

II

(Comunicări)

COMUNICĂRI PROVENIND DE LA INSTITUȚIILE, ORGANELE ȘI
ORGANISMELE UNIUNII EUROPENE

COMISIA EUROPEANĂ

**Lista și descrierea metodelor de analiză menționate la articolul 120g primul paragraf din
Regulamentul (CE) nr. 1234/2007 al Consiliului ⁽¹⁾**

**[publicate în conformitate cu articolul 15 alineatul (2) din Regulamentul (CE) nr. 606/2009 al Comisiei
din 10 iulie 2009 ⁽²⁾]**

(2010/C 43/01)

Tabelul de mai jos regrupează lista metodelor de analiză care se aplică la verificarea limitelor și a cerințelor stabilite în legislația comunitară privind fabricarea produselor vitivinicole. În cea de-a treia coloană se găsește, pentru fiecare parametru specific, trimiterea la metoda de analiză corespunzătoare descrisă în „Culegerea de metode internaționale de analiză a vinurilor și musturilor” a OIV, în ultima ediție (2009) disponibilă la data prezentei publicări. Pentru fiecare parametru sunt descrise numai metodele de referință („tip I” sau „tip II” în clasificarea OIV), cu excepția parametrilor pentru care nu există în prezent nicio metodă de tip I sau II validată. Descrierea metodelor figurează în anexa la comunicare.

Observație:

Culegerea OIV stabilește, în anexa A secțiunea I, definiția diferitelor tipuri de metode de analiză, în special a tipului I (metodă de referință criteriu), a tipului II (metodă de referință) și a tipului IV (metodă provizorie).

Metodele de analiză pentru plumb și cadmiu sunt descrise în prezent în Regulamentul (CE) nr. 333/2007 al Comisiei din 28 martie 2007 (anexa C-3) ⁽³⁾. De asemenea, Regulamentul (CE) nr. 401/2006 din 23 februarie 2006 ⁽⁴⁾ stabilește criterii generale pentru metodele de analiză pentru ocratoxina A în anexa II.4, drept pentru care nu este necesar să se descrie, pentru această substanță, o metodă specifică produselor vitivinicole.

LISTA METODELOR DE ANALIZĂ

Nr.	Parametrul	Metoda din Culegerea OIV	Tipul
1	Masa volumică / densitatea	AS-2-01-MASVOL	I
2	Indicele refractometric	AS-2-02-SUCREF	I
3	Extractul sec total	AS-2-03-EXTSEC	I
4	Raportul izotopic ¹⁸ O/ ¹⁶ O al apei din vin	AS-2-09-MOUO18	II

⁽¹⁾ JO L 299, 16.11.2007.

⁽²⁾ JO L 193, 24.7.2009, p. 1.

⁽³⁾ JO L 88, 29.3.2007, p. 29.

⁽⁴⁾ JO L 70, 9.3.2006, p. 12.

Nr.	Parametrul	Metoda din Culegerea OIV	Tipul
5	Indicele Folin-Ciocalteu	AS-2-10-INDFOL	IV
6	Conținutul de zahăr (= glucoză+fructoză)	AS-311-02-GLUFRU	II
7	Conținutul de zaharoză (determinarea HPLC)	AS-311-03-SUCRES	II
8	Rezonanța magnetică nucleară – Deuteriu a etanolului din vin	AS-311-05-ENRRMN (în revizuire)	I
9	Tăria alcoolică în volume % (TAV)	AS-312-01-TALVOL	I
10	Raportul izotopic $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ al etanolului din vin	AS-312-06-ETHANO	II
11	Aciditatea totală	AS-313-01-ACITOT	I
12	Aciditatea volatilă	AS-313-02-ACIVOL	I
13	Acidul citric	AS-313-09-ACIENZ	II
14	Acidul sorbic	AS-313-14-ACISOR	IV
15	pH-ul mustului	AS-313-15-PH	I
16	Acidul ascorbic	AS- 313-22 ACASCO	II
17	CO ₂ în g/l	AS-314-01-DIOCAR	II
18	CO ₂ în g/l (manometrie)	AS-314-04-CO2MAN	II
19	Suprapresiunea CO ₂	AS-314-02-SURPRES	I
20	Lizozima	AS-315-14-LYSOZY	IV
21	Sulfatul de potasiu	AS-321-05-SULFAT	II
22	Fierul	AS-322-05-FER	IV
23	Cuprul	AS-322-06-CUIVRE	IV
24	Sulfii (SO ₂) sau Dioxidul de sulf total	AS-323-04-DIOSU	II

Descrierea câtorva metode de analiză face obiectul unei actualizări realizate de către autoritățile OIV. Descrierile respective vor fi publicate într-o viitoare comunicare a Comisiei, imediat ce un text actualizat va fi publicat de OIV în ediția 2010 a Culegerii de metode internaționale de analiză a OIV.

ANEXĂ

CUPRINS

1. MASA VOLUMICĂ LA 20 °C ȘI DENSITATEA RELATIVĂ LA 20 °C (OIV-AS2-01-MASVOL) – Metodă tip I	4
2. EVALUAREA PRIN REFRACTOMETRIE A CONȚINUTULUI DE ZAHARURI DIN MUSTURI, DIN MUSTURILE CONCENTRATE ȘI DIN MUSTURILE CONCENTRATE RECTIFICATE (OIV-AS2-02-SUCREF) – Metodă tip I	8
3. EXTRACTUL SEC TOTAL (OIV-AS-2-03-EXTSEC) Materia uscată totală – Metodă tip I	10
4. DETERMINAREA RAPORTULUI IZOTOPIC $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ AL CONȚINUTULUI DE APĂ DIN VIN (OIV-AS-2-09-MOUO18) – Metodă tip II	11
5. INDICELE FOLIN-CIOCALTEU (OIV-AS-2-10-INDFOL) – Metodă tip IV	12
6. GLUCOZA ȘI FRUCTOZA (OIV-AS-311-02-GLUFUR) – Metodă tip II	14
7. DETERMINAREA ZAHARURILOR PRIN HPLC (ZAHAROZĂ) (OIV-AS-311-03-SUCRES) – Metodă tip II	17
8. DETECTAREA ÎMBOGĂȚIRII MUSTURILOR DE STRUGURI, A MUSTURILOR DE STRUGURI CONCENTRATE, A MUSTURILOR DE STRUGURI CONCENTRATE RECTIFICATE ȘI A VINURILOR, PRIN APLICAREA REZONANȚEI MAGNETICE NUCLEARE A DEUTERIULUI (OIV-AS-311-05-ENRRMN) – Metodă tip I	18
9. TĂRIA ALCOOLICĂ ÎN VOLUME (OIV-AS-312-01-TALVOL) – Metodă tip I	19
10. DETERMINAREA PRIN SPECTROMETRIA IZOTOPICĂ DE MASĂ A RAPORTULUI IZOTOPIC $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ AL ETANOLULUI DIN VIN SAU AL ETANOLULUI OBTINUT PRIN FERMENTAREA MUSTURILOR, A MUSTURILOR CONCENTRATE SAU A MUSTURILOR CONCENTRATE RECTIFICATE (OIV-AS-312-06-ETHANO) – Metodă tip II	20
11. ACIDITATEA TOTALĂ (OIV - AS-313-01-ACITOT) – Metodă tip I	27
12. ACIDITATEA VOLATILĂ (OIV - AS-313-02-ACIVOL) – Metodă tip I	30
13. ACIDUL CITRIC (OIV -AS-313-09-ACIENZ) – Metodă tip II	33
14. ACIDUL SORBIC (OIV - AS-313-14-ACISOR) – Metodă tip IV	36
15. pH-ul (OIV - AS-313-15-PH) – Metodă tip I	39
16. DETERMINAREA SIMULTANĂ A ACIDULUI L-ASCORBIC ȘI A ACIDULUI D-IZOASCORBIC PRIN HPLC ȘI DETECTARE UV (OIV-AS-313-22-ACASCO) – Metodă tip II	41
17. DIOXIDUL DE CARBON (OIV - AS-314-01-DIOCAR) – Metodă tip II	45
18. DETERMINAREA DIOXIDULUI DE CARBON DIN VIN PRIN METODA MANOMETRICĂ (OIV – AS314-04-CO2MAN) – Metodă tip II	47
19. MĂSURAREA SUPRAPRESIUNII VINURILOR SPUMANTE ȘI PETIANTE (OIV - AS-314-02-SURPRES) – Metodă tip I	48
20. DETERMINAREA LIZOZIMEI DIN VIN PRIN HPLC (OIV-AS-315-14) – Metodă tip IV	51
21. SULFAȚII (OIV- AS-321-05-SULFAT) – Metodă tip II	54
22. FIERUL (OIV - AS-322-05-FER) – Metodă tip IV	55
23. CUPRUL (OIV – AS 322-06) – Metodă tip IV	56
24. DIOXIDUL DE SULF (OIV - AS-323-04-DIOSU) – Metodă tip II	58

1 MASA VOLUMICĂ LA 20 °C ȘI DENSITATEA RELATIVĂ LA 20 °C (OIV - AS2 - 01- MASVOL) – METODĂ TIP I

1. DEFINIȚII

Masa volumică reprezintă masa per unitate de volum de vin sau de must, la 20 °C. Aceasta se exprimă în grame pe mililitru și este reprezentată prin simbolul $\rho_{20\text{ °C}}$.

Densitatea relativă la 20 °C sau densitatea 20 °C/20 °C reprezintă raportul, exprimat în număr zecimal, dintre masa unui anumit volum de vin sau de must la 20 °C și masa aceluiași volum de apă, la aceeași temperatură. Se exprimă prin simbolul $d_{20\text{ °C}}^{20\text{ °C}}$.

2. PRINCIPIUL METODELOR

Masa volumică și densitatea relativă la 20 °C sunt determinate pe proba de testare:

fie prin picnometrie: metoda de referință,

fie prin densimetrie cu balanța hidrostatică sau prin densimetrie electronică.

Notă

Pentru determinări foarte precise, masa volumică trebuie corectată de acțiunea dioxidului de sulf.

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

$\rho_{20\text{ °C}}$ = masa volumică corectată

$\rho'_{20\text{ °C}}$ = masa volumică observată

S = dioxid de sulf total în g/l

3. TRATAREA PRELIMINARĂ A PROBEI

Dacă vinul sau mustul conține cantități semnificative de dioxid de carbon, acesta se elimină în cea mai mare parte prin agitarea a 250 ml de vin într-un recipient de 1 000 ml sau prin filtrarea la presiune redusă prin 2 g de vată plasată într-un tub prelungitor.

4. METODA DE REFERINȚĂ

4.1. Aparatura

Echipament de laborator normal, în special:

- 4.1.1. Picnometru ⁽¹⁾ din sticlă pirex cu o capacitate de aproximativ 100 ml, dotat cu un termometru detașabil cu îmbinare din sticlă șlefuită, calibrat în zecimi de grad, de la 10 ° la 30 °C. Termometrul trebuie să fie standardizat (figura 1).

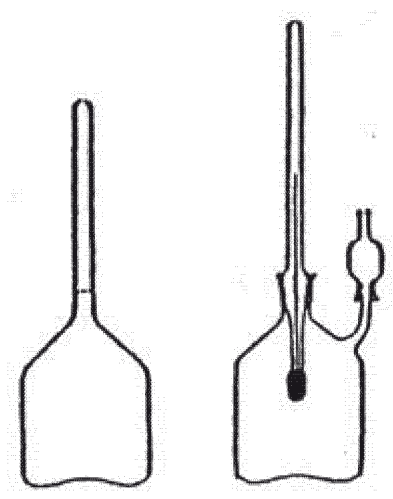


Figura 1

Picnometru și tară

Acest picnometru are un tub lateral cu o lungime de 25 mm și un diametru interior de maxim 1 mm, care se termină printr-o îmbinare conică șlefuită. Tubul lateral poate fi etanșat cu un „dop rezervor” format dintr-un tub conic de legătură din sticlă șlefuită și terminat cu o secțiune ascuțită. Dopul folosește drept cameră de expansiune.

⁽¹⁾ Se poate utiliza orice picnometru cu caracteristici echivalente.

Cele două îmbinări șlefuite ale aparatului se pregătesc cu atenție deosebită.

- 4.1.2. Un recipient tară cu același volum exterior (sub 1 ml, cu aproximație) ca și picnometrul și cu masa egală cu masa picnometrului umplut cu un lichid cu densitatea 1.01 (soluție de clorură de sodiu 2,0 % m/v).

Recipient izolat termic, ajustat exact pe corpul picnometrului.

- 4.1.3. O balanță cu două talere cu o plăjă de cel puțin 300 g și cu o sensibilitate de 0,1 mg,

sau,

o balanță cu un taler cu o plăjă de cel puțin 200 g și cu o sensibilitate de 0,1 mg.

4.2. **Calibrarea picnometrului**

Calibrarea picnometrului implică determinarea următoarelor caracteristici:

- tara picnometrului vid,
- volumul picnometrului la 20 °C,
- masa picnometrului umplut cu apă la 20 °C.

4.2.1. *Metoda utilizării unei balanțe cu două talere*

Recipientul tară fiind așezat pe talerul stâng al balanței, iar picnometrul curat, uscat și prevăzut cu „dopul rezervor” pe talerul drept, se realizează echilibrarea prin adăugarea de greutate pe talerul pe care se află picnometrul: se notează cu p grame.

Se umple picnometrul cu apă distilată la temperatura ambiantă și se fixează termometrul; se șterge picnometrul pentru a-l usca și se așează în recipientul izolat termic; se amestecă prin rotirea recipientului până când temperatura arătată de termometru este constantă. Se reglează cu atenție nivelul, până la marginea superioară a tubului lateral. Se usucă prin tamponare tubul lateral și se așează dopul; se citește cu atenție temperatura t °C corectând-o pentru eventuala imprecizie a scalei termometrului. Se cântărește picnometrul umplut cu apă și se notează cu p' greutatea, în grame, necesară stabilirii echilibrului.

Calculare

Tararea picnometrului vid:

Tara picnometrului vid = $p + m$

m = masa aerului conținut în picnometru

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

Volumul la 20 °C:

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

unde F_t = factor luat din tabelul I pentru temperatura t °C

$V_{20\text{ °C}}$ trebuie să fie cunoscut în intervalul $\pm 0,001$ ml.

Masa apei la 20 °C:

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

0,998203 = densitatea apei la 20 °C.

4.2.2. *Metoda utilizării unei balanțe cu un taler*

Se determină:

- masa picnometrului curat și uscat: P
- masa picnometrului umplut cu apă la t °C: P_1 urmând metoda descrisă la punctul 4.2.1
- masa recipientului tară T_0

Calculare

Tararea picnometrului vid:

Tara picnometrului vid = $P - m$

unde m = masa aerului din picnometru

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

Volumul la 20 °C:

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

unde F_t = factor luat din tabelul I pentru temperatura t °C.

Volumul la 20 °C trebuie să fie cunoscut în intervalul $\pm 0,001$ ml.

Masa apei la 20 °C:

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

0,998203 = densitatea apei la 20 °C.

4.3. Metoda de determinare

4.3.1. Metoda utilizării unei balanțe cu două talere

Se cântărește picnometrul umplut cu proba pregătită pentru testare (punctul 3), urmându-se procedura descrisă la punctul 4.2.1.

Se notează cu p'' greutatea, în grame, necesară stabilirii echilibrului la t °C.

Masa lichidului conținut în picnometru = $p + m - p''$

Masa volumică aparentă la t °C:

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

Se calculează masa volumică la 20 °C utilizând unul dintre tabelele de corecție prezentate mai jos, în conformitate cu natura lichidului testat: vin sec (tabelul II), must natural sau concentrat (tabelul III), vin dulce (tabelul IV).

Densitatea 20 °C/20 °C a vinului se calculează prin împărțirea la 0,998203 a masei volumice acestuia la 20 °C.

4.3.2. Metoda utilizării unei balanțe cu un taler

Se cântărește recipientul tară și se notează masa acestuia cu T_1

Se calculează $dT = T_1 - T_0$

Masa picnometrului vid în momentul măsurării = $P - m + dT$

Se cântărește picnometrul umplut cu proba pregătită pentru testare (punctul 3), urmându-se procedura descrisă la punctul 4.2.1. Se notează cu P_2 masa acestuia la t °C.

Masa lichidului din picnometru la t °C = $P_2 - (P - m + dT)$

Masa volumică aparentă la t °C:

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

Se calculează masa volumică la 20 °C a lichidului testat: vin sec, must natural și concentrat, vin dulce, cum s-a arătat la punctul 4.3.1.

Densitatea 20 °C/20 °C se calculează prin împărțirea la 0,998203 a masei volumice la 20 °C.

4.3.3. Repetabilitatea determinărilor de masă volumică:

pentru vinurile seci și demidulci: $r = 0,00010$

pentru vinurile dulci: $r = 0,00018$

4.3.4. Reproducibilitatea determinărilor de masă volumică:

pentru vinurile seci și demidulci: $R = 0,00037$

pentru vinurile dulci: $R = 0,00045$

TABELUL I

Factorii F

de multiplicare a masei de apă conținută în picnometrul din sticlă pirex la t °C, pentru calcularea volumului picnometrului la 20 °C

[A se consulta tabelul I din anexa II la metoda AS2 - 01 descrisă în Culegerea de metode internaționale de analiză a OIV]

TABELUL II

Corecția c de temperatură a masei volumice a vinurilor seci și a vinurilor seci dezalcoolizate, măsurată cu un picnometru din sticlă pirex la t °C, pentru exprimarea rezultatului la 20 °C

[A se consulta tabelul II din anexa II la metoda AS2 - 01 descrisă în Culegerea de metode internaționale de analiză a OIV]

$$\rho_{20} = \rho_t \pm (c/1\,000) \quad \begin{array}{l} - \text{dacă } t \text{ °C este sub } 20 \text{ °C} \\ + \text{dacă } t \text{ °C este peste } 20 \text{ °C} \end{array}$$

TABELUL III

Corecția c de temperatură a masei volumice a musturilor naturale și concentrate, măsurată cu un picnometru din sticlă pirex la t °C, pentru exprimarea rezultatului la 20 °C

[A se consulta tabelul III din anexa II la metoda AS2 - 01 descrisă în Culegerea de metode internaționale de analiză a OIV]

$$\rho_{20} = \rho_t \pm (c/1\,000) \quad \begin{array}{l} - \text{dacă } t \text{ °C este sub } 20 \text{ °C} \\ + \text{dacă } t \text{ °C este peste } 20 \text{ °C} \end{array}$$

TABELUL IV

Corecția c de temperatură a masei volumice a vinurilor cu 13 % vol. și mai mult, cu conținut de zahăr rezidual, măsurată cu un picnometru din sticlă pirex la t °C, pentru exprimarea rezultatului la 20 °C

[A se consulta tabelul IV din anexa II la metoda AS2 - 01 descrisă în Culegerea de metode internaționale de analiză a OIV]

$$\rho_{20} = \rho_t \pm (c/1\,000) \quad \begin{array}{l} - \text{dacă } t \text{ °C este sub } 20 \text{ °C} \\ + \text{dacă } t \text{ °C este peste } 20 \text{ °C} \end{array}$$

2 EVALUAREA PRIN REFRACTOMETRIE A CONȚINUTULUI DE ZAHARURI DIN MUSTURI, DIN MUSTURILE CONCENTRATE ȘI DIN MUSTURILE CONCENTRATE RECTIFICATE (OIV - AS2 - 02-SUCREF) – METODĂ TIP I

1. PRINCIPIUL METODEI

Indicele de refracție la 20 °C, exprimat fie ca valoare absolută, fie ca procent din masa de zaharoză, este dat de tabelul corespunzător pentru a furniza un mijloc de a obține conținutul de zaharuri în grame per litru și în grame per kilogram din musturi, din musturile concentrate și din mustul concentrat rectificat.

