31999R0761

KOMISIJAS REGULA (EK) Nr. 761/1999

(1999. gada 12. aprīlis),

ar kuru groza Regulu (EEK) Nr. 2676/90, kurā ir noteiktas Kopienas metodes vīnu analīzei

EIROPAS KOPIENU KOMISIJA,

ņemot vērā Eiropas Kopienas dibināšanas līgumu,

ņemot vērā Padomes 1987. gada 16. marta Regulu (EEK) Nr. 822/87 par vīna tirgus kopīgo organizāciju [1], kurā jaunākie grozījumi izdarīti ar Regulu (EK) Nr. 1627/98 [2], un jo īpaši tās 74. pantu,

tā kā Komisijas Regulas (EEK) Nr. 2676/90 [3], kurā jaunākie grozījumi izdarīti ar Regulu (EK) Nr. 822/97 [4], pielikumā ir aprakstītas analīzes metodes; tā kā D-ābolskābes analīzes metode, kas aprakstīta 20. nodaļā, ir izrādījusies mazliet neprecīza, un ir izstrādāta jauna, precīzāka, metode; tā kā ir izstrādāta jauna metode cianīdu atvasinājumu analīzei, kas ir jutīgāka un vieglāk piemērojama, un tā kā starptautiskā līmenī ir izstrādāta jauna metode etilkarbamāta noteikšanai vīnā; tā kā minētās trīs metodes ir apstiprinātas saskaņā ar starptautiski atzītiem kritērijiem; tā kā šādu metožu izmantošana var nodrošināt labāku vīna kvalitātes un īstuma kontroli un novērš strīdus, kas rodas, ja tiek piemērotas novecojušas un mazliet neuzticamas analīzes metodes; tā kā jauno metožu aprakstus ir apstiprinājis Starptautiskais Vīnogu un vīna birojs; tā kā tie būtu jāiestrādā nolikumā;

tā kā šajā nolikumā paredzētie pasākumi saskan ar Vīnu pārvaldības komitejas atzinumu,

IR PIEŅĒMUSI ŠO REGULU.

1. pants

Ar šo Regulas (EEK) Nr. 2676/90 pielikumu groza šādi:

1. 20. nodaļu (D-ābolskābe) aizvieto ar šīs regulas I pielikumu.
2. 38. nodaļu (Cianīdu atvasinājumi) aizvieto ar šīs regulas II pielikumu.
3. Šīs regulas III pielikumu pievieno kā 44. nodaļu.

2. pants

Šī regula stājas spēkā septītajā dienā pēc tās publicēšanas *Eiropas Kopienu Oficiālajā Vēstnesī*.

Šī regula uzliek saistības kopumā un ir tieši piemērojama visās dalībvalstīs.

Briselē, 1999. gada 12. aprīlī

Komisijas vārdā –

Komisijas loceklis

Franz FISCHLER

---

[1] OV L 84, 27.3.1987., 1. lpp.
[2] OV L 210, 28.7.1998., 10. lpp.
[3] OV L 272, 3.10.1990., 1. lpp.
[4] OV L 117, 7.5.1997., 10. lpp.

I PIELIKUMS

"20. **D-ĀBOLSKĀBE**

(fermentatīvā metode)

1. PRINCIPS

D-malāta dehidrogenāzes (D-MDH) klātbūtnē, D-ābolskābi (D-malātu) nikotinamīda adenīna dinukleotīds (NAD) oksidē par oksalacetātu. Izveidojies oksalacetāts sadalās piruvātā un oglekļa dioksīdā.

$$\text{D-malāts} + NAD^+ \xrightleftharpoons{\text{D-MDH}} \text{piruvāts} + CO_2 + NADH + H^+$$

Izveidojies NADH daudzums ir proporcionāls D-ābolskābes koncentrācijai un to mēra pie viļņu garuma 334, 340 vai 365 nm.

2. REAĢENTI

Testa kombinācija apmēram 30 noteikšanām:

a) pudele 1 ar apmēram 30 ml šķīduma, kas sastāv no Hepes buferšķīduma [N-(2-hidroksietil)piperazīna-N'-2-etān-sulfoskābes] pH = 9,0 un stabilizētājiem;

b) pudele 2 ar apmēram 210 mg NAD liofilizāta;

c) trīs pudeles 3 ar D-MDH liofilizātu, apmēram 8 U katra.

