

Validacija metode za određivanje slobodnog sumporovog dioksida u vinu primjenom analizatora kontinuiranog protoka

Dizdar, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:978725>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-16**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, travanj 2023.

Lucija Dizdar

**VALIDACIJA METODE ZA
ODREĐIVANJE SLOBODNOG
SUMPOROVOG DIOKSIDA U
VINU PRIMJENOM
ANALIZATORA
KONTINUIRANOG PROTOKA**

Rad je izrađen pod mentorstvom prof. dr. sc. Mare Banović (Prehrambeno-biotehnološki fakultet), u Odjelu za fizikalno kemijska ispitivanja, u Hrvatskoj agenciji za poljoprivredu i hranu, Centra za vinogradarstvo, vinarstvo i uljarstvo pod vodstvom dr. sc. Renate Leder te uz pomoć mr. sc. Andreje Strelec Dučak.

ZAHVALA

Veliko hvala mojoj mentorici prof. dr. sc. Mari Banović za svu pomoć kod izrade diplomskog rada te na svim savjetima, riječima podrške i razumijevanju.

Puno hvala dr. sc. Renati Leder i mr. sc. Andreji Strelec Dučak iz Centra za vinogradarstvo, vinarstvo i uljarstvo što su mi omogućile izradu eksperimentalnog dijela rada u njihovoj instituciji te na pomoći i potpori kod izvedbe eksperimentalnog dijela.

Hvala mojoj obitelji što mi je tijekom cijelog studija bila izvor najveće potpore i utjehe kada je bilo potrebno.

Želim zahvaliti i dečku Pavlu te svojim prijateljicama i prijateljima koji su također cijelo ovo vrijeme bili uz mene.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju i analitiku vina

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Prehrambeno inženjerstvo

VALIDACIJA METODE ZA ODREĐIVANJE SLOBODNOG SUMPOROVOG DIOKSIDA U VINU PRIMJENOM ANALIZATORA KONTINUIRANOG PROTOKA

Lucija Dizdar, univ. bacc. ing. techn. aliment. 0058208637

Sažetak: Sumporov dioksid nalazi svoju primjenu u proizvodnji vina od 17. stoljeća. Njegova antimikrobna svojstva očituju se u antifungalnom i antibakterijskom djelovanju. Kao antioksidacijsko sredstvo SO₂ sprječava enzimске i neenzimske oksidacije. Adekvatna alternativa za SO₂ i dalje nije pronađena, ali kombinacijom sumporenja s tehnikama kao što su primjena pulsirajućeg električnog polja, visokog hidrostatskog tlaka i ultrazvuka visoke snage moguće je postići odgovarajući konzervirajući učinak uz manji dodatak SO₂. Slobodni SO₂ u vinu moguće je odrediti klasičnim metodama po Frantz Paulu i Ripperu, ali i instrumentalnim tehnikama kao što su analiza kontinuiranog protoka, analiza protoka ubrizgavanja i sekvencijska injekcijska analiza koje omogućuju brzu analizu velikog broja uzoraka. Cilj ovog rada bio je validirati metodu za određivanje slobodnog SO₂ u vinu primjenom analizatora kontinuiranog protoka (engl. *continuous flow analysis, CFA*). Definirani parametri validacije (linearnost, točnost, preciznost, ponovljivost, LOD, LOQ i raspon) udovoljili su zadanim kriterijima, čime se uzvrđuje prikladnost metode za dano područje mjerenja.

Ključne riječi: vino, sumporov dioksid, validacija, CFA (*continuous flow analysis*), metoda po Frantz Paulu

Rad sadrži: 51 stranicu, 17 slika, 7 tablica, 62 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: prof. dr. sc. Mara Banović

Pomoć pri izradi: dr. sc. Renata Leder i mr. sc. Andreja Strelec Dučak

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. doc. dr. sc. Marina Tomašević (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Mara Banović (mentor)
3. dr. sc. Ivana Vladimira Petric, znan. sur., HAPIH (član)
4. prof. dr. sc. Vlatka Petravić Tominac (zamjenski član)

Datum obrane: 4. svibnja 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Engineering
Laboratory for Technology and Analysis of Wine

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

Graduate university study programme: Food Engineering

METHOD VALIDATION FOR DETERMINING FREE SULFUR DIOXIDE IN WINE USING THE CONTINUOUS FLOW ANALYZER

Lucija Dizdar, univ. bacc. ing. techn. aliment. 0058208637

Abstract: Sulfur dioxide has been used in wine production since the 17th century. Its antimicrobial properties are manifested in antifungal and antibacterial effects. As an antioxidant, SO₂ prevents enzymatic and non-enzymatic oxidations. An adequate alternative for SO₂ has not yet been found, but by combining sulfurization with techniques such as pulsed electric field, high hydrostatic pressure or high power ultrasound, it is possible to achieve an adequate preservation effect with a smaller addition of SO₂. Free SO₂ in wine can be determined by classical methods (according to Frantz Paul or Ripper), but also by instrumental techniques such as continuous flow analysis, flow injection analysis or segmented injection analysis that enable rapid analysis of many samples. The aim of this paper was to validate a method for determining free SO₂ in wine using continuous flow analysis (CFA). Defined validation parameters (linearity, accuracy, precision, repeatability, LOD, LOQ and range) met the given criteria and it can be concluded that the method is suitable for given measurement area.

Keywords: wine, sulfur dioxide, validation, continuous flow analysis (CFA), Frantz Paul method

Thesis contains: 51 pages, 17 figures, 7 tables, 62 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in: The Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: Mara Banović, PhD, Full professor

Technical support and assistance: Renata Leder, PhD; Andreja Strelec Dučak, M.Sc.

Reviewers:

1. Marina Tomašević, PhD, Assistant professor (president)
2. Mara Banović, PhD, Full professor (mentor)
3. Ivana Vladimira Petric, PhD, HAPIH (member)
4. Vlatka Petravić Tominac, PhD, Full professor (substitute)

Thesis defended: May 4th, 2023

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. SUMPOR I SUMPOROV DIOKSID	3
2.2. SUMPOROV DIOKSID U VINU	5
2.3. ANTIMIKROBNO DJELOVANJE.....	6
2.4. ANTIOKSIDACIJSKO DJELOVANJE	7
2.5. PRIMJENA SUMPORA U TEHNOLOGIJI VINA.....	8
2.6. ZAKONSKA REGULATIVA.....	10
2.7. NEDOSTACI PRIMJENE SUMPORA I POTENCIJALNE ZAMJENE	11
2.8. VALIDACIJA ANALITIČKIH METODA.....	14
2.8.1. Razlozi za validaciju.....	14
2.8.2. Preduvjeti za validaciju	15
2.8.3. Koraci validacije	15
2.8.4. Parametri validacije	17
2.8.4.1. Selektivnost.....	17
2.8.4.2. Linearnost.....	17
2.8.4.3. Točnost/Istinitost.....	17
2.8.4.4. Preciznost	18
2.8.4.5. Granica detekcije (LOD – limit of detection)	18
2.8.4.6. Granica kvantifikacije (LOQ – limit of quantification)	19
2.8.4.7. Radno područje	19
2.8.4.8. Robusnost.....	19
3. EKSPERIMENTALNI DIO	20
3.1. MATERIJALI	20
3.2. ODREĐIVANJE SLOBODNOG SUMPOROVOG DIOKSIDA U VINU I VOĆNOM VINU OIV METODOM PO FRANTZ-PAULU	20
3.3. ODREĐIVANJE SLOBODNOG SUMPOROVOG DIOKSIDA S CFA/SFA ANALIZATOROM FLOWSYS	23
3.4. PARAMETRI VALIDACIJE	27
4. REZULTATI I RASPRAVA	28
4.1. LINEARNOST.....	28
4.1.1. Koeficijent korelacije (r).....	30
4.2. TOČNOST	30
4.2.1. Koeficijent korelacije (r).....	30

4.2.2.	Apsolutno i relativno odstupanje (bias).....	32
4.2.3.	Bland-Altmanov dijagram.....	33
4.2.4.	Z – vrijednost	34
4.3.	PRECIZNOST I PONOVLJIVOST	35
4.3.1.	Preciznost (RSD).....	35
4.3.2.	Ponovljivost (R)	39
4.4.	GRANICA DETEKCIJE (LOD) I GRANICA KVANTIFIKACIJE (LOQ).....	40
4.4.1.	Granica detekcije (LOD).....	42
4.4.2.	Granica kvantifikacije (LOQ).....	42
4.5.	RASPON	43
5.	ZAKLJUČCI.....	44
6.	LITERATURA.....	45

1. UVOD

Sumporov dioksid (SO₂) bezbojan je i nezapaljiv plin, intenzivnog i zagušujućeg mirisa, teži je od zraka i isparava pri temperaturi od -10 °C. Pod pritiskom je u tekućem stanju i lako je topljiv u vodi pri čemu tvori sumporastu kiselinu (H₂SO₃). Koristi se u proizvodnji kemikalija, metala i kao konzervirajuće sredstvo u prehrambenim proizvodima. U proizvodnji vina nalazi primjenu još od 17. stoljeća. Kao antimikrobno sredstvo, SO₂ ulazi u stanice mikroorganizama i remeti aktivnost njihovih staničnih enzima i proteina. Njegovo antimikrobno djelovanje očituje se u antifungalnom djelovanju na kvasce, osobito na kvasce roda *Brettanomyces* te antibakterijskom djelovanju, osobito na bakterije rodova *Acetobacter*, *Lactobacillus* i *Pediococcus*. Kao antioksidacijsko sredstvo, SO₂ sprječava reakcije enzimske oksidacije inhibicijom i inaktivacijom oksidaza (uzrokuju enzimsko posmeđivanje) te reakcije neenzimske oksidacije koje mogu dovesti do stvaranja oksidacijskih produkata (npr. acetaldehid) i time nepoželjno utjecati na organoleptički karakter vina. Iako SO₂ u većini populacije ne uzrokuje značajne nuspojave, u osjetljivih pojedinaca može uzrokovati glavobolje, umor, astmu, angioedem, bolove u trbuhu i dr. Osim toga, SO₂ također može imati negativno djelovanje na organoleptički karakter vina jer proizvodi negativne, redukcijske arome. Zbog navedenih negativnih utjecaja na kvalitetu vina i ljudsko zdravlje, sve više istraživanja usmjereno je na pronalazak alternativnih metoda koje bi mogle potpuno zamijeniti ili smanjiti primjenu SO₂ u tehnologiji vina. Sve više pažnje se posvećuje netoplinskim tehnikama kao što su tehnologija visokog hidrostatskog tlaka (engl. *high hydrostatic pressure, HHP*), pulsirajućeg električnog polja (engl. *pulsed electric field, PEF*), ultrazvuka visoke snage (engl. *high power ultrasound, HPU*) te upotrebi prirodnih ekstrakata bogatih antioksidansima. Ipak, dosad nije utvrđena metoda kojom bi bilo moguće u potpunosti zamijeniti SO₂ i pritom osigurati odgovarajući antimikrobni i antioksidacijski učinak kroz duži vremenski period.

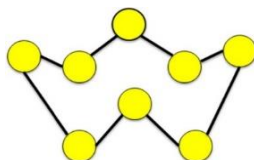
Validacija analitičke metode obuhvaća skup postupaka kojima se dokazuje prikladnost određenog analitičkog postupka za upotrebu. Cilj ovog rada bio je provesti validaciju metode za određivanje slobodnog SO₂ u vinu primjenom analizatora kontinuiranog protoka uz pomoć automatskog analizatora FLOWSYS. Analiza kontinuiranog protoka (engl. *continuous flow analysis, CFA*) također se naziva i analizom segmentiranog protoka (engl. *segmented flow analysis, SFA*), a temelji se na brzom uvođenju uzoraka u analitički sustav, pri čemu jedan uzorak nema utjecaja na sljedeći. Validacija metode provedena je usporedbom rezultata

dobivenih CFA metodom i referentnom OIV (fran. *Organisation Internationale de la vigne et du vin*, engl. *The International Organisation of Vine and Wine*) metodom po Frantz Paulu. Validacija CFA metode provedena je određivanjem slijedećih parametara: linearnost, točnost (istinitost), preciznost i ponovljivost, granice detekcije i kvantifikacije te raspon.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. SUMPOR I SUMPOROV DIOKSID

Sumpor je kemijski element oznake S i atomskog broja 16, pripada skupini nemetala i pri sobnoj temperaturi je krutina blijedožute boje, bez mirisa, netopljiva u vodi, ali topljiva u nepolaranom otapalu ugljikovom disulfidu (CS_2). Elementarni sumpor prisutan je u više alotropskih modifikacija kao što su α -S (ortorompski), β -S (monoklinski), S_2 , S_3 i prstenasti S_8 (slika 1), a najčešće je prisutan u obliku žutih kristala (slika 2) ili praha (slika 3). Naziv potječe iz latinske riječi *sulphurium* i sanskritskog *sulveri*. Komercijalno je dostupan sumpor visoke čistoće (preko 99,999 %). Amorfni oblik sumpora dobiva se brzim hlađenjem kristalnog oblika. U tablici 1 prikazana su osnovna svojstva sumpora. Najveći udio proizvedenog sumpora koristi se u proizvodnji sumporne kiseline (H_2SO_4), koja se primjenjuje za dobivanje gnojiva, baterija i u industrijskim procesima. Osim sumporne kiseline, sumpor tvori i druge spojeve kao što su sumporovodik (H_2S) i sumporov dioksid (SO_2) koji se koristi za izbjeljivanje, kao otapalo, dezinfekcijsko sredstvo te kao rashladno sredstvo. U reakciji s vodom, sumporov dioksid tvori sumporastu kiselinu (H_2SO_3). Sumpor je esencijalni element potreban svim živim bićima, važan je u tvorbi esencijanih aminokiselina potrebnih za izgradnju proteina, a također je sastavni dio nekih koenzima. (National Center for Biotechnology Information, 2022a; Royal Society of Chemistry, 2022).



Slika 1. Prstenasta struktura sumpora koja se sastoji od osam atoma sumpora (S_8)
(Gomathi Devi i ArunaKumari, 2014)



Slika 2. Sumpor u kristalnom obliku (Anonymous 1, 2016)

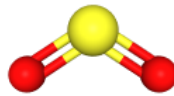


Slika 3. Sumpor u prahu (Anonymous 2, 2022)

Tablica 1. Osnovna svojstva sumpora (prema National Center for Biotechnology Information, 2022a)

SUMPOR (S)	
Atomski broj	16
Kemijska skupina	Nemetal
Agregacijsko stanje	Krutina
Atomska masa	32,07 u
Elektronska konfiguracija	[Ne]3s ² 3p ⁴
Oksidacijska stanja	+6, +4, -2
Elektronegativnost (po Paulingu)	2,58
Atomski radijus (van der Waals)	180 pm
Energija ionizacije	10,360 eV
Elektronski afinitet	2,077 Ev
Talište	388,36 K
Vrelište	717,75 K
Gustoća	2,067 g/cm ³
Otkriće	poznat od davnina

Sumporov dioksid je bezbojan i nezapaljiv plin intenzivnog, zagušujućeg mirisa čije udisanje može dovesti do iritacije sluznice. Teži je od zraka i isparava pri temperaturi -10 °C. Kemijska formula sumporovog dioksida je SO₂ (slika 4), a molarna masa iznosi 64,07 g/mol. Koristi se u proizvodnji kemikalija, metala i hrane. Pod pritiskom je u tekućem stanju i lako je topljiv u vodi pri čemu tvori sumporastu kiselinu (H₂SO₃). U zrak dospijeva izgaranjem ugljena i nafte u elektranama ili taljenjem bakra, ali i prirodnim putem uslijed vulkanskih erupcija. Sumporov dioksid u tekućem stanju dovodi do izrazite korozije željeza, mjedi i bakra. Metali kao što su željezo, čelik, nikal, legure bakra i nikla i inconel legure nikal-krom-željezo lako korodiraju djelovanjem sumporovog dioksida ispod točke rosišta ili djelovanjem tekućeg sumporovog dioksida, dok su relativno stabilni na koroziju uslijed djelovanja vrućeg i suhog sumporovog dioksida (National Center for Biotechnology Information, 2022b).



Slika 4. Model strukture sumporovog dioksida (National Center for Biotechnology Information, 2022c)

2.2. SUMPOROV DIOKSID U VINU

Sumporov dioksid i sulfiti primjenjuju se u proizvodnji vina od 17. stoljeća te su u njemu i dalje neizostavni aditiv zbog svojih nezamjenjivih svojstava. Sumporov dioksid djeluje kao jak nukleofil pri čemu tvori veze s aldehidima i drugim spojevima u vinu, djeluje antioksidacijski (kao reducirajući agens), inaktivira enzime koji dovode do enzimskog posmeđivanja te djeluje antimikrobno na velik broj nepoželjnih organizama (Waterhouse i sur., 2016). Sumporov dioksid uvijek je prisutan u vinu (bez obzira na to je li dodan tijekom proizvodnje vina ili nije) jer određena količina sumporovog dioksida (10 - 50 mg/L) (OIV, 2021) nastaje djelovanjem kvasaca kao međuprodukt redukcije sulfata do sulfita (Ribéreau-Gayon i sur., 2021).

