Rektyfikowane moszcze zagęszczone:*
rozcieńczyć rektyfikowany moszcz zagęszczony wodą do zawartości $25 \pm 0,5$ % (m/m) cukrów ogółem (25 °Brix).
Jeżeli P oznacza procentową zawartością (m/m) cukrów ogółem w rektyfikowanym moszczu zagęszczonym, odważyć masę równą $2\ 500/P$ i uzupełnić wodą do 100 g. Użyta woda musi mieć przewodność elektryczną poniżej 2 mikrosimensów na centymetr.
- 4.2. **Zerowanie aparatu**
Zerowanie należy przeprowadzić przed każdym pomiarem, zgodnie z instrukcją dołączoną do aparatu.
- 4.3. **Kalibracja pehametru**
Wyskalować pehametr w temperaturze 20 °C, stosując roztwory buforowe o pH 6,88 i 3,57 i o temperaturze 20 °C.
Do sprawdzenia kalibracji skali użyć roztworu buforowego o pH 4,00 i o temperaturze 20 °C.
- 4.4. **Oznaczanie**
Zanurzyć elektrodę w badanej próbce, której temperatura powinna wynosić 20—25 °C i możliwie jak najmniej odbiegać od 20 °C. Odczytać wartość pH bezpośrednio ze skali.
Przeprowadzić co najmniej dwa oznaczenia tej samej próbki.
Wynik końcowy stanowi średnią arytmetyczną oznaczeń.
5. PRZEDSTAWIENIE WYNIKÓW
Wartość pH moszczów, wina lub roztworu rektyfikowanego moszczu zagęszczonego o stężeniu 25 % (m/m) (25 °Brix) podawać z dokładnością do dwóch miejsc dziesiętnych.

16 RÓWNOCZESNE OZNACZANIE ZAWARTOŚCI KWASU L-ASKORBINOWEGO I KWASU D-IZOASKORBINOWEGO (OIV-AS-313-22-ACASCO) – METODA TYPU II**1. WPROWADZENIE**

Kwas askorbinowy jest naturalnym przeciwutleniaczem znajdującym się w wielu produktach spożywczych. Normalna ilość kwasu askorbinowego w winogronach maleje w trakcie sporządzania moszczu oraz podczas procesu produkcji wina. Może być dodany do moszczów i win w ograniczonych ilościach.

Opisana metoda została zatwierdzona w ramach badań międzylaboratoryjnych poprzez badania próbek wina z dodatkiem kwasu L-askorbinowego i D-izoaskorbinowego odpowiednio w ilościach od 30 mg/l do 150 mg/l i od 10 mg/l do 100 mg/l.

2. ZAKRES METODY

Metoda ta jest odpowiednia do równoczesnego oznaczania zawartości kwasu L-askorbinowego i D-izoaskorbinowego (kwasu erytorbinowego) w winie metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej i oznaczania UV w zakresie od 3 do 150 mg/l.

Przy zawartości wyższej od 150 mg/l konieczne jest rozcieńczenie próbki.

3. ZASADA METODY

Próbki są bezpośrednio wstrzykiwane do urządzenia do HPLC po przefiltrowaniu przez filtr strzykawkowy. Anality są oddzielane w kolumnie o fazie odwróconej i są poddane oznaczeniu UV przy 266 nm. Kwas L-askorbinowy i kwas D-izoaskorbinowy są wykrywane i ilościowo oznaczane metodą standardu zewnętrznego.

Uwaga: Kolumny i warunki działania podane są tytułem informacji. Inne rodzaje kolumn mogą również zapewniać właściwy rozdział.

4. ODCZYNNIKI I PRODUKTY**4.1 Odczynniki**

4.1.1 n-oktyloamina o czystości $\geq 99,0$ %

4.1.2 Octan sodowy $\times 3 \text{ H}_2\text{O}$ o czystości $\geq 99,0$ %

4.1.3 Czysty kwas octowy 100 %

4.1.4 Kwas fosforowy o stężeniu 25 %

4.1.5 Kwas szczawiowy o czystości $\geq 99,0$ %

4.1.6 Askorbinian oksydazy

4.1.7 Kwas L-askorbinowy ultra $\geq 99,5$ %

4.1.8 Kwas D-izoaskorbinowy o czystości $\geq 99,0$ %

4.1.9 Woda podwójnie destylowana

4.1.10 Metanol p.A. 99,8 %

4.2 Przygotowanie fazy ruchomej

4.2.1 Roztwory do fazy ruchomej

Przygotować następujące roztwory do fazy ruchomej:

4.2.1.1 12,93 g n-oktyloaminy w 100 ml metanolu

4.2.1.2 68,05 g octanu sodowego $\times 3 \text{ H}_2\text{O}$ w 500 ml wody podwójnie destylowanej

4.2.1.3 12,01 g czystego kwasu octowego w 200 ml wody podwójnie destylowanej

4.2.1.4 Roztwór buforowy o pH 5,4: 430 ml roztworu octanu sodowego (pkt 4.2.1.2) i 70 ml roztworu kwasu octowego (pkt 4.2.1.3).

4.2.2 Przygotowanie fazy ruchomej

W zlewce dodać 5 ml roztworu n-oktyloaminy (pkt 4.2.1.1) do około 400 ml wody podwójnie destylowanej. Doprowadzić pH roztworu do wartości między 5,4 a 5,6 dodając po kropli kwas fosforowy o stężeniu 25 % (pkt 4.1.4). Dodać 50 ml roztworu buforowego (pkt 4.2.1.4) i przenieść mieszaninę do kolby miarowej na 1 000 ml i uzupełnić wodą podwójnie destylowaną. Przed wykorzystaniem faza ruchoma powinna być przefiltrowana przez filtr (regenerowana celuloza o grubości 0,2 µm) i w miarę możliwości odgazowana za pomocą helu (przez około 10 minut) zgodnie z wymaganiami stosowanego urządzenia do HPLC.

4.3 Przygotowanie roztworu wzorcowego

Uwaga:

Wszystkie roztwory wzorcowe (roztwór macierzysty 4.3.1 i roztwory robocze 4.3.2) powinny być przygotowywane każdego dnia i w miarę możliwości przechowywane w lodówce przed wstrzyknięciem

4.3.1 Przygotowanie roztworu macierzystego (1 mg/ml)

Przygotować wodny roztwór kwasu szczawowego o stężeniu 2 % i usunąć rozpuszczony tlen przez barbotowanie azotem.

Dokładnie odważyć 100 mg kwasu L-askorbinowego i 100 mg kwasu D-izoaskorbinowego w kolbie miarowej na 100 ml i uzupełnić wodnym roztworem kwasu szczawowego o stężeniu 2 %.

4.3.2 Przygotowanie roztworów roboczych

W celu uzyskania roztworów roboczych należy rozcieńczyć roztwór macierzysty (pkt 4.3.1) do pożądaných stężeń roztworem kwasu szczawowego o stężeniu 2 %. Zaleca się stężenia pomiędzy 10 a 120 mg/l. Na przykład 100 µl, 200 µl, 400 µl, 800 µl, 1 200 µl w 10 ml odpowiada 10, 20, 40, 80 et 120 mg/l.

5. APARATURA

Zwykła aparatura laboratoryjna, w szczególności:

5.1 Pompa HPLC

5.2 Pętla dozownika o pojemności 20 µl

5.3 Detektor UV

6. BADANIE PRÓBEK

Przed nastrzykiem próbki wina są filtrowane przez filtr strzykawkowy o średnicy porów 0,2 µm.

Przy stężeniach powyżej 150 mg/l potrzebne jest rozcieńczenie próbki.

7. PROCEDURA

7.1 Warunki stosowania systemu HPLC

Wstrzyknąć do chromatografu 20 µl próbki przefiltrowanej przez filtr strzykawkowy.