2. APARATURA

2.1. **Refractometru Abbé**

Refractometrul utilizat trebuie prevăzut cu o scală care să arate:

- fie un procentaj din masa de zaharoză la 0,1 %,
- fie indicii de refracție cu patru zecimale.

Refractometrul trebuie prevăzut cu un termometru cu o scală cel puțin de la + 15 °C la + 25 °C și cu un dispozitiv de circulare a apei care să permită efectuarea determinărilor la o temperatură de 20 °C ± 5 °C.

Instrucțiunile de folosire a acestui instrument trebuie respectate cu strictețe, în special în ceea ce privește calibrarea și sursa de lumină.

3. PREGĂTIREA PROBEI

3.1 **Musturi și musturi concentrate**

Dacă este necesar, se trece mustul printr-un tifon împăturit în patru și, după eliminarea primelor picături de lichid filtrat, se efectuează determinarea pe produsul filtrat.

3.2 **Musturi concentrate rectificate**

În funcție de concentrație, se utilizează fie mustul concentrat rectificat, fie soluția obținută prin completarea a 200 g de must concentrat rectificat, până la 500 g, cu apă, toate cântăririle fiind efectuate cu exactitate.

4. METODA DE LUCRU

Se aduce proba la o temperatură apropiată de 20 °C. Pe prisma inferioară a refractometrului se pune un volum mic din proba de testare, având grijă ca lichidul testat să acopere uniform suprafața sticlei (deoarece prismele sunt ferm presate una pe cealaltă). Determinările se realizează în conformitate cu instrucțiunile de funcționare ale instrumentului utilizat.

Se citește procentul de zaharoză din masă cu o precizie de 0,1 % sau se citește indicele de refracție cu patru zecimale.

Se efectuează cel puțin două determinări pe aceeași probă pregătită. Se notează temperatura t °C.

5. CALCULARE

5.1. **Corecții de temperatură**

5.1.1. Instrumente gradate în procente pe masă de zaharoză: pentru obținerea corecțiilor de temperatură se utilizează tabelul I.

5.1.2. Instrumente gradate în indice de refracție: se află indicele măsurat la t °C din tabelul II (coloana 1) pentru a se obține valoarea corespunzătoare a procentului din masa de zaharoză la t °C. Această valoare este corectată pentru temperatură și este exprimată la 20 °C cu ajutorul tabelului I.

5.2. **Conținutul de zaharuri din musturi și din musturile concentrate**

Se află din tabelul II procentul din masa de zaharoză la 20 °C pentru a se obține conținutul în zaharuri în grame pe litru și în grame pe kilogram. Conținutul în zaharuri este exprimat cu o zecimală, ca zahăr invertit.

5.3. **Conținutul de zaharuri din mustul concentrat rectificat**

Se află din tabelul III procentul din masa de zaharoză la 20 °C pentru a se obține conținutul în zaharuri în grame pe litru și în grame pe kilogram. Conținutul în zaharuri este exprimat cu o zecimală, ca zahăr invertit.

În cazul în care determinarea a fost efectuată pe must concentrat rectificat și diluat, rezultatul se înmulțește cu factorul de diluție.

5.4. **Indicele de refracție al musturilor, al musturilor concentrate și al musturilor concentrate rectificate**

Se află din tabelul II procentul din masa de zaharoză la 20 °C pentru a se obține indicele de refracție la 20 °C. Acest indice este exprimat cu patru zecimale.

Notă: Tăria alcoolică potențială a musturilor, a musturilor concentrate și a musturilor concentrate rectificate poate fi determinată utilizând tabelul de corespondență care figurează în anexa I la Regulamentul (CE) nr. 1623/2000 al Comisiei din 25 iulie 2000 (JOCE L 194, 31 iulie 2000)

TABELUL I

Corecții care trebuie operate în cazul în care procentul din masa de zaharoză a fost determinat la o altă temperatură decât la 20 °C

[a se consulta tabelul I din anexa la metoda AS2 - 02 descrisă în Culegerea de metode internaționale de analiză a OIV]

TABELUL II

Tabelul conținutului de zaharuri din musturi și din musturile concentrate în grame pe litru și în grame pe kilogram, determinat cu ajutorul refractometrului gradat, fie în procente din masa de zaharoză la 20 °C, fie în indice de refracție la 20 °C. Este dată, de asemenea, masa volumică la 20 °C.

[a se consulta tabelul II din anexa la metoda AS2 - 02 descrisă în Culegerea de metode internaționale de analiză a OIV]

TABELUL III

Tabelul conținutului de zaharuri din musturile concentrate rectificate în grame pe litru și în grame pe kilogram, determinat cu ajutorul refractometrului gradat, fie în procente din masa de zaharoză la 20 °C, fie în indice de refracție la 20 °C. Este dată, de asemenea, masa volumică la 20 °C.

[a se consulta tabelul III din anexa la metoda AS2 - 02 descrisă în Culegerea de metode internaționale de analiză a OIV]

3 EXTRACTUL USCAT TOTAL (OIV-AS-2-03-EXTSEC) MATERIA USCATĂ TOTALĂ – METODĂ TIP I**1. DEFINIȚIE**

Extractul uscat total sau materia uscată totală reprezintă totalitatea substanțelor care, în condiții fizice specificate, nu se volatilizează. Aceste condiții fizice trebuie să fie de așa natură încât substanțele care formează extractul să fie alterate cât mai puțin posibil.

Extractul nereducător reprezintă diferența dintre extractul uscat total și totalul zaharurilor.

Extractul redus reprezintă diferența dintre extractul sec total și totalul zaharurilor care depășesc 1 g/l, sulfatul de potasiu care depășește 1 g/l, manitolul, dacă acesta este prezent, și orice alte substanțe chimice care au fost adăugate vinului.

Extractul rezidual reprezintă diferența dintre extractul nereducător și aciditatea fixă, exprimată ca acid tartric.

Extractul se exprimă în grame pe litru și trebuie determinat cu o precizie de 0,5 g.

2. PRINCIPIUL METODEI

[Descrierea acestei metode de analiză face obiectul unei actualizări de către autoritățile OIV. Aceasta va fi publicată într-o viitoare comunicare a Comisiei imediat ce textul actualizat va fi publicat de OIV în ediția 2010 a Culegerii de metode internaționale de analiză a OIV. Cu titlu informativ, în așteptarea acestei publicări, se poate consulta capitolul 4 din anexa la Regulamentul (CEE) nr. 2676/90 al Comisiei.]

4 DETERMINAREA RAPORTULUI IZOTOPIC $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ AL CONȚINUTULUI DE APĂ DIN VIN (OIV-AS-2-09-MOUO18) – METODĂ TIP II

(p.m.)

[Descrierea acestei metode de analiză face obiectul unei actualizări de către autoritățile OIV. Aceasta va fi publicată într-o viitoare comunicare a Comisiei imediat ce textul actualizat va fi publicat de OIV în ediția 2010 a Culegerii de metode internaționale de analiză a OIV. Cu titlu informativ, în așteptarea acestei publicări, se poate consulta capitolul 43 din anexa la Regulamentul (CEE) nr. 2676/90 al Comisiei.]

5 INDICELE FOLIN-CIOCÂLTEU (OIV-AS-2-10-INDFOL) – METODĂ TIP IV**1. DEFINIȚIE**

Indicele Folin-Ciocâlțu este rezultatul obținut din aplicarea metodei descrise mai jos.

2. PRINCIPIUL METODEI

Toți compușii fenolici din vin sunt oxidați de reactivul Folin-Ciocâlțu. Acest reactiv este format dintr-un amestec de acid fosfowolframic ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) și de acid fosfomolibdic ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$) care, după oxidarea fenolilor, este redus la un amestec de oxizi albaștri de tungsten (W_8O_{23}) și de molibden (Mo_8O_{23}).

Colorația albastră produsă are o absorbție maximă în zona 750 nm și este proporțională cu totalul cantității de compuși fenolici prezenți inițial.

3. REACTIVI

Reactivii trebuie să fie analitici. Apa utilizată trebuie să fie apă distilată sau de puritate echivalentă.

3.1. Reactivul Folin-Ciocâlțu

Acest reactiv este disponibil în comerț într-o formă pregătită pentru utilizare. Reactivul poate fi preparat după cum urmează: se dizolvă 100 g de wolframat de sodiu ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) și 25 g de molibdat de sodiu ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) în 700 ml de apă distilată; se adaugă 50 ml de acid fosforic 85 % ($\rho_{20} = 1,71 \text{ g/ml}$) și 100 ml de acid clorhidric concentrat ($\rho_{20} = 1,19 \text{ g/ml}$). Se aduce la temperatura de fierbere și se fierbe zece ore la reflux. Se adaugă apoi 150 g de sulfat de litiu ($\text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) și câteva picături de brom și se fierbe timp de încă 15 minute. Se lasă să se răcească și se completează până la un litru cu apă distilată.

3.2. Carbonat de sodiu anhidru (Na_2CO_3) în soluție de 20 % (m/v).**4. APARATURA**

Aparatura normală de laborator, în special:

4.1. Baloane cotate de 100 ml.**4.2. Spectrofotometru care poate funcționa la 750 nm.****5. METODA DE LUCRU****5.1. Vinuri roșii**

Într-un balon cotate de 100 ml (punctul 4.1), se introduc următoarele, respectând exact ordinea dată:

1 ml de vin diluat 1:5

50 ml de apă distilată

5 ml de reactiv Folin-Ciocâlțu (3.1)

20 ml de soluție de carbonat de sodiu (3.2)

Se completează până la 100 ml cu apă distilată.

Se amestecă pentru omogenizare. Se așteaptă 30 minute pentru stabilizarea reacției. Se determină absorbția la 750 nm printr-un drum optic de 1 cm față de un blanc pregătit cu apă distilată în locul vinului.

Dacă absorbția nu este în jur de 0,3, trebuie să se modifice diluarea vinului.

5.2. Vinuri albe

Se efectuează aceeași procedură cu 1 ml de vin nediluat.

5.3. Musturi concentrate rectificate**5.3.1. Pregătirea probei**

Se utilizează soluția cu un conținut de zaharuri de 25 % (m/m) (25 ° Brix) pregătită conform descrierii din capitolul „pH” secțiunea 4.1.2.

5.3.2. *Determinări*

Se procedează conform descrierii din cazul vinurilor roșii (punctul 5.1) utilizând 5 ml de probă preparată conform descrierii de la punctul 5.3.1, măsurând absorbția față de un blanc pregătit cu 5 ml de soluție de zahăr invertit 25 % (m/m).

6. **EXPRIMAREA REZULTATELOR**6.1. **Metoda de calcul**

Rezultatul este exprimat sub forma unui indice, obținut prin înmulțirea absorbției cu 100 în cazul vinurilor roșii diluate 1:5 (sau cu factorul corespunzător diluției utilizate) și cu 20 în cazul vinurilor albe. În cazul musturilor concentrate rectificate, absorbția se înmulțește cu 16.

6.2. **Repetabilitatea**

Diferența dintre rezultatele a două determinări efectuate simultan sau imediat una după cealaltă, de către același analist, nu trebuie să fie mai mare de 1.

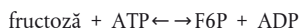
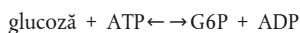
O bună repetabilitate a rezultatelor este obținută prin utilizarea unei aparaturi (baloane cotate și cuve spectrometrice) curățate foarte atent.

6 GLUCOZA ȘI FRUCTOZA (OIV-AS-311-02-GLUFU) – METODĂ TIP II**1. DEFINIȚIE**

Glucoza și fructoza pot fi determinate individual printr-o metodă enzimatică, având ca unic obiectiv calcularea raportului glucoză/fructoză.

2. PRINCIPIUL METODEI

Glucoza și fructoza sunt fosforilate cu adenosin trifosfat (ATP) printr-o reacție enzimatică catalizată de hexochinază (HK) și produc glucoză 6-fosfat (G6P) și fructoză 6-fosfat (F6P):



Într-o primă etapă, glucoză 6-fosfat este oxidat în gluconat 6-fosfat de către nicotinamid adenin dinucleotid fosfat (NADP) în prezența enzimei glucoză 6-fosfat dehidrogenază (G6PDH). Cantitatea de nicotinamid adenin dinucleotid fosfat redus (NADPH) produsă corespunde celei de glucoză 6-fosfat și, prin urmare, celei de glucoză.



Cantitatea de nicotinamid adenin dinucleotid fosfat redus se determină din absorbția la 340 nm.

La sfârșitul acestei reacții, fructoza 6-fosfat este transformată în glucoză 6-fosfat, prin acțiunea fosfoglucozei izomerizate (PGI):



Glucoza 6-fosfat reacționează din nou cu nicotinamid adenin dinucleotid fosfat pentru a rezulta gluconat 6-fosfat și nicotinamid adenin dinucleotid fosfat redus; acesta din urmă va fi determinat.

3. APARATURA

— Spectrofotometru pentru determinări la 340 nm, lungimea de undă la care absorbția de NADPH este maximă. În ceea ce privește măsurătorile absolute (fără a fi folosite diagrame de calibrare, dar standardizarea efectuându-se pe baza coeficientului de extincție al NADPH), trebuie controlate scala lungimilor de undă și valorile puterii de absorbție.

În cazul în care acesta nu este disponibil, se poate utiliza un spectrofotometru cu o sursă cu spectru discontinuu pentru determinări la 334 nm sau la 365 nm.

— Cuve de sticlă cu lungimea drumului optic de 1 cm sau cuve de unică folosință.

— Pipete pentru soluțiile testului enzimatic de 0,02, 0,05, 0,1 și 0,2 ml.

4. REACTIVI

- 4.1. Soluția 1:** soluție-tampon (trietanolamină 0,3 M; pH = 7,6; 4×10^{-3} M în Mg^{2+}): se dizolvă 11,2 g de clorhidrat de trietanolamină ($\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{N}\cdot\text{HCl}$) și 0,2 g $\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ în 150 ml de apă bidistilată. Se adaugă aproximativ 4 ml de soluție 5 M de hidroxid de sodiu (NaOH) pentru a obține o valoare a pH-ului de 7,6 și se completează până la 200 ml.

Această soluție-tampon se păstrează timp de 4 săptămâni la + 4 °C.

- 4.2. Soluția 2:** soluția de nicotinamid adenin dinucleotid fosfat (aproximativ $11,5 \times 10^{-3}$ M): se dizolvă 50 mg de nicotinamid adenin dinucleotid fosfat disodic în 5 ml de apă bidistilată.

Această soluție se păstrează timp de 4 săptămâni la + 4 °C.

- 4.3. Soluția 3:** soluția de adenosin 5'-trifosfat (aproximativ 81×10^{-3} M): se dizolvă 250 mg de adenosin 5'-trifosfat disodic și 250 mg de bicarbonat de sodiu Na H CO_3 în 5 ml de apă bidistilată.

Această soluție se păstrează timp de 4 săptămâni la + 4 °C.

- 4.4. Soluția 4:** Hexochinază/glucoză 6-fosfat dehidrogenază: se amestecă 0,5 ml de hexochinază (2 mg de proteină/ml sau 280 U/ml) cu 0,5 ml de glucoză 6-fosfat dehidrogenază (1 mg de proteină/ml).

Această soluție se păstrează timp de un an la + 4 °C.

- 4.5. **Soluția 5:** Fosfoglucoizomerază (2 mg de proteină/ml sau 700 U/ml). Suspensia este utilizată nediluată.

Această soluție se păstrează timp de un an la + 4 °C.

Notă:

Toți reactivii necesari pentru această determinare sunt disponibili în comerț.

5. METODA DE LUCRU

5.1. Pregătirea probei

În funcție de cantitatea estimată de glucoză + fructoză pe litru, proba se diluează după cum urmează:

Măsurare la 340 și 334 nm	Măsurare la 365 nm	Diluție cu apă	Factorul de diluție F
Până la 0,4 g/l	Până la 0,8 g/l	—	—
Până la 4,0 g/l	Până la 8,0 g/l	1 + 9	10
Până la 10,0 g/l	Până la 20,0 g/l	1 + 24	25
Până la 20,0 g/l	Până la 40,0 g/l	1 + 49	50
Până la 40,0 g/l	Până la 80,0 g/l	1 + 99	100
Peste 40,0 g/l	Peste 80,0 g/l	1 + 999	1 000

5.2. Determinarea

Cu ajutorul spectrofotometrului reglat pe lungimea de undă 340 nm, se efectuează măsurători folosind aerul (fără cuvă pe drumul optic) sau apa ca referință.

Temperatura între 20 și 25 °C.

În două cuve cu drumul optic de 1 cm se introduc următoarele:

	Cuva de referință	Cuva probă
Soluția 1 (4.1) (la 20 °C)	2,50 ml	2,50 ml
Soluția 2 (4.2)	0,10 ml	0,10 ml
Soluția 3 (4.3)	0,10 ml	0,10 ml
Probă pentru măsurare		0,20 ml
Apă bidistilată	0,20 ml	

Se amestecă și, după aproximativ 3 minute, se citește absorbția soluțiilor (A1). Reacția se începe prin adăugarea:

Soluția 4 (4.4)	0,02 ml	0,02 ml
-----------------	---------	---------

Se amestecă și se așteaptă 15 minute; se citește absorbția și, după 2 minute, se verifică dacă reacția s-a oprit (A2).

Se adaugă imediat:

Soluția 5 (4.5)	0,02 ml	0,02 ml
-----------------	---------	---------

Se amestecă; se citește absorbția după 10 minute și, după 2 minute, se verifică dacă reacția s-a oprit (A3).

Se calculează diferențele de absorbție:

$A_2 - A_1$ corespunzătoare glucozei,

$A_3 - A_2$ corespunzătoare fructozei,

pentru cuva de referință și cuva probă.

Se calculează diferența de absorbție dintre cuva de referință (ΔA_R) și cuva probă (ΔA_S) și se obține:

pentru glucoză: $\Delta A_G = \Delta A_S - \Delta A_R$

pentru fructoză: $\Delta A_F = \Delta A_S - \Delta A_R$

Notă:

Timul necesar pentru acțiunea enzimelor poate varia de la un lot la altul. Valoarea de mai sus are doar caracter orientativ și se recomandă ca ea să fie determinată pentru fiecare lot.