Šķīdumu sagatavošana

1. Izmantot pudeles 1 saturu neatšķaidītu. Pirms izmantošanas uzsildīt šķīdumu līdz 20 – 25 °C.

2. Izšķīdināt pudeles 2 saturu 4 ml divkārt destilēta ūdens.

3. Izšķīdināt vienas no pudelēm 3 saturu 0,6 ml divkārt destilēta ūdens. Pirms izmantošanas uzsildīt šķīdumu līdz 20 – 25 °C.

Šķīdumu stabilitāte

Pudeles 1 saturs ir stabils vismaz vienu gadu, ja to uzglabā pie + 4 °C; šķīdums 2 ir stabils trīs nedēļas, ja to uzglabā pie + 4 °C, un divus mēnešus, ja to uzglabā pie – 20 °C; šķīdums 3 ir stabils piecas dienas, ja to uzglabā pie + 4 °C.

3. APARATŪRA

3.1. Spektrofotometrs, ar ko var izdarīt mērījumus pie 340 nm – viļņu garuma, pie kura NADH optiskais blīvums ir maksimāls. Ja tāda nav, tad var izmantot spektrofotometru ar pārtraukta spektra avotu, ar ko var veikt mērījumus pie 334 vai 365 nm. Tā kā ir iesaistīti absolūtie mērījumi (tas ir, nav kalibrācijas šķīdumu komplekta, bet salīdzina ar NADH ekstinkcijas koeficientu), tad ir jāpārbauda aparāta viļņu garumu skalas un spektrālā absorbcija.

3.2. Stikla kivetes ar 1 cm garu optisko ceļu (ja dod priekšroku vienreizējas lietošanas kivetēm, tad tās var izmantot).

3.3. Mikropipetes tilpumu pipetēšanai diapazonā no 0,01 līdz 2 ml.

4. PARAUGA SAGATAVOŠANA

D-malāta analīzi parasti veic tieši vīnā, bez iepriekšējas atkrāsošanas.

D-malāta daudzumam kivetē būtu jābūt no 2 līdz 50 µg. Vīnam līdz ar to jābūt atšķaidītam, lai iegūtu D-malāta koncentrāciju attiecīgi no 0,02 līdz 0,5 g/l vai no 0,02 līdz 0,3 g/l (atkarībā no izmantotā aparāta).

Atšķaidījuma tabula:

Aptuveni aprēķinātais D-malāta daudzums litrā		Atšķaidījums ar ūdeni	Atšķaidījuma koeficients F
Mērīts pie:			
340 vai 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. PROCEDŪRA

Ar spektrofotometru, kas noregulēts uz viļņu garumu 340 nm, noteikt absorbciju, izmantojot 1 cm kivetes, vai nu nulles absorbcijas nostādīšanai izmantojot gaisu (bez kivetes optiskajā ceļā), vai izmantojot ūdeni.

Iepipetēt kivetēs:

	Standarts	Tests
Šķīdums 1	1,00 ml	1,00 ml
Šķīdums 2	0,10 ml	0,10 ml
Divkārt destilēts ūdens	1,80 ml	1,70 ml
Paraugs mērīšanai	–	0,10 ml

Samaisīt un apmēram pēc sešām minūtēm izmērīt absorbciju standarta un testa šķīdumiem (A_1).

Pievienot:

	Standarts	Tests
Šķīdums 3	0,05 ml	0,05 ml

Samaisīt un tad pagaidīt, līdz reakcija ir beigusies (apmēram 20 minūtes), un izmērīt absorbciju standarta un testa šķīdumiem (A_2).

Aprēķināt absorbciju starpību ($A_2 - A_1$) standarta (ΔA_T) un testa (ΔA_E) šķīdumiem. Beidzot aprēķināt starpību starp šīm starpībām: $\Delta A = \Delta A_E - \Delta A_T$.

Piezīme: Laiks, kas vajadzīgs, *lai beigtos fermentu aktivitāte, var būt atšķirīgs dažādām partijām. Iepriekš minētais laiks ir dots tikai kā norāde, un tiek ieteikts to pārbaudīt katrai partijai.*

D-ābolskābe reaģē ātri. Ferments pārveido arī L-vīnskābi, kaut arī daudz lēnāk. Tas izskaidro nelielo blakusreakciju, kuru var koriģēt ar ekstrapolāciju (sk. A pielikumu).

