

# Metode određivanja parametara kakvoće vina

---

**Barišić, Veronika**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2015**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:109:170190>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-04-14**

REPOZITORIJ

PTF OS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar  
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Food Technology Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
PREHRAMBENO – TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

PREDDIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENE TEHNOLOGIJE

Veronika Barišić

Metode određivanja parametara kakvoće vina

završni rad

Osijek, 2015.

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

**PREDDIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENA TEHNOLOGIJA**

## Završni rad

### **Metode određivanja parametara kakvoće vina**

Nastavni predmet:

Tehnologija prerade sirovina biljnog podrijetla 2

Osnove tehnologije vina

Predmetni nastavnik: izv.prof.dr.sc. Andrija Pozderović

doc.dr.sc. Anita Pichler

---

Student/ica: Veronika Barišić

(MB: 3572/12)

Mentor: dr. sc. Anita Pichler, docent

Predano (datum):

Pregledano (datum):

---

**Ocjena:**

**Potpis mentora:**

---

## Metode određivanja parametara kakvoće vina

### Sažetak

U ovom završnom radu su obrađene fizikalno-kemijske metode analize mošta, vina i drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina. Fizikalno-kemijske metode koje se koriste za ispitivanje udovoljavanja temeljnim zahtjevima kakvoće mošta, vina drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina su gustoća i relativna gustoća pri 20° C, alkoholna jakost, ukupni suhi ekstrakt, reducirajući šećeri, pepeo, pH vrijednost, ukupna kiselost, hlapiva kiselost, nehlapiva kiselost, slobodni i ukupni sumporni dioksid, limunska kiselina, ugljikov dioksid i određivanje šećera refraktometrom. Ove metode su propisane Pravilnikom o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina.

**Ključne riječi:** fizikalno-kemijska metoda, vino, mošt, grožđe

## **Methods of determining the quality parameters of wine**

### **Summary**

The aim of this study was to describe physicochemical methods for analyzing must, wine, other products of grapes and fruity wines. Physicochemical methods which are used for quality testing of must, wine, other products of grapes and fruity wines are density and relative density at 20°C, alcohol content, total dry extract, reducing sugars, ash, pH, total acidity, volatile acidity, non-volatile acidity, free and total sulfur dioxide, citric acid, carbon dioxide, determination of sugars by refractometry. These methods are regulated whitRegulation of physico-chemical methods of must, wine and other grape-based products.

**Key words:** physicochemical methods, wine, must, grapes

## Contents

1.UVOD .....	1
2.GLAVNI DIO.....	2
2.1 Određivanje gustoće i relativne gustoće pri 20°C .....	2
2.1.1 Referentna metoda .....	2
2.1.2 Uobičajene metode .....	5
2.2Određivanje alkoholne jakosti.....	6
2.2.1 Metoda za dobivanje destilata .....	6
2.2.2 Referentna metoda .....	7
2.2.3 Uobičajene metode .....	8
2.3 Određivanje ukupnog suhog ekstrakta .....	9
2.4 Određivanje reducirajućih šećera.....	10
2.4.1 Pročišćavanje vina .....	11
2.4.2 Određivanje šećera.....	15
2.5 Određivanje pepela .....	16
2.6 Određivanje pH.....	17
2.7 Određivanje ukupne kiselosti .....	18
2.8 Određivanje hlapive kiselosti .....	21
2.9 Određivanje nehlapive kiselosti .....	24
2.10 Određivanje slobodnog i ukupnog sumpornog dioksida .....	24
2.10.1 Referentna metoda .....	25
2.10.2 Brza metoda.....	28
2.11 Određivanje limunske kiseline.....	29
2.12 Određivanje ugljikovog dioksida .....	31
2.12.1 Princip metoda .....	31
2.12.2 Referentna metoda .....	32
2.12.3 Uobičajena metoda .....	34
2.12.4 Odnos između tlaka i količine ugljikovog dioksida u biser vinu .....	34
2.13 Određivanje šećera refraktometrom .....	35
3.ZAKLJUČAK.....	37
4.LITERATURA .....	38

# 1.UVOD

Vino je poljoprivredno prehrambeni proizvod, dobiven potpunim ili djelomičnim alkoholnim vrenjem masulja ili mošta, od svježeg i za preradbu u vino pogodnoga grožđa. (web 2.)

Kakvoća vina se određuje metodama koje su propisane Pravilnikom o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina. Metode koje su propisane su gustoća i relativna gustoća pri 20° C, alkoholna jakost, ukupni suhi ekstrakt, reducirajući šećeri, pepeo, pH vrijednost, ukupna kiselost, hlapiva kiselost, nehlapiva kiselost, slobodni i ukupni sumporni dioksid, limunska kiselina, ugljikov dioksid i određivanje šećera refraktometrom. One se koriste za ispitivanje udovoljavanja temeljnim zahtjevima kakvoće.

## 2.GLAVNI DIO

### 2.1 Određivanje gustoće i relativne gustoće pri 20°C

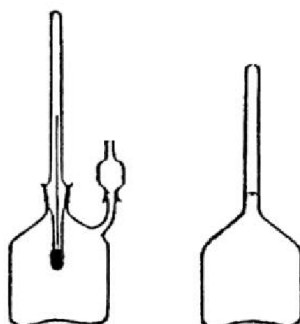
Gustoća je masa vina ili mošta po jedinici volumena pri temperaturi od 20° C. Izražena je u gramima po mililitru i označena simbolom P20°C. Relativna gustoća pri 20°C/20°C (ili specifična težina pri 20°C) je omjer gustoće nekoga određenog volumena vina ili mošta pri 20°C prema gustoći istog volumena vode pri istoj temperaturi. Gustoća i relativna gustoća pri 20 °C mjere se na pokusnom uzorku uporabom referentne metode (piknometrija) ili uobičajene metode (hidrometrija ili denzitometrija uporabom hidrostatske vage). Ako vino (ili mošt) sadrži značajne količine ugljikovog dioksida, provodimo prethodnu pripremu uzorka tako da se glavni dio ugljikovog dioksida otkloni mućkanjem 250 ml vina u boci od 1000 ml ili filtriranjem pod smanjenim tlakom kroz 2 g vate smještene u produžnoj cjevčici.(Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, Zakona o vinu »Narodne novine«, br. 96/03)

#### 2.1.1 Referentna metoda

*Aparatura:*

- Uobičajena laboratorijska oprema, a posebno piknometar (prikazan na **slici 1.**) od Pyrex stakla, volumena otprilike 100 ml s odvojivim brušenim termometrom, kalibriranim na desetinke stupnja od 10 do 30 °C.
- Tara posuda koja se sastoji od piknometra istoga vanjskog volumena kao piknometar, a masom je jednaka masi piknometra ispunjenog tekućinom specifične težine 1,01.
- Toplinski izolirana posuda koja točno odgovara obliku piknometra.
- Vaga s dvije plitice (twin-pan) s rasponom od najmanje 300 g i osjetljivosti 0,1 mg ili vaga s jednom pliticom (single-pan) s rasponom od najmanje 200 g i 0,1 mg osjetljivosti. (Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, Zakona o vinu »Narodne novine«, br. 96/03)





**Slika 1.** Piknometar i njegova tara posuda (Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, Zakona o vinu »Narodne novine«, br. 96/03)

### *Umjeravanje piknometra*

Umjeravanje piknometra uključuje određivanje sljedećih vrijednosti: masu praznoga piknometra, volumen piknometra pri 20° C i masu piknometra napunjenog vodom pri 20° C.

#### 1. Metoda za uporabu vage s dvije plitice (twin-pan):

Postavimo tara posudu na lijevu pliticu vage, a čist i suh piknometar, opremljen zatvaračem rezervoara, na desnu pliticu vage. Dodamo utege na pliticu na kojoj je piknometar i zabilježimo masu potrebnu da se uspostavi ravnoteža: neka ta masa bude  $p$  grama. Piknometar pažljivo napunimo destiliranom vodom pri sobnoj temperaturi i umetnemo termometar. Pažljivo obrišemo piknometar i stavimo ga u toplinski izoliranu posudu. Miješamo okretanjem posude dok temperatura očitana na termometru ne postigne konstantnu vrijednost. Poravnamo nivo vode na vrhu bočne cjevčice, brisanjem je osušimo i zatvorimo zatvaračem. Pažljivo očitamo temperaturu  $t$  °C ako je potrebno korigiramo obzirom na točnost skale termometra. Izmjerimo vodom napunjeni piknometar u odnosu na tara posudu i zabilježimo masu  $p'$  u gramima potrebnim da se uspostavi ravnoteža. (Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, Zakona o vinu »Narodne novine«, br. 96/03)

Izračunavanje:

Tariranje praznoga piknometra: masa praznoga piknometra =  $p + m$ ; ( $m$  je masa zraka sadržanoga u piknometru:  $m = 0,0012 (p - p')$ )

#### 2. Metoda za uporabu vage s jednom pliticom (single-pan):

Odredimo: masu čistog i suhog piknometra (to označimo sa P), masu piknometra, napunjenog sa vodom pri t° C (označimo sa P1) i masu tara posude (označimo sa T0).

Izračunavanje:

– Tariranje praznoga piknometra: masa praznoga piknometra = P – m; (gdje je m masa zraka u piknometru:  $m = 0,0012 (P1 - P)$ )

– Volumen pri 20 °C:  $V_{20\text{ °C}} = [(P1 - (P - m)) \times Ft]$ ; (gdje je Ft faktor za temperaturu t° C)

– Masa vode pri 20 °C:  $M_{20\text{ °C}} = 0,998203 \times V_{20\text{ °C}}$ ; (gdje je 0,998203 gustoća vode pri 20° C).

(Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, Zakona o vinu »Narodne novine«, br. 96/03)

*Metode mjerenja:*

1. Metoda s uporabom vage s dvije plitice (twin-pan)

Napunimo piknometar s pripremljenim uzorkom. p'' = masa (u gramima) potrebna da se uspostavi ravnoteža pri temperaturi od t° C. Masa tekućine u piknometru = p + m - p''.

Gustoća pri temperaturi t° C je:  $r_{t^{\circ}C} = \frac{p+m-p''}{V_{20^{\circ}C}}$   
Relativnu gustoću vina ili mošta izračunavamo:  $d_{20}^{20} = \frac{\rho_v}{\rho_{H_2O}} = \frac{\rho_{20}}{0,998203}$

gdje je  $\rho_{20}$  gustoća vina pri 20° C u gramima po litri i 0,998203 je gustoća vode pri 20° C u gramima po litri.

2. Metoda s uporabom vage s jednom pliticom (single-pan)

Izmjerimo tara posudu; masu označimo sa T<sub>1</sub>, izračunamo:  $dT = T_1 - T_0$ ; masa praznoga piknometra u vrijeme mjerenja = P - m + dT, izmjerimo piknometar napunjen pripremljenim uzorkom; njegovu masu pri t° C označimo sa P<sub>2</sub>. Masa tekućine u piknometru pri t° C = P<sub>2</sub> - (P - m + dT).

Gustoća pri t° C:  $\rho_{t^{\circ}C} = \frac{P_2 - (P - m + \Delta T)}{V_{20^{\circ}C}}$

Relativnu gustoću uzorka izračunamo tako da njegovu gustoću pri 20° C podijelimo s 0,998203.