5.3. **Exprimarea rezultatelor**

5.3.1. *Calculare*

Formula generală pentru calcularea concentrațiilor este următoarea:

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

V = volumul soluției testate (ml)

v = volumul probei (ml)

M = masa moleculară a substanței de determinat

d = drumul optic al cuvei (cm)

ϵ = coeficientul de absorbție al NADPH la 340 nm = $6,3 \text{ (mmol}^{-1} \times l \times \text{cm}^{-1})$

V = 2,92 ml pentru măsurarea glucozei

V = 2,94 ml pentru măsurarea fructozei

v = 0,20 ml

M = 180

d = 1.

Se obține:

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

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

Dacă proba a fost diluată în timpul preparării, se înmulțește rezultatul cu factorul de diluare F.

Notă:

În cazul în care determinările se efectuează la 334 sau 365 nm, se obțin următoarele:

— măsurarea la 334 nm: $\epsilon = 6,2 \text{ (mmol}^{-1} \times l \times \text{cm}^{-1})$

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

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

— măsurarea la 365 nm: $\epsilon = 3,4 \text{ (mmol}^{-1} \times l \times \text{cm}^{-1})$

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

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

5.3.2. *Repetabilitatea (r)*

$$r = 0,056 \times x_i$$

5.3.3. *Reproductibilitatea (R)*

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

x_i = conținutul de glucoză sau fructoză în g/l.

7 DETERMINAREA ZAHARURILOR PRIN HPLC (ZAHAROZĂ) (OIV-AS-311-03-SUCRES) – METODĂ TIP II**(p.m.)**

[Descrierea acestei metode de analiză face obiectul unei actualizări de către autoritățile OIV. Aceasta va fi publicată într-o viitoare comunicare a Comisiei imediat ce textul actualizat va fi publicat de OIV în ediția 2010 a Culegerii de metode internaționale de analiză a OIV. Cu titlu informativ, în așteptarea acestei publicări, se poate consulta capitolul 6 alineatul (3) din anexa la Regulamentul (CEE) nr. 2676/90 al Comisiei.]

8 DETECTAREA ÎMBOGĂȚIRII MUSTURILOR DE STRUGURI, A MUSTURILOR DE STRUGURI CONCENTRATE, A MUSTURILOR DE STRUGURI CONCENTRATE RECTIFICATE ȘI A VINURILOR PRIN APLICAREA REZONANȚEI MAGNETICE NUCLEARE A DEUTERIULUI (OIV-AS-311-05-ENRRMN) – METODĂ TIP I

(p.m.)

[Descrierea acestei metode de analiză face obiectul unei reexaminări de către autoritățile științifice ale OIV. Aceasta va fi publicată într-o comunicare a Comisiei imediat ce textul definitiv va fi adoptat de Adunarea Generală a OIV. Cu titlu informativ, în așteptarea acestei decizii a OIV, se poate consulta capitolul 8 din anexa la Regulamentul (CEE) nr. 2676/90 al Comisiei.]

9 TĂRIA ALCOOLICĂ ÎN VOLUME (OIV-AS-312-01-TALVOL) – METODĂ TIP I**(p.m.)**

[Descrierea acestor metode de analiză face obiectul unei actualizări de către autoritățile OIV. Aceste metode vor fi publicate într-o viitoare comunicare a Comisiei imediat ce textul actualizat va fi publicat de OIV în ediția 2010 a Culegerii de metode internaționale de analiză a OIV. Cu titlu informativ, în așteptarea acestei publicări a OIV, se poate consulta capitolul 3 din anexa la Regulamentul (CEE) nr. 2676/90 al Comisiei.]

10 DETERMINAREA PRIN SPECTROMETRIA IZOTOPICĂ DE MASĂ A RAPORTULUI $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ AL ETANOLULUI DIN VIN SAU AL ETANOLULUI OBTINUT PRIN FERMENTAREA MUSTURILOR, A MUSTURILOR CONCENTRATE SAU A MUSTURILOR CONCENTRATE RECTIFICATE (OIV-AS-312-06-ETHANO) – METODĂ TIP II

1. DOMENIUL DE APLICARE

Metoda permite măsurarea raportului izotopic $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ al etanolului din vin și al etanolului obținut prin fermentarea produselor vitivinicole (must, must concentrat, must concentrat rectificat).

2. STANDARDE DE REFERINȚĂ

ISO: 5725:1994 „Acuratețea metodelor de măsurare — Determinarea repetabilității și a reproductibilității unei metode de măsurare standard prin studii inter-laborator”.

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

Metoda OIV AS-311-O5-ENRRMN „Detectarea îmbogățirii musturilor, a musturilor concentrate, a musturilor concentrate rectificate și a vinurilor prin aplicarea rezonanței magnetice nucleare a deuteriului (RMN-FINS)”.

3. TERMENI ȘI DEFINIȚII

$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$: Raportul dintre izotopul de carbon 13 (^{13}C) și izotopul de carbon 12 (^{12}C) pentru o probă dată.

$\delta^{13}\text{C}$: conținutul de carbon 13 (^{13}C) exprimat în părți la mie (‰).

RMN-FINS: Fraționarea izotopului natural specific, studiat prin rezonanță magnetică nucleară.

V-PDB: Vienna-Pee-Dee Belemnite. PDB este materialul primar de referință pentru măsurarea variațiilor naturale ale conținutului izotopic de carbon 13, constând într-un carbonat de calciu provenit dintr-un rostru de belemnite din Cretacic din formațiunea Pee-Dee din Carolina de Sud (SUA). Raportul său izotopic $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ sau R_{PDB} este $R_{\text{PDB}} = 0,0112372$. Rezervele de PDB sunt epuizate de multă vreme, însă acesta a rămas materialul primar de referință pentru exprimarea variațiilor naturale ale conținutului izotopic de carbon 13, față de care se etalonează materialul de referință disponibil la Agenția Internațională pentru Energia Atomică (IAEA) din Viena (Austria). Determinările izotopice ale rezervelor naturale de carbon 13 se exprimă, prin convenție, în raport cu V-PDB.

m/z: Raportul masă/sarcină.

4. PRINCIPIU

În timpul fotosintezei, asimilarea dioxidului de carbon de către plante se produce prin două forme principale de metabolism, și anume metabolismul C_3 (ciclul lui Calvin) și metabolismul C_4 (Hatch și Slack). Aceste două mecanisme de fotosinteză prezintă o fracționare izotopică diferită. Astfel, produsele provenite din plante C_4 , cum ar fi zaharurile și alcoolul derivat din fermentație, au un conținut mai ridicat de carbon 13 decât produsele similare provenite din plante C_3 . Majoritatea plantelor, inclusiv vița-de-vie și sfecla de zahăr, aparțin grupului C_3 . Trestia de zahăr și porumbul aparțin grupului C_4 . Măsurarea conținutului de carbon 13 permite detectarea și evaluarea zaharurilor cu origine C_4 (zahăr din trestie de zahăr sau izoglucoză de porumb) adăugate produselor provenite din struguri (musturi de struguri, vinuri etc.). Informațiile privind conținutul de carbon 13, combinate cu cele obținute prin RMN-FINS, permit determinarea cantităților adăugate de amestecuri de zaharuri sau de alcooluri derivate din plante C_3 și C_4 .

Conținutul de carbon 13 se determină pe dioxidul de carbon rezultat în urma combustiei complete a probei. Abundența principalilor izotopomeri cu masa de 44 ($^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2$), 45 ($^{13}\text{C}^{16}\text{O}_2$ și $^{12}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O}$) și 46 ($^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$), care rezultă din diferitele combinații posibile între izotopii ^{18}O , ^{17}O , ^{16}O , ^{13}C și ^{12}C , se determină pe baza curenților ionici măsurați prin trei colectori diferiți ai unui spectrometru izotopic de masă. Contribuțiile izotopomerilor $^{13}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O}$ și $^{12}\text{C}^{17}\text{O}_2$ pot fi neglijate, datorită nivelurilor reduse ale acestora. Curentul ionic

pentru $m/z = 45$ se corectează prin contribuția $^{12}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O}$, care se calculează în funcție de intensitatea curentului măsurat pentru $m/z = 46$, ținând seama de abundența relativă a ^{18}O și ^{17}O (corecția Craig). Compararea cu o referință etalonată față de referința internațională V-PDB permite calcularea conținutului de carbon 13 pe scara relativă $\delta^{13}\text{C}$.

5. REACTIVI

Materialul și consumabilele depind de aparatura (punctul 6) utilizată de laborator. Sistemele utilizate în general se bazează pe analizori elementari. Aceste sisteme pot fi echipate pentru a permite introducerea de probe închise în capsule metalice sigilate sau injectarea de probe lichide printr-un septum, cu ajutorul unei seringi.

În funcție de tipul dispozitivului utilizat, se pot utiliza materialele de referință, reactivii și consumabilele de mai jos:

— materiale de referință

— disponibile de la IAEA:

Denumire	Material	$\delta^{13}\text{C}$ în raport cu V-PDB (9)
— IAEA-CH-6	zaharoză	− 10,4 ‰
— IAEA-CH-7	polietilenă	− 31,8 ‰
— NBS22	ulei	− 29,7 ‰
— USGS24	grafit	− 16,1 ‰

— disponibile de la Institutul pentru materiale și măsurări de referință (IRMM) din Geel (BE):

Denumire	Material	$\delta^{13}\text{C}$ în raport cu V-PDB (9)
— CRM/BCR 656	alcool din vin	− 26,93 ‰
— CRM/BCR 657	glucoză	− 10,75 ‰
— CRM/BCR 660	soluție hidroalcoolică (TAV 12 %)	− 26,72 ‰

— O probă de lucru standard, cu un raport $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ cunoscut, etalonat față de materialele de referință internaționale.

— Lista indicativă de consumabile de mai jos se stabilește pentru sistemele cu flux continuu:

— heliu pentru analiză (CAS 07440-59-7),

— oxigen pentru analiză (CAS 07782-44-7),

— dioxid de carbon pentru analiză, utilizat ca gaz de referință secundar pentru conținutul de carbon 13 (CAS 00124-38-9),

— reactiv de oxidare pentru cuptorul sistemului de combustie, de exemplu oxid de cupru (II) pentru analiză elementară (CAS 1317-38-0),

— deshidratant pentru eliminarea apei produse în combustie, de exemplu anhidronă pentru analiză elementară (perclorat de magneziu) (CAS 10034-81-8) (nu este necesar în cazul aparatelor echipate cu un sistem de eliminare a apei prin crioseparatoare sau capilare selectiv permeabile).

6. APARATURĂ ȘI ECHIPAMENT

6.1. Spectrometru de masă de raport izotopic (SMRI)

Spectrometru de masă de raport izotopic (SMRI), care permite determinarea conținutului relativ de ^{13}C din gazul de CO_2 în formă naturală, cu o precizie internă de cel puțin 0,05 ‰, exprimată în valoare relativă (punctul 9). Precizia internă se definește aici ca diferența dintre două măsurători efectuate pe aceeași probă de CO_2 . Spectrometrul de masă utilizat pentru măsurarea raporturilor izotopice este, în general, echipat cu un colector triplu, pentru măsurarea simultană a intensităților pentru $m/z = 44$, 45 și 46. Spectrometrul de masă de raport izotopic trebuie să fie echipat cu un sistem de introducere dublu, pentru măsurarea alternativă a unei probe necunoscute și a unei probe de referință, fie să utilizeze un sistem integrat care efectuează combustia cantitativă a probelor și separă dioxidul de carbon de alți produși de combustie înaintea măsurătorii din spectrometrul de masă.

6.2. Aparatură de combustie

Aparatură de combustie care să permită convertirea cantitativă a etanolului în dioxid de carbon și eliminarea tuturor celorlalți produși de combustie, inclusiv a apei, fără nicio fracționare izotopică. Aparatura poate fi fie un sistem cu flux continuu integrat în aparatura de spectrometrie de masă (punctul 6.2.1), fie un sistem separat de combustie (punctul 6.2.2). Aparatura trebuie să permită obținerea unei precizii cel puțin echivalente cu cea indicată la punctul 11.

6.2.1. Sisteme cu flux continuu

Acestea sunt constituite fie dintr-un analizor elementar, fie dintr-un cromatograf în fază gazoasă, echipat cu un sistem de combustie integrat.

Pentru sistemele echipate pentru introducerea de probe conținute în capsule metalice, se utilizează următorul echipament de laborator:

- microseringă sau micropipetă volumetrică cu vârful corespunzătoare,
- cântar cu precizie de cel puțin 1 µg,
- pensetă pentru încapsulare,
- capsule de staniu pentru probe lichide,
- capsule de staniu pentru probe solide.

Notă:

pentru a reduce riscul de evaporare a probelor de etanol, se poate introduce în capsule un material absorbant (de exemplu, *chromosorb W 45-60 mesh*), după ce s-a verificat în prealabil, printr-o măsurătoare fără probă, că acesta nu conține o cantitate semnificativă de carbon care ar putea modifica rezultatele.

În cazul utilizării unui analizor elementar prevăzut cu un injector pentru lichide sau în cazul unui sistem de pregătire prin cromatografie de combustie, se utilizează următoarele echipamente de laborator:

- seringă pentru lichide,
- flacoane prevăzute cu sisteme de închidere etanșă și septumuri inerte.

Echipamentele de laborator indicate în lista de mai sus constituie exemple și pot fi înlocuite cu alte echipamente cu performanțe echivalente, în funcție de tipul de combustie și de aparatura de spectrometrie de masă utilizată de către laborator.

6.2.2. Sisteme separate de pregătire

În acest caz, probele de dioxid de carbon care rezultă din combustia probelor de analizat și a probei de referință se colectează în fiole, care sunt introduse apoi în sistemul dublu de intrare al spectrometrului pentru analiza izotopică. Se pot utiliza mai multe tipuri de aparate de combustie descrise în literatură:

- sistem închis de combustie umplut cu oxigen circulant,
- analizor elementar cu flux de heliu și oxigen,
- flacon etanș de sticlă umplut cu oxid de cupru (II) ca agent de oxidare.

7. PREGĂTIREA PROBELOR PENTRU TESTARE

Etanolul trebuie extras din vin înaintea determinării izotopice. Extracția se realizează prin distilarea vinului în conformitate cu descrierea de la punctul 3.1 din metoda RMN-FINS (OIV - MA-E-AS311-05-ENRRMN).

În cazul mustului de struguri, al mustului de struguri concentrat și al mustului de struguri concentrat rectificat, zaharurile trebuie fermentate mai întâi în etanol, în conformitate cu descrierea de la punctul 3.2 din metoda RMN-FINS (OIV - MA-E-AS311-05-ENRRMN).

8. PROCEDURĂ

Toate etapele pregătitoare trebuie realizate fără o pierdere semnificativă de etanol prin evaporare, care ar putea modifica compoziția izotopică a probei.

Următoarea descriere se referă la procedurile utilizate în general pentru combustia probei de etanol cu ajutorul sistemelor automatizate de combustie comerciale. Orice altă metodă, care asigură convertirea întregii probe de etanol în dioxid de carbon, fără nicio pierdere de etanol prin evaporare, poate fi utilizată pentru pregătirea dioxidului de carbon pentru analiza izotopică.

Procedul experimental bazat pe utilizarea unui analizor elementar:

a) introducerea probelor în capsule:

- se utilizează capsule, o pensetă și o tavă de preparare curate,
- se ia o capsulă de dimensiuni corespunzătoare, cu ajutorul pensetei,
- se introduce o cantitate corespunzătoare de lichid în capsulă, cu ajutorul micropipetei,
- *Notă:*

Pentru obținerea a 2 mg de carbon sunt necesare 3,84 mg de etanol absolut sau 4,17 mg de distilat cu o tărie alcoolică de 92 % m/m. Cantitatea corespunzătoare de distilat trebuie calculată pe această bază, în funcție de cantitatea de carbon necesară, având în vedere sensibilitatea aparaturii de spectrometrie de masă.
- se închide capsula cu ajutorul pensetei,
- fiecare capsulă trebuie complet sigilată. În caz contrar, aceasta se aruncă și se pregătește o nouă capsulă,
- pentru fiecare probă trebuie pregătite două capsule,
- se introduce capsula în locul corespunzător de pe platoul modulului automat de manevrare a probelor al analizorului elementar. Fiecare capsulă trebuie identificată cu atenție printr-un număr de serie,
- se introduc sistematic capsulele care conțin referințele de lucru, la începutul și la sfârșitul seriei de probe,
- se introduc regulat probe de control în seria de probe;

b) controlul și ajustarea analizorului elementar și a aparatului de spectrometrie de masă

- se ajustează temperatura cuptoarelor analizorului elementar și fluxurile de heliu și de oxigen pentru combustia optimă a probei,
- se verifică analizorul elementar și sistemul de spectrometrie de masă pentru a detecta eventualele scurgeri (de exemplu, prin controlarea curentului ionic pentru $m/z = 28$ pentru N_2),
- se ajustează spectrometrul de masă pentru măsurarea intensității curenților ionici pentru $m/z = 44, 45$ și 46 ,
- se verifică sistemul cu ajutorul unor probe de control cunoscute înainte de începerea măsurării probelor;

c) efectuarea unei serii de măsurători

Probele așezate pe modulul automat de manevrare a probelor al analizorului elementar (sau al cromatografului) se introduc pe rând. Dioxidul de carbon din fiecare combustie a probei este eluat spre spectrometrul de masă care măsoară curenții ionici. Calculatorul interfațat înregistrează intensitățile curenților ionici și calculează valoarea δ pentru fiecare probă (punctul 9).

9. CALCUL

Obiectivul metodei îl reprezintă măsurarea raportului izotopic $^{13}C/^{12}C$ al etanolului extras din vin sau din produse derivate din struguri în urma fermentației. Raportul izotopic $^{13}C/^{12}C$ poate fi exprimat prin deviația sa în raport cu o referință de lucru. Deviația izotopică a carbonului 13 ($\delta^{13}C$) este apoi calculată pe o scară delta la mie ($\delta/1\ 000$), prin compararea rezultatelor obținute pentru proba de măsurat cu cele ale referinței de lucru etalonate anterior pe baza referinței primare internaționale (V-PDB). Valorile $\delta^{13}C$ sunt exprimate în raport cu referința de lucru, după cum urmează:

$$\delta^{13}C_{\text{pro/ref}} \text{‰} = 1\ 000 \times (R_{\text{pro}} - R_{\text{ref}}) / R_{\text{ref}}$$

unde R_{pro} și R_{ref} sunt rapoartele izotopice $^{13}C/^{12}C$ ale probei, respectiv ale dioxidului de carbon utilizat ca gaz de referință.

Valorile $\delta^{13}\text{C}$ sunt exprimate în raport cu V-PDB, după cum urmează:

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{pro/V-PDB}} \text{ ‰} = \delta^{13}\text{C}_{\text{pro/ref}} + \delta^{13}\text{C}_{\text{ref/V-PDB}} + (\delta^{13}\text{C}_{\text{pro/ref}} \times \delta^{13}\text{C}_{\text{ref/V-PDB}})/1\,000$$

unde $\delta^{13}\text{C}_{\text{ref/V-PDB}}$ este deviația izotopică determinată anterior pentru referința de lucru, în raport cu V-PDB.