6. REZULTĀTU IZTEIKŠANA

Vispārīgā formula koncentrācijas mg/l aprēķināšanai ir:

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

kur:

V = testa šķīduma tilpums ml (2,95 ml)

v = parauga tilpums ml (0,1 ml)

PM = nosakāmās vielas molekulas masa (D-ābolskābei, PM = 134,09)

d = kivetes optiskais ceļš cm (1 cm)

ε = NADH absorbcijas koeficients:

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

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

pie 334 nm = 6,18 (1 $mmol^{-1}$ cm^{-1})

Ja paraugs sagatavošanas laikā tika atšķaidīts, tad rezultāts jāpareizina ar atšķaidījuma koeficientu.

D-ābolskābes koncentrāciju izsaka miligramos litrā (mg/l), bez cipariem aiz komata.

7. PRECIZITĀTE

Sīka informācija par metodes precizitātes starplaboratoriju pārbaudi ir apkopota B papildinājumā. Lielumus, kas iegūti starplaboratoriju pārbaudē, nedrīkst piemērot citiem analizējamo vielu koncentrācijas diapazoniem un matricām, kā vien tām, kas minētas B papildinājumā.

7.1. **Atkārtojamība.**

Absolūtā starpība starp diviem individuāliem rezultātiem, kas iegūti no identiska materiāla, ko pārbaudei iesniedzis operators, kas izmanto vienu un to pašu aparātu, īsākajā laika intervālā, nepārsniegs atkārtojamības lielumu r vairāk nekā 5 % gadījumu.

r = 11 mg/l.

7.2. **Reproducējamība.**

Absolūtā starpība starp diviem individuāliem rezultātiem, kas iegūti no identiska materiāla, kas iesniegts pārbaudei divās dažādās laboratorijās, nepārsniegs reproducējamības lielumu R vairāk nekā 5 % gadījumu.

R = 20 mg/l.

8. KOMENTĀRI

Ņemot vērā metodes precizitāti, D-ābolskābes lielumi zem 50 mg/l būtu vajadzības gadījumā jāapstiprina ar kādu citu analītisko metodi, izmantojot kādu citu mērīšanas principu, tādu kā *Przyborski et. al.* (*Mitteilungen Klosterneuburg* 43, 1993; 215-218. 1993).

Vīna paraugam kivetē nevajadzētu pārsniegt 0,1 ml, lai izvairītos no iespējas, ka fermentu aktivitāti kavē polifenoli.

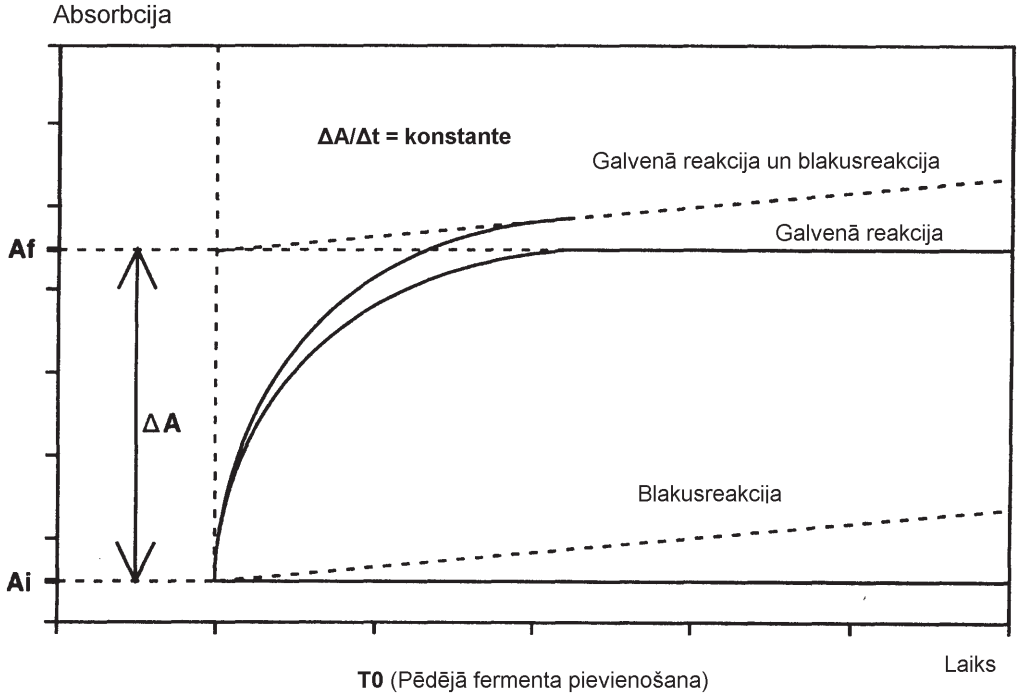
A papildinājums

Kā rīkoties blakusreakciju gadījumā

Blakusreakcijas parasti rodas no fermentu sekundārajām reakcijām, no citu fermentu klātbūtnes parauga matricē vai no viena vai vairāku matrices elementu mijiedarbības ar kofermentu fermentatīvajā reakcijā.