3. Ponovljivost mjerenja gustoće (r): za suha i polusuha vina: r = 0,00010 i za slatka vina: r = 0,00018.

4. Obnovljivost mjerenja gustoće (R): za suha i polusuha vina: R = 0,00037 i za slatka vina: R = 0,00045. (Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, Zakona o vinu »Narodne novine«, br. 96/03)

## 2.1.2 Uobičajene metode

### 2.1.2.1 Hidrometrija

#### *Aparatura:*

- Hidrometar: Hidrometri svojim dimenzijama i podjelom skale moraju odgovarati ISO standardima.
- Umjeren termometar koji ima skalu s minimalnom podjelom od 0,5° C.
- Mjerni cilindar s unutarnjim promjerom od 36 mm i visinom od 320 mm, kojega se drži uspravno pomoću zavrtnja za nivelaciju. (Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, Zakona o vinu »Narodne novine«, br. 96/03)

#### *Postupak:*

Metoda mjerenja: Ulijemo 250 ml pripremljenog uzorka u odmjerni cilindar i u njega uronimo termometar i hidrometar. Uzorak dobro promješamo, sačekamo jednu minutu radi izjednačavanja temperature i potom očitamo temperaturu. Izvadimo termometar i poslije još jedne minute na skali hidrometra pročitamo gustoću pri  $t$  °C. Korigiramo gustoću određenu pri  $t$ ° C na 20° C uporabom pripadajućih tabela. Relativnu gustoću vina ili mošta izračunamo tako, da dijelimo njegovu gustoću pri 20° C sa 0,998203. (Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, Zakona o vinu »Narodne novine«, br. 96/03)

### 2.1.2.2 Denzimetrija uporabom hidrostatske vage

#### *Aparatura:*

- Hidrostatska vaga s maksimalnim kapacitetom od najmanje 100 g i osjetljivosti 0,1 mg.
- Dva identična plovka od Pyrex-stakla, volumena najmanje 20 ml pričvršćena ispod svake plitice pomoću niti promjera ne većeg od 0,1 mm.
- Plovak obješen pod desnu pliticu mora biti takav da se može umetnuti u mjerni cilindar koji nosi oznaku razine.
- Može se rabiti i jednostrana vaga. (Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, Zakona o vinu »Narodne novine«, br. 96/03)

#### *Postupak:*

– Kalibriranje hidrostatske vage: S oba plovka u zraku, uspostavimo ravnotežu stavljajući utege na desnu pliticu. Označimo masu dodanih utega p. Napunimo mjerni cilindar čistom vodom do oznake, promućkamo i pročitamo temperaturu t °C poslije dvije ili tri minute. Ponovno uspostavimo ravnotežu stavljajući utege na desnu pliticu: masa dodanih utega označimo sa p'. Volumen plovka pri 20 °C prikazan je formulom:  $V_{20\text{ °C}} = (p' - p) (F + 0,012)$ ; gdje je F faktor za temperaturu t °C, a p i V<sub>20 °C</sub> su karakteristike plovka.

– Metoda mjerenja: Desni plovak uronimo u odmjerni cilindar ispunjen vinom (ili moštom) do oznake. Očitamo temperaturu t °C vina (ili mošta) i masu utega potrebnih da se uspostavi ravnoteža i označimo sa p". Gustoća d<sub>t °C</sub> se dobiva iz formule: 
$$\rho_{t^{\circ}\text{C}} = \frac{(p'' - p)}{V} + 0,0012$$
 (Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, Zakona o vinu »Narodne novine«, br. 96/03)

## 2.2 Određivanje alkoholne jakosti

Alkoholna jakost izražena volumenom je broj litara etanola sadržanog u 100 litara vina, a oba volumena mjerena pri temperaturi od 20 °C. Izražava se simbolom »%vol«. Napomena: homolozi etanola, zajedno sa etanolom i homolozima estera etanola, uključeni su u alkoholnu jakost jer su prisutni u destilatu. (Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, Zakona o vinu »Narodne novine«, br. 96/03)

*Principi metoda:*

1. Metoda za dobivanje destilata: destilacija vina, kojemu je dodana suspenzija kalcijeva hidroksida: mjerenje alkoholne jakosti destilata.
2. Referentna metoda: mjerenje gustoće destilata piknometrom.
3. Uobičajene metode: Mjerenje alkoholne jakosti destilata hidrometrom, mjerenje alkoholne jakosti destilata denzitometrijski uporabom hidrostatske vage, mjerenje alkoholne jakosti destilata refraktometrijski. (Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, Zakona o vinu »Narodne novine«, br. 96/03)

### 2.2.1 Metoda za dobivanje destilata

*Aparatura:*

– Uređaj za destilaciju sastoji se od: boce od 1 litre, s okruglim dnom i spojevima od brušena stakla, kolone za rektifikaciju od oko 20 cm visine ili bilo koje slično hladilo, izvora topline, hladila koji se završava izvučenom cjevčicom koja vodi destilat do dna odmjerne tikvice koja sadrži nekoliko mililitara vode.

– Aparat za destilaciju vodenom parom sastoji se od: generatora pare, cijevi za paru, kolone za rektifikaciju, hladila. (Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, Zakona o vinu »Narodne novine«, br. 96/03)

*Reagensi:*

2 M suspenzija kalcijeva hidroksida, koja se dobije tako da se pažljivo ulije 1 litra vode pri temperaturi od 60° do 70 °C na 120 g živoga vapna (CaO). (Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, Zakona o vinu »Narodne novine«, br. 96/03)

*Priprema uzorka:*

Kod mladih i pjenušavih vina uklonimo najveći dio ugljikova dioksida miješajući 250 do 300 ml vina u tikvicu od 500 ml. (Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, Zakona o vinu »Narodne novine«, br. 96/03)

*Postupak:*

U odmjernu tikvicu od 200 ml ulijemo vino do crte i zabilježimo temperaturu. Vino prelijemo u destilacijsku tikvicu i stavimo cijev za paru. Odmjernu tikvicu od 200 ml isperemo četiri puta s po 5-ml vode i te volumene prelijemo u destilacijsku tikvicu. Dodamo 10 ml kalcijeva hidroksida i nekoliko kuglica za vrenje. Skupljamo destilat u odmjernu tikvicu od 200 ml ranije upotrijebljenu za mjerenje volumena vina. Destiliramo do otprilike tri četvrtine početnoga volumena ako se radi destilacijom, a volumen od 198 do 199 ml destilata ako je primijenjena destilacija s vodenom parom. Dopunimo do 200 ml destiliranom vodom, održavajući destilat na temperaturi koja se najviše za 2° C razlikuje od početne temperature. Miješamo s velikom pažnjom kružnim pokretima. (Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, Zakona o vinu »Narodne novine«, br. 96/03)

### **2.2.2 Referentna metoda**

Alkoholnu jakost destilata mjerimo piknometrom.

*Aparatura:* Rabimo piknometar koji je opisan u prvom poglavlju.

*Postupak:* Izmjerimo gustoću destilata pri  $t$  °C. Ovu gustoću označimo kao  $\rho_t$  °C.

*Iskazivanje rezultata*

Izračunavanje: Nađemo alkoholnu jakost pri 20° C uporabom tabele. U vodoravnoj koloni ove tabele koja odgovara temperaturi T neposredno ispod  $t$  °C, pronađimo najmanju gustoću koja je veća od  $\rho_t$  °C. Tabelarnu razliku ispod ove gustoće upotrijebimo za izračun gustoće  $\rho$  pri temperaturi T. U liniji temperature T nađemo gustoću  $\rho$  neposredno iznad  $\rho'$  te izračunamo razliku između gustoća  $\rho$  i  $\rho'$ . Ovu razliku dijelimo s tabelarnom razlikom koja se nalazi desno od  $\rho'$ . Kvocijent daje decimalni dio alkoholne jakosti dok se njezini cijeli brojevi nalaze na vrhu. (Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, Zakona o vinu »Narodne novine«, br. 96/03)

## **2.2.3 Uobičajene metode**

### **2.2.3.1 Hidrometrija**

*Aparatura:* Alkoholometar, termometar sa podjelom od 0,1°C, od 0° do 40 °C s točnošću do 1/20 stupnja (0,05°C) i mjerni cilindar promjera 36 mm i visine 320 mm, koji se drži uspravno pomoću zavrtnja za nivelaciju. (Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, Zakona o vinu »Narodne novine«, br. 96/03)

*Postupak:* Destilat ulijemo u mjerni cilindar. Cilindar držimo uspravno. Umetnemo termometar i alkoholometar. Očitamo temperaturu na termometru nakon jedno minutnog miješanja radi uravnoteženja temperature u mjernom cilindru, termometra, alkoholometra i destilata. Izvučemo termometar i očitamo alkoholnu jakost poslije jedne minute. Očitavanje obavimo najmanje tri puta upotrebom povećala. Alkoholnu jakost očitano pri temperaturi  $t$  °C korigiramo za učinak temperature pomoću tabele. Temperatura tekućine mora se vrlo malo razlikovati od sobne temperature (najviše 5 °C). (Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, Zakona o vinu »Narodne novine«, br. 96/03)

### **2.2.3.2 Denzimetrija uporabom hidrostatske vage**

*Aparatura:* Koristimo hidrostatsku vagu.

*Postupak:* Gustoću destilata pri  $t$  °C mjerimo kako je opisano prethodno.

*Iskazivanje rezultata:* Odredimo alkoholnu jakost na 20 °C sljedeći metodu opisanu prethodno. (Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, Zakona o vinu »Narodne novine«, br. 96/03)

### **2.2.3.3 Refraktometrija**

*Aparatura:* Refraktometar koji omogućuje mjerenje indeksa loma u rasponu od 1,330 do 1,346. Ovisno o tipu opreme, mjerenja se izvode: ili na 20° C s pogodnim instrumentom, ili na sobnoj temperaturi  $t$  °C upotrebom instrumenta opremljenog termometrom koji omogućava mjerenje temperature s točnošću od 0,05° C. Tabela za korekciju temperature treba biti pridružena takvom instrumentu.

*Postupak:* Indeks loma destilata, koji je dobiven kako je opisano prethodno, mjeri se slijedeći upute priložene instrumentu.

*Iskazivanje rezultata:* Alkoholna jakost koja odgovara indeksu loma očitanoj na 20° C očitava se iz tabele. (Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, Zakona o vinu »Narodne novine«, br. 96/03)

## **2.3 Određivanje ukupnog suhog ekstrakta**

Ukupan suhi ekstrakt ili ukupna suha tvar uključuje sve tvari koje nisu hlapive pod specifičnim fizičkim uvjetima. Ovi fizički uvjeti moraju biti takvi da tvari koje čine ekstrakt pretrpe što je moguće manje promjene u tijeku izvođenja testa. Ekstrakt bez šećera je razlika između ukupnog suhog ekstrakta i ukupnih šećera. Reducirani ekstrakt je razlika između ukupnog suhog ekstrakta i ukupnih šećera iznad 1 g/l, kalijeva sulfata iznad 1 g/l, prisutnog manitola ili drugih kemijskih supstancija koje su možda bile dodane vinu. Rezidualni ekstrakt je ekstrakt bez šećera i nehlapive kiselosti izražene kao vinska kiselina. Ekstrakt se izražava u gramima po litri i treba biti određen unutar najbližih 0,5 g. (Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, Zakona o vinu »Narodne novine«, br. 96/03)

Mjerenje s denzitometrom:

*Postupak:* Ukupan suhi ekstrakt izračunava se indirektno iz relativne gustoće mošta, a za vino iz relativne gustoće bezalkoholnog vina. Ovaj suhi ekstrakt predstavlja količinu saharoze koja, otopljena u 1 litri vode daje otopinu iste relativne gustoće kao mošt ili bezalkoholno vino.