Sumpor se u vinu javlja u obliku elementarnog sumpora, sulfida (sumporovodik i merkaptani) i sulfita (SO_2 i drugi oblici) (Kojić, 2019). Sulfiti se javljaju u obliku molekularnog SO_2 , bisulfita HSO_3^- i sulfita SO_3^{2-} (Waterhouse i sur., 2016).

SO_2 se nalazi u sastavu mošta ili vina i pritom se jedna njegova frakcija može kovalentno vezati i s drugim molekulama kao što su šećeri, aldehidi, ketoni ili antocijani (kod crnih vina). Ta frakcija naziva se vezanim SO_2 . Vezana molekula ne pruža zaštitu vinu, ali može doći do otpuštanja SO_2 i vezanja SO_2 s drugim molekulama. Najveći afinitet za SO_2 pokazuje acetaldehid i veza s acetaldehidom ima najveću stabilnost (De Azevedo i sur., 2007). Preostala frakcija naziva se slobodnim SO_2 . Frakciju slobodnog SO_2 čine molekularni SO_2 , bisulfit (HSO_3^-) i sulfit (SO_3^{2-}). Iako udio molekularnog SO_2 iznosi manje od 5 %, jedino on pokazuje senzorske i antimikrobne učinke. Slobodni i vezani SO_2 zajedno čine ukupni SO_2 . pH vrijednost vina kreće se u rasponu 3 - 4 i u tom području od slobodnih oblika SO_2 prevladava bisulfitni oblik (> 90 %), dok je u maloj količini prisutan molekularni SO_2 . Koncentracija sulfitnog oblika (SO_3^{2-}) pri navedenoj pH vrijednosti vina može se smatrati zanemarivom. Disocijacija SO_2 i tvorba bisulfita i sulfita odvija se prema reakciji:



Pri većoj temperaturi brža je disocijacija vezanog SO₂ i time se povećava koncentracija slobodnog SO₂, a pri nižoj temperaturi reakcija se pomiče u smjeru vezanja SO₂ s drugim sastojcima vina. Koncentracija ukupnog SO₂ i spojeva na koje se on može vezati najviše utječe na to hoće li u vinu biti prisutno više slobodnog ili vezanog oblika (Ribéreau-Gayon i sur., 2021). Dodatkom SO₂ u bijela vina dolazi do naglog porasta koncentracije vezanog SO₂ uz vrlo mali porast koncentracije slobodnog SO₂ što se može objasniti favoriziranom reakcijom vezanja slobodnog SO₂ na acetaldehid u stabilan kompleks. Kod dodatka većih koncentracija SO₂ odnos slobodnog i vezanog SO₂ bliži je ravnoteži jer su zasićene sve veze s acetaldehidom, a preostale su slabe veze s drugim sastojcima vina čije su reakcije reverzibilne (Burroughs i Sparks, 1973).

Tijekom skladištenja vina dolazi do gubitka SO₂ uslijed izloženosti vina kisiku iz zraka zaostalog u spremniku. Ukoliko je vino skladišteno u podrumima s nižom temperaturom i ukoliko su spremnici zatvoreni i maksimalno napunjeni, gubici će biti oko 5 mg/L slobodnog SO₂ mjesečno. Ako je pak prisutna viša temperatura i puno otpražnjelog prostora u spremnicima koji nisu adekvatno zatvoreni, gubici SO₂ se značajno povećavaju (20 mg/L ili više) (Danilewicz, 2016).

2.3. ANTIMIKROBNO DJELOVANJE

Antimikrobno (antiseptičko) djelovanje SO₂ podrazumijeva njegovo antifungalno djelovanje na kvasce te antibakterijsko djelovanje na bakterije, osobito bakterije mliječne kiseline. SO₂ djeluje tako da ulazi u stanice nepoželjnih mikroorganizama i remeti aktivnost njihovih staničnih enzima i proteina (Henderson, 2014).

Djelovanjem na kvasce SO₂ zaustavlja fermentaciju slatkih vina tako da uspješno eliminira prisutne kvasce, a također štiti vino od potencijalne refermentacije. Vezani SO₂ ne pokazuje utjecaj na kvasce. Kvasci se međusobno razlikuju po osjetljivosti na SO₂. Divlji kvasci prisutni na grožđu ili u vinariji pokazuju izrazitu osjetljivost na SO₂ i alkohol. Divlji kvasci započinju spontanu fermentaciju, ali njihov rast ubrzo inhibira alkohol nastao tijekom fermentacije. Selekcionirani kvasci roda *Saccharomyces* koji se dodaju kako bi pokrenuli fermentaciju otporniji su na SO₂ od divljih kvasaca. Divlji kvasci mogu prouzročiti stvaranje nepoželjnih aroma pa je preporuka da se u mošt doda mala količina SO₂, a zatim inokulira selekcionirani vinski kvasac *Saccharomyces*. Doza molekularnog SO₂ od 0,4 ppm (20 ppm slobodnog SO₂) pri pH 3,5 uspješno će djelovati na divlje kvasce, a da pritom neće utjecati na kvasce roda *Saccharomyces*. Kvasci roda *Brettanomyces* mogu rasti u vinu bez prisutnosti kisika i uglavnom

su prisutni u crnim vinima višeg pH. U velikim količinama proizvode nepoželjnu aromu koja se opisuje kao miris „po konju“ ili „po konjskom znoju“. SO₂ uspješno inhibira rast kvasaca roda *Brettanomyces*, ali ih ne može uništiti. Tipično je da pri visokom pH i niskim koncentracijama SO₂ djeluje kao fungistatik (inhibira rast kvasaca, ali ih ne ubija) dok pri nižem pH i visokim koncentracijama djeluje kao fungicid (Ribéreau-Gayon i sur., 2021; Henderson, 2014).

Kao antibakterijsko sredstvo SO₂ djeluje na bakterije mliječne i octene kiseline. Rod *Acetobacter* pripada bakterijama octene kiseline koje rastu u prisutnosti kisika i nepoželjno utječe na aromu vina dajući mu kiselkastu aromu po octu. Podnosi relativno visoke koncentracije SO₂ (Ribéreau-Gayon i sur., 2021; Henderson, 2014).

Rodovi *Lactobacillus* i *Pediococcus* pripadaju bakterijama mliječne kiseline i sudjeluju u malolaktičkoj (jabučno-mliječnoj) fermentaciji vina. Malolaktička fermentacija vina je sekundarna fermentacija uslijed koje bakterije mliječne kiseline prevode jabučnu kiselinu u mliječnu. Pritom se smanjuje kiselost i poboljšava okus vina. Iako malolaktička fermentacija ima svoje pozitivne strane, može dovesti i do pojave nepoželjne „maslačne“ arome, osobito u bijelim vinima. Pravovremenim dodatkom SO₂ spriječit će se te nepoželjne pojave. Bakterije roda *Lactobacillus* uglavnom se pojavljuju u crnom vinu veće pH vrijednosti u kojem je došlo do prekida fermentacije, a za rast koriste neprevreli šećer. Tretman sa SO₂ neće se pokazati izrazito učinkovit za njihovo suzbijanje zbog visokog pH. Bakterije roda *Pediococcus* proizvode arome koje se opisuju kao „biljne“ ili „arome koje podsjećaju na znojne čarape“ („dirty socks“) i najčešće se javljaju u vinskih podrumima u nečistim bačvama. Za provođenje malolaktičke fermentacije najpoželjnije su bakterije mliječne kiseline vrste *Oenococcus oeni*. One su osjetljivije na SO₂ nego što su to bakterije iz roda *Lactobacillus* i *Pediococcus* i njihov rast je otežan već kod koncentracije 25 ppm ukupnog SO₂ (Ribéreau-Gayon i sur., 2021; Henderson, 2014).

2.4. ANTIOKSIDACIJSKO DJELOVANJE

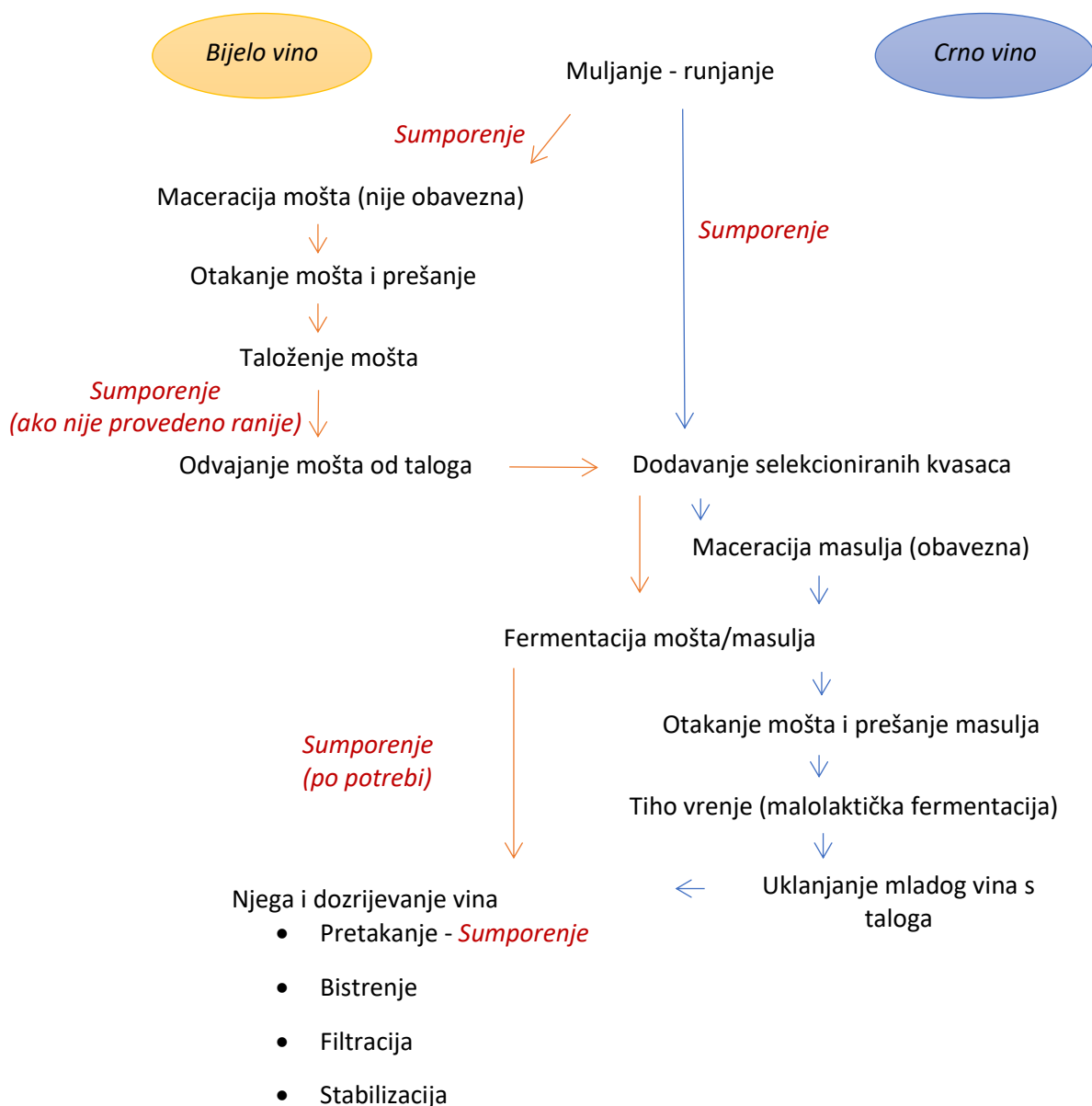
Oksidacijske reakcije u vinu mogu se podijeliti na enzimске i neenzimске oksidacije. Neenzimске oksidacije također se nazivaju i kemijske oksidacije, tijekom kojih dolazi do oksidacije polifenolnih spojeva (Oliveira i sur., 2011). Uslijed katalitičkog djelovanja metalnih iona željeza Fe(II) i bakra Cu(I), molekularni kisik prima elektrone i dolazi do nastanka hidroperoksil radikala (HO₂·). Nakon toga, kateholna skupina fenola podliježe oksidaciji u kinone (redukcijom Fe(III)), dok se hidroperoksilni radikal reducira do vodikovog peroksida

H_2O_2 (oksidacijom Fe(II)). Ukoliko SO_2 nije prisutan doći će do transformacije H_2O_2 u $\text{HO}\cdot$, izrazito reaktivan radikal odgovoran za pretvorbu etanola u acetaldehid (Ugliano, 2013). Acetaldehid je jedan od glavnih produkata reakcija oksidacije tijekom vinifikacije, a nositelj je arome jabuke, orašastih plodova te zelene trave koje se percipiraju kao nepoželjne (Zea i sur., 2015). SO_2 djeluje na način da reagira s H_2O_2 , reducira ga u H_2O , a pritom se oksidira u sulfat (SO_4^{2-}). SO_2 može reagirati s kinonima pri čemu ih može reducirati u katehole ili tvoriti sulfonate. Vezanjem SO_2 na prekursore oksidacijskih reakcija onemogućena je reakcija tih spojeva s kisikom (Ugliano, 2013). Ukoliko je već došlo do oksidacije i stvaranja oksidacijskih produkata (kao što je acetaldehid), vezanjem sumporovog dioksida na oksidacijske produkte bit će umanjen njihov nepoželjan utjecaj na organoleptička svojstva vina (Jackowetz i sur., 2011). Zato se može reći da u pogledu antioksidacijske aktivnosti SO_2 ima preventivno djelovanje, ali i terapijsko djelovanje ukoliko je već došlo do oksidacije i nastanka produkata oksidacije (Kojić, 2019).

SO_2 može djelovati antioksidacijski tako da inhibira ili inaktivira oksidaze, tj. da sprječava enzimsku oksidaciju. Enzimsku oksidaciju u moštu dovest će do nepoželjnih reakcija enzimskog posmeđivanja. Mehanizam oksidaza uključuje hidroksilaciju na *o*-poziciji uz već postojeću hidroksilnu skupinu fenolne tvari (aktivnost monofenol oksidaze) i oksidaciju *o*-dihidroksibenzena u *o*-benzokinone (aktivnost difenol oksidaze). SO_2 inhibira enzime tirozinazu i lakazu, glavne fenoloksidaze odgovorne za pojavu enzimskog posmeđivanja u moštu (Oliveira i sur., 2011). Antioksidacijsko djelovanje na enzime izrazito je važno u moštu, prije početka fermentacije, kada se enzimsku oksidaciju odvijaju izrazito brzo u odnosu na kemijske oksidacije. Nakon fermentacije u vinu više nisu prisutni oksidacijski enzimi (Ribéreau-Gayon i sur., 2021).

2.5. PRIMJENA SUMPORA U TEHNOLOGIJI VINA

U tehnologiji vina, sumpor se dodaje tijekom prerade grožđa, fermentacije te tijekom perioda njege i dozrijevanja vina. Na slici 5 shematski je prikazan proces proizvodnje bijelih i crnih vina, a pritom su istaknute faze u kojima se obavezno ili po potrebi provodi sumporenje (Tomas i Kolovrat, 2014).



Slika 5. Shematski prikaz proizvodnje bijelog i crnog vina (prema Tomas i Kolovrat, 2014).

Sumpor se u tehnologiji vina može koristiti u različitim oblicima; kao sumporne trake ili vrpce (pale se), u tekućem obliku, u plinovitom obliku te u obliku čvrstih soli koje oslobađaju SO₂ (Giacosa i sur., 2019).

Ukoliko se drvene bačve neće odmah koristiti u njih se unose sumporne trake ili vrpce koje se pale (važno je da su bačve prije toga dobro oprane i osušene). Sumporne trake je potrebno ponovno primijeniti svakih 5 - 6 tjedana (Tomas i Kolovrat, 2014).

Korištenje SO₂ u tekućem obliku može se provesti doziranjem iz spremnika pod tlakom 2 - 5 bara (ovisno o temperaturi) ili primjenom vodenih otopina soli koje oslobađaju SO₂. Vaganjem

spremnika mjeri se količina ispuštene tekućine. Ovaj oblik upotrebe primjeren je za veće proizvođače u vinarijama koje imaju sofisticirane sustave mjerenja. Vodene otopine SO₂ (5 - 10 %) omogućavaju optimalno miješanje, imaju zadovoljavajuću čistoću i jednostavne su za rukovanje, ali mogu djelovati agresivno na opremu i radnike te je potrebno koristiti odgovarajuću zaštitu. Također, imaju oporu aromu i kemijski su nestabilne. Zato se u srednjim i manjim podrumima za sumporenje uglavnom koriste vodene otopine soli koje oslobađaju SO₂, primjerice otopina kalijeva hidrogensulfita (KHSO₃). Takve otopine imaju blažu aromu, kemijski su stabilnije, ali imaju veću gustoću pa ih je potrebno dobro promiješati s vinom. Prije nego što započne proces fermentacije može se sumporiti otopinom amonijeva hidrogensulfita (NH₄HSO₃), odnosno amonijeva bisulfita. Njegovim dodatkom unosi se i oko 22 % dušika koji pogoduje razvoju kvasaca. Amonijev bisulfit dodaje se isključivo prije početka fermentacije, jer bi se njegovim naknadnim dodatkom u vino mogla narušiti mikrobiološka stabilnost i sigurnost vina (Giacosa i sur., 2019).