Parastā reakcijā absorbcija sasniedz konstantu lielumu pēc zināma laika, parasti pēc 10 līdz 20 minūtēm, atkarībā no specifiskās fermentatīvās reakcijas ātruma. Tomēr, ja notiek sekundāra reakcija, tad absorbcija nesasniedz konstantu lielumu, bet pastāvīgi palielinās laikā. Šo procesa veidu parasti sauc par "blakusreakciju".

Kad notiek blakusreakcija, tad šķīduma absorbcija būtu jāmēra ar regulāriem starplaikiem (katras divas līdz piecas minūtes) pēc tam, kad beigu absorbcijas sasniegšanai vajadzīgais laiks ir beidzies. Ja absorbcija palielinās vienmērīgi, būtu jāveic pieci vai seši mērījumi, un jāekstrapolē atpakaļ, izmantojot diagrammu vai aprēķinu, lai noteiktu absorbciju, kas būtu novērota, kad tika pievienots pēdējais ferments (T0). Substrāta koncentrāciju aprēķina, pamatojoties uz absorbcijas starpību, ko ekstrapolēja tajā laikā (Af – Ai).



1. zīmējums. Blakusreakcija

B papildinājums

Starplaboratoriju pārbaudes statistiskie rezultāti

Starplaboratoriju pārbaudes gads: 1995

Laboratoriju skaits: 8

Paraugu skaits: 5 ar D-ābolskābes piedevu

Paraugs	A	B	C	D	E
To laboratoriju skaits, kas paturētas pēc to laboratoriju atskaitīšanas, kas iesniedza kļūdainus rezultātus	7	8	7	8	7
Laboratoriju skaits, kas iesniedza kļūdainus rezultātus	1	–	1	–	1
Pieņemto rezultātu skaits	35	41	35	41	36
Vidējais lielums ($\bar{\chi}$)(mg/l)	161,7	65,9	33,1	106,9	111,0
Atkārtojamības standartnovirze (s_r) (mg/l)	4,53	4,24	1,93	4,36	4,47
Atkārtojamības relatīvā standartnovirze (RSD_r) (%)	2,8	6,4	5,8	4,1	4,00
Atkārtojamības robeža (r) (mg/l)	12,7	11,9	5,4	12,2	12,5
Reprodukcējamības standartnovirze (s_R) (mg/l)	9,26	7,24	5,89	6,36	6,08
Reprodukcējamības relatīvā standartnovirze (RSD_R) (%)	5,7	11	17,8	5,9	5,5
Reprodukcējamības robeža (R) (mg/l)	25,9	20,3	16,5	17,8	17,0

Paraugu veidi:

A: sarkanvīns; B: sarkanvīns; C: baltvīns; D: baltvīns; E: baltvīns;"

II PIELIKUMS

"38. **CIANĪDU ATVASINĀJUMI**

(*Brīdinājums*: ievērot drošības pasākumus, rīkojoties ar ķimikālijām hloramīnu T, piridīnu, kālija cianīdu, sālsskābi un fosforskābi. Atbrīvoties no izmantotajām vielām pienācīgā veidā saskaņā ar spēkā esošajiem apkārtējās vides aizsardzības likumiem. Sargāties no ciānūdeņražskābes, kas atbrīvota paskābināta vīna destilācijas laikā.)

1. PRINCIPS

Kopējo brīvo ciānūdeņražskābi vīnā atbrīvo skābā hidrolīze un atdala destilējot. Pēc reakcijas ar hloramīnu-T un piridīnu izveidojušos glutakondialdehīdu nosaka ar kolorimetriju, pamatojoties uz zilo krāsojumu, ko tas dod ar 1,3-dimetil-barbitūrskābi.