Prekolumna: na przykład Nucléosil 120 C18 (4 cm × 4 mm × 7 µm)

Kolumna: na przykład Nucléosil 120 C18 (25 cm × 4 mm × 7 µm)

Ilość wstrzykiwana: 20 µl

Faza ruchoma: patrz pkt 4.2.2, izokratyczna

Przepływ: 1 ml/min

Detektor UV: 266 nm

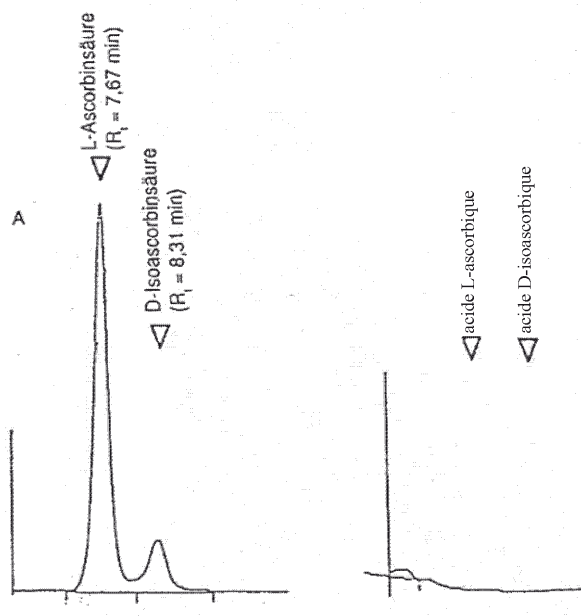
Cykl przepłukiwania: co najmniej 30 ml wody podwójnie destylowanej, potem 30 ml metanolu i 30 ml acetonitrylu

7.2 Identyfikacja

Identyfikacji pików dokonuje się poprzez porównanie czasów retencji wzorców i próbek. W opisanym systemie chromatograficznym czasy retencji wynoszą odpowiednio 7,7 min dla kwasu L-askorbinowego i 8,3 min dla kwasu D-izoaskorbinowego (patrz rys. 1, chromatogram A).

Aby potwierdzić obecność kwasów należy do próbki dodać łąpkę askorbinianu oksydazy i ponownie dokonać nastrzyków (patrz rys. 1, chromatogram B).

Ze względu na rozpad kwasu L-askorbinowego i kwasu D-izoaskorbinowego spowodowany askorbinianem oksydazy, nie powinno być żadnego sygnału w czasie retencji L-askorbinowego i kwasu D-izoaskorbinowego. W przypadku wykrycia pików zakłócających, ich powierzchnię należy uwzględnić przy obliczaniu stężenia analitów.



Rysunek 1

Przykład chromatografu wina białego: A przed dodaniem askorbinianu oksydazy; B po dodaniu askorbinianu oksydazy (Opis rysunku: Kwas L-askorbinowy, kwas D-izoaskorbinowy)

Uwaga: Zaleca się badanie próbek z dodatkiem askorbinianu oksydazy na koniec sekwencji, po której następuje cykl przepłukiwania w celu usunięcia pozostałości askorbinianu oksydazy z kolumny, z powodu czego kwas L-askorbinowy i D-izoaskorbinowy mógłby zostać zmieniony przez pozostałości askorbinianu oksydazy w trakcie pomiarów HPLC, a co za tym mieć wpływ na wyniki.

8. OBLICZANIE

Przygotować krzywą wzorcową na podstawie roztworów roboczych (pkt 4.3.2). Zgodnie z metodą standardu zewnętrznego, oznaczania ilościowego kwasu L-askorbinowego i kwasu D-izoaskorbinowego dokonuje się poprzez pomiar powierzchni pików i ich porównania z odpowiednim stężeniem na krzywej wzorcowej.

Przedstawianie wyników

Wyniki przedstawia się w mg/l odpowiednio kwasu L-askorbinowego i kwasu D-izoaskorbinowego do jednego miejsca dziesiętnej (np. 51,3 mg/l).

Dla stężeń przekraczających 150 mg/l należy uwzględnić rozcieńczenie.

9. WIARYGODNOŚĆ

Metoda została sprawdzona w ramach badań międzylaboratoryjnych przeprowadzonych w 1994 r. przez dawny niemiecki Sanepid (*Bundesgesundheitsamt*), w których uczestniczyło 27 laboratoriów. Program badań międzylaboratoryjnych prowadzony był zgodnie z § 35 ustawy niemieckiej w sprawie środków spożywczych, który został zaakceptowany przez OIV do czasu wprowadzenia nowego protokołu (OENO 6/2000).

Badania prowadzono na czterech próbkach różnych win – dwóch białych i dwóch czerwonych, a każde oznaczenie powtarza się pięciokrotnie. Biorąc pod uwagę, że nie można było przygotować próbek o wystarczającej stabilności analitów (różna szybkość rozpadu), podjęto decyzję o wysłaniu uczestnikom określonych ilości czystych substancji wzorcowych oraz próbki wina. Laboratoria otrzymały polecenie przeniesienia wzorców ilościowo do próbek wina i dokonania natychmiastowo badania. Badaniu poddaje się od 30 do 150 mg/l kwasu L-askorbinowego i od 10 do 100 mg/l kwasu D-izoaskorbinowego. Szczegółowe wyniki są przedstawione w ZAŁĄCZNIKU opublikowanym przez OIV. Oceny dokonano zgodnie z normą DIN/ISO 5725 (z 1988 r.).

Standardowe odchylenia powtarzalności (s_r) i odtwarzalności (s_R) były adekwatne do stężeń kwasu L-askorbinowego i D-izoaskorbinowego. Parametry rzeczywistej precyzji można obliczyć za pomocą następujących równań:

Kwas L-askorbinowy

$$s_r = 0,011 x + 0,31$$

$$s_R = 0,064 x + 1,39$$

x: stężenie kwasu L-askorbinowego (mg/l)

Kwas D-izoaskorbinowy

$$s_r = 0,014 x + 0,31$$

$$s_R = 0,079 x + 1,29$$

x: stężenie kwasu D-izoaskorbinowego (mg/l)

Przykład:

dla 50 mg/l kwasu D-izoaskorbinowego $s_r = 1,0$ mg/L

$$s_R = 5,2 \text{ mg/L}$$

10. DALSZA CHARAKTERYSTYKA BADANIA

10.1 Granica oznaczalności

Granice oznaczalności tej metody szacuje się na 3 mg/l dla kwasu L-askorbinowego i kwasu D-izoaskorbinowego.

10.2 Poprawność

Średni odzysk obliczony na podstawie badania międzylaboratoryjnego przeprowadzonego na czterech próbkach (patrz ZAŁĄCZNIK opublikowany w *Recueil OIV*) wynosi:

- 100,6 % w odniesieniu do kwasu L-askorbinowego
- 103,3 % w odniesieniu do kwasu D-izoaskorbinowego

17 DITLENEK WĘGLA (OIV - AS-314-01-DIOCAR) – METODA TYPU II

1. ZASADA METODY

1.1. **Wina niemusujące (naciśnienie $\text{CO}_2 \leq 0,5 \times 10^5 \text{ Pa}$) ⁽¹⁾**

Objętość wina pobranego z próbki jest schładzana do temperatury około 0 i mieszana z wodorotlenkiem sodu w ilości wystarczającej do sprowadzenia pH do wartości 10-11. Miareczkowanie wykonuje się za pomocą roztworu kwasu w obecności anhydryzy węglowej. Zawartość ditlenku węgla oblicza się na podstawie objętości kwasu potrzebnego do zmiany pH z 8,6 (postać wodorowęglanowa) na 4,0 (kwas węglowy). Przeprowadza się próbę ślepą, miareczkując w tych samych warunkach wino pozbawione ditlenku węgla, w celu uwzględnienia ilości wodorotlenku sodu związanego przez kwasy obecne w winie.

