31999R0761

KOMISIJOS REGLAMENTAS (EB) Nr. 761/1999

1999 m. balandžio 12 d.

iš dalies keičiantis Reglamentą (EEB) Nr. 2676/90, nustatantį vynų analizės metodus Bendrijoje

EUROPOS BENDRIJŲ KOMISIJA,

atsižvelgdama į Europos bendrijos steigimo sutartį,

atsižvelgdama į 1987 m. kovo 16 d. Tarybos reglamentą (EEB) Nr. 822/87 dėl bendro vyno rinkos organizavimo ([1]) su paskutiniais pakeitimais, padarytais Reglamentu (EB) Nr. 1627/98 ([2]), ypač į jo 74 straipsnį,

kadangi Komisijos reglamento (EEB) Nr. 2676/90 priedas ([3]) su paskutiniais pakeitimais, padarytais Reglamentu (EB) Nr. 822/97 ([4]), apibūdina analizės metodus; kadangi 20 skyriuje aprašytas D-obuolių rūgšties analizės metodas pasirodė esąs ne visiškai tikslus, ir yra parengtas naujas, tikslesnis metodas; kadangi parengtas naujas, jautresnis ir lengviau taikomas cianido darinių analizės metodas; kadangi tarptautiniu lygiu parengtas naujas etilo karbamido vyne nustatymo metodas; kadangi šie trys metodai įteisinti remiantis tarptautiniu lygiu pripažintais kriterijais; kadangi taikant šiuos metodus galima užtikrinti geresnę vyno kokybės ir autentiškumo kontrolę ir išvengti ginčų, kylančių dėl pasenusių ir ne visiškai patikimų analizės metodų taikymo; kadangi naujųjų metodų aprašus patvirtino Tarptautinis vynuogių ir vynų biuras; kadangi juos reikia įtraukti į šį reglamentą;

kadangi šiame reglamente numatytos priemonės atitinka Vyno vadybos komiteto nuomonę,

PRIĖMĖ ŠĮ REGLAMENTĄ:

1 straipsnis

Reglamento (EEB) Nr. 2676/90 priedas iš dalies keičiamas taip:

1) 20 skyrius (D-obuolių rūgštis) pakeičiama šio reglamento I priedu;

2) 38 skyrius (Cianido dariniai) pakeičiamas šio reglamento II priedu;

3) šio reglamento III priedas pridedamas kaip 44 skyrius.

2 straipsnis

Šis reglamentas įsigalioja septintą dieną po jo paskelbimo *Europos Bendrijų oficialiajame leidinyje*.

Šis reglamentas yra privalomas visas ir tiesiogiai taikomas visose valstybėse narėse.

Priimta Briuselyje, 1999 m. balandžio 12 d.

Komisijos vardu

Franz FISCHLER

Komisijos narys

([1]) OL L 84, 1987 3 27, p. 1.
([2]) OL L 210, 1998 7 28, p. 10.
([3]) OL L 272, 1990 10 3, p. 1.
([4]) OL L 117, 1997 5 7, p. 10.

I PRIEDAS

„20. **D-OBUOLIŲ RŪGŠTIS**

(fermentinis metodas)

1. METODŲ ESMĖ

Vykstant D-obuolių rūgšties druskos dehidracijai (D-MDH), D-obuolių rūgštis (D-obuolių rūgšties druska), veikiant nikotinamido adenino dinukleotidui (NAD), oksiduojasi į oksalacetatą. Susidaręs oksalacetatas suskyla į piruvatą ir karbonato rūgštį.

$$\text{D-malatas} + NAD^+ \overset{\text{D-MDH}}{\rightleftharpoons} \text{piruvatas} + CO_2 + NADH + H^+$$

Susidariusio NADH kiekis yra proporcingas D-obuolių rūgšties koncentracijai ir yra nustatomas, kai bangos ilgis yra 334, 340 arba 365 nm.

2. REAGENTAI

Bandymų rinkinys apie 30 nustatymų:

a) buteliukas Nr. 1 su maždaug 30 ml Hepes neutralizatoriaus [N-(2-hidroksietilo) piperazino-N-2- etansulfonrūgštis] pH = 9,0 ir stabilizatoriai;

b) buteliukas Nr. 2 su maždaug 210 mg NAD liofilizato;

c) trys buteliukai Nr. 3 su D-MDH liofilizatu, – maždaug po 8 vienetus kiekviename.