În timpul măsurării integrate pot să apară mici variații, datorită modificării condițiilor instrumentale. În acest caz, valorile $\delta^{13}\text{C}$ ale probelor trebuie corectate în funcție de diferența dintre valoarea $\delta^{13}\text{C}$ măsurată a referinței de lucru și valoarea sa reală, etalonată anterior față de V-PDB, prin compararea cu unul dintre materialele de referință internaționale. Între două măsurători ale referinței de lucru, variația și, implicit, corecția care trebuie aplicată rezultatelor obținute din probe pot fi considerate liniare. Referința de lucru trebuie măsurată la începutul și la sfârșitul fiecărei serii de probe. Se poate calcula apoi o corecție pentru fiecare probă, cu ajutorul unei interpolări liniare.

10. ASIGURAREA CALITĂȚII ȘI CONTROLUL

Se controlează ca valoarea ^{13}C pentru referința de lucru să nu difere cu mai mult de 0,5 ‰ față de valoarea admisă. În caz contrar, trebuie să se verifice și, după caz, să se ajusteze reglajele aparatului de spectrometrie.

Pentru fiecare probă, se controlează ca diferența dintre rezultatele a două capsule măsurate succesiv să fie mai mică de 0,3 ‰. Rezultatul final pentru o probă dată este valoarea medie a celor două capsule. În cazul în care deviația este mai mare de 0,3 ‰, măsurarea trebuie repetată.

Verificarea corectitudinii măsurării poate fi bazată pe intensitatea curentului ionic pentru $m/z = 44$, care este proporțional cu cantitatea de carbon injectată în analizorul elementar. În condiții standard, intensitatea curentului ionic ar trebui să fie, practic, constantă pentru probele analizate. O deviație semnificativă poate indica o evaporare de etanol (de exemplu, o capsulă insuficient sigilată) sau instabilitatea analizorului elementar sau a spectrometrului de masă.

11. CARACTERISTICI DE PERFORMANȚĂ ALE METODEI (PRECIZIE)

Un studiu inițial în colaborare (punctul 11.1) a fost realizat pe distilate care conțin alcool provenit din vin și alcool de trestie de zahăr și de sfeclă de zahăr, precum și diferite amestecuri de alcool cu aceste trei origini. Întrucât acest studiu nu a luat în considerare procedura de distilare, s-au avut în vedere și informații suplimentare furnizate de alte studii inter-laborator asupra vinurilor (punctul 11.2) și, în special, serii de teste de eficacitate (punctul 11.3) pentru măsurările izotopice. Rezultatele arată că, în condiții satisfăcătoare, în special cele aplicabile măsurărilor prin RMN-FINS, sistemele diferite de distilare nu produc o variație semnificativă în determinarea valorii $\delta^{13}\text{C}$ a etanolului din vin. Parametrii de fidelitate observați pentru vin sunt aproape identici cu cei obținuți în cadrul studiului comun asupra distilatelor (punctul 11.1).

11.1. Studiu comun asupra distilatelor

Anul testelor inter-laborator: 1996

Număr de laboratoare: 20

Număr de probe: 6 probe în comparație dublu-orb

Analit: $\delta^{13}\text{C}$ a etanolului

Codul probei	Alcool provenit din vin	Alcool din sfeclă de zahăr	Alcool din trestie de zahăr
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 %

Probe	A/G	B/C	D/F	E/I	H/K	J/L
Număr de laboratoare reținute după eliminarea rezultatelor aberante	19	18	17	19	19	19
Număr de rezultate acceptate	38	36	34	38	38	38
Valoare medie ($\delta^{13}\text{C}$) ‰	- 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
Deviația standard de repetabilitate (S_r) ‰	0,08	0,09	0,06	0,11	0,08	0,06
Limita de repetabilitate 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
Deviația standard de reproductibilitate (S_R) ‰	0,20	0,18	0,20	0,21	0,18	0,24
Limita de reproductibilitate R ($2,8 \times S_R$) ‰	0,55	0,49	0,55	0,60	0,50	0,68

11.2. Studiu comun pe două vinuri și un alcool

Anul testelor inter-laborator: 1996

Număr de laboratoare: 14 pentru distilarea vinului, dintre care 7 au măsurat și $\delta^{13}\text{C}$ a etanolului din vin, 8 pentru măsurarea valorii $\delta^{13}\text{C}$ a probei de alcool

Număr de probe: 3 (vin alb cu TAV de 9,3 %, vin alb cu TAV de 9,6 % și alcool cu tăria alcoolică de 93 % m/m)

Analit: $\delta^{13}\text{C}$ a etanolului

Probe	Vin roșu	Vin alb	Alcool
Număr de laboratoare	7	7	8
Număr de rezultate acceptate	7	7	8
Valoare medie ($\delta^{13}\text{C}$) ‰	- 26,20	- 26,20	- 25,08
Variația de reproductibilitate S_R^2	0,0525	0,0740	0,0962
Deviația standard de reproductibilitate (S_R) ‰	0,23	0,27	0,31
Limita de reproductibilitate R ($2,8 \times S_R$) ‰	0,64	0,76	0,87

S-au utilizat sisteme diferite de distilare de către laboratoarele participante. Determinările izotopice $\delta^{13}\text{C}$ efectuate într-un singur laborator pe toate distilatele returnate de participanți nu prezintă valori aberante sau valori care diferă semnificativ de valorile medii. Variația între rezultate ($S^2 = 0,0059$) este comparabilă cu variațiile de repetabilitate S_r^2 din studiul comun asupra distilatelor (punctul 11.1).

11.3. Rezultatele exercițiilor efectuate pentru monitorizarea eficacității în realizarea testelor izotopice

Din decembrie 1994, au fost organizate teste internaționale de eficacitate pentru determinarea măsurilor izotopice pentru vin și alcool (distilate cu TAV de 96 %). Rezultatele permit laboratoarelor participante să verifice calitatea propriilor analize. Rezultatele statistice permit aprecierea variației între măsurători în condiții de reproductibilitate și, prin urmare, permit estimarea parametrilor de varianță și a limitei de reproductibilitate. Rezultatele obținute pentru determinarea $\delta^{13}\text{C}$ pentru etanolul din vin și distilate sunt rezumate în tabelul următor:

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

N: număr de laboratoare participante.

11.4. Limite de repetabilitate și de reproductibilitate

Pe baza datelor obținute în urma diferitelor teste inter-laborator prezentate în tabelele de mai sus, se pot stabili următoarele limite de repetabilitate și de reproductibilitate pentru această metodă, inclusiv etapa de distilare:

Limita de repetabilitate r: 0,24

Limita de reproductibilitate R: 0,6.

11 ACIDITATEA TOTALĂ (OIV - AS-313-01-ACITOT) – METODĂ TIP I

1. DEFINIȚIE

Aciditatea totală reprezintă suma acidităților titrabile atunci când pH-ul ajunge la 7 prin adăugarea unei soluții alcaline titrate.

Dioxidul de carbon nu este inclus în aciditatea totală.

2. PRINCIPIUL METODEI

Titrare potențimetrică sau titrare cu albastru de bromotimol ca indicator de sfârșit de reacție prin comparare cu un standard de culoare.

3. REACTIVI

3.1. Soluție tampon cu pH 7,0:

Fosfat monopotasice KH_2PO_4 : 107,3 g

Soluție de hidroxid de sodiu 1 M (NaOH): 500 ml

Apă până la: 1 000 ml.

Ca alternativă, există în comerț soluții tampon gata preparate.

3.2. Soluție de hidroxid de sodiu 0,1 M (NaOH).

3.3. Soluție indicatoare de albastru de bromotimol: 4 g/l.

Albastru de bromotimol ($\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{Br}_2\text{O}_5\text{S}$) 4 g

Alcool neutru 96 % vol. 200 ml

După dizolvare, se adaugă:

Apă lipsită de CO_2 200 ml

Soluție de hidroxid de sodiu 1 M

suficientă pentru a produce culoarea albastru-verde (pH 7) 7,5 ml

Apă până la 1 000 ml

4. APARATURA

4.1. Pompă de vid cu apă.

4.2. Balon de vid de 500 ml.

4.3. Potențiomtru cu scală gradată pentru valori pH și electrozi. Electrocul de sticlă trebuie păstrat în apă distilată. Electrocul de calomel/clorură de potasiu saturată trebuie păstrat în soluție saturată de clorură de potasiu. Cel mai des este folosit un electrod combinat, care trebuie păstrat în apă distilată.

4.4. Cilindri gradați de 50 ml (pentru vin) și de 100 ml (pentru must concentrat rectificat).

5. METODA DE LUCRU

5.1. Pregătirea probei

5.1.1. Vinuri

Se elimină dioxidul de carbon. Se pun aproximativ 50 ml de vin într-un balon de vid; se face vid în balon cu pompa de apă timp de 1-2 minute, agitând continuu.

5.1.2. Must concentrat rectificat

Într-un balon cotelat de 500 ml, se introduc 200 g de must concentrat rectificat măsurat cu precizie. Se completează până la cotă cu apă. Se omogenizează.

5.2. Titrarea potențiometrică

5.2.1. Calibrarea pH-metrului

Calibrarea pH-metrului se efectuează la 20 °C, conform instrucțiunilor producătorului, cu soluția tampon cu pH 7 la 20 °C.

5.2.2. Metoda de determinare

Într-un cilindru gradat (punctul 4.4) se introduce o cantitate din probă, preparată în conformitate cu punctul 5.1, cantitate egală cu 10 ml, în cazul vinului, și cu 50 ml, în cazul mustului concentrat rectificat. Se adaugă circa 10 ml apă distilată și apoi se adaugă soluție de hidroxid de sodiu 0,1 M (punctul 3.2) din biuretă, până când pH-ul este egal cu 7 la 20 °C. Hidroxidul de sodiu trebuie adăugat încet și soluția trebuie amestecată continuu. Se notează cu *n* numărul de mililitri de NaOH 0,1 M adăugați.

5.3. Titrarea cu indicator (albastru de bromotimol)

5.3.1. Test preliminar: determinarea etalonului de culoare

Într-un cilindru gradat (punctul 4.4), se pun 25 ml apă distilată fiartă, 1 ml soluție de albastru de bromotimol (punctul 3.3) și o cantitate preparată în conformitate cu punctul 5.1 egală cu 10 ml, în cazul vinului, și cu 50 ml, în cazul mustului concentrat rectificat. Se adaugă soluție de hidroxid de sodiu 0,1 M (punctul 3.2) până când culoarea devine albastru-verde. Apoi se adaugă 5 ml soluție tampon cu pH 7 (punctul 3.1).

5.3.2. Măsurare

Într-un cilindru gradat (punctul 4.4), se pun 30 ml apă distilată fiartă, 1 ml soluție de albastru de bromotimol (punctul 3.3) și o cantitate din proba preparată în conformitate cu punctul 5.1, egală cu 10 ml, în cazul vinului, și cu 50 ml, în cazul mustului concentrat rectificat. Se adaugă soluție de hidroxid de sodiu 0,1 M (punctul 3.2) până când se obține aceeași culoare ca în testul preliminar de mai sus (punctul 5.3.1). Se notează cu *n* numărul de mililitri de soluție de hidroxid de sodiu 0,1 M adăugați.

6. EXPIMAREA REZULTATELOR

6.1. Metoda de calcul

6.1.1. Vinuri

Aciditatea totală exprimată în miliechivalenți pe litru este dată de formula:

$$A = 10 \, n$$

Se notează cu o cifră zecimală.

Aciditatea totală exprimată în grame de acid tartric pe litru este dată de formula:

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

Se notează cu o cifră zecimală.

6.1.2. Must concentrat rectificat

— Aciditatea totală exprimată în miliechivalenți pe kilogram de must concentrat rectificat este dată de formula:

$$a = 5 \times n$$

— Aciditatea totală exprimată în miliechivalenți pe kilogram de zaharuri totale este dată de formula:

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

P = procentul de concentrație (m/m) a zaharurilor totale.

Se notează cu o cifră zecimală.

6.2. Repetabilitatea (*r*) pentru titrare cu indicator (5.3)

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

$$r = 0,07 \, \text{g acid tartric/l}$$

pentru vinuri albe, rosé și roșii.

6.3. **Reproductibilitatea (R) pentru titrare cu indicator (punctul 5.3)**

Pentru vinuri albe și rosé:

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

$$R = 0,3 \text{ g acid tartric/l.}$$

Pentru vinuri roșii:

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

$$R = 0,4 \text{ g acid tartric/l.}$$

12 ACIDITATEA VOLATILĂ (OIV - AS-313-02-ACIVOL) – METODĂ TIP I**1. DEFINIȚIE**

Aciditatea volatilă este constituită din acizii aparținând seriei acetice prezenți în vin în stare liberă și sub formă de sare.

2. PRINCIPIUL METODEI

Titrare acidimetrică a acidității volatile din vin prin antrenare cu vapori de apă și rectificarea vaporilor.

Mai întâi se elimină dioxidul de carbon din vin.

Aciditatea dioxidului de sulf liber și a dioxidului de sulf combinat, distilate în aceste condiții, trebuie scăzută din aciditatea produsului rezultat în urma distilării.

Trebuie scăzută, de asemenea, aciditatea oricărui acid sorbic adăugat eventual în vin.

Notă:

Acidul salicilic folosit în unele țări pentru a stabili vinurile înainte de analiză este prezent în produsul rezultat în urma distilării. Acesta trebuie determinat și scăzut din aciditate. Metoda de determinare se află la punctul 7 din prezentul capitol.

3. REACTIVI

3.1. Acid tartric cristalizat ($C_4H_6O_6$)

3.2. Soluție de hidroxid de sodiu 0,1 M (NaOH)

3.3. Soluție de fenolfaleină 1 % în alcool neutru 96 % vol.

3.4. Acid clorhidric ($\rho_{20} = 1,18$ până la $1,19$ g/ml) diluat la 1/4 (v/v)

3.5. Soluție de iod 0,005 M (I_2)

3.6. Iodură de potasiu (KI) cristalizată

3.7. Soluție de amidon 5 g/l:

Se amestecă 5 g de amidon cu aproximativ 500 ml de apă. Se aduce la punctul de fierbere, amestecând continuu, și se fierbe timp de 10 minute. Se adaugă 200 g de clorură de sodiu. Când s-a răcit, se completează până la un litru.

3.8. Soluție saturată de borax ($Na_2B_4O_7 \cdot 10 H_2O$), adică aproximativ 55 g/l la 20 °C.

4. APARATURA

4.1. Aparatul de antrenare cu vapori de apă este format din:

- 1) generator de abur; aburul produs nu trebuie să conțină dioxid de carbon;
- 2) barbotor de sticlă;
- 3) coloană de rectificare;
- 4) refrigerent.

Această instalație trebuie să treacă următoarele trei teste:

- a) se pun 20 ml de apă fiartă în barbotor. Se colectează 250 ml de produs distilat și se adaugă 0,1 ml de soluție de hidroxid de sodiu 0,1 M (punctul 3.2) și două picături de soluție de fenolfaleină (punctul 3.3). Nuanța roz trebuie să se păstreze cel puțin 10 secunde (aburul să nu conțină dioxid de carbon).
- b) se pun în barbotor 20 ml de soluție de acid acetic 0,1 M. Se colectează 250 ml de produs distilat. Se titrează cu soluție de hidroxid de sodiu 0,1 M (punctul 3.2). Volumul utilizat trebuie să fie de cel puțin 19,9 ml. (Acidul acetic antrenat de vapori $\geq 99,5$ %).

- c) se pun în barbotor 20 ml de soluție de acid lactic 1 M. Se colectează 250 ml de produs distilat și se titrează acidul cu soluție de hidroxid de sodiu 0,1 M (punctul 3.2).

Volumul de soluție de hidroxid de sodiu adăugat trebuie să fie mai mic sau egal cu 1,0 ml (Acid lactic distilat $\leq 0,5\%$).

Orice aparat sau procedeu care trece aceste teste în mod satisfăcător, îndeplinește condițiile cerute aparatelor și procedeele oficiale internaționale.

4.2. Pompă de vid cu apă.

4.3. Balon de vid.

5. METODA DE LUCRU

5.1. **Pregătirea probei: eliminarea dioxidului de carbon.**

Se pun circa 50 ml de vin în balonul de vid ; se face vid în balon cu pompa de apă timp de un minut sau două, agitându-se continuu.

5.2. **Antrenarea cu vapori de apă.**

Se pun în barbotor 20 ml de vin fără dioxid de carbon, conform indicațiilor de la punctul 5.1. Se adaugă aproximativ 0,5 g de acid tartric (punctul 3.1). Se colectează cel puțin 250 ml de produs distilat.

5.3. **Titrare**

Se titrează cu soluție de hidroxid de sodiu 0,1 M (punctul 3.2), folosindu-se două picături de soluție de fenolfaleină (punctul 3.3) ca indicator. Se notează cu n ml cantitatea de hidroxid de sodiu folosită.

Se adaugă 4 picături de acid clorhidric diluat 1:4 (3.4), 2 ml de soluție de amidon (punctul 3.7) și câteva cristale de iodură de potasiu (punctul 3.6). Se titrează dioxidul de sulf liber cu o soluție de iod 0,005 M (punctul 3.5). Se notează cu n' ml cantitatea folosită.

Se adaugă soluție saturată de borax (punctul 3.8) până când nuanța roz reapare. Se titrează dioxidul de sulf combinat cu o soluție de iod 0,005 M (punctul 3.5). Se notează cu „ n ” ml cantitatea folosită.

6. EXPRIMAREA REZULTATELOR

6.1. **Metoda de calcul**

Aciditatea volatilă exprimată, cu o cifră zecimală, în miliechivalenți pe litru este dată de formula:

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

Aciditatea volatilă exprimată, cu două zecimale, în grame de acid acetic pe litru este dată de formula:

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

6.2. **Repetabilitatea (r)**

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

$$r = 0,04 \text{ g acid acetic/l.}$$

6.3. **Reproductibilitatea (R)**

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

$$R = 0,08 \text{ g acid acetic/l.}$$

6.4. **Vin în care există acid sorbic**

Deoarece 96 % din acidul sorbic este antrenat de vapori într-un volum distilat de 250 ml, aciditatea acestuia trebuie scăzută din aciditatea volatilă, știind că 100 mg de acid sorbic corespunde unei acidități de 0,89 miliechivalenți sau 0,053 g de acid acetic și cunoscând concentrația de acid sorbic exprimată în mg/l determinată prin alte metode.

7. DETERMINAREA ACIDULUI SALICILIC ANTRENAT ÎN DISTILATUL ACIDITĂȚII VOLATILE

7.1. **Principiu**

După determinarea acidității volatile și rectificarea dioxidului de sulf, prezența acidului salicilic este caracterizată, după acidificare, de nuanța violet care apare când se adaugă o sare de fier III.

Determinarea acidului salicilic antrenat în produsul distilat cu aciditate volatilă se realizează pe un al doilea produs distilat, cu același volum cu acela asupra căruia s-a efectuat determinarea acidității volatile. În acest produs distilat, acidul salicilic se determină printr-o metodă colorimetrică comparativă. Acesta se scade din aciditatea volatilă a produsului distilat.