2. APARATŪRA

2.1. **Destilācijas aparāts.**

Izmantot destilācijas aparātu, kas aprakstīts spirta satura noteikšanai vīnā.

2.2. 500-ml apaļkolba ar standartizētiem pieslīpētiem savienojumiem.

2.3. Ūdens vanna, termostatējama pie 20 °C.

2.4. Spektrofotometrs, ar ko var mērīt absorbciju pie viļņu garuma 590 nm.

2.5. Stikla kivetes vai vienreizējas izmantošanas kivetes ar 20 mm optisko ceļu.

3. REAĢENTI

3.1. Fosforskābe (H_3PO_4) 25 % (masa/tilp.).

3.2. Hloramīna-T šķīdums ($C_7H_7ClNNa\ O_2S,\ 3H_2O$) 3 % (masa/tilp.).

3.3. 1,3-dimetilbarbitūrskābes šķīdums: izšķīdināt 3,658 g 1,3-dimetilbarbitūrskābes ($C_6H_8N_2O_3$) 15 ml piridīna un 3 ml sālsskābes (ρ_{20} = 1,19 g/ml) un pievienot 50 ml destilēta ūdens.

3.4. Kālija cianīds (KCN).

3.5. Kālija jodīda (KI) šķīdums 10 % (masa/tilp.).

3.6. Sudraba nitrāta šķīdums ($AgNO_3$), 0,1 M.

4. PROCEDŪRA

4.1. **Destilācija.**

Ievietot 25 ml vīna, 50 ml destilēta ūdens, 1 ml fosforskābes (3.1) un dažas stikla pērlītes 500-ml kolbā (2.2). Nekavējoties novietot kolbu uz destilācijas aparāta. Izmantot konisku caurulīti, lai ievadītu destilātu 50-ml mērkolbā, kurā atrodas 10 ml ūdens. Iegremdēt mērkolbu ledus un ūdens maisījumā. Savākt 30 līdz 35 ml destilāta (vai apmēram 45 ml šķidruma kopumā) mērkolbā.

Izskalot dzesinātāja konisko caurulīti ar dažiem mililitriem destilēta ūdens, uzsildīt destilātu līdz 20 °C un uzpildīt līdz zīmei ar destilētu ūdeni.

4.2. **Mērījums.**

Ievietot 25 ml destilāta 50-ml konusveida kolbā ar pieslīpētu aizbāzni, pievienot 1 ml hloramīna-T šķīduma (3.2) un noslēgt ar aizbāzni. Tieši pēc 60 sekundēm pievienot 3 ml 1,3-dimetil-barbitūrskābes šķīduma (3.3), noslēgt ar aizbāzni un atstāt uz 10 minūtēm. Tad izmērīt absorbciju pret salīdzināšanas šķīdumu (25 ml destilēta ūdens 25 ml destilāta vietā) pie viļņu garuma 590 nm kivetēs ar 20 mm optisko ceļu.

5. KALIBRĀCIJAS LĪKNES NOTEIKŠANA

5.1. **Kālija cianīda argentometriskā titrēšana.**

Izšķīdināt apmēram 0,2 g rūpīgi nomērīta KCN (3.4) 100 ml destilēta ūdens 300-ml mērkolbā. Pievienot 0,2 ml kālija jodīda šķīduma (3.5) un titrēt ar 0,1 M sudraba nitrāta šķīdumu (3.6), līdz iegūst stabilu dzeltenīgu krāsojumu.

Ņemot 1 ml 0,1 M sudraba nitrāta šķīduma kā atbilstošu 13,2 mg KCN, aprēķināt KCN parauga koncentrāciju.

5.2. **Standartlīkne.**

5.2.1. *Standartšķīdumu sagatavošana.*

Pēc KCN koncentrācijas noteikšanas saskaņā ar procedūru, kas izklāstīta 5.1. punktā, sagatavot standartšķīdumu, kas satur 30 mg/l ciānūdeņražskābes (30 mg HCN ≡ 72,3 mg KCN). Atšķaidīt šķīdumu attiecībā 1/10.

Ievadīt 1,0 ml, 2,0 ml, 3,0 ml, 4,0 ml un 5,0 ml atšķaidītā parauga šķīduma 100-ml mērkolbās un uzpildīt līdz zīmei ar destilētu ūdeni. Sagatavotie šķīdumi satur attiecīgi 30 µg, 60 µg, 90 µg, 120 µg un 150 µg ciānūdeņražskābes litrā.