*Iskazivanje rezultata:*

– Izračunavanje:

Relativna gustoća (20/20)  $d_r$  bezalkoholnog vina izračunava se pomoću formule:

$d_r = d_v - d_a + 1,000$ , gdje je:  $d_v$  = relativna gustoća vina pri 20 °C (korigirana za hlapivu kiselost),  $d_a$  = relativna gustoća mješavine voda–alkohol iste alkoholne jakosti kao vino pri 20 °C,  $d_r$  lako izračunamo iz gustoća pri 20 °C gustoće vina  $d_v$  i gustoće  $d_a$  mješavine voda–alkohol iste alkoholne jakosti kao vino prema formuli:  $d_r = 1,0018 (d_v - d_a) + 1,000$ , gdje se koeficijent 1,0018 približava 1 kad je  $d_v$  ispod 1,05, što je najčešće slučaj. Za izračun ukupnog suhog ekstrakta u g/l treba koristiti tabelu, u kojoj je ukupni suhi ekstrakt u funkciji relativne gustoće  $d_r$  bezalkoholnog vina, ili iz relativne gustoće mošta. Ukupan suhi ekstrakt izražava se u g/l na jedno decimalno mjesto. (Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, Zakona o vinu »Narodne novine«, br. 96/03)

## **2.4 Određivanje reducirajućih šećera**

Reducirajući šećeri su svi šećeri, koji imaju keto ili aldehidne funkcionalne skupine. Njihovo određivanje vezano je za redukciju alkalne otopine bakar (II) soli. (Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, Zakona o vinu »Narodne novine«, br. 96/03)

*Princip metode:*

1. Pročišćavanje:

Referentna metoda: poslije neutralizacije i uklanjanja alkohola, vino propuštamo kroz kolonu za izmjenu iona u kojoj se njegovi anioni zamjenjuju ionima acetata nakon čega slijedi pročišćavanje neutralnim olovnim acetatom.



Uobičajene metode: vino pročišćavamo jednim od sljedećih reagensa: neutralni olovni acetat; cink-2-heksacijanoferat.

2. Određivanje: Pročišćeno vino ili mošt reagira s određenom količinom otopine alkalne bakrene soli (II), a višak iona bakra određuje se jodometrijski. (Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, Zakona o vinu »Narodne novine«, br. 96/03)

### 2.4.1 Pročišćavanje vina

Koncentracija reducirajućih šećera u uzorku kojega analiziramo mora biti od 0,5 do 5 g/l. Suha vina ne razrjeđujemo tijekom pročišćavanja, slatka vina moramo razrijediti u cilju postizanja razine šećera unutar okvira propisanih u **Tablici 1**. (Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, Zakona o vinu »Narodne novine«, br. 96/03)

**Tablica 1.** Koncentracija šećera, relativna gustoća i razrjeđenja (Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, Zakona o vinu »Narodne novine«, br. 96/03)

Opis uzorka	Koncentracija šećera (g/l)	Relativna gustoća	Razrjeđenje (%)
moštev i mistele	iznad 125	iznad 1,038	1
slatka vina	25 do 125	1,005 do 1,038	4
poluslatka vina	5 do 25	0,997 do 1,005	20
suha vina	ispod 5	ispod 0,997	bez razrjeđenja

#### 2.4.1.1 Referentna metoda

*Reagensi:* 1 M otopina klorovodične kiseline, HCl; 1 M otopina natrijeva hidroksida, NaOH; 4 M otopina octene kiseline, CH<sub>3</sub>COOH; 2 M otopina natrijeva hidroksida, NaOH; smola anionske izmjene [Dowex 3 (20-50 mesh) ili ekvivalentne smole];

Priprema kolone za anionsku izmjenu: Na dno birete stavimo malen umetak staklene vune i dodamo 15 ml smole anionske izmjene. Prije uporabe, smolu dva puta regeneriramo tako da

je naizmjenično prelijemo sa 1 M otopinom klorovodične kiseline i 1 M otopinom natrijeva hidroksida. Nakon ispiranja s 50 ml destilirane vode, premjestimo smolu u čašu, dodamo 50 ml 4 M otopine octene kiseline i miješamo pet minuta. Ponovno napunimo biretu smolom i na nju dolijemo 100 ml 4 M otopine octene kiseline. Napomena: poželjno je imati zalihu smole spremljenu u boci napunjenoj sa 4 M otopinom octene kiseline. Kolonu ispiramo destiliranom vodom dok eluat nije neutralan.

Regeneriranje smole: U kolonu nalijemo 150 ml 2 M otopine natrijeva hidroksida da odstranimo kiselinu i većinu pigmenta vezanih na smolu. Isperemo sa 100 ml vode i na to nalijemo 100 ml 4 M octene kiseline. Kolonu ispiramo s destiliranom vodom dok eluat nije neutralan.

Neutralna otopina olovnog acetata (približno zasićena): neutralni olovni acetat: 250g; vrlo vruća voda: do 500 ml; miješamo, dok se potpuno ne otopi.

Kalcijev karbonat ( $\text{CaCO}_3$ ). (Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, Zakona o vinu »Narodne novine«, br. 96/03)

*Postupak:*

Suha vina: Ulijemo 50 ml vina u čašu promjera od oko 10 do 12 cm, dodamo  $\frac{1}{2}(n - 0,5)$  ml 1 M otopine natrijeva hidroksida, (n je volumen 0,1 M otopine natrijeva hidroksida potreban za titraciju ukupne kiselosti u 10 ml vina) te uparavamo na vodenoj kupelji do oko 20 ml. Ovu tekućinu propustimo kroz smolu anionske izmjene u obliku acetata po 3 ml svake dvije minute. Eluat skupljamo u tikvicu od 100 ml. Ispiremo posudu i kolonu šest puta sa po 10 ml destilirane vode. Tijekom mješanja, eluatu dodamo 2,5 ml zasićene otopine olovnog acetata i 0,5 g kalcijeva karbonata, nekoliko puta promućkamo i pustimo da odstoji najmanje 15 minuta. Tikvicu dopunimo do oznake i filtriramo. 1 ml ovoga filtrata odgovara 0,5 ml vina.

Moštevci, mistele, slatka i poluslatka vina: Razrjeđenja se prave prema uputama:

1. moštevci i mistele: pripremimo 10 % otopinu uzorka i za analizu uzmemo 10 ml razrijeđenog uzorka.
2. slatka vina, pojačana ili ne, relativne gustoće između 1,005 i 1,038: pripremimo 20 % otopinu uzorka i uzmemo 20 ml razrijeđenog uzorka.

3. poluslatka vina relativne gustoće pri 20° C između 0,997 i 1,005: uzmemo 20 ml nerazrijeđena vina.

Propuštamo gore navedeni volumen vina ili mošta kroz kolonu anionske izmjene u obliku acetata brzinom od 3 ml svake dvije minute. Eluat skupljamo u tikvicu od 100 ml, kolonu ispiramo vodom dok ne dobijemo oko 90 ml eluata. Eluatu dodajemo 0,5 g kalcijeva karbonata i 1 ml zasićene otopine olovnog acetata. Promućkamo, ostavimo da odstoji najmanje 15 minuta miješajući ga povremeno. Nadolijemo vodu do oznake i filtriramo.

U slučajevima iz gornjih točaka 1., 2. i 3. razrjeđenja odgovaraju sljedećim količinama: 1 ml filtrata odgovara 0,01 ml mošta ili mistele, 1 ml filtrata odgovara 0,04 ml slatkog vina, 1 ml filtrata odgovara 0,20 ml poluslatkog vina. (Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, Zakona o vinu »Narodne novine«, br. 96/03)

#### **2.4.1.2 Uobičajene metode**

##### **A) PROČIŠĆAVANJE S NEUTRALNIM OLOVO ACETATOM**

*Reagensi:* otopina neutralna olovnog acetata, kalcijev karbonat.

*Postupak:*

– Suha vina: 50 ml vina ulijemo u odmjerenu tikvicu od 100 ml, dodamo  $\frac{1}{2}$  (n - 0,5) ml 1 M otopine natrijeva hidroksida; gdje je n volumen 0,1 M natrijeva hidroksida upotrebljen za određivanje ukupne kiselosti u 10 ml vina. Uz miješanje dodamo 2,5 ml zasićene otopine olovnog acetata i 0,5 g kalcijeva karbonata. Sadržaj tikvice promućkamo nekoliko puta i ostavimo da odstoji najmanje 15 minuta. Nadopunimo do oznake vodom i filtriramo. 1 ml filtrata odgovara 0,5 ml vina.

– Moštevima, mistelama, slatkim i poluslatkim vinima:

Razrjeđenja se prave prema uputama:

1. moštevima i mistelama: priredimo 10 % otopinu uzorka i za analizu uzmemo 10 ml toga razrijeđenog uzorka;

2. slatka vina, pojačana ili ne, relativne gustoće između 1,005 i 1,038: priredimo 20 % otopinu uzorka i uzmemo 20 ml razrijeđenog uzorka;

3. poluslatka vina gustoće između 0,997 i 1,005 pri 20 °C: uzmemo 20 ml nerazrijeđena uzorka.

Dodamo 0,5 g kalcijeva karbonata, oko 60 ml vode i 0,5, 1 ili 2 ml zasićene otopine olovnog acetata. Promiješamo i ostavimo da stoji najmanje 15 minuta, miješajući povremeno. Dopunimo vodom do oznake i filtriramo.

U slučajevima iz gornjih točaka 1., 2. i 3. razrjeđenja odgovaraju sljedećim količinama: 1 ml filtrata odgovara 0,01 ml mošta ili mistele, 1 ml filtrata odgovara 0,04 ml slatka vina, 1 ml filtrata odgovara 0,20 ml poluslatka vina. (Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, Zakona o vinu »Narodne novine«, br. 96/03)

#### B) PROČIŠĆAVANJE S CINKOVIM-2-HEKSA-CI-JAN-O---FERATOM

Ovaj postupak koristimo samo za bijela vina, svijetla slatka vina i moštveve.

*Reagensi:* Otopina I: kalijev-2-heksacijanoferat: Kalijev-2-heksacijanoferat [ $K_4Fe(CN)_6 \times 3H_2O$ ], 150 g; dopunimo vodom do 1000 ml. Otopina II: cinkov sulfat: Cinkov sulfat,  $ZnSO_4 \times 7H_2O$ , 300 g; dopunimo vodom do 1000 ml.

*Postupak:* U odmjernu tikvicu od 100 ml ulijemo uzorak vina (ili mošta ili mistele); razrjeđenja su navedena u uputama:

1. moštvevi i mistele: priredimo 10 % otopinu uzorka i za analizu uzmemo 10 ml razrijeđenog uzorka;
2. slatka vina, pojačana ili ne, relativne gustoće između 1,005 i 1,038: priredimo 20 % otopinu uzorka i uzmemo 20 ml razrijeđenog uzorka;
3. poluslatka vina relativne gustoće između 0,997 i 1,005: uzmemo 20 ml nerazrijeđena uzorka.
4. suha vina: uzmemo 50 ml nerazrijeđenog uzorka.