1.2. **Wina musujące i półmusujące**

Próbka wina do analizy jest schładzana do temperatury bliskiej temperaturze krzepnięcia. Po pobraniu pewnej ilości wina do wykonania próby ślepej po usunięciu ditlenku węgla wino pozostałe w butelce alkalizuje się w celu związania całego CO_2 w formie Na_2CO_3 . Miareczkowanie wykonuje się za pomocą roztworu kwasu w obecności anhydryzy węglowej. Zawartość ditlenku węgla oblicza się na podstawie objętości kwasu potrzebnej do zmiany pH z 8,6 (postać wodorowęglanowa) na 4,0 (kwas węglowy). Przeprowadza się próbę ślepą, miareczkując w tych samych warunkach wino pozbawione ditlenku węgla, w celu uwzględnienia ilości wodorotlenku sodu związanego przez kwasy obecne w winie.

2. OPIS METODY

2.1. **Wina niemusujące (naciśnienie wywoływane przez $\text{CO}_2 \leq 0,5 \times 10^5 \text{ Pa}$).**2.1.1. *Aparatura*

2.1.1.1. Mieszadło magnetyczne.

2.1.1.2. Pehametr.

2.1.2. *Odczynniki*

2.1.2.1. 0,1 M roztwór wodorotlenku sodu (NaOH).

2.1.2.2. 0,05 M roztwór kwasu siarkowego H_2SO_4 .

2.1.2.3. Roztwór anhydryzy węglanowej 1 g/l.

2.1.3. *Procedura*

Schłodzić wino do temperatury około 0 °C, razem z pipetą na 10 ml, używaną do pobierania próbek.

Umieścić 25 ml roztworu wodorotlenku sodu (pkt 2.1.2.1) w zlewce o objętości 100 ml; dodać dwie krople wodnego roztworu anhydryzy węglowej (pkt 2.1.2.3). Pipetą schłodzoną do temperatury 0 °C wprowadzić 10 ml wina.

Zlewkę umieścić na mieszadle magnetycznym, włożyć elektrodę pehametru i mieszać z umiarkowaną prędkością.

Gdy roztwór osiągnie temperaturę pokojową, miareczkować powoli roztworem kwasu siarkowego (pkt 2.1.2.2) do uzyskania wartości pH 8,6.

Miareczkować dalej powoli kwasem siarkowym (pkt 2.1.2.2) do uzyskania wartości pH 4,0. n ml oznacza ilość kwasu zużytego na zmianę pH z 8,6 do 4,0.

Z próbki wina o objętości około 50 ml usunąć CO_2 poprzez wstrząsanie w warunkach próżniowych przez 3 minuty, ogrzewając kolbę na łaźni wodnej do temperatury 25 °C.

Powyższe postępowanie powtórzyć, używając 10 ml wina pozbawionego ditlenku węgla. n' ml oznacza ilość zużytego kwasu.

2.1.4. *Przedstawianie wyników*

1 ml odmiareczkowanego 0,05 M roztworu kwasu siarkowego odpowiada 4,4 mg CO_2 .

Ilość CO_2 w gramach na litr wina wynosi:

$$0,44 (n - n')$$

Wynik podawać z dokładnością do dwóch miejsc dziesiętnych.

Uwaga: W przypadku gdy wino zawiera niewiele CO_2 ($\text{CO}_2 < 1 \text{ g/l}$), nie jest konieczne dodawanie anhydryzy węglowej w celu katalizowania reakcji hydratacji CO_2 .

⁽¹⁾ 10^5 paskala (Pa) = 1 bar.

2.2. Wina półmusujące i musujące**2.2.1. Aparatura**

2.2.1.1. Mieszadło magnetyczne.

2.2.1.2. Pehametr.

2.2.2. Odczynniki

2.2.2.1. Roztwór wodorotlenku sodu (NaOH) 50 % (m/m).

2.2.2.2. 0,05 M roztwór kwasu siarkowego H₂SO₄.

2.2.2.3. Roztwór anhydryzy węglanowej 1 g/l.

2.2.3. Procedura

Zaznaczyć poziom wina w butelce, następnie schłodzić do rozpoczęcia zamarzania wina.

Ogrzać lekko butelkę, stale wstrząsając, do zniknięcia kryształów lodu.

Szybko wyjąć korek i odmierzyć 45—50 ml wina do cylindra miarowego w celu wykonania próby ślepej. Dokładną ilość odmierzonego wina, *v* ml, odczytać w cylindrze miarowym po sprowadzeniu próbki do temperatury pokojowej.

Niezwłocznie po pobraniu wina do próby ślepej do butelki o pojemności 750 ml dodać 20 ml roztworu wodorotlenku sodu (pkt 2.2.2.1).

Odczekać, aż wino osiągnie temperaturę pokojową.

Umieścić 30 ml przegotowanej wody destylowanej i dodać dwie krople roztworu anhydryzy węglowej (pkt 2.2.2.3) w zlewce o pojemności 100 ml. Dodać 10 ml zalkalizowanego wina.

Umieścić zlewkę na mieszadle magnetycznym, włożyć elektrodę i mieszadło i mieszać z umiarkowaną prędkością.

Miareczkować powoli roztworem kwasu siarkowego (pkt 2.2.2.2) do osiągnięcia pH 8,6.

Miareczkować dalej powoli kwasem siarkowym (pkt 2.2.2.2) do uzyskania wartości pH 4,0. *n* ml oznacza ilość kwasu zużytego na zmianę pH z 8,6 do 4,0.

Z próbki wina o objętości *v* ml, pozostawionego do wykonania próby ślepej, usunąć CO₂ poprzez wstrząsanie w warunkach próżniowych przez 3 minuty, ogrzewając kolbę na łaźni wodnej do temperatury 25 °C. Pobrać 10 ml wina pozbawionego ditlenku węgla i dodać 30 ml przegotowanej wody destylowanej, dodać dwie do trzech kropli roztworu wodorotlenku sodu (pkt 2.2.2.1), aby sprowadzić pH do wartości 10-11. Dalej postępować jak wyżej. *n'* ml oznacza ilość zużytego 0,5 M roztworu kwasu siarkowego.

2.2.4. Przedstawianie wyników

1 ml 0,05 M kwasu siarkowego odpowiada 4,4 mg CO₂.

Opróżnić butelkę wina, które zostało zalkalizowane, i oznaczyć początkową objętość wina z dokładnością do 1 ml poprzez napełnienie butelki wodą do zaznaczonej wysokości, niech *V* oznacza zmierzoną objętość w ml.

Ilość CO₂ w gramach na litr wina wyliczyć według następującego wzoru:

$$0,44 (n - n') \times [(V - v + 20)/(V - v)]$$

Wynik podawać z dokładnością do dwóch miejsc dziesiętnych.

2.3. Obliczanie nadciśnienia teoretycznego

Nadciśnienie w temperaturze 20 °C (*P* atm₂₀), wyrażane w paskalach, oblicza się według wzoru:

$$P \text{ atm}_{20} = \{Q/[1,951 \times 10^{-5}(0,86 - 0,01 A)(1 - 0,00144 S)]\} - P \text{ atm}$$

gdzie:

Q: zawartość CO₂ w g/l wina,

A: zawartość alkoholu w winie w temperaturze 20 °C,

S: zawartość cukru w winie w g/l,

P atm: ciśnienie atmosferyczne, wyrażone w paskalach.

18 OZNACZANIE ZAWARTOŚCI DITLENKU WĘGLA W WINIE METODĄ MANOMETRYCZNAŁ (OIV – AS314-04-CO2MAN) – METODA TYPU II

(p.m.)

[Opis tej metody analizy podlega w chwili obecnej aktualizacji przez organy OIV. Zostanie on umieszczony w kolejnym komunikacie Komisji jak tylko zaktualizowany tekst zostanie opublikowany przez OIV w Recueil des Méthode Internationales d'analyse z 2010 r.]

19 MIERZENIE NADCIŚNIENIA WIN MUSUJĄCYCH I PÓLMUSUJĄCYCH (OIV - AS-314-02-SURPRES) – METODA TYPU I

1. ZASADA

Po stabilizacji temperatury i wstrząśnięciu butelki, nadciśnienie mierzy się za pomocą afrometru (przyrząd do pomiaru ciśnienia). Wyraża się je w paskalach (Pa) (metoda typu I) Metodę tę stosuje się również do win musujących gazowanych i półmusujących gazowanych.