Tirpalų paruošimas

1. Buteliuko Nr. 1 turinys naudojamas neskiestas. Prieš naudojimą tirpalas turi sušilti iki 20–25 °C.

2. Buteliuko Nr. 2 turinys praskiedžiamas su 4 ml dvigubai distiliuoto vandens.

3. Vieno iš trijų butelių Nr. 3 turinys praskiedžiamas su 0,6 ml dvigubai distiliuoto vandens. Prieš naudojimą tirpalas turi sušilti iki 20–25 °C.

Tirpalų patvarumas

Buteliuko Nr. 1 turinys tinka naudoti vienerius metus, laikant jį + 4 °C temperatūroje; tirpalas Nr. 2 tinka naudoti tris savaites, jei laikomas + 4 °C temperatūroje, ir du mėnesius, jei laikomas – 20 °C temperatūroje; tirpalas Nr. 3 tinka naudoti penkias dienas, laikant jį + 4 °C temperatūroje.

3. APARATŪRA

3.1. Spektrofotometras, kuriuo matuojama, kai bangos ilgis yra 340 nm, nes tuomet NADH absorbcija yra maksimali. Jei aukščiau minėto prietaiso gauti neįmanoma, tai galima naudoti spektrofotometrą su diskretinio spektro šaltiniu, kuris leidžia atlikti matavimus, kai bangos ilgis yra 334 nm ar 365 nm. Kadangi atliekami absoliučios absorbcijos matavimai (t. y. nenaudojamas kalibravimo tirpalų komplektas, o atsižvelgiama į NADH gesimo koeficientą), reikia tikrinti bangų ilgio diapazonus ir aparato spektro absorbciją.

3.2. 1 cm storio optinio kelio stiklo kiuvetės (taip pat galima naudoti vienkartines kiuvetes).

3.3. Mikropipetės, su kuriomis galima paimti 0,01 ml ir 2 ml.

4. BANDINIO PARUOŠIMAS

D-obuolių rūgšties analizė paprastai atliekama tiesiogiai tiriant vyną, prieš tai neatlikus dekolorizacijos.

D-obuolių rūgšties kiekis kiuvetėje turi būti nuo 2 μg iki 50 μg. Todėl vyną reikia praskiesti, kad D-obuolių rūgšties koncentracija būtų atitinkamai nuo 0,02 g/l iki 0,5 g/l arba nuo 0,02 g/l iki 0,3 g/l.

Praskiedimo lentelė:

Apytikris D-obuolių rūgšties kiekis litre		Praskiedimas vandeniu	Praskiedimo faktorius F
Bangos ilgis matuojant:			
340 arba 334 nm	365 nm		
0,3 g	0,5 g	—	1
0,3–3,0 g	0,5–5,0 g	1 + 9	10

5. DARBO EIGA

Nustačius 340 nm spektrofotometro bangos ilgį, naudojant 1 cm kiuvetes nustatoma absorbcija; nulinė absorbcija nustatoma pagal orą (kai optiniame kelyje nėra kiuvetės), arba pagal vandenį.

Į kiuvetes pipete įlašinama:

	Pavyzdinis tirpalas	Tiriamasis tirpalas
Tirpalas Nr. 1	1,00 ml	1,00 ml
Tirpalas Nr. 2	0,10 ml	0,10 ml
Dvigubai distiliuotas vanduo	1,80 ml	1,70 ml
Matuojamas bandinys	—	0,10 ml

Sumaišius ir palaukus maždaug šešias minutes, išmatuojama pavyzdinio ir tiriamojo tirpalo absorbcija (A_1).

Papildoma:

	Pavyzdinis tirpalas	Tiriamasis tirpalas
Tirpalas Nr. 3	0,05 ml	0,05 ml

Sumaišius ir palaukus, kol pasibaigs reakcija (maždaug 20 minučių), išmatuojama pavyzdinio ir tiriamojo tirpalo absorbcijos (A_2).

Apskaičiuojamas pavyzdinio ($\Delta A\gamma$) ir tiriamojo (ΔAE) tirpalų absorbcijos skirtumas ($A_2 - A_1$). Pabaigoje apskaičiuojamas šių skirtumų skirtumas: $\Delta A = \Delta A_E - \Delta A_\gamma$.

Pastaba: įvairių bandinių partijų fermentų aktyvumui pasibaigti reikalingas laikas gali skirtis. Anksčiau nurodytas laikas yra tik orientacinis; kiekvienos bandinių partijos laiką rekomenduojama nustatyti atskirai.

D-obuolių rūgštis reaguoja greitai. Fermentas pakeičia ir L vyno rūgštį – tiesa, žymiai lėčiau. Todėl kyla nesmarki šalutinė reakcija, kurią galima pakoreguoti ekstrapoliuojant (žr. A priedėlį).