Dodamo 5 ml otopine I, kalijev 2-heksacijanoferata i 5 ml otopine II, cinkova sulfata. Promiješamo, dopunimo vodom do znake, ostavimo da stoji 10 minuta i filtriramo. U slučajevima iz gornjih točaka 1., 2., 3. i 4. razrjeđenja odgovaraju sljedećim količinama: 1 ml filtrata odgovara 0,01 ml mošta ili mistele, 1 ml filtrata odgovara 0,04 ml slatkog vina, 1 ml filtrata odgovara 0,20 ml poluslatkog vina, 1 ml filtrata odgovara 0,50 ml suhog vina.

(Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, Zakona o vinu »Narodne novine«, br. 96/03)

### 2.4.2 Određivanje šećera

*Reagensi:*

- Alkalna otopina soli bakra: bakar (II) sulfat, ( $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ): 25 g; limunska kiselina ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \times \text{H}_2\text{O}$ ): 50 g; natrijev karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3 \times 10\text{H}_2\text{O}$ ): 388 g; voda: do 1000 ml. Bakar (II) sulfat otopimo u 100 ml vode, limunsku kiselinu u 300 ml vode i natrijev karbonat u 300 do 400 ml vruće vode. Pomiješamo otopine limunske kiseline i natrijeva karbonata. Dodamo im otopinu bakar (II) sulfata i dopunimo vodom do 1 litre.
- 30 % otopina kalijeva jodida: kalijev jodid (KI): 30 g; voda: do 100 ml; Otopinu spremimo u tamnu bocu.
- 25 % otopina sumporne kiseline: koncentrirana sumporna kiselina ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ),  $r_{20} = 1,84$  g/ml: 25 g; voda: do 100 ml. Kiselinu polako dodajemo u vodu, pričekamo da se ohladi i dopunimo sa vodom do 100 ml.
- Otopina škroba, 5 g/l: 5 g škroba pomiješamo s oko 500 ml vode. Uz stalno miješanje grijemo do vrenja, ostavimo da vrije 10 minuta. Dodamo 200 g natrijeva klorida (NaCl), ohladimo i dopunimo vodom do 1 litre.
- 0,1 M otopina natrijeva tiosulfata,
- Otopina invertnog šećera, 5 g/l.

U odmjernu tikvicu od 200 ml dodamo: čistu suhu saharozu: 4,75 g; vodu: približno 100 ml; koncentriranu klorovodičnu kiselinu,  $r_{20} =$  od 1,16 do 1,19 g/ml: 5 ml. Tikvicu grijemo na vodenoj kupelji pri  $60^\circ \text{C}$  dok temperatura otopine ne dostigne  $50^\circ\text{C}$ ; temperaturu održavamo 15 minuta. Tikvicu hladimo na zraku 30 minuta i tada je uronimo u hladnu vodu. Otopinu prenesemo u odmjernu tikvicu od 1 litre i dopunimo do oznake. Ova otopina postojana je mjesec dana. Kad je koristimo, ispitni uzorak (otopina ima aproksimativno 0,06 M HCl) neutraliziramo otopinom natrijeva hidroksida. (Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, Zakona o vinu »Narodne novine«, br. 96/03)

*Postupak:* U tikvici od 300 ml pomiješamo 25 ml alkalne otopine bakrene soli, 15 ml vode i 10 ml pročišćene otopine uzorka. Ovaj volumen otopine ne smije sadržavati više od 60 mg invertnog šećera. Dodamo nekoliko kuglica za vrenje, na tikvicu namjestimo povratno hladilo i zagrijemo do vrenja u roku od dvije minute. Neka mješavina vrije točno 10 minuta. Ohladimo tikvicu u mlazu hladne vode. Kad se potpuno ohladi, dodajemo 10 ml 30 % otopine kalijeva jodida, 25 ml 25 % sumporne kiseline i 2 ml otopine škroba. Titriramo s 0,1 M otopine natrijeva tiosulfata, broj utrošenih mililitara natrijeva tiosulfata označimo sa n. Za titraciju slijepa probe, 10 ml otopine šećera zamijenimo s 10 ml destilirane vode, broj mililitara utrošenog natrijeva tiosulfata za titraciju slijepa probe označimo sa n'. (Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, Zakona o vinu »Narodne novine«, br. 96/03)

#### *Iskazivanje rezultata*

1. Izračunavanje: Masa reducirajućih šećera, izražena kao invertni šećer, sadržana u uzorku dana je u tabeli, kao funkcija broja (nž - n) utrošenih mililitara natrijeva tiosulfata. Masu reducirajućih šećera izražavamo u gramima invertnog šećera na litru, na jedno decimalno mjesto, uzimajući u obzir razrjeđenje u tijeku pročišćavanja i volumen ispitivanog uzorka.
2. Ponovljivost, (r):  $r = 0,015x_i$ ; gdje je  $x_i$  koncentracija invertnog šećera u g/l uzorka.
3. Obnovljivost, (R):  $R = 0,058x_i$ ; gdje je  $x_i$  koncentracija invertnog šećera u g/l uzorka. (Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, Zakona o vinu »Narodne novine«, br. 96/03)

## **2.5 Određivanje pepela**

Sadržaj pepela definiran je kao ukupnost svih produkata koji ostaju nakon žarenja taloga preostalog od isparavanja vina. Žarenje se izvodi tako da se svi kationi (isključivši kation amonija) pretvore u karbonate ili druge bezvodne anorganske soli.

*Princip metode:* Ekstrakt vina žarimo na temperaturi između 500 i 550° C do potpune oksidacije organskih tvari.

*Aparature:* vodena kupelj, vaga s točnošću 0,1 mg, žarna ploča ili infra-crveni evaporator, električna peć s kontroliranom temperaturom, platinska posuda ravna dna, promjera 70 mm, visine 25 mm.

*Postupak:* U prethodno izmjerenu platinsku posudu odpipetiramo 20 ml vina. Otparimo do suha na kipućoj vodenoj kupelji, ostatak sagorimo na žarnoj ploči na 200° C ili pod infra-crvenim evaporatorom dok ne započne karbonizacija. Kad se prestane razvijati dim, stavimo posude u električnu peć pri 525 +/-25° C. Nakon 15 minuta karbonizacije, izvadimo posudu iz peći, dodamo 5 ml destilirane vode, isparimo na vodenoj kupelji ili pod infra-crvenim evaporatorom i ostatak ponovo žarimo pri 525° C 10 minuta. Ako sagorijevanje nije potpuna, ponavljamo postupak dodavanja vode, isparavanja vode i žarenja. Kada je pepeo bijele boje, platinsku posudu ohladimo u eksikatoru i važemo (masa P1). Masa pepela u uzorku (20 ml) jednaka je  $P = P1 - P0$ .

*Iskazivanje rezultata:* Masa pepela P u gramima po litri dobit će se na dva decimalna mjesta izrazom:  $P = 50 \times p$ . (Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, Zakona o vinu »Narodne novine«, br. 96/03)

## 2.6 Određivanje pH

Mjerimo razliku u potencijalu između dviju elektroda uronjenih u ispitivanu tekućinu. Potencijal jedne od elektroda je u funkciji pH vrijednosti tekućine dok druga elektroda ima stalan i poznat potencijal te predstavlja referentnu elektrodu. (Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, Zakona o vinu »Narodne novine«, br. 96/03)

*Aparatura:* pH metar sa skalom kalibriranom u jedinicama pH tako da omogućava mjerenja do točnosti od najmanje 0,05 pH jedinice, elektrode: staklena elektroda koja se drži u destiliranoj vodi; kalomel elektroda – referentna; drži se u zasićenoj otopini kalijeva klorida; ili kombinirana elektroda koja se drži u destiliranoj vodi.

*Reagensi* – puferne otopine:

– Zasićena otopina kalijeva hidrogenkarbonata, s najmanje 5,7 g kalijeva hidrogenkarbonata po litri pri 20° C. pH vrijednost: 3,57 pri 20° C; 3,56 pri 25° C; 3,55 pri 30° C;

- 0,05 M otopina kalijeva hidrogenftalata, koja sadrži 10,211 g kalijeva hidrogen-ftalata pri 20°C. pH vrijednost: 3,999 pri 15° C; 4,003 pri 20° C; 4,008 pri 25° C; 4,015 pri 30° C;
- Otopina koja sadrži: monokalijev fosfat: 3,402 g, dikalijev fosfat: 4,354 g, voda do 1000 ml. pH vrijednost: 6,90 pri 15° C; 6,88 pri 20° C; 6,86 pri 25° C; 6,85 pri 30° C;

*Postupak:*

1. Priprema uzorka za analizu: Mošt i vino mjerimo direktno. Pročišćeni ugušćeni mošt: razrijedimo pročišćeni ugušćeni mošt vodom da dobijemo koncentraciju od 25 +/- 0,5% (m/m) ukupnih šećera (25° Brix). Ako je P koncentracije (m/m) ukupnih šećera u pročišćenom ugušćenom moštu, izmjerimo masu od 2500/P i nadopunimo do 100 g vodom. Provodljivost upotrebijene vode mora biti ispod 2 mikrosimensa po cm (mS/cm).
2. Namještanje nule aparata: Prije mjerenja aparaturu treba namjestiti na nulu prema priloženim uputama.
3. Kalibriranje pH metra: pH metar kalibriramo pri 20° C pufer otopinama pH 6,88 i 3,57. Upotrijebimo pufer otopinu pH 4,00 pri 20° C da bismo provjerili skalu.
4. Određivanje pH: Elektrodu uronimo u uzorak na temperaturi između 20 i 25°C i to što je moguće bliže 20° C. pH vrijednost izravno pročitamo sa skale. Svaki uzorak izmjerimo dva puta. Konačni rezultat je aritmetička sredina dva mjerenja.

*Iskazivanje rezultata:* Vrijednost pH mošta, vina ili otopine 25% (m/m) (25°Brix) pročišćenog ugušćenog mošta izražava se na dva decimalna mjesta. (Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, Zakona o vinu »Narodne novine«, br. 96/03)

## **2.7 Određivanje ukupne kiselosti**

Ukupna kiselost vina je suma njegovih titrabilnih kiselina kad ga se titrira do pH 7 sa standardnom alkalnom otopinom. Ugljikov dioksid nije uključen u ukupnu kiselost.

*Princip metode:* Potenciometrijska titracija ili titracija uz indikator bromtimol modro i usporedba sa završnom točkom bojenog standarda. (Pravilnik o fizikalno-kemijskim



metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, Zakona o vinu »Narodne novine«, br. 96/03)

*Reagensi:*

1. Puferna otopina pH 7,0: kalijev dihidrogen fosfat: 107,3 g; 1 M otopina natrijeva hidroksida: 500 ml; destilirana voda: do 1000 ml. Mogu se koristiti komercijalne pufer otopine.