Korištenje SO₂ kao plina također se može provesti doziranjem iz spremnika pod tlakom. U plinovitom obliku SO₂ je pogodan za dezinfekciju spremnika (umjesto sumpornih traka), ali zahtijeva odgovarajuće mjere opreza kako bi se zaštitile osobe u podrumu (Giacosa i sur., 2019).

Za sumporenje se često primjenjuju i krute soli koje oslobađaju SO₂ iz razloga što omogućavaju precizno doziranje, ne zahtijevaju dodatak vode i stabilne su ukoliko se skladište na ispravan način. Najčešće se primjenjuje kalijev metabisulfit (K₂S₂O₅) koji se također naziva i vinobran, a sadrži oko 50 % SO₂ (Giacosa i sur., 2019).

2.6. ZAKONSKA REGULATIVA

Pravilnik o vinarstvu (2022) poziva se na Uredbu Komisije (2009) kojom je definiran najveći sadržaj SO₂ u vinima prilikom stavljanja u promet. Prema Uredbi, koncentracija SO₂ prilikom stavljanja vina u promet može iznositi najviše 150 mg/L za crna vina i 200 mg/L za bijela i rose vina (ova točka ne obuhvaća pjenušava i likerska vina). Kada sadržaj šećera (zbroy glukoze i fruktoze) iznosi barem 5 g/L tada se ta granica se povećava na 200 mg/L za crna vina i 250 mg/L za bijela i rose vina, ali se može povećati i do 400 mg/L ukoliko vino ispunjava određene uvjete definirane uredbom. U likerskim vinima najviša dopuštena koncentracija SO₂ iznosi 150 mg/L ako je sadržaj šećera manji od 5 g/L, odnosno 200 mg/L ako je sadržaj šećera veći od 5 g/L. U pjenušavim vinima najveća dopuštena koncentracija SO₂ iznosi 185 mg/L za kvalitetna pjenušava vina i 235 mg/L za ostale kategorije. U slučaju pjenušavih vina moguće je u nekim

vinorodnim područjima odobriti povećanje najviše dopuštene količine SO₂ (do 40 mg/L) ako se utvrdi da je to potrebno (pod uvjetom da se ta vina ne isporučuju izvan odnosne države članice).

2.7. NEDOSTACI PRIMJENE SUMPORA I POTENCIJALNE ZAMJENE

Nuspojave kod pojedinaca osjetljivih na SO₂ mogu biti glavobolja, umor, astma, angioedem, anafilaksija, bolovi u trbuhu, proljev i bronhokonstrikcija (Guerrero i Cantos-Villar, 2015; Vally i Thompson, 2003; 2001), dok su kod većine populacije nuspojave rijetke. Neka istraživanja utvrdila su da SO₂ i sulfiti mogu izazvati aktivaciju protoonkogeni i inaktivaciju tumorsupresorskih gena te dovesti do patogeneze raka pluća (Qin i Meng, 2009). Dio stručnjaka smatra da je mišljenje da SO₂ uzrokuje glavobolju nedostatan jer su sulfiti osim u vinu prisutni u većim koncentracijama u drugim prehrambenim proizvodima čija se konzumacija ne povezuje s glavoboljom (npr. sušeno voće sadrži do 1000 ppm sulfita dok crno i bijelo vino sadrže 60, odnosno 210 ppm) (Gorman-McAdams, 2009).

Osim utjecaja na zdravstveno stanje, sumpor također može imati negativno djelovanje na organoleptička svojstva vina jer proizvodi negativne, redukcijske arome. Za takve arome uglavnom su odgovorni hlapljivi sumporni spojevi. Među njima je najzastupljeniji sumporovodik (H₂S), zatim metantiole (MeSH) i etantiole (EtSH) (Kreitman i sur., 2018). Sumporovodik najčešće nastaje djelovanjem kvasca *Saccharomyces cerevisiae* tijekom alkoholne fermentacije redukcijom iz sulfata (pojavljuju se u moštu), sulfita (dodani zbog antioksidacijskih i antimikrobnih svojstava) te elementarnog sumpora (fungicid u vinogradima) (Jiranek i sur., 1995; Rauhut i Kürbel, 1994). Hlapljivi sumporni spojevi nastaju i tijekom enzimske ili kemijske razgradnje aminokiselina cisteina i metionina, koje sadrže sumpor (Muller i Rauhut, 2018). Karakterističan miris povezan s povećanom koncentracijom H₂S opisuje se kao „miris po trulim jajima“. Iz H₂S mogu se razviti i drugi nepoželjni spojevi arome, merkaptani, čije arome podsjećaju na češnjak i kupus (Coetzee i sur., 2016).

Uz odgovarajuće alternative, moguće je smanjiti primjenu SO₂ ili zamijeniti SO₂ s drugim agensima koje će vinu dati odgovarajuću antioksidacijsku stabilnost i antimikrobnu zaštitu. Isto tako, primjenom tih alternativa vino će biti prirodnijeg okusa i nuspojave izazvane prevelikim dozama SO₂ bit će eliminirane (Yıldırım i Darıcı, 2020).

U proizvodnji vina moguće je primijeniti toplinske procese kao što su pasterizacija i sterilizacija. Toplinski procesi pomažu u sprječavanju mikrobiološke kontaminacije, enzimskog posmeđivanja (inhibirajući lakazu i polifenol oksidazu) (Clarke i Bakker, 2011) te pomažu u

ekstrakciji antocijana (El Darra i sur., 2013). Ipak, tijekom duljeg trajanja tretmana pri 80 °C u vinu se može pojaviti okus po kuhanom (Rankine, 1973). Visoke temperature negativno djeluju na toplinski osjetljive polifenole i druge bioaktivne komponente podložne termalnoj degradaciji te na njihovu antioksidacijsku aktivnost (Rodríguez i sur., 2016; Može Bornšek i sur., 2015). Ipak, u kombinaciji s drugim alternativnim metodama, toplinske metode mogu biti poželjna zamjena za SO₂ (Lambri i sur., 2015).

Tijekom zadnjih 20 godina netopliniski procesi zauzimaju sve veću važnost kao alternativa sumporovu dioksidu. Glavna prednost netoplinskih tehnika u odnosu na toplinske je ta što one nemaju značajan utjecaj na aromu vina. Od netoplinskih tehnika često se u obradi vina i mošta primjenjuje visoki hidrostatski tlak (HHP). Neka istraživanja dokazala su da tretiranje HHP-metodom može dovesti do promjene boje crnih vina i smanjenja sadržaja fenolnih spojeva (Tao i sur., 2012). Iz tog razloga preporuka je da se HHP primjenjuje kod proizvodnje vina koja se konzumiraju mlađa. Prema istraživanju Christofi i sur. (2020) tehnologija HHP učinkovita je ukoliko se koristi zajedno s SO₂ (> 60 mg/L SO₂) jer se na taj način dodatno pospješuje antimikrobno i antioksidacijsko djelovanje SO₂. Primjena tehnologije HHP kod vina koja sadrže < 60 mg/L SO₂ nije adekvatna i takva vina percipiraju se kao manje aromatična, više oksidirana i bit će pojačan intenzitet arome „po suhom voću“. HHP učinkovito djeluje i na kvasac *Brettanomyces bruxellensis* (200 MPa, 3 min) pri čemu se populacija ovog kvasca smanjuje za 10³ - 10⁶ puta ovisno o udjelu alkohola u vinu (van Wyk i Silva, 2017).

Od ostalih netoplinskih tehnika, kao zamjena za SO₂ mogu se primjenjivati pulsirajuće električno polje (PEF), ultrazvuk visoke snage (HPU), ultraljubičasto zračenje i dr. (Yıldırım i Darıcı, 2020). Lukić i sur. (2019) proučavali su utjecaj primjene HHP i HPU na koncentraciju slobodnog SO₂, ukupnog SO₂ i otopljenog kisika u bijelom i crnom vinu neposredno nakon tretmana navedenim tehnikama. Isto tako, istražen je i učinak primjene navedenih tehnika zajedno s antioksidansima (SO₂ i glutation) tijekom 12 mjeseci skladištenja vina u boci. Neposredno nakon HHP-tretmana nije došlo do promjene koncentracije SO₂, dok nakon tretmana HPU-tretmana nije bio jasno vidljiv trend u ispitivanim parametrima. Nakon tretmana primjenom HHP i HPU, došlo je do blagog porasta koncentracije otopljenog kisika (najveći porast kod primjene HPU). Tijekom starenja došlo je do smanjenja koncentracije slobodnog i ukupnog SO₂ te koncentracije otopljenog kisika. Dodatkom SO₂ postignuto je bolje antioksidacijsko djelovanje nego dodatkom glutationa (veći dodatak SO₂ - manja koncentracija otopljenog kisika u vinu). Van Wyk i sur. (2018) proučavali su utjecaj tehnologija visokog tlaka

(engl. *high pressure processing*, *HPP*) i pulsirajućeg električnog polja na senzorske karakteristike vina, inaktivaciju kvasca *Brettanomyces* i ostale parametre kvalitete tijekom jedne godine skladištenja. Nakon godinu dana, nije došlo do pojave značajnih razlika u senzorskim karakteristikama vina tretiranih HPP i PEF u odnosu na netretirana vina. HPP se pokazala kao uspješna tehnologija za inaktivaciju kvasca *B. bruxellensis* i njenom primjenom sprječava se stvaranje hlapljivih fenola odgovornih za nastanak nepoželjnih *Brettanomyces* aroma. Ipak, kako bi se očuvala kvaliteta HPP vina kroz duži vremenski period (više od 6 mjeseci), neophodan je dodatak SO₂.

Antibakterijsko djelovanje može se postići primjenom aditiva kao što je npr. enzim lizozim koji kontrolira bakterije mliječne kiseline, dok se antifungalno djelovanje postiže upotrebom sorbinske kiseline, dimetil dikarbonata (DMDC) i polisaharida kitozana (Giacosa i sur., 2019). Hou i sur. (2020) predložili su upotrebu spoja α -pinena molekulske formule C₁₀H₁₆ (National Center for Biotechnology Information, 2022d) kao zamjenu za SO₂ u proizvodnji crnih vina. Dodavane su različite koncentracije α -pinena (0,125 %, 0,25 % i 0,5 %) kako bi se utvrdila optimalna koncentracija koja će omogućiti odgovarajuće antioksidacijsko djelovanje. Dodatak 0,125 % α -pinena može se potencijalno koristiti kao zamjena za SO₂ bez negativnih utjecaja na proizvodnju etanola i senzorske karakteristike. Ipak, potrebno je provesti dodatna istraživanja kako bi se ova zamjena mogla primjenjivati kod proizvodnje u velikim vinarijama.

U današnje vrijeme sve je veći interes potrošača za prehrambenim proizvodima koji sadrže prirodne sastojke umjesto onih koji sadrže kemijske konzervanse (Amato i sur., 2017). Tako su se kao zamjena za SO₂ u proizvodnji vina počeli koristiti prirodni biljni ekstrakti, bogati fenolnim spojevima (osobito flavonoidima) i njihovim derivatima, koji vinu osiguravaju odgovarajuća antioksidacijska i antimikrobna svojstva (Yıldırım i sur., 2015). Prirodni biljni ekstrakti koji se primjenjuju u proizvodnji vina mogu biti nusproizvodi proizvodnje vina (ekstrakti iz pokožice i sjemenki grožđa), ekstrakt hrasta, ekstrakt izdanaka vinove loze, ekstrakt eukaliptusa, esencijalno ulje timijana i dr. (Yıldırım i Darıcı, 2020). Hidroksitirozol je fenolni spoj molekulske formule C₈H₁₀O₃ s potencijalnim antioksidacijskim, antikancerogenim i protuupalnim svojstvima (National Center for Biotechnology Information, 2022e). Raposo i sur. (2016) istražili su na koji način primjena hidroksitirozola, kao zamjene za SO₂, utječe na kemijski sastav i senzorne karakteristike vina *Sauvignon blanc*. Kao izvor hidroksitirozola korišten je sintetski hidroksitirozol, analitičke čistoće > 99 % koji ima GRAS status (*GRAS*, engl. *generally recognized as safe*). Kao drugi izvor hidroksitirozola, korišten je prirodni

ekstrakt nusproizvoda masline. Rezultatima je dokazano da nema značajnih razlika u enološkim parametrima i hlapljivim sastojcima vina s dodatkom hidroksitirozola (HT vina) i vina s dodatkom 80 mg/L SO₂. Ipak, intenzitet boje bio je izraženiji kod HT vina nakon punjenja u boce (osobito u vinima s dodatkom sintetskog hidroksitirozola), ali nakon 6 mjeseci skladištenja intenzitet boje HT vina se smanjio u odnosu na vina s dodatkom SO₂ (osobito u vinima s dodatkom prirodnog ekstrakta hidroksitirozola). Dodatkom hidroksitirozola u vino, sortne karakteristike vina *Sauvignon blanc* bile su manje izražene. Iz tog razloga, i dalje se preporučuje hidroksitirozol koristiti u kombinaciji s SO₂ i nekim drugim antioksidacijskim sredstvima.

2.8. VALIDACIJA ANALITIČKIH METODA

2.8.1. Razlozi za validaciju

Svaka analitička metoda unutar svog područja primjene omogućava točne, razumljive, čitljive, izvorne, pouzdane i ponovljive rezultate, a te karakteristike metoda je zadobila zahvaljujući postupcima validacije (vrednovanja) analitičkih metoda. Validacija obuhvaća skup postupaka kojima se ispituju i prikupljaju objektivni dokazi s ciljem ispunjenja zahtjeva za predviđenu specifičnu primjenu. Jednostavnije rečeno, validacijom se dokazuje prikladnost određenog analitičkog postupka za upotrebu (Grgić, 2019; Pravilnik, 2005). Različiti ciljevi zahtijevaju korištenje različitih validacijskih postupaka. Metode validacije uključuju kvalitativnu analizu, kvantitativnu analizu, potvrdne analize i druge (FDA, 2019).

Analitičar je dužan validirati metodu jer je to njegova profesionalna odgovornost i time omogućava dobivanje ispravnih rezultata, što bližih stvarnim vrijednostima, na temelju kojih će kvalificirane osobe moći donositi ispravne odluke (Lazarić i Gašljević, 2002).

Zbog uniformnosti podataka važno je da se tijekom validacije metode poštuju isti principi. Validacija se može provesti prema principima Dobre laboratorijske prakse, Dobre proizvođačke prakse, Dobre analitičke prakse, Codex Alimentarius-a, Međunarodne organizacije za standardizaciju (engl. *International Organization for Standardization, ISO*), Međunarodne unije za čistu i primijenjenu kemiju (engl. *International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC*) itd. Također, validacija se može provesti i postupkom unutarnjeg vrednovanja (istraživanja unutar jednog laboratorija) koji se sastoji od određivanja zajedničkih značajki neovisnih o primijenjenom modelu validacije i specifičnih postupaka koji su karakteristični za sam model (Lazarić i Gašljević, 2002). Nevalidirana metoda se ne može smatrati prikladnom za upotrebu jer ne postoji sigurnost da će se njenom primjenom unutar nekog područja dobiti

relevantni rezultati (Grgić, 2019).

Od velike važnosti je i odabir kriterija za validaciju prije provođenja analitičkih postupaka kako bi eksperimenti bili provedeni racionalno i s minimalnim brojem kontrolnih analiza metode i cijelog analitičkog postupka, pri čemu će krajnji rezultat udovoljavati zadanom cilju (Lazarić i Gašljević, 2002).

Validacija metode provodi se prije uvođenja novih metoda koje se prvi put upotrebljavaju u laboratoriju ili se prvi put upotrebljavaju za neki proizvod, kada dođe do promjene same metode ili kada dođe do promjene određenih uvjeta koji utječu na metodu. Prije nego što se validirana metoda stavi u upotrebu potrebno je provesti verifikaciju metode, čime se određuju konkretni uvjeti u kojima će laboratorij provoditi metodu (osposobljavanje osoblja, odabir opreme, materijala, kemikalija, okolišni uvjeti, obnovljivost itd.) (Grgić, 2019).

2.8.2. Preuvjeti za validaciju

- Materijali (kemikalije) moraju biti definiranog sastava i čistoće.
- Standardi koji se koriste mogu biti primarni i sekundarni. Primarni standardi su certificirani standardi uzeti iz službenih izvora. Sekundarni (radni) standardi zahtijevaju dodatne analitičke postupke kojima se dokazuje sastav, kvaliteta, čistoća, identitet i druge karakteristike.
- Instrument je prije početka validacije potrebno verificirati. Ispravnost instrumenta osigurava se na način da se od trenutka instalacije, tijekom cijelog rada instrumenta, provode kontinuirane provjere obuhvaćene planovima i odgovarajućim uputama. Način rukovanja instrumentom opisan je Dobrom analitičkom praksom.
- Sljedivost podrazumijeva nedvosmislenu povezanost ulaza uzorka i izlaska podataka, a postiže se pravilnim vođenjem laboratorijskih dnevnika i metodičkom pohranom sirovih podataka.
- Pokrivenost Standardnim operativnim postupcima (engl. *Standard Operating Procedure, SOP*) odnosi se na postojanje radnih uputa u kojima je detaljno opisan svaki postupak (Lazarić i Gašljević, 2002).