2. APARATURA

Aparat pozwalający mierzyć nadciśnienie w butelkach z winem musującym i półmusującym nazywany afrometrem. Wygląda on różnie w zależności od rodzaju zamknięcia butelki (kapsel metalowy, kapsel koronowy, korek z korka naturalnego lub plastiku).

2.1. W przypadku butelek zamykanych kapslem

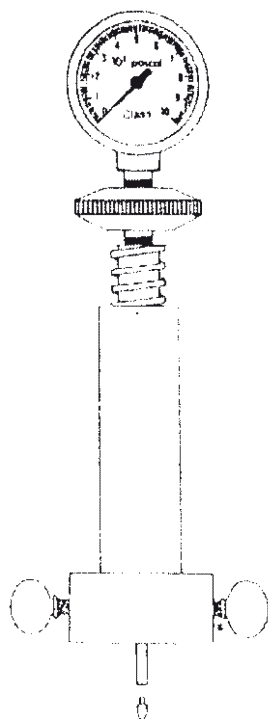
Afometr składa się z trzech części (rysunek 1):

- Część górna (śruba z igłą) składa się z manometru, ręcznego pierścienia mocującego, śruby bez złącza, która wchodzi w część środkową oraz igły przebijającej kapsel. Igła posiada poprzeczny otwór, który przekazuje ciśnienie do manometru. Złącze zapewnia szczelność całości aparatu zamontowanego na kapslu butelki.
- Część środkowa (nakrętka) służy do ustawienia części górnej w pozycji centralnej. Wkręca się w część dolną w taki sposób, aby mocno utrzymała całość na butelce.
- Część dolna (jarzmo) posiada występ, który wchodzi pod pierścień butelki w ten sposób, że podtrzymuje całość. Istnieją pierścienie dostosowane do każdego typu butelki.

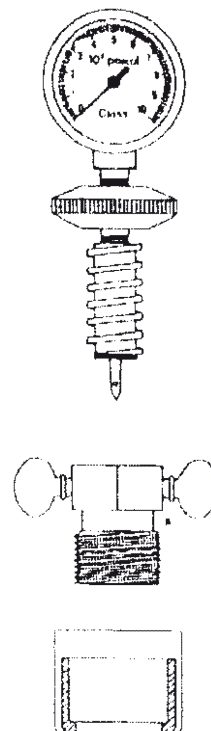
2.2. W przypadku butelek zamykanych korkiem

Składa się z dwóch części (rysunek 2):

- Część górna jest identyczna jak w poprzednim aparacie, jednak igła jest dłuższa. Składa się ona z długiej wklęsłej rurki, na której końcu znajduje się ostrze ułatwiające przebicie korka. Ostrze jest ruchome i wpada do wina po przebicciu korka.
- Część dolna składa się z nakrętki i podstawy, która opiera się na butelce. Jest ona wyposażona w cztery śruby mocujące, które utrzymują całość na korku.



Rysunek 2: Afometr do korków



Rysunek 1: Afometr do kapsli

Uwagi dotyczące manometrów, wchodzących w skład obu aparatów:

- Mogą być albo mechaniczne, z rurką Bourdona, albo cyfrowe z czujnikiem piezoelektrycznym. W pierwszym przypadku rurka Bourdona musi obowiązkowo być z nierdzewnej stali.
- Są one wyskalowane w paskalach (skrót Pa). Dla win musujących praktyczniej jest stosować 10^5 paskali (10^5 Pa) lub kilopaskale (kPa) jako jednostki.
- Istnieją manometry różnych klas. Klasa manometru zależy od dokładności odczytu w stosunku do całej skali wyrażonej w procentach (np. manometr 1 000 kPa klasy 1 oznacza maksymalne stosowane ciśnienie 1 000 kPa, odczyt z dokładnością do ± 10 kPa). Do dokładnych pomiarów zaleca się klasę 1.

3. PROCEDURA

Pomiaru należy dokonywać na butelkach, których temperatura jest ustabilizowana od co najmniej 24 godzin. Po przebicciu korony lub korka butelkę należy mocno wstrząsnąć aż do uzyskania stałego ciśnienia w celu dokonania odczytu.

3.1. W przypadku butelki kapslowanej

Wsunąć występ jarzma pod pierścień butelki. Dokręcić nakrętkę, aż do zakręcenia całości na butelce. Część górna jest teraz wkręcona w nakrętkę. Aby uniknąć wydobywania się gazu, należy przebić kapsel jak najszybciej, aby doprowadzić do kontaktu złącza z kapslem. Następnie należy mocno wstrząsnąć butelką, aż do uzyskania stałego ciśnienia w celu dokonania odczytu.

3.2. W przypadku butelki korkowanej

Założyć ostrze na koniec igły. Ustawić cały element na korku. Przykręcić cztery śruby do korka. Przykręcić część górną (igła przebija wtedy korek). Ostrze musi wpaść do butelki, tak aby ciśnienie mogło zostać przekazane do manometru. Dokonać odczytu po wstrząśnięciu butelki, aż do uzyskania stałego ciśnienia. Po odczycie wydobyć ostrze.

4. PRZEDSTAWIANIE WYNIKÓW

Nadciśnienie przy 20 °C ($P_{atm_{20}}$) wyraża się w paskalach (Pa) lub w kilopaskalach (kPa). Musi ono odpowiadać dokładności manometru (np. $6,3 \times 10^5$ Pa lub 630 kPa, a nie $6,33 \times 10^5$ Pa lub 633 kPa dla manometru o pełnej skali do 1 000 kPa, klasy 1).

Jeśli temperatura pomiaru jest inna niż 20 °C, należy wprowadzić korektę mnożąc otrzymane ciśnienie przez odpowiedni współczynnik (patrz: Tabela 1).

Tabela 1

Stosunek nadciśnienia w winie półmusującym i musującym przy temperaturze 20 °C ($P_{atm_{20}}$) do nadciśnienia w temperaturze t (P_{atm_t})

| °C | | °C | |
|----|------|----|------|
| 0 | 1,85 | 13 | 1,24 |
| 1 | 1,80 | 14 | 1,20 |
| 2 | 1,74 | 15 | 1,16 |
| 3 | 1,68 | 16 | 1,13 |
| 4 | 1,64 | 17 | 1,09 |
| 5 | 1,59 | 18 | 1,06 |
| 6 | 1,54 | 19 | 1,03 |
| 7 | 1,50 | 20 | 1,00 |
| 8 | 1,45 | 21 | 0,97 |
| 9 | 1,40 | 22 | 0,95 |
| 10 | 1,36 | 23 | 0,93 |
| 11 | 1,32 | 24 | 0,91 |
| 12 | 1,28 | 25 | 0,88 |

5. KONTROLA WYNIKÓW

Metoda bezpośredniego określenia parametrów fizycznych (metoda kryterium typu I)

Sprawdzanie afrometrów

Należy regularnie sprawdzać afrometry (co najmniej raz w roku).

Sprawdzenia dokonuje się na stanowisku pomiarowym. Pozwala to porównać manometr z manometrem wzorcowym, wyższej klasy, zgodnym z normami krajowymi, zamontowanym równolegle. Kontrolę przeprowadza się tak, aby porównać wskazania obu aparatów przy rosnącym i malejącym ciśnieniu. Jeśli jest między nimi różnica, śruba regulacyjna pozwala wprowadzić niezbędne poprawki.

Laboratoria i upoważnione organy wyposażone są w takie stanowiska pomiarowe. Są one też dostępne u producenta manometrów.

20 OZNACZANIE ZAWARTOŚCI LIZOZYMU W WINACH METODĄ HPLC (OIV-AS-315-14) – METODA TYPU IV**1. WPROWADZENIE**

W odniesieniu do lizozymu lepiej stosować metodę analityczną, która nie opiera się na reakcji enzymatycznej.