7.2. **Reactivi**

7.2.1. Acid clorhidric (HCl) ($\rho_{20} = 1,18$ până la $1,19$ g/ml).

7.2.2. Soluție de tiosulfat de sodiu ($\text{Na}_2 \text{S}_2 \text{O}_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$) $0,1$ M.

7.2.3. 10% (m/v) soluție de sulfat de fier III și de amoniu [$\text{Fe}_2 (\text{SO}_4)_3 \times (\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4 \times 24 \text{H}_2\text{O}$].

7.2.4. Soluție de salicilat de sodiu $0,01$ M. Soluția conține $1,60$ g/l salicilat de sodiu ($\text{Na C}_7 \text{H}_5 \text{O}_3$).

7.3. **Metoda de lucru**

7.3.1. *Identificarea acidului salicilic în distilatul acidității volatile.*

Imediat după determinarea acidității volatile și rectificarea pentru dioxidul de sulf liber și combinat, se pun într-un balon conic $0,5$ ml de acid clorhidric (punctul 7.2.1), 3 ml de soluție de tiosulfat de sodiu $0,1$ M (punctul 7.2.2) și 1 ml de soluție de sulfat de amoniu și fier (III) (punctul 7.2.3).

Dacă acidul salicilic este prezent, apare o culoare violet.

7.3.2. *Determinarea acidului salicilic*

Pe balonul conic se notează cantitatea produsului distilat printr-un semn de referință. Se golește și se spală balonul.

O nouă probă test de 20 ml de vin se supune antrenării cu vapori de apă și se colectează produsul distilat în balonul conic până la cota de referință. Se adaugă $0,3$ ml de acid clorhidric pur (punctul 7.2.1) și 1 ml de soluție de sulfat de amoniu și fier (III) (punctul 7.2.3). Conținutul balonului va deveni violet.

Într-un balon conic, identic cu acela care are semnul de referință, se pune apă distilată până la același nivel cu acela al produsului distilat. Se adaugă $0,3$ ml de acid clorhidric pur (punctul 7.2.1) și 1 ml de soluție de sulfat de amoniu și fier (III) (punctul 7.2.3). Din biuretă se pune soluție de salicilat de sodiu $0,01$ M (punctul 7.2.4) până când nuanța de violet obținută are aceeași intensitate cu aceea din balonul conic care conține vinul distilat.

Se notează cu n''' cantitatea de soluție adăugată.

7.4. **Rectificarea acidității volatile**

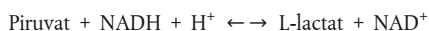
Se scade volumul $0,1 \cdot n'''$ ml din volumul de n ml soluție de hidroxid de sodiu $0,1$ M folosită pentru titrarea acidității produsului distilat în timpul determinării acidității volatile.

13 ACIDUL CITRIC (OIV -AS-313-09-ACIENZ) – METODĂ TIP II**1. PRINCIPIUL METODEI**

Acidul citric este convertit în oxaloacetat și acetat printr-o reacție catalizată de citrat-liază (CL):



În prezența maleat-dehidrogenazei (MDH) și lactat-dehidrogenazei (LDH), oxaloacetatul și derivatul acestuia de decarboxilare, piruvatul, sunt reduși la L-maleat și L-lactat de nicotilamid adenin dinucleotidă redusă (NADH):



Cantitatea de NADH oxidată la NAD^+ în aceste reacții este proporțională cu cantitatea de citrat prezent. Oxidarea NADH este măsurată prin descreșterea puterii sale de absorbție la o lungime de undă de 340 nm.

2. REACTIVI**2.1. Soluție tampon pH 7,8**

(0,51 M glicilglicină; pH = 7,8; Zn^{2+} : $0,6 \times 10^{-3} \text{ M}$)

Se dizolvă 7,13 g de glicilglicină în aproximativ 70 ml de apă bidistilată.

Se ajustează pH-ul la 7,8 cu aproximativ 13 ml de soluție de hidroxid de sodiu 5 M; se adaugă 10 ml de soluție de clorură de zinc ZnCl_2 , 80 mg în 100 ml de apă, și se completează până la 100 ml cu apă bidistilată.

Această soluție rămâne stabilă cel puțin 4 săptămâni la 4 °C.

2.2. Soluție de nicotilamid adenin dinucleotidă redusă (NADH), aproximativ $6 \times 10^{-3} \text{ M}$. Se dizolvă 30 mg NADH și 60 mg NaHCO_3 în 6 ml apă bidistilată.**2.3. Soluție de maleat dehidrogenază /lactat dehidrogenază, (MDH/LDH) (0,5 mg MDH/ml; 2,5 mg LDH/ml):**

Se amestecă împreună 0,1 ml MDH (5 mg MDH/ml), 0,4 ml de soluție de sulfat de amoniu (3,2 M) și 0,5 ml LDH (5 mg/ml). Această suspensie rămâne stabilă cel puțin un an la 4 °C.

2.4. Citrat-liază CL (5 mg proteină/ml): Se dizolvă 168 mg de liofilizat în 1 ml de apă foarte rece. Această soluție rămâne stabilă cel puțin o săptămână la 4 °C și cel puțin 4 săptămâni dacă este înghețată.

Se recomandă ca înainte de determinare să fie verificată activitatea enzimei.

2.5. Polivinilpolipirrolidonă (PVPP)

Notă: Toți reactivii de mai sus sunt disponibili în comerț.

3. APARATURA**3.1. Spectrofotometru pentru determinări la 340 nm, lungimea de undă la care absorbția NADH este maximă.**

În cazul în care acesta nu este disponibil, se poate utiliza un spectrofotometru cu o sursă spectrală discontinuă, pentru determinări la 334 nm sau la 365 nm. Deoarece sunt incluse determinări ale absorbției absolute (nu sunt folosite curbe de calibrare, dar standardizarea se face prin considerarea coeficientului de extincție a NADH), trebuie verificate scalele de lungime de undă și absorbția spectrală a aparatului.

3.2. Cuve de sticlă cu lungimea drumului optic de 1 cm sau cuve de unică folosință.**3.3. Micropipete pentru pipetarea de volume în intervalul 0,02 la 2 ml.****4. PREGĂTIREA PROBEI**

Determinarea citratului se efectuează în general direct în vin, fără îndepărtarea preliminară a colorației și fără diluare, în cazul în care conținutul de acid citric este mai mic de 400 mg/l. În caz contrar, se diluează vinul până când concentrația citratului se situează între 20 și 400 mg/l (cantitatea de citrat în eșantionul analizat cuprinsă între 5 μg și 80 μg).

La vinurile roșii care sunt bogate în compuși fenolici, se recomandă un tratament preliminar cu PVPP:

Se pregătește o suspensie de aproximativ 0,2 g PVPP în apă și se lasă în repaus 15 minute. Se filtrează folosind un filtru cu pliuri.

Se pun 10 ml de vin într-un flacon conic de 50 ml, se adaugă PVPP umed luat de pe filtru cu o spatulă. Se agită 2-3 minute. Se filtrează.

5. METODA DE LUCRU

Cu spectrofotometrul ajustat la o lungime de undă de 340 nm, se determină absorbția folosind cuve de 1 cm, utilizând aerul ca standard de absorbție zero (fără cuvă în drumul optic). În cuvele de 1 cm se adaugă următoarele:

	Cuvă de referință	Cuvă probă
Soluția 2.1	1,00 ml	1,00 ml
Soluția 2.2	0,10 ml	0,10 ml
Proba de măsurat	—	0,20 ml
Apă bidistilată	2,00 ml	1,80 ml
Soluția 2.3	0,02 ml	0,02 ml

Se amestecă și, după aproximativ 5 minute, se citesc absorbțiile soluțiilor din cuvele de referință și probă (A_1).

Se adaugă:

Soluția 2.4	0,02 ml	0,02 ml
-------------	---------	---------

Se amestecă; se așteaptă până la terminarea reacției (aproximativ 5 minute) și se citesc absorbțiile soluțiilor din cuvele de referință și probă (A_2).

Se calculează diferența absorbțiilor ($A_1 - A_2$) pentru cuvele de referință și probă.

Se calculează diferența dintre absorbția din cuva de referință și absorbția din cuva de probă:

$$\Delta A = \Delta A_S - \Delta A_R$$

Notă: Timpul necesar pentru acțiunea enzimelor poate varia de la un lot la altul. Valoarea de mai sus este dată numai orientativ și se recomandă determinarea ei pentru fiecare lot.

6. EXPRIMAREA REZULTATELOR

Conținutul de acid citric este dat în miligrame pe litru (mg/l) rotunjit la cel mai apropiat număr întreg.

6.1. Metoda de calcul

Formula generală pentru calcularea concentrației în miligrame pe litru este:

$$C = ((V \times PM) / (\epsilon \times d \times v)) \times \Delta A$$

V = volumul soluției test în mililitri (aici 3,14 ml)

v = volumul probei în mililitri (aici 0,2 ml)

PM = masa moleculară a substanței de determinat (aici, pentru acid citric anhidru = 192,1)

d = drumul optic în cuvă în centimetri (aici 1 cm)

ϵ = coeficientul de absorbție a NADH; la 340 nm,

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

Se obține:

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

Dacă proba a fost diluată în timpul pregătirii, rezultatul se înmulțește cu factorul de diluare.

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

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

6.2. Repetabilitatea (r)

Concentrația acidului citric mai mică de 400 mg/l: $r = 14 \text{ mg/l}$.

Concentrația acidului citric mai mare de 400 mg/l: $r = 28 \text{ mg/l}$.

6.3. Reproducibilitatea (R)

Concentrația acidului citric mai mică de 400 mg/l: $R = 39 \text{ mg/l}$.

Concentrația acidului citric mai mare de 400 mg/l: $R = 65 \text{ mg/l}$.

14 ACIDUL SORBIC (OIV - AS-313-14-ACISOR) – METODĂ TIP IV**1. PRINCIPIUL METODELOR****1.1. Determinarea prin spectrofotometria de absorbție în ultraviolet**

Acidul sorbic (acidul trans, trans 2,4 hexadienoic) extras prin distilarea cu vapori de apă este determinat în distilatul de vin prin spectrofotometria de absorbție în ultraviolet. Substanțele care interferă în ultraviolet sunt îndepărtate prin evaporarea până la uscare a probei de distilat ușor alcalinizată de o soluție de hidroxid de calciu. Un conținut mai mic de 20 mg/l trebuie confirmat prin cromatografie în strat subțire (sensibilitate: 1 mg/l).

1.2. Determinarea prin gaz cromatografie

Acidul sorbic extras în eter etilic se determină prin gaz cromatografie în prezența unui etalon intern.

1.3. Identificarea urmelor prin cromatografia în strat subțire

Acidul sorbic extras în eterul etilic este separat prin cromatografia în strat subțire, iar concentrația acestuia este evaluată semi-cantitativ.

2. DETERMINARE PRIN SPECTROFOTOMETRIE DE ABSORBȚIE ÎN ULTRAVIOLET**2.1. Reactivi**

2.1.1. Acid tartric cristalin ($C_4H_6O_6$).

2.1.2. Soluție de hidroxid de calciu $Ca(OH)_2$ aproximativ 0,02 M.

2.1.3. Soluție de referință de acid sorbic, 20 mg pe litru.

Se dizolvă 20 mg de acid sorbic, $C_6H_8O_2$ în aproximativ 2 ml de soluție de hidroxid de sodiu 0,1 M. Se pune într-un balon cotat de 1 000 ml și se completează cu apă până la cotă. Este posibilă, de asemenea, dizolvarea a 26,8 mg de sorbat de potasiu, $C_6H_7KO_2$ în apă și completarea până la 1 000 ml cu apă.

2.2. Aparatura

2.2.1. Aparat de distilare cu aburi (a se vedea capitolul „Aciditatea volatilă”).

2.2.2. Baie de apă la 100 °C.

2.2.3. Spectrofotometru pentru determinarea absorbției la o lungime de undă de 256 nm și având o cuvă de cuarț cu drum optic de 1 cm.

2.3. Metoda de lucru**2.3.1. Distilarea**

Se pun în balonul aparatului de distilare cu aburi 10 ml de vin și se adaugă 1-2 g de acid tartric (2.1.1). Se colectează 250 ml de distilat.

2.3.2. Pregătirea curbei de calibrare

Se prepară, prin diluarea soluției de referință (punctul 2.1.3), patru soluții de referință diluate, cu 0,5, 1, 2,5 și 5 mg de acid sorbic la litru; se determină absorbțiile cu spectrofotometrul la 256 nm, folosindu-se apa distilată ca blank. Se obține curba variațiilor absorbției reprezentată în funcție de concentrațiile soluțiilor. Variația este liniară.

2.3.3. Determinarea

Se pun 5 ml de distilat într-o capsulă de evaporare cu diametrul de 55 mm și se adaugă 1 ml de soluție de hidroxid de calciu (punctul 2.1.2). Se evaporă, până la uscare, pe o baie de apă.

Se dizolvă reziduul în câțiva mililitri de apă distilată, se transferă cantitativ într-un balon cotat de 20 ml și se completează până la cotă cu apă de clătire. Se măsoară absorbția la 256 nm folosind spectrofotometrul față de un blank constituit dintr-o soluție obținută prin diluarea a 1 ml de soluție de hidroxid de calciu (punctul 2.1.2).

Valoarea absorbției măsurate se trece pe curba valorii și de aici se găsește concentrația C a acidului sorbic în soluție.

Notă: În practică, pierderea datorată evaporării poate fi neglijată, iar absorbția se măsoară direct în distilatul total, diluat ¼ cu apă distilată.

2.4. Exprimarea rezultatelor**2.4.1. Calcularea**

Concentrația acidului sorbic în vin, exprimată în mg/l, este egală cu:

$$100 \times C,$$

Unde C = concentrația acidului sorbic în soluția analizată prin spectrofotometrie, exprimată în mg/l.

3. DETERMINAREA PRIN CROMATOGRAFIE ÎN FAZĂ GAZOASĂ**3.1. Reactivi**

3.1.1. Eter etilic (C₂H₅)₂O distilat chiar înainte de folosire.

3.1.2. Soluție internă de referință: soluție de acid undecanoic C₁₁H₂₂O₂ în etanol 95 % vol. la o tărie de 1 g/l.

3.1.3. Soluție apoasă de acid sulfuric H₂SO₄ (ρ₂₀ = 1,84 g/ml) diluat 1:3 (v/v).

3.2. Aparatura

3.2.1. Cromatograf cu gaz prevăzut cu detector de ionizare în flacără și o coloană de oțel inoxidabil (4 m × 1/8 Țoli), tratat în prealabil cu dimetil-diclorasilan și prevăzut cu o fază staționară alcătuită dintr-un amestec de succinat dietilenglicol (5 %) și acid fosforic (1 %) (DEGS – H₃ PO₄) sau un amestec de dietilenglicol adipat (7 %) și acid fosforic (1 %) (DEGA — H₃ PO₄) legat pe Gaschrom Q 80 — 100 mesh.

Pentru tratarea cu dimetil-diclorasilan (DMDCS), se trece prin coloană o soluție conținând 2-3 g de DMDCS în toluen. Se spală imediat coloana cu metanol, urmat de azot, apoi se spală cu hexan, urmat din nou de azot. Apoi se umple.

Condiții de lucru:

Temperatura cuptorului: 175 °C.

Temperatura injectorului și a detectorului: 230 °C.

Gaz purtător: azot (rata de scurgere = 20 ml/min.).

3.2.2. Microseringă cu o capacitate de 10 microlitri, gradată în 0,1 microlitri.

Notă: Pot fi folosite alte tipuri de coloane care permit o bună separare, în special coloane capilare (cum ar fi FFAP).

Metoda de lucru descrisă este dată ca exemplu.

3.3. Metoda de lucru**3.3.1. Pregătirea probei pentru analiză**

Într-o eprubetă de sticlă cu o capacitate de aproximativ 40 ml și prevăzută cu un dop de sticlă rodat, se introduc 20 ml de vin, se adaugă 2 ml de soluție etalon (punctul 3.1.2) și 1 ml de acid sulfuric diluat (punctul 3.1.3).

După ce se amestecă soluția prin răsturnări repetate ale eprubetei, se adaugă în conținut 10 ml de eter etilic (punctul 3.1.1). Se extrage acidul sorbic în faza organică prin scuturarea eprubetei timp de 5 minute. Se lasă să se așeze.

3.3.2. Pregătirea soluției de referință

Se selectează un vin pentru care cromatograma extractului cu eter nu arată niciun vârf corespunzător eluției acidului sorbic. Vinul este supraîncărcat cu acid sorbic cu o concentrație de 100 mg/l. Se tratează 20 ml din proba astfel preparată în conformitate cu procedura de la punctul 3.3.1.

3.3.3. Cromatografia

Folosind o microseringă, se injectează pe rând în cromatograf 2 μl din faza extrasă cu eter obținută cum s-a arătat la punctul 3.3.2 și 2 μl din faza extrasă cu eter obținută cum s-a arătat la punctul 3.3.1.

Se înregistrează cromatogramele respective; se verifică identitatea timpilor de reținere ai acidului sorbic și ai etalonului. Se măsoară înălțimea (sau suprafața) fiecăruia dintre picurile înregistrate.

3.4. Exprimarea rezultatelor**3.4.1. Calculare**

Concentrația acidului sorbic în vinul analizat, exprimată în miligrame pe litru, este dată de relația:

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

H = înălțimea picului acidului sorbic în soluția de referință

h = înălțimea picului acidului sorbic în proba pentru analiză

l = înălțimea picului etalonului intern în soluția de referință

I = înălțimea picului etalonului intern în proba pentru analiză

Notă: Concentrația acidului sorbic poate fi determinată, în același mod, prin măsurarea suprafețelor aflate sub picurile respective.

15 PH (OIV - AS-313-15-PH) – METODĂ TIP I

1. PRINCIPIU

Se măsoară diferența de potențial dintre doi electrozi cufundați în lichidul de analizat. Unul dintre electrozi are un potențial care este o funcție definită a pH-ului lichidului, în timp ce celălalt are un potențial stabilit și cunoscut și reprezintă electrodul de referință.