5.2.2. *Titrēšana.*

Paņemt tādējādi iegūto šķīdumu 25-ml paraugus un turpināt, kā norādīts iepriekš 4.1. un 4.2. punktā.

Absorbcijas lielumiem, kas iegūti attiecībā pret standartšķīdumiem kā ciānūdeņražskābes atbilstošās koncentrācijas funkcija, vajadzētu veidot taisnu līniju, kas iet caur koordinātu sākuma punktu.

6. REZULTĀTU IZTEIKŠANA

Ciānūdeņražskābi izsaka mikrogramos litrā (µg/l) bez cipariem aiz komata.

6.1. **Aprēķina metode.**

Nolasīt ciānūdeņražskābes saturu uz kalibrācijas līknes. Ja paraugs ir atšķaidīts, tad pareizināt rezultātu ar atšķaidījuma koeficientu.

Atkārtojamība (r) un reproducējamība (R)

Baltvīns = r = 3,1 µg/l vai apmēram 6 %· x_i

R = 12 µg/l vai apmēram 25 %· x_i

Sarkanvīns = r = 6,4 µg/l vai apmēram 8 %· x_i

R = 23 µg/l vai apmēram 29 %· x_i

x_i = HCN vidējā koncentrācija vīnā

x_i = 48,4 µg/l baltvīnam

x_i = 80,5 µg/l sarkanvīnam.”

III PIELIKUMS

44.

ETILKARBAMĀTA NOTEIKŠANA VĪNĀ: SELEKTĪVĀ NOTEIKŠANAS METODE, IZMANTOJOT GĀZU HROMATOGRĀFIJU/MASSPEKTROMETRIJU

(Piemērojams etilkarbamāta noteikšanai koncentrācijām no 10 līdz 200 µg/l)

(*Brīdinājums*: ievērot drošības pasākumus, kas jāievēro, rīkojoties ar ķimikālijām, etanolu, acetonu un kancerogēniem produktiem (etilkarbamātu un dihlormetānu). No izmantotiem šķīdinātājiem atbrīvoties pareizā veidā saskaņā ar spēkā esošajiem apkārtējās vides aizsardzības noteikumiem).

A. **Princips**

Propilkarbamātu pievieno paraugam kā iekšējo standartu, šķīdumu atšķaida ar ūdeni un ievieto 50 ml cietās fāzes ekstrakcijas kolonnā. Etilkarbamātu un propilkarbamātu eluē ar dihlormetānu.

Eluātu koncentrē vakuuma rotācijas tvaicētājā. Koncentrātu analizē ar gāzu hromatogrāfiju (GH). Detektē ar masspektrometriju, izmantojot fragmentogrāfiju SIM (izvēlētā jona monitoringa – *selected ion monitoring*) režīmā.

B. **Aparāts un hromatogrāfijas apstākļi (piemērs)**

a) gāzu hromatogrāfs/masspektrometrs (GH/MS) un, ja vajadzīgs, parauga filtrs un datu apstrādes sistēma vai tai līdzvērtīga sistēma.

Kvarca kapilārā kolonna, 30 m (*) gara ar 0,25 mm iekšējo diametru, 0,25 µm *Carbowax* 20M.

Darbība: inžektors 180 °C, hēlija gāzes plūsmas ātrums 1 ml/minūtē pie 25 °C, iešļircināšana bez plūsmas dalīšanas.

Temperatūras programma: 40 °C 0,75 minūtes, pēc tam ceļ 10 °C/minūtē līdz 60 °C, tad 3 °C/minūtē līdz 150 °C (**), ceļ līdz 220 °C un uztur tādu temperatūru 4,25 minūtes. Īpatnējais aiztures laiks etilkarbamātam ir 23 līdz 27 minūtes, propilkarbamātam – 27 līdz 31 minūte.

Gāzu hromatogrāfa/masspektrometra (GH/MS) savienojums (*interface*): pārvades līnija 220 °C. Masspektrometra parametri ar roku noregulēti ar perfluortributilamīnu un optimizēti uz zemāku masu jutīgumu, SIM uzņemšanas veids, šķīdinātāju aiztures (*solvent delay*) un uzņemšanas sākuma laiks 22 minūtes, pirmsreģistrēšanas laiks uz jonu 100 ms;

b) vakuuma rotācijas tvaicētājs vai koncentrēšanas sistēma, līdzīga *Kuderna Danish* sistēmai;

(*NB:* etilkarbamāta atgūšanas attiecībai no testa parauga C(g) jābūt no 90 līdz 110 % procesa laikā.)

c) kolba – bumbierveida, 300 ml, viens pieslīpēts kakls;

d) koncentrēšanas mēģene – 4 ml, graduēta, ar teflonu pārklāts savienojums un aizbāznis.