2. ZAKRES STOSOWANIA

Metoda ta pozwala na oznaczanie ilościowo zawartości lizozymu (w mg białka na liter) w winach białych i czerwonych niezależnie od reakcji enzymatycznej (którą mogłaby zakłócić częściowa denaturacja lub inne zjawiska kompleksacji i wytrącania) matrycy.

3. DEFINICJA

Wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC) umożliwia podejście analityczne oparte na interakcji o charakterze przestrzennym, polarnym lub absorpcyjnym między fazą nieruchomą a analitem, a zatem niezwiązane z rzeczywistą reakcją enzymatyczną białka.

4. ZASADA

Badania wysokosprawną chromatografią cieczową (HPLC) dokonuje się poprzez połączenie detektora spektrofotometrycznego i spektrofluorometrycznego. Nieznana zawartość próbki wina oblicza się na podstawie piku chromatograficznego wykorzystując metodę wzorca zewnętrznego.

5. ODCZYNNIKI**5.1. Rozpuszczalniki i roztwory**

Acetonitryl (CH_3CN) do badania HPLC

Czysty kwas trifluorooctowy (TFA)

Woda dejonizowana do badania HPLC

Roztwór mianowany: kwas winowy 1 g/l, alkohol etylowy 10 % v/v o pH dostosowanym pH 3,2 przy pomocy obojętnego winianu potasu

5.2. Eluenty

A: CH_3CN 1 %, TFA 0,2 %, H_2O = 98,8 %

B: CH_3CN 70 %, TFA 0,2 %, H_2O = 29,8 %

5.3. Roztwory odniesienia

Od 1 do 250 mg/l lizozymu mianowanego rozpuszczonego we wzorcowym roztworze poprzez ciągłe mieszanie przez co najmniej 12 godzin.

6. SPRZĘT I APARATURA

6.1. Aparat do HPLC z systemem pomp do przeprowadzenie gradientu elucji

6.2. Komora kolumny termostaticznej (piec)

6.3. Detektor spektrofotometryczny powiązany z detektorem spektrofluorometrycznym

6.4. Pętla dozownika o pojemności 20 μl

6.5. Kolumna polimerowa o fazie odwrotnej z fenyłowymi grupami funkcyjnymi (przechrój porów = 1 000 Å, granica wykluczenia = 1 000 000 Da), np. *Tosoh Bioscience TSK-gel Phényl 5PW RP 7,5 cm × 4,6 mm ID*

6.6. Prekolumna z tego samego materiału co kolumna, np. *Tosoh Bioscience TSK-gel Phényl 5PW RP Guardgel 1,5 cm × 3,2 mm ID*

7. PRZYGOTOWANIE PRÓBK

Próbki wina zakwasza się roztworem HCl (10 M) rozcieńczonym w stosunku 1:10 i w 5 minut później filtruje przez sączek poliamidowy, którego pory mają przechrój 0,22 μm . Badania chromatograficzne dokonuje się natychmiast po przefiltrowaniu.

8. WARUNKI

8.1. Przepływ eluentu: 1 ml/min

8.2. Temperatura kolumny: 30 °C

- 8.3. Oznaczenie spektrofotometryczne: 280 nm
- 8.4. Oznaczenie spektrofluorometryczne: $\lambda_{ex} = 276 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 345 \text{ nm}$; Wzmocnienie = 10
- 8.5. Program gradientu elucji

| Czas (w min) | Roztwór A % | Roztwór B % | gradient |
|--------------|-------------|-------------|--------------|
| 0 | 100 | 0 | |
| | | | izokratyczny |
| 3 | 100 | 0 | |
| | | | liniowy |
| 10 | 65 | 35 | |
| | | | izokratyczny |
| 15 | 65 | 35 | |
| | | | liniowy |
| 27 | 40,5 | 59,5 | |
| | | | liniowy |
| 29 | 0 | 100 | |
| | | | izokratyczny |
| 34 | 0 | 100 | |
| | | | liniowy |
| 36 | 100 | 0 | |
| | | | izokratyczny |
| 40 | 100 | 0 | |

- 8.6. Średni czas retencji lizozymu: 25,50 minut.

9. OBLICZANIE

Badaniu podlegają roztwory odniesienia o następujących stężeniach lizozymu: 1; 5; 10; 50; 100; 200; 250 mg/l. Na każdym chromatogramie obszary piku odpowiadające lizozymowi są zaznaczone na diagramie w odniesieniu do odpowiednich stężeń, tak aby otrzymać proste regresji linearnej wyrażone wzorem $Y = ax + b$. Współczynnik oznaczania r^2 powinien być $> 0,999$.

10. CHARAKTERYSTYKA METODY

Aby ocenić przydatność metody do sformułowanego celu, przeprowadzono badanie walidacji uwzględniając linearność, granice oznaczalności i oznaczanie ilościowe oraz dokładność metody. Ten ostatni parametr został określony poprzez definicję poziomu dokładności metody.

| | Zakres linearności (mg/l) | Nachylenie prostej | Współczynnik oznaczania (r^2) | LD (mg/l) | LQ (mg/l) | Powtarzalność (n=5) RSD% | | | Odtwarzalność (n=5) RSD% |
|-----|---------------------------|--------------------|-----------------------------------|-----------|-----------|--------------------------|-------------------|-------------------|--------------------------|
| | | | | | | Std ¹ | V.R. ² | V.B. ³ | Std ¹ |
| UV | 5-250 | 3,786 | 0,9993 | 1,86 | 6,20 | 4,67 | 5,54 | 0,62 | 1,93 |
| FLD | 1-250 | 52,037 | 0,9990 | 0,18 | 0,59 | 2,61 | 2,37 | 0,68 | 2,30 |

Tabela 1: Dane charakteryzujące metodę: Std¹ roztwór mianowany; V.R.² wino czerwone; V.B.³ wino białe

10.1. Linearność metody

Na podstawie wyników uzyskanych dzięki badaniu regresji linearnej, metoda okazała się linearna w zakresach wskazanych w tabeli 1.

10.2. Granica oznaczalności i oznaczania ilościowego

Granice oznaczalności (LD) i granicę oznaczania ilościowego (LQ) obliczono jako sygnał równy odpowiednio 3- i 10-krotności szumu chromatograficznego w warunkach pracy na matrycy rzeczywistej (tabela 1).

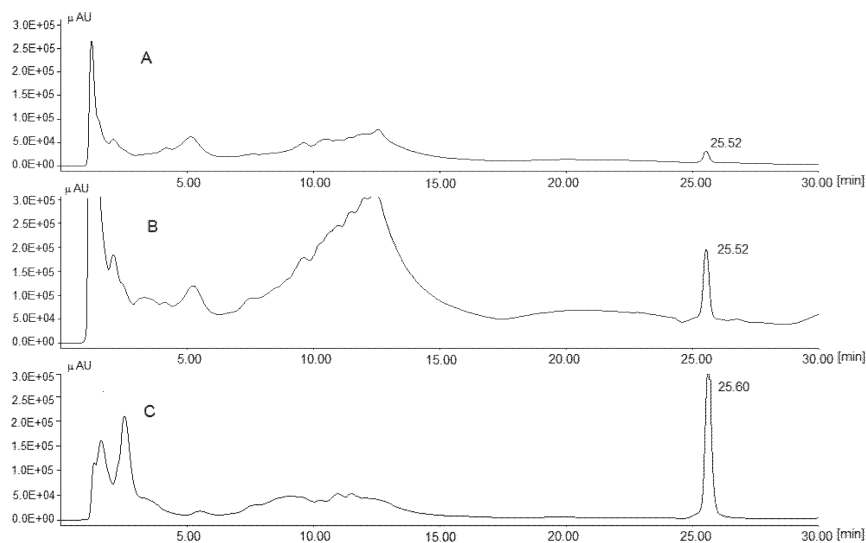
10.3. Skuteczność metody

Uwzględnianymi parametrami są powtarzalność i odtwarzalność. Tabela 1 wskazuje wartości tych parametrów (wyrażone jako % standardowego odchylenia od powtarzanych pomiarów dla różnych stężeń) zanotowane dla roztworu mianowanego w odniesieniu do wina białego i wina czerwonego.