2. APARATURA

2.1. **pH-metru cu o scală în unități pH, permițând realizarea determinărilor la cel puțin 0,05 unități de pH.**

2.2. **Electrozi:**

2.2.1. Electrod de sticlă, păstrat în apă distilată.

2.2.2. Electrod de referință de clorură de potasiu saturată, păstrat într-o soluție saturată de clorură de potasiu.

2.2.3. Sau un electrod mixt, păstrat în apă distilată.

3. REACTIVI

3.1. **Soluții tampon:**

3.1.1. Soluție saturată de tartrat acid de potasiu, conținând minimum 5,7 g/l de tartrat acid de potasiu ($C_4H_5KO_6$), la 20 °C. Această soluție poate fi păstrată până la două luni adăugând 0,1 g de timol la 200 ml.

$$\text{pH} \begin{cases} 3,57 \text{ la } 20^\circ\text{C} \\ 3,56 \text{ la } 25^\circ\text{C} \\ 3,55 \text{ la } 30^\circ\text{C} \end{cases}$$

3.1.2. Soluție de ftalat acid de potasiu 0,05 M, conținând 10,211 g/l de ftalat acid de potasiu ($C_8H_5KO_4$), la 20 °C. (Perioada maximă de păstrare este de două luni).

$$\text{pH} \begin{cases} 3,999 \text{ la } 15^\circ\text{C} \\ 4,003 \text{ la } 20^\circ\text{C} \\ 4,008 \text{ la } 25^\circ\text{C} \\ 4,015 \text{ la } 30^\circ\text{C} \end{cases}$$

3.1.3. Soluție conținând:

Fosfat monopotasice, KH_2PO_4 3,402 g

Fosfat dipotasice, K_2HPO_4 4,354 g

Apă până la 1 l

(Perioada maximă de păstrare este de două luni)

$$\text{pH} \begin{cases} 6,90 \text{ la } 15^\circ\text{C} \\ 6,88 \text{ la } 20^\circ\text{C} \\ 6,86 \text{ la } 25^\circ\text{C} \\ 6,85 \text{ la } 30^\circ\text{C} \end{cases}$$

Notă: Pot fi utilizate, de asemenea, soluții tampon de etalonare din comerț.

4. METODA DE LUCRU

4.1. **Pregătirea probei pentru analiză**

4.1.1. *Pentru must și vin*

Se analizează direct mustul sau vinul.

4.1.2. *Pentru must concentrat rectificat*

Se diluează mustul concentrat rectificat cu apă pentru a obține o concentrație de $25 \pm 0,5$ % (m/m) a totalului zaharurilor (25 ° Brix).

Dacă P reprezintă procentajul concentrației (m/m) totalului zaharurilor în mustul concentrat rectificat, se cântărește o masă de $2\,500/P$

și se completează până la 100 g cu apă. Apa utilizată trebuie să aibă o conductibilitate sub 2 micro-siemens pe centimetru.

4.2. **Stabilirea punctului zero al aparatului**

Această operație se realizează înaintea oricărei determinări, în conformitate cu instrucțiunile furnizate o dată cu aparatul utilizat.

4.3. **Calibrarea pH-metrului**

Calibrarea se realizează la 20 °C, urmând instrucțiunile furnizate pentru aparatul utilizat, cu soluții tampon cu pH 6,88 și 3,57 la 20 °C.

Se utilizează soluțiile tampon cu pH 4,00 la 20 °C pentru verificarea calibrării scalei.

4.4. **Determinarea**

Se cufundă electrodul în proba ce trebuie analizată, a cărei temperatură trebuie să se situeze între 20 și 25 °C și cât mai aproape posibil de 20 °C. Se citește valoarea pH-ului direct de pe scală.

Se realizează cel puțin două determinări pentru aceeași probă.

Media aritmetică a determinărilor este considerată rezultatul final.

5. **EXPRIMAREA REZULTATELOR**

pH-ul mustului, vinului sau soluției 25 % (m/m) (25 ° Brix) de must concentrat rectificat este exprimat cu două zecimale.

16 DETERMINAREA SIMULTANĂ A ACIDULUI L-ASCORBIC ȘI A ACIDULUI D-IZOASCORBIC PRIN HPLC ȘI DETECTARE UV (OIV-AS-313-22-ACASCO) – METODĂ TIP II**1. INTRODUCERE**

Acidul ascorbic este un antioxidant prezent, în mod natural, într-o întreagă serie de produse alimentare. Cantitatea normală de acid ascorbic din strugure scade în momentul producerii mustului și în cursul vinificării. În anumite limite, acidul ascorbic poate fi adăugat la musturi și la vinuri.

Metoda descrisă a fost validată în cadrul unor studii inter-laborator, prin analiza unor probe de vin la care s-au adăugat 30 mg/l la 150 mg/l, respectiv 10 mg/l la 100 mg/l de acid L-ascorbic și acid D-izoascorbic.

2. DOMENIUL DE APLICARE

Prezenta metodă este adecvată pentru determinarea simultană a acidului L-ascorbic și a acidului D-izoascorbic (acid erithorbic) din vin prin cromatografie lichidă de înaltă performanță și detectare UV pe o plajă cuprinsă între 3 și 150 mg/l.

Pentru conținuturile mai mari de 150 mg/l, este necesară diluarea probei.

3. PRINCIPIUL

Probele sunt injectate direct în sistemul HPLC după filtrarea prin membrană. Analizii sunt separați pe o coloană cu fază inversă și sunt supuși unei detectări UV la 266 nm. Cuantificarea acidului L-ascorbic și a acidului D-izoascorbic se realizează în raport cu un etalon extern.

Notă: Coloanele și condițiile de funcționare sunt date ca exemplu. O bună separare poate fi asigurată și de alte tipuri de coloane.

4. REACTIVI ȘI PRODUȘI**4.1 Reactivi**

4.1.1 n-octilamină, puritate $\geq 99,0\%$

4.1.2 Acetat de sodiu $\times 3 \text{ H}_2\text{O}$, puritate $\geq 99,0\%$

4.1.3 Acid acetic pur, 100 %

4.1.4 Acid fosforic, aproximativ 25 %

4.1.5 Acid oxalic, puritate $\geq 99,0\%$

4.1.6 Ascorbat oxidaza

4.1.7 Acid L-ascorbic, ultra $\geq 99,5\%$

4.1.8 Acid D-izoascorbic, puritate $\geq 99,0\%$

4.1.9 Apă bidistilată

4.1.10 Metanol, p.A. 99,8 %

4.2. Pregătirea fazei mobile**4.2.1 Soluții pentru faza mobilă**

Pentru faza mobilă, se prepară următoarele soluții:

4.2.1.1 12,93 g de n-octilamină în 100 ml de metanol

4.2.1.2 68,05 g de acetat de sodiu $\times 3 \text{ H}_2\text{O}$ în 500 ml de apă bidistilată

4.2.1.3 12,01 g de acid acetic pur în 200 ml de apă bidistilată

4.2.1.4 Soluție tampon (pH 5,4): 430 ml de soluție de acetat de sodiu (4.2.1.2) și 70 ml de soluție de acid acetic (4.2.1.3)

4.2.2 Pregătirea fazei mobile

Într-un pahar Berzelius, se amestecă 5 ml de soluție de n-octilamină (4.2.1.1) cu aproximativ 400 ml de apă bidistilată. Se aduce această soluție la un pH între 5,4 și 5,6, adăugând acid fosforic 25% (4.1.4), picătură cu picătură. Se adaugă 50 ml din soluția tampon (4.2.1.4) și se transferă compusul într-un balon cotate de 1 000 ml, apoi se completează cu apă bidistilată. Înainte de utilizare, faza mobilă trebuie filtrată cu ajutorul unei membrane (celuloză regenerată de 0,2 μm) și, pe cât posibil, degazată cu heliu (aproximativ 10 minute), în funcție de necesitățile sistemului HPLC utilizat.

4.3 Prepararea soluției standard

Notă:

Toate soluțiile standard (soluția mamă 4.3.1. și soluțiile de etalonare 4.3.2) trebuie preparate în ziua utilizării și păstrate, de preferință, în frigider înainte de injectare.

4.3.1 Prepararea soluției mamă (1 mg/ml)

Se prepară o soluție apoasă de acid oxalic 2 % și se elimină oxigenul dizolvat prin barbotare cu azot.

Se cântăresc cu exactitate 100 mg de acid L-ascorbic și 100 mg de acid D-izoascorbic într-un balon cotate de 100 ml, care se umple cu soluție apoasă de acid oxalic 2 %.

4.3.2 Prepararea soluțiilor de etalonare

Pentru soluțiile de etalonare, se diluează soluția mamă (4.3.1) cu soluția de acid oxalic 2 % până când se obțin concentrațiile dorite. Se recomandă concentrațiile între 10 mg/l și 120 mg/l. De exemplu 100 μl, 200 μl, 400 μl, 800 μl la 1 200 μl la 10 ml, care corespund concentrațiilor de 10, 20, 40, 80 și 120 mg/l.

5. APARATURA

Echipament de laborator normal, în special următoarele:

5.1 Pompă HPLC**5.2 Buclă de injecție de 20 μl****5.3 Detector UV****6. EȘANTIONARE**

Înainte de injectare, probele de vin sunt filtrate printr-o membrană cu diametrul porilor de 0,2 μm.

Pentru concentrații mai mari de 150 mg/l, este necesară diluarea probei.

7. METODA DE LUCRU**7.1 Condițiile de utilizare a sistemului HPLC**

Se injectează în aparatul cromatografic 20 μl din proba filtrată prin membrană.

Precoloana: de exemplu Nucleosil 120 C18 (4 cm × 4 mm × 7 μm)

Coloana: de exemplu Nucleosil 120 C18 (25 cm × 4 mm × 7 μm)

Volumul de injecție: 20 μl

Faza mobilă: vezi 4.2.2, eluție izocratică

Debit: 1 ml/min

Detectare UV: 266 nm

Ciclul de clătire: cel puțin 30 ml de apă bidistilată, urmați de 30 ml de metanol și 30 ml de acetonitril

7.2 Identificare/Confirmare

Identificarea picurilor se efectuează prin compararea timpilor de retenție ai soluțiilor standard cu cei ai probelor. Cu sistemul cromatografic descris în exemplul de mai jos, timpii de retenție sunt de 7,7 minute pentru acidul L-ascorbic, respectiv 8,3 minute pentru acidul D-izoascorbic (a se vedea figura 1, cromatograma A).

Pentru a se confirma rezultatele pozitive, aceste probe trebuie tratate cu o spatulă de ascorbat oxidază și măsurate din nou (a se vedea figura 1, cromatograma B).

Ca urmare a descompunerii acidului L-ascorbic și a acidului D-izoascorbic provocată de ascorbat oxidaza, nu ar trebui să apară niciun semnal în timpul retenției de acid L-ascorbic și acid D-izoascorbic. În cazul detectării unor picuri parazite, suprafața acestora trebuie luată în considerare în calcularea concentrației analiților.

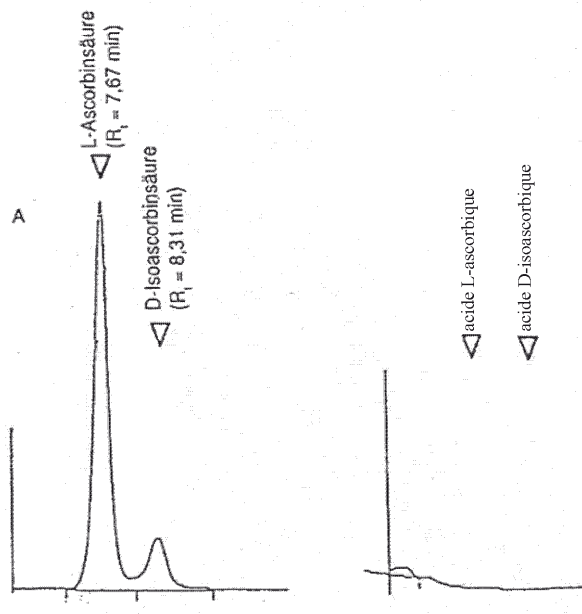


Figura 1

Exemplu de cromatogramă pentru vin alb: A înainte de tratarea cu ascorbat oxidază; B după tratare. Legendă: acid L-ascorbic; acid D-izoascorbic

Notă: Se recomandă ca analiza probelor tratate cu ascorbat oxidază să se efectueze la sfârșitul unei secvențe urmate de ciclul de clătire, pentru a se elimina resturile de ascorbat oxidază de pe coloană. În caz contrar, acidul L-ascorbic și acidul D-izoascorbic ar putea fi convertiți de resturile de ascorbat oxidază în timpul măsurării HPLC, iar rezultatul ar putea fi afectat din această cauză.

8. CALCULARE

Se pregătește o curbă de calibrare utilizând soluțiile de etalonare (4.3.2). Conform metodei etalonului extern, cuantificarea acidului L-ascorbic și a acidului D-izoascorbic se realizează prin măsurarea suprafețelor picurilor și compararea acestora cu concentrația corespunzătoare de pe curba de calibrare.

Exprimarea rezultatelor

Rezultatele se exprimă în miligrame de acid L-ascorbic, respectiv de acid D-izoascorbic per litru, cu o cifră zecimală (de exemplu 51,3 mg/l).

Pentru concentrații mai mari de 150 mg/l, se ia în calcul diluția.

9. FIDELITATEA

Metoda a fost testată în cadrul unui studiu inter-laborator organizat în anul 1994 de fostul Oficiu federal de igienă publică (Bundesgesundheitsamt, Germania), la care au participat 27 de laboratoare. Programul studiului inter-laborator a urmărit art. 35 din legea germană privind produsele alimentare, care a fost acceptat de OIV până la introducerea noului protocol (OENO 6/2000).

Studiul a avut în vedere patru probe diferite de vin – două de vin alb și două de vin roșu – cu cinci repetări solicitate pentru fiecare probă. Dat fiind faptul că era imposibil să se prepare probe cu o stabilitate suficientă a analizelor (viteze de descompunere diferite), s-a hotărât să se trimită participanților cantități stabilite de substanțe etalon pure, precum și probele de vin. Sarcina laboratoarelor a fost de a transfera cantitativ substanțele etalon în probele de vin și de a le analiza imediat. Au fost analizate volume de la 30 la 150 mg/l pentru acidul L-ascorbic și de la 10 la 100 mg/l pentru acidul D-izoascorbic. Rezultatele detaliate ale studiului sunt prezentate în ANEXA publicată de OIV. Evaluarea s-a realizat în conformitate cu DIN/ISO 5725 (versiunea 1988).

Deviațiile standard de repetabilitate (s_r) și de reproductibilitate (s_R) erau în concordanță cu concentrațiile de acid L-ascorbic și acid D-izoascorbic. Parametrul de precizie reală se poate calcula cu ajutorul ecuațiilor următoare:

Acid L-ascorbic

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

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

x: concentrația de acid L-ascorbic (mg/l)

Acid D-izoascorbic

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

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

x: concentrația de acid D-izoascorbic (mg/l)

Exemplu:

50 mg/l de acid D-izoascorbic $s_r = 1,0$ mg/l

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

10. ALTE CARACTERISTICI ALE ANALIZEI

10.1 Limita de detecție

Limita de detecție a acestei metode a fost estimată la 3 mg/l pentru acidul L-ascorbic și acidul D-izoascorbic.

10.2 Precizia

Recuperarea medie calculată pornind de la studiul inter-laborator efectuat pe patru probe (a se vedea ANEXA publicată în Culegerea OIV) a fost de:

— 100,6 % pentru acidul L-ascorbic

— 103,3 % pentru acidul D-izoascorbic

17 DIOXIDUL DE CARBON (OIV - AS-314-01-DIOCAR) – METODĂ TIP II

1. PRINCIPIUL METODEI

1.1. **Vinuri nespumoase (suprapresiune $\text{CO}_2 \leq 0,5 \times 10^5 \text{ Pa}$) ⁽¹⁾**

Volumul de vin luat din probă este răcit la aproximativ 0 °C și amestecat cu o cantitate suficientă de soluție de hidroxid de sodiu pentru a obține un pH de 10-11. Titrarea este efectuată cu o soluție acidă în prezența anhidrazei carbonice. Conținutul de dioxid de carbon este calculat din volumul de acid necesar schimbării pH-ului de la 8,6 (forma bicarbonat) la 4,0 (acid carbonic). În aceleași condiții se efectuează și o titrare blanc, pe vin decarbonat, în scopul de a se ține cont de volumul de soluție de hidroxid de sodiu absorbit de acizii din vin.

1.2. **Vinuri petiante și spumante**

Proba de vin de analizat este răcită aproape de punctul de îngheț. După înlăturarea unei cantități utilizate ca blanc după decarbonare, restul conținutului sticlei este alcalinizat pentru a fixa tot dioxidul de carbon sub forma Na_2CO_3 . Titrarea este efectuată cu o soluție acidă, în prezența anhidrazei carbonice. Conținutul de dioxid de carbon este calculat din volumul soluției acide necesară pentru schimbarea pH-ului de la 8,6 (forma bicarbonat) la 4,0 (acid carbonic). În aceleași condiții se întreprinde și o titrare blanc, pe vin decarbonat, în scopul de a ține cont de volumul de soluție de hidroxid de sodiu absorbit de acizii din vin.

2. DESCRIEREA METODEI

2.1. **Vinuri nespumoase (dioxid de carbon sub presiune $\leq 0,5 \times 10^5 \text{ Pa}$).**2.1.1. *Aparatura*

2.1.1.1. Agitator magnetic.

2.1.1.2. pH metru.

2.1.2. *Reactivi*2.1.2.1. Soluție de hidroxid de sodiu (NaOH) 0,1 M.2.1.2.2. Soluție de acid sulfuric (H_2SO_4) 0,05 M.

2.1.2.3. Soluție de anhidrază carbonică 1 g/l.

2.1.3. *Metoda de lucru*

Se răcește proba de vin la aproximativ 0 °C împreună cu pipeta utilizată pentru eșantionare.

Se pun 25 ml de soluție de hidroxid de sodiu (punctul 2.1.2.1) într-un pahar de laborator de 100 ml; se adaugă două picături de soluție apoasă de anhidrază carbonică (punctul 2.1.2.3). Se introduc 10 ml de vin, utilizând pipeta răcită la 0 °C.

Se pune paharul pe agitatorul magnetic, se instalează electrodul și tija magnetică și se agită moderat.

Când lichidul a ajuns la temperatura camerei, se titrează încet cu soluția de acid sulfuric (punctul 2.1.2.2) până când pH-ul ajunge la 8,6.

Se continuă titrarea cu acid sulfuric (punctul 2.1.2.2) până când pH-ul atinge valoarea 4,0. Se notează cu n ml volumul utilizat între pH 8,6 și 4,0.

Se înlătură CO_2 din aproximativ 50 ml de probă de vin prin agitarea în vid timp de trei minute, balonul fiind încălzit într-o baie de apă la aproximativ 25 °C.

Se repetă procedura de mai sus pe 10 ml de vin decarbonat. Se notează cu n' ml volumul utilizat.

2.1.4. *Exprimarea rezultatelor*

1 ml de soluție de acid sulfuric 0,05 M titrată corespunde la 4,4 mg de CO_2 .

Cantitatea de CO_2 din vin, în grame pe litru, este dată de formula

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

Se exprimă cu două zecimale.

Notă: În cazul vinurilor care conțin puțin CO_2 ($\text{CO}_2 < 1 \text{ g/l}$), nu este necesară adăugarea anhidrazei carbonice pentru catalizarea hidratării CO_2 .

⁽¹⁾ 10^5 pascal (Pa) = 1 bar.

2.2. Vinuri spumante și petiante**2.2.1. Aparatura**

2.2.1.1. Agitator magnetic.

2.2.1.2. pH metru.

2.2.2. Reactivi

2.2.2.1. Soluție de hidroxid de sodiu (NaOH) 50 % (m/m).

2.2.2.2. Soluție de acid sulfuric (H₂SO₄) 0,05 M.

2.2.2.3. Soluție de anhidrază carbonică 1 g/l.

2.2.3. Metoda de lucru

Se notează nivelul vinului în sticlă și se răcește până când începe să înghețe.