2.8.3. Koraci validacije

- Definicija problema i plan rada

- Definiranje metode – određuje se način kako će se metoda provesti i parametre validacije koji će se pratiti.
- Definiranje izvedbenih parametara i kriterija prihvatljivosti – ovisno o vrsti i svrsi analitičke metode definiraju se izvedbeni parametri validacije i specificiraju se statističke analize.
- Definiranje validacijskih eksperimenata – detaljan opis postupka kod određivanja svakog parametra validacije.
- Definiranje opreme i njenih relevantnih karakteristika.
- Definiranje materijala – standardi, reagensi, njihova kvaliteta (Lazarić i Gašljević, 2002).
- Mjerenje i obrada podataka
 - Izvođenje predvalidacijskih eksperimenata – postavljanje početnih zahtjeva za kriterije prihvatljivosti metode, procjena približne preciznosti metode, radno područje i granica detekcije.
 - Prilagođavanje parametara metode i/ili kriterija prihvatljivosti (po potrebi) – Ukoliko prethodnim korakom nisu dobiveni odgovarajući rezultati, mijenja se metoda, uređaj, tehnika ili kriterij prihvatljivosti.
 - Potpuna izvedba validacije – provođenje eksperimenata postupkom koji je opisan u protokolu (za svaki parameter).
 - Obrada podataka – statistička obrada podataka i usporedba s kriterijima prihvatljivosti na način koji je naveden u protokolu (Lazarić i Gašljević, 2002).
- Izrada dokumentacije
 - Pisanje standardnih operativnih postupaka za rutinsku izvedbu metode – pisani po načelima Dobre analitičke prakse na osnovi odgovarajućih rezultata iz prethodnih koraka.
 - Definiranje vrste i učestalosti ispitivanja prikladnosti sustava – odabir kritičnih parametara koje metoda mora zadovoljiti.

- Pisanje izvješća o eksperimentima i rezultatima validacije – mora biti odobreno prije nego što se metoda stavi u upotrebu (Lazarić i Gašljević, 2002).

2.8.4. Parametri validacije

2.8.4.1. *Selektivnost*

Pojmovi selektivnost i specifičnost se često poistovjećuju i zamjenjuju, iako su to različita obilježja metode. Razlika je u tome što specifična metoda određuje jedan analit, a selektivna metoda više komponenti istovremeno, neovisno o tome razlikuju li se komponente ili ne (Lazarić, 2012). Prema tome, selektivnost metode omogućava jasno određivanje analita koji se nalazi u prisutnosti drugih tvari iz smjese ili matriksa uzorka, kao što su npr. međuprodukti sinteza, izomeri, placebo, pomoćne komponente, kontaminanti, degradacijski produkti i dr. (Maithani i Singh, 2011).

2.8.4.2. *Linearnost*

Linearnost je sposobnost metode da se njenom primjenom unutar zadanog raspona dobiju rezultati direktno proporcionalni koncentraciji analita u uzorku. Za određivanje linearnosti najčešće se provode analize u 5 koncentracijskih raspona, uz 3 ponavljanja za svaki raspon. Linearnost se može odrediti matematički preko jednadžbe pravca $y = ax + b$ uz izračun koeficijenta korelacije (r) pri čemu se postavlja kriterij $r \geq 0,98$. Nagib pravca (a) upućuje na osjetljivost analitičke metode, dok odsječak na y-osi (b) upućuje na sustavnu pogrešku metode. Osim matematički, linearnost se može odrediti i grafički, čime se dobiva vizualan prikaz ovisnosti nekog signala o koncentraciji analita u uzorku (Lazarić, 2012).

U slučaju kad analitičkim postupkom nije moguće dobiti linearnost (npr. kod imunoloških testova), analitički odgovor bi trebalo opisati odgovarajućom funkcijom koncentracije (količine) analita u uzorku ili prilagoditi raspon koncentracija u kojem će odziv biti linearan (ICH, 2005).

2.8.4.3. *Točnost/Istinitost*

Točnost/istinitost se definira kao stupanj podudaranja između izmjerene i stvarne (prihvaćene) vrijednosti. Može se odrediti analizom poznate količine nekog analita u uzorku (npr. analiza certificiranog referentnog materijala) te se navedene vrijednosti uspoređuju s vrijednostima koje su dobivene primjenom metode. Drugi način je određivanje razlike između srednjih vrijednosti dobivenih primjenom metode i prihvatljivih vrijednosti čiji su rezultati dobiveni primjenom referentne metode koje se svakodnevno provode u laboratoriju (Lazarić,

2012; ICH, 2005). Kad god na raspolaganju stoji certificirani referentni materijal, on bi se trebao upotrijebiti (Pravilnik, 2005). Preporuka je analize točnosti provoditi u minimalno 3 koncentracijska raspona i s minimalno 3 ponavljanja za svaki koncentracijski raspon što ukupno čini 9 analiza. Jedan od 3 koncentracijska raspona trebao bi pripadati području granice kvantifikacije, dok ostali pripadaju rasponu koncentracija u stvarnom uzorku (Lazarić, 2012; ICH, 2005).

2.8.4.4. *Preciznost*

Preciznost se definira kao slaganje između više mjerenja provedenih na istom homogenom uzorku pri određenim uvjetima, a omogućuje kvantitativno određivanje slučajnih pogrešaka tijekom primjene metode (Lazarić, 2012). Najčešće se provodi 9 mjerenja koja uključuju 3 koncentracijska raspona (3 mjerenja za svaki koncentracijski raspon) (ICH, 2005). Preciznost se može određivati na tri razine; na razini ponovljivosti, međupreciznosti i obnovljivosti. Kada uvjeti uključuju jedan laboratorij, istu aparaturu i analitičara i provođenje analiza u kratkom vremenskom periodu tada se govori o preciznosti pod uvjetima ponovljivosti. Kada se analize provode u istom laboratoriju, ali kroz duži vremenski period i izmjene pojedinih uvjeta tada se govori o međupreciznosti. Kod određivanja međupreciznosti važno je uzeti u obzir uvjete rada koji su što sličniji svakodnevnoj rutinskoj provedbi metode u laboratoriju. Kada promjenjivi uvjeti uključuju i različite laboratorije tada je riječ o preciznosti pod uvjetima obnovljivosti (Lazarić, 2012). Određivanje preciznosti pod uvjetima obnovljivosti omogućava dobivanje neovisnih rezultata i najčešće se provodi u slučajevima kada je potrebno standardizirati neku analitičku metodu (primjerice kod uključivanja neke metode u farmakopeju) (ICH, 2005). Kao numerički pokazatelj preciznosti najčešće se uzima standardna devijacija. Kriteriji prihvatljivosti ovise o koncentraciji analita koji se određuje, vrsti analize i matrici uzorka (Lazarić, 2012).

2.8.4.5. *Granica detekcije (LOD – limit of detection)*

Granica detekcije (engl. *limit of detection*, *LOD*) je najniži udio analita u uzorku kojeg je moguće identificirati, ali ne nužno i kvantitativno odrediti primjenom zadanih eksperimentalnih uvjeta. Granica detekcije može se odrediti na temelju vizualne procjene (može i kod neinstrumentalnih metoda), na temelju veze signal-šum te na temelju standardne devijacije signala i nagiba. Određivanje granice detekcije na temelju veze signal-šum upotrebljava se samo kod primjene analitičkih metoda s baznom linijom (prihvatljiv omjer signal/šum je 3:1 ili 2:1). Određivanje granice detekcije na temelju standardne devijacije signala i nagiba izražava se kao

$LOD = 3,3 \sigma / S$ (σ = standardna devijacija odgovora; S = nagib pravca kalibracijske krivulje analita) (Lazarić, 2012; ICH, 2005).

2.8.4.6. Granica kvantifikacije (*LOQ – limit of quantification*)

Granica kvantifikacije (engl. *limit of quantification, LOQ*) predstavlja najniži udio analita u uzorku kojeg je moguće kvantitativno odrediti uz odgovarajuću istinitost i preciznost. Granica kvantifikacije, isto kao i granica detekcije, može se odrediti vizualnom procjenom, na temelju omjera signal-šum te na temelju standardne varijacije signala i nagiba. Određivanje granice kvantifikacije na temelju veze signal-šum također se upotrebljava samo kod primjene analitičkih metoda s baznom linijom (prihvatljiv omjer je 10:1). Određivanje granice kvantifikacije na temelju standardne devijacije signala i nagiba izražava se kao $LOQ = 10 \sigma / S$ (σ = standardna devijacija odgovora; S = nagib pravca kalibracijske krivulje analita) (Lazarić, 2012; ICH, 2005).

2.8.4.7. Radno područje

Radno područje analitičke metode je raspon između minimalne i maksimalne koncentracije analita dobivene analitičkom metodom u kojem se dobivaju precizni, istiniti i linearni rezultati. Što je radno područje uže rezultati će biti istinitiji i precizniji. Raspon se određuje iz studija linearnosti na temelju primjenjene upotrebe metode (Lazarić, 2012).

2.8.4.8. Robusnost

Robusnost predstavlja otpornost metode na male, namjerne promjene parametara pri čemu se osiguravaju točni i precizni rezultati. Prije ispitivanja robusnosti potrebno je odrediti čimbenike koji utječu na rezultate, a pojavljuju se u primarnoj obradi, pročišćavanju i analizi uzoraka. Svakom od navedenih čimbenika neznatno se promijeni svaki parametar koji utječe na rezultat te se prema nekom od priznatih postupaka provodi test robusnosti praćenjem kvantitavne promjene rezultata. Kada metoda nije osjetljiva na male, namjerne promjene parametara i osigurava odgovarajuće rezultate kaže se da je navedeni parametar u području robusnosti metode. Ako navedene promjene pokazuju značajniji utjecaj na rezultate potrebno je provesti daljnja ispitivanja kojima će se definirati granice prihvatljivosti tog parametra ili objasniti utjecaj navedenih parametara u opisu metode (Lazarić, 2012; Pravilnik, 2005).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

U ovom radu je provedena validacija metode za određivanje slobodnog SO₂ primjenom analizatora kontinuiranog protoka (CFA/SFA). Za ispitivanja su odabrani uzorci vina, voćnih vina i aromatiziranih vina. Validacija je provedena usporedbom rezultata dobivenih ovom metodom i rezultata dobivenih referentnom, OIV metodom. Sva ispitivanja su provedena u Odjelu za fizikalno kemijska ispitivanja, Centra za vinogradarstvo, vinarstvo i uljarstvo, Hrvatske agencije za poljoprivredu i hranu.

3.2. ODREĐIVANJE SLOBODNOG SUMPOROVOG DIOKSIDA U VINU I VOĆNOM VINU OIV METODOM PO FRANTZ-PAULU

Kemikalije:

- Fosfatna kiselina (H₃PO₄, 85 %, ρ₂₀ = 1,71 g/mL)
- Otopina vodikovog peroksida (H₂O₂, 30 %)
- Metilno crvenilo (C₁₆H₁₅N₃O₂)
- Etanol (CH₃CH₂OH, 50 vol %)
- Metilensko modriilo (C₁₆H₁₈ClN₃S * nH₂O)
- Demineralizirana voda (H₂O)
- Natrijev hidroksid (NaOH; 0,01 mol/L)

Aparatura i pomoćna oprema

- Aparatura se sastoji od tikvice s dugim grlom A, kruškolike tikvice B
- Mjerač protoka zraka
- Vakuum pumpa
- Pipeta od 50 mL, automatska bireta od 20 mL
- Rashladna kupelj

Princip metode

Uzorak vina zakiseljen je fosfatnom kiselinom i izložen struji zraka pri sobnoj temperaturi. Izdvojen sumporov dioksid oksidira se u otopini vodikova peroksida, a nastali vodikovi ioni

titriraju se otopinom natrijevog hidroksida uz kombinirani indikator.

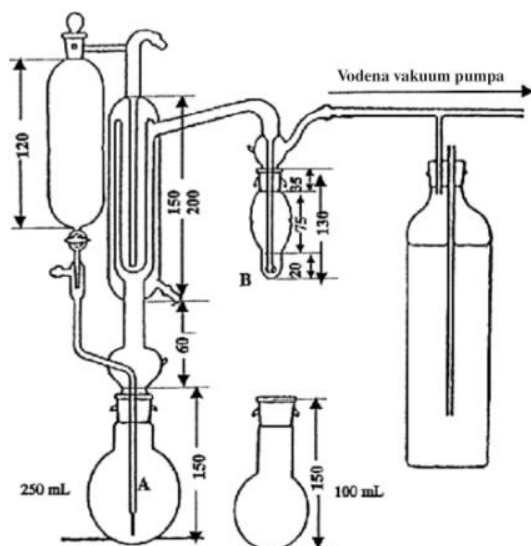
Priprema, označavanje i čuvanje volumetrijskih otopina

- Otopina 25 % fosfatne kiseline – 300 mL fosfatne kiseline doda se u 700 mL demineralizirane vode i ohladi.
- Otopina miješanog indikatora – 1 g metilnog crvenila i 0,5 g metilenskog modrila otopi se u 1 L 50 % etanola
- Otopina reagens-indikatora – U tikvicu od 100 mL doda se 1 mL otopine vodikovog peroksida te se nadopuni do oznake s demineraliziranom vodom. Otopina se prelije u Erlenmeyerovu tikvicu i doda se nešto otopine miješanog indikatora (do promjene boje otopine u ljubičastu). Zatim se otopini doda 0,01 mol/L natrijevog hidroksida do promjene boje otopine u zelenu.

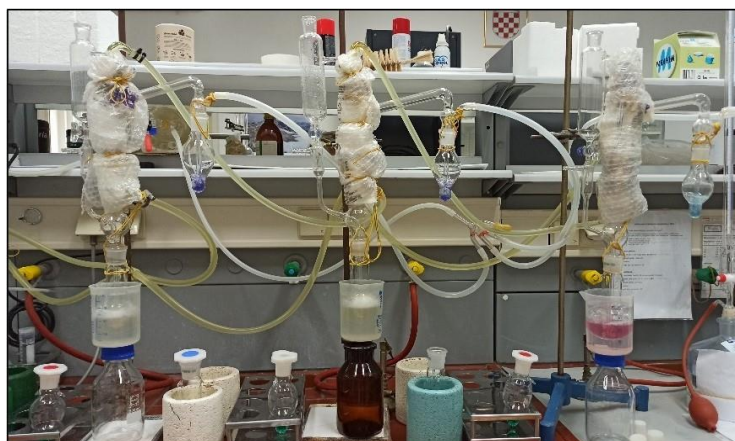
Određivanje slobodnog sumporovog dioksida

Aparatura za određivanje slobodnog sumporovog dioksida prikazana je na slikama 6 i 7. U tikvicu A doda se 50 mL vina/voćnog vina, priključi se na aparaturu i uroni u rashladnu kupelj. Kroz nastavak se doda 15 mL 25 %-tne fosforne kiseline. U tikvicu B doda se 3 mL otopine reagens-indikatora. Protok vode kroz vodenu vakuum pumpu podesi se na približno 40 L/h.

Od trenutka kad u tikvicu B počinju prelaziti mjehurići mjeri se vrijeme od 15 minuta. Nakon 15 minuta tikvice se skidaju s aparature. Sadržaj tikvice B titrira se otopinom 0,01 mol/L natrijevog hidroksida dok prva dodana kap otopine natrijevog hidroksida ne promijeni ljubičasto obojenje u zeleno. Volumen utroška 0,01 mol/L natrijevog hidroksida označava se sa n' . Obojenja prije i nakon titracije prikazana su na slici 8.



Slika 6. Aparatura za određivanje slobodnog SO₂ (Pravilnik, 2004)



Slika 7. Aparatura za određivanje slobodnog sumporovog dioksida metodom po Frantz Paulu (*vlastita fotografija*)



Slika 8. Obojenja prije i nakon titracije s natrijevim hidroksidom (*vlastita fotografija*)

Iskazivanje rezultata

Količina slobodnog sumporovog dioksida u mg/L računa se prema jednadžbi (1):

$$\text{Slobodni SO}_2 \text{ (mg/L)} = n' * 6,4 \quad [1]$$

gdje je n' - mL 0,01 mol/L NaOH.