10.4. Dokładność metody

Odsetek odzysku obliczono dla roztworów mianowanych zawierających 5 i 50 mg lizozymu na litr, zsumowanych pod względem danej ilości lizozymu, zgodnie z następującą tabelą.

| | [C] początkowe nominalne (w mg/l) | Dodane (mg/l) | [C] teoretyczne (w mg/l) | [C] stwierdzone (w mg/l) | Standardowe odchylenie | Odzysk % |
|-----------|-----------------------------------|---------------|--------------------------|--------------------------|------------------------|----------|
| UV 280 nm | 50 | 13,1 | 63,1 | 62,3 | 3,86 | 99 |
| FD | 50 | 13,1 | 63,1 | 64,5 | 5,36 | 102 |
| UV 280 nm | 5 | 14,4 | 19,4 | 17,9 | 1,49 | 92,1 |
| FD | 5 | 14,4 | 19,4 | 19,0 | 1,61 | 97,7 |



Rys. 1 Chromatogram wina czerwonego zawierającego czysty lizozym (roztwór mianowany zawierający 1 000 mg lizozymu na litr dodany do wina w celu osiągnięcia końcowego stężenia 125 mg lizozymu na litr). A: oznaczanie UV przy 280 nm; B: oznaczanie UV przy 225 nm; C: oznaczanie FLD (λ ex 276 nm; λ em 345 nm).

21 SIARCZANY (OIV- AS-321-05-SULFAT) – METODA TYPU II

1. ZASADA METODY

1.1. **Metoda referencyjna**

Wytrącanie siarczanu baru i ważenie. Fosforan baru wytrącający się w tych samych warunkach jest eliminowany przez przemywanie osadu kwasem solnym.

W przypadku moszczów i win bogatych w ditlenek siarki przed oznaczaniem zalecana jest desulfatacja poprzez gotowanie w szczelnie zamkniętym naczyniu.

1.2. **Szybka metoda badawcza**

Wina są klasyfikowane na kilka kategorii z zastosowaniem tzw. metody limitów, opartej na wytrącaniu siarczanu baru przez miareczkowany roztwór jonów baru.

2. METODA REFERENCYJNA

2.1. **Odczynniki**

2.1.1. 2 M roztwór kwasu solnego.

2.1.2. Roztwór chlorku baru o stężeniu 200 g/l of $\text{BaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$.2.2. **Procedura**2.2.1. *Procedura ogólna*

Do próbki wirówkowej o objętości 50 ml odmierzyć 40 ml badanej próbki; dodać 2 ml 2 M kwasu solnego i 2 ml roztworu chlorku baru o stężeniu 200 g/l. Mieszać mieszadłem szklanym; opłukać mieszadło niewielką ilością wody destylowanej i odstawić na pięć minut. Wirować pięć minut, następnie ostrożnie zlać ciecz z nad osadu.

Następnie przemyć osad siarczanu baru w następujący sposób: dodać 10 ml 2 M kwasu solnego, wytworzyć zawiesinę osadu i wirować przez pięć minut, następnie ostrożnie zlać ciecz z nad osadu. Powtórzyć procedurę przemywania dwukrotnie w tych samych warunkach, za każdym razem używając 15 ml wody destylowanej.

Przenieść ilościowo osad, popłukując wodą destylowaną, do zważonej kapsułki platynowej i umieścić nad łaźnią wodną o temperaturze 100 °C aż do całkowitego odparowania. Wyszuszony osad prażyć kilkakrotnie w płomieniu do uzyskania białej pozostałości. Ochłodzić w eksykatorze i zważyć.

m = masa otrzymanego siarczanu baru w miligramach.

2.2.2. *Specjalna procedura*: moszcz sulfitowany i wina o wysokiej zawartości ditlenku siarki.

Wcześniej usunąć ditlenek siarki.

Do kolby stożkowej na 500 ml wyposażonej we wkraplacz i rurkę odprowadzającą odmierzyć 25 ml wody i 1 ml czystego kwasu solnego (ρ_{20} = od 1,15 do 1,18 g/ml). Zagotować roztwór w celu usunięcia powietrza i przez wkraplacz wprowadzić 100 ml wina. Gotować próbkę do momentu, gdy objętość cieczy w kolbie zmniejszy się do około 75 ml i po schłodzeniu przenieść ilościowo do kolby miarowej na 100 ml. Uzupełnić wodą do kreski. Oznaczyć zawartość siarczanów w próbce o objętości 40 ml jak w pkt 2.2.1.

2.3. **Przedstawianie wyników**2.3.1. *Obliczanie*

Zawartość siarczanów w przeliczeniu na miligramy siarczanu potasu, K_2SO_4 , na litr wynosi:

$$18,67 \times m$$

Zawartość siarczanów w moszczach lub winie wyrażana jest w miligramach na litr siarczanu potasu, bez miejsca dziesiątego.

2.3.2. *Powtarzalność*

do 1 000 mg/l: $r = 27$ mg/l

około 1 500 mg/l: $r = 41$ mg/l

2.3.3. *Odtwarzalność*

do 1 000 mg/l: $R = 51$ mg/l

około 1 500 mg/l: $R = 81$ mg/l

22 ŻELAZO (OIV - AS-322-05-FER) – METODA TYPU IV

1. ZASADA METODY

METODA REFERENCYJNA

Po odpowiednim rozcieńczeniu wina i usunięciu alkoholu zawartość żelaza oznaczana jest bezpośrednio metodą spektrofotometrii absorpcji atomowej.

METODA ZWYKŁA

Po rozpuszczeniu próbki w 30 % roztworze nadtlenku wodoru żelazo występujące w formie Fe(III), zostaje zredukowane do postaci Fe(II) i oznaczone przy użyciu reakcji barwnej z ortofenantroliną.

2. METODA REFERENCYJNA

2.1. **Odczynniki**

2.1.1. Stężony roztwór wzorcowy żelaza zawierający 1 g Fe(III) w litrze.

Użyć normalnego handlowego roztworu żelaza (1 g/l). Roztwór ten można sporządzić, rozpuszczając 8,6341 g siarczanu amonu żelaza $[\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2 \times 12 \text{H}_2\text{O}]$ w wodzie destylowanej lekko zakwaszonej 1 M kwasu solnego i uzupełnić do jednego litra.

2.1.2. Rozcieńczony roztwór wzorcowy żelaza zawierający 100 mg żelaza w litrze.

2.2. **Aparatura**

2.2.1. Obrótowy aparat wyparny z łaźnią wodną kontrolowaną termostatycznie.

2.2.2. Spektrofotometr absorpcji atomowej wyposażony w palnik powietrzno-acetylenowy.

2.2.3. Lampa żelazowa z katodą wnątkową.

2.3. **Procedura**2.3.1. *Przygotowanie próbki*

Usunąć alkohol z wina, zmniejszając objętość próbki o połowę za pomocą obrotowego aparatu wyparnego (temperatura 50–60 °C). Uzupełnić do początkowej objętości wodą destylowaną.

Jeżeli potrzeba, próbkę należy rozcieńczyć przed oznaczeniem.

2.3.2. *Kalibracja*

Umieścić odpowiednio 1, 2, 3, 4 i 5 ml roztworu zawierającego 100 mg żelaza na litr (pkt 2.1.2) w każdej z pięciu kolb miarowych na 100 ml i uzupełnić do 100 ml wodą destylowaną. Przygotowane w ten sposób roztwory zawierają odpowiednio 1, 2, 3, 4 i 5 mg żelaza w litrze.

Roztwory przechowywać w butelkach z polietylenu.

2.3.3. *Oznaczanie*

Ustawić długość fali na 248,3 nm. Ustawić zero na skali absorbancji w stosunku do wody destylowanej. Do palnika spektrofotometru wprowadzić bezpośrednio rozcieńczoną próbkę, a następnie kolejno pięć roztworów wzorcowych (pkt 2.3.2). Odczytać absorbancje. Powtórzyć każdy pomiar.