2. 0,1 M otopina natrijeva hidroksida;

3. Otopina indikatora bromtimol modro koncentracije 4 g/l: bromtimol modro: 4 g; neutralni etanol, 96%: 200 ml. Spojimo otopine i dodamo: degaziranu vodu (bez CO<sub>2</sub>): 200 ml; 1 M otopinu natrijeva hidroksida, do pojave modro-zelene boje (pH 7): približno 7,5 ml. Dopunimo sa destiliranom vodom do 1000 ml. (Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, Zakona o vinu »Narodne novine«, br. 96/03)

*Aparatura:* Vodena vakuum pumpa; vakuum tikvica od 500 ml; potencijometar sa skalom u vrijednostima pH i elektroda. Staklena elektroda mora se držati u destiliranoj vodi. Kalomel elektroda mora se držati u zasićenoj otopini kalijeva klorida. Kombinirana elektroda koja se koristi mora biti pohranjena u destiliranoj vodi; mjerni cilindri: za vino od 50 ml, za pročišćene ugušćene moštve od 100 ml. (Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, Zakona o vinu »Narodne novine«, br. 96/03)

*Postupak:*

1. Priprema uzorka:

Vino: Odstranjivanje ugljikovog dioksida: ulijemo oko 50 ml vina u vakuum tikvicu i priključimo na vodenu vakuum pumpu 1-2 minute, miješajući ga kontinuirano.

Pročišćeni ugušćeni mošt: Izmjerimo točno 200 g pročišćenog ugušćenog mošta u odmjernu tikvicu od 500 ml i nadopunimo s vodom do oznake. Homogeniziramo.

2. Potencijometrijska titracija

Kalibriranje pH metra: pH metar mora biti umjeren pri 20° C u skladu s uputama proizvođača, sa pufer otopinom pH 7 pri 20° C.

Metoda mjerenja: u mjerni cilindar ulijemo određeni volumen uzorka što je 10 ml u slučaju vina, a 50 ml pročišćenog ugušćenog mošta. Dodamo približno 10 ml destilirane vode i titriramo sa 0,1 M otopinom natrijeva hidroksida iz birete dok pH ne bude 7 pri 20 °C. Otopinu natrijeva hidroksida dodajemo uz stalno miješanje. Označimo volumen dodane 0,1 M otopine natrijeva hidroksida s n ml.

### 3. Titracija u prisustvu indikatora (bromtimol modro)

Preliminarani test: određivanje boje u završnoj točki: Umjerni cilindar ulijemo 25 ml kipuće destilirane vode, 1 ml otopine bromtimol modro i volumen od 10 ml uzorka u slučaju vina, a 50 ml ako se radi o rektificiranu koncentriranom moštu. Dodamo 0,1 M otopinu natrijeva hidroksida dok se boja ne promijeni u modrozelenu. Tada dodajemo 5 ml puferne otopine pH 7.

Titracija: U mjerni cilindar ulijemo 30 ml kipuće destilirane vode, 1 ml otopine bromtimol modro i volumen uzorka (10 ml u slučaju vina, a 50 ml ako se radi o pročišćenom ugušćenom moštu) pripremljenog kako je opisano prethodno. Dodamo 0,1 M otopinu natrijeva hidroksida dok se ne dobije ista boja kao i u preliminarnom testu. Volumen dodane 0,1 M otopine natrijeva hidroksida označimo sa n ml. (Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, Zakona o vinu »Narodne novine«, br. 96/03)

#### *Iskazivanje rezultata*

##### 1. Izračunavanje:

Vino: Ukupnu kiselost, izraženu u miliekvivalentima po litri (A) izračunavamo:  $A = 10 \times n$ ; Rezultat izražavamo na jedno decimalo mjesto. Ukupnu kiselost izraženu u gramima vinske kiseline po litri (A'), izračunavamo:  $A' = 0,075 \times A$ ; Rezultat izražavamo na jedno decimalno mjesto.

Pročišćeni ugušćeni mošt: Ukupnu kiselost, izraženu u miliekvivalentima po kilogramu pročišćenog ugušćenog mošta (A), izračunavamo :  $A = 5 \times n$ . Ukupnu kiselost, izraženu u miliekvivalentima po kilogramu ukupnih šećera (A), izračunavamo:  $A = \frac{500 \times n}{P}$  gdje je P koncentracije (m/m) ukupnih šećera. Rezultat izražavamo na jedno decimalno mjesto.

##### 2. Ponovljivost (r) za titraciju s indikatorom:

Za bijela, ružičasta i crna vina:  $r = 0,9$  mekv/l,  $r = 0,07$  g vinske kiseline/l.

3. Obnovljivost (R) za titraciju s indikatorom:

Za bijela i roze vina:  $R = 3,6$  mekv/l,  $R = 0,3$  g vinske kiseline/l.

Za crna vina:  $R = 5,1$  mekv/l,  $R = 0,4$  g vinske kiseline/l. (Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, Zakona o vinu »Narodne novine«, br. 96/03)

## 2.8 Određivanje hlapive kislosti

Hlapiva kislost predstavlja homologe octene kiseline prisutnih u vinu u slobodnom obliku ili u obliku soli.

*Princip metode:* Titracija hlapivih kiselina, izdvojenih iz vina destilacijom vodenom parom i titriranje destilata. Iz vina se najprije izdvoji ugljikov dioksid. Kislost slobodnog i vezanog sumpornog dioksida u destilatu dobivenom pod ovim uvjetima mora se oduzeti od kislosti destilata. Kislost sorbinske kiseline koja je dodana vinu mora se oduzeti od hlapive kislosti.

Napomena: dio salicilne kiseline, koja se u nekim zemljama rabi za stabilizaciju vina, prisutan je u destilatu. Količina salicilne kiseline mora biti određena i oduzeta od hlapive kislosti. (Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, Zakona o vinu »Narodne novine«, br. 96/03)

*Reagensi:* Kristalizirana vinska kiselina; 0,1 M otopine natrijeva hidroksida; 1% otopina fenolftaleina u 96% neutralnom alkoholu; klorovodična kiselina, ( $\rho_{20} = 1,18$  do  $1,19$  g/l) razrijeđena 1:4 (v/v); 0,005 M otopina joda, kristalizirani kalijev jodid, otopina škroba, 5 g/l, zasićena otopina natrijeva borata ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10 \text{H}_2\text{O}$ ), koncentracije približno 55 g/l pri 20° C. (Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, Zakona o vinu »Narodne novine«, br. 96/03)

*Aparatura:*

1. Aparatura za destilaciju vodenom parom sastavljena od: generatora vodene pare (para mora biti bez ugljikovog dioksida), tikvice sa cijevi za paru, kolone za destilaciju, hladila.

Oprema mora zadovoljiti sljedeća tri testa:

a) U tikvicu ulijemo 20 ml uzavrele vode. Sakupimo 250 ml destilata, dodamo 0,1 ml 0,1 M otopine natrijeva hidroksida i dvije kapi otopine fenolftaleina. Ružičasta boja mora biti postojana najmanje 10 sekundi. To znači da para ne sadrži ugljikovog dioksida.

b) U tikvicu ulijemo 20 ml 0,1 M otopine octene kiseline. Sakupimo 250 ml destilata i titiramo s 0,1 M otopinom natrijeva hidroksida. Volumen utrošenog NaOH mora biti najmanje 19,9 ml. To znači da je predestilirano najmanje 99,5% octene kiseline.

c) U tikvicu ulijemo 20 ml 1 M otopine mliječne kiseline. Sakupimo 250 ml destilata i titiramo kiselinu s 0,1 M otopinom natrijeva hidroksida. Volumen utrošene otopine natrijeva hidroksida mora biti manji ili jednak 1,0 ml, što znači da se predestiliralo ne više od 0,5% mliječne kiseline.

Svaka aparatura ili postupak koja zadovoljava ove testove ispunjava zahtjeve službenih međunarodnih aparatura ili postupaka.

2. Vodena pumpa

3. Vakuum tikvica. (Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, Zakona o vinu »Narodne novine«, br. 96/03)

*Postupak:*

1. Pripremanje uzorka: odstranjivanje ugljikovog dioksida. U vakuum tikvicu ulijemo približno 50 ml vina; pomoću vodene pumpe uspostavimo vakuum u tikvici na minutu-dvije, tresući vino neprestano.

2. Destilacija vodenom parom: U tikvicu ulijemo 20 ml vina bez ugljikovog dioksida. Dodamo približno 0,5 g vinske kiseline. Sakupimo najmanje 250 ml destilata.

3. Titracija: Titriramo sa 0,1 M otopine natrijeva hidroksida uz dodatak dvije kapi fenolftaleina kao indikatora. Označimo volumen upotrijebljenog natrijeva hidroksida  $n$  ml. Dodamo četiri kapi razrijeđene klorovodične kiseline, 2 ml otopine škroba i nekoliko kristala kalijeva jodida. Titriramo slobodan sumporni dioksid s 0,005 M otopine joda. Označimo upotrebljeni volumen sa  $n'$ . Dodamo zasićenu otopinu natrijeva borata dok se opet ne pojavi ružičasta boja. Titriramo ukupni sumporni dioksid sa 0,005 M otopine joda. Označimo upotrebljeni volumen 0,005 M otopine joda sa  $n''$ . (Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama

analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, Zakona o vinu »Narodne novine«, br. 96/03)

#### *Iskazivanje rezultata*

1. Izračunavanje: Hlapiva kiselost, izražena u miliekvivalentima po litri, izražena na jedno decimalno mjesto, dana je formulom:  $A = 5 (n - 0,1 \times n' - 0,05 \times n'')$ . Hlapiva kiselost, izražena u gramima octene kiseline po litri, izražena na dva decimalna mjesta, dana je formulom:  $A = 0,300 \times (n - 0,1 \times n' - 0,05 \times n'')$ ;

2. Ponovljivost (r):  $r = 0,7$  mekv/l;  $r = 0,04$  g octene kiseline/l.

3. Obnovljivost (R):  $R = 1,3$  mekv/l;  $R = 0,08$  g octene kiseline/l.

4. Vino s prisutnom sorbinskom kiselinom: Kako se 96% sorbinske kiseline destilira vodenom parom u destilat volumena 250 ml, njezina kiselost mora biti oduzeta od hlapive kiselosti. 100 mg sorbinske kiseline odgovara kiselosti od 0,89 miliekvivalenta ili 0,053 g octene kiseline. Koncentraciju sorbinske kiseline u mg/l određujemo drugim metodama. (Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, Zakona o vinu »Narodne novine«, br. 96/03)

#### *Određivanje salicilne kiseline u destilatu hlapivih kiselina*

1. Princip: Nakon što se odredi hlapiva kiselost s korekcijom za sumporni dioksid, prisutnost salicilne kiseline dokazuje se, pojavom ljubičaste boje, nakon zakiseljavanja i dodatka soli željeza (III). Određivanje salicilne kiseline sadržane u destilatu s hlapivom kiselosti izvodi se u drugom destilatu istoga volumena kao i destilat u kojemu je određena hlapiva kiselost. U ovom destilatu salicilna se kiselina određuje kolorimetrijskom metodom. Dobivena količina se oduzima od hlapive kiselosti destilata.

2. Reagensi: Klorovodična kiselina, HCl ( $\rho_{20} = 1,18$  do  $1,19$  g/l), 0,1 M otopina natrijevog tiosulfata, ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ), 10 % otopina željezo (III) amonijeva sulfata [ $(\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \times (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \times 24\text{H}_2\text{O})$ ] i 0,01 M otopina natrijeva salicilata: otopina sadrži 1,60 g/l natrijeva salicilata ( $\text{NaC}_7\text{H}_5\text{O}_3$ ).