Se lasă sticla să se încălzească ușor, în timp ce se agită, până la dispariția cristalelor de gheață.

Se scoate dopul rapid și se pun 45-50 ml de vin într-un cilindru gradat, pentru titrarea blanc. Volumul exact înlăturat, *v* ml, este determinat prin citirea valorilor pe cilindru gradat după ce vinul a ajuns la temperatura camerei.

Imediat după ce proba blanc a fost înlăturată, se adaugă 20 ml de soluție de hidroxid de sodiu (punctul 2.2.2.1) într-o sticlă cu capacitatea de 750 ml.

Se așteaptă până când vinul ajunge la temperatura camerei.

Se pun 30 ml de apă distilată fiartă și două picături de soluție de anhidrază carbonică (punctul 2.2.2.3) într-un pahar de laborator de 100 ml. Se adaugă 10 ml de vin care a fost alcalinizat.

Se pune paharul pe agitatorul magnetic, se instalează electrodul și tija magnetică și se agită ușor.

Se titrează ușor cu soluție de acid sulfuric (punctul 2.2.2.2) până când pH-ul ajunge la 8,6.

Se continuă ușor titrarea cu acid sulfuric (punctul 2.2.2.2) până când pH-ul ajunge la valoarea 4,0. Se notează cu *n* ml volumul utilizat între pH 8,6 și 4,0.

Se înlătură CO₂ din *v* ml de vin pus deoparte pentru titrarea blanc prin agitare timp de 3 minute în vid, balonul fiind încălzit la aproximativ 25 °C într-o baie de apă. Se înlătură 10 ml de vin decarbonat și se adaugă la 30 ml de apă distilată fiartă ; se adaugă două-trei picături de soluție de hidroxid de sodiu (punctul 2.2.2.1) pentru aducerea pH-ului la 10-11. Se urmează apoi procedura de mai sus. Se notează cu *n'* ml volumul de acid sulfuric 0,05 M adăugat.

2.2.4. Exprimarea rezultatelor

1 ml de soluție de acid sulfuric 0,05 M corespunde la 4,4 mg de CO₂.

Se golește sticla de vin care a fost alcalinizat și se determină, cu precizie de 1 ml, volumul inițial de vin prin completarea cu apă până la cotă. Se notează cu *V* ml.

Cantitatea de CO₂, exprimată în grame pe litru de vin, este dată de următoarea formulă:

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

Rezultatul se notează cu două zecimale.

2.3. Calculul suprapresiunii teoretice

Suprapresiunea la 20 °C, *Paph*₂₀, exprimată în pascali, este dată de formula:

$$Paph_{20} = ((Q)/(1,951 \times 10^{-5}(0,86 - 0,01 A)(1 - 0,00144 S))) - Patm$$

unde:

Q: conținutul de CO₂ al vinului, în g/l

A: tăria alcoolică a vinului la 20 °C

S: conținutul de zahăr al vinului, în g/l

Patm: presiunea atmosferică, exprimată în pascali

18 DETERMINAREA DIOXIDULUI DE CARBON DIN VIN PRIN METODA MANOMETRICĂ (OIV – AS314-04-CO2MAN) – METODĂ TIP II

(p.m.)

[Descrierea acestei metode de analiză face obiectul unei actualizări de către autoritățile OIV. Aceasta va fi publicată într-o viitoare comunicare a Comisiei imediat ce textul actualizat va fi publicat de OIV în ediția 2010 a Culegerii de metode internaționale de analiză a OIV]

19 MĂSURAREA SUPRAPRESIUNII VINURILOR SPUMANTE ȘI PETIANTE (OIV - AS-314-02-SURPRES) – METODĂ TIP I

1. PRINCIPIU

După stabilizarea termică și agitarea sticlei, suprapresiunea se măsoară cu ajutorul unui afrometru (manometru). Se exprimă în pascali (Pa) (metodă de tipul I). Metoda se poate aplica și vinurilor spumoase și vinurilor perlante.

2. APARATURA

Aparatul care permite măsurarea suprapresiunii din sticlele cu vin spumant și petiant se numește afrometru. Acesta are diferite forme, corespunzător modului în care este astupată sticla (capsulă metalică, capac, dop de plută sau plastic).

2.1. Pentru sticlele dotate cu o capsulă

Este format din trei părți (figura 1):

- partea superioară (sau șurub port-ac) se compune din manometru, inel de strângere manuală, șurub melcat care culisează în partea mediană și un ac care traversează capsula. Acul este dotat cu o deschidere laterală care comunică presiunea la manometru. O garnitură asigură contactul etanș cu capsula sticlei
- partea mediană (sau piuliță) servește la centrarea părții superioare. Ea se înșurubează pe partea inferioară, menținând ferm pe sticlă întreaga instalație
- partea inferioară (sau etrier) este prevăzută cu o gheară care se prinde sub capul sticlei, fixând instalația. Există capete adaptate pentru fiecare tip de sticlă.

2.2. Pentru sticlele prevăzute cu dop

Este format din două părți (figura 2):

- partea superioară este identică cu aparatul precedent ; cu toate acestea, acul este mai lung. Acesta este format dintr-un tub lung găurit, cu un vârf la unul din capete, pentru a traversa dopul. Vârful este detașabil și cade în vin după traversarea dopului
- partea inferioară este formată dintr-o piuliță și o bază care se așează pe dop. Aceasta este prevăzută cu patru șuruburi de strângere pentru menținerea întregii instalații pe dop.

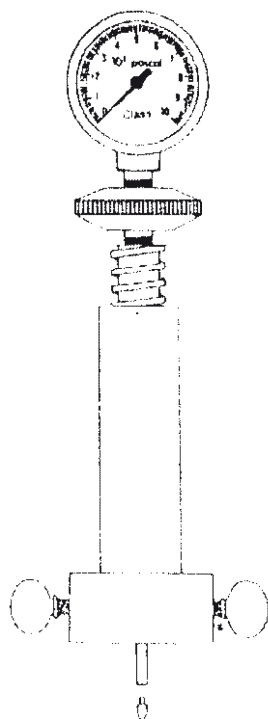


Figura 2: Afrometru pentru dopuri

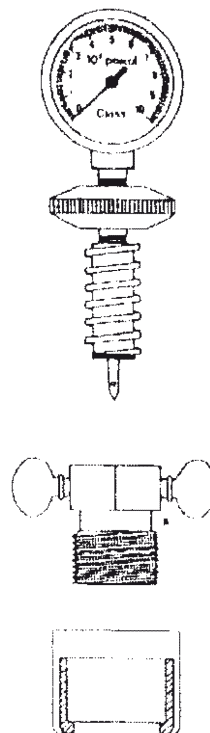


Figura 1: Afrometru pentru capsule

Observații privind manometrele cu care sunt dotate cele două tipuri de aparate:

- manometrele pot fi mecanice cu tub Burdon, fie digitale cu senzori piezoelectrice. În primul caz, tubul Burdon trebuie obligatoriu să fie din oțel inoxidabil
- sunt gradate în pascali (Pa). Pentru vinurile spumante este mai practic să se utilizeze, ca unitate, 10^5 pascali (10^5 Pa) sau kilopascalul (kPa)
- se împart în diferite clase. Clasa unui manometru este dată de precizia citirii, în raport cu o citire pe întreaga scală, exprimată ca procentaj (de exemplu, un manometru de 1 000 kPa din clasa I înseamnă o presiune maximă de 1 000 kPa și o citire în intervalul ± 10 kPa). Instrumentele din clasa I se recomandă pentru măsurători de precizie.

3. METODA DE LUCRU

Determinările trebuie efectuate pe sticle a căror temperatură a fost stabilizată cel puțin 24 de ore. După ce a fost străpunsă capsula, dopul din plută sau din plastic, sticla trebuie agitată puternic, până când presiunea este constantă, în scopul efectuării citirii.

3.1. Cazul sticlelor închise cu o capsulă

Se fixează gheara etrierului sub capul sticlei. Se strânge piulița până ce aparatul este fixat ferm pe sticlă. Apoi se înșurubează partea superioară în piuliță. Pentru a se evita eliminarea de gaz, străpungerea capsulei trebuie efectuată cât mai rapid posibil, pentru a pune în contact garnitura și sticla. Sticla trebuie apoi agitată puternic, până la o presiune constantă, în scopul efectuării citirii.

3.2. Cazul sticlelor prevăzute cu dop

Se poziționează vârful acului. Aparatul se așează în poziție pe dop. Se strâng cele patru șuruburi pe dop. Se înșurubează partea superioară (acul traversează dopul). Vârful trebuie să cadă în interiorul sticlei pentru a permite manometrului să transmită presiunea. Se efectuează citirea după agitarea sticlei până la o presiune constantă. După citire, se recuperează vârful.

4. EXPRIMAREA REZULTATELOR

Suprapresiunea la 20 °C (P_{aph20}) se exprimă în pascali (Pa) sau în kilopascali (kPa). Ea trebuie să fie în concordanță cu precizia manometrului (de exemplu: $6,3 \times 10^5$ Pa sau 630 kPa și nu $6,33 \times 10^5$ Pa sau 633 kPa pentru un manometru din clasa I, cu o scală completă de citire de 1 000 kPa).

Dacă temperatura la care se efectuează măsurătoarea este diferită de 20 °C, trebuie efectuată o corecție, prin înmulțirea presiunii măsurate cu coeficientul corespunzător (vezi tabelul 1).

Tabelul 1

Raportul dintre suprapresiunea P_{aph20} într-un vin petiant sau spumant la 20 °C și suprapresiunea P_{aph_t} la temperatura 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. CONTROLUL REZULTATELOR

Metoda de determinare directă a parametrilor fizici (metodă criteriu de tip I)

Verificarea afrometrelor

Afrometrele trebuie verificate cu regularitate (cel puțin o dată pe an).

Verificarea se face cu ajutorul unei pompe de presiune pentru etalonare. Aceasta permite compararea manometrului de testat cu un manometru de referință, de clasă superioară, racordat la etaloanele naționale, montat în paralel. Controlul este utilizat pentru a confrunța valorile indicate de cele două aparate pentru presiuni în creștere, apoi în descreștere. În cazul în care apare o diferență între cele două, un șurub de reglaj permite efectuarea corecțiilor necesare.

Laboratoarele și organismele autorizate sunt toate dotate cu astfel de pompe de presiune pentru etalonare; acestea se pot obține și de la producătorii de manometre.

20 DETERMINAREA LIZOZIMEI DIN VIN PRIN HPLC (OIV-AS-315-14) – METODĂ TIP IV**1. INTRODUCERE**

Pentru lizozimă, este de preferat să se utilizeze o metodă analitică, care nu se bazează pe activitatea enzimatică.

2. DOMENIUL DE APLICARE

Această metodă permite cuantificarea lizozimei (mg de proteină per litru) prezente în vinurile albe și roșii, independent de activitatea enzimatică (care ar putea fi compromisă de o descompunere parțială sau de fenomene de complexare și de coprecipitare) a matricei.

3. DEFINIȚIE

Cromatografia lichidă de înaltă performanță (HPLC) oferă o abordare analitică bazată pe interacțiunea de tip steric, polar sau de absorbție între faza staționară și analit și, în consecință, nu este legată de activitatea enzimatică reală a proteinei.

4. PRINCIPIUL METODEI

Analiza se efectuează prin cromatografie lichidă de înaltă performanță (HPLC), prin asocierea unui detector spectrofotometric cu un detector spectrofluorimetric. Conținutul necunoscut din proba de vin se calculează în funcție de suprafața picului cromatografic, utilizând metoda etalonării externe.

5. REACTIVI**5.1. Solvenți și soluții**

Acetonitril (CH_3CN) pentru analiza HPLC

Acid trifluoroacetic (TFA) pur

Apă deionizată pentru analiza HPLC

Soluție standard: acid tartric 1g/l, Alcool etilic 10% v/v cu pH-ul ajustat la 3,2 cu tartrat de potasiu neutru

5.2. Eluanți

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

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

5.3. Soluții de referință

De la 1 la 250 mg/l de lizozimă standard dizolvată în soluția matrice prin agitare continuă timp de minim 12 ore.

6. MATERIAL

6.1. Aparat HPLC prevăzut cu sistem de pompare pentru efectuarea unui gradient de eluare

6.2. Instalație pentru coloana termostat (cuptor)

6.3. Detector spectrofotometric asociat cu un detector spectrofluorimetric

6.4. Buclă de injecție, 20 μL

6.5. Coloană polimer cu fază inversă cu grupe funcționale fenil (diametrul porilor = 1 000 Å, limita de excludere = 1 000 000 Da), Tosoh Bioscience TSK-gel Phenyl 5PW RP 7,5 cm $\times$ 4,6 mm ID, spre exemplu

6.6. Precoloană din același material ca și coloana, Tosoh Bioscience TSK-gel Phenyl 5PW RP Guardgel 1,5 cm $\times$ 3,2mm ID, spre exemplu

7. PREPARAREA PROBEI

Probele de vin se acidificază cu HCl (10 M) diluat 1:10 și, după 5 minute, se filtrează cu un filtru de poliamidă ai cărui pori au un diametru de 0,22 μm . Analiza cromatografică se efectuează imediat după filtrare.

8. CONDIȚII DE LUCRU

8.1. Debitul eluantului: 1 ml/min

8.2. Temperatura coloanei: 30 °C

- 8.3. Detectarea prin spectrofotometrie: 280 nm
- 8.4. Detectarea prin spectrofluorimetrie: $\lambda_{ex} = 276 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 345 \text{ nm}$; Câștig = 10
- 8.5. Programul gradientului de eluare

Time (min)	Sol A %	Sol B %	gradient
0	100	0	
			izocratic
3	100	0	
			liniar
10	65	35	
			izocratic
15	65	35	
			liniar
27	40,5	59,5	
			liniar
29	0	100	
			izocratic
34	0	100	
			liniar
36	100	0	
			izocratic
40	100	0	

- 8.6. Timpul mediu de retenție a lizozimei: 25,50 minute

9. CALCUL

Soluțiile de referință care conțin următoarele concentrații de lizozimă sunt analizate de trei ori: 1; 5; 10; 50; 100; 200; 250 mg/l. Pe fiecare cromatogramă, suprafețele picului corespunzător lizozimei sunt reprezentate pe o diagramă, în funcție de concentrațiile lor respective, obținându-se drepte de regresie liniară exprimate cu ajutorul formulei $Y = ax + b$. Coeficientul de determinare r^2 va trebui să fie $> 0,999$.

10. CARACTERISTICILE METODEI

În scopul evaluării aptitudinii metodei pentru obiectivul formulat, s-a realizat un studiu de validare, ținând cont de linearitatea, limitele de detectare și de cuantificare și de precizia metodei. Acest ultim parametru a fost determinat prin definirea nivelului de precizie și de exactitate a metodei.

	Plaja de linearitate (mg/l)	Panta dreptei	Coeficient de determinare (r^2)	LD (mg/l)	LC (mg/l)	Repetabilitatea (n=5) RSD %			Reproductibilitatea (n=5) RSD %
						Std ¹	V.R. ²	V.A. 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

Tabelul 1: Datele referitoare la caracteristicile metodei: Std¹ soluție standard; V.R.² vin roșu; V.A.³ vin alb

10.1. Linearitatea metodei

Pe baza rezultatelor obținute în urma analizei de regresie liniară, metoda s-a dovedit liniară pentru plajele indicate în tabelul 1.

10.2. Limita de detectare și de cuantificare

Limita de detectare (LD) și limita de cuantificare (LC) au fost calculate ca un semnal echivalent cu de 3 ori, respectiv de 10 ori zgomotul de fond cromatografic în condiții de lucru pe o matrice reală (tabelul 1).

10.3. Precizia metodei

Parametrii luați în considerare sunt repetabilitatea și reproductibilitatea. Tabelul 1 indică valorile acestor parametri (exprimate ca % de ecart standard ale unor măsurători repetate cu concentrații diferite) obținute pentru soluția standard, pentru vin alb și pentru vin roșu.

10.4. Exactitatea metodei

Procentul de recuperare s-a calculat pe soluțiile standard care conțineau 5 și 50 mg de lizozimă per litru, la care s-a adăugat o cantitate dată de lizozimă, astfel cum se indică în tabelul de mai jos.

	[C] inițial nominal (mg/l)	Completare (mg/l)	[C] teoretic (mg/l)	[C] găsit (mg/l)	Ecart standard	Recuperare %
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

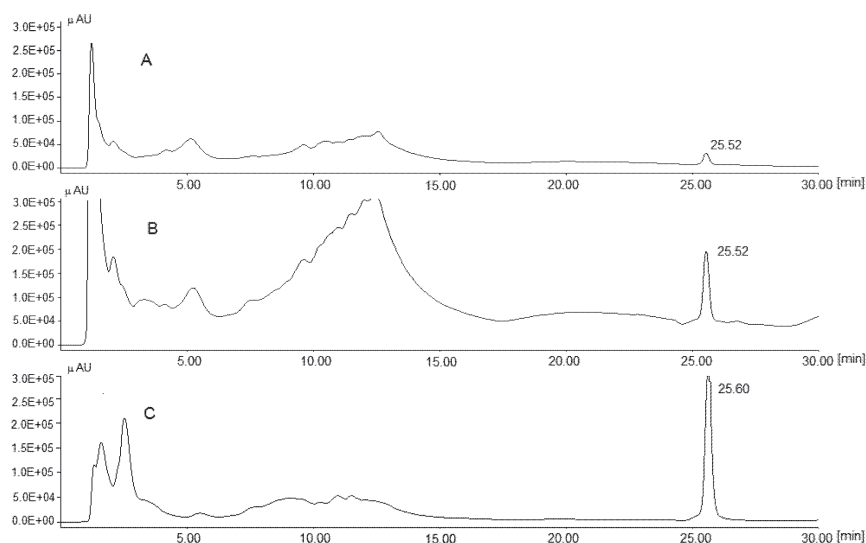


Fig.1 Cromatograma unui vin roșu care conține lizozimă pură (cantitatea de vin s-a completat cu o soluție standard conținând 1 000 mg/l de lizozimă, pentru a se obține o concentrație finală de 125 mg/l de lizozimă). A: detector UV la 280 nm; B: detector UV la 225 nm; C: detector FLD (λ ex 276 nm; λ em 345 nm).

21 SULFAȚI (OIV- AS-321-05-SULFAT) – METODĂ TIP II

1. PRINCIPIUL METODELOR

1.1. **Metoda de referință**

Precipitarea și cântărirea sulfatului de bariu. Fosfatul de bariu precipitat în aceleași condiții este eliminat prin spălarea precipitatului cu acid clorhidric.

În cazul musturilor sau al vinurilor bogate în dioxid de sulf, se recomandă desulfizarea prealabilă prin fierbere într-un vas etanș.

1.2. **Metoda de testare rapidă**

Vinurile sunt clasificate în mai multe categorii utilizând așa-numita metodă a limitelor, bazată pe precipitarea sulfatului de bariu utilizând titrarea cu ioni de bariu.