2.4. **Przedstawianie wyników**2.4.1. *Metoda obliczania*

Sporządzić wykres przedstawiający zróżnicowanie absorbancji jako funkcję zawartości żelaza w roztworach wzorcowych. Zapisać średnią wartość absorbancji uzyskaną na wykresie dla próbki rozcieńczonego wina i oznaczyć zawartość żelaza C.

Stężenie żelaza w miligramach na litr wina z dokładnością do jednego miejsca dziesiętnego wynosi

$$C \times F$$

gdzie F = współczynnik rozcieńczenia.

23 MIEDŹ (OIV – AS 322-06) – METODA TYPU IV

1. ZASADA METODY
Metoda jest oparta na wykorzystaniu spektrofotometrii absorpcji atomowej.
2. APARATURA
 - 2.1. Naczynie platynowe.
 - 2.2. Spektrofotometr absorpcji atomowej.
 - 2.3. Lampa miedziowa z katodą wnątkową.
 - 2.4. Doprowadzenie gazu: powietrze – acetylen lub podtlenek azotu/acetylen.
3. ODCZYNNIKI
 - 3.1. Miedź metaliczna.
 - 3.2. Kwas azotowy HNO₃, o stężeniu 65 %, $\rho_{20} = 1,38$ g/ml).
 - 3.3. Kwas azotowy rozcieńczony w stosunku 1:2 (v/v).
 - 3.4. **Roztwór zawierający miedź w stężeniu 1 g/l.**
Użyć normalnego handlowego roztworu miedzi (1 g/l). Roztwór ten można sporządzić, odważając 1 000 g metalicznej miedzi i przenosząc ją bez ubytków do kolby miarowej o pojemności 1 000 ml. Dodać kwasu azotowego rozcieńczonego w stosunku 1:2 (v/v) (pkt 3.3) w ilości wystarczającej do rozpuszczenia metalu, dodać 10 ml stężonego kwasu azotowego (pkt 3.2) i uzupełnić do kreski wodą destylowaną.
 - 3.5. **Roztwór zawierający miedź w stężeniu 100 mg/l.**
Do kolby miarowej na 100 ml przenieść 10 ml roztworu przygotowanego jak w pkt 3.4 i uzupełnić do kreski wodą podwójnie destylowaną.
4. PROCEDURA
 - 4.1. **Przygotowanie próbki i oznaczanie zawartości miedzi**
Do kolb miarowych na 100 ml przenieść 20 ml próbki i uzupełnić do kreski wodą podwójnie destylowaną. Jeżeli potrzeba, zmienić stopień rozcieńczenia.

Na spektrofotometrze absorpcji atomowej odczytać absorbancję rozcieńczonej próbki przy długości fali 324,8 nm, po ustawieniu zera na skali absorbancji w stosunku do wody podwójnie destylowanej. Jeżeli potrzeba, sporządzić odpowiednio rozcieńczony roztwór, używając wody podwójnie destylowanej.
 - 4.2. **Sporządzenie krzywej wzorcowej**
Do kolb miarowych na 100 ml przenieść odpowiednio 0,5, 1, i 2 ml roztworu (przygotowanego jak w pkt 3.5) (100 mg miedzi w litrze) i uzupełnić do kreski wodą podwójnie destylowaną; przygotowane w ten sposób roztwory zawierają odpowiednio 0,5, 1 i 2 mg miedzi w litrze. Krzywą wzorcową należy sporządzić na podstawie wartości absorbancji tych roztworów zmierzonych zgodnie z pkt. 4.1.
5. PRZEDSTAWIANIE WYNIKÓW
Wykorzystując zmierzoną absorbancję badanej próbki rozcieńczonego wina, odczytać z krzywej odwzorowania zawartość miedzi C w mg/l.

Jeżeli F jest współczynnikiem rozcieńczenia, stężenie miedzi, podawane w miligramach na litr z dokładnością do dwóch miejsc dziesiętnych, wynosi $F \times C$.

Uwagi:

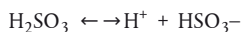
- a) Stężenia roztworów do wyznaczenia krzywej wzorcowej i rozcieńczenie próbki należy dobrać właściwie do czułości używanego aparatu i zawartości miedzi obecnej w próbce.

- b) Jeżeli w badanej próbce oczekiwane stężenie miedzi jest bardzo niskie, należy postępować następująco: umieścić 100 ml próbki w naczyniu platynowym i odparować na łaźni wodnej o temperaturze 100 °C do uzyskania syropu. Dodać 2,5 ml stężonego kwasu azotowego kropla po kropli (pkt 3.2), całkowicie pokrywając cieczą dno naczynia. Ostrożnie spopielić pozostałość na elektrycznej płytce grzejnej lub w niskim płomieniu palnika; następnie umieścić naczynie w piecu muflowym o temperaturze 500 ± 25 °C i pozostawić na około 1 godzinę. Po schłodzeniu zwilżyć popiół 1 ml stężonego kwasu azotowego (pkt 3.2), rozkruszając próbkę szklaną bagietką; pozostawić mieszaninę do odparowania i spopielić jak uprzednio. Umieścić naczynie ponownie w piecu muflowym na 15 minut; powtórzyć zwilżanie kwasem azotowym co najmniej trzykrotnie. Rozpuścić popiół, dodając do naczynia 1 ml stężonego kwasu azotowego (pkt 3.2) i 2 ml wody podwójnie destylowanej i przenieść do kolby na 10 ml. Przemyc naczynie trzykrotnie, za każdym razem używając 2 ml wody podwójnie destylowanej. Na koniec uzupełnić do kreski wodą podwójnie destylowaną. Dokonać oznaczenia zgodnie z pkt 4.1 stosując 10 ml roztworu, uwzględniając współczynnik rozcieńczenia przy przedstawianiu wyników.

24 DITLENEK SIARKI (OIV - AS-323-04-DIOSU) – METODA TYPU II

1. DEFINICJE

Wolny ditlenek siarki jest to ditlenek siarki obecny w moszczu lub winie pod następującymi postaciami: H_2SO_3 , HSO_3^- . Równowaga między tymi dwoma postaciami jest funkcją pH i temperatury:



H_2SO_3 stanowi cząsteczkowy ditlenek siarki.

Całkowity ditlenek siarki jest oznaczany jako wszystkie formy ditlenku siarki obecne w winie, zarówno w stanie wolnym, jak i związane ze składnikami wina.

2. WOLNY I CAŁKOWITY DITLENEK SIARKI

2.1. Zasada metody

2.1.1. Metoda referencyjna

2.1.1.1. Wina i moszcze

Ditlenek siarki jest wydzielany z próbki strumieniem powietrza lub azotu; następnie jest wiązany i utleniany poprzez przepuszczenie przez rozcieńczony i obojętny roztwór nadtlenu wodoru. Powstały kwas siarkowy jest oznaczany poprzez miareczkowanie mianowanym roztworem wodorotlenku sodu. Wolny ditlenek siarki jest wydzielany z próbki przez odparowanie w niskiej temperaturze (10 °C).

Całkowity ditlenek siarki jest wydzielany z wina przez odparowanie w wysokiej temperaturze (około 100 °C).

2.1.1.2. Rektyfikowane moszcze zagęszczone

Całkowity ditlenek siarki ogółem jest wydzielany z uprzednio rozcieńczonego rektyfikowanego moszczu zagęszczonego przez odparowanie w wysokiej temperaturze (około 100 °C).