6. REZULTATŲ UŽRAŠYMAS

Bendra formulė, pagal kurią apskaičiuojama koncentracija mg/l, yra tokia:

$$C : \frac{V \times PM}{\varepsilon \times d \times v} \times \Delta A$$

čia:

V = tiriamojo tirpalo tūris mililitrais (2,95 ml)

v = bandinio tūris mililitrais (0,1 ml)

PM = medžiagos, kurią reikia nustatyti, molekulinė masė (D-obuolių rūgšties PM = 134,09)

d = kiuvetės optinis kelias centimetrais (1 cm)

ε = NADH absorbcijos koeficientas:

esant 340 nm bangos ilgiui = 6,3 (1 $mmol^{-1}$ cm^{-1})

esant 365 nm bangos ilgiui = 3,4 (1 $mmol^{-1}$ cm^{-1})

esant 334 nm bangos ilgiui = 6,18 (1 $mmol^{-1}$ cm^{-1}).

Jeigu bandinys ruošiant buvo praskiestas, rezultatas padauginamas iš praskiedimo faktoriaus.

D-obuolių rūgšties koncentracija nurodoma miligramais viename litre (mg/l) be skaitmenų po dešimtainės trupmenos kablelio.

7. TIKSLUMAS

Detalūs metodo tikslumo tarplaboratorinio bandymo duomenys apibendrinti B priedėlyje. Tarplaboratoriniais bandymais nustatyti dydžiai negali būti taikomi kitokioms analitinių medžiagų apimtims ir matricoms, negu nurodyta B priedėlyje.

7.1. **Pakartojamumas**

Dviejų atskirų rezultatų, gautų tiriant tą pačią medžiagą, absoliutus skirtumas, laborantui ją ištyrus tuo pačiu aparatu per trumpiausią laiko tarpą, daugiau kaip 5 % atvejų neviršija pakartojamumo vertės r.

r = 11 mg/l.

7.2. **Atkuriamumas**

Dviejų atskirų rezultatų, gautų tiriant tą pačią medžiagą, absoliutus skirtumas, tiriant medžiagą dviejose skirtingose laboratorijose, daugiau kaip 5 % atvejų neviršija atkuriamumo vertės R.

R = 20 mg/l.

8. PASTABOS

Atsižvelgiant į šio metodo tikslumo laipsnį, mažesnius negu 50 mg/l D-obuolių rūgšties kiekius, jeigu būtina, galima patvirtinti kitu analizės būdu, taikant kitokį matavimo principą, kaip antai Przyborskio *et al*. principą (*Mitteilungen Klosterneuburg* 43, 1993; 215–218. 1993).

Kad polifenoliai nenuslopintų fermentų aktyvumo, vyno bandinys kiuvetėje neturėtų viršyti 0,1 ml.