3. Postupak:

Određivanje salicilne kiseline u destilatu hlapive kiselosti: Neposredno poslije određivanja hlapive kiselosti i korekcije na slobodni i ukupni sumporni dioksid, ulijemo u konusnu tikvicu

0,5 ml klorovodične kiseline, 3 ml 0,1 M otopine natrijeva tiosulfata i 1 ml otopine željezo (III) amonijeva sulfata. U prisustvu salicilne kiseline pojavi se ljubičasto obojenje.

Određivanje salicilne kiseline: Na konusnoj tikvici označimo nivo destilata. Ispraznimo i isperemo tikvicu. U istu tikvicu dodamo novih 20 ml vina, destiliramo vodenom parom i skupimo destilata u konusnu tikvicu do označenog nivoa. Dodamo 0,3 ml klorovodične kiseline i 1 ml otopine željezo (III) amonijeva sulfata. Sadržaj konusne tikvice oboji se ljubičasto. U konusnu tikvicu, identičnu tikvici iz prvog stavka ove točke, dodamo destiliranu vodu do označenog nivoa. Dodamo 0,3 ml klorovodične kiseline, i 1 ml otopine željezo (III) amonijeva sulfata. Iz birete dodajemo 0,01 M otopine natrijeva salicilata sve dok otopina ne poprimi istu ljubičastu boju kao ona u konusnoj tikvici s vinskim destilatom. Volumen otopine, koja je dodana iz birete označimo sa  $n''$  ml.

Korekcija hlapive kiselosti: Od volumena  $n$  0,1 M otopine natrijeva hidroksida, upotrebljenog za titiranje hlapive kiselosti oduzmemo  $0,1 \times n''$  ml. (Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, Zakona o vinu »Narodne novine«, br. 96/03)

## 2.9 Određivanje nehlapive kiselosti

Nehlapiva kiselost predstavlja razliku između ukupne i hlapive kiselosti. Nehlapivu kiselost izražavamo u: miliekvivalentima po litri (mekv/l), gramima vinske kiseline po litri (g vinske kiseline/l). (Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, Zakona o vinu »Narodne novine«, br. 96/03)

## 2.10 Određivanje slobodnog i ukupnog sumpornog dioksida

Slobodni sumporni dioksid definiran je kao sumporni dioksid koji je prisutan u moštu ili vinu u sljedećim oblicima:  $\text{H}_2\text{SO}_3, \rightleftharpoons \text{HSO}_3^-$ . Ravnoteža između ovih oblika je funkcija pH i temperature:  $\text{H}_2\text{SO}_3 \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{HSO}_3^-$ . Ukupni sumporni dioksid definiran je kao ukupnost svih različitih oblika sumpornog dioksida prisutnih u vinu, bilo slobodnom stanju ili kombiniran sa sastojcima vina. (Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, Zakona o vinu »Narodne novine«, br. 96/03)

*Princip metode:*

1. Referentna metoda:

Za vina i moštve: Sumporni dioksid izdvajamo iz vina strujom zraka ili dušika; vežemo i oksidiramo ga tako da ga mjehurićima provodimo kroz razrijeđenu i neutralnu otopinu vodikova peroksida. Nastalu sumpornu kiselinu određujemo titracijom sa standardnom otopinom natrijeva hidroksida. Slobodni sumporni dioksid izdvajamo iz vina na niskoj temperaturi (10° C). Ukupni sumporni dioksid izdvajamo iz vina zagrijavanjem na visokoj temperaturi (približno 100° C).

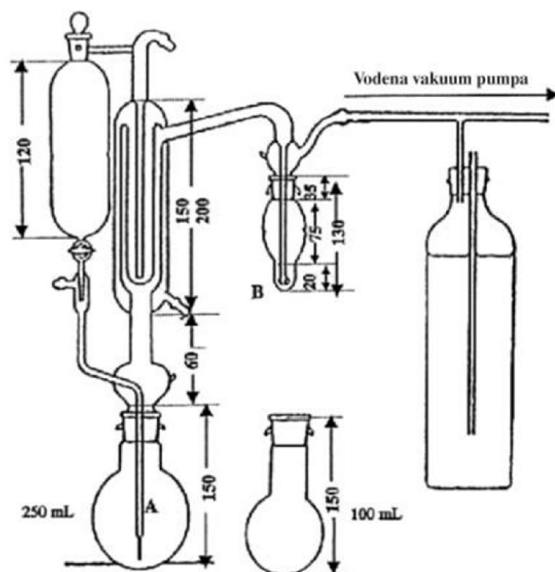
Za pročišćeni ugušćeni mošt: Ukupni sumporni dioksid izdvajamo iz prethodno razrijeđenog pročišćenog ugušćenog mošta zagrijavanjem na visokoj temperaturi (približno 100°C).

2. Brza metoda: Za vina i moštve: Slobodni sumporni dioksid određujemo direktno jodometrijskom titracijom. Vezani sumporni dioksid naknadno određujemo jodometrijskom titracijom nakon alkalne hidrolize. Ovaj rezultat pridodamo rezultatu slobodnog sumpornog dioksida, zbroj predstavlja ukupni sumporni dioksid. (Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, Zakona o vinu »Narodne novine«, br. 96/03)

### **2.10.1 Referentna metoda**

*Aparatura:* Aparatura, koja se koristi mora se slagati sa **slikom 2**. Posebnu pažnju potrebno je obratiti hladilu. Mikro-bireta.

*Reagensi:* Fosfatna kiselina, 85 % (p20 = 1,71 g/ml); otopina vodikova peroksida, 9,1 g H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / litri (tri volumena); indikator (metil crveno: 100 mg, metilensko modro: 50 mg, alkohol, 50%: 100 ml), 0,01 M otopina natrijeva hidroksida, NaOH.



**Slika 2** Dimenzije aparature za određivanje slobodnog i ukupnog sumpornog dioksida kod referentne metode (Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, Zakona o vinu »Narodne novine«, br. 96/03)

*Postupak:*

1. Određivanje slobodnog sumpornog dioksida: Vino moramo držati u punoj i začepljenoj boci na 20° C dva dana prije određivanja. U tikvicu B stavimo 2 do 3 ml otopine vodikova peroksida i dvije kapi indikatora. Otopinu vodikova peroksida neutraliziramo s otopinom 0,01 M natrijeva hidroksida i spojimo tikvicu B s aparaturom. U tikvicu A ulijemo 50 ml uzorka i 15 ml fosfatne kiseline i spojimo s aparaturom. Provodimo mjehuriće zraka (ili dušika) 15 minuta. Oslobođeni sumporni dioksid se u tikvici B oksidira u sumpornu kiselinu. Tikvicu B skinemo sa aparature i titriramo nastalu kiselinu s 0,01 M otopinom natrijeva hidroksida. Utrošeni volumen za titraciju označimo sa n ml.

Iskazivanje rezultata: Oslobođeni sumporni dioksid izražava se u mg/l, na najbliži cijeli broj.

Izračunavanje: Slobodni sumporni dioksid u mg/l dobiva se iz proizvoda  $6,4 \times n$ .

2. Određivanje ukupnog sumpornog dioksida: U slučaju pročišćenog ugušćenog mošta koristimo otopinu, dobivenu razrjeđivanjem uzorka do 40 % (m/v). U tikvicu A od 250 ml ulijemo 50 ml razrijeđenog uzorka i 5 ml fosfatne kiseline. Tikvicu A spojimo na aparaturu.



Vina i moštovi: Ako očekivana koncentracija ukupnog SO<sub>2</sub> u uzorku nije veća od 50 mg/l, stavimo 50 ml uzorka i 15 ml fosfatne kiseline u tikvicu A od 250 ml i spojimo na aparaturu. Ako je očekivana koncentracija ukupnog SO<sub>2</sub> u uzorku veća od 50 mg/l, stavimo 20 ml uzorka i 5 ml fosfatne kiseline u tikvicu A od 250 ml i spojimo na aparaturu. U tikvicu B stavimo 2 do 3 ml otopine vodikova peroksida, neutraliziramo. Vino u tikvici A zagrijemo do vrenja pomoću plamena visine od 4 do 5 cm, koji izravno dotiče dno tikvice. Tikvicu ne smijemo staviti na metalnu ploču, već na disk otprilike 30 cm promjera rupom u sredini. Tako izbjegavamo pregrijavanje supstanci ekstrahiranih iz vina koje se talože na stjenke tikvice. Održavamo vrenje dok kroz aparaturu struji zrak (ili dušik). Unutar 15 minuta sav sumporni dioksid se oslobodi i oksidira. Nastalu sumpornu kiselinu titriramo sa 0,01 M otopinom natrijeva hidroksida. Utrošeni volumen za titraciju označimo sa n ml. (Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, Zakona o vinu »Narodne novine«, br. 96/03)

#### *Iskazivanje rezultata*

Moštovi i vina: ukupni sumporni dioksid iskazujemo u mg/l.

Pročišćeni ugušćeni mošt: ukupni sumporni dioksid iskazujemo u mg/kg ukupnih šećera.

#### *Izračunavanje:*

Vino: Ukupni sumporni dioksid u miligramima po litri:  $6,4 \times n$  (gdje koncentracija SO<sub>2</sub> u uzorku nije veća od 50 mg/l, a rabili smo 50 ml uzorka);  $16 \times n$  (gdje je koncentracija SO<sub>2</sub> u uzorku veća od 50 mg/l, a rabili smo 20 ml uzorka).

Pročišćeni ugušćeni moštovi: Ukupni sumporni dioksid u mg/kg ukupnih šećera je:  $\frac{1600 \times n}{P}$ ; gdje je P koncentracija ukupnih šećera (m/m),

2. Ponovljivost (r): za 50 ml uzorka (koncentracija SO<sub>2</sub> u uzorku nije veća od 50 mg/l);  $r = 1$  mg/l, za 20 ml uzorka (koncentracija SO<sub>2</sub> u uzorku je veća od 50 mg/l);  $r = 6$  mg/l,

3. Obnovljivost (R): za 50 ml uzorka (koncentracija SO<sub>2</sub> u uzorku nije veća od 50 mg/l);  $R = 9$  mg/l, za 20 ml uzorka (koncentracija SO<sub>2</sub> u uzorku je veća od 50 mg/l);  $R = 15$  mg/l. (Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, Zakona o vinu »Narodne novine«, br. 96/03)

## 2.10.2 Brza metoda

*Reagensi:* EDTA komplekson III: dinatrijeva sol etilendiamin tetra octena kiselina; 4M otopina natrijeva hidroksida, (160 g/l); sumporna kiselina ( $p_{20} = 1,84$  g/ml), razrijeđena 1:10 (v/v); otopina škroba 5 g/l, 0,025 M otopine joda. (Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, Zakona o vinu »Narodne novine«, br. 96/03)

*Aparatura:* tikvica od 500 ml, bireta, pipete od 1, 2, 5 i 50 ml.