2.1.2. Szybka metoda badania (wina i moszcze)

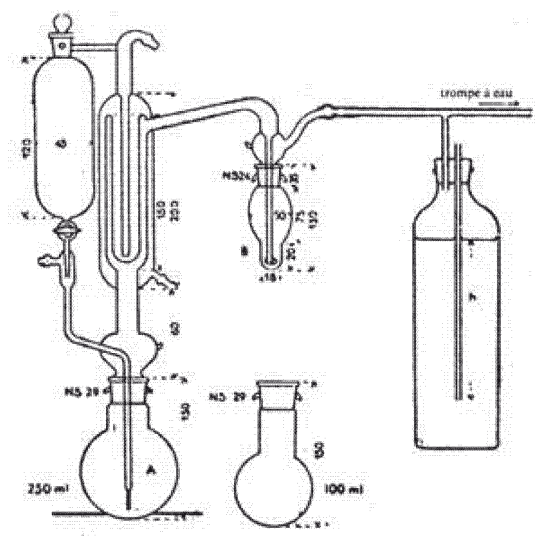
Wolny ditlenek siarki jest oznaczany poprzez bezpośrednie miareczkowanie jodometryczne.

Następnie oznacza się związany ditlenek siarki metodą miareczkowania jodometrycznego, po przeprowadzeniu hydrolizy alkalicznej. Suma zawartości wolnego i związanego ditlenku siarki stanowi zawartość całkowitego ditlenku siarki ogółem.

2.2. Metoda referencyjna

2.2.1. Aparatura

2.2.1.1. Używany aparat powinien odpowiadać poniżej zamieszczonemu schematowi, ze szczególnym uwzględnieniem skraplacza.



(opis rysunku: Pompka do wody)

Rysunek 1

Wymiary podane są w milimetrach. Średnice wewnętrzne czterech koncentrycznych rurek tworzących skraplacz wynoszą 45, 34, 27 i 10 mm.

Rurka doprowadzająca gaz do barbotera B jest zakończona małą kulką o średnicy 1 cm, posiadającą na poziomym obwodzie 20 otworów o średnicy 0,2 mm. Rurka może być również zakończona płytką ze szkła, który powoduje tworzenie dużej ilości bardzo małych pęcherzyków gazu, przez co zapewnia dobry kontakt fazy ciekłej z gazową.

Przepływ gazu przez aparat powinien wynosić około 40 litrów na godzinę. Butelka umieszczona na schemacie po prawej stronie ma za zadanie ograniczać redukcję ciśnienia powodowaną przez pompkę wodną do 20–30 cm słupa wody. W celu utrzymania próżni na odpowiednim poziomie między barboterem a butelką należy zainstalować przepływomierz z rurkami półkapielnymi.

2.2.1.2. Mikrobiureta

2.2.2. Odczynniki

2.2.2.1. Kwas fosforowy, 85 % (H_3PO_4 , $\rho_{20} = 1,71$ g/ml).

2.2.2.2. Roztwór nadtlenu wodoru, 9,1 g H_2O_2 /litr (trzy objętości).

2.2.2.3. Wskaźnik:

| | |
|-------------------------|--------|
| czerwień metylowa | 100 mg |
| błękit metylenowy | 50 mg |
| alkohol, 50 % obj. | 100 ml |

2.2.2.4. 0,01 M roztwór wodorotlenku sodu (NaOH).

2.2.3. Oznaczanie wolnego ditlenku siarki

2.2.3.1. Procedura

Wino przed określeniem powinno być przechowywane przez dwa dni w całkowicie napełnionej i zamkniętej butelce w temperaturze 20 °C.

— Umieścić 2-3 ml roztworu nadtlenu wodoru (pkt 2.2.2.2) i dwie krople wskaźnika w barboterze B, po czym zobojętnić roztwór nadtlenu wodoru za pomocą 0,01 M roztworu wodorotlenku sodu (pkt 2.2.2.4). Przyłączyć barboter do aparatu.

— Do kolby A aparatu na 250 ml wprowadzić 50 ml próbki i 15 ml kwasu fosforowego (pkt 2.2.2.1). Przyłączyć kolbę do aparatu.

— Przepuszczać powietrze lub azot przez aparat przez 15 minut. Wolny ditlenek siarki wydzielony z próbki jest utleniany do kwasu siarkowego. Odłączyć barboter od aparatu i miareczkować powstały kwas siarkowy 0,01 M roztworem wodorotlenku sodu (pkt 2.2.2.4). n ml oznacza ilość zużytego roztworu.

2.2.3.2. Przedstawianie wyników

Uwolniony ditlenek siarki wyrażać w mg/l, zaokrąglając wynik do najbliższej liczby całkowitej.

2.2.3.2.1. Obliczanie

Zawartość ditlenku siarki ogółem w miligramach na litr: 6,4 n.

2.2.4. Oznaczanie wolnego ditlenku siarki

2.2.4.1. Procedura

2.2.4.1.1. Dla zagęszczonych moszczów rektyfikowanych należy użyć roztworu otrzymanego przez rozcieńczenie badanej próbki do stężenia 40 % (m/v), jak podano w rozdziale „Kwasowość ogólna”, pkt 5.1.2. Do kolby A aparatu na 250 ml wprowadzić 50 ml badanego roztworu i 5 ml kwasu fosforowego (pkt 2.2.2.1). Przyłączyć kolbę do aparatu.

2.2.4.1.2. Wina i moszcze

Oczekiwana zawartość SO_2 ogółem w próbce jest ≤ 50 mg/l. Do kolby A aparatu o objętości 250 ml wprowadzić 50 ml próbki i 15 ml kwasu fosforowego (pkt 2.2.2.1). Przyłączyć kolbę do aparatu.

Oczekiwana zawartość SO_2 ogółem w próbce jest ≤ 50 mg/l. Do kolby A aparatu o objętości 100 ml wprowadzić 20 ml próbki i 5 ml kwasu fosforowego (pkt 2.2.2.1). Przyłączyć kolbę do aparatu.

Do barbotera B odmierzyć 2—3 ml roztworu nadtlenu wodoru (pkt 2.2.2.2), zubożonego jak uprzednio, wino w kolbie A doprowadzić do wrzenia za pomocą niewielkiego płomienia o wysokości 4—5 cm, który powinien bezpośrednio dotykać dna kolby. Nie należy umieszczać kolby na płytce metalowej, lecz na krążku z otworem o średnicy około 30 mm. Zapobiega to przegrzaniu substancji wydzielanych z wina, które osadzają się na ściankach kolby.

Utrzymywać próbkę w stanie wrzenia, przepuszczając przez nią strumień powietrza (lub azotu). W ciągu 15 minut następuje wydzielenie z próbki i utlenienie całości ditlenku siarki (wolnego i związanego). Oznaczyć ilość wytworzonego kwasu siarkowego poprzez miareczkowanie 0,01 M roztworem wodorotlenku sodu (pkt 2.2.2.4).

n ml oznacza ilość zużytego roztworu.

2.2.4.2. Przedstawianie wyników

Zawartość ditlenku siarki ogółem wyraża się odpowiednio w mg/l lub mg/kg cukrów ogółem w zaokrągleniu do najbliższej liczby całkowitej.

2.2.4.2.1. Obliczanie

— Wina i moszcze

Zawartość ditlenku siarki ogółem w miligramach na liter.

— próbki o niskiej zawartości ditlenku siarki (objętość badanej próbki 50 ml):

$$6,4 \times n$$

— pozostałe próbki (objętość badanej próbki 20 ml):

$$16 \times n$$

— Rektyfikowane moszcze zagęszczone

Całkowita zawartość ditlenku siarki w miligramach na kilogram cukrów ogółem (objętość badanej próbki 50 ml (pkt 2.2.4.1.1)) wynosi:

$$(1,600 \times n)/P$$

gdzie P = procentowa zawartość (m/m) cukrów ogółem

2.2.3.4.2. Powtarzalność (r)

zawartość < 50 mg/l (badana próbka 50 ml); $r = 1$ mg/l;

zawartość > 50 g/l (badana próbka 20 ml); $r = 6$ mg/l.

2.2.3.4.3. Odtwarzalność (R)

zawartość < 50 g/l (badana próbka 50 ml); $R=9$ mg/l;

zawartość > 50 mg/l (badana próbka 20 ml); $R=15$ mg/l.