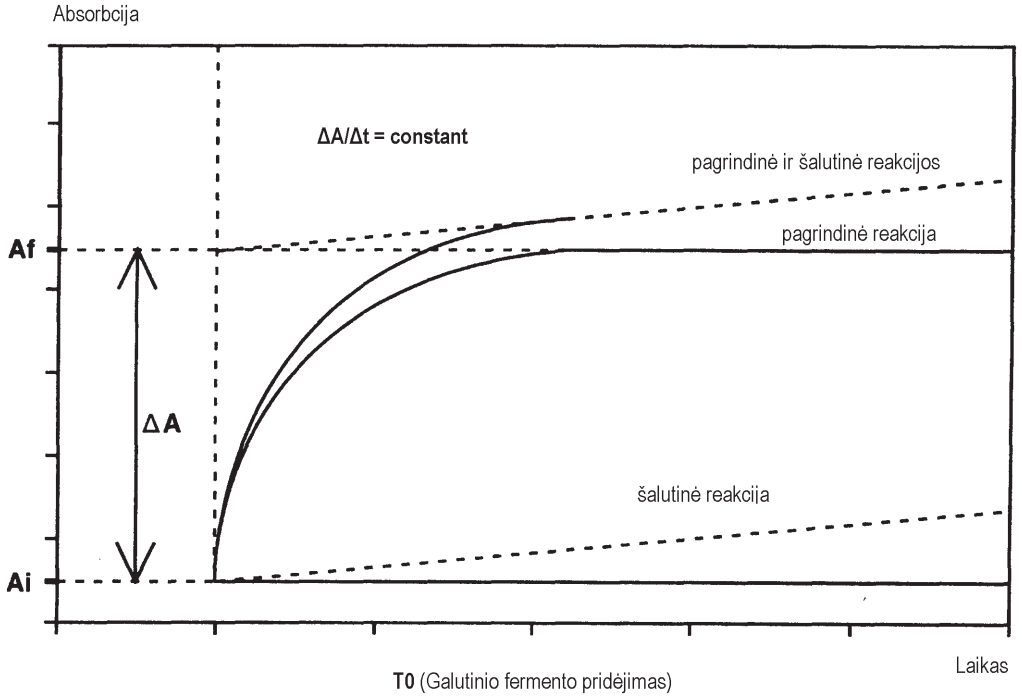
A priedėlis

Kaip elgtis, kai kyla šalutinės reakcijos

Šalutinės reakcijas dažniausiai sukelia fermento antrinės reakcijos, bandinio matricoje esantys kiti fermentai arba dviejų ar daugiau matricos elementų tarpusavio sąveika su fermentinės reakcijos bendruoju faktoriumi.

Kai reakcija vyksta normaliai, absorbcijos dydis po kiek laiko – paprastai praėjus nuo 10 iki 30 minučių (tai priklauso nuo konkrečios fermentinės reakcijos greičio), tampa pastovus. Tačiau jeigu kyla antrinės reakcijos, absorbcijos dydis nenusistovi, o laikui bėgant tolydžio auga. Tokį procesą įprasta vadinti šalutine reakcija.

Jeigu kyla šalutinė reakcija, praėjus laikui, per kurį standartinis tirpalas pasiekia galutinę absorbciją, tirpalo absorbciją reikia matuoti reguliariais laiko tarpais (kas dvi ar kas penkias minutes). Jeigu absorbcija tolydžio didėja, reikia atlikti šeis ar septynis matavimus ir juos ekstrapoliuoti grafiškai arba skaičiuojant. taip nustatoma absorbcija, kuri būtų gauta pridėjus galutinį fermentą (T0). Substrato koncentracija skaičiuojama pagal tuo laiku ekstrapoliuotą absorbcijos skirtumą (Af – Ai).



Absorbcija

B priedėlis

Statistiniai tarplaboratorinio bandymo rezultatai

Tarplaboratorinio bandymo atlikimo metai: 1995

Laboratorijų skaičius: 8

Bandinių kiekis: 5 pridėjus D obuolių rūgšties

Bandinys	A	B	C	D	E
Laboratorijų skaičius, likęs eliminavus nenormalius rezultatus pateikusias laboratorijas	7	8	7	8	7
Nenormalius rezultatus pateikiančių laboratorijų skaičius	1	—	1	—	1
Priimtų rezultatų skaičius	35	41	35	41	36
Vidutinis ($\bar{\chi}$)dydis (mg/l)	161,7	65,9	33,1	106,9	111,0
Standartinis pasikartojamumo nuokrypis (sr) (mg/l)	4,53	4,24	1,93	4,36	4,47
Santykinis standartinis pasikartojamumo nuokrypis (RSDr) (%)	2,8	6,4	5,8	4,1	4,00
Pasikartojamumo riba (r) (mg/l)	12,7	11,9	5,4	12,2	12,5
Standartinis atkuriamumo nuokrypis (sR) (mg/l)	9,26	7,24	5,89	6,36	6,08
Santykinis standartinis atkuriamumo nuokrypis (RSDR) (%)	5,7	11	17,8	5,9	5,5
Atkuriamumo riba (R) (mg/l)	25,9	20,3	16,5	17,8	17,0

Bandinių rūšys:

A: raudonasis vynas B: raudonasis vynas C: baltasis vynas D: baltasis vynas E: baltasis vynas;“

II PRIEDAS

„38. **CIANIDO DARINIAI**

(*Įspėjimas:* būtina laikytis saugos priemonių, numatytų dirbant su tokiais chemikalais, kaip antai: chloraminas T, piridinas, kalio cianidas, druskos rūgštis ir fosforo rūgštis. Panaudoti produktai turi būti šalinami tinkamai, laikantis galiojančių aplinkosaugos taisyklių. Saugotis rūgštinto vyno distiliacijos metu išsiskiriančios ciano vandenilio rūgšties.)

1. METODŲ ESMĖ

Visa vyne esanti laisva ciano vandenilio rūgštis išsiskiria vykstant rūgštinei hidrolizei. Ji atskiriama distiliuojant. Įvykus reakcijai su chloraminu T ir piridinu, susidaręs gliutamino dialdehidas randamas kolorimetrijos būdu pagal mėlyną spalvą, kurią jis sudaro su 1,3 dimetil barbitūro rūgštimi.