C. **Reaģenti**

a) acetons – šķidrumu hromatogrāfijas kvalitātes;

(*NB:* pārbaudīt katru partiju pirms izmantošanas GH/MS, vai spektrā nav jonu ar m/z 62, 74 un 89.)

b) dihlormetāns;

(*NB:* izanalizēt katru partiju pirms izmantošanas GH/MS pēc 200-kārtīgas koncentrēšanas, lai pārbaudītu, vai spektrā nav jonu ar m/z 62, 74 un 89.)

c) etanols, bezūdens;

(*) Dažiem īpaši bagātiem vīniem var būt vēlama 50 m kapilārā kolonna.
(**) Dažiem īpaši bagātiem vīniem var būt vēlama temperatūras programma 2 °C/minūtē.

d) etilkarbamāta (EK) standartšķīdumi;

1. Sākuma šķīdums – 1,00 mg/ml. Nosvērt 100 mg EK (tīrība ≥ 99 %) 100 ml mērkolbā un atšķaidīt ar acetonu.

2. Standarta darba šķīdums – 10,0 µg/ml. Pārnest 1 ml sākuma EK šķīduma 100 ml mērkolbā un uzpildīt līdz zīmei ar acetonu;

e) propilkarbamāta (PK) standartšķīdumi;

1. Sākuma šķīdums – 1,00 mg/ml. Nosvērt 100 mg PK (reaģentu tīrības) 100 ml mērkolbā un uzpildīt ar acetonu līdz zīmei.

2. Standarta darba šķīdums – 10,0 µg/ml. Pārnest 1 ml PK sākuma šķīduma 100 ml mērkolbā un uzpildīt ar acetonu līdz zīmei.

3. Iekšējā standarta šķīdums EK – 400 ng/ml. Pārnest 4 ml standarta PK darba šķīduma 100 ml mērkolbā un uzpildīt ar ūdeni līdz zīmei;

f) standarta kalibrētie šķīdumi EK-PK

Atšķaidīt EK standarta darba šķīdumu d) 2. un PK standarta darba šķīdumu e) 2. ar dihlormetānu, lai iegūtu:

1) (100 ng EK un 400 ng PK)/ml;

2) (200 ng EK un 400 ng PK)/ml;

3) (400 ng EK un 400 ng PK)/ml;

4) (800 ng EK un 400 ng PK)/ml;

5) (1 600 ng EK un 400 ng PK)/ml;

g) testa paraugs – 100 ng EK/ml 40 % etanola;

Pārnest 1 ml EK standarta darba šķīduma d) 2. 100 ml mērkolbā un uzpildīt ar 40 % etanolu līdz zīmei;

h) cietās fāzes ekstrakcijas kolonna – vienreizējas lietošanas materiāls, iepriekš pakota ar diatomītu, tilpums 50 ml;

NB: Pirms analīzes pārbaudīt katru ekstrakcijas kolonnu partiju uz EK un PK atgūšanu un uz to, vai spektrā nav jonu ar 62, 74 un 89 m/z. Sagatavot 100 ng EK/ml testa parauga g). Izanalizēt 5,00 ml testa parauga, kā aprakstīts D a), E un F. No 90 līdz 110 ng EK/ml atgūšana ir apmierinoša. Absorbenti, kuru daļiņu diametrs ir neregulārs, var būt par cēloni lēnai plūsmai, kas ietekmē EK un PK atgūšanu. Ja pēc vairākiem mēģinājumiem netiek iegūts 90 līdz 110 % no testa parauga lieluma, tad mainīt kolonnu vai izmantot koriģētu atgūšanas kalibrēšanas līkni, lai kvantitatīvi noteiktu EK. Lai iegūtu koriģētu kalibrācijas līkni, sagatavot standarta šķīdumus, kā aprakstīts f), izmantojot 40 % etanolu dihlormetāna vietā.

Analizēt 1 ml standarta kalibrācijas šķīduma, kā aprakstīts D, E un F punktā.