*Postupak:*

1. Slobodni sumporni dioksid: U tikvicu od 500 ml dodamo: 50 ml vina, 5 ml otopine škroba, 30 mg EDTA komplekson III, 3 ml otopine sumporne kiseline, 1:10 (v/v). Titriramo s 0,025 M otopinom joda uz indikator škrob do plave boje koja se zadrži od 10 do 15 sekundi. Volumen utrošenog joda označimo sa  $n$ .

2. Ukupni sumporni dioksid: Dodamo 8 ml 4 M otopine natrijeva hidroksida, protresemo otopinu jednom i ostavimo da stoji 5 minuta. Miješajući energično dodajemo u istom mahu 10 ml sumporne kiseline 1 : 10 (v/v). Odmah titriramo sa 0,025 M joda. Volumen upotrebijene otopine joda označimo sa  $n'$  ml. Dodamo 20 ml 4 M otopine natrijeva hidroksida, protresemo i pustimo da odstoji 5 minuta. Razrijedimo s 200 ml ledene vode. Energično miješajući dodamo odjednom sadržaj epruvete u kojoj se nalazi 30 ml sumporne kiseline 1:10 (v/v). Titriramo slobodni sumporni dioksid sa 0,025 M joda. Upotrebijeni volumen otopine joda joda označimo sa  $n''$ . (Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, Zakona o vinu »Narodne novine«, br. 96/03)

*Iskazivanje rezultata*

Izračunavanje: Slobodni sumporni dioksid u miligramima po litri:  $32 \times n$ . Ukupni sumporni dioksid u miligramima po litri:  $32 \times (n + n' + n'')$ . (Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, Zakona o vinu »Narodne novine«, br. 96/03)

## 2.11 Određivanje limunske kiseline

### *Princip metode*

Limunska kiselina prevodi se u oksaloacetat i acetat u reakciji kataliziranoj citrat liazom (CL):

CL

citrat  $\longleftrightarrow$  oksaloacetat + acetat

U prisutnosti malat dehidrogenaze (MDH) i laktat dehidrogenaze (LDH), oksaloacetat i njegov produkt dekarboksilacije piruvat reduciraju se u L-malat i L-laktat pomoću reduciranog nikotinamid adenin dinukleotida (NADH):

MDH

oksalacetat + NADH + H<sup>+</sup>  $\longleftrightarrow$  L-malat + NAD<sup>+</sup>

LDH

piruvat + NADH + H<sup>+</sup>  $\longleftrightarrow$  L-laktat + NAD<sup>+</sup>

Količina NADH oksidiranog u NAD<sup>+</sup> u ovim reakcijama proporcionalna je količini prisutnog citrata. Oksidacija NADH mjeri se rezultirajućim padom apsorbancije pri valnoj duljini od 340 nm. (Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, Zakona o vinu »Narodne novine«, br. 96/03)

### *Reagensi:*

- Otopina pufera pH 7,8 (0,51 M otopina glicilglicina; pH 7,8; Zn<sup>2+</sup> (0,6 × 10<sup>-3</sup> M); 7,13 g glicilglicina otopimo u približno 70 ml redestilirane vode. Podesimo pH na 7,8 sa približno 13 ml 5 M otopine natrijeva hidroksida, dodamo 10 ml otopine cink klorida (80 mg ZnCl<sub>2</sub> u 100 ml H<sub>2</sub>O) i nadopunimo do 100 ml redestiliranom vodom.
- Otopina reduciranog nikotinamid adenin dinukleotida (NADH) (približno 6 × 10<sup>-3</sup> M): otopiti 30 mg NADH i 60 mg NaHCO<sub>3</sub> u 6 ml redestilirane vode.
- Otopina malat dehidrogenaze/laktat dehidrogenaze (MDH/LDH, 0,5 mg MDH/ml, 2,5 mg LDH/ml): pomiješamo zajedno 0,1 ml MDH (5 mg MDH/ml), 0,4 ml otopine amonij sulfata (3,2 M) i 0,5 ml LDH (5 mg/ml). Ova suspenzija ostaje stabilna najmanje jednu godinu pri 4° C.
- Citrat liaza (CL, 5 mg protein/ml): otopimo 168 mg liofilizata u 1 ml ledene vode. Ova otopina ostaje stabilna najmanje jedan tjedan pri 4° C ili najmanje četiri tjedna ako je smrznuta. Preporučuje se prije određivanja provjeriti aktivnost enzima.

– Polivinilpolipirrolidon (PVPP). (Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, Zakona o vinu »Narodne novine«, br. 96/03)

*Aparatura:* Spektrofotometar, koji omogućuje mjerenje pri 340 nm, valnoj duljini kod koje NADH ima najveću apsorbanciju. Umjesto toga može se primijeniti spektrofotometar s diskontinuiranim izvorom koji omogućava mjerenje kod 334 nm ili 365 nm. Staklene kivete od 1 cm. Mikropipete za dodavanje volumena od 0,02 do 2 ml. (Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, Zakona o vinu »Narodne novine«, br. 96/03)

*Priprema uzorka:* Određivanje citrata se obično provodi direktno u vinu bez prethodnog uklanjanja boje i bez razrjeđenja ukoliko je količina limunske kiseline manja od 400 mg/l. Prema potrebi napravimo razrjeđenje tako da je koncentracija citrata između 20 i 400 mg/l (tj. između 5 i 80 mg citrata u ispitivanom uzorku).

Kod crnih vina bogatih fenolnim spojevima preporučuje se prethodna priprema sa PVPP: Napravimo vodenu suspenziju od oko 0,2 g PVPP i ostavimo da stoji 15 minuta. Profiltriramo kroz nabrani filter. 10 ml vina sipamo u tikvicu od 50 ml, dodamo vlažni PVPP koji je s filtera uklonjen spatulom. Tresemo dvije do tri minute. Filtriramo. (Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, Zakona o vinu »Narodne novine«, br. 96/03)

#### *Postupak*

Na spektrofotometru podesimo apsorbanciju pri 340 nm, primjenom kiveta širine 1 cm, uz zrak kao slijepu probu (bez kivete u optičkom putu). Zatim u kivetu stavljamo kako slijedi:

	Referentna kiveta	Kiveta za uzorak
	(ml)	(ml)
Otopina 1	1,00	1,00
Otopina 2	0,10	0,10
Uzorak	–	0,20
Redestilirana voda	2,00	1,80

Otopina 3                              0,02                              0,02

Promućkamo, i nakon pet minuta očitamo apsorbanciju otopina u referentnoj kiveti i kiveti za uzorak (A1).

Dodamo:

Otopina 4                              0,02 ml                              0,02 ml

Promućkamo i pričekamo da se reakcija završi (oko pet minuta) i očitamo apsorbancije otopina u referentnoj kiveti i kiveti za uzorak (A2). Izračunamo razliku apsorbancija (A2 – A1) za referentnu kivetu i kivetu za uzorak,  $\Delta AR$  i  $\Delta AS$ . Na kraju, izračunamo razliku između ovih razlika:  $\Delta A = \Delta AS - \Delta AR$ . (Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, Zakona o vinu »Narodne novine«, br. 96/03)

*Iskazivanje rezultata:* Koncentracija limunske kiseline izražava se u miligramima po litri na najbliži cijeli broj.

#### 1. Izračunavanje

Opća formula za izračunavanje koncentracije u mg/l je:  $C = \frac{V \times M}{\epsilon \times d \times v} \times \Delta A$ ; gdje je: V = volumen otopine koja se analizira u ml (3,14 ml), v = volumen uzorka u ml (0,2 ml), M = molekulska masa tvari koju određujemo (za bezvodnu limunsku kiselinu M =192,1), d = optički put u kiveti u cm (1 cm),  $\epsilon$  = koeficijent apsorbancije NADH (kod 340 nm,  $\epsilon = 6,3 \text{ mmol}^{-1} \times 1 \times \text{cm}^{-1}$ ), tako da je:  $C = 479 \times \Delta A$ . Ako je uzorak prethodno razrijeđen rezultat pomnožimo s faktorom razrjeđenja.

2. Ponovljivost (r): Za koncentracije limunske kiseline manje od 400 mg/l: r = 14 mg/l; za koncentracije limunske kiseline veće od 400 mg/l: r = 28 mg/l.

3. Obnovljivost (R): Za koncentracije limunske kiseline manje od 400 mg/l; R = 39 mg/l, za koncentracije limunske kiseline veće od 400 mg/l; R = 65 mg/l. (Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina)

## 2.12 Određivanje ugljikovog dioksida

### 2.12.1 Princip metoda

#### 1. Referentna metoda

Mirna vina: Volumen vina uzet od uzorka ohladimo na oko 0° C i pomiješamo s dovoljnom količinom natrijeva hidroksida da se dobije pH vrijednost od 10 do 11. Titracija se provodi otopinom kiseline u prisustvu ugljikove anhidraze. Sadržaj ugljikovog dioksida izračuna se iz volumena kiseline potrebnog da se pH promijeni od 8,6 (hidrogenkarbonatni oblik) do 4,0 (ugljikova kiselina). Slijepa proba se provodi u istim uvjetima na dekarboniziranom vinu da bi se uzeo u obzir volumen otopine natrijeva hidroksida koji troše kiseline u vinu.

Pjenušava i biser vina: Uzorak vina koji se analizira ohladi se blizu točke smrzavanja. Nakon uzimanja količine koja će se upotrijebiti za slijepu probu nakon dekarbonizacije, ostatak u boci se prevede u alkalno tako da se sav ugljikov dioksid veže u obliku Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Provodi se titracija otopinom kiseline u prisustvu ugljikove anhidraze. Sadržaj ugljikovog dioksida izračuna se iz volumena kiseline potrebnog da se pH promijeni od 8,6 (hidrogenkarbonatni oblik) do 4,0 (ugljikova kiselina). Slijepa proba se provodi u istim uvjetima na dekarboniziranom vinu da bi se uzeo u obzir volumen otopine natrijeva hidroksida koji troše kiseline u vinu.

2. Uobičajena metoda:

Pjenušava i biser vina: Manometarska metoda: nadtlak ugljikova dioksida mjeri se direktno u boci pomoću afrometra. (Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, Zakona o vinu »Narodne novine«, br. 96/03)

### **2.12.2 Referentna metoda**

1. Mirna vina

*Aparatura:* Magnetska miješalica, pH metar.

*Reagensi:* Otopina natrijeva hidroksida (NaOH) 0,1 M, otopina sumporne kiseline (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 0,05M, otopina enzima ugljikove anhidraze, 1 g/l.

*Postupak:* Uzorak vina ohladimo na približno 0° C zajedno s pipetom od 10 ml za odmjeravanje. Stavimo 25 ml 0,1 M otopine natrijeva hidroksida u čašu od 100 ml; dodamo dvije kapi vodene otopine ugljikove anhidraze. Dodamo 10 ml vina pomoću pipete ohlađene na 0° C. Stavimo čašu na magnetsku miješalicu, namjestimo pH elektrodu i povremeno miješamo. Kad tekućina postigne sobnu temperaturu, polako titriramo 0,05 M otopinom

sumporne kiseline do pH 8,6. Zabilježimo očitavanje na bireti. Nastavimo titrirati sumpornom kiselinom do pH 4,0. Označimo sa  $n$  ml utrošene sumporne kiseline za titriranje između pH 8,6 i 4,0. Uklonimo CO<sub>2</sub> iz oko 50 ml uzorka vina mućkanjem u vakuumu oko tri minute, uz grijanje tikvice u vodenoj kupelji na oko 25° C. Gornji postupak ponovimo i na 10 ml dekarboniziranom vinu.  $nž$  ml je volumen utrošene 0,05 M sumporne kiseline.