2. APARATŪRA

2.1. **Distiliavimo aparatas**

Naudojamas alkoholio kiekiui vyne nustatyti skirtas distiliavimo aparatas.

2.2. 500 ml talpos apvaliadugnė kolba su standartizuotomis šlifuotomis jungtimis

2.3. Termostatu kontroliuojama vandens vonia, palaikant 20 °C temperatūrą

2.4. Spektrofotometras, kuriuo galima matuoti absorbciją esant 590 nm bangos ilgiui

2.5. Stiklinės arba vienkartinės kiuvetės, turinčios 20 mm optinį kelią.

3. REAGENTAI

3.1. 25 % (m/v) fosforo rūgštis (H_3PO_4)

3.2. 3 % (m/v) chloramino T tirpalas ($C_7H_7ClNNaO_2S, 3H_2O$)

3.3. 1,3 dimetil barbitūro rūgšties tirpalas: 3,658 g dimetil barbitūro rūgšties ($C_6H_8N_2O_3$) ištirpinama 15 ml piridino ir 3 ml druskos rūgšties (ρ_{20} = 1,19 g/ml) ir įpilama 50 ml distiliuoto vandens.

3.4. Kalio cianidas (KCN)

3.5. 10 % (m/v) kalio jodido (KI) tirpalas

3.6. Sidabro nitrato ($AgNO_3$) tirpalas, 0,1 M

4. DARBO EIGA

4.1. **Distiliavimas**

Į 500 ml talpos kolbą (žr. 2.2 punktą) įpilama 25 ml vyno, 50 ml distiliuoto vandens, 1 ml fosforo rūgšties (žr. 3.1 punktą) ir įdedami keli stiklo rutuliukai. Kolba iš karto uždedama ant distiliavimo aparato. Distiliatas smailėjančiu vamzdžiu nuvedamas į 50 ml talpos kalibruotą kolbą, kurioje yra 10 ml vandens. Kalibruota kolba panardinama lediniame vandenyje. Į kalibruotą kolbą surenkama nuo 30 iki 35 ml distiliato (arba iš viso apie 45 ml skysčio).

Smailėjantis kondensatoriaus vamzdelis praskalaujamas keliais mililitrais distiliuoto vandens, distiliatas pašildomas iki 20 °C temperatūros, ir iki kalibravimo linijos pripilama distiliuoto vandens.

4.2. **Matavimas**

25 ml distiliato įpilama į 50 ml talpos kūginę kolbą su šlifuotu stikliniu kamščiu, į jį įpilama 1 ml chloramino T tirpalo (žr. 3.2 punktą) ir sandariai užkemšama kamščiu. Praėjus lygiai 60 sekundžių įpilama 3 ml 1,3 dimetil barbitūro rūgšties tirpalo (žr. 3.3 punktą), sandariai užkemšama kamščiu ir palaikoma 10 minučių. Po to 20 mm optinį kelią turinčiose kiuvetėse, esant 590 nm bangos ilgiui, išmatuojama absorbcija, palyginant su kontroliniu tirpalu (25 distiliuoto vandens vietoj 25 ml distiliato).

5. KALIBRAVIMO KREIVĖS BRAIŽYMAS

5.1. **Kalio cianido argentometrinis titravimas**

Apie 0,2 g tiksliai atseikėto KCN (žr. 3.4 punktą) ištirpinama 100 ml vandens 300 ml kalibruotoje kolboje. Įpylus 0,2 ml kalio jodido tirpalo (žr. 3.5 punktą), titruojama 0,1 M sidabro nitrato tirpalu (žr. 3.6 punktą), kol atsiranda stabili gelsva spalva.

Laikant, kad 13,2 mg KCN yra 1 ml 0,1 M sidabro nitrato tirpalo, apskaičiuojama KCN bandinio koncentracija.

5.2. **Standartinė kreivė**

5.2.1. *Standartinių tirpalų paruošimas*

5.1 punkte nurodyta tvarka nustačius KCN koncentraciją, paruošiamas standartinis tirpalas, turintis 30 mg/l ciano vandenilio rūgšties (30 mg HCN 72,3 mg KCN). Tirpalas praskiedžiamas 1/10 santykiu.

1,0 ml, 2,0 ml, 3,0 ml, 4,0 ml ir 5,0 ml praskiesto bandinio supilama į 100 ml talpos kalibruotas kolbas, kurios iki kalibravimo linijos pripilamos vandens. Paruošti tirpalai viename litre turi atitinkamai 30 µg, 60 µg, 90 µg, 120 µg ir 150 µg.