3.3. ODREĐIVANJE SLOBODNOG SUMPOROVOG DIOKSIDA S CFA/SFA ANALIZATOROM FLOWSYS

Kemikalije

- Sumporna kiselina (H₂SO₄, 97 %)
- Pararosanilin acetat (C₁₉H₁₇N₃ x C₂H₄O₂)
- Klorovodična kiselina (HCl, 37 %)
- Formaldehid (HCHO, 37 %)
- Triton X100, tenzid (C₁₄H₂₂O(C₂H₄O)_n (n = 9 - 10))
- Etanol (CH₃CH₂OH, 96 %)
- Ultračista voda (R-H₂O, 18M Ω/cm)

Aparatura i pomoćna oprema

- Metode koje koriste analizu protoka omogućuju automatsku provedbu postupaka mokre kemije i samim time su pogodne za analizu velikog broja uzoraka. Razlikuju se dvije vrste analize protoka, a to su analiza kontinuiranog protoka (CFA/SFA) i analiza protoka ubrizgavanja (engl. *flow injection analysis*, *FIA*). U ovom radu primjenjena je metoda kontinuiranog protoka uz pomoć analizatora CFA/SFA FLOWSYS (proizvođač Alliance Instruments GmbH, Salzburg, Austrija) koji omogućuje potpuno automatsku provedbu analize slobodnog SO₂ u vinu i voćnom vinu.
- Staklene kivete za uzorke, mikropipeta od 500 μL, plastična kiveta od 10 mL, plastični držač za kivete

Princip metode

Uzorak vina se pri sobnoj temperaturi (20 °C) razrjeđuje sa sumpornom kiselinom kako bi se oslobodio slobodni sumporov dioksid. Sumporov dioksid se izdvaja mikrodestilacijom uz plin dušik kao nosač i prikuplja u kontinuiranoj struji otopine kojoj će se mjeriti apsorbancija. Sumporov dioksid iz destilata ulazi u reakciju s pararosanilinom i formaldehidom tvoreći ljubičasto-ružičasto obojenje u kiselom pH. Apsorbancija se određuje pri 546 nm u protočnom kolorimetru, a rezultat se uspoređuje s kalibracijskom krivuljom.

Princip rada analizatora

Analizator se sastoji od uzorkivača za tekuće uzorke i višekanalne peristaltičke pumpe koja radi kontinuirano stalnom brzinom i transportira uzorke i reagense (slika 9, slika 10). U stanju mirovanja, uzorkivač unosi R-H₂O kroz sustav cjevčica, R-H₂O se miješa s radnim reagensima te otopina teče kontinuirano kroz cijeli reakcijski sustav. Ta reakcijska otopina detektira se u protočnoj ćeliji kao bazna linija (slijepa proba). U stanju mirovanja, pipeta za uzimanje uzorka spojena je s linijom slijepa probe i na fotometru se očitava bazna linija, pri čemu stabilna bazna linija upućuje na dobru kvalitetu reagensa i omogućuje dobru ponovljivost. Kad uređaj za uzorkovanje prelazi sa slijepa probe na prvi uzorak uz kontinuirani rad pumpe, dolazi do kratkog usisavanja zraka. Podizanjem pipete iz uzorka aspirira se malo zraka koji ulazi u sustav u obliku mjehurića i omogućuje segmentaciju (1 mjehurić/1 sekunda), a zatim kroz cjevčice prolaze ostali reagensi. Zračni mjehurić između uzoraka odvaja slijepu probu od uzorka i uzorke međusobno. Zbog površinske napetosti, na stijenkama protočne ćelije ostaje tanak film prilikom prolaska mjehurića te se iz tog razloga reakcijski sustav uvijek mora održavati čistim (kako ne bi došlo do prijenosa prethodnog uzorka i reagensa na sljedeći). Uzorak i reagensi miješaju se u staklenim spiralama, pri čemu različite duljine spirala omogućuju različito trajanje miješanja prije dodatka sljedećeg reagensa.



Slika 9. Analizator CFA/SFA FLOWSYS (*vlastita fotografija*)



Slika 10. Analitička jedinica sa sustavom cijevi u kojima se odvija kontinuirani protok
(*vlastita fotografija*)

Priprema, označavanje i čuvanje volumetrijskih otopina

- Sulfatna kiselina: U digestoru se 100 mL H_2SO_4 otopi u otprilike 600 mL R- H_2O , ohladi i nadopuni do 1000 mL s R- H_2O .
- Stock A: 1,1 g pararosanilin acetata otopi se u 500 mL R-vode pri čemu se otopina miješa cijeli dan na sobnoj temperaturi. Nakon toga otopinu je potrebno polako profiltrirati kroz dupli filter papir i spremiti u tamnu posudu.

- Rosan: Odmjeri se 25 mL stocka A, doda 6,25 mL klorovodične kiseline i miješa 15 minuta. Nakon toga nadopuni se s R-H₂O do 1000 mL.
- Formal: 0,5 mL formaldehida doda se u tikvicu od 100 mL i nadopuni s R-H₂O (potrebno svaki dan pripremiti svježu otopinu). U tikvicu se doda 0,2 mL tritona razrijeđenog s etanolom u omjeru 1:1 (razrijeđenje treba provesti polako, kako ne bi došlo do stvaranje pjene). Takvu otopinu moguće je koristiti nekoliko dana, odnosno dok je bistra.

Priprema uzoraka

Uzorci se stavljaju u pripadajuće staklene kivete (bez filtriranja).

Kalibracijski uzorci

Za kalibraciju koriste se uzorci vina u slijedećim rasponima: C1 - ≥ 50 mg/L, C2 – 20 - 40 mg/L i C3 - ≤ 10 mg/L. Uzorci se čuvaju o bočicama od 250 mL začepljenim parafilmom.

Dnevna provjera metode s kontrolnim uzorcima

Dnevno se provjeravaju 3 uzorka u različitim koncentracijskim rasponima, kojima su koncentracije određene primjenom OIV metode. Istim uzorcima se određuje koncentracija slobodnog SO₂ CFA metodom te se navedeni rezultati upisuju u odgovarajući Excel predložak i uspoređuju na komparativnoj kontrolnoj karti (za usporedbu metoda).

Početak rada i provjera uređaja

Tri kalibracijske točke određuju se OIV metodom, a za to vrijeme radne otopine se temperiraju na sobnoj temperaturi. U kivete se dodaju primer (uzorak veće koncentracije od C1), kalibracijski uzorci (C1, C2, C3) i uzorci vina te se istim redoslijedom slažu u plastični držač za kivete.

Analizator FLOWSYS pokreće se uključivanjem analitičke jedinice, dovoda dušika, fotometra, mjerača protoka, autosamplera, računala i softvera. Pokreće se ispiranje s R-H₂O. Na računalu se odabere metoda za određivanje slobodnog sumporovog dioksida. Provedu se dva mjerenja neposredno jedno iza drugog. U predložak koji je dio softvera upisuje se broj dnevnih uzoraka zajedno s njihovim analitičkim oznakama. U metodi na računalu prati se bazna linija koja se treba stabilizirati na 400 mV (stabilizira ju prolazak pararosanilina). U program na računalu unose se izmjerene koncentracije C1, C2, C3 koju su bile određene OIV metodom i na

temelju tih vrijednosti konstruira se kalibracijska krivulja. Nakon ove pripreme i provjere uređaja, pokreće se CFA metoda.

Iskazivanje rezultata

Uređaj je programiran tako da nakon provedene analize vina izražava koncentraciju slobodnog sumporovog dioksida (mg/L). Uređaj ima radni raspon 2 - 80 mg/L za slobodni sumporov dioksid u vinu.

3.4. PARAMETRI VALIDACIJE

Odabrani parametri za validaciju CFA metode su: linearnost - određena preko koeficijenta korelacije (r); točnost - određena preko koeficijenta korelacije (r), apsolutnog odstupanja ($Bias_{abs}$), relativnog odstupanja ($Bias_{rel}$), Bland-Altmanovog dijagrama i Z – vrijednosti; preciznost - određena preko relativne standardne devijacije (RSD); ponovljivost (R); granica detekcije (LOD); granica kvantifikacije (LOQ) i raspon. Parametri su određeni preko kriterija OIV-a (OIV, 2019) te prema Resolution OIV/OENO 391/2010 (međulaboratorijska ponovljivost za slobodni SO_2 (automatska kolorimetrijska metoda s pararosanilinom) (OIV, 2010).

4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je provesti validaciju metode za određivanje slobodnog sumporovog dioksida u vinu primjenom analizatora kontinuiranog protoka FLOWSYS. Validacija je provedena kroz određivanje slijedećih parametara validacije; linearnost - određena preko koeficijenta korelacije (r); točnost - određena preko koeficijenta korelacije (r), apsolutnog odstupanja ($Bias_{abs}$), relativnog odstupanja ($Bias_{rel}$), Bland-Altmanovog dijagrama i Z – vrijednosti; preciznost - određena preko relativne standardne devijacije (RSD); ponovljivost (R); granica detekcije (LOD); granica kvantifikacije (LOQ) i raspon. Validirana metoda bila je uspoređivana s referentnom OIV metodom po Frantz Paulu. Koncentracije slobodnog SO_2 izražene su u mg/L. Rezultati su prikazani grafički (slike 11 – 17) i tablično (tablice 2 - 6).

4.1. LINEARNOST

Linearnost se određuje temeljem usporedbe rezultata analize uzoraka različitih koncentracija pri čemu se uspoređuju rezultati dobiveni OIV i CFA metodom. Mjerenja su provedena u zadanom koncentracijskom rasponu, u duplikatu. Za utvrđivanje linearnosti u ovom su radu provedene analize 32 uzorka u koncentracijskom rasponu 3 - 60 mg/L SO_2 (tablica 2).

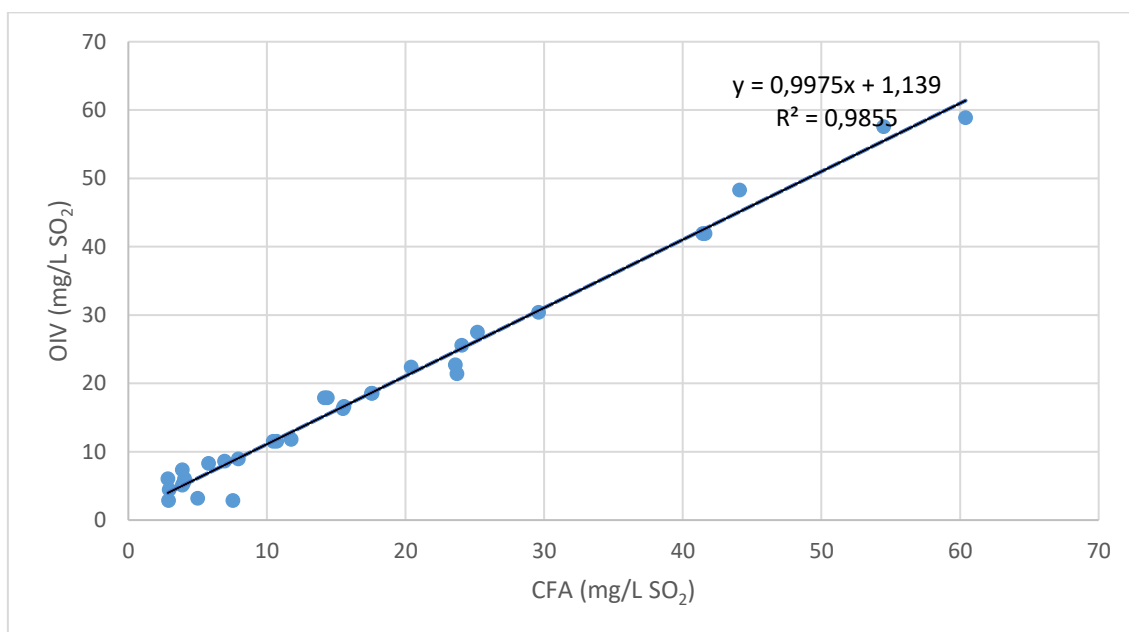
Tablica 2. Koncentracije slobodnog SO₂ (mg/L) dobivene primjenom OIV i CFA metode

Redni broj uzorka	\bar{x} CFA (mg/L SO ₂)	\bar{x} OIV(mg/L SO ₂)	\bar{x} CFA - \bar{x} OIV	\bar{x} CFA - \bar{x} OIV
1	23,6	22,75	0,85	0,85
2	3,9	5,12	-1,22	1,22
3	29,6	30,4	-0,8	0,8
4	3,9	7,36	-3,46	3,46
5	11,75	11,84	-0,09	0,09
6	2,85	6,08	-3,23	3,23
7	2,9	2,88	0,02	0,02
8	5	3,2	1,8	1,8
9	7,55	2,88	4,67	4,67
10	4,05	6,08	-2,03	2,03
11	20,4	22,4	-2	2
12	2,95	4,48	-1,53	1,53
13	15,5	16,32	-0,82	0,82
14	4	5,44	-1,44	1,44
15	17,6	18,56	-0,96	0,96
16	17,55	18,56	-1,01	1,01
17	14,15	17,92	-3,77	3,77
18	24,05	25,6	-1,55	1,55
19	25,2	27,52	-2,32	2,32
20	10,45	11,52	-1,07	1,07
21	6,95	8,64	-1,69	1,69
22	14,35	17,92	-3,57	3,57
23	5,8	8,32	-2,52	2,52
24	23,7	21,44	2,26	2,26
25	7,95	8,96	-1,01	1,01
26	10,7	11,52	-0,82	0,82
27	15,55	16,64	-1,09	1,09
28	44,1	48,32	-4,22	4,22
29	41,45	41,92	-0,47	0,47
30	41,6	41,92	-0,32	0,32
31	54,5	57,6	-3,1	3,1
32	60,4	58,88	1,52	1,52
srednja vrijednost (mg/L)	17,94	19,03	-1,09	1,79

Kod 26 od 32 uzorka vrijednosti dobivene OIV metodom nešto su veće od onih dobivenih CFA metodom, dok su kod 6 uzoraka (1, 7, 8, 9, 24, 32) vrijednosti CFA metode nešto veće od OIV, pri čemu je najveća razlika prisutna kod Uzorka 9 (4,67 mg/L).

4.1.1. Koeficijent korelacije (r)

Koeficijent korelacije koristi se kada između varijabli postoji linearna povezanost i neprekidna normalna distribucija. Maksimalna vrijednost iznosi +1 (savršena pozitivna korelacija), a minimalna -1 (savršena negativna korelacija). Predznak upućuje na smjer korelacije, ali ne i na snagu korelacije. Na temelju dobivenih rezultata konstruira se dijagram i izračuna jednadžba pravca ($y = ax + b$) i koeficijent korelacije r , pri čemu nagib pravca (a) ukazuje na osjetljivost metode, dok odsječak na y osi (b) ukazuje na eventualnu sustavnu pogrešku. Kriterij za koeficijent korelacije iznosi $r \geq 0,98$ za raspon 3 - 60 mg/L SO_2 (slika 11).



Slika 11. Usporedbe OIV i CFA metode u rasponu koncentracija 3 - 60 mg/L

Dobiveni koeficijent korelacije iznosi $r = 0,99$ što je u skladu s kriterijem $r \geq 0,98$ te se na temelju toga može utvrditi linearni odziv metode u ovisnosti o koncentraciji analita u ispitivanom uzorku.

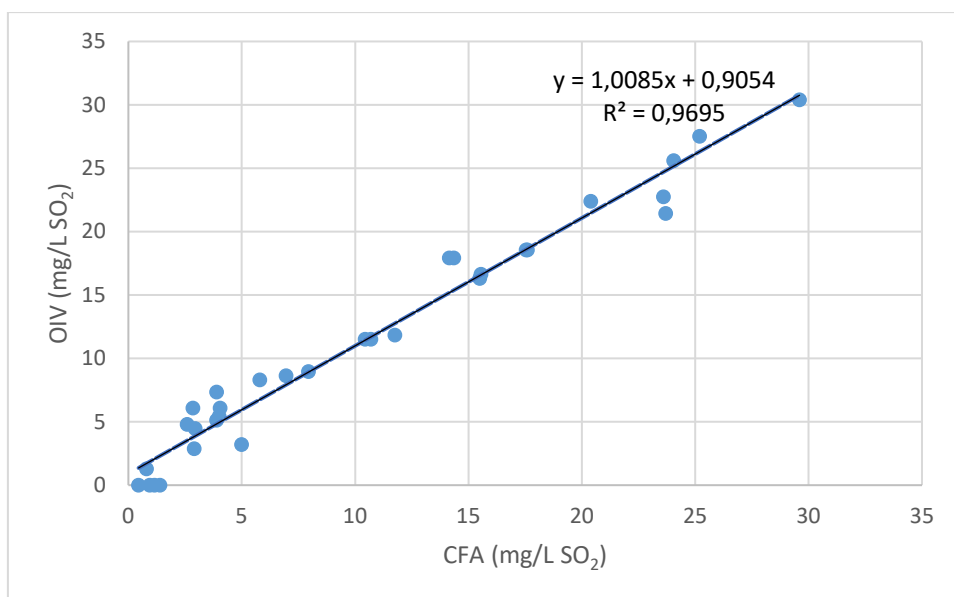
4.2. TOČNOST

Za određivanje točnosti metode primjenjeni su slijedeći parametri: koeficijent korelacije (r), apsolutno i relativno odstupanje (bias), Bland-Altmanov dijagram i Z-vrijednost.