Izveidot jaunu kalibrācijas līkni, izmantojot ekstrahēto standartu EK/PK attiecību.

D. **Testa parauga sagatavošana**

Ievietot šādus testa materiāla tilpumus divās atsevišķās 100 ml vārglāzēs:

a) vīnus, kas satur vairāk nekā 14 tilpuma % spirtu: 5,00 ± 0,01 ml;

b) vīnus, kas satur maksimāli 14 tilpuma % spirtu: 20,00 ± 0,01 ml.

Katrā vārglāzē pievienot l ml iekšējā standarta PK šķīduma C e) 3. un ūdeni, lai iegūtu kopējo tilpumu 40 ml (vai 40 g).

E. **Ekstrakcija**

Ekstrakcija būtu jāveic zem velkmes ar atbilstošu ventilāciju.

Pārnest paraugu, kas sagatavots, ievērojot D ekstrakcijas kolonnā.

Izskalot vārglāzi ar 10 ml ūdens un pārnest skalojamo ūdeni kolonnā.

Atstāt šķidrumu absorbēties četras minūtes. Skalot ar 2 x 80 ml dihlormetāna. Savākt eluātu 300 ml koniskajā kolbā.

Iztvaicēt eluātu no 2 līdz 3 ml ūdens vannas rotācijas tvaicētājā pie 30 °C. (NB: neļaut izvārīties sausam.)

Ar Pastēra pipeti pārnest koncentrēto atlikumu 4 ml graduētā mēģenē.

Izskalot kolbu ar 1 ml dihlormetāna un pārnest skalojamo šķidrumu mēģenē. Koncentrēt paraugu līdz 1 ml vājā slāpekļa plūsmā.

Vajadzības gadījumā pārnest koncentrātu automātiskā paraugu nomainītāja kolbā GH/MS analīzei.

F. **GH/MS analīze**

a) kalibrācijas līkne;

Iešļircināt 1 µl katra standarta kalibrācijas šķīduma C f) GH/MS sistēmā. Uzzīmēt diagrammu, kur EK-PK m/z 62 jona pīķa laukuma attiecība atlikta uz vertikālās ass un EK daudzums ng/ml – uz horizontālās ass (100, 200, 400, 800, 1 600 ng/ml);

b) EK daudzuma noteikšana;

1 µl koncentrēta ekstrakta, kas sagatavots saskaņā ar E, iešļircināt GH/MS sistēmā un aprēķināt EK-PK pīķa laukuma attiecību m/z 62 jonam. Noteikt EK koncentrāciju (ng/ml) ekstraktā, izmantojot iekšējā standarta kalibrācijas līkni. Aprēķināt EK koncentrāciju testa paraugā (ng/ml), dalot EK daudzumu (ng) ekstraktā ar testa parauga tilpumu (ml).

c) EK identitātes apstiprināšana;

Noteikt, vai EK aiztures laikā spektrā parādās joni ar m/z 62, 74 un 89. Tādu jonu parādīšanās ir attiecīgi galveno fragmentu $(M - C_2H_2)^+$ un $(M - CH_3)^+$ un molekulārā jona $(M)^+$ īpašība. EK klātbūtne ir apstiprināta, ja tādu jonu intensitāšu attiecības 20 % robežās sakrīt ar šo jonu intensitāšu attiecībām EK standarta spektrā. Iespējams, ka ekstraktu vajag vēl koncentrēt, lai iegūtu pietiekami intensīvu jona m/z 89 pīķi.

G. **Kolaboratīvā analīze**

Tabulā ir norādīti individuālie rezultāti praktiskam "līdznešanas" paraugam un abiem vīna veidiem.

Kohrana testa rezultātā tika izņemts tikai viens rezultātu pāris – vīnam ar spirta saturu virs 14 tilpuma % un vīnam ar spirta saturu 14 tilpuma % vai mazāk – no divām dažādām laboratorijām.

Relatīvajai reproducējamībai (RSD_R) tendence ir samazināties līdz ar etilkarbamāta koncentrācijas palielināšanos.

Izpilde etilkarbamāta EK noteikšanai alkoholiskajos dzērienos ar GH/MS metodi

Paraugs	Vidējais atrastais EK (ng/ml)	Pievienotā EK atgūšana (%)	S_r	S_R	RSD_r (%)	RSD_R (%)
Vīni > 14 % tilpuma	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
Vīni ≤ 14 % tilpuma	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