5.2.2. *Titravimas*

Paėmus tokiu būdu gautų tirpalų bandinius, atliekami 4.1 ir 4.2 punktuose aprašyti veiksmai.

Gauti absorbcijos dydžiai, standartinius tirpalus laikant atitinkamo ciano vandenilio rūgšties kiekio funkcija, sudaro tiesę, einančią per koordinačių susikirtimo tašką.

6. REZULTATŲ UŽRAŠYMAS

Ciano vandenilio rūgštis nurodoma mikrogramais viename litre (µg/l), be skaitmenų po dešimtainės trupmenos kablelio.

6.1. **Skaičiavimo metodas**

Pagal kalibracinę kreivę nustatomas ciano vandenilio rūgšties kiekis. Jeigu bandinys praskiestas, rezultatas padauginamas iš praskiedimo faktoriaus.

Pakartojamumas (r) ir atkuriamumas (R)

Baltojo vyno = r = 3,1 µg/l arba apytikriai 6 % · x_i

R = 12 µg/l arba apytikriai 25 % · x_i

Raudonojo vyno = r = 6,4 µg/l arba apytikriai 8 % · x_i

R = 23 µg/l arba apytikriai 29 % · x_i

x_i = vidutinė HCN koncentracija vyne

x_i = 48,4 µg/l baltajame vyne

x_i = 80,5 µg/l raudonajame vyne.“

III PRIEDAS

44. **ETILO KARBAMIDO KIEKIO VYNE NUSTATYMAS: ATRANKINIO APTIKIMO METODAS, TAIKANT DUJŲ CHROMATOGRAFIJĄ IR MASIŲ SPEKTROMETRIJĄ**

(Taikoma nustatant etilo karbamido kiekį, esant nuo 10 iki 200 μg/l koncentracijoms)

spėjimas: būtina laikytis saugos priemonių, numatytų dirbant su tokiais chemikalais, kaip antai: etanolis, acetonas ir kancerogeniniai produktai (etilo karbamidas ir dichlormetanas). Panaudoti produktai turi būti šalinami tinkamai, laikantis galiojančių aplinkosaugos taisyklių.)

A. **Metodų esmė**

Propilo karbamido į bandinį įpilama pagal vidinį standartą, tirpalas praskiedžiamas vandeniu ir supilamas į 50 ml kietos fazės ekstrakcijos stulpelį. Etilo karbamidas ir propilo karbamidas išplaunami dichlormetanu.

Eliuatas sodrinamas vakuuminiame rotaciniame garintuve. Koncentratas ištiriamas dujinės chromatografijos (GC) būdu. Nustatoma masių spektrometrijos būdu, taikant fragmentometriją SIM (pasirinktų jonų stebėjimo) režimu.

B. **Aparatūra ir chromatografijos sąlygos (pavyzdys)**

a) Dujų chromatograma ir masių spektrometras (GC/MS) ir, jeigu reikia, bandinio filtras ir duomenų apdorojimo arba jai tolygi sistema.

30 m (*) x 0,25 mm vidinio skersmens lydyto silicio kapiliarinis stulpelis, 0,25 μm Carbowax 20M

Veikimas:180 °C purkštuvas, helio dujų kreiptuvas (1 ml per minutę, esant 25 °C), purškimas neskaidomu būdu.

Temperatūros planas: 0,75 minutės 40 °C, po to 10 °C per minutę greičiu pakyla iki 60 °C, o po to po 3 °C per minutę iki 150 °C (**) temperatūros, pakyla iki 220 °C temperatūros ir laikosi 4,25 minutės. Etilo karbamido specifinis sulaikymo laikas – nuo 23 iki 27 minučių, propilo karbamido – nuo 27 iki 31 minutės.

Dujų chromatogramos ir spektrometro (GC/MS) sąsaja: 220 °C perdavimo linija. Masių spektrometro parametrai nustatyti su perfluoro tributilaminu ir geriausiai pritaikytas mažesniam masės jautrumui, SIM duomenų rinkimo režimas, tirpiklio sulaikymo ir duomenų rinkimo pradžios laikas 22 minutės, vieno jono duomenų priėmimo laikas 100 ms.

b) Vakuuminis rotacinis garintuvas arba danų gamybos Kuderna pobūdžio sodrinimo sistema.

(*NB* etilo karbamido regeneravimo iš bandomojo bandinio rodiklis C(g) proceso metu turi būti tarp 90 ir 110 %).)

c) Kolba – kriaušės formos, 300 ml talpos, vienas šlifuotas kaklelis.

d) Sodrinimo vamzdis – 4 ml, graduotas, su teflonu dengta jungtimi ir kamščiu.