2. METODA DE REFERINȚĂ

2.1. **Reactivi**

2.1.1. Soluție de acid clorhidric 2 M.

2.1.2. Soluție de clorură de bariu la 200 g/l $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

2.2. **Metoda de lucru**2.2.1. *Metoda generală*

Se introduc 40 ml de probă de analiză într-un tub de centrifugare de 50 ml ; se adaugă 2 ml de acid clorhidric 2 M și 2 ml de soluție de clorură de bariu la 200 g/l. Se amestecă utilizând o baghetă de sticlă; se clătește bagheta cu puțină apă distilată și se lasă să stea 5 minute. Se centrifughează timp de 5 minute, după care se decantează cu atenție lichidul supernatant.

Se spală apoi precipitatul de sulfat de bariu după cum urmează: se adaugă 10 ml de acid clorhidric 2 M, se pune precipitatul în suspensie și se centrifughează 5 minute, după care se decantează cu atenție supernatantul. Se repetă de două ori procedeul de spălare a precipitatului în aceleași condiții, utilizând 15 ml de apă distilată de fiecare dată.

Precipitatul se transferă cantitativ, prin spălare cu apă distilată, într-o capsulă tarată de platină și se pune deasupra unei băi de apă la 100 °C până la evaporarea completă. Precipitatul uscat este calcinat scurt de mai multe ori deasupra unei flăcări, până când se obține un reziduu alb. Se lasă să se răcească în exsicator și se cântărește.

Se notează cu m masa, în miligrame, a sulfatului de bariu obținut.

2.2.2. *Metoda specială*: must sulfat și vin cu un conținut ridicat de dioxid de sulf

În prima fază se elimină dioxidul de sulf.

Se introduc 25 ml de apă și 1 ml de acid clorhidric pur ($\rho_{20} = 1,15 - 1,18 \text{ g/ml}$) într-un balon conic de 500 ml, echipat cu o pâlnie picurătoare și un tub de ieșire. Soluția se fierbe pentru eliminarea aerului și se introduc 100 ml de vin prin pâlnia picurătoare. Se continuă fierberea până când volumul lichidului din balon a fost redus la aproximativ 75 ml și se transferă cantitativ, după răcire, într-un balon cotat de 100 ml. Se completează cu apă până la cotă. Se determină sulfații dintr-o probă de 40 ml în conformitate cu procedura de la punctul 2.2.1.

2.3. **Exprimarea rezultatelor**2.3.1. *Calcul*

Conținutul de sulfat, exprimat în miligrame pe litru de sulfat de potasiu K_2SO_4 reprezintă:

$$18,67 \times m$$

Conținutul de sulfat din must sau vin este exprimat în miligrame de sulfat de potasiu pe litru, fără zecimale.

2.3.2. *Repetabilitatea*

până la 1 000 mg/l: $r = 27 \text{ mg/l}$

circa 1 500 mg/l: $r = 41 \text{ mg/l}$

2.3.3. *Reproductibilitatea*

până la 1 000 mg/l: $R = 51 \text{ mg/l}$

circa 1 500 mg/l: $R = 81 \text{ mg/l}$

22 FIERUL (OIV - AS-322-05-FER) – METODĂ TIP IV

1. PRINCIPIUL METODELOR

METODA DE REFERINȚĂ

După diluarea corespunzătoare a vinului și eliminarea alcoolului, fierul este determinat direct prin spectrofotometria de absorbție atomică.

METODA OBIȘNUITĂ

După mineralizarea vinului cu perhidrol, fierul aflat sub formă de Fe(III) se reduce la Fe(II) și este determinat prin colorația roșie produsă de ortofenantrolină.

2. METODA DE REFERINȚĂ

2.1. **Reactivi**

2.1.1. Soluție standard concentrată de fier, conținând 1 g de Fe(III) per litru.

Se utilizează o soluție standard (1 g/l) din comerț. Această soluție poate fi preparată dizolvând 8,6341 g de sulfat de fier (III) și amoniu $[\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2, 12\text{H}_2\text{O}]$ în apă distilată, acidificată ușor cu acid clorhidric 1 M, și completând până la un litru.

2.1.2. Soluție standard diluată, conținând 100 mg de fier per litru.

2.2. **Aparatura**

2.2.1. Evaporator rotativ, cu baie de apă controlată termostatic.

2.2.2. Spectrofotometru de absorbție atomică, echipat cu un arzător aer-acetilenă.

2.2.3. Lampă catodică pentru fier.

2.3. **Metoda de lucru**2.3.1. *Pregătirea probei*

Se elimină alcoolul din vin prin reducerea volumului probei la jumătate din volumul original utilizând un evaporator rotativ (50-60 °C). Se completează până la volumul original cu apă distilată.

Dacă este cazul, se diluează înainte de determinare.

2.3.2. *Calibrarea*

În cinci baloane cotate de 100 ml, se pun 1, 2, 3, 4 și 5 ml de soluție conținând 100 mg de fier per litru (punctul 2.1.2) și se completează până la 100 ml cu apă distilată. Soluțiile astfel preparate conțin 1, 2, 3, 4 și 5 mg de fier per litru.

Soluțiile trebuie păstrate în flacoane de polietilenă.

2.3.3. *Determinarea*

Se reglează lungimea de undă la 248,3 nm. Se reglează absorbția la zero utilizând apă distilată. Se aspiră proba diluată direct în arzătorul spectrofotometrului, urmată succesiv de cele cinci soluții standard pregătite conform indicațiilor de la punctul 2.3.2. Se citesc valorile absorbției. Se repetă fiecare măsurătoare.

2.4. **Exprimarea rezultatelor**2.4.1. *Metoda de calcul*

Se trasează un grafic al variației absorbției în funcție de concentrația de fier în soluțiile standard. Se reprezintă pe acest grafic valoarea medie a absorbției obținută pentru proba de vin diluat și se determină concentrația de fier C.

Concentrația de fier, exprimată în mg per litru de vin, cu o cifră zecimală, este:

$$C \times F$$

F = factorul de diluare.

23 CUPRUL (OIV – AS 322-06) – METODĂ TIP IV**1. PRINCIPIUL METODEI**

Metoda se bazează pe utilizarea spectrofotometriei de absorbție atomică.

2. APARATURA

2.1. Capsulă de platină.

2.2. Spectrofotometru de absorbție atomică.

2.3. Lampă catodică pentru cupru.

2.4. Surse de gaz: aer-acetilenă sau oxid nitros/acetilenă.

3. REACTIVI

3.1. Cupru metalic.

3.2. Acid nitric, concentrație 65 % (HNO_3 , $\rho_{20} = 1,38 \text{ g/ml}$).

3.3. Acid nitric diluat 1:2 (v/v).

3.4. Soluție conținând cupru 1 g/l

Se utilizează o soluție standard de cupru 1 g/l, din comerț. Această soluție poate fi preparată prin cântărirea a 1 000 g de cupru metalic și transferarea, fără pierderi, într-un balon cotelat de 1 000 ml. Se adaugă acid nitric diluat 1:2 (punctul 3.3), în cantitate suficientă pentru dizolvarea metalului, se adaugă, de asemenea, 10 ml de acid nitric concentrat (punctul 3.2) și se completează până la cotă cu apă bidistilată.

3.5. Soluție conținând cupru 100 mg/l

Se introduc 10 ml de soluție, preparată corespunzător punctului 3.4, într-un balon cotelat de 100 ml și se completează până la cotă cu apă bidistilată.

4. METODA DE LUCRU**4.1. Prepararea probei și determinarea cuprului**

Se iau 20 ml din probă, se introduc într-un balon cotelat de 100 ml și se completează până la cotă cu apă bidistilată. Dacă este necesar, se modifică diluția.

Pe spectrofotometrul de absorbție atomică, se măsoară absorbția probei diluate la lungimea de undă de 324,8 nm, după ce s-a reglat valoarea zero cu apă distilată. Dacă este necesar, se prepară o soluție diluată corespunzător cu apă bidistilată.

4.2. Calibrarea

Se pipetează 0,5, 1 și 2 ml de soluție (punctul 3.5) (100 mg de cupru per litru) într-un balon cotelat de 100 ml și se completează volumul cu apă bidistilată; soluțiile astfel obținute conțin 0,5, 1 și 2 mg de cupru per litru. Având valorile absorbțiilor acestor soluții, măsurate conform indicațiilor de la punctul 4.1., se trasează curba de calibrare.

5. EXPRIMAREA REZULTATELOR

Utilizând absorbția măsurată a probei de vin diluat, se citește concentrația C, în mg/l, de pe curba de calibrare.

Dacă F este factorul de diluare, concentrația cuprului din vin, în miligrame per litru, este dată de: $F \times C$.

Se notează cu două zecimale.

Note:

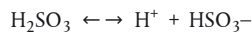
a) Pentru stabilirea curbei de calibrare și a diluțiilor probei, se aleg soluțiile corespunzătoare sensibilității aparatului utilizat și concentrației cuprului prezent în probă.

- b) Când se prevăd concentrații de cupru foarte scăzute în proba analizată, se procedează după cum urmează. Se pun 100 ml de probă într-un vas de platină și se evaporază într-o baie de apă la 100 °C până când devine siropoasă. Se adaugă 2,5 ml de acid nitric concentrat (punctul 3.2), picătură cu picătură, până când se acoperă complet fundul vasului. Se arde cu grijă reziduul pe un reșou electric sau la o flacără scăzută ; apoi vasul se pune într-un cuptor izolat, setat la 500 °C ± 25 °C și se așteaptă aproximativ o oră. După răcire, se amestecă cenușa cu 1 ml de acid nitric concentrat (punctul 3.2), zdrobind-o cu o baghetă de sticlă; se lasă să se evaporeze amestecul și se arde din nou, ca și mai înainte. Se pune din nou vasul în cuptor timp de 15 minute ; se repetă tratamentul cu acid nitric concentrat cel puțin de trei ori. Se dizolvă cenușa prin adăugarea în vas a unui mililitru de acid nitric concentrat (punctul 3.2) și a 2 ml de apă bidistilată și se transferă într-un balon cotat de 10 ml. Se spală vasul de trei ori, utilizând de fiecare dată 2 ml de apă bidistilată și se completează volumul cu apă bidistilată. Se face determinarea conform indicațiilor de la punctul 4.1. utilizând cei 10 ml de soluție. În exprimarea rezultatelor, se ține cont de factorul de concentrație.

24 DIOXIDUL DE SULF (OIV - AS-323-04-DIOSU) – METODA TIP II

1. DEFINIȚII

Se numește dioxid de sulf liber, dioxidul de sulf prezent în must sau în vin, în formele următoare: H_2SO_3 , HSO_3^- al căror echilibru este în funcție de pH și de temperatură:



H_2SO_3 reprezintă dioxidul de sulf molecular.

Dioxidul de sulf total este definit ca totalul diferitelor forme de dioxid de sulf prezente în vin, fie în stare liberă, fie combinată cu constituenții săi.

2. DIOXIDUL DE SULF LIBER ȘI TOTAL

2.1. Principiul metodelor

2.1.1. Metoda de referință

2.1.1.1. Pentru vinuri și musturi

Dioxidul de sulf este transportat de un curent de aer sau de azot ; este fixat și oxidat fiind trecut printr-o soluție diluată și neutră de apă oxigenată. Acidul sulfuric format este determinat prin titrarea cu o soluție standard de hidroxid de sodiu. Dioxidul de sulf liber se extrage din vin prin antrenare la temperatură scăzută (10 °C).

Dioxidul de sulf total se extrage din vin prin antrenare la temperatură ridicată (aproximativ 100 °C).

2.1.1.2. Pentru mustul concentrat rectificat

Dioxidul de sulf total se extrage din mustul concentrat rectificat diluat înainte prin antrenare la temperatură ridicată (aproximativ 100 °C).

2.1.2. Metodă rapidă de determinare (pentru vinuri și musturi)

Dioxidul de sulf liber este determinat prin titrare iodometrică directă.

Dioxidul de sulf combinat este determinat prin titrare iodometrică după hidroliză alcalină. Dacă este adăugat dioxidului de sulf liber, se obține dioxidul de sulf total.

2.2. Metoda de referință

2.2.1. Aparatura

2.2.1.1. Aparatele utilizate trebuie să fie conforme cu diagrama prezentată mai jos, în special în ceea ce privește condensatorul.

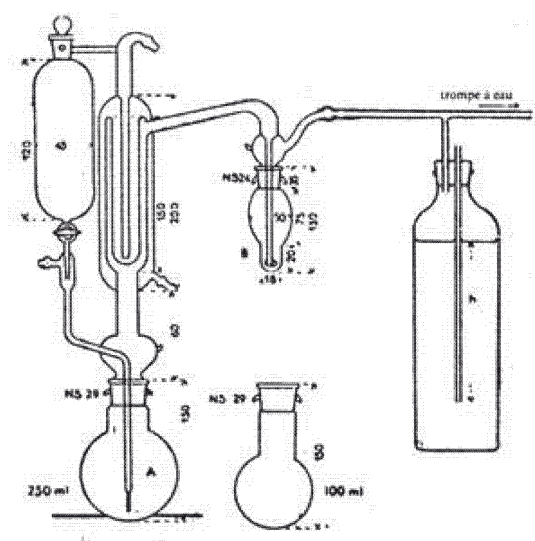


Figura 1

Dimensiunile sunt date în milimetri. Diametrele interioare ale celor patru tuburi concentrice care formează condensatorul sunt: 45, 34, 27 și 10 mm

Tubul de alimentare cu gaz care ajunge în balonul B se termină într-o mică sferă cu diametrul de 1 cm cu 20 de orificii cu diametrul de 0,2 mm pe circumferința orizontală cea mai mare. Alternativ, acest tub se poate termina într-o placă de sticlă sinterizată care produce un număr mare de bule foarte mici, care asigură contactul dintre faza gazoasă și cea lichidă.

Curentul de gaz care traversează aparatele trebuie să fie de aproximativ 40 de litri pe oră. Sticla din dreapta diagramei are rolul de a limita la 20-30 cm reducerea presiunii produsă de pompa de apă. Pentru reglarea vidului la valoarea corectă, trebuie instalat un debitmetru, cu un tub semicapilar, între barbotor și sticlă.

2.2.1.2. Microbiuretă.

2.2.2. Reactivi

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

2.2.2.2. Soluție de apă oxigenată, 9,1 g $\text{d'H}_2\text{O}_2/\text{l}$ (3 volume).

2.2.2.3. Reactivul indicator:

roșu de metil 100 mg

albastru de metilen 50 mg

alcool, 50 % vol. 100 ml

2.2.2.4. Soluție de hidroxid de sodiu (NaOH), 0,01 M.

2.2.3. *Determinarea dioxidului de sulf liber*

2.2.3.1. Metoda de lucru

Vinul se păstrează într-o sticlă plină și închisă cu dop, la 20 °C, timp de două zile înaintea determinării.

— Se pun 2-3 ml de soluție de apă oxigenată (punctul 2.2.2.2) și două picături din reactivul indicator în balonul B și se neutralizează soluția de apă oxigenată cu soluție de hidroxid de sodiu 0,01 M (punctul 2.2.2.4). Se conectează balonul la aparate.

— Se introduc 50 ml din probă și 15 ml de acid fosforic (punctul 2.2.2.1) în balonul A de 250 ml al aparatului de antrenare. Se conectează balonul la aparate.

— Bulele de aer (sau azot) traversează aparatele timp de 15 minute. Dioxidul de sulf liber transportat este oxidat la acid sulfuric. Se îndepărtează balonul de aparat și se titrează acidul care s-a format cu soluție de hidroxid de sodiu 0,01 M (punctul 2.2.2.4). Se notează cu n ml volumul utilizat.

2.2.3.2. Exprimarea rezultatelor

Dioxidul de sulf liber este exprimat în miligrame pe litru (mg/l), rotunjit la cel mai apropiat număr întreg.

2.2.3.2.1. Calculare

Dioxidul de sulf liber, în miligrame pe litru, este 6,4 n.

2.2.4. *Determinarea dioxidului de sulf total*

2.2.4.1. Metoda de lucru

2.2.4.1.1. Pentru mustul concentrat rectificat, se folosește soluția obținută prin diluarea probei de analizat la 40 % (m/v), conform indicațiilor din capitolul „Aciditatea totală”, punctul 5.1.2. Se introduc 50 ml din această soluție și 5 ml de acid fosforic (punctul 2.2.2.1) în balonul A de 250 ml al aparatului de antrenare. Se conectează balonul la aparat.

2.2.4.1.2. Pentru vinuri și musturi

În cazul în care concentrația estimată în probă nu depășește 50 mg de SO_2 total per litru, se pun 50 ml din probă și 15 ml de acid fosforic (punctul 2.2.2.1) în balonul A de 250 ml al aparatului de antrenare. Se conectează balonul la aparat.

În cazul în care concentrația estimată în probă depășește 50 mg de SO_2 total per litru, se pun 20 ml din probă și 5 ml de acid fosforic (punctul 2.2.2.1) în balonul A de 100 ml al aparatului de antrenare. Se conectează balonul la aparat.

Se pun 2-3 ml de soluție de apă oxigenată (punctul 2.2.2.2) în barbotorul B, se neutralizează cum s-a arătat mai sus și se aduce vinul din balonul A la fierbere utilizând o flacăra mică de 4-5 cm înălțime, care trebuie să atingă direct fundul balonului. Nu se pune balonul pe o placă de metal, ci pe un disc cu o deschizătură de 30 mm diametru. Acest lucru este necesar pentru a evita supraîncălzirea substanțelor extrase din vin care sunt depozitate pe pereții balonului.

Se menține la fierbere în timp ce trece un curent de aer (sau azot). În 15 minute, dioxidul de sulf total a fost antrenat și oxidat. Se determină acidul sulfuric format prin titrarea cu soluție de hidroxid de sodiu 0,01 M (punctul 2.2.2.4).

Se notează cu n ml volumul utilizat.

2.2.4.2. Exprimarea rezultatelor

Dioxidul de sulf total este exprimat în miligrame pe litru (mg/l), respectiv în miligrame pe kilogram (mg/kg) din zaharurile totale, rotunjit la cel mai apropiat număr întreg.

2.2.4.2.1. Calculare

— Pentru vinuri și musturi

Dioxidul de sulf total în miligrame per litru.

— Probe cu conținut scăzut de dioxid de sulf (50 ml de probă testată):

$$6,4 \times n$$

— Alte probe (20 ml de probă testată):

$$16 \times n$$

— Pentru mustul concentrat rectificat

Dioxidul de sulf în miligrame per kilogram din zaharurile totale (50 ml de probă testată preparată) (punctul 2.2.4.1.1):

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

P = procentajul concentrației (m/m) a zaharurilor totale

2.2.3.4.2. Repetabilitatea (r)

Concentrație < 50 mg/l (50 ml de probă testată), $r = 1$ mg/l

Concentrație > 50 mg/l (20 ml de probă testată), $r = 6$ mg/l

2.2.3.4.3. Reproducibilitatea (R)

Concentrație < 50 mg/l (50 ml de probă testată), $R = 9$ mg/l

Concentrație > 50 mg/l (20 ml de probă testată), $R = 15$ mg/l