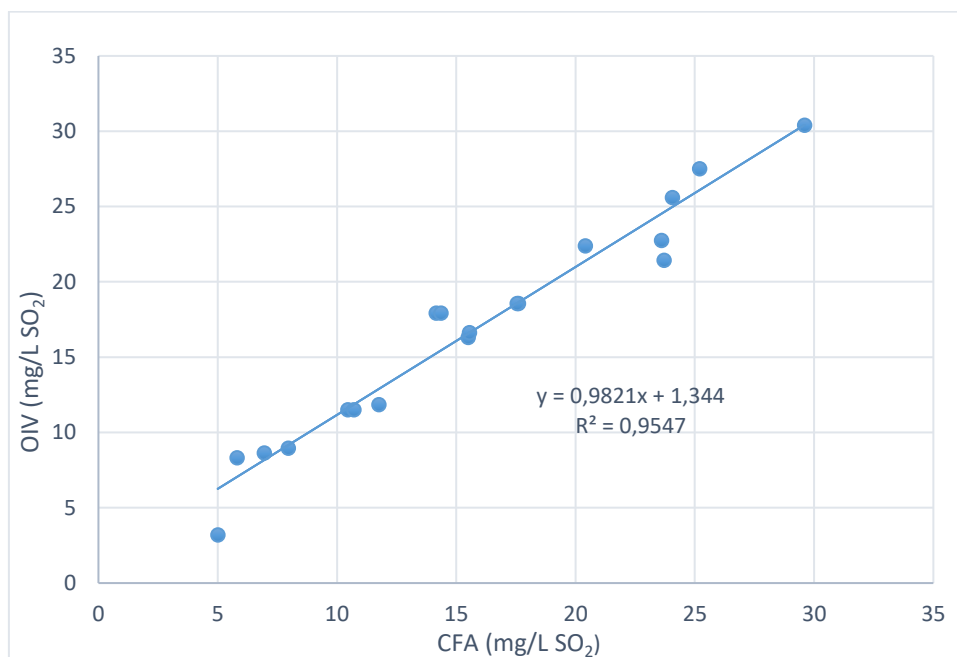
4.2.1. Koeficijent korelacije (r)

Provedene su usporedbe rezultata dobivenih OIV i CFA metodom (prosjeck 2 uzastopna ponavljanja) na 34 uzorka vina za 3 koncentracijska raspona; 0 - 30 mg/L SO_2 , 5 - 30 mg/L SO_2

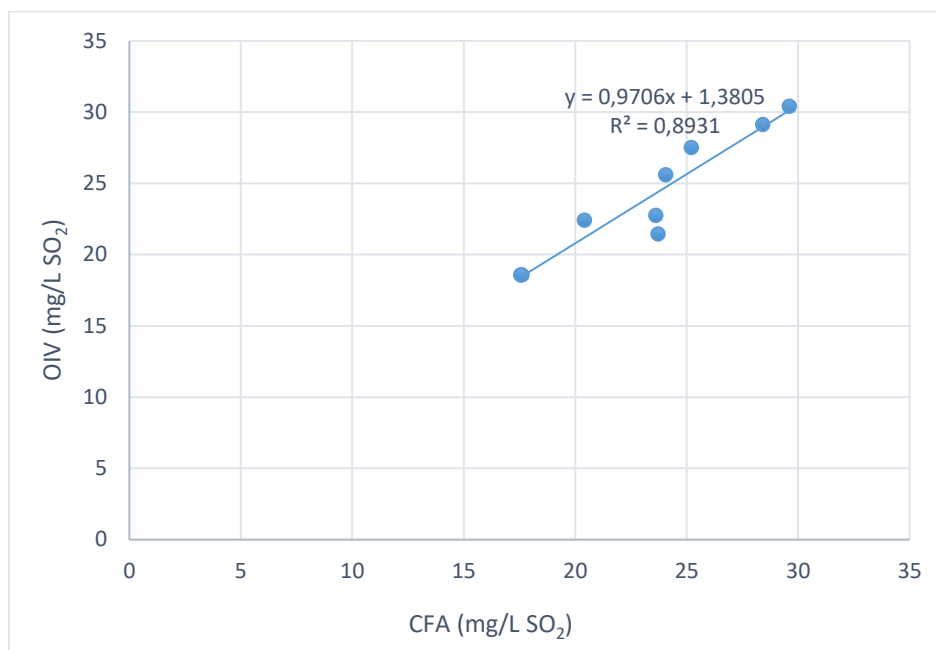
i 15 - 30 mg/L SO₂. Rezultati su prikazani grafički (slika 12, 13, 14) kao odnos rezultata dobivenih s obje metode. Izračunati su koeficijenti korelacije (r) za pojedine raspone. Koeficijent korelacije kojim se potvrđuje točnost metode treba biti veći od 0,9 (r ≥ 0,90).



Slika 12. Određivanje točnosti (0 - 30 mg/L SO₂)



Slika 13. Određivanje točnosti (5 - 30 mg/L SO₂)



Slika 14. Određivanje točnosti (15 - 30 mg/L SO₂)

Za zadane koncentracijske raspone koeficijent korelacije su iznosili:

$$r(0-30 \text{ mg/L}) = 0,98$$

$$r(5-30 \text{ mg/L}) = 0,98$$

$$r(15-30 \text{ mg/L}) = 0,95.$$

Dobivene r vrijednosti u skladu su sa zadanim kriterijem validacije ($r \geq 0,90$).

4.2.2. Apsolutno i relativno odstupanje (bias)

Bias (sustavna pogreška) donosi procjenu odstupanja srednje vrijednosti ponovljenih mjerenja od očekivanih vrijednosti (West, 1999). Na temelju analize 32 uzorka vina (tablica 2) određeno je apsolutno ($Bias_{abs}$) i relativno ($Bias_{rel}$) odstupanje aritmetičke sredine vrijednosti dobivenih CFA metodom od aritmetičkih sredina vrijednosti dobivenih OIV metodom. Bias se računa prema formulama (2 i 3):

$$Bias_{abs} = |\bar{x} \text{ CFA} - \bar{x} \text{ OIV}| \text{ (mg/L)} \quad [2]$$

$$Bias_{rel} = [|\bar{x} \text{ CFA} - \bar{x} \text{ OIV}| / \bar{x} \text{ OIV}] * 100 \%, \quad [3]$$

gdje je:

$|\bar{x} \text{ CFA} - \bar{x} \text{ OIV}|$ – apsolutna vrijednost aritmetičke sredine razlike između CFA i OIV metode za svaki pojedini uzorak (tablica 2),

$\bar{x} \text{ OIV}$ – srednja vrijednost rezultata dobivenih OIV metodom (tablica 2) (mg/L).

Izračunate vrijednosti za $Bias_{abs}$ i $Bias_{rel}$ iznose:

$$Bias_{abs} = 1,79 \text{ mg/L}$$

$$Bias_{rel} = [|(\bar{x} \text{ CFA} - \bar{x} \text{ OIV})| / \bar{x} \text{ OIV}] * 100 \% = 9,4 \%$$

4.2.3. Bland-Altmanov dijagram

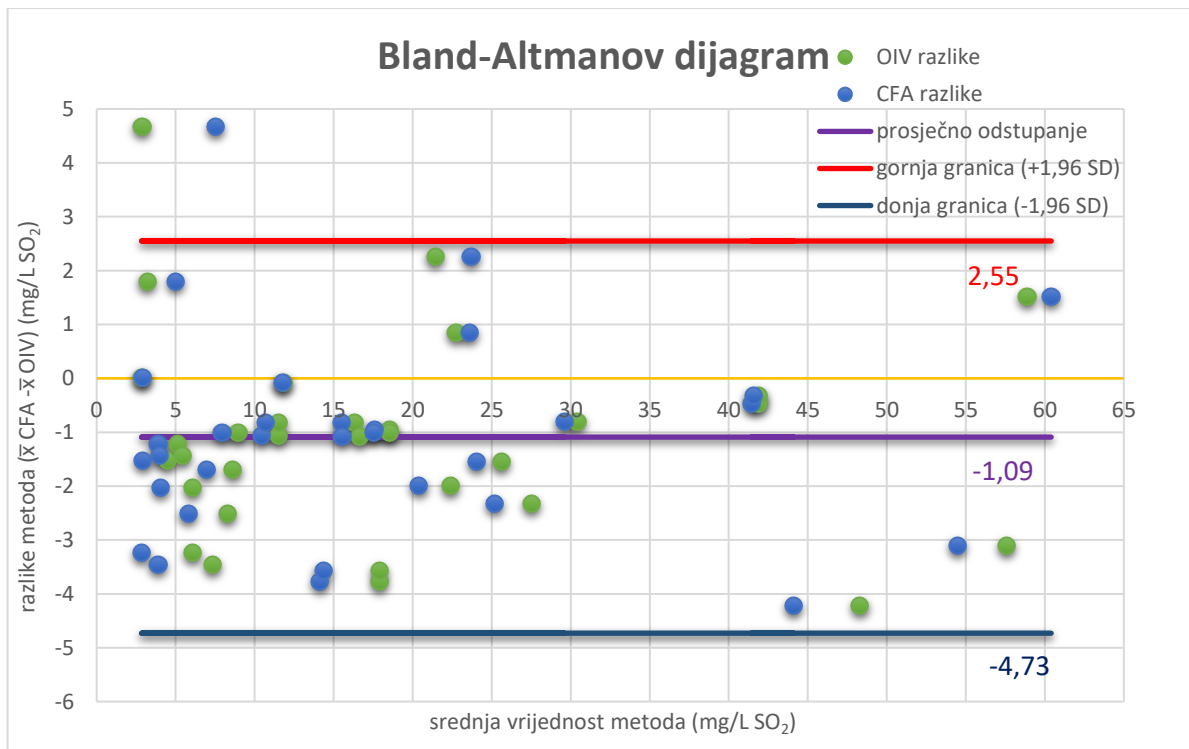
Kako bi se lakše uočila razlika između dva mjerna instrumenta, tj. dvije metode, konstruiran je Bland-Altmanov dijagram raspršenja razlike između mjerenja dobivenih OIV i CFA metodom. Prilikom konstrukcije Bland-Altmanovog dijagrama na apscisu se nanosi aritmetička sredina rezultata (od dva uzastopna mjerenja) za svaku metodu, a na ordinatu razlika između rezultata izmjerenih referentnom i ispitivanom metodom. Bland-Altmanov dijagram izrađen je na temelju analize 32 uzorka (tablica 2). Izračunate su vrijednosti za prosječno odstupanje (\bar{d}) i standardnu devijaciju prosječnog odstupanja (s_d) koje su poslužile za određivanje donje i gornje granice prihvatljivosti prema formulama (4 i 5):

$$d = -1,09 \text{ mg/L}$$

$$s_d = 1,86 \text{ mg/L}$$

$$\text{Gornja granica prihvatljivosti} = \bar{d} + 1,96 * s_d = 2,55 \text{ mg/L} \quad [4]$$

$$\text{Donja granica prihvatljivosti} = \bar{d} - 1,96 * s_d = -4,73 \text{ mg/L} \quad [5]$$



Slika 15. Bland-Altmanov dijagram

Bland-Altmanovim dijagramom (slika 15) nisu utvrđena značajna odstupanja, no jedna je točka (Uzorak 9) u obje metode označena kao *outlier* jer izlazi iz granica prihvatljivosti definiranih rasponom $\pm 1,96$ standardne devijacije od srednje vrijednosti. U pojedinim slučajevima raspršenost razlika nešto je veća kod nižih vrijednosti (< 5 mg/L) i viših vrijednosti (> 45 mg/L), ali ne izlazi iz granica prihvatljivosti pa se može zaključiti da nije prisutno proporcionalno ili konstantno odstupanje između metoda.

4.2.4. Z – vrijednost

Kroz duži vremenski period prikupljeni su rezultati dobiveni OIV i CFA metodama za veći broj uzoraka vina, voćnih vina i aromatiziranih vina ($n = 211$). Na dijagramu je prikazana usporedba dobivenih rezultata (slika 16). Na temelju analize 211 uzoraka određena je Z – vrijednost prema formuli (6):

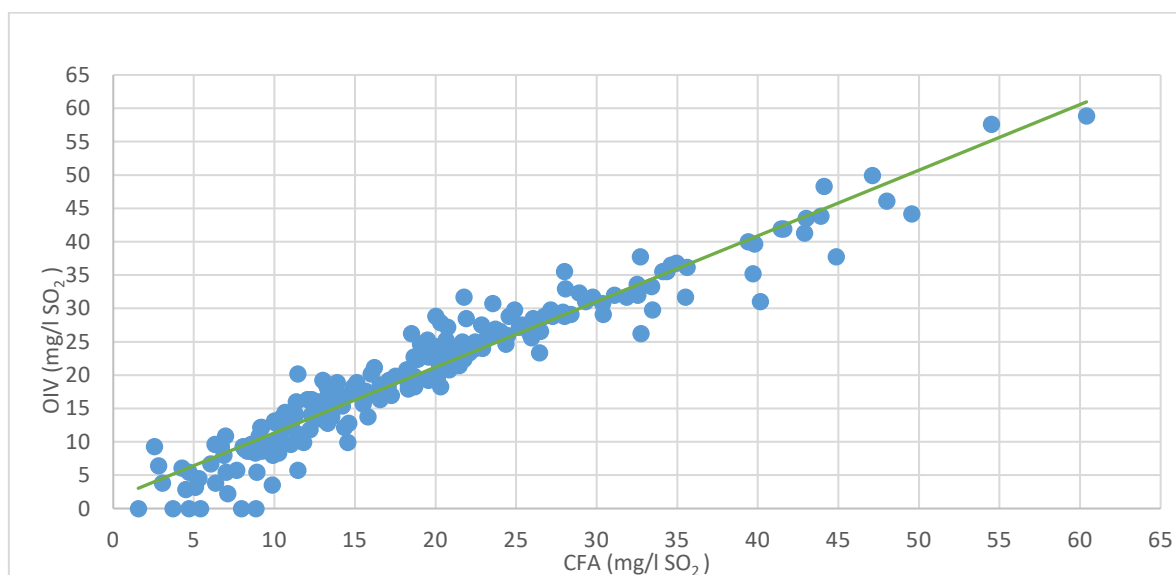
$$Z = |M_d| / S_d \quad [6]$$

gdje je:

M_d - srednja vrijednost razlika između OIV i CFA metode (mg/L)

S_d – standardna devijacija razlika između OIV i CFA metode (mg/L).

Ukoliko je Z - vrijednost $< 2,0$ može se zaključiti da je točnost validirane metode u odnosu na referentnu zadovoljavajuća, uz rizik pogreške $\alpha = 5 \%$. Ukoliko je Z – vrijednost $> 2,0$, može se zaključiti da točnost validirane metode nije zadovoljavajuća u odnosu na referentnu.



Slika 16. Usporedba OIV i CFA metode tijekom dužeg vremenskog perioda

Na temelju dobivenih koncentracija slobodnog SO₂ u uzorcima vina izračunati su sljedeći podaci:

$$|M_d| = 1,20 \text{ mg/L}$$

$$S_d = 3,05 \text{ mg/L}$$

$$Z - \text{vrijednost} = |M_d| / S_d = 0,39 \leq 2$$

Z - vrijednost je manja od 2,0 i pritom se može zaključiti da je točnost jedne metode u odnosu na drugu zadovoljavajuća na razini raspona u kojem se razmatra, pri čemu je rizik pogreške $\alpha = 5 \%$.

Vrijednosti svih ispitivanih parametara koji opisuju točnost pokazale su da je CFA metoda točna u odnosu na referentnu, OIV metodu.

4.3. PRECIZNOST I PONOVLJIVOST

Budući da je slobodni SO₂ u vinu nestabilan parametar (otopljen u plinovitom obliku i tijekom vremena oksidira i hlapi), promatraju se preciznost i ponovljivost mjerenja iz netom otvorene boce.

4.3.1. Preciznost (RSD)

Preciznost (RSD) je stupanj podudaradnosti između niza mjerenja izvedenih pod propisanim uvjetima iz istog, homogenog uzorka primjenom ispitivane metode. Za utvrđivanje preciznosti CFA metode provedena su mjerenja u pet uzoraka vina (A-E) s koncentracijskim rasponima; $\leq 5 \text{ mg/L}$; $\leq 10 \text{ mg/L}$; $\geq 15 \text{ mg/L}$; $\geq 20 \text{ mg/L}$ i $\geq 50 \text{ mg/L}$. Za svaki uzorak provedeno je 10 ponovljenih mjerenja. Za pojedini koncentracijski raspon određena je aritmetička sredina mjerenja (\bar{x}) i standardna devijacija (σ) (tablica 3). Određena je preciznost (RSD, %) za raspone i ukupno.