C. **Reagentai**

a) Acetonas – LC kokybės

(*NB* Kiekvieną partiją prieš taikant GC/MS reikia patikrinti, ar nėra aptinkamų m/z 62, 74 ir 89 jonų.)

b) Dichlormetanas

(*NB* Kiekvieną partiją, prisodrinus 200 kartų, prieš taikant GC/MS, reikia ištirti ir patikrinti, ar nėra aptinkamų m/z 62, 74 ir 89 jonų.)

c) Etanolis – grynas (be vandens)

(*) Tam tikriems ypaè sodrintiems vynams pageidaujamas 50 m ilgio kapiliarinis stulpelis.
(**) Tam tikriems ypaè sodrintiems vynams pageidaujamas 2 °C per minutæ temperatûros planas.

d) Etilo karbamido (EB) – standartiniai tirpalai

1. Pradinis tirpalas – 1,00 mg/ml. 100 mg (grynumas 99 %) EB pasveriama 100 ml matavimo kolboje ir praskiedžiama acetonu.

2. Standartinis darbinis tirpalas – 10,0 µg/ml. 1 ml EB pagrindinio tirpalo perpilama į 100ml matavimo kolbą ir praskiesti acetonu iki paženklintos ribos.

e) Propilo karbamido (PC) standartiniai tirpalai

1. Pradinis tirpalas – 1,00 mg/ml. 100 mg PC (reagento kokybės) pasveriama 100 ml matavimo kolboje ir praskiedžiama acetonu iki paženklintos ribos.

2. Standartinis darbinis tirpalas – 10,0 µg/ml. 1 ml PC pagrindinio tirpalo perpilama į 100 ml matavimo kolbą ir praskiedžiama acetonu iki paženklintos ribos.

3. Vidinis standartinis PC tirpalas – 400 ng/ml. 4 ml standartinio PC tirpalo perpilama į 100 ml matavimo kolbą ir praskiedžiama vandeniu iki paženklintos ribos.

f) Standartinio kalibravimo EB – PC tirpalai

EB standartinis darbinis tirpalas (žr. d punkto 2 papunktį) ir PC standartinis darbinis tirpalas (žr. e punkto 2 papunktį) praskiedžiami dichlormetanu, paruošiant tokius tirpalus:

1. (100 ng EB ir 400 ng PC)/ml;
2. (200 ng EB ir 40 ng PC)/ml;
3. (400 ng EB ir 400 ng PC)/ml;
4. (800 ng EB ir 400 ng PC)/ml;
5. (1 600 ng EB ir 400 ng PC)/ml.

g) Bandomasis bandinys – 100 ng EB/ml 40 % etanolio.

1 ml standartinio darbinio EB tirpalo (žr. d punkto 2 papunktį) perpilama į 100 ml matavimo kolbą ir iki pažymėtos ribos praskiedžiama 40 % etanoliu.

h) Kietos fazės ekstrakcijos stulpelis – vienkartinė medžiaga, fasuota su diatomitu, 50 ml talpos

NB prieš pradedant analizę, reikia pažiūrėti, kiek iš kiekvienos ekstrakcijos stulpelių partijos regeneruojama EB ir PC ir patikrinti, ar nėra aptinkamų m/z 62, 74 ir 89 jonų. Bandomajam bandiniui paruošiama 100 ng EB/ml (žr. g punktą). 5,00 ml bandomojo bandinio analizė aprašyta D poskyrio a punkte, E poskyryje ir F poskyryje. Jeigu regeneruojama nuo 90 iki 110 ng EB/ml, toks rezultatas yra patenkinamas. Sugėrikliai, kurių dalelyčių skersmenys yra nevienodi, gali sulėtinti srautą, o tai turės įtakos EB ir PC regeneravimui. Jeigu po kelių bandymų nepavyksta atgauti nuo 90 iki 110 % bandomojo bandinio dydžio, reikėtų pakeisti stulpelį arba įvertinant EB kiekį naudotis pakoreguota kalibracine regeneracijos kreive. Norint gauti pakoreguotą kalibracinę kreivę, pagal f punkto aprašą paruošiamas standartinis tirpalas, tik vietoje dichlormetano naudojamas 40 % etanolis.

Pagal D, E ir F poskyrių aprašą atliekama 1 ml standartinės kalibravimo tirpalo analizė.

Pagal ekstrahuotų standartų EB ir PC proporciją sudaroma nauja kalibracinė kreivė.