*Iskazivanje rezultata:* 1 ml 0,05 otopine sumporne kiseline odgovara 4,4 mg CO<sub>2</sub>. Količina CO<sub>2</sub> u gramima po litri dana je formulom:  $0,44 \times (n - n')$ . Izražava se na dva decimalna mjesta. (Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, Zakona o vinu »Narodne novine«, br. 96/03)

## 2. Pjenušava i biser vina

*Aparatura:* Magnetska miješalica, pH metar.

*Reagensi:* Otopina natrijeva hidroksida (NaOH), 50 % (m/m), otopina sumporne kiseline (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 0,05 M, otopina enzima ugljične anhidraze, 1 g/l.

*Postupak:* Označimo nivo vina u boci te ga hladimo dok ne počne smrzavanje. Pustimo da se boca blago ugrije, protresemo je da kristali leda ne nestanu. Brzo uklonimo čep i stavimo 45 do 50 ml vina u odmjerni cilindar za slijepu probu. Točan volumen uzetoga vina,  $v$  ml, očitamo na cilindru kad vino postigne sobnu temperaturu. Odmah nakon što je uklonjen uzorak za slijepu probu, dodamo 20 ml otopine natrijeva hidroksida u bocu volumena 750 ml. Pričekamo da vino postigne sobnu temperaturu. U čašu od 100 ml stavimo 30 ml prokuhane destilirane vode i dvije kapi otopine ugljične anhidraze. Dodamo 10 ml vina koje je prethodno prevedeno u alkalno. Stavimo čašu na magnetsku miješalicu, namjestimo elektrodu i magnetni štapić uz umjereno miješanje. Titriramo otopinom sumporne kiseline do pH 8,6. Zabilježiti očitavanje na bireti. Nastavimo polako titrirati sumpornom kiselinom do pH 4,0. Neka je  $n$  ml utrošak kiseline za titriranje između pH 8,6 i 4,0. Uklonimo CO<sub>2</sub> iz  $v$  ml uzorka vina (koje smo uzeli za slijepu probu) mućkanjem u vakuumu oko tri minute, uz grijanje tikvice u vodenoj kupelji na oko 25 °C. Uzmemo 10 ml dekarboniziranog vina i dodamo 30 ml prokuhane destilirane vode, dodamo dvije do tri kapi otopine natrijeva hidroksida da se pH podesi na između 10 i 11. Zatim slijediti gornji postupak. Neka je  $nž$  ml dodani volumen 0,05 M otopine sumporne kiseline.

*Iskazivanje rezultata:* 1 ml 0,05 M otopine sumporne kiseline odgovara 4,4 mg CO<sub>2</sub>. Ispraznimo bocu vina koje je bilo prevedeno u alkalno i odredimo unutar 1 ml početni volumen vina tako da se boca ispuni vodom do oznake, i to je V ml. Količina CO<sub>2</sub> u gramima po litri dana je formulom:  $0,44 \times (n - n') \times \frac{(V - v + 20)}{V - v}$ . Rezultat se izražava na dva decimalna mjesta.

3. Iskazivanje rezultata: Nadtlak pri 20° C (Paph20) izražen u paskalima dan je formulom:

$$P_{aph20} = \frac{Q}{1,951 \times 10^{-5} (0,86 - 0,01A) \cdot (1 - 0,00144S)} - P_{atm}$$

gdje je: Q = količina CO<sub>2</sub> u g/l vina; A = alkoholna jakost vina pri 20° C; S = količina šećera u vinu u g/l; P<sub>atm</sub> = atmosferski tlak u paskalima. (Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, Zakona o vinu »Narodne novine«, br. 96/03)

### 2.12.3 Uobičajena metoda

1. Pjenušava i biser vina

*Aparatura:* Afrometar

*Postupak:* Mjerenja se moraju provoditi na bocama čija se temperatura stabilizirala najmanje 24 sata. Nakon što je čep probušen, boca se mora žestoko promućkati sve dok tlak na postane konstantan, tada se očitava.

*Iskazivanje rezultata:* Tlak pri 20° C (Paph20) izražava se u paskalima (Pa) ili kilopaskalima (kPa). Rezultat treba izraziti u obliku koji je sukladan preciznosti. Ako je temperatura pri kojoj je izvedeno mjerenje različita od 20° C mora se provesti korekcija množenjem izmjerene vrijednosti tlaka sa koeficijentom  $\frac{P_{aph20}}{P_{aph_t}}$ . (Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, Zakona o vinu »Narodne novine«, br. 96/03)

### 2.12.4 Odnos između tlaka i količine ugljikovog dioksida u biser vinu

Iz tlaka kod 20° C (Paph20) izračuna se apsolutni tlak kod 20° C (Pabs20) pomoću formule:

$$P_{abs20} = P_{atm} + P_{aph20}$$



Patm je atmosferski tlak izražen u barima

Količina ugljikovog dioksida u vinu dana je slijedećim odnosima:

– u litrama CO<sub>2</sub> po litri vina:  $0,987 \times 10^{-5} \times P_{abs20} \times (0,86 - 0,01 A) \times (1 - 0,00144 S)$

– u gramima CO<sub>2</sub> po litri vina:  $1,951 \times 10^{-5} \times P_{abs20} \times (0,86 - 0,01 A) \times (1 - 0,00144 S)$

gdje je: A = alkoholna jakost vina pri 20°C; S = količina šećera u g/l. (Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, Zakona o vinu »Narodne novine«, br. 96/03)

## 2.13 Određivanje šećera refraktometrom

*Princip metode:* Indeks loma pri 20° C, izražen kao apsolutna vrijednost ili kao maseni postotak saharoze, pomoću kojega se dobiva koncentracija šećera u gramima u litri i gramima na kilogram mošta, ugušćenog mošta i pročišćenog ugušćenog mošta. (Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, Zakona o vinu »Narodne novine«, br. 96/03)

*Aparatura:*

Abbe-ov refraktometar koji mora imati skale u: masenim postocima saharoze s podjelom od 0,1%; ili u indeksima loma na četiri decimalna mjesta.

Refraktometar mora imati termometar sa skalom najmanje od +15° C do +25° C s omogućenim cirkuliranjem vode koja osigurava mjerenje pri temperaturi 20° C ± 5° C. (Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, Zakona o vinu »Narodne novine«, br. 96/03)

*Priprava uzorka:*

– Mošt i ugušćeni mošt: Po potrebi, mošt se propusti kroz četverostruko presavijenu suhu gazu i nakon odbacivanja prvih kapi filtrata, nastavlja se određivanje filtriranog proizvoda.

– Pročišćeni ugušćeni mošt: Ovisno o koncentraciji, koristi se ili pročišćeni ugušćeni mošt ili otopina dobivena tako da se 200 g pročišćenog ugušćenog mošta razrijedi s vodom do 500 g, pri čemu sva vaganja moraju biti točno provedena.

*Postupak:* Uzorak temperirati na blizu 20° C. Staviti malu količinu uzorka na donju prizmu refraktometra, pri čemu treba paziti (jer su prizme čvrsto pričvršćene jedna na drugu) da

uzorak jednako pokriva staklenu površinu prizme. Mjerenje provesti sukladno uputama za uporabu aparata. Očitati maseni postotak saharoze unutar 0,1% ili indeks loma na četiri decimalna mjesta. Na istom uzorku napraviti najmanje dva određivanja. Zabilježiti temperaturu  $t$  °C. (Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, Zakona o vinu »Narodne novine«, br. 96/03)

*Izračun:*

#### 1. Korigiranje temperature

– Instrumenti sa skalom u masenim postocima saharoze: korigiranje temperature provesti pomoću tabele.

– Instrumenti sa skalom u indeksima loma: indeks loma mjeren pri  $t$ °C pronaći u tabeli da se dobije odgovarajuća vrijednost u masenim postocima saharoze pri  $t$ °C. Ova vrijednost je korigirana za temperaturu i izražena kao koncentracija pri 20° C.

#### 2. Koncentracija šećera u moštu i ugušćenom moštu

Pronaći maseni postotak saharoze pri 20°C u tabeli i iz istoga reda očitati koncentraciju šećera u gramima na litru i gramima na kilogram. Koncentracija šećera izražena je kao invertni šećer na jedno decimalno mjesto.

#### 3. Koncentracija šećera u pročišćenom ugušćenom moštu

Pronaći maseni postotak saharoze pri 20° C u tabeli i iz istoga reda očita se koncentracija šećera u gramima na litru i gramima na kilogram. Koncentracija šećera izražena je kao invertni šećer na jedno decimalno mjesto. Ako se mjerenje provodi na razrijeđenom pročišćenom ugušćenom moštu, rezultat se množi s faktorom razrjeđenja.

#### 4. Indeks loma mošta, ugušćenog mošta i pročišćenog ugušćenog mošta

Pronaći maseni postotak saharoze pri 20° C u tabeli i iz istoga reda pročitati se indeks loma pri 20° C na četiri decimalna mjesta. (Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, Zakona o vinu »Narodne novine«, br. 96/03)

### 3.ZAKLJUČAK

Metode određivanja parametara kakvoće vina koje su opisane u ovom završnom radu su:

- gustoća i relativna gustoća pri 20° C - gustoća je masa vina ili mošta po jedinici volumena pri temperaturi od 20° C.
- alkoholna jakost - alkoholna jakost izražena volumenom je broj litara etanola sadržanog u 100 litara vina, a oba volumena mjerena pri temperaturi od 20 °C.
- ukupni suhi ekstrakt - ukupan suhi ekstrakt ili ukupna suha tvar uključuje sve tvari koje nisu hlapive pod specifičnim fizičkim uvjetima.
- reducirajući šećeri - reducirajući šećeri su svi šećeri, koji imaju keto ili aldehidne funkcionalne skupine.
- pepo - sadržaj pepela definiran je kao ukupnost svih produkata koji ostaju nakon žarenja taloga preostalog od isparavanja vina.
- pH vrijednost - mjerimo razliku u potencijalu između dviju elektroda uronjenih u ispitivanu tekućinu.
- ukupna kiselost–ukupna kiselost vina je suma njegovih titrabilnih kiselina kad ga se titrira do pH 7 sa standardnom alkalnom otopinom.
- hlapiva kiselost–hlapiva kiselost predstavlja homologe octene kiseline prisutnih u vinu u slobodnom obliku ili u obliku soli.
- nehlapiva kiselost–nehlapiva kiselost predstavlja razliku između ukupne i hlapive kiselosti.
- slobodni i ukupni sumporni dioksid–Slobodni sumporni dioksid definiran je kao sumporni dioksid koji je prisutan u moštu ili vinu u sljedećim oblicima:  $H_2SO_3$ ,  $HSO_3^-$ .
- limunska kiselina
- ugljikov dioksid
- određivanje šećera refraktometrom

## 4.LITERATURA

Pravilnikom o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina(»Narodne novine«, br. 96/03)

Web 1: <http://www.zakon.hr/z/277/Zakon-o-vinu>[29.8.2015]

Web 2: <http://vinopedia.hr/wiki/index.php?title=vino>[29.8.2015]