Tablica 3. Koncentracija slobodnog SO₂ (mg/L) dobivena CFA metodom u uzorcima vina (A-E) s pet koncentracijskih raspona

Broj mjerenja	Uzorak A (≤ 5 mg/L)	Uzorak B (≤ 10 mg/L)	Uzorak C (≥ 15 mg/L)	Uzorak D (≥ 20 mg/L)	Uzorak E (≥ 50 mg/L)
1	4,10	7,20	15,80	21	51,9
2	4,00	7,00	15,60	21,6	53,1
3	4,00	6,90	15,50	21,8	53,6
4	3,90	6,90	15,40	21,7	53,7
5	3,90	7,00	15,20	21,8	53,7
6	4,00	6,90	15,20	21,8	53,8
7	3,90	6,90	15,10	21,8	53,8
8	3,80	6,80	15,20	21,8	53,9
9	3,80	6,90	15,60	21,6	53,8
10	3,70	6,90	15,60	21,7	52,8
Srednja vrijednost (\bar{x}) (mg/L)	3,91	6,94	15,42	21,66	53,41
Standardna devijacija (σ) (mg/L)	0,12	0,11	0,23	0,25	0,64

Na temelju aritmetičke sredine i standardne devijacije određena je preciznost CFA metode (RSD vrijednost). Kriterij za preciznost iznosi $RSD \leq 5 \%$. Preciznost metode izračuna se iz srednje vrijednosti (\bar{x}) dobivene iz 10 mjerenja pojedinog uzorka i pripadajuće standardne devijacije (σ) prema formuli (7):

$$RSD = (\sigma / \bar{x}) * 100 \% . \quad [7]$$

Dobivene vrijednosti preciznosti iznose:

$$RSD (\leq 5 \text{ mg/L}) = 3,06 \%$$

$$RSD (\leq 10 \text{ mg/L}) = 1,55 \%$$

$$RSD (\geq 15 \text{ mg/L}) = 1,52 \%$$

$$RSD (\geq 20 \text{ mg/L}) = 1,14 \%$$

$$RSD (\geq 50 \text{ mg/L}) = 1,19 \%$$

Ukupna preciznost dobivena je izračunom aritmetičke sredine pojedinačnih RSD vrijednosti i iznosi:

$$RSD (\text{ukupno}) = 1,69 \%$$

Kako bi se odredila preciznost kroz dulji vremenski period, prikupljeni su rezultati CFA metode koji su dobiveni analizom većeg broja uzoraka vina, voćnih vina i aromatiziranih vina (n=117). Provedena su mjerenja kroz 4 koncentracijska raspona odabranih uzoraka; $\leq 5 \text{ mg/L}$,

5 - 15 mg/L, 15 - 30 mg/L i 30 - 60 mg/L (tablica 4). Određena je preciznost (RSD_R , %) za raspone i ukupno. Za vrijednosti preciznosti kroz duži vremenski period (RSD_R) zadani kriterij validacije iznosi $RSD_R \leq 10$ %.

Tablica 4. Koncentracija slobodnog SO₂ (mg/L) dobivena CFA metodom u uzorcima vina s četiri koncentracijska raspona

\bar{x} (≤ 5 mg/L)	\bar{x} (5 - 15 mg/L)	\bar{x} (15 - 30 mg/L)	\bar{x} (30 - 60 mg/L)
2,55	5,3	14,95	31,1
2,75	5,65	15,2	32,05
3,05	6	15,4	32,5
	6,35	15,75	32,55
	6,65	15,95	32,75
	6,95	16,4	33,4
	7	16,55	33,8
	7,25	16,75	34,1
	7,65	17,2	34,85
	8,15	17,25	35,5
	8,55	17,85	35,5
	8,6	17,95	37,95
	8,7	18	40,4
	8,8	18	41,45
	9,2	18,6	41,5
	10,15	18,95	43
	10,35	19,3	44
	10,35	19,55	44,1
	10,4	19,55	46,25
	10,75	19,8	46,95
	10,8	20,1	48
	10,8	20,3	51,95
	10,9	20,3	54,5
	11,05	20,4	60,4
	11,1	21	
	11,35	21,05	
	11,7	21,1	
	11,9	21,25	
	12,2	21,35	
	12,45	21,75	
	12,5	22,1	
	12,75	22,45	
	12,85	22,5	
	12,9	24	
	13	24,7	

Tablica 4. Koncentracija slobodnog SO₂ (mg/L) dobivena CFA metodom u uzorcima vina s četiri koncentracijska raspona - *nastavak*

	13,4	25,25	
	13,7	25,35	
	14,05	25,35	
	14,1	25,75	
	14,2	25,85	
	14,55	26,45	
	14,6	26,9	
		27,1	
		27,15	
		27,95	
		29,2	
		30,05	
		30,25	

Dobivene vrijednosti su:

$$RSD_R (\leq 5 \text{ mg/L SO}_2) = 7,66 \%$$

$$RSD_R (5 - 15 \text{ mg/L SO}_2) = 2,07 \%$$

$$RSD_R (15 - 30 \text{ mg/L SO}_2) = 1,30 \%$$

$$RSD_R (30 - 60 \text{ mg/L SO}_2) = 1,04 \%$$

$$RSD_R (\text{ukupno}) = 3,02 \%$$

Rezultati preciznosti za svaki koncentracijski raspon i ukupne preciznosti zadovoljavaju kriterij validacije $RSD \leq 5 \%$. Vrijednosti preciznosti kroz duži vremenski period zadovoljavanju kriterij validacije $RSD_R \leq 10 \%$. I kod RSD i RSD_R vrijednosti uočljivo je da je nešto manja preciznost prisutna u uzorcima s niskom koncentracijom slobodnog SO₂ (< 5 mg/L), ali s obzirom na to da sve vrijednosti zadovoljavaju zadane kriterije može se zaključiti da metoda pokazuje odgovarajuću preciznost za dano područje mjerenja. Segundo i Rangel (2001) određivali su slobodni SO₂ sekvencijskom injekcijskom analizom (engl. *Sequential Injection Analysis, SIA*). RSD vrijednost dobivena je na temelju analize 2 uzorka vina, kroz 10 ponavljanja. RSD za vino čija je koncentracija slobodnog SO₂ iznosila 10,3 mg/L je 1,2 %, a za vino čija je koncentracija slobodnog SO₂ iznosila 23 mg/L je 0,8 %. Vrijednosti dobivene primjenom SIA metode također su u skladu s kriterijem $RSD \leq 5 \%$ pri čemu je isto kao i kod CFA metode vidljiva manja preciznost kod uzorka s nižom koncentracijom slobodnog SO₂.

Ivanova-Petropulos i Mitrev (2014) su određivali slobodni SO₂ metodom po Ripperu. Kroz 10 ponavljanja na 2 uzorka vina dobivene su koncentracije slobodnog SO₂ u vinima; \bar{x} (bijelo

vino) = 28,93 mg/L i \bar{x} (crno vino) = 13,82 mg/L. Određene su vrijednosti preciznosti; RSD (bijelo vino) = 2,28 % i RSD (crno vino) = 3,90 %, što zadovoljava zadani kriterij $RSD \leq 5 \%$. Za oba uzorka određene su i koncentracije slobodnog SO₂ u vinima kroz 5 različitih dana pri čemu su se za svaki uzorak provodila 3 mjerenja; \bar{x}_R (bijelo vino) = 29,01 mg/L i \bar{x}_R (crno vino) = 13,65 mg/L. Određene vrijednosti preciznosti iznosile su: RSD_R (bijelo vino) = 2,55 % i RSD_R (crno vino) = 5,41 %, što udovoljava zadanom kriteriju $RSD_R \leq 10 \%$. Uočljiva je manja preciznost mjerenja kroz 5 različitih dana, nego što je to kod uzastopnih mjerenja u istom danu. Kao i kod CFA metode bolja preciznost dobivena kod uzorka s većom koncentracijom slobodnog SO₂, tj. kod uzorka bijelog vina.

4.3.2. Ponovljivost (R)

Ponovljivost mjerenja (R) podrazumijeva preciznost ostvarenu pod jednakim uvjetima (identične kemikalije, identična aparatura, jedan laboratorij i analitičar, provedba kroz kraći vremenski period). Za utvrđivanje ponovljivosti CFA metode provedena su mjerenja u pet uzoraka vina (A-E) s koncentracijskim rasponima; ≤ 5 mg/L; ≤ 10 mg/L; ≥ 15 mg/L; ≥ 20 mg/L i ≥ 50 mg/L. Za svaki uzorak provedeno je 10 ponovljenih mjerenja. Za pojedini koncentracijski raspon određena je aritmetička sredina mjerenja (\bar{x}) i standardna devijacija (σ) (tablica 3). Određena je ponovljivost (R, mg/L) za raspone i ukupno.

Na temelju vrijednosti standardne devijacije (σ) određena je ponovljivost CFA metode (R). Kriterij za ponovljivost iznosi $R < 7$ mg/L. Ponovljivost metode izračuna se iz pripadajuće standardne devijacije (σ) 10 mjerenja prema formuli (8):

$$R = \sigma * 2,8 \text{ mg/L.} \quad [8]$$

Dobivene vrijednosti ponovljivosti iznose:

$$R (\leq 5 \text{ mg/L}) = 0,34 \text{ mg/L}$$

$$R (\leq 10 \text{ mg/L}) = 0,30 \text{ mg/L}$$

$$R (\geq 15 \text{ mg/L}) = 0,66 \text{ mg/L}$$

$$R (\geq 20 \text{ mg/L}) = 0,69 \text{ mg/L}$$

$$R (\geq 50 \text{ mg/L}) = 1,78 \text{ mg/L.}$$

Ukupna ponovljivost dobivena je izračunom aritmetičke sredine pojedinačnih R vrijednosti i iznosi:

$$R (\text{ukupno}) = 0,75 \text{ mg/L.}$$

Kako bi se odredila ponovljivost kroz dulji vremenski period, prikupljeni su rezultati CFA

metode koji su dobiveni analizom većeg broja uzoraka vina, voćnih vina i aromatiziranih vina (n = 117). Provedena su mjerenja kroz 4 koncentracijska raspona odabranih uzoraka; ≤ 5 mg/L, 5-15 mg/L, 15-30 mg/L i 30-60 mg/L (tablica 4). Određena je ponovljivost (R_R , mg/L) za raspone i ukupno.

Za vrijednosti ponovljivosti kroz duži vremenski period (R_R) zadani kriterij validacije iznosi $R_R < 7$ mg/L. Dobivene vrijednosti su:

$$R_R (\leq 5 \text{ mg/L SO}_2) = 0,59 \text{ mg/L}$$

$$R_R (5 - 15 \text{ mg/L SO}_2) = 0,53 \text{ mg/L}$$

$$R_R (15 - 30 \text{ mg/L SO}_2) = 0,78 \text{ mg/L}$$

$$R_R (30 - 60 \text{ mg/L SO}_2) = 1,21 \text{ mg/L}$$

$$R_R (\text{ukupno}) = 0,78 \text{ mg/L.}$$

Rezultati ponovljivosti za svaki koncentracijski raspon (R) i ukupne ponovljivosti (R (ukupno)) zadovoljavaju kriterij validacije $R < 7$ mg/L. Vrijednosti ponovljivosti kroz duži vremenski period također zadovoljavaju kriterij validacije $R_R < 7$ mg/L te se može zaključiti da metoda ima odgovarajuću ponovljivost za dano područje mjerenja. Kod raspona ≥ 50 mg/L za R i 30 - 60 mg/L za R_R ponovljivost je neznatno manja nego za ostale raspone ($R = 1,78$ mg/L i $R_R = 1,21$ mg/L) dok su vrijednosti za ostale raspone < 1 mg/L.

4.4. GRANICA DETEKCIJE (LOD) I GRANICA KVANTIFIKACIJE (LOQ)

Za izračun granice detekcije i granice kvantifikacije provodi se 10 ponovljenih mjerenja na jednom uzorku pri čemu se mjeri apsorbancija pri valnoj duljini od 546 nm (tablica 5). Apsorbancija predstavlja logaritam omjera između količine upadnog zračenja i propuštenog zračenja kroz uzorak (Englesko-hrvatski kemijski rječnik & glosar, 2022).

Tablica 5. Vrijednosti apsorbancije za 10 ponovljenih mjerenja

BROJ MJERENJA	Apsorbancija
1	417
2	391
3	400
4	422
5	395
6	395
7	406
8	407
9	396
10	415

Standardna devijacija dobivenih vrijednosti apsorbancija predstavlja standardnu devijaciju slijepe probe (S_rB0). Dobivene srednje vrijednosti apsorbancije ($B0$) i standardne devijacije slijepe probe (S_rB0) su:

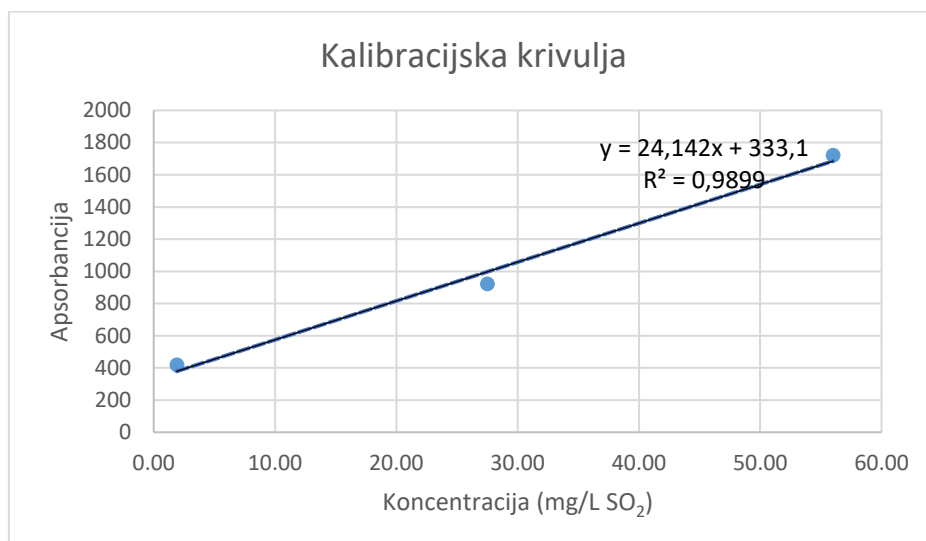
$$B0 = 404,40$$

$$S_rB0 = 10,7311.$$

Kalibracijski pravac konstruira na način da se CFA metodom odrede apsorbancije 3 kalibracijske točke u vinima s 3 koncentracijska raspona (tablica 6). Konstruira se dijagram u kojem se na x-osi nalaze vrijednosti koncentracija slobodnog SO_2 , a na y-osi vrijednosti apsorbancija. Iz dobivene jednadžbe očita se nagib pravca (a) (slika 17) koji se koristi za izračunavanje granice detekcije (LOD) i granice kvantifikacije (LOQ). LOD treba biti manji od LOQ.

Tablica 6. Kalibracijske točke za određivanje granice detekcije i granice kvantifikacije

Kalibracijski uzorci	Koncentracija (mg/L SO_2)	Apsorbancija
1	56,00	1721
2	27,50	921
3	1,90	419



Slika 17. Kalibracijska krivulja za određivanje granice detekcije (LOD) i granice kvantifikacije (LOQ)

4.4.1. Granica detekcije (LOD)

Granica detekcije (LOD) CFA metode predstavlja najnižu koncentraciju slobodnog SO₂ u uzorku koju je moguće identificirati, ali ne nužno i kvantitativno odrediti primjenom zadanih eksperimentalnih uvjeta. Računa se iz standardne devijacije slijepe probe (S_{rB0}) i nagiba kalibracijskog pravca (a) prema formuli (9):

$$\text{LOD} = (3,3 * S_{rB0}) / a \text{ (mg/L)}. \quad [9]$$

Izračunata granica detekcije iznosi LOD = 1,47 mg/L.

4.4.2. Granica kvantifikacije (LOQ)

Granica kvantifikacije (LOQ) CFA metode predstavlja najnižu koncentraciju slobodnog SO₂ u uzorku koju je moguće kvantitativno odrediti. Računa se iz standardne devijacije slijepe probe (S_{rB0}) i nagiba kalibracijskog pravca (a) prema formuli (10):

$$\text{LOQ} = (10 * S_{rB0}) / a \text{ (mg/L)}. \quad [10]$$

Izračunata granica kvantifikacije iznosi LOQ = 4,44 mg/L.

Budući da je LOQ > LOD može se zaključiti da se LOD = 1,47 mg/L i LOQ = 4,44 mg/L smatraju valjanima. Giménez-Gómez i sur. (2017) proveli su validaciju metode za određivanje slobodnog sumporovog dioksida uz pomoć plinsko-difuzijskog analitičkog sustava s detekcijom pH pri čemu su validiranu metodu uspoređivali s metodom po Ripperu i Paulu. Giménez-Gómez i sur. odredili su nešto nižu LOD u odnosu na CFA metodu (LOD = 0,5 mg/L), pri čemu je

njihova LOD vrijednost određena na temelju analize 70 uzoraka (izračunato na temelju IUPAC kriterija za potenciometrijske senzore).

4.5. RASPON

Potrebno je odrediti prihvatljive raspone za koncentraciju slobodnog SO₂ na temelju kriterija prihvatljivosti linearnosti. Prema informaciji proizvođača instrumenta raspon metode iznosi 2-80 mg/L. Eksperimentalno utvrđen raspon metode iznosi 3 - 60 mg/L. Sličan raspon za određivanje slobodnog SO₂ eksperimentalno su odredili su i Giménez-Gómez i sur. (2017) (1 - 60 mg/L) te Segundo i Rangel (2001) (2 - 40 mg/L).