D. **Bandomojo bandinio paruošimas**

Į dvi atskiras 100 ml menzūras supilami tokie bandomosios medžiagos tūriai:

a) vynų, turinčių daugiau kaip 14 % alkoholio: 5,00 ± 0,01 ml;

b) vynų, turinčių ne daugiau kaip 14 % alkoholio: 20,00 ± 0,01 ml.

Į kiekvieną menzūrą įpilama po 1 ml standartinio vidinio PC tirpalo (žr. C poskyrio e punkto 3 papunktį) ir vandens, kad bendras tūris būtų 40 ml (arba 40 g).

E. **Ekstrahavimas**

Ekstrahavimas turi būti atliekamas po ekstrahavimo gaubtu, esant tinkamai ventiliacijai.

Pagal D poskyrio nuostatas paruoštas bandinys perpilamas į ekstrahavimo stulpelį.

Menzūra praskalaujama 10 ml vandens, o skalavimui panaudotas vanduo perpilamas į stulpelį.

Skystis paliekamas kelioms minutėms, kad galėtų sugerti. Sugertos medžiagos išplaunamos 2 x 80 ml dichlormetano. Eliuatas surenkamas 300 ml talpos kūginėje kolboje.

Nuo 2 iki 3 ml eliuoto išgarinama rotaciniu garintuvu vandens vonioje, esant 30 °C. (*NB:* negalima leisti, kad viskas išgaruotų sausai.)

Likučių koncentratas Pastero pipete pernešamas į graduotą 4 ml vamzdelį.

Kolba praskalaujama 1 ml dichlormetano, o skalavimui panaudotas skystis supilamas į vamzdelį. Bandinys sodrinamas po silpna azoto srovele iki 1 ml.

Jei būtina, koncentratą galima perkelti į automatinio bandinių rinktuvo kolbą GC/MS analizei atlikti.

F. **GC/MS analizė**

a) Kalibracinė kreivė

Po 1 µl kiekvieno standartinio kalibravimo skysčio (žr. C poskyrio f punktą) įšvirkščiama į GC/MS. Nubraižoma EB ir PC santykio lauko kreivė, vertikalioje ašyje žymint m/z 62 joną, o horizontalioje – EB kiekį ng/ml (100, 200, 400, 800, 1 600 ng/m).

b) EB kiekio įvertinimas

1 µl pagal E poskyrį paruošto ekstrakto įšvirkščiamas į GC/MS sistemą ir apskaičiuojamas EB ir PC lauko santykis, esant m/z 62 jonui. Naudojantis vidinio standartinio kalibravimo kreive, nustatoma EB koncentracija (ng/ml). EB kiekį ekstrakte (ng) padalijus iš bandomojo bandinio tūrio (ml), apskaičiuojama EB koncentracija (ng/ml).

c) EB tapatumo patvirtinimas

Nustatoma, ar EB sulaikymo laikotarpiu fiksuojami m/z 62, 74 ir 89 jonai. Tokie aptikimai būdingi atitinkamai fragmentams $(M - C2H2)^+$ ir $(M - CH3)^+$ ir molekuliniam jonui $(M)^+$. EB buvimas patvirtinamas, jeigu šių jonų santykinės proporcijos neviršija 20 % EB standarto proporcijų. Norint pakankamai gerai aptikti m/z 89 joną, gali prireikti toliau sodrinti ekstraktą.

G. **Tarplaboratorinė analizė**

Lentelėje parodyti faktinio dalelių srauto bandinio ir abiejų vyno rūšių atskiri rezultatai.

Cochrano testo metu buvo atmesta tik viena rezultatų pora iš dviejų skirtingų laboratorijų: daugiau kaip 14 % alkoholio turinčio vyno ir 14 % arba mažiau alkoholio turinčio vyno.

Didėjant etilo karbamido koncentracijai, santykinis atkuriamumas (RSDR) yra linkęs mažėti.

Etilo karbamido EB alkoholiniuose gėrimuose nustatymo GC/MS metodu apibûdinimas

Bandinys	Vidutinis aptikto EB kiekis (ng/ml)	Pridėto EB regeneracija (%)	Sr	SR	RSDr (%)	RSDR (%)
Vynai, turintys daugiau kaip 14 % alkoholio	40		1,59	4,77	4,01	12,02
	80	89	3,32	7,00	4,14	8,74
	162	90	8,20	11,11	5,05	6,84
Vynai, turintys 14 % arba mažiau alkoholio	11		0,43	2,03	3,94	18,47
	25	93	1,67	2,67	6,73	10,73
	48	93	1,97	4,25	4,10	8,86