5. ZAKLJUČCI

1. Instrumentalne metode za određivanje slobodnog SO₂ u vinu kao što su analiza kontinuiranog protoka (CFA), analiza protoka ubrizgavanja (FIA), sekvencijska injekcijska analiza (SIA) i dr. omogućuju brzu analizu velikog broja uzoraka što im daje prednost pred referentnim metodama, kao što su metoda po Frantz Paulu i Ripperu.
2. Da bi validacija metode bila uspješna potrebno je odrediti parametre validacije te isti parametri trebaju ispunjavati zadane kriterije. Za validaciju metode za određivanje slobodnog SO₂ u vinu primjenom analizatora kontinuiranog protoka (CFA) određeni su sljedeći parametri; linearnost, točnost (istinitost), preciznost, ponovljivost, granice detekcije i kvantifikacije te raspon. Navedeni parametri ispunili su zadane kriterije za validaciju te se može zaključiti da je metoda primjenjiva za dano područje mjerenja. Rezultati CFA metode uspoređivani su s rezultatima referentne OIV metode.
3. Određivanje selektivnosti nije primjenjivo jer se s postojećom konfiguracijom instrumenta CFA ne može određivati više komponenti istovremeno.
4. Dobiveni koeficijent korelacije ($r = 0,99$) zadovoljio je zadani kriterij za linearnost ($r \geq 0,98$).
5. Točnost je određena preko koeficijenta korelacije (r), apsolutnog i relativnog odstupanja (bias), Bland-Altmanovog dijagrama te Z vrijednosti. Svi odabrani parametri zadovoljili su zadane kriterije za točnost.
6. Preciznost metode (RSD) ispunjava zadani kriterij ($RSD \leq 5\%$). Preciznost mjerenja kroz duži vremenski period (RSD_R) također ispunjava zadani kriterij ($RSD_R \leq 10\%$). Nešto manja preciznost uočljiva je kod uzoraka s nižom koncentracijom slobodnog SO₂ (< 5 mg/L SO₂) s vrijednostima; $RSD = 3,06\%$ i $RSD_R = 7,66\%$.
7. Ponovljivost metode (R) ispunjava zadani kriterij ($R < 7,0$ mg/L). Ponovljivost mjerenja kroz duži vremenski period (R_R) također ispunjava zadani kriterij ($R_R < 7,0$ mg/L). Nešto manja ponovljivost uočljiva je kod uzoraka s većom koncentracijom slobodnog SO₂ s vrijednostima; $R (\geq 50$ mg/L) = 1,78 mg/L i $R_R (30-60$ mg/L) = 1,21 mg/L.
8. Granice detekcije (LOD = 1,47 mg/L) i kvantifikacije (LOQ = 4,44 mg/L) odgovaraju zadanom kriteriju $LOQ > LOD$.
9. Prema informaciji proizvođača uređaja raspon metode iznosi 2 - 80 mg/L slobodnog sumporovog dioksida, ali je eksperimentalno utvrđen raspon 3 - 60 mg/L, što potvrđuje linearan odziv metode u navedenom rasponu.

6. LITERATURA

Anonymous 1 (2016) Chemical Elements – Sulfur. <https://images-of-elements.com/sulfur.php> Pristupljeno 7. lipnja 2022.

Anonymous 2 (2022) Sulfur Powder.

<https://melscience.com/US-en/chemistry/reagents/62/> Pristupljeno 26. studenog 2022.

Burroughs LF, Sparks AH (1973) Sulphite-binding power of wines and ciders. II. Theoretical consideration and calculation of sulphite-binding equilibria. *J Sci Food Agric* **24**, 199–206. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740240212>

Christofi S, Malliaris D, Katsaros G, Panagou E, Kallithraka S (2020) Limit SO₂ content of wines by applying High Hydrostatic Pressure. *Innov Food Sci Emerg Technol* **62**, 102342. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102342>

Clarke RJ, Bakker J (2011) Wine flavour chemistry, 2. izd., Blackwell Publishing Ltd., Oxford <https://doi.org/10.1002/9781444346022>

Coetzee C, Brand J, Jacobson D, Du Toit WJ (2016) Sensory effect of acetaldehyde on the perception of 3-mercaptohexan-1-ol and 3-isobutyl-2-methoxypyrazine. *Aust J Grape Wine Res* **22**, 197– 204. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12206>

Danilewicz JC (2016) Reaction of oxygen and sulfite in wine. *Am J Enol Vitic* **67**, 13-17. <https://doi.org/10.5344/ajev.2015.15069>

De Azevedo LC, Reis MM, Motta LF, Da Rocha GO, Silva LA, De Andrade JB (2007) Evaluation of the formation of stability of hydroxyalkylsulfonic acids in wines. *J Agric Food Chem* **55**, 8670-80. <https://doi.org/10.1021/jf0709653>

El Darra NE, Grimi N, Maroun RG, Louka N, Vorobiev E. (2013) Pulsed electric field, ultrasound, and thermal pretreatments for better phenolic extraction during red fermentation. *Eur Food Res Technol* **236**, 47–56. <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1858-9>

FDA (2019) Guidelines for the Validation of Chemical Methods in Food, Feed, Cosmetics, and Veterinary Products 3rd Edition. U.S. Food and Drug Administration https://s27415.pcdn.co/wp-content/uploads/2020/01/64ER20-7/Validation_Methods/b-

[Chemical-Methods-Validation-Guidelines_3rd-ed_RSSC-508_final_12_06_19.pdf](#)

Pristupljeno: 4. studenog 2022.

Generalić E (2022) Apsorbancija. Englesko-hrvatski kemijski rječnik & glosar. 29 June 2022. KTF-Split. Pristupljeno 30 ožujka 2023. <https://glossary.periodni.com>

Giacosa S, Río Segade S, Cagnasso E, Caudana A, Rolle L, Gerbi V (2019) SO₂ in Wines: Rational Use and Possible Alternatives. U: Morata A (ured.) Red Wine Technology, Academic Press, New York, str. 309-321. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814399-5.00021-9>

Giménez-Gómez P, Gutiérrez-Capitán M, Puig-Pujol A, Capdevila F, Muñoz S, Tobeña A, Miró A, Jiménez-Jorquera C (2017) Analysis of free and total sulfur dioxide in wine by using a gas-diffusion analytical system with pH detection. *Food Chem* **228**, 518-525. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.026>.

Gomathi Devi L, ArunaKumari ML (2014) Synergistic effect between orthorhombic α -Sulfur and TiO₂ as co-photocatalysts for efficient degradation of methylene blue: A mechanistic approach. *J Mol Catal A Chem* **391**, 99-104. <https://doi.org/10.1016/j.molcata.2014.04.012>

Gorman-McAdams M (2009) Sulfites in wine. The myths, the facts, and the truth. <http://www.thekitchn.com/sulfites-in-wine-necessary-or-100878> Pristupljeno: 8. kolovoza 2022.

Grgić Z (2019) Odabir, verifikacija i validacija laboratorijskih metoda. *Svijet po mjeri* **1**, 3-6.

Guerrero RF, Cantos-Villar E. (2015) Demonstrating the efficiency of sulphur dioxide replacements in wine: A parameter review. *Trends Food Sci Technol* **42**, 27-43. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.11.004>

Henderson P (2014) Sulfur dioxide the science behind this anti-microbial, anti-oxidant wine additive. *The Free Library* (January, 1) [https://www.thefreelibrary.com/Sulfur dioxide the science behind this anti-microbial, anti-oxidant...-a0358572559](https://www.thefreelibrary.com/Sulfur+dioxide+the+science+behind+this+anti-microbial,+anti-oxidant...-a0358572559) Pristupljeno 9. kolovoza 2022.

Hou C-Y, Hou Z-T., Lin C-M., Shih M-K, Chen Y-W, Lai Y-H (2020) Adding α -pinene as a novel application for sulfur dioxide-free in red wine. *Int J Food Prop* **23**, 167–177. <https://doi.org/10.1080/10942912.2020.1716798>

ICH Q2(R1) (2005) Validation of analytical procedures: Text and methodology. The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. <https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf> Pristupljeno: 4. studenog 2022.

Ivanova-Petropulos V, Mitrev S (2014) Determination of SO₂ and reducing sugars in Macedonian wines. Yearbook - Faculty of Agriculture

Jackowetz JN, Dierschke S, de Orduña RM (2011) Multifactorial analysis of acetaldehyde kinetics during alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Res Int* **44**, 310-316. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.10.014>

Jiranek V, Langridge P, Henschke PA (1995) Regulation of hydrogen sulfide liberation in wine producing *Saccharomyces cerevisiae* strains by assimilable nitrogen. *Appl Environ Microbiol* **61**, 461–467. <https://doi.org/10.1128/aem.61.2.461-467.1995>

Kojić N (2019) Djelovanje sumporovog dioksida u vinu. *Glasnik zaštite bilja* **42**, 86-92. <https://doi.org/10.31727/gzb.42.6.11>

Kreitman GY, Elias RJ, Jeffery DW, Sacks GL (2018) Loss and formation of malodourous volatile sulfhydryl compounds during wine storage. *Crit Rev Food Sci Nutr* **5**, 1–24. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1427043>

Lambri M, Torchio F, Colangelo D, Segade SR, Giacosa S, De Faveri DM, Gerbi V, Rolle L (2015) Influence of different berry thermal treatment conditions, grape anthocyanin profile, and skin hardness on the extraction of anthocyanin compounds in the colored grape juice production. *Int Food Res J* **77**, 584-590. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.08.027>

Lazarić K (2012) Validacija analitičkih metoda–osnovna načela. *Svijet po mjeri* **1**, 61-64.

Lazarić K., Gašljević V (2002) Validacija analitičkih metoda, materijali edukacijskog tečaja, Zagreb.

Lukić K, Tomašević M, Ćurko N, Sivrić A, Ružman E, Kovačević Ganić K. (2019) Influence of non-thermal processing techniques on sulfur dioxide and oxygen concentrations in young and aged wines. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* **14**, 65-75. <https://doi.org/10.31895/hcptbn.14.3-4.7>

Maithani M, Singh R (2011) Development and Validation of a Stability- Indicating HPLC Method for the Simultaneous Determination of Salbutamol Sulphate and Theophylline in Pharmaceutical Dosage Forms. *J Anal Bioanal Tech* **1**, 116. <https://doi.org/10.4172/2155-9872.1000116>

Može Bornšek Š, Polak T, Skrt M, Demšar L, Poklar Ulrih N, Abram V. (2015) Effects of industrial and home-made spread processing on bilberry phenolics. *Food Chem* **173**, 61–69. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.005>

Muller N, Rauhut D (2018) Recent development on the origin and nature of reductive sulfurous off-odours in wine. *Fermentation* **4**, 62. <https://doi.org/10.3390/fermentation4030062>

National Center for Biotechnology Information (2022a) PubChem Element Summary for AtomicNumber 16, Sulfur. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/element/Sulfur> Pristupljeno 7. lipnja 2022.

National Center for Biotechnology Information (2022b) PubChem Compound Summary for CID 1119, Sulfur dioxide. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/sulfur-dioxide> Pristupljeno 2. srpnja 2022.

National Center for Biotechnology Information (2022c) Sulfur dioxide – Compound <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/sulfur-dioxide#section=2D-Structure> Pristupljeno 2. srpnja 2022.

National Center for Biotechnology Information (2022d) alpha-Pinene – Molecular Formula <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/alpha-Pinene#section=Molecular-Formula> Pristupljeno 28. studenog 2022.

National Center for Biotechnology Information (2022e) Hydroxytyrosol – Compound Summary <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/82755> Pristupljeno: 28. studenog 2022.

OIV (2010) Guidelines for automated colorimetric analysers in oenology. Resolution OIV/OENO 391/2010

OIV (2019): Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis. International Organization of Vine and Wine. Paris

OIV (2021) SO₂ and Wine: A Review. OIV - International Organisation of Vine and Wine, <https://www.oiv.int/public/medias/7840/oiv-collective-expertise-document-so2-and-wine-a-review.pdf> Pristupljeno: 5. kolovoza 2022.

Oliveira CM, Ferreira ACS, De Freitas V, Silva AMS (2011) Oxidation mechanisms occurring in wines. *Food Res Int* **44**, 1115-1126. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.050>

Pravilnik (2004) Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina. Narodne novine 106, Zagreb. https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2004_07_106_2060.html Pristupljeno: 14. siječnja 2023.

Pravilnik (2005) Pravilnik o provođenju analitičkih metoda i tumačenju rezultata. Narodne novine 2, Zagreb. https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2005_01_2_16.html Pristupljeno: 4. studenog 2022.

Pravilnik (2022) Pravilnik o vinarstvu. Narodne novine 81, Zagreb. https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2022_07_81_1183.html Pristupljeno 6. siječnja 2023.

Qin G, Meng Z (2009) Effects of sulfur dioxide derivatives on expression of oncogenes and tumor suppressor genes in human bronchial epithelial cells. *Food Chem Toxicol* **47**, 734–744. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.01.005>

Rankine BC (1973) Heat extraction of color from red grapes of increasing importance. *Wines and vines* **54**, 33-36.

Rauhut D, Kürbel H (1994) The production from H₂S from elemental sulfur residues during fermentation and its influence on the formation of sulfur metabolites causing off-flavours in wine. *Vitic Enol Sci* **49**, 27–36.

Ribéreau-Gayon P, Dubourdieu D, Doneche B, Lonvaud A (2021) The use of sulfur dioxide in must and wine treatment. U: Handbook of Enology Vol. 1. The Microbiology of Wine and Vinifications, 3. izd., John Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK, str. 243-277.

Rodríguez K, Ah-Hen KS, Vega-Gálvez A, Vásquez V, Quispe-Fuentes I, Rojas P, Lemus-Mondaca R (2016) Changes in bioactive components and antioxidant capacity of maqui, *Aristotelia chilensis* [Mol] Stuntz, berries during drying. *Lwt-Food Sci Technol* **65**, 537–542. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.08.050>

Royal Society of Chemistry (2022) Sulfur - Element information, properties and uses | Periodic Table (rsc.org) <https://www.rsc.org/periodic-table/element/16/sulfur> Pristupljeno 7. lipnja 2022.

Segundo MA, Rangel AOSS (2001) A gas diffusion sequential injection system for the determination of sulphur dioxide in wines. *Anal Chim Acta* **427** (2001) 279–286. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)01197-1](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)01197-1)

Tao Y, Sun D, Górecki A, Wioletta B, Lamparski G, Amarowicz R, Jeli T. (2012) Effects of high hydrostatic pressure processing on the physicochemical and sensorial properties of a red wine. *Innov Food Sci Emerg Technol* **16**, 409–416. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2012.09.005>

Tomas D, Kolovrat D (2014) Priručnik za proizvodnju vina -za male proizvođače i hobiste. Federalni agromediteranski zavod, Mostar.

Ugliano M (2013) Oxygen Contribution to Wine Aroma Evolution during Bottle Aging. *J Agric Food Chem* **61**, 6125–6136. <https://doi.org/10.1021/jf400810v>

Uredba Komisije (2009) Uredba Komisije (EZ) br. 606/2009 od 10. srpnja 2009. o utvrđivanju određenih detaljnih pravila za provedbu Uredbe Vijeća (EZ) br. 479/2008 u pogledu kategorija proizvoda od vinove loze, enoloških postupaka i primjenjivih ograničenja. *Službeni list Europske Unije* **3**, 291-294. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/?uri=CELEX%3A32009R0606> Pristupljeno 6. siječnja 2023.

Vally H, Thompson PJ (2001) Role of sulphite additives in wine induced asthma: single dose and cumulative dose studies. *Thorax* **56**, 763–769. <http://dx.doi.org/10.1136/thorax.56.10.763>

Vally H, Thompson PJ (2003) Allergic and asthmatic reactions to alcoholic drinks. *Addict Biol* **8**, 3–11. <https://doi.org/10.1080/1355621031000069828>

van Wyk S, Silva FVM (2017) High pressure processing inactivation of *Brettanomyces bruxellensis* in seven different table wines. *Food Control* **81**, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.05.028>

Van Wyk S, Farid MM, Silva FVM (2018) SO₂, high pressure processing and pulsed electric field treatments of red wine: Effect on sensory, *Brettanomyces* inactivation and other quality parameters during one year storage. *Innov Food Sci Emerg Technol* **48**, 204–211. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.06.016>

Waterhouse AL, Sacks GL, Jeffery DW (2016) Sulfur dioxide. U: Understanding Wine Chemistry. John Wiley & Sons, UK, 140-148.

West MJ (1999) Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: issues of precision and bias. *Trends Neurosci* **22**, 51-61. [https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(98\)01362-9](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(98)01362-9)

Yıldırım H, Darıcı B (2020) Alternative methods of sulfur dioxide used in wine production. *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci* **9**, 675-687. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2020.9.4.675-687>.

Yildirim HK, Isci B, Altindisli A (2015) Chemometric and Phenolic Attributes of Blended Wines Assessed by Multivariate Techniques. *J Inst Brew* **121**, 636-641. <https://doi.org/10.1002/jib.258>

Zea L, Serratos MP, Mérida J, Moyano L (2015) Acetaldehyde as Key Compound for the Authenticity of Sherry Wines: A Study Covering 5 Decades. *Compr Rev Food Sci Food Saf* **14**, 681-693. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12159>

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja LUCIJA DIZDAR izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Vlastoručni